



HAL
open science

Congélation et maturation in vitro de tissu testiculaire de rats prépubères.

Justine Saulnier

► **To cite this version:**

Justine Saulnier. Congélation et maturation in vitro de tissu testiculaire de rats prépubères.. Endocrinologie et métabolisme. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR014 . tel-04199201

HAL Id: tel-04199201

<https://theses.hal.science/tel-04199201>

Submitted on 7 Sep 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la vie et de la santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Congélation et maturation *in vitro* de tissus testiculaires de rats prépubères

Présentée et soutenue par
Justine SAULNIER

Thèse soutenue publiquement le 8 Juin 2021
devant le jury composé de

Mme Marie SAINT-DIZIER	PR – Université de Tours	Examineur
Mme Aurélie LARDENOIS	MCF – Université de Rennes	Examineur
Mr Frédéric CHALMEL	DR – Université de Rennes	Examineur
Mme Catherine METZLER-GUILLEMAIN	PU-PH – Université Aix-Marseille	Rapporteur
Mr Marius TELETIN	MCU-PH – Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme Christine RONDANINO	MCF – Université de Rouen Normandie	Co-encadrant de thèse
Mme Nathalie RIVES	PU-PH – Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Pr. Nathalie RIVES et co-encadrée par le Dr. Christine RONDANINO,
EA4308 Gamétogenèse et Qualité du Gamète, 22 Boulevard Gambetta – UFR Santé, 76183 ROUEN

*A mes parents,
A mes grands-parents,
Et à toute ma famille,*

Résumé : Congélation et maturation *in vitro* de tissus testiculaires de rats prépubères

La préservation de la fertilité des enfants présentant un cancer est depuis plusieurs années devenue une étape importante dans la prise en charge de la qualité de vie après le cancer. La chimiothérapie et la radiothérapie utilisées dans le traitement du cancer peuvent entraîner une infertilité à l'âge adulte. Un protocole de congélation lente contrôlée mis au point au sein du laboratoire permet actuellement de préserver la structure et la fonctionnalité du tissu testiculaire de ces enfants. Afin de restaurer la fertilité de ces patients, différentes méthodes de maturation *in vitro* du tissu testiculaire prépubère ont vu le jour. La culture organotypique sur gel d'agarose permet d'obtenir une spermatogenèse complète à partir de tissus testiculaires prépubères de souris. Cependant, un blocage de la spermatogenèse est observé lorsque ce même protocole est utilisé chez le rat ou chez l'homme. Le rat, dont la durée de la spermatogenèse est intermédiaire entre la souris et l'homme, représente un modèle adéquat pour étudier ce blocage méiotique.

Après validation d'une procédure de congélation chez le rat prépubère, nous avons comparé l'effet de milieux de culture de composition différente sur la progression de la spermatogenèse *in vitro*. Nos résultats montrent une incapacité des milieux testés à soutenir une première vague complète de la spermatogenèse. Des analyses histologiques ont montré un maintien de la fonctionnalité des tissus testiculaires de rats prépubères en culture. Nos résultats suggèrent plutôt une incapacité des milieux de culture à soutenir la différenciation des cellules ayant initié leur méiose. Les analyses RNA-seq réalisées sur ces tissus mettent en évidence une dérégulation importante de l'expression des gènes en lien avec la spermatogenèse, la stéroïdogénèse ainsi que le processus inflammatoire.

Afin de pouvoir envisager une application chez l'homme, il est indispensable de continuer ces travaux par la réalisation de cultures séquentielles, permettant de mimer au mieux les conditions physiologiques, et par l'ajout de molécules anti-inflammatoires dans les milieux de culture. Par ailleurs, l'aplatissement des tissus entre une matrice de PDMS et un gel d'agarose pourrait être envisagé afin d'assurer une meilleure oxygénation et diffusion des nutriments au sein des explants tissulaires.

Mots clés : culture organotypique, spermatogenèse *in vitro*, arrêt de maturation, testicule prépubère, RNA-Seq

Abstract: Freezing and *in vitro* maturation of prepubertal rat testicular tissues

Fertility preservation in children treated for cancer has become an important criterion in the management of quality of life after cancer. Chemo- or radiotherapy treatments used in pediatric cancers can lead to infertility at adulthood. Protocols implemented in our laboratory currently allow the preservation of the structure and functionality of testicular tissue in these children by controlled slow freezing. In order to restore fertility in these patients, methods of *in vitro* maturation of prepubertal testicular tissue have emerged. The organotypic culture on agarose gel allows the completion of *in vitro* spermatogenesis from prepubertal mouse testicular tissues. However, a spermatogenic arrest is observed when the same protocol is used in rats or in humans. The rat, whose duration of spermatogenesis is intermediate between mouse and human, represents a suitable model to study this meiotic arrest.

After validation of the freezing procedures in prepubertal rats, we compared the effect of culture media of different composition on the progression of *in vitro* spermatogenesis. Our results show the inability of the tested media to support a complete spermatogenesis. Tissue analyses showed a maintenance of the functionality of prepubertal rat testicular tissues in culture. Our results rather suggest the inability of culture media to support the differentiation of cells that have initiated meiosis. RNA-seq analyses performed on these tissues revealed a significant deregulation of the expression of genes related to spermatogenesis, steroidogenesis and inflammatory process.

In order to consider a human application, it is essential to continue this work by performing sequential cultures to mimic the physiological conditions as closely as possible, and by adding anti-inflammatory molecules in culture media. Moreover, the flattening of tissues between a PDMS matrix and an agarose gel could be envisaged to allow a better oxygenation and diffusion of nutrients within the tissue explants.

Keywords: organotypic culture, *in vitro* spermatogenesis, maturation arrest, prepubertal testis, RNA-Seq

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier Madame le **Professeur Catherine Metzler-Guillemain** et Monsieur le **Docteur Marius Teletin** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie également, Madame le **Professeur Marie Saint-Dizier**, Madame le **Docteur Aurélie Lardenois** et Monsieur le **Docteur Frédéric Chalmel** pour avoir accepté d'assister à ma soutenance de thèse en tant qu'examineurs.

Madame le **Professeur Nathalie Rives**,

Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser mon doctorat au sein de votre équipe et sous votre direction. Je vous remercie également pour vos conseils et pour toutes les choses que vous avez pu faire pour m'aider à obtenir et poursuivre cette thèse. Pour le temps que vous avez pris pour discuter de mon projet de thèse (même les longues heures passées sur la transcriptomique), mais aussi sur des points plus personnels. Mais surtout, je tiens à vous remercier pour votre bienveillance à mon égard et vos encouragements.

Madame le **Docteur Christine Rondanino**,

Je tiens à te remercier pour avoir co-encadré cette thèse. L'arrivée dans ce nouvel environnement n'a pas été facile, mais tu as su m'écouter, me conseiller afin que je puisse m'intégrer et gérer les divers tracas de la vie de laboratoire. En tant que co-encadrante tu as dû gérer mes excès passionnés ainsi que mes envies de révolution, et je t'en remercie. Tout comme Nathalie, tu as su participer à la réussite de cette thèse. Je te remercie également pour tes conseils en tant que collègue d'enseignement.

Merci aux membres de mon Comité de Suivi Individuel, le Professeur **Virginie Rouiller-Fabre**, le Professeur **Marie Saint-Dizier**, le Professeur **Carine Ali** et le Docteur **Audrey Thiebaut**.

Je tiens à remercier toute l'équipe de recherche de l'**EA 4308** :

Marion, ou la Docteure Marion Delessard Dufour, malgré nos caractères complètement opposés, je ne pense pas qu'il y ait d'autres co-thésard qui se soient autant bien entendue que nous. Je te remercie pour m'avoir soutenue durant ces 4 années. Je pense que c'est principalement grâce à toi que j'ai réussi à survivre à toute cette pression. Nos conversations à 20h00 au labo ou planquées à l'animalerie à changer des cages pendant 3h vont me manquer.

Antoine, pour tes râleries qui m'ont fait bien rigoler ainsi que pour ton aide dans mes manip, on aura bien rigolé malgré des débuts bancals, parce que comme tu as su me le dire « On n'a pas élevé les cochons ensemble ! ». Mais bon, on a quand même fini par aller se prendre régulièrement des bières.

Benoît, merci d'avoir su me faire rire à chaque passage dans le laboratoire, pas pour parler de science (quelle idée !), mais à travers tes diverses photos pouvant passer de ta mégaloutre à des particularité anatomique ou pathologie dirons-nous, marquantes ! Bon courage pour la suite, tu vas finir par la passer cette thèse de science ^^

Ludovic, pour m'avoir conseillé, guidé et appris une partie des techniques au sein du laboratoire.

Laura, courage pour cette thèse, je pense qu'avec ta motivation et ton aptitude à monter les marches du 4ème, tu vas pouvoir être fière de tes travaux de thèses.

Amandine et **Véronique**, merci pour votre bonne humeur au quotidien. Amandine, merci pour tes conseils et ta patience quand je suis arrivée. Véronique, merci pour tes conseils techniques, mais surtout pour nos nombreuses conversations et conseils couture. Bon courage dans ton nouveau poste, je suis sûre que tu vas pouvoir t'y épanouir !

Aurélie, pour ta bonne humeur, tes magnifiques dessins qui restent encore au laboratoire. Bon courage pour tes nouvelles aventures, maman, médecin et future docteure en science, ça en fait du travail ! Mais je ne doute pas que tu vas y arriver :).

Tous les stagiaires de Master qui sont passés au laboratoire au cours de ma thèse, **Caroline**, **Auréli**e, **Laura**, **Candice**, **Laura**, **Coline**, **Mathilde** et **Anaïs**.

Merci aux techniciens/techniciennes et à **Fanny** et **Pierre**, aux biologistes des services de Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique du CHU de Rouen.

Je tiens également à remercier **Julie** et **Déborah**, copines de galère, à la fin de l'année nous serons toutes docteurs ! Merci pour vos rigolades et divers ragots, on va peut-être réussir à aller le boire de nouveau ce verre dont on parle depuis plus de 1 an !

Pour mes amies rencontrées lors du master de Tours, merci **Laureen** et **Fiona**, pour votre amitié et soutiens qui dure depuis 6 ans maintenant (HA les vieilles !!!). Merci d'avoir été la même à distance, de m'avoir écouté me plaindre sans jamais m'avoir envoyé bouler. La preuve que l'amitié peut rester même en étant éparpillée à Rouen, Nantes et en Belgique.

Et un énorme merci à ceux sans qui je n'en saurai probablement là, **ma famille**. Merci à mes parents et mes sœurs pour leur soutien sans faille. Je sais que ça n'a été facile de me soutenir à distance, mais vous y êtes arrivées. La preuve sur papier ! Les mots ne sont pas suffisants pour exprimer ce que je pense mais vous me connaissez. Merci, à tous. Je ne serai jamais arrivée ici sans vous.

Petit mot pour **Charlie** : si un jour tu lis cette thèse, arrête-toi ici, c'est déjà trop !

Je tiens à remercier les financeurs qui ont permis la réalisation de ces travaux **l'Agence de la Biomédecine**, **l'Association Laurette Fugain** et **l'Association France Lymphome Espoir** ainsi que **la Fondation de l'Avenir**. Je remercie également, **l'Université de Rouen Normandie** pour m'avoir financé au cours de mes trois années de thèse ainsi que mon poste de demi-ATER.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES FIGURES	9
ABREVIATIONS	11
Étude bibliographique.....	15
Chapitre 1. Structure et fonction du testicule.....	17
1.1. Mise en place et développement du testicule	17
1.1.1. Périodes embryonnaire et foetale	17
1.1.2. De la naissance à la puberté	20
1.2. Période adulte	22
1.2.1. Anatomie du testicule	22
1.2.2. Tissu interstitiel	24
A) Cellules de Leydig	24
B) Autres types cellulaires.....	26
1.3.3. Tubes séminifères	26
A) Cellules périvitubulaires	26
B) Cellules de Sertoli	28
C) Barrière hémato-testiculaire	29
D) Lignée germinale	30
Chapitre 2. La spermatogenèse.....	32
Partie 1 - Généralités.....	32
2.1. Déroulement de la spermatogenèse	34
2.1.1. Prolifération spermatogoniale	34
2.1.2. Méiose spermatocytaire	36
2.1.3. Spermiogenèse	40
2.2. Évènements méiotiques	42
2.2.1. Recombinaisons méiotiques	42
2.2.2. Inactivation des chromosomes sexuels	44
2.2.3. Checkpoints méiotiques.....	45

2.3. Cinétique de la spermatogenèse	47
2.4. Régulation de la spermatogenèse	49
2.4.1. Régulation hormonale	49
A) Axe hypothalamo – hypophyso – gonadique	49
B) Régulation de la spermatogenèse par la testostérone et l'œstradiol.....	49
2.4.2 Régulation paracrine : la « niche » spermatogoniale	50
2.4.3. Régulation thermique.....	52
Partie 2 - Arrêts de maturation au cours de la spermatogenèse	54
2.5. Caractérisation phénotypique des arrêts de maturation	54
2.6. Étiologies	56
2.6.1. Causes génétiques	56
2.6.2. Perturbations hormonales	58
A) Rôle de la FSH	59
B) Rôle de la voie LH/testostérone/œstradiol.....	59
2.7. Troubles de l'homéostasie testiculaire	61
2.7.1. Température.....	61
2.7.2. Facteurs métaboliques et nutritionnels	62
2.7.3. Inflammation	64
2.8. Altérations des cellules germinales	66
2.8.1. Altérations induites par le stress oxydant	66
2.8.2. Fragmentation de l'ADN	68
2.8.3. Anomalies méiotiques.....	68
Partie 3. Apport de la transcriptomique dans la compréhension de la	
spermatogenèse normale et pathologique	71
2.9. Principe de base du séquençage haut débit.....	71
2.10. Différentes technologies d'analyse du transcriptome utilisées	73
2.10.1. Puces à ADN	74
2.10.2. Bulk RNA-Seq	75
2.10.3. RNA-Seq sur cellules isolées	75
2.11. Mise en évidence de mécanismes testiculaires.....	76
2.11.1. Compréhension de la spermatogenèse normale	76
A) Première vague de la spermatogenèse	76
B) Puberté	76
C) Age adulte.....	77

2.11.2. Étude de la spermatogenèse altérée/pathologique	78
A) Études toxicologiques.....	78
B) Azoospermie/ arrêt de maturation	78
Chapitre 3. Préservation de la fertilité.....	81
3.1. Traitements gonadotoxiques et fertilité	82
3.1.1. Impact de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur le testicule	82
3.1.2. Traitements gonadotoxiques chez le garçon prépubère.....	83
3.2. Méthodes de préservation de la fertilité.....	83
3.2.1. Congélation de cellules ou tissus testiculaires	85
A) Principe de la congélation	85
B) Agents cryoprotecteurs (CPA)	86
3.2.2. Choix de la stratégie.....	87
A) Congélation lente	88
B) Vitrification	89
3.2.3. Étape de réchauffement	90
3.3. État des lieux de la congélation de tissus testiculaires.....	90
3.3.1. Modèle animal.....	90
3.3.2. Chez l’homme	91
Chapitre 4. Restauration de la fertilité	101
4.1. Transplantation de cellules souches spermatogoniales	101
4.1.1. Transplantation autologue de CSS	102
4.1.2. Transplantation hétérologue de CSS.....	102
4.2. Greffe de tissu testiculaire	103
4.2.1. Allo-/auto-greffe	103
4.2.2. Xénogreffe	104
4.3. Maturation <i>in vitro</i> de cellules testiculaires isolées	105
4.3.1. Culture 2D	105
4.3.2. Culture 3D	106
4.4. Maturation <i>in vitro</i> de fragments tissulaires	108
4.4.1. Évolution du support de culture	108
4.4.2. Évolution des conditions de culture.....	110
4.4.3. État des lieux de la culture organotypique	112
A) Modèle animal.....	112
B) Chez l’homme	113

Chapitre 5. Objectifs de l'étude	124
Travaux personnels	126
Publication 1	128
Publication 2	155
Discussion	230
Modèle murin utilisé – Choix du rat par comparaison à la souris	231
Validation des protocoles de congélation	233
Culture organotypique – Progression de la spermatogenèse et optimisation des conditions de culture	236
Spermatogenèse <i>in vitro</i> – Fonctionnalité du tissu testiculaire	243
Spermatogenèse <i>in vitro</i> – Mécanismes moléculaires mis en jeu	248
Conclusions et Perspectives	252
Références bibliographiques	256
Annexes	294

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Différenciation des gonades et du tractus génital mâle chez la souris, le rat et l'homme.

Tableau 2 : Comparaison entre les puces à ADN et le RNA-sequencing.

Tableau 3 : Comparaison entre la congélation lente contrôlée et la vitrification.

Tableau 4 : Protocoles de congélations du tissu testiculaire immature de mammifères.

Tableau 5 : Principaux avantages et inconvénients des possibles techniques de restauration de la fertilité d'enfants prépubères.

Tableau 6 : Protocoles de culture organotypique du tissu testiculaire immature de mammifère.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Détermination génétique du sexe gonadique chez le rat.

Figure 2 : Développement précoce du testicule chez le rat.

Figure 3 : Mise en place du sexe phénotypique.

Figure 4 : Anatomie du testicule adulte.

Figure 5 : Tissu interstitiel de rat.

Figure 6 : Biosynthèse de la testostérone par les cellules de Leydig chez le rat adulte.

Figure 7 : Structure des tubes séminifères.

Figure 8 : Spermatogenèse.

Figure 9 : Étapes de la méiose.

Figure 10 : Prolifération et différenciation spermatogoniale.

Figure 11 : Formation et structure du complexe synaptonémal.

Figure 12 : Formation de la coiffe acrosomiale.

Figure 13 : Spermio-genèse chez le rat.

Figure 14 : Conséquences des asynapsis dans la méiose mâle.

Figure 15 : Cycle de l'épithélium séminifère chez le rat.

Figure 16 : Régulation endocrine de la spermatogenèse.

Figure 17 : Classification phénotypique de la spermatogenèse humaine.

Figure 18 : Liste des gènes impliqués dans des arrêts de maturation des cellules germinales et dans l'hypospermatogenèse.

Figure 19 : Coupes histologiques de sections de testicule de patients présentant un arrêt de maturation en prophase I de méiose.

Figure 20 : Régulation de la spermatogenèse par les cytokines.

Figure 21 : Chaîne respiratoire mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde.

Figure 22 : Préparation des bibliothèques et séquençage selon la technologie d'Illumina.

Figure 23 : Préservation de la fertilité chez l'homme.

Figure 24 : Principe de la congélation lente contrôlée et de la vitrification de tissus.

Figure 25 : Méthodes de restauration de la fertilité à partir de testicules prépubères.

Figure 26 : Évolution de la culture organotypique.

ABREVIATIONS

3 β -HSD : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase

7 β -HSD : 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase

A

α MEM : *Minimum Essential Medium α*

A_{aligned} : A_{al}, *A aligned spermatogonia*, spermatogonie

A alignée

ABP : *Androgen-binding protein*

A_{dark} : Spermatogonie A foncée

ADN : Acide désoxyribonucléique

AKT : AKT serine/threonine kinase 1

AMH : *Anti Müllerian hormone*

AMP : Assistance médicale à la procréation

A_{paired} : A_{pr}, *A paired spermatogonia*, spermatogonie

A appariées

A_{pale} : Spermatogonie A pâle

APC : *Anaphase promoting complex*

AR : *Androgen receptor*

ARNm : Acide ribonucléique messagé

A_{single} : A_s, *A single spermatogonia*, spermatogonie A isolée

ATM : ATM serine/threonine kinase

ATP : Adénosine triphosphate

ATR : ATR serine/threonine kinase

atRA : all-trans retinoic acid

AZF : Azoospermia factor

B

bFGF : *basic fibroblast growth factor*

BHT : Barrière hémato-testiculaire

BLEFCO : Biologistes des Laboratoires d'Étude de la Fécondation et de la Conservation de l'Œuf

BMP4 : *Bone morphogenetic protein 4*

BRCA1 : *BRCA1 DNA repair associated*

BrdU : BromodésoxyUridine

BSA : *Bovine Serum Albumin*

BuOF : Fluide Oculaire Bovin

C

c-KIT : *KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase*

CECOS : Centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme

CLC : Congélation Lente Contrôlée

CO : *Crossing-over*, enjambement

CPA : *Cryoprotective agent*, Agent cryoprotecteur

CPG : Cellules germinales primordiales

CRBP : *Cellular retinol binding protein*

CSF-1 : *Colony stimulating factor 1*

CSS : Cellule Souche Spermatogoniale

CYP17A1 : cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1

CYP19A1 : Cytochrome P450, family 19, subfamily a, peptide 1

CYP26B1 : Cytochrome P450, family 6, subfamily b, peptide 1

D

DDX4 : *DEAD-box helicase 4*

DEG : *Differentially expressed genes*, Gènes différenciellement exprimés

DHEA : déhydroépiandrostérone

DMC1 : *DNA meiotic recombina*

DMEM/F12 : *Dulbecco's Modified Eagle, Medium/Nutrient Mixture F-12*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPBS : *Dulbecco's phosphate-buffered saline*

DSBs : *Double strand breaks*, cassures de l'AND double-brins

E

E2fr : *E2F transcription factor 1*

EG : Ethylène Glycol

EGF : *Epidermal Growth Factor*

ER α : Estrogen receptor α

ER β : Estrogen receptor β

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

F

FAS : *Fas cell surface death receptor*

FDE : Fibre dense externe

FFER : Fédération Française d'étude de la Reproduction

FGF2 : *Fibroblast growth factor 2*

FGF9 : *Fibroblast Growth Factor 9*

FIV : Fécondation *in vitro*

FoxL2 : *Forkhead box L2*

FSH : *Follicle-stimulating hormone*

G

GATA4 : *GATA binding protein 4*

GDNF : *Glial cell line-derived neurotrophic factor*

GnRH : *Gonadotropin releasing hormone*

GO : *Gene ontology*

Gy : Grey

H

H2AX : *H2A.X variant histone*

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HBSS : *Hanks' Balanced Salt Solution*

hCG : *human Chorionic Gonadotropin*

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HHG : (axe) Hypothalamo-hypophyso-gonadique

HSA : *Human Serum Albumin*

I

ICSI : *Intra-cytoplasmic sperm injection*

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1

IL-1 : Interleukine 1

IL-6R : Interleukine 6 receptor

In : Intermédiaire

INSL3 : *Insulin-like factor 3*

ITS : Insuline-Transferrine-Selenium

J

JED : Journées de l'école doctorale

JNRB : Journée Normande de Recherche Biomédicale

Jpc : Jours *post-coïtum*

Jpp : Jours *post-partum*

K

K₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de potassium

KCl : Potassium Chloride

KH₂PO₄ : Phosphate monopotassium

Ki67 : *marker of proliferation Ki-67*

KO : Knock-out

KSR : knock-out serum replacement

L

L-15 : Leibovitz L-15

LAMA1 : *Laminin subunit alpha 1*

LH : *Luteinizing hormone*

LIF : *Leukemia inhibitory factor*

LN₂ : Azote

LPA : acide lysophosphatidic

LPC : lysophosphatidylcholine

LysoPC : lysophosphatidylserine

M

M : Molaire

MC : Milieu de Culture

Min : minutes

MIS : *Müllerian Inhibitory Substance*

MLH1 : MutL homolog 1

MSCI : *Meiotic sex chromosome inactivation*

MSCU : *Meiotic silencing of unsynapsed chromosomes*

N

NaCl : Sodium Chloride

ND : pas d'information

NFκB : *Nuclear factor kappa-B*

NGF : *Nerve growth factor*

O

O/N : *Overnight*, Sur la nuit

P

P450scc : *P450 side chain cleavage*

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PC : *pachytene checkpoint*

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PROH : 1,2-propanediol

PTEN : *Phosphatase and tensin homolog*

PVP : Polyvinylpyrrolidone

R

RAD51 : *RAD51 recombinase*

Raff : Raffinose

RAR : *retinoic acid receptor alpha*

RARE : *Retinoic acid response element*

RBP4 : *Retinol binding protein 4*

rEDF : *recombinant human epidermal growth factor*

RIA : *Radio-immuno assay*

ROSI : *Round spermatid injection*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute Medium*

Rspo1 : R-spondin-1

RT : *Room Temperature*, température ambiante

RXR : *retinoid X receptor alpha*

S

SAC : *Spindle assembly checkpoint*

SALF : Société d'Andrologie de Langue Française

SF1 : *Splicing factor 1*

Sohlh2 : *Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 2*

Sox9 : *SRY-box transcription factor 9*

SPO11 : *SPO initiator of meiotic double stranded breaks*

Sry : *Sex determining region of the Y chromosome*

SSV : *Solid Surface Vitrification*, vitrification sur surface solide

Stab : stabilisation

StAR : *Steroidogenic Acute Regulatory protein*

Stra8 : *Stimulated by retinoic acid 8*

Suc : sucrose

SVF : Sérum de veau fœtal

SYCP1 : *synaptonemal complex protein 1*

SYCP3 : *synaptonemal complex protein 3*

T

Tex11 : *testis expressed 11*

TIRA : Transferrine -Insuline-Acide rétinoïque

TLR2 : *Toll like receptor 2*

TLR4 : *Toll like receptor 4*

TNF- α : *Tumor necrosis factor 1*

TNFR1 : *Tumor necrosis factor receptor 1*

Treh : Trehalose

TSPO : *translocator protein*

TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick-end labeling*

W

WB : *Water Bath*, Bain marie

Wnt : *Wingless-type MMTV integration site family*

Étude bibliographique

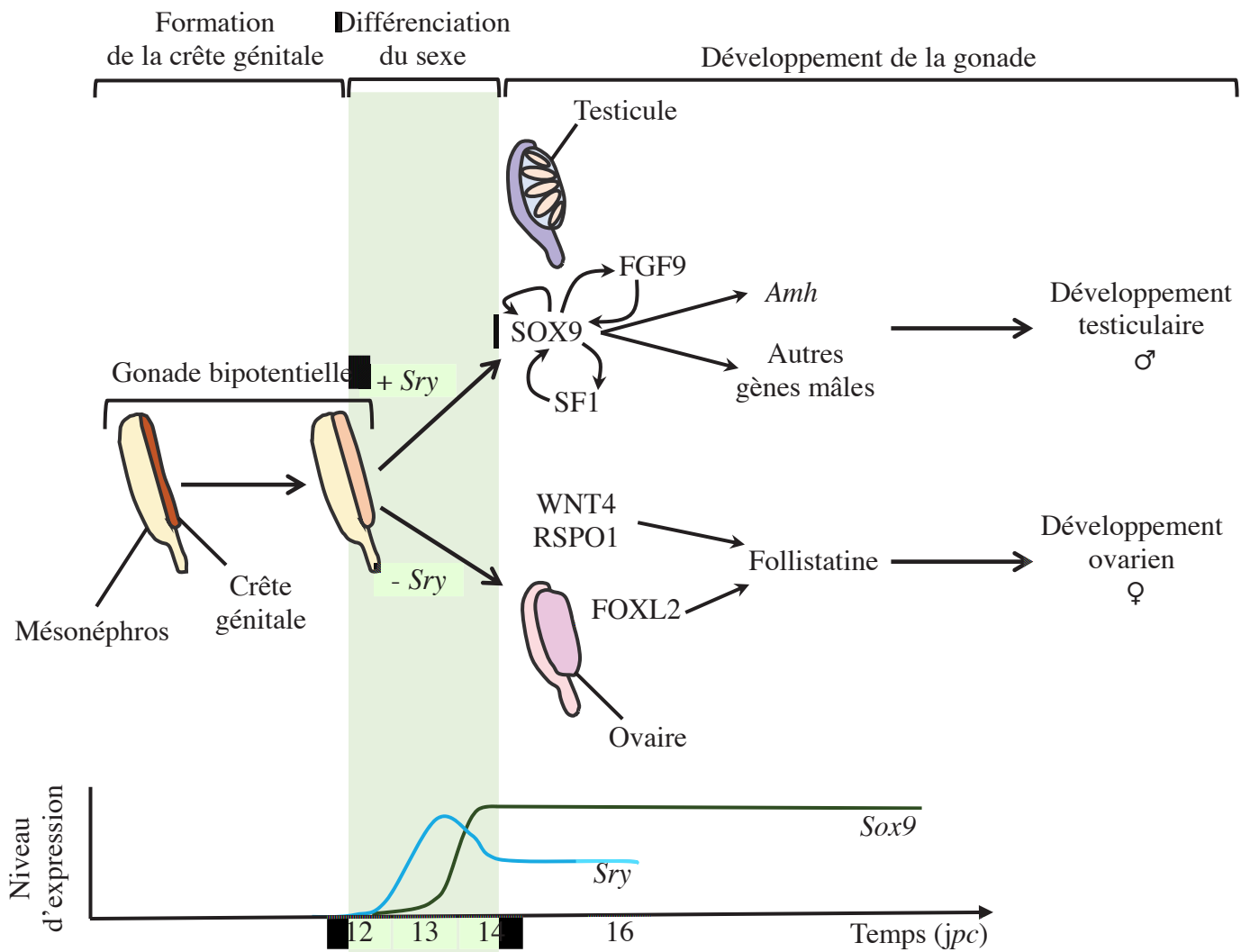


Figure 1 : Détermination génétique du sexe gonadique chez le rat

Le gène *Sry* est exprimé à partir de 12 *jpc* dans les cellules somatiques de la gonade bipotentielle XY pour atteindre son maximum à 13 *jpc*. Le gène *Sry* active le gène *Sox9* dont les boucles d'autorégulation vont permettre l'amplification et le maintien de son expression. *Sox9* va induire l'expression de l'*Amh* et de divers autres gènes permettant la masculinisation de la gonade. L'absence de *Sry* lors du développement de la gonade XX laisse place aux gènes *Wnt4*, *FoxL2* et *Rspo1* permettant un développement ovarien. *Amh*, hormone anti-Müllérienne (*Anti Müllerian Hormone*) ; *FGF9*, *Fibroblast Growth Factor 9* ; *FoxL2*, *Forkhead box L2* ; *jpc*, jours postcoïtum ; *Rspo1*, *R-spondin-1* ; *SF1*, *Splicing factor 1* ; *Sox9*, *Sry-related HMG box gene 9* ; *Sry*, *Sex-determining Region of Y chromosome* ; *Wnt4*, *Wingless-type MMTV integration site family member 4* (Adapté de Kashimada and Koopman, 2010; Clement *et al.*, 2011)

Chapitre 1. Structure et fonction du testicule

1.1. Mise en place et développement du testicule

1.1.1. Périodes embryonnaire et fœtale

Les ébauches gonadiques, aussi appelées crêtes génitales, se forment à partir de la face interne du mésonéphros par multiplication des cellules de l'épithélium coelomique et du mésenchyme. Cette gonade embryonnaire est qualifiée d'indifférenciée ou bipotentielle, faisant référence à sa capacité de s'orienter vers un destin de gonade mâle ou femelle, en fonction des chromosomes sexuels (X ou Y) reçu lors de la fécondation.

Chez le rat, les premières cellules germinales primordiales (CGP) apparaissent autour de 8,5 jours *postcoïtum* (*jpc*) et migrent de l'épiblaste vers les crêtes génitales entre 10,5 et 11,5 *jpc*. Au 12^{ème} *jpc*, les CGP sont majoritairement présentes à la surface ventro-médiane mésonéphrotique des crêtes génitales et commencent une expansion massive (Kemper and Peters, 1987; Kobayashi *et al.*, 2020). Ces étapes sont identiques à travers plusieurs espèces mais présentent une chronologie différente (Tableau 1).

Évènement	Stade du développement		
	Rat	Souris	Homme
Première détection des CPG	8,5 <i>jpc</i>	6 <i>jpc</i>	4 sem
Formation de la gonade indifférenciée	N/D	10 <i>jpc</i>	4 sem
Colonisation des crêtes génitales	12,5 <i>jpc</i>	10,5 – 11,5 <i>jpc</i>	4 - 5 sem
Formation des cordons séminifères	13 – 14 <i>jpc</i>	12,5 <i>jpc</i>	6 - 7 sem
Différenciation des cellules de Leydig	14,5 <i>jpc</i>	12,5 <i>jpc</i>	8 sem
Régression des canaux de Müller	15,5 <i>jpc</i>	14 <i>jpc</i>	8 sem
Masculinisation des organes génitaux externes	N/D	16 <i>jpc</i>	9 - 10 sem
Migration testiculaire dans les bourses			28 sem
Début	15 <i>jpp</i>		
Fin		18,5 <i>jpp</i>	
Début de la prophase méiotique	15 <i>jpp</i>	5 <i>jpp</i>	

Tableau 1 : Différenciation des gonades et du tractus génital mâle chez la souris, le rat et l'homme. *Jpc*, Jours *post-coïtum* ; *jpp*, jours *post-partum* ; CPG, Cellules germinales primordiales ;

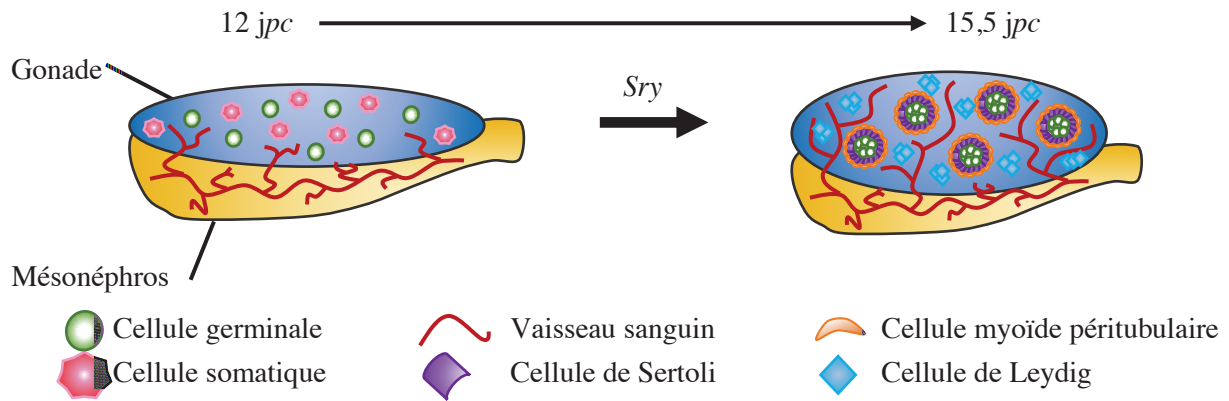


Figure 2 : Développement précoce du testicule chez le rat

Dès 12 *jpc*, la présence du gène *Sry* induit une différenciation de la gonade par la formation de cordons séminifères entourant les cellules germinales. Les cellules du tissu interstitiel et de l'épithélium vasculaire se mettent en place. (D'après Ross and Capel, 2005)

Jpc, jours *postcoitum* ; *Sry*, *Sex-determining Region of Y chromosome*.

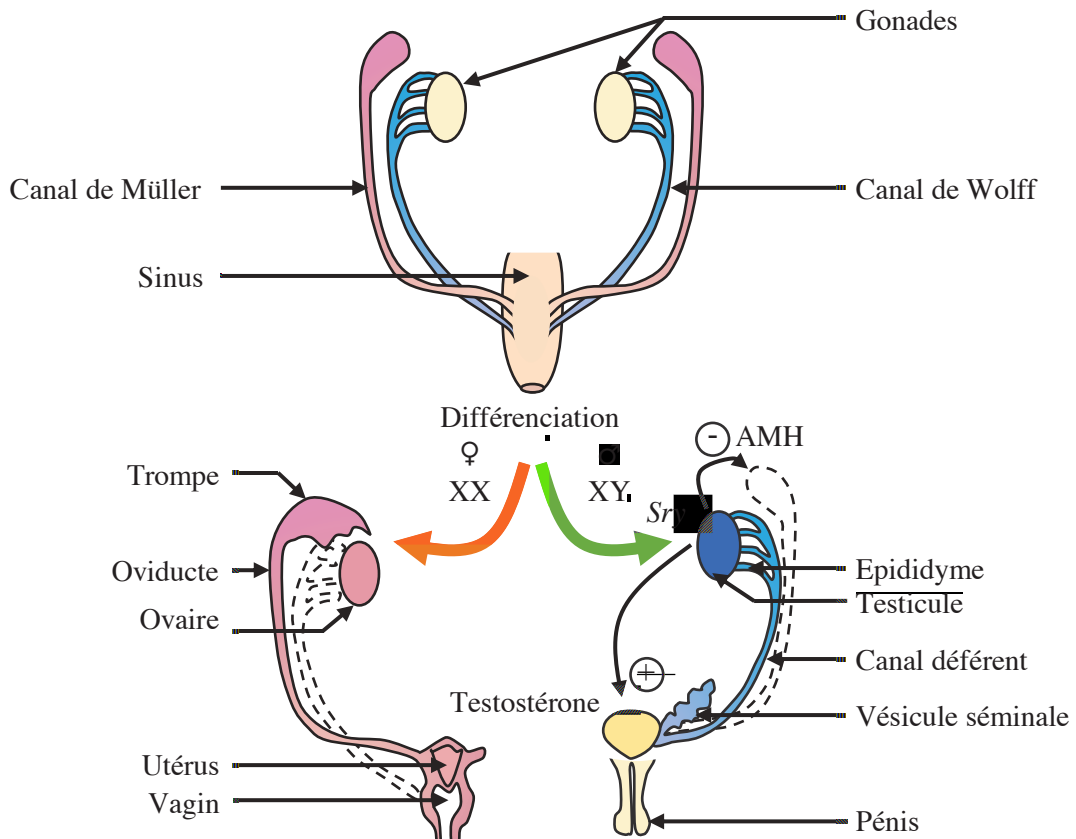


Figure 3 : Mise en place du sexe phénotypique

Pour les individus XY, sous l'action du gène *Sry*, la gonade bipotentielle se différencie en testicule, les canaux de Müller régressent tandis que les canaux de Wolff permettent la formation de l'épididyme, du canal déférent et des glandes accessoires (vésicule séminale). Pour les individus XX, on observe la formation d'une paire d'ovaires, et un développement des voies génitales femelles à partir des canaux Müller ; les canaux de Wolff régressent. Les organes génitaux externes se développent en conséquence. AMH : hormone anti-Müllerienne (*Anti Müllerian Hormone*) ; *Sry* : *Sex-determining Region of Y chromosome* ; + : stimulation ; - : inhibition.

Suite légende Tableau 1 > sem, semaines (d'après Lucas-Herald and Bashamboo, 2014; Tanaka and Nishinakamura, 2014).

La différenciation des crêtes génitales en gonades embryonnaires mâles est contrôlée par le sexe chromosomique de l'individu. Le gène *Sry* (*Sex determining Region of the Y chromosome*) présent sur la bras court du chromosome Y, va être exprimé dans les cellules somatiques des crêtes génitales et entraîne leur différenciation en cellules de Sertoli immatures (Albrecht and Eicher, 2001). À partir de 13,5 *jpc*, l'expression de SRY va activer une cascade de signalisation faisant intervenir les gènes *Sox9* (*SRY-box transcription factor 9*), *Sfl* (*Splicing factor 1*) et *Fgf9* (*Fibroblast growth factor 9*), impliqués dans la différenciation des voies génitales vers un destin mâle (Sekido and Lovell-Badge, 2008; Kashimada and Koopman, 2010; Clement *et al.*, 2011) (Figure 1). Les cordons séminifères délimités par une lame basale résultent de l'agrégation des cellules de Sertoli différenciées, colonisées par les CGP dorénavant appelées gonocytes (Olaso and Habert, 2000). Ces structures sont les précurseurs des futurs tubes séminifères. Les cellules de Sertoli établissent des jonctions entre elles et se mettent à produire de protéines de la matrice extracellulaire afin de définir la structure primaire de ces cordons. Cette structure est consolidée par la migration autour des cordons de cellules se différenciant en cellules myoïdes périvitubulaires ainsi que par des interactions avec les cellules endothéliales (Combes *et al.*, 2009). La différenciation des cellules de l'espace interstitiel en cellules de Leydig fœtales est une des conséquences induites par la différenciation des cellules de Sertoli (Rotgers *et al.*, 2018) (Figure 2). À partir de 14,5 *jpc*, les premières enzymes stéroïdogéniques sont détectées (Livera *et al.*, 2000), permettant la synthèse de testostérone à partir de 15,5 *jpc* (Warren *et al.*, 1973).

En réponse à l'expression du gène *Sox9*, les cellules de Sertoli immatures produisent l'AMH (*AntiMüllerian hormone*) responsable de la régression des canaux de Müller (Rotgers *et al.*, 2018) à 15,5 *jpc* (Xavier and Allard, 2003). Les cellules de Leydig fœtales vont sécréter de la testostérone responsable du maintien des canaux de Wolff et de la différenciation du tractus génital interne et externe (Figure 3), mais aussi INSL3 (*insulin-like factor 3*) permettant la descente des testicules dans le scrotum après la naissance (Adham *et al.*, 2000).

Les gonocytes entrent en quiescence à 18 *jpc* jusqu'à l'entrée en mitose des cellules souches spermatogoniales (CSS) quelques jours après la naissance. Ce repos cellulaire fait intervenir des facteurs produits par les cellules de Sertoli tels que CYP26B1 (*Cytochrome P450, family 26, subfamily b, peptide 1*), ayant pour fonction de dégrader l'acide rétinoïque, inhibant ainsi l'expression de *Stra8* (*Stimulated by retinoic acid 8*) impliqué dans l'entrée en méiose.

Cette inhibition est aussi supportée par d'autres facteurs locaux indépendants de la voie de l'acide rétinoïque (Guerquin *et al.*, 2010; Childs *et al.*, 2011). La prolifération des cellules de Sertoli est maximale à 20 *jpc* et se prolonge jusqu'à la naissance (Orth, 1982).

1.1.2. De la naissance à la puberté

À la naissance, chez le rat, les testicules sont composés des cordons séminifères, comprenant les gonocytes et les cellules de Sertoli, et du tissu interstitiel incluant les cellules de Leydig fœtales.

Le développement sexuel post-natal du rat a été décrit comme étant divisé en 4 étapes : la période néonatale allant de 0 à 7 *jpp*, la période infantile de 8 à 21 *jpp*, la période juvénile entre 21 et 35 *jpp*, et la période péri-pubertaire de 35 à 60 *jpp*. La fin de cette dernière période correspond à la présence de spermatozoïdes dans l'épididyme (Ojeda *et al.*, 1980).

Durant la période néonatale (0 à 7 *jpp*), les cellules de Sertoli en prolifération sous l'action de la FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) vont stimuler la prolifération des gonocytes les faisant passer d'un état quiescent (induit lors du développement fœtal) à un stade de spermatogonie en prolifération (Rossi and Dolci, 2013). Cette entrée en activité est estimée entre 3 et 5 *jpp* (Olaso and Habert, 2000).

La période infantile (8 à 21 *jpp*) est caractérisée par une forte activité des 3 principaux types cellulaires :

- Les premières cellules de Leydig progénitrices apparaissent au 8^{ème} *jpp* et entrent en prolifération, remplaçant les cellules de Leydig fœtales. Ces cellules commencent à produire un androgène primaire, l'androstérone (Haider, 2004), sous l'action de la LH (*Luteinizing Hormone*).
- Les cellules de Sertoli atteignent leur densité maximale entre le 14^{ème} et le 16^{ème} *jpp*. Une augmentation du poids testiculaire est ainsi observée, résultant des multiplications cellulaires successives, associé à l'apparition de la lumière au sein des cordons séminifères, qui deviennent alors les tubes séminifères. La taille des tubes et du testicule est corrélée au nombre total de cellules de Sertoli résultantes de la phase de prolifération (Orth *et al.*, 1988). Les cellules de Sertoli vont mettre en place des jonctions serrées entre elles afin de constituer la barrière hémato-testiculaire (BHT), contemporaine de l'apparition des premiers spermatocytes (Pryor *et al.*, 2000; Setchell, 2008).

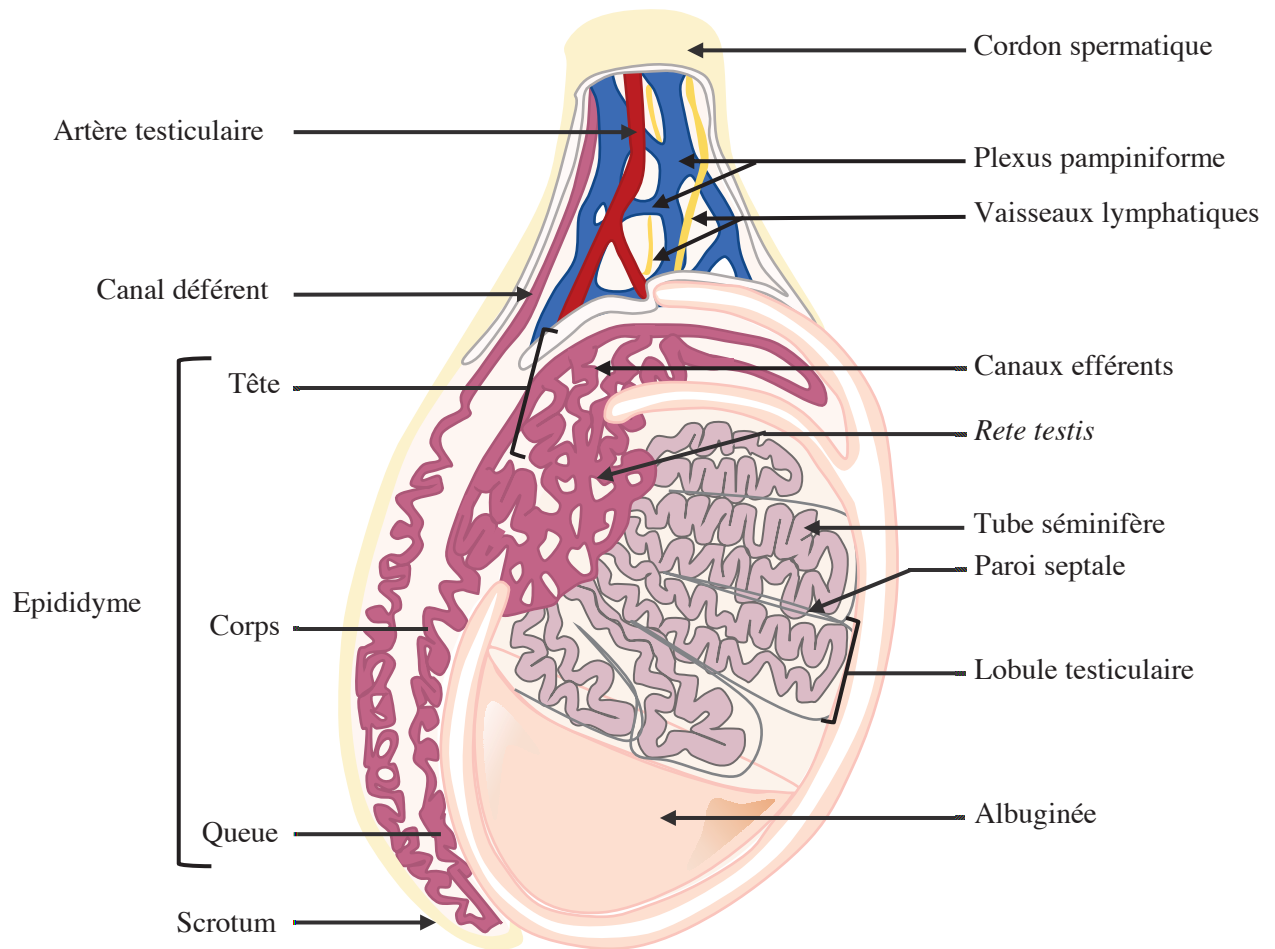


Figure 4 : Anatomie du testicule adulte

Les testicules, situés dans le scrotum, sont les organes permettant la production de spermatozoïdes. Ils sont entourés d'une membrane de protection appelée albuginée, et sont soumis à une importante thermorégulation réalisée par le plexus pampiniforme. Les spermatozoïdes sont produits dans les tubes séminifères et vont être évacués vers le rete testis, zone de rassemblement des tubes séminifères. Les spermatozoïdes vont par la suite être dirigés dans l'épididyme, lieu de leur maturation.

- Entre le 15^{ème} et le 18^{ème} jpp, les CSS vont se différencier en spermatogonies A, intermédiaires et B. Va suivre rapidement la division des spermatogonies B, l'apparition des premières cellules méiotiques (pré-leptotène, leptotène et zygotène) (Picut *et al.*, 2015). La descente testiculaire par le canal inguinal se produit de manière simultanée à l'apparition des premiers spermatocytes I (Picut *et al.*, 2015).

La période juvénile (21 à 35 jpp) est en comparaison plus faible en termes de prolifération cellulaire des cellules intratubulaires. Les spermatides rondes de la première vague de la spermatogenèse sont produites et une augmentation du diamètre des tubes est observée suite à la croissance du nombre de cellules intratubulaires. À partir de 25 jpp, les cellules de Leydig immatures vont commencer à produire progressivement de la testostérone, stimulant la spermatogenèse (Picut *et al.*, 2015).

Durant la période péri-pubertaire (35 à 60 jpp), la maturation des cellules de Leydig induit une production massive de testostérone, correspondant au niveau observé chez l'adulte (Gupta *et al.*, 1975). Les premières spermatides en cours d'élongation et allongées sont observées à 45 jpp, permettant la détermination des stades de l'épithélium séminifère. La densité cellulaire va progressivement augmenter afin d'être comparable à celle de l'adulte.

1.2. Période adulte

1.2.1. Anatomie du testicule

Chez le rat, les testicules migrent dans le scrotum en position exorchide après la naissance, maintenus par le cordon spermatique. Ils sont enveloppés par une membrane dense, l'albuginée (*tunica albuginea*) dont la surface interne est recouverte d'un tissu conjonctif richement vascularisé (Figure 4). Le testicule est compartimenté en de nombreux lobules séparés par des parois septales (*septula testis*). Les lobules sont eux-mêmes composés de tubes séminifères enchevêtrés, zones principales de l'activité testiculaire, séparés par du tissu interstitiel. Les tubes séminifères se regroupent dans la partie supérieure du testicule sous forme d'anastomose tubaire appelée *rete testis*. Les canaux efférents partant du *rete testis* en direction de la tête de l'épididyme se regroupent sous le nom du canal épидидymaire. L'épididyme est composé de trois parties : la tête, le corps, la queue et est responsable de la maturation et du

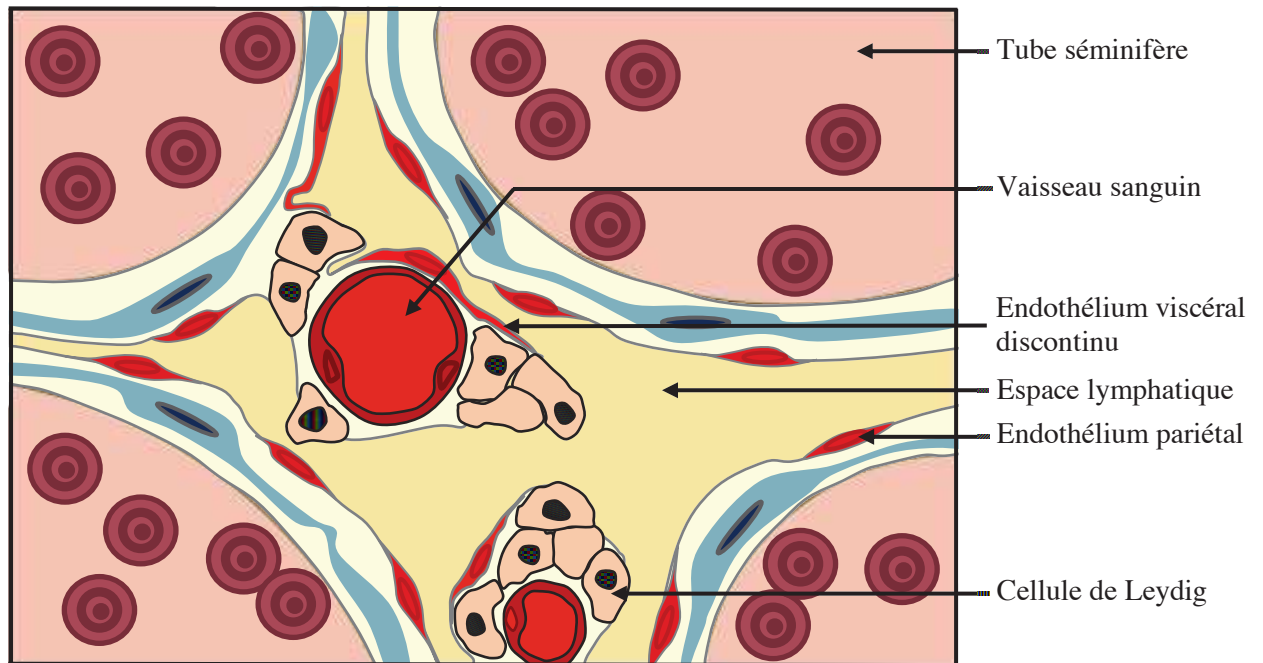


Figure 5 : Tissu interstitiel de rat

Le tissu interstitiel de rat est présent entre les tubes séminifères et est composé principalement d'îlots de cellules de Leydig, productrices de testostérone, de vaisseaux sanguins et cellules du système immunitaire. Les cellules de Leydig sont partiellement entourées d'une couche de cellules endothéliales, permettant un contact étroit avec l'espace lymphatique (D'après Fawcett *et al.*, 1973).

stockage des spermatozoïdes produits par le testicule. L'épididyme est prolongé par une succession de canaux, reliés aux glandes accessoires, sollicités lors de l'accouplement (Saint-Dizier *et al.*, 2014).

Le testicule est un organe richement vascularisé, irrigué par une artère testiculaire, se subdivisant pour irriguer les lobules testiculaires et l'épididyme. Le réseau vasculaire produit lors du rassemblement des artères et veines reliés au testicule porte le nom de plexus pampiniforme, responsable de la thermorégulation du testicule (Saint-Dizier *et al.*, 2014).

Le testicule assure 2 fonctions fondamentales réparties entre les compartiments testiculaires, les tubes séminifères et l'espace interstitiel (ou tissu interstitiel). Les tubes séminifères exercent une fonction exocrine, par la production de spermatozoïdes. L'espace interstitiel exerce une fonction endocrine.

1.2.2. Tissu interstitiel

L'espace interstitiel, situé autour des tubes séminifères, est composé d'un tissu conjonctif lâche, hautement vascularisé et innervé (Figure 5). Il contient de nombreux capillaires sanguins, responsables du trafic hormonal périphérique et testiculaire, des éléments figurés du sang, des fibroblastes, des macrophages et les cellules de Leydig. Chez le rat, l'endothélium lymphatique est très développé, discontinu, entourant partiellement les cellules de Leydig périvasculaire (Fawcett *et al.*, 1973).

A) Cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont localisées autour des capillaires sanguins. Cette conformation péri-vasculaire permet des échanges actifs entre l'environnement testiculaire et la circulation générale. Ces cellules occupent 1 à 5% du volume testiculaire. Elles présentent un cytoplasme abondant, contenant des inclusions lipidiques, sources de cholestérol (Fawcett *et al.*, 1973). En effet, les cellules de Leydig ont une fonction endocrine et paracrine, responsable de la production d'androgènes nécessaires à la masculinisation des organes androgéno-dépendants durant le développement et la stimulation de la spermatogenèse. INSL3, impliqué dans la descente testiculaire est produit spécifiquement par les cellules de Leydig. De par la présence de son récepteur dans les cellules germinales, on lui attribue un rôle potentiel au cours de la spermatogenèse, cependant celui-ci n'est pour l'instant pas élucidé (Sansone *et al.*, 2019).



Figure 6 : Biosynthèse de la testostérone par les cellules de Leydig chez le rat adulte.

La voie $\Delta 4$ de la biosynthèse de la testostérone est majoritaire chez le rat. Cette voie passe par la transformation de la prégnénolone en progestérone dans le réticulum endoplasmique lisse tandis que la voie $\Delta 5$, majoritaire chez l'homme passe par la DHEA. La testostérone est aromatisée en œstradiol dans les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et par certaines cellules germinales (Adapté de Saint-Dizier *et al.*, 2014).

CYP17A1 : cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 ; DHEA : déhydroépiandrostérone ; P450scc : P450 side chain cleavage ; StAR : Steroidogenic Acute Regulatory protein ; TSPO : translocator protein ; 3 β-HSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 17β-HSD : 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase.

Parmi toutes les molécules produites par les cellules de Leydig, la testostérone est celle qui a été la plus étudiée de par son rôle indispensable dans la régulation de la spermatogenèse (Zhou *et al.*, 2019). La production de testostérone par les cellules de Leydig consiste en un recrutement du cholestérol contenu dans les gouttelettes lipidiques stockées au sein de la cellule. Ce cholestérol va être transporté dans les mitochondries où il va être transformé en prégnénolone. Celle-ci va subir une cascade de réactions enzymatiques au sein du réticulum endoplasmique lisse conduisant à la production de testostérone (Aghazadeh *et al.*, 2015) (Figure 6).

À l'âge adulte, les cellules de Leydig vont commencer à synthétiser des œstrogènes, par aromatisation de la testostérone. L'œstradiol produit va induire un rétrocontrôle sur la production de LH mais aussi sur les cellules testiculaires présentant les récepteurs ER α et β (*Estrogen Receptor α/β*) (Carreau and Hess, 2010).

B) Autres types cellulaires

Outre les cellules de Leydig, le tissu interstitiel est composé de nombreux autres types cellulaires : des cellules nerveuses et des cellules associées au système immunitaire telles que les macrophages et lymphocytes. Ces cellules vont permettre une sélectivité de l'entrée des molécules au sein des compartiments du testicule. Le réseau lymphatique va permettre un drainage du tissu tandis que les cellules immunitaires vont détruire les cellules présentant des antigènes étrangers (Schuppe and Meinhardt, 2005). Il a été observé la mise en place d'un « sanctuaire immunitaire » par l'action combinée des propriétés immunosuppressives des cellules de l'espace interstitiel et celle des tubes séminifères *via* la BHT.

1.3.3. Tubes séminifères

Les tubes séminifères ont un diamètre de 150 à 200 μm et représentent 60 à 80% du volume testiculaire. Chaque tube est bordé par des cellules péritubulaires appelées aussi cellules myoïdes, accolées à la membrane basale (*lamina propria*) (Figure 7). Les cellules de Sertoli et les cellules de la lignée germinale forment le contenu cellulaire intratubulaire (Sertoli, 2018).

A) Cellules péritubulaires

De par leur nature myofibroblastique, les cellules myoïdes ont la capacité de générer une contraction des tubes séminifères qu'elles entourent. Ces cellules sont à l'origine des

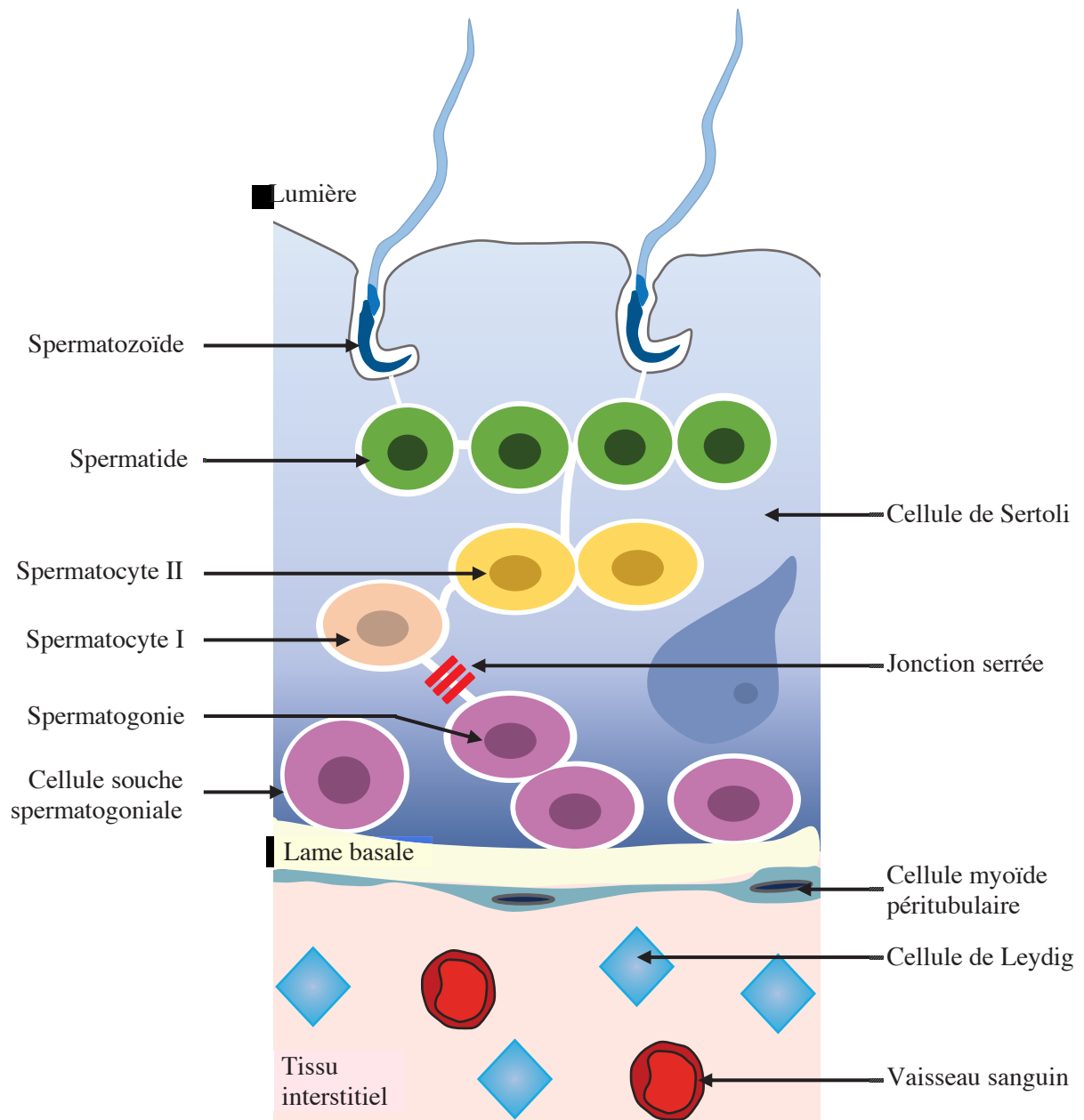


Figure 7 : Structure des tubes séminifères

Les tubes séminifères sont composés d'une association complexe de cellules de Sertoli et cellules germinales. Des jonctions serrées mises en place entre les cellules de Sertoli permettent de différencier deux compartiments : le compartiment basal, constitué des spermatogonies et des spermatocytes pré-leptotènes, et le compartiment adluminal, regroupant les spermatocytes différenciés, les spermatozoïdes et spermatozoïdes. Le compartiment adluminal est prolongé par la lumière tubulaire, au centre de la structure, lieu de relargage des spermatozoïdes. Les tubes séminifères sont entourés de cellules myoïdes péricubulaires, cellules contractiles permettant le maintien des tubes ainsi que le transport des spermatozoïdes (D'après Oatley and Brinster, 2012).

contractions péristaltiques jouant un rôle dans le transport des spermatozoïdes testiculaires et du fluide tubaire vers le *rete testis* (Wang *et al.*, 2018). Les cellules myoïdes produisent différents facteurs impliqués dans la contractilité cellulaire, la prolifération ou encore des espèces réactives de l'oxygène et exercent donc une activité paracrine sur les types cellulaires environnants (Mayerhofer, 2013; Zhou *et al.*, 2019).

De nombreux cas d'infertilité ont montré une altération de la structure de la membrane basale et des cellules myoïdes (Mayerhofer, 2013). Via la sécrétion de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), les cellules péritubulaires pourraient induire une prolifération des spermatogonies et agir directement sur la spermatogenèse (Dorval-Coiffec *et al.*, 2005). Les cellules myoïdes expriment le récepteur aux androgènes (*AR, androgen receptor*), qui lorsqu'il est activé, induit la production de GDNF (*Glial cell Line-Derived Neurotrophic Factor*) dans les cellules myoïdes. Le GDNF va transiter au sein des tubes séminifères et par son action sur les cellules de Sertoli et les CSS, stimuler l'auto-renouvellement des CSS (Potter and DeFalco, 2017). Une invalidation du gène codant pour le récepteur aux androgènes dans les cellules myoïdes péritubulaires induit une réduction de la population de cellules germinales et une stérilité à l'âge adulte chez la souris (Welsh *et al.*, 2009). Une altération de la production d'androgènes entraînerait quant à elle, une variation du nombre de récepteurs aux androgènes présents au sein de ces cellules chez la souris (Mayer *et al.*, 2018).

B) Cellules de Sertoli

La cellule de Sertoli adulte est une cellule polarisée, présentant de nombreuses extensions cytoplasmiques ramifiées et jonctions cellulaires, à l'origine de la BHT. Son noyau est reconnaissable de par sa forme géométrique, la plupart du temps allongée et anatomiquement proche de la lame basale. Elle est en contact permanent avec plusieurs générations de cellules germinales via son cytoplasme, s'étendant de la lame basale jusqu'à la lumière tubulaire. Ses nombreux prolongements cytoplasmiques s'adaptent pour permettre le développement des cellules germinales qui l'entourent (França *et al.*, 2016). La cellule de Sertoli est la seule cellule testiculaire capable de communiquer avec tous les types cellulaires présents au sein des tubes séminifères, permettant ainsi une régulation fine des cellules environnantes. Son appellation de « cellule nourricière » vient de sa relation morphologique avec les cellules germinales en développement. Elle est le support structural, biochimique, ionique, métabolique et est à l'origine de la synchronisation de l'activité de l'ensemble des cellules intra-tubulaires (França *et al.*, 2016). L'activité phagocytaire des cellules de Sertoli est

nécessaire afin d'éliminer les cellules germinales apoptotiques et les corps résiduels issus des spermatides allongées. La cellule de Sertoli est à l'origine de la production de fluide tubulaire, et de multiples autres composés. Ce fluide, en plus d'un apport ionique et nutritif, permet le transport de molécules produites par les différents types cellulaires allant de la lame basale à la lumière du tube. Il a aussi un rôle dans le transport des spermatozoïdes non mobiles jusqu'au *rete testis* puis l'épididyme (Rato *et al.*, 2010). Ces différents rôles de soutien, nutrition et sécrétion font de la cellule de Sertoli un élément essentiel pour la survie des cellules germinales et le déroulement de la spermatogenèse.

Les cellules de Sertoli sont régulées par différents facteurs, influant de ce fait sur la spermatogenèse. Dès la naissance, cette cellule est sous le contrôle de la FSH, facteur mitogène responsable de leur intense prolifération *via* la voie insuline/IGF1 (Pitetti *et al.*, 2013). À la puberté, la stimulation par la FSH va induire la production de la protéine PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), antagoniste majeur de la voie PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-kinase/AKT serine/threonine kinase 1*) rendant la cellule de Sertoli réfractaire à l'effet mitogène de la FSH (Dupont *et al.*, 2010). La production d'androgènes par les cellules de Leydig, de molécules impliquées dans la formation de la matrice extracellulaire par les cellules péritubulaires et de facteurs par les cellules germinales, tels que le NGF (*Nerve growth factor*) et le bFGF (*basic fibroblast growth factor*), sont responsables de variations de l'activité sertolienne (Jégou, 1993). La résorption des corps résiduels des spermatides pourrait aussi induire des changements fonctionnels des cellules de Sertoli, entraînant une activation des processus de division et de différenciation des spermatogonies et spermatocytes (Syed *et al.*, 1995).

C) Barrière hémato-testiculaire

Les cellules de Sertoli sont les principaux éléments anatomiques définissant la BHT. Il s'agit d'un réseau complexe, composé de nombreuses jonctions cellulaires (serrées, d'ancrage et communicantes) entre les cellules de Sertoli. Elle constitue une barrière physique sélective au sein du tube séminifère par l'établissement d'une ségrégation des spermatogonies et jeunes spermatocytes primaires dans le compartiment basal de l'épithélium séminifère, et des spermatocytes ayant initié leur méiose et des cellules post-méiotiques dans le compartiment adluminal. Son rôle de filtration des molécules passant d'un compartiment tubulaire à l'autre induit la formation d'un gradient ionique, nécessaire pour l'établissement du

microenvironnement testiculaire propice à la spermatogenèse. Sa composition et sélectivité varient en fonction des cycles spermatogéniques (Mruk and Cheng, 2015; França *et al.*, 2016).

Classiquement décrite comme étant la protection principale des cellules germinales face aux molécules étrangères et réponse immunitaire du « soi », la BHT n'est pas réductible aux seules cellules de Sertoli. Elle est complétée par l'endothélium vasculaire (présence de nombreuses jonctions serrées), des vaisseaux lymphatiques permettant le drainage des molécules et les cellules myoïdes périvitubulaires (présence de jonctions serrées). Cette association de barrière et de cellules du compartiment interstitiel permet la mise en place d'un « sanctuaire immunitaire », ayant rôle de protection des cellules germinales méiotiques et post-méiotiques, ainsi que le maintien de l'homéostasie par constitution et entretien du microenvironnement testiculaire (Mruk and Cheng, 2015). Une altération des constituants ou des régulateurs de la BHT peut causer des dommages immunologiques ou autres aux cellules méiotiques et post-méiotiques, pouvant conduire à une infertilité (Jiang *et al.*, 2014).

D) Lignée germinale

Contrairement aux cellules de Sertoli, les cellules germinales ne commencent à proliférer qu'à partir de la puberté, jusqu'à la sénescence. À l'âge adulte, elles représentent la majorité des cellules présentes au sein de l'épithélium séminifère. Leurs nutrition et soutien sont assurés par les cellules de Sertoli. Les CSS, à l'origine des différentes cellules germinales, sont localisées à la base du tube séminifère, accolées à la membrane basale. Ces cellules vont subir plusieurs vagues de prolifération/différenciation afin de générer des cellules haploïdes hyperspécialisées appelées spermatozoïdes. Les CSS vont se différencier en spermatogonies A, intermédiaires et B. Les spermatogonies vont ensuite devenir des spermatocytes I puis II *via* le processus de méiose, pour aboutir à la formation de spermatides et spermatozoïdes. Les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière tubulaire, et par contraction des cellules myoïdes, redirigés vers le *rete testis* puis l'épididyme (Saint-Dizier *et al.*, 2014)

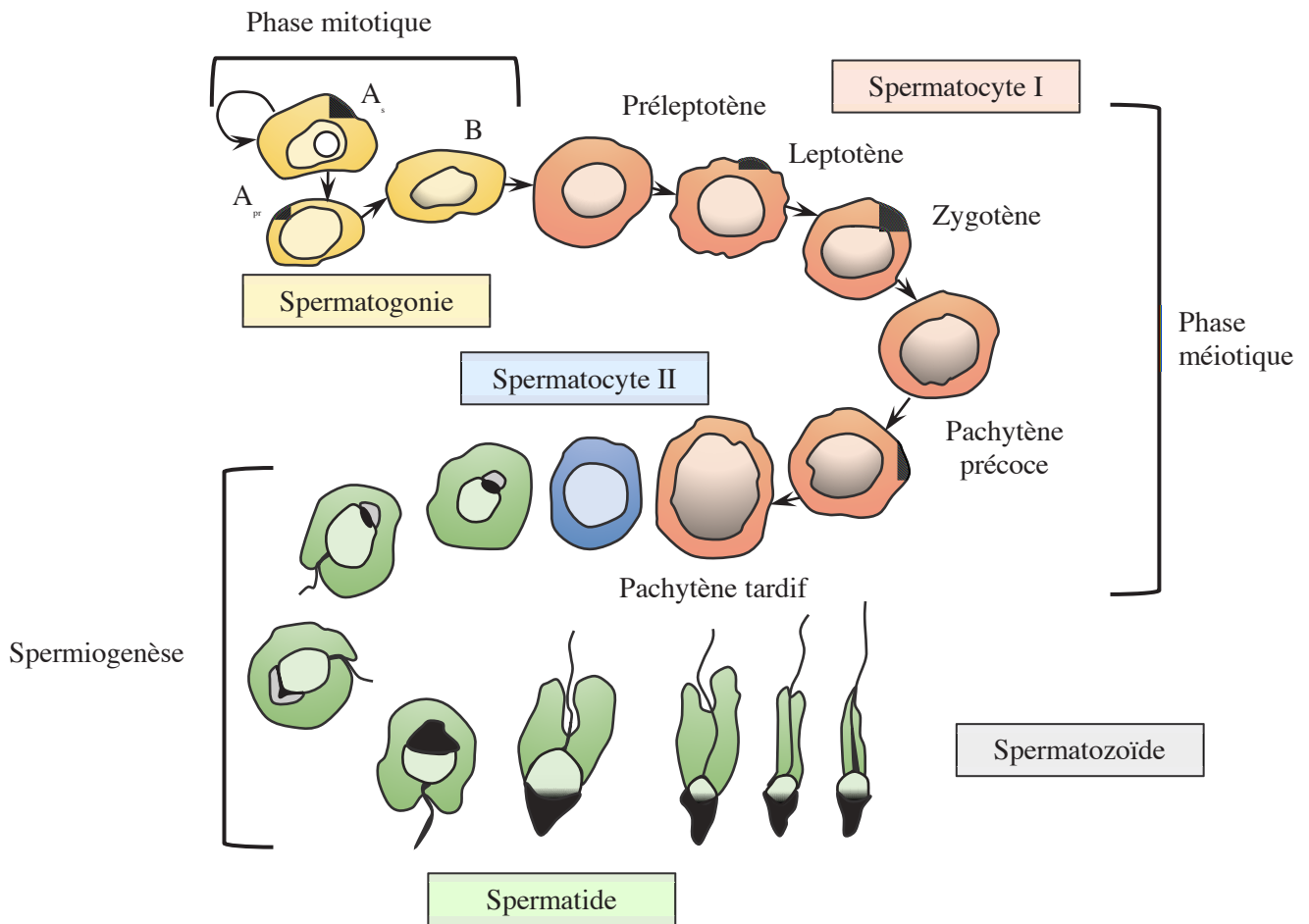


Figure 8 : Spermatogenèse

Le processus de spermatogenèse résulte de la succession de 3 étapes de division et différenciation : la mitose spermatogoniale, la méiose spermatocytaire et la spermiogenèse des spermatides, induisant des modifications de structure et fonctionnalité de la cellule.

Chapitre 2. La spermatogenèse

Partie 1 - Généralités

La spermatogenèse correspond à l'ensemble des phases successives de division et différenciation cellulaires aboutissant à la formation et libération de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. C'est un processus complexe, nécessitant une longue préparation commençant lors du développement embryonnaire et s'initiant de façon pleinement active à la puberté. La production de gamètes, chez le mâle, est continue de la puberté à la sénescence, grâce au renouvellement et différenciation des CSS. Elle peut cependant varier en fonction des conditions environnementales ou hormonales de l'individu, l'âge étant un facteur prépondérant dans l'altération de la qualité des gamètes (Neto *et al.*, 2016).

La spermatogenèse est divisée en 3 phases principales, permettant la production de 3 types cellulaires distincts, chacun étant à l'origine du type cellulaire suivant : la phase mitotique permettant la production de spermatogonies différenciées, la phase de méiose des spermatocytes permettant la production de spermatides et la phase de spermiogenèse, permettant une modification morphologique des spermatides en spermatozoïdes (Neto *et al.*, 2016) (Figure 8).

La méiose permet d'obtenir des cellules haploïdes à partir d'une cellule diploïde, par l'association d'une réplication unique de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) suivie d'une double division chromosomique. Cette réduction de ploïdie permet de compenser son doublement lors de la fécondation. Ce mécanisme permet d'accroître la diversité génétique par le réassortiment aléatoire des chromosomes d'origines paternels et maternels, et par les recombinaisons homologues créant de nouvelles combinaisons génétiques. Contrairement à la femelle, la méiose chez le mâle a lieu de la puberté à la sénescence.

La première division de méiose, dite réductionnelle, consiste en une séparation des chromosomes homologues, permettant une réduction de la ploïdie. La deuxième division, dite équationnelle, s'apparente à une division mitotique, faisant intervenir une séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome. Comme pour chaque division cellulaire, les divisions méiotiques sont constituées des étapes suivantes : prophase, métaphase, anaphase et télophase (Figure 9). La prophase I, représente la phase la plus importante et la plus longue de la méiose. En effet, elle dure environ 19 jours chez le rat et 23 jours chez l'homme, tandis que

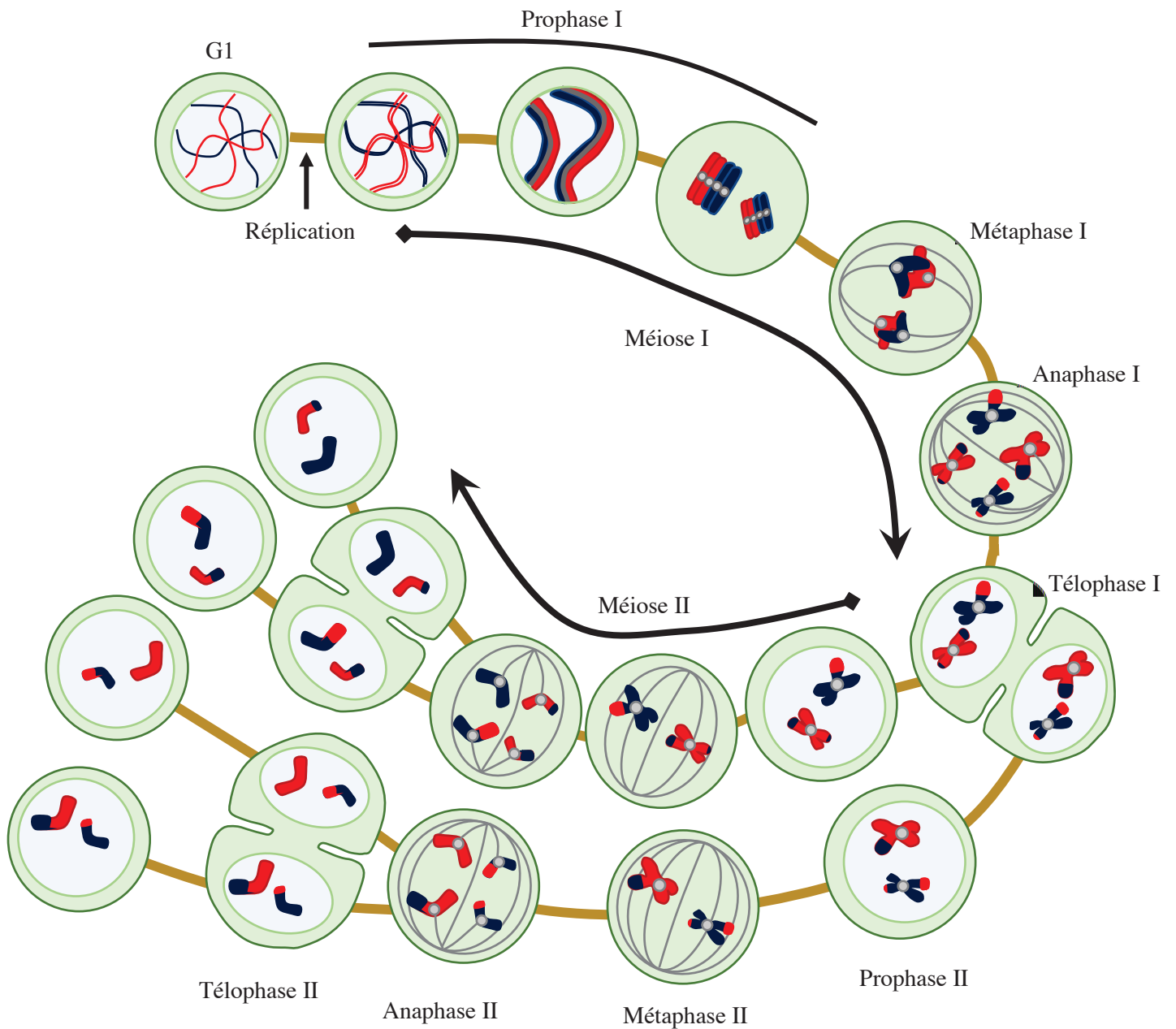


Figure 9 : Étapes de la méiose

Au cours de la méiose, une unique étape de réplication de l'ADN est suivie de deux étapes de divisions successives, la méiose I et la méiose II conduisant théoriquement à la production de 4 cellules haploïdes à partir d'une cellule diploïde (d'après Saint-Dizier *et al.*, 2014).

la fin de la méiose ne dure que quelques heures chez le rat à moins d'une journée chez l'homme. Durant cette longue phase, les chromosomes vont se condenser, s'individualiser puis de façon transitoire, on observe la formation du complexe synaptonémal.

La méiose est un mécanisme hautement régulé et soumis à plusieurs points de contrôles qui permettent de s'assurer de la qualité des cellules produites (Burgoyne *et al.*, 2009). Cependant, il peut arriver que certaines aneuploïdies (nombre anormal de chromosomes), persistent au sein des gamètes produits et se transmettent à la descendance. Un grand nombre d'autres anomalies résultant de défauts méiotiques ou de l'environnement testiculaire peuvent entraîner des arrêts ou blocages temporaires, affectant la qualité et le rendement des cellules germinales produites.

Les principaux événements en lien avec la spermatogenèse, tout comme sa régulation seront développés dans cette première partie.

2.1. Déroulement de la spermatogenèse

2.1.1. Prolifération spermatogoniale

Plusieurs générations de spermatogonies ont été décrites d'après la condensation et la position de la chromatine nucléaire et leur position dans les tubes séminifères (Clermont, 1963). Les spermatogonies sont réparties en trois catégories selon leur fonction : les spermatogonies souches, les spermatogonies prolifératives et les spermatogonies en différenciation situées dans le compartiment basal de l'épithélium séminifère (Zhou and Griswold, 2008).

Chez le rat, les spermatogonies isolées de type A (A_{single} , A , *A single spermatogonia*) qui restent accolées à la membrane basale des tubes séminifères. Les CSS représentent peu de cellules dans le testicule adulte (Oatley and Brinster, 2012). Deux types de division sont observées chez les CSS : (i) la division symétrique, ayant pour but de restituer le pool de CSS, principalement après exposition toxique et (ii) la division asymétrique, permettant le renouvellement du stock de CSS tout en permettant l'entrée en différenciation d'une des cellules filles produites (Morrison and Kimble, 2006). Durant la spermatogenèse, les divisions asymétriques des A, donnent naissance aux spermatogonies A appariées (A_{paired} , A_{pr} , *A paired spermatogonia*). Ces dernières vont réaliser des divisions mitotiques successives afin de former un pool de spermatogonies alignées de type A (A_{aligned} , A_{al} , *A aligned spermatogonia*). Les spermatogonies

A_{al} vont se diviser et se différencier en spermatogonies de type A1-4 puis en spermatogonies de type intermédiaire (In). Après une dernière division, les spermatogonies In se différencient en

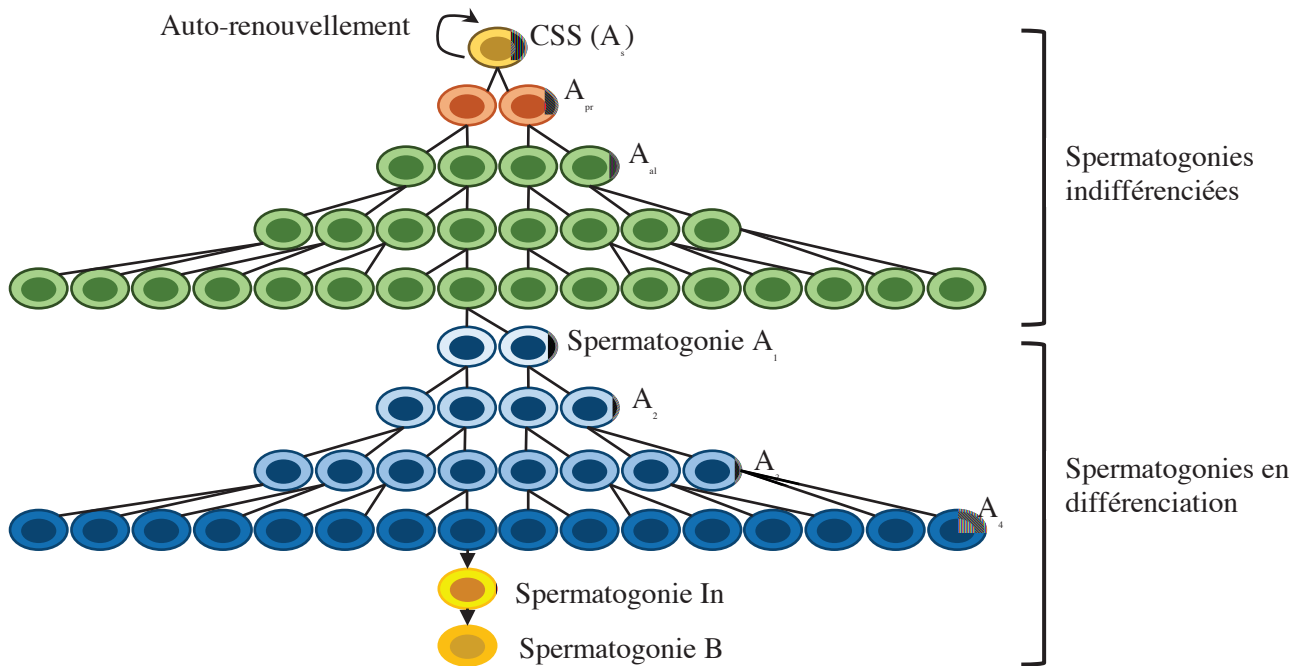


Figure 10 : Prolifération et différenciation spermatogoniale

Les CSS ou spermatogonies A_s , ont la faculté de s'auto-renouveler pour maintenir leur stock cellulaire initial et d'entrer dans une voie de différenciation des cellules germinales. Ces cellules sont à l'origine du processus de spermatogenèse (adapté de Chen and Liu, 2015).

A_{al} : Spermatogonie de type A alignée ; A_{pr} : Spermatogonie de type A appariée ; A_s : Spermatogonie de type A isolée ; CSS : Cellule Souche Spermatogoniale.

spermatogonies B qui entreront en prophase de première division méiotique (Oatley and Brinster, 2012) (Figure 10). Ces différentes transitions sont régulées par divers facteurs externes aux spermatogonies (GDNF, acide rétinoïque, BMP4 (*Bone morphogenetic protein 4*) ...) et régulateurs de transcription (Stra8 [*Stimulated By Retinoic Acid 8*], Sohlh2 [*Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 2*], RAR/RXR [*retinoic acid receptor alpha/retinoid X receptor alpha*] ...), permettant leur prolifération et différenciation (Xie *et al.*, 2021).

2.1.2. Méiose spermatocytaire

Les spermatocytes sont accolés à la lame basale ou peuvent en être séparés par une rangée de spermatogonies et sont reconnaissables par la condensation de leur chromatine, caractéristique de chaque stade (Clermont, 1963). La méiose comporte une phase de réplication de l'ADN au sein du spermatocyte primaire au stade pré-leptotène, suivie de deux divisions cellulaires successives. Chaque division cellulaire est composée de quatre étapes principales : prophase, métaphase, anaphase et télophase.

La première division de méiose, ou méiose I, voit apparaître des changements morphologiques importants des chromosomes en lien avec les processus d'appariement et dissociation, liés aux enjambements (CO ou *crossing-over*) qui ont lieu durant le stade pachytène de la prophase.

La prophase I de méiose, ayant lieu au sein des spermatocytes I, est subdivisée en plusieurs stades successifs :

- Le stade leptotène, durant lequel on observe un début de condensation et une individualisation des chromosomes. Les chromatides sœurs sont associées par des complexes protéiques appelés cohésines et s'ancrent progressivement sur un axe protéique : l'élément axial commence à se structurer (Figure 11). Les cassures de l'ADN double-brin (DSBs, *Double Strand Breaks*) nécessaires aux recombinaisons méiotiques se forment et sont associées à des marques de réparation de l'ADN. Au moment de la transition leptotène/zygotène, les télomères se rassemblent sous forme de bouquets, associés à l'enveloppe nucléaire (Zickler and Kleckner, 1998).
- Le stade suivant est le stade zygotène ; il est marqué par la formation progressive, initiée mais non complète, du complexe synaptonémal. Il s'agit d'une structure protéique

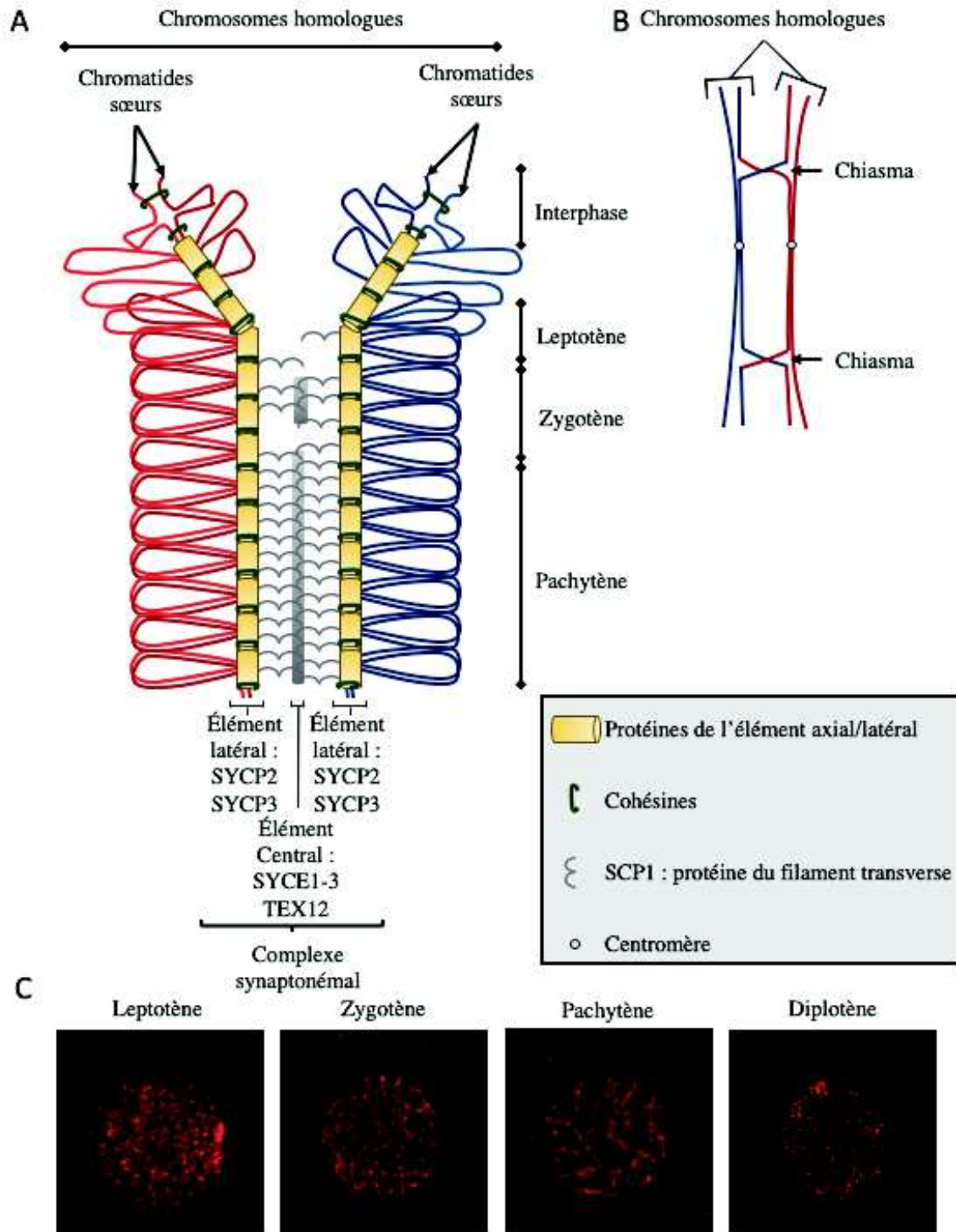


Figure 11 : Formation et structure du complexe synaptonémal

(A) Le complexe synaptonémal (CS) joue le rôle d'une fermeture éclair moléculaire permettant le rapprochement des chromosomes homologues durant la prophase I de méiose. Les chromatides sœurs sont maintenues associées entre elles par les complexes cohésines. Au stade leptotène, la condensation de la chromatine débute et se met en place autour d'un axe protéique appelé élément axial. En zygotène, les éléments axiaux des chromosomes homologues s'apparient, suivi de la polymérisation du filament transverse reliant les éléments latéraux et l'élément central. Au stade pachytène, les chromosomes sont appariés sur toute leur longueur. (B) Lors du stade diplotène, le CS est dépolymérisé et seuls les chiasmata, représentant les zones de crossing-over, permettent le lien entre les chromosomes homologues. (C) Photo de microscopie confocale du marquage SYCP3 sur spermatocyte I (d'après Saint-Dizier *et al.*, 2014)

tripartite sous forme d'échelle, composée des éléments axiaux (maintenant appelés éléments latéraux) reliés par des filaments protéiques transverses. La zone d'appariement des chromosomes homologues est appelée synapsis. La réparation des DSBs est initiée (Hann *et al.*, 2011).

- Le stade pachytène est caractérisé par une association complète des chromosomes homologues - sous forme de bivalents -, avec synapsis de l'ensemble des bivalents chromosomiques. La mise en place des nodules de recombinaison marque les zones de CO. Les recombinaisons génétiques se terminent avec la fin du stade pachytène (Hann *et al.*, 2011).
- Une dépolymérisation rapide du complexe synaptonémal est observée au stade diplotène. Les bivalents sont uniquement retenus par les chiasmata, structures en X issue des CO préalablement réalisés.
- En diacinèse, les chromosomes continuent de se condenser et sont localisés près de l'enveloppe nucléaire.

Cette étape, spécifique de la méiose, est la plus longue du cycle. Elle permet la séparation des chromosomes homologues ainsi que le brassage génétique. La première division est qualifiée de réductionnelle, associant la réduction du nombre de chromosomes et de la quantité d'ADN, produisant les spermatocytes secondaires (Neto *et al.*, 2016).

En métaphase I, la condensation des chromosomes est maximale et l'enveloppe nucléaire disparaît (Hermo *et al.*, 2010a). Le fuseau méiotique se fixe aux bivalents *via* les kinétochores présents au niveau de leur centromère. Ces kinétochores sont mono-orientés par chromosome mais bipolaires pour chaque bivalent.

Au cours de l'anaphase I, la cohésion des bras des chromosomes est réduite, permettant une séparation des chromosomes homologues et une séparation des chiasmata. La cohésion centromérique étant maintenue au sein de chaque chromosome, les chromatides sœurs restent attachées entre elles. La tension produite par le fuseau induit une séparation puis une migration des chromosomes homologues, de part et d'autre de la cellule.

Lors de la télophase I, l'enveloppe nucléaire se reforme. Les spermatocytes II haploïdes formés à l'issue de cette première division sont composés de 21 chromosomes à 2 chromatides chez le rat et 23 chromosomes à 2 chromatides chez l'homme.

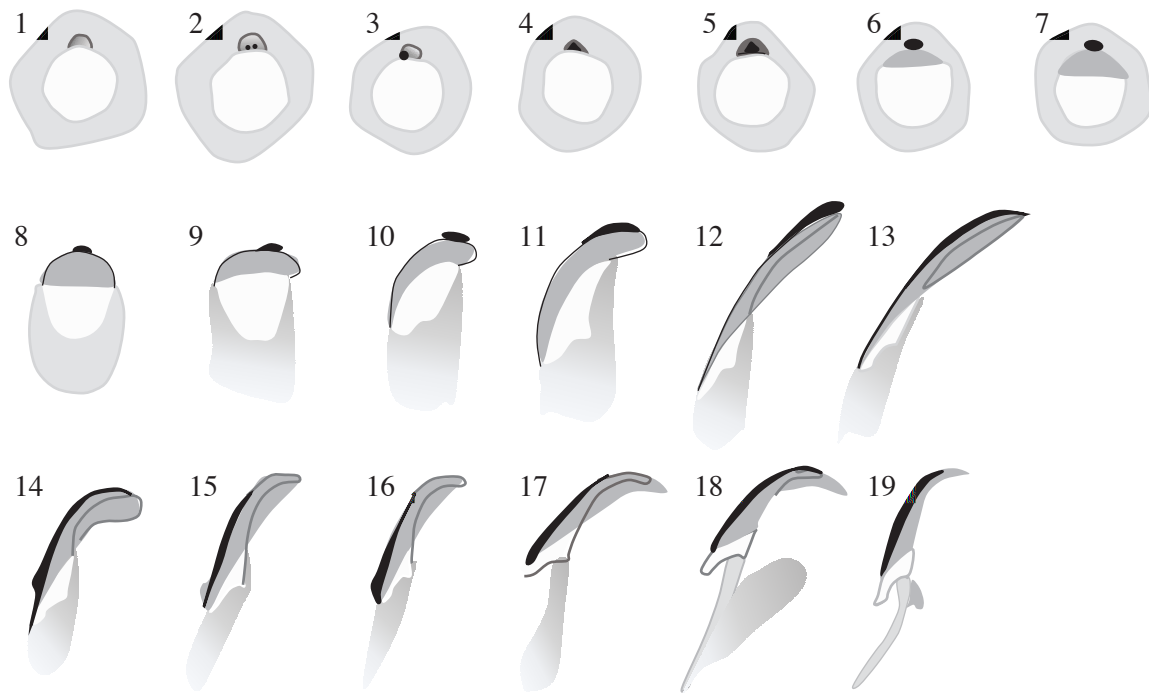


Figure 12 : Formation de la coiffe acrosomiale

La spermiogenèse permettant la formation d'un spermatozoïde à partir d'une spermatide ronde est divisée en 4 phases : (i) Phase de Golgi (1-3), les granules pro-acrosomiques fusionnent, (ii) Phase du capuchon acrosomial (4-7), les granules acrosomiques deviennent la coiffe acrosomiale qui recouvre le tiers supérieur de la spermatide, (iii) Phase de l'acrosome (8-14), le noyau et la coiffe s'allongent, les granules acrosomiques deviennent l'acrosome, (iv) Phase de maturation (15-19), la cellule complète sa différenciation, la pièce intermédiaire est formée, la gouttelette cytoplasmique est résorbée au stade 19 (Adapté de Leblond et Clermont, 1952).

La deuxième division de méiose, ou méiose II, est dite équationnelle et s'apparente à une division mitotique sans synthèse d'ADN préalable. Les kinétochores bi-orientés permettent une séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase II et 2 cellules haploïdes, appelées spermatides, à 1 seule chromatide sont produites par spermatocyte II. Chez le rat, chaque spermatide est dotée de 21 chromosomes haploïdes (20 autosomes et 1 chromosome sexuel) à une seule chromatide. Cette étape est l'une des plus rapides de la spermatogenèse et n'est que très peu visible sur les coupes histologiques (Perey *et al.*, 1961).

2.1.3. Spermio-genèse

Les spermatides produites à la suite de la méiose sont présentes sur 3 à 4 assises cellulaires au sein de l'épithélium séminifère et bordent la lumière tubulaire. La spermio-genèse est un processus complexe, nécessitant une différenciation morphologique et fonctionnelle afin de produire des cellules mobiles hautement spécialisées : les spermatozoïdes. Cette étape est constituée de 4 grandes phases (Hess et Renato de Franca, 2008) appelées phase de Golgi, phase du capuchon acrosomial, phase de l'acrosome, et phase de maturation, elles-mêmes réparties en 19 sous-étapes (Leblond et Clermont, 1952). Ces phases ont été décrites à partir de la morphologie de l'acrosome et de la forme du noyau de la spermatide (Figure 12).

Durant la spermio-genèse, l'appareil de Golgi va progressivement produire diverses molécules et enzymes, impliquées dans la formation du contenu de l'acrosome, structure vésiculaire accolée au noyau cellulaire de la spermatide (Figure 13) (Herms *et al.*, 2010b). L'acrosome va se développer jusqu'à recouvrir les deux tiers supérieurs du noyau spermatique. La coiffe acrosomiale est indispensable lors de la fécondation de l'ovocyte, nécessitant la libération des enzymes protéolytiques qui y sont contenues (Herms *et al.*, 2010b).

Le noyau va subir un important remaniement de sa structure et de sa forme, associé à la compaction progressive de la chromatine. Le noyau va réduire en taille et s'allonger du fait du remplacement des histones par des protéines dites de transition elles-mêmes remplacées par des protamines, protéines nucléaires basiques permettant une compaction maximale de l'ADN spermatique. Ce processus est appelé « transition histones-protamines » et est indispensable à la protection du génome paternel.

Lors du réarrangement nucléaire, les centrioles vont migrer à la base du noyau, à l'opposé de la coiffe acrosomiale et vont former le flagelle, structure tubulaire permettant la locomotion du futur spermatozoïde. Dans le spermatozoïde mature, ce flagelle sera composé

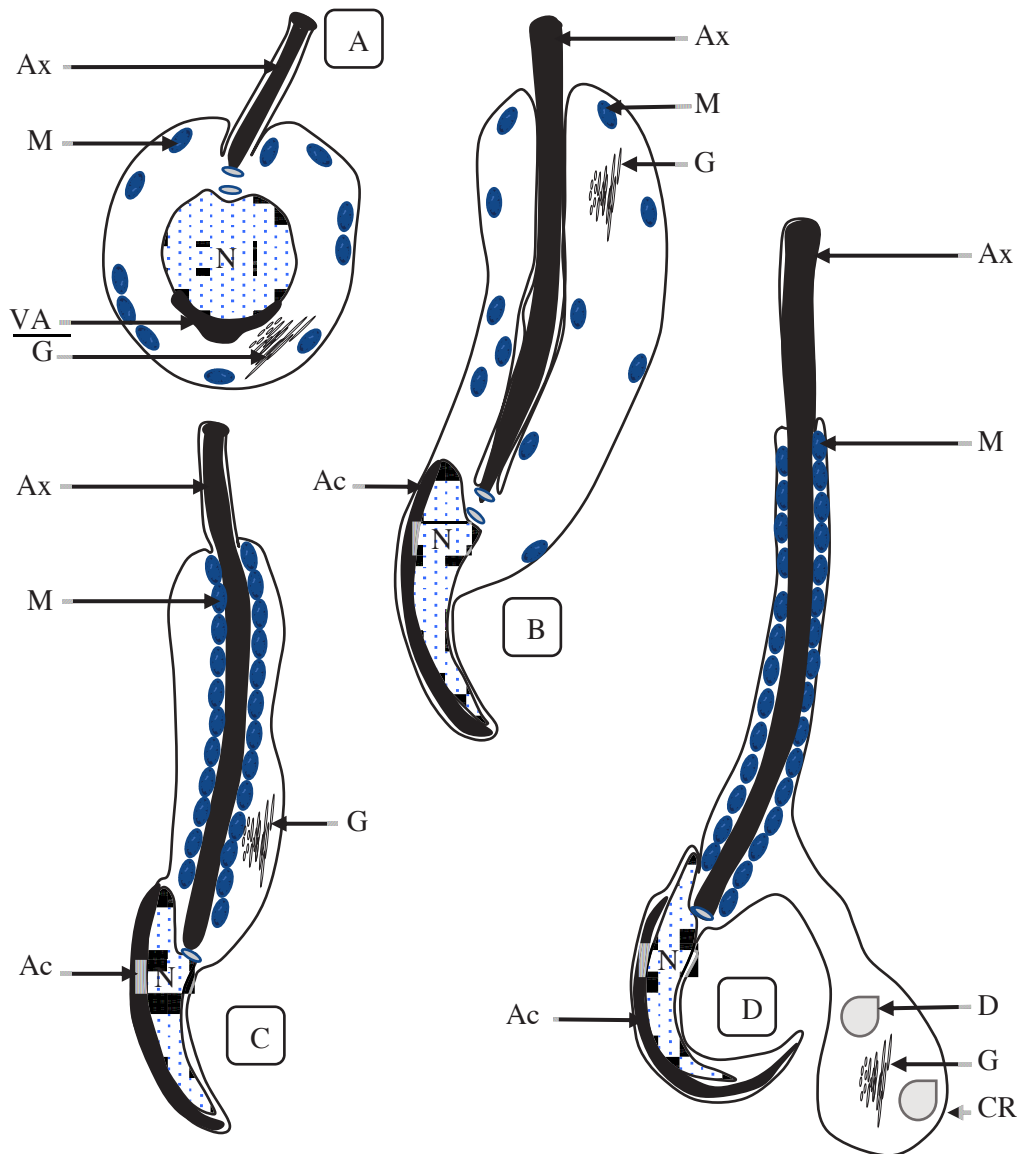


Figure 13 : Spermiogenèse chez le rat

A, B, C et D représentent la spermatide en allongement aux stades 6, 12, 16 et 19 de la formation de la coiffe acrosomiale, respectivement. A : La vésicule acrosomiale commence à recouvrir le noyau et l'appareil de Golgi se rapproche du noyau. B : Le noyau et l'acrosome commencent à s'allonger, l'appareil de Golgi se déplace dans la partie distale du cytoplasme et les mitochondries commencent à se rassembler autour de l'axonème. C : Le noyau continue de s'allonger, s'alignant sur l'axonème de la pièce intermédiaire. D : Le corps résiduel, contenant les organites et déchets cytoplasmiques, se forme au niveau du col du spermatozoïde avant d'être phagocyté par les cellules de Sertoli (adapté de Hermo *et al.*, 2010b).

Ac : Acrosome ; Ax : Axonème ; CR : Corps Résiduel ; D : Déchets cytoplasmiques ; G : Appareil de Golgi ; M : Mitochondrie ; N : Noyau ; VA : Vésicule Acrosomiale.

de 3 parties, relié à la tête du spermatozoïde par le col, contenant le centriole proximal. Chacune des parties contient en son centre l'axonème, composé de 9 doublets externes de microtubes reliés à 2 doublets internes (Linck *et al.*, 2016).

- La pièce intermédiaire contenant les mitochondries (responsables du métabolisme énergétique) regroupées autour de fibres denses externes (FDE), entourant l'axonème.
- La pièce principale composée d'une gaine fibreuse entourant les FDE et l'axonème.
- La pièce terminale composée uniquement de l'axonème.

A la fin de la spermiogenèse, la réduction cytoplasmique est telle que près de 90% du cytoplasme est éliminé de la cellule. Ce corps résiduel est phagocyté par les cellules de Sertoli et pourrait avoir un rôle dans le métabolisme et l'homéostasie testiculaire. Le spermatozoïde produit est libéré par les cellules de Sertoli dans la lumière tubulaire au cours du processus de spermiation (Hess et Renato de Franca, 2008).

2.2. Évènements méiotiques

2.2.1. Recombinaisons méiotiques

La recombinaison méiotique est un mécanisme responsable de la connexion physique entre chromosomes homologues, qui assure le bon alignement des chromosomes homologues sur la plaque métaphasique, puis leur ségrégation à travers la formation de chiasmata. Il permet les échanges réciproques d'information génétique entre chromosomes homologues, créant une diversité génétique. Ce processus est initié par la réalisation programmée de DSBs lors du stade leptotène. La protéine SPO11 (*SPO11 initiator of meiotic double stranded breaks*) est une enzyme catalytique permettant la formation irréversible de cassures de l'ADN. La présence de cette protéine à l'extrémité des brins rompus permet le recrutement de diverses protéines telles que les kinases qui vont promouvoir la phosphorylation du variant d'histone H2AX (*H2AX variant histone*) en γ H2AX, utilisé pour repérer les DSBs. L'histone γ H2AX va recruter les membres de la machinerie de réparation de l'ADN, entraînant un détachement de SPO11, remplacé par des complexes protéiques comprenant les recombinases RAD51/DMC1 (*RAD51 recombinase/DNA meiotic recombinase 1*) en début de synapsis (Baudat et de Massy, 2007). Dans le cas de CO, la réparation du brin d'ADN clivé est réalisée à partir du brin homologue. Les CO sont achevés à la fin du stade pachytène et visibles *via* les chiasmata formés lors du

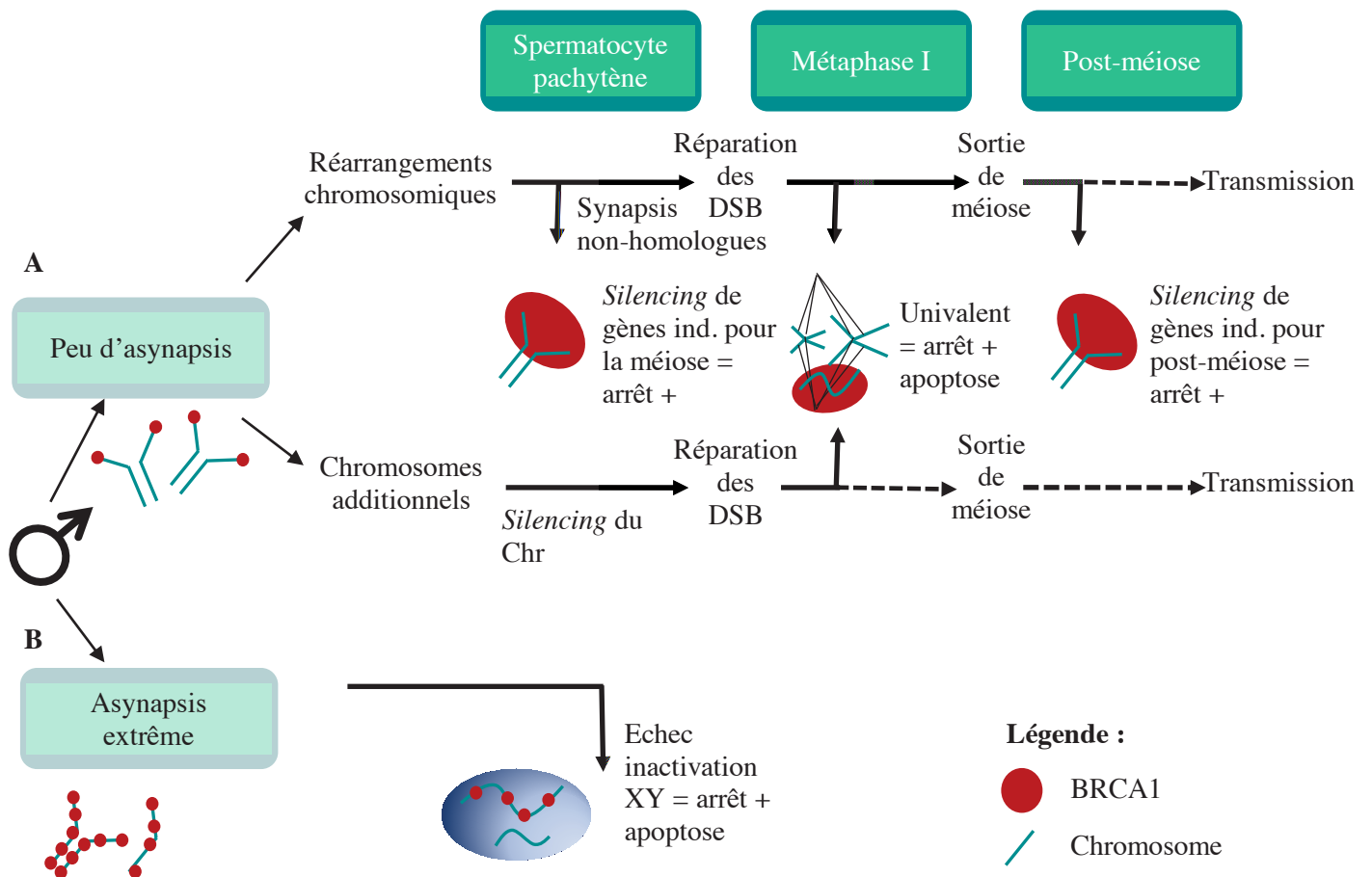


Figure 14 : Conséquences des asynapsis dans la méiose mâle

A : Asynapsis limitée chez les mâles. Chez les souris présentant des réarrangements chromosomiques, l'inhibition de gènes cruciaux - due aux asynapsis - est susceptible d'être une cause majeure de défaillance spermatocytaire ou post-méiotique ; un chromosome surnuméraire peut contrebalancer cet effet par l'apport des gènes manquants. Certains réarrangements sont associés à une fréquence accrue d'univalence, ce qui entraînera une certaine perte en métaphase I. B : Asynapsis étendue chez les hommes. La séquestration de la protéine de réponse aux dommages de l'ADN BRCA1 aux nombreuses cassures non appariées abroge la réponse d'inhibition transcriptionnelle des chromosomes non-appariés, entraînant l'échec de l'inactivation méiotique des chromosomes sexuels. Cela conduit à l'apoptose des spermatocytes pachytènes. Chr, Chromosome; DSB, cassures de l'ADN double brin; ind, indispensables (d'après Burgoyne *et al.*, 2009).

stade diplotène. Ce mécanisme permet la formation d'au moins 1 CO par paire de chromosomes homologues et serait à l'origine de leur appariement, permettant une association stable et la formation du complexe synaptonémal (de Massy, 2013; Zickler et Kleckner, 2015; Carofiglio *et al.*, 2018).

2.2.2. Inactivation des chromosomes sexuels

Lors de la prophase de méiose I, un mécanisme de *silencing* transcriptionnel des chromosomes X et Y se met en place : l'inactivation méiotique des chromosomes sexuels (MSCI, *Meiotic Sex Chromosome Inactivation*). Le MSCI a lieu au stade pachytène, à partir du synapsis complet des autosomes et est associé à un remodelage de la chromatine des chromosomes sexuels. Les gènes des chromosomes sexuels sont exprimés au stade spermatogonie, spermatocyte leptotène/zygotène et sont transcriptionnellement éteints lors du stade pachytène. Les chromosomes XY sont compartimentés dans un sous-domaine nucléaire appelé le corps sexuel, ou corps XY (Turner, 2015). Cela se traduit par une inhibition totale de l'expression génique, affectant tous les gènes codant pour des protéines dans les zones chromosomiques asynapsées aux stades pachytène et diplotène. Le stade pachytène est une période très riche en activité transcriptionnelle, en prévision de la compaction de l'ADN (Monesi, 1965; Yan et McCarrey, 2009). Il a été mis en évidence que le MSCI était une version spécialisée de l'inactivation des chromosomes asynapsés (MSCU, *Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromosome*), entraînant un *silencing* transcriptionnel pour toute zone chromosomique non appariée, conservé après la méiose (Turner *et al.*, 2006).

Le chaînon principal du MSCI est le variant d'histone H2AX (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003). Une première vague de phosphorylation de cette histone est observée lors des recombinaisons méiotiques, l'histone H2AX étant recrutée aux sites de cassures, sa phosphorylation entraînant le recrutement des protéines nécessaires à la réparation de l'ADN au stade zygotène. Lors de la transition zygotène/pachytène, la deuxième vague de phosphorylation se produit, uniquement sur les régions non-synapsés des chromosomes X et Y. L'histone γ H2AX est présente sur ces chromosomes du stade pachytène au stade diplotène puis est déphosphorylée lors de la transition diplotène/métaphase I (Turner *et al.*, 2004). D'autres histones ayant subi des modifications post-transcriptionnelles permettent de maintenir le MSCI jusqu'à la fin de la spermatogenèse (Turner, 2007) (Figure 14).

2.2.3. Checkpoints méiotiques

La méiose est un processus hautement régulé afin de produire des gamètes de la meilleure qualité possible. Lors des différentes phases qui la composent, différents points de contrôle, appelés *checkpoints*, sont présents afin de bloquer la maturation des cellules aberrantes, évitant ainsi les aneuploïdies. Le *meiotic replication checkpoint* va permettre le maintien du potentiel de réplication de l'ADN afin d'éviter la formation de DSBs tant que la réplication est en cours. Il permet ainsi de s'assurer que les CO aient lieu entre chromosomes répliqués. Un autre checkpoint permet la régulation du nombre de DSBs par chromosome afin d'éviter la présence de plusieurs CO au même locus. Cependant, beaucoup de ces *checkpoints* sont étudiés chez des modèles tels que la levure ou le ver plat, ne permettant pas forcément une transposition chez les mammifères. En effet, les gènes impliqués dans les divers *checkpoints* varient d'une espèce à l'autre (Subramanian et Hochwagen, 2014).

D'autres checkpoints, tels que le *Pachytene checkpoint* (PC) et le *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) sont présents chez les mammifères et ont un rôle fondamental dans la progression méiotique. Le PC, aussi nommé *DNA damages checkpoint*, intervient lors de la réparation des DSBs induits lors des recombinaisons méiotiques et de la détection des asynapsis. La rétention des kinases ATM/ATR (*ATM serine/threonine kinase/ATR serine/threonine kinase*) aux sites de cassure de l'ADN agit comme une prévention de la division cellulaire, suivie par une amplification de ce signal faisant intervenir la protéine BRCA1 (*BRCA1 DNA repair associated*) et l'histone H2AX. Il permet d'informer la cellule de la persistance des DSBs sur des fragments de chromosomes asynapsés. Certaines données ont montré que ce checkpoint permettait le passage des cellules au stade suivant *via* un seuil de 20 foci γ H2AX (Deckbar *et al.*, 2007). La présence, quant à elles, de nombreux asynapsis induit un défaut de recrutement des protéines ATR et BRCA1 sur les sections asynapsés des chromosomes sexuels. Une rétention de ces protéines sur les asynapsis des autosomes entraîne donc un défaut de l'inactivation des chromosomes sexuels et une apoptose cellulaire (Mahadevaiah *et al.*, 2008). Le PC étant très stringente, un défaut de réparation de l'ADN ou la présence d'asynapsis induit un arrêt de maturation et une apoptose cellulaire (Burgoyne *et al.*, 2009).

Le SAC intervient après le PC, lors de la transition métaphase/anaphase I *via* une inhibition du complexe de promotion de l'anaphase (APC, *Anaphase-promoting complex*). Il a pour rôle de vérifier l'alignement correct des chromosomes *via* la liaison aux kinétochores du

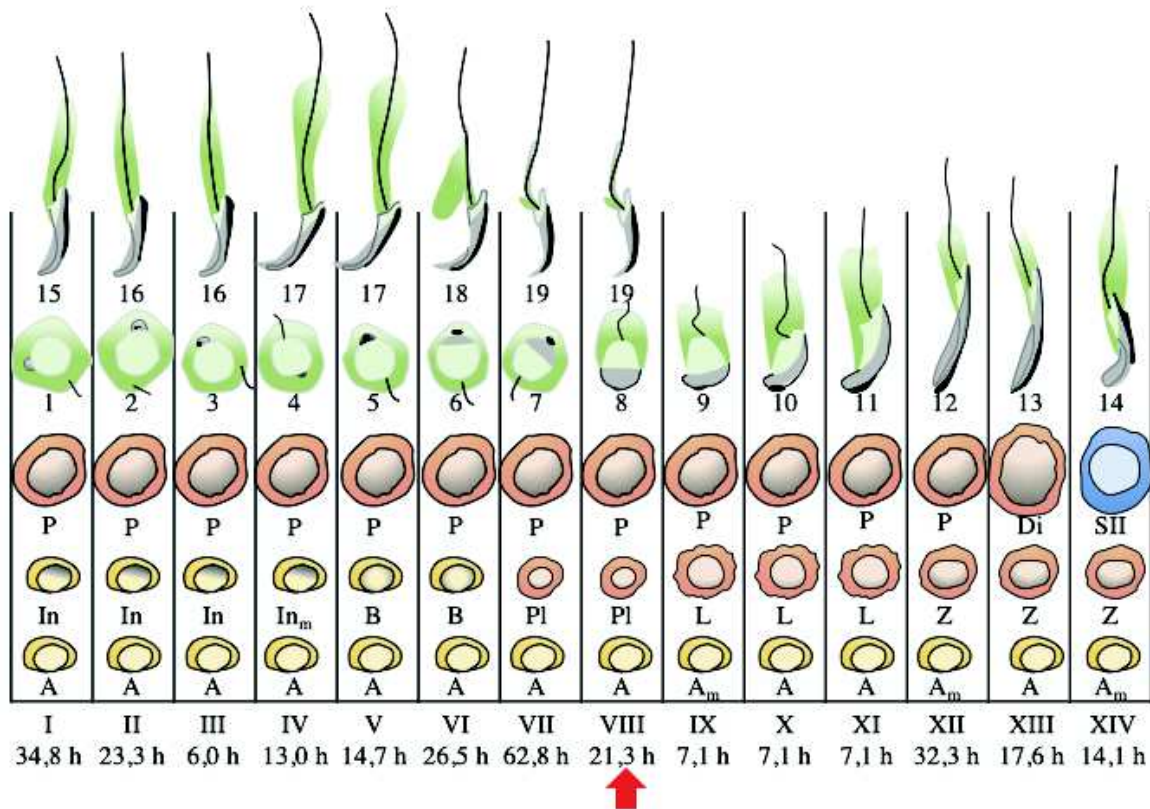


Figure 15 : Cycle de l'épithélium séminifère chez le rat

Composition des 14 associations cellulaires présentes au sein de l'épithélium séminifère. La succession de ces associations forme le cycle de l'épithélium séminifère, dont la durée est d'environ 13 jours chez le rat. La flèche rouge indique le moment hypothétique où le rétinol est requis pour les transitions cellulaires chez le rat. Les temps correspondent à la durée de chaque stade (Adapté de Perey *et al.*, 1961).

Les chiffres romains indiquent le stade de l'épithélium tandis que les chiffres arabes désignent le stade de la spermatide en élongation. A : spermatogonies de type A ; A_m : spermatogonies de type A en mitose ; B : spermatogonies B ; B_m : spermatogonies B en mitose ; Di : spermatocytes diplotènes ; h : heures ; In : spermatogonies intermédiaires ; In_m : spermatogonies intermédiaires en mitose ; L : spermatocytes leptotènes ; P : spermatocytes pachytènes ; Pl : spermatocytes pré-léptotènes ; SII : spermatocytes secondaires ; Z : spermatocytes zygotènes.

fuseau de division, afin d'éviter une ségrégation précoce des chromosomes durant la première division de méiose (Musacchio, 2015; Lane et Kauppi, 2019). Lorsque l'attachement des microtubes du fuseau à tous les kinétochores est complet, le SAC lève son inhibition sur l'APC induisant une destruction protéolytique de la cycline B1 et de la securine permettant une entrée en anaphase (Pines, 2006). L'attachement des microtubes à tous les kinétochores est essentiel, le signal généré par un seul kinétochore libre étant suffisant pour maintenir le checkpoint actif (Musacchio, 2015). Il est cependant à noter que le SAC ne reconnaît pas uniquement l'attachement aux kinétochores, mais aussi la tension exercée sur celui-ci, reflétant la qualité de celui-ci en terme de stabilité (El Yakoubi et Wassmann, 2017). Des erreurs de ségrégation ou d'alignement entraînent un arrêt prématuré du cycle cellulaire et la mort des spermatocytes (Gorbsky, 2015).

2.3. Cinétique de la spermatogenèse

La spermatogenèse est caractérisée par une évolution coordonnée de plusieurs cellules germinales associées entre elles. Cette synchronisation du développement cellulaire est permise par des ponts cytoplasmiques, liant les cellules germinales au même stade. L'association transversale de cellules germinales définit un stade de l'épithélium séminifère. Pour chaque stade, 4 à 5 associations de cellules germinales sont observées (Perey *et al.*, 1961). Chez le rat, les 14 premiers stades de différenciation des spermatides permettent de différencier les différents stades de l'épithélium séminifère (Figure 15). La succession des différents stades pour revenir à celui de départ correspond au cycle de l'épithélium séminifère. La durée du cycle correspond à l'intervalle de temps entre 2 entrées des spermatogonies en différenciation. Chaque étape de la spermatogenèse a une durée fixe, mais varie en fonction de l'espèce. Ainsi, chez le rat, on observe 14 stades de l'épithélium avec un cycle de 13 jours pour une spermatogenèse de 52-54 jours (Perey *et al.*, 1961). Chez l'homme, 6 stades sont observés avec un cycle de 16 jours, pour une durée totale de la spermatogenèse de 74 jours. Les stades de l'épithélium apparaissent dans un ordre précis. Ils se succèdent l'un après l'autre d'un segment de tube au suivant chez le rat, tandis que chez l'homme, les stades se succéderaient selon un mode hélicoïdal (Amann, 2008).

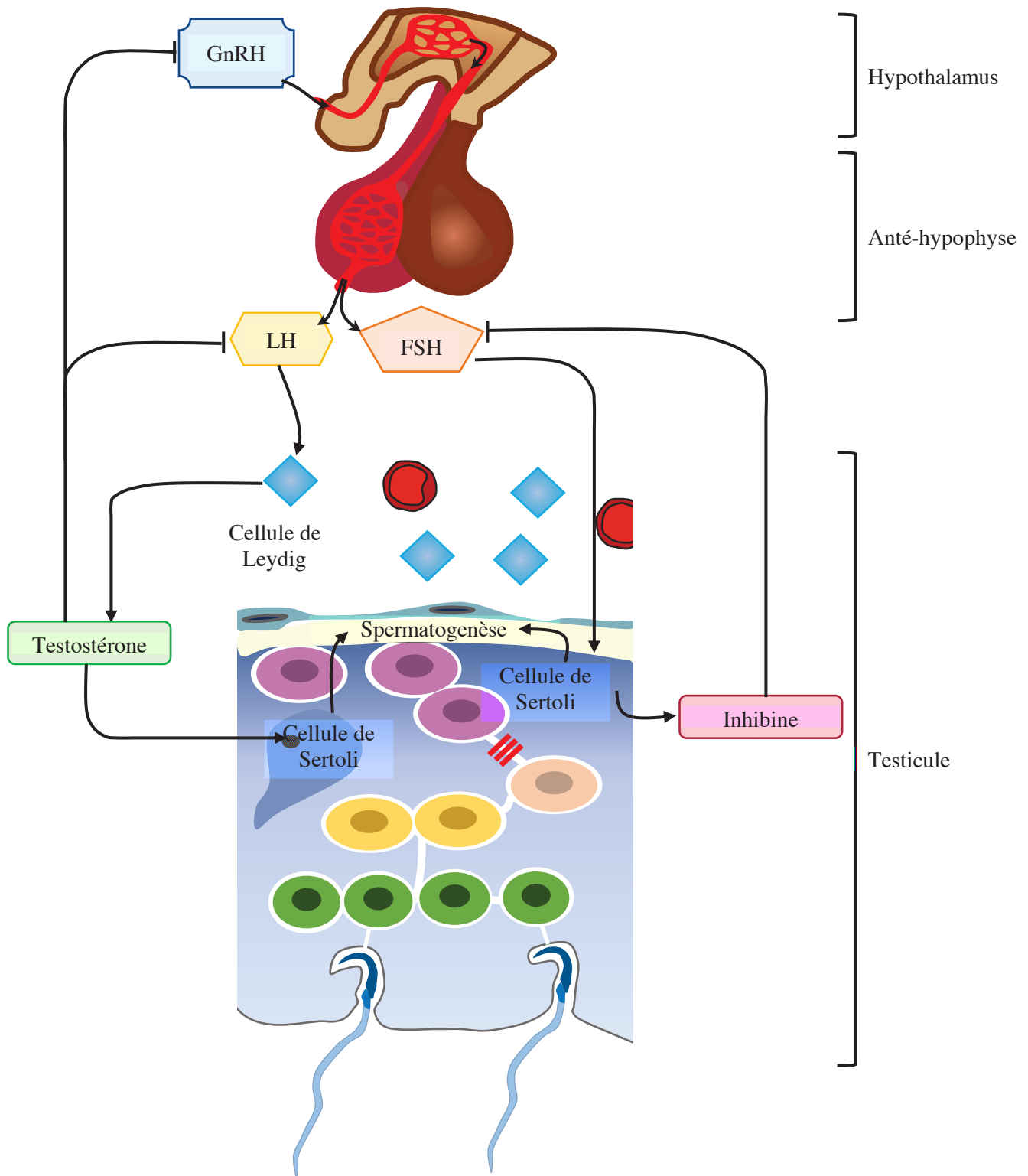


Figure 16 : Régulation endocrinienne de la spermatogenèse

La GnRH, sécrétée par l'hypothalamus, stimule la sécrétion de LH et FSH par l'anté-hypophyse. La FSH agit au niveau des cellules de Sertoli permettant d'assurer leur rôle de soutien de la spermatogenèse. La LH va stimuler les cellules de Leydig et leur production de testostérone. La testostérone peut soit agir directement sur les cellules de Sertoli, ou se lier à l'ABP, afin de faciliter son transport dans la circulation sanguine générale. La testostérone est à l'origine d'un rétrocontrôle négatif sur la production de GnRH et de LH. Les cellules de Sertoli produisent également l'inhibine qui régule la production de FSH.

2.4. Régulation de la spermatogenèse

2.4.1. Régulation hormonale

A) Axe hypothalamo – hypophyso – gonadique

Le contrôle endocrine de la spermatogenèse est dirigé par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) (Figure 16). La gonadolibérine (GnRH, *Gonadotropin Releasing Hormone*) à l'origine de cette régulation est une neurohormone produite par les neurones à GnRH situés dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Ce décapeptide est relargué de façon pulsatile dans le système porte hypothalamo-hypophysaire et agit par fixation sur ses récepteurs présents à la surface des cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. Cette fixation va induire la libération et sécrétion des gonadotrophines, LH et FSH présentes dans les mêmes granules sécrétoires des cellules gonadotropes. Durant la période périnatale, l'axe HHG va être brièvement activé, permettant une sécrétion pulsatile de FSH et LH, nécessaire au développement gonadique et à la différenciation du tractus génital. Il s'ensuit une période de quiescence (chez l'homme) jusqu'à la réactivation lors de la puberté et de l'initiation de la première vague de la spermatogenèse. Chez les rongeurs, ce contrôle neuroendocrine est présent immédiatement après la naissance (Ramaswamy et Weinbauer, 2014).

L'arrivée de la FSH et LH dans le testicule se fait *via* le système vasculaire périphérique. Leur action sur la spermatogenèse est indirecte. En effet, la FSH va agir sur les cellules de Sertoli, tandis que la LH cible les cellules de Leydig productrices de testostérone. L'action combinée de la FSH et de la testostérone sur les cellules de Sertoli permet l'initiation et le maintien de la spermatogenèse. Sous l'action de la FSH, les cellules de Sertoli vont produire l'inhibine B, qui en synergie avec la testostérone, va entraîner un rétrocontrôle négatif sur l'axe HHG, diminuant la sécrétion de GnRH et des acteurs suivants (Smith et Walker, 2014; Santi *et al.*, 2020).

B) Régulation de la spermatogenèse par la testostérone et l'œstradiol

Le rétrocontrôle négatif induit par la testostérone permet le maintien de l'homéostasie testiculaire, régulant à la fois la libération de GnRH et de la LH. Même si de nombreux facteurs sont impliqués dans le processus de spermatogenèse, la testostérone, produite par les cellules

de Leydig, est la seule hormone essentielle à son accomplissement. L'invalidation du récepteur aux androgènes chez la souris produit des animaux stériles, présentant un arrêt de maturation au stade spermatide ronde. En effet, la testostérone est indispensable pour le maintien de la BHT, la réalisation de la méiose, l'adhésion spermatide/cellule de Sertoli et la libération des spermatozoïdes produits dans la lumière tubulaire (Smith et Walker, 2014).

Chez le mammifère, il a été mis en évidence au sein des cellules somatiques et germinales du testicule, la présence de l'enzyme aromatasase (CYP19A1, *cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1*), permettant la synthèse d'œstrogènes à partir d'androgènes (Carreau et Hess, 2010). Contrairement à la testostérone, aucun consensus sur la fonction précise des œstrogènes dans le testicule n'a été établi. Cependant, leur rôle certain dans la physiologie testiculaire est maintenant admis. Les récepteurs aux œstrogènes ayant été retrouvés au niveau des cellules de Sertoli, des cellules de Leydig et certaines cellules germinales, l'œstradiol semble représenter un élément supplémentaire du réseau de régulation paracrine au sein du testicule (Dostalova *et al.*, 2017). En effet, l'œstradiol inhibe l'action de la LH, induisant une diminution de la production de la testostérone (O'Donnell *et al.*, 2001). L'œstradiol semble indispensable à la stimulation de la spermatogenèse *via* les cellules de Sertoli et serait impliqué dans la prolifération des spermatogonies, le développement et l'apoptose des spermatocytes pachytènes, spermatides et spermatozoïdes ainsi que dans la résorption du fluide tubaire (Dostalova *et al.*, 2017).

2.4.2 Régulation paracrine : la « niche » spermatogoniale

Le maintien de la spermatogenèse de la puberté à la sénescence est permis grâce à la population de CSS présente au sein de l'épithélium séminifère. Les CSS sont accolées à la lame basale et maintenues au sein de ce qu'on appelle « la niche » par les cellules de Sertoli qui les entourent. Il s'agit d'un microenvironnement avec une spécialisation anatomique consistant en des cellules de support et d'un milieu contenant des facteurs influençant la biologie de la cellule souche. Pour préserver leur fonction, les CSS possèdent la capacité de s'auto-renouveler afin de préserver un pool de CSS et de générer des cellules progénitrices qui vont s'engager dans la voie de différenciation des cellules germinales. Cette capacité de division est régulée par la niche spermatogoniale. Les facteurs composant la niche varient en fonction du cycle de l'épithélium séminifère, modulant le destin de la CSS en fonction des besoins physiologiques (Oatley et Brinster, 2012).

De nombreux types cellulaires, tels que les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig, les cellules myoïdes, les macrophages et les cellules vasculaires endothéliales, contribuent au support de la niche spermatogoniale par la production de facteurs paracrines (Chen et Liu, 2015; Potter et DeFalco, 2017). Les facteurs tels que le GDNF, produit en partie par les cellules de Sertoli et les cellules myoïdes ou CSF-1 (*Colony Stimulating Factor 1*) produit par les cellules de Leydig et les cellules myoïdes permettent l'auto-renouvellement des CSS (Meng *et al.*, 2000; Oatley *et al.*, 2009). Des études menées *in vitro* ont permis de mettre en évidence qu'une association des facteurs GDNF, FGF2 (*Fibroblast Growth factor 2*) et IGF-1 (*Insulin-like Growth factor 1*) ou GDNF et LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) permettait une meilleure survie et prolifération des cellules spermatogoniales indifférenciées en culture (Kubota *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014a). Contrairement aux autres facteurs, seul CSF-1 qui soutient le processus d'auto-renouvellement sans affecter la prolifération des progéniteurs peut être considéré comme un régulateur spécifique des CSS (Oatley et Brinster, 2012). D'autres facteurs sécrétés, tels que BMP4, la Neuroréguline 1 ou le rétinol sont des inducteurs de différenciation des spermatogonies, les dirigeant vers une entrée en méiose (Oatley et Brinster, 2012; Mäkelä et Hobbs, 2019).

Le rétinol, appelé aussi vitamine A, est apporté à l'homme uniquement par son alimentation sous forme de caroténoïde par les plantes et de rétinyl ester par les animaux. Après absorption, le rétinol est stocké dans le foie puis transporté *via* une liaison à la protéine de transport RBP4 (*Retinol Binding Protein 4*) vers les tissus cibles par le système vasculaire. Le complexe rétinol-RBP4 va se fixer au CRBP (*Cellular Retinol Binding Protein*) présent à la membrane des cellules de Sertoli. Le rétinol va par la suite être métabolisé en *atRA* (*all-trans Retinoic Acid*), qui est le métabolite actif du rétinol. L'*atRA* va être soit utilisé directement par la cellule de Sertoli, soit redistribué vers les cellules germinales cibles. Il va alors s'associer aux récepteurs aux rétinoïdes RAR et RXR puis se fixer sur des régions d'ADN spécifiques appelées RARE (*Retinoic Acid Response Element*), recrutant des co-activateurs ou co-répresseurs induisant des changements transcriptionnels. Plusieurs enzymes présentes dans le cytoplasme des cellules de Sertoli ainsi que dans l'espace interstitiel sont responsables de la dégradation du rétinol, permettant sa régulation. L'*atRA* est responsable de la différenciation des spermatogonies indifférenciées, son action induisant l'expression de *Stra8*, impliqué dans l'entrée en méiose des spermatogonies (Griswold, 2016; Endo *et al.*, 2019). Il est cependant à noter que l'expression de *Stra8* n'est pas forcément corrélée avec la présence de l'*atRA*. Des études récentes ont aussi montré une implication de la voie de signalisation du rétinol au niveau

des spermatocytes pachytènes, des spermatides rondes et dans le processus de spermiation (Endo *et al.*, 2017; Teletin *et al.*, 2019). De par son action localisée au sein de l'épithélium séminifère, le rétinol est à l'origine de la cyclicité de l'épithélium séminifère et de l'entrée en méiose asynchrone des spermatogonies.

2.4.3. Régulation thermique

Chez les espèces exorchides, pour qu'une spermatogenèse optimale ait lieu, la température testiculaire doit être maintenue entre 3 et 4°C en dessous de la température corporelle (Waites, 1970). Le maintien de cette température implique une adaptation physiologique du système vasculaire apportant le sang chaud. Le plexus pampiniforme, formé d'un réseau veineux entourant l'artère testiculaire permet le refroidissement du sang artériel descendant et le réchauffement du sang veineux ascendant par un mécanisme d'échange de température. La présence de glandes sudoripares au niveau du scrotum et la mobilité testiculaire *via* le muscle crémaster permettent une modulation de la température intra-testiculaire (Durairajanayagam *et al.*, 2015).

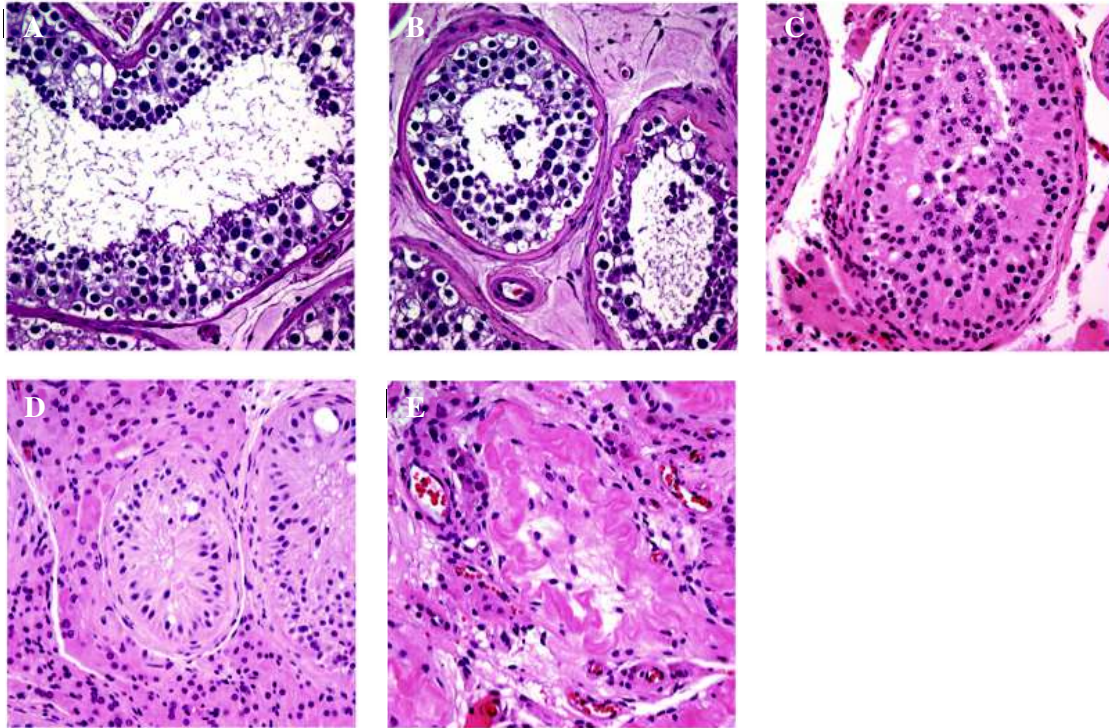


Figure 17 : Classification phénotypique de la spermatogenèse humaine

A, B, C, D et E sont des coupes histologiques de tissus testiculaires humains après coloration par hémalaun-éosine. A : Tissu présentant une spermatogenèse complète et un tissu interstitiel de taille normale. B : Tissu présentant une hypospermatogenèse, caractérisée par une réduction du nombre de cellules germinales à chaque stade. C : Tissu présentant un arrêt de maturation. D : Tubes contenant uniquement des cellules de Sertoli, appelés *Sertoli cell-only*. E : Tissu testiculaire présentant une hyalinisation de ses tubes, correspondant à une dégénérescence tissulaire et l'apparition d'une fibrose testiculaire (Adapté de Cerilli *et al.*, 2010).

Partie 2 - Arrêts de maturation au cours de la spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus complexe, régulé par de nombreux paramètres. La perturbation de l'un d'eux peut entraîner des dommages menant à la formation de cellules germinales altérées ou à un arrêt de maturation et à l'apoptose des cellules germinales.

2.5. Caractérisation phénotypique des arrêts de maturation

L'azoospermie non-obstructive, aussi appelée sécrétoire, est définie par l'absence de spermatozoïdes dans le sperme (Salonia *et al.*, 2017). Les causes de cette pathologie peuvent être divisées en 2 catégories : pré-testiculaire et testiculaire. Les causes pré-testiculaires de cette infertilité sont imputées à l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, par une dérégulation hormonale influant sur la spermatogenèse. Les causes testiculaires sont des défauts primaires du testicule. Elles peuvent être congénitales ou inhérentes aux conditions environnementales ou à une maladie (Cerilli *et al.*, 2010).

Du point de vue histologique, une classification du phénotype histologique de la spermatogenèse a été mise en place, cinq phénotypes sont observables (Cerilli *et al.*, 2010; Salonia *et al.*, 2017) (Figure 17) :

- Biopsie testiculaire normale, avec une spermatogenèse complète au sein du testicule et un tissu interstitiel de taille normale,
- Hypospermatogenèse, tous les stades de la spermatogenèse sont présents mais en nombre réduit, avec une hétérogénéité entre les différents tubes
- Arrêt de maturation, avec un arrêt complet à un stade spécifique (spermatogonie, spermatocyte, spermatide ronde)
- *Sertoli cell-only*, les tubes contiennent uniquement des cellules de Sertoli, avec une absence totale de cellules germinales
- Hyalinisation des tubes séminifères, avec un épaissement de la membrane périvitubulaire, et apparition de fibrose et dégénérescence des tubes séminifères.

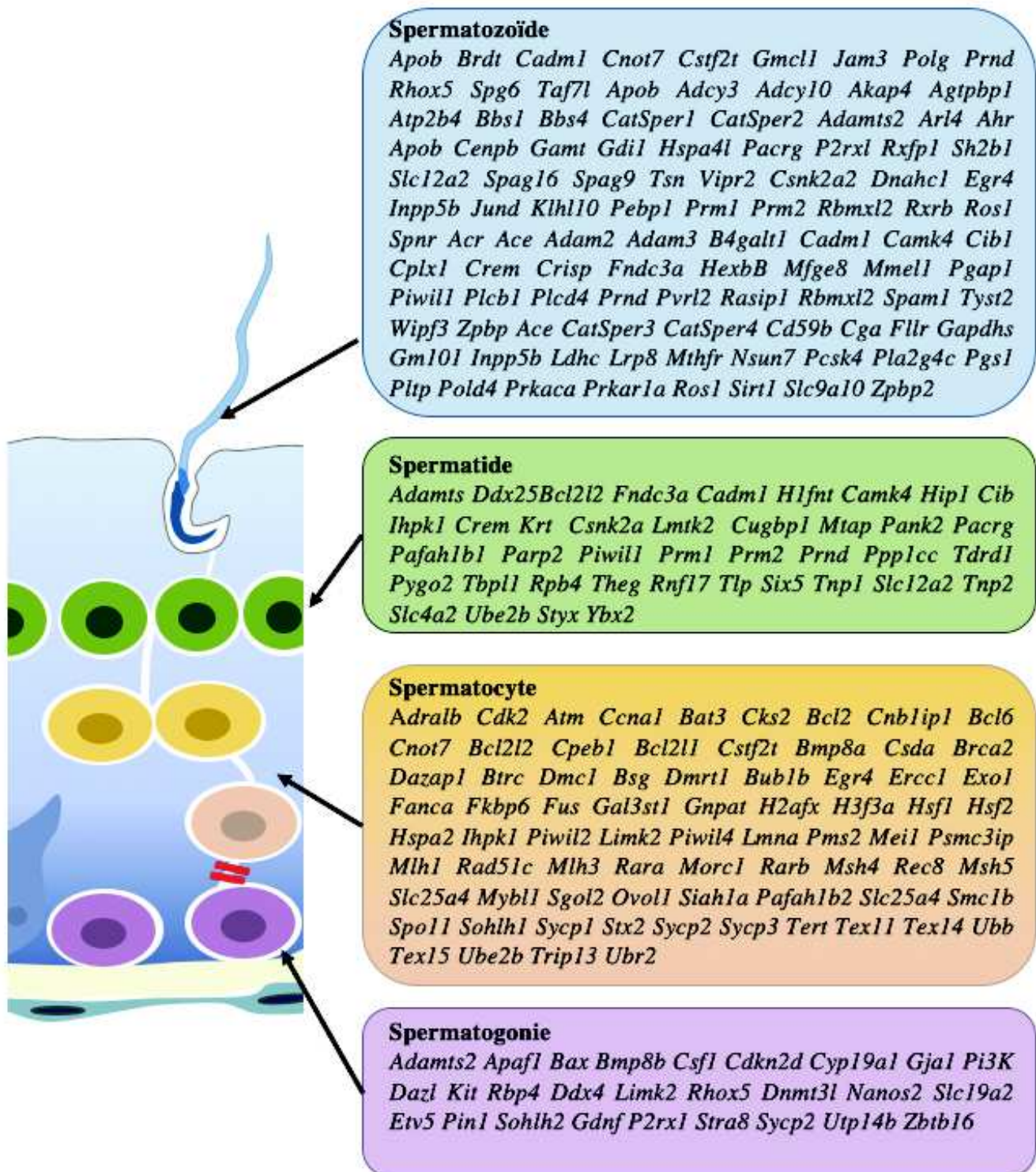


Figure 18 : Liste des gènes impliqués dans des arrêts de maturation des cellules germinales et dans l'hypospermatogenèse

Ces gènes sont issus de modèles souris de défaut de la spermatogenèse (D'après Matzuk et Lamb, 2008).

Du fait de la multiplicité des origines possibles des arrêts de maturation, il est encore difficile de déterminer leur origine exacte face aux nombreux gènes impliqués dans la spermatogenèse et sa régulation (Schultz *et al.*, 2003; Kui *et al.*, 2019). Afin d'en comprendre les mécanismes, de nombreux modèles génétiques d'azoospermie ont été générés chez la souris (Matzuk et Lamb, 2008). Différents arrêts de maturation, correspondant à chacun des différents stades de la spermatogenèse ont été identifiés : arrêt au stade spermatogonie, spermatocyte, spermatide. En plus de cela, des gènes conduisant à la formation de tubes *Sertoli cell-only* ont été identifiés ainsi que des gènes entraînant d'autres altérations de la fertilité (Figure 18). Des analyses menées chez l'homme présentant une azoospermie non-obstructive ont permis de mettre en évidence d'autres phénotypes d'arrêts de maturation au stade spermatocyte pachytène, appelés de type I ou type II, associés à des modifications de la chromatine dans les cellules germinales, visibles après coloration histologique (Jan *et al.*, 2018). Ces arrêts, au stade spermatocyte pachytène sont caractérisés par une disparition (type I) ou non (type II) du corps sexuel (Figure 19).

Des caractérisations plus précises du stade cellulaire correspondant aux arrêts de maturation sont possibles, mais nécessitent des analyses plus poussées des types cellulaires présents. Cela est notamment réalisé dans le cadre des arrêts au stade spermatocyte par l'analyse de la mise en place du complexe synaptonémal ainsi que la formation du corps XY (Park *et al.*, 2016). Ces analyses cytologiques permettent aussi d'identifier d'autres anomalies comme les arrêts en métaphase I, qui semblent plus présents chez les hommes diagnostiqués pour une azoospermie (Enguita-Marruedo *et al.*, 2019).

2.6. Étiologies

2.6.1. Causes génétiques

L'une des premières causes induisant une spermatogenèse altérée est génétique. Qu'il s'agisse d'une insertion, délétion ou translocation, la modification de l'expression d'un gène intervenant directement ou non dans la spermatogenèse peut impacter son efficacité tout autant que sa qualité. En plus des inversions nucléotidiques, les aneuploïdies ainsi que les micro-délétions de sections de chromosomes sont à l'origine d'arrêts méiotiques et par extension, d'infertilité (Flannigan et Schlegel, 2017).

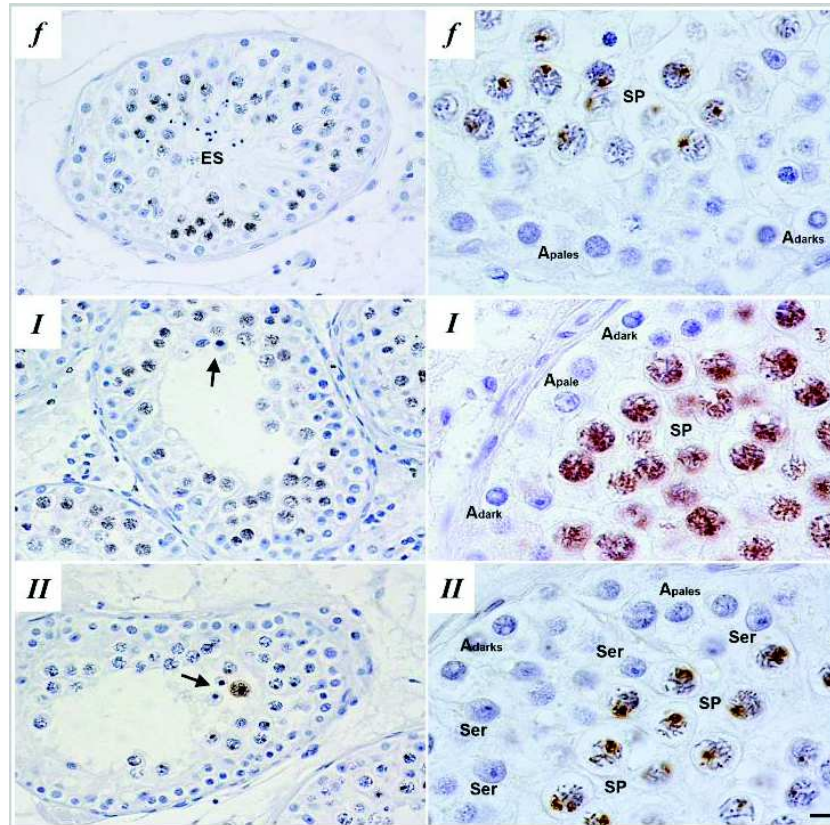


Figure 19 : Coupes histologiques de sections de testicule de patients présentant un arrêt de maturation en prophase I de méiose

La localisation de γ H2AX sur les sections testiculaires d'hommes fertiles (*f*) et de patients avec des arrêts de maturation révèle deux types distincts d'arrêt de prophase méiotique : type I (*I*) et type II (*II*). Le patient possédant le type I montre une distribution altérée du marquage γ H2AX, avec une absence du corps XY. Le patient ayant le type II présente un phénotype normal. La colonne de droite est un agrandissement de celle de gauche. La flèche indique des spermatocytes apoptotiques. A_{pale}, Spermatogonie de type A_{pale}; A_{dark}, Spermatogonie de type A_{dark}; Es, Spermatide allongée; Ser, cellule de Sertoli; SP, spermatocyte. Barre d'échelle : 3 μ m (gauche) et 10 μ m (droite) (Jan *et al.*, 2018)

Les anomalies génétiques telles que la présence d'un chromosome X surnuméraire, appelée syndrome de Klinefelter, ou les micro-délétions du chromosome Y sont bien connues et identifiables *via* la réalisation d'un caryotype ou par analyse en biologie moléculaire, respectivement. La présence de chromosomes surnuméraires au sein du génome induit des asynapsis lors de la prophase I de méiose et mène à l'apoptose des spermatocytes produits ; tandis que les délétions du bras long du chromosome Y peuvent se traduire par une normozoospermie autant qu'une azoospermie, en fonction de la région AZFa (AZF, *Azoospermia Factor*), AZFb ou AZFc déplétée (Krausz et Riera-Escamilla, 2018). Cela est d'autant plus vrai que de nombreuses mutations présentes sur d'autres chromosomes induisent une perturbation de la spermatogenèse et des arrêts de maturation allant du syndrome *Sertoli cell-only* aux anomalies de maturation et d'acquisition du pouvoir fécondant du spermatozoïde (de Rooij et de Boer, 2003; Matzuk et Lamb, 2008).

2.6.2. Perturbations hormonales

Les hormones sécrétées par l'axe HHG sont des éléments essentiels de la régulation hormonale de la spermatogenèse. Celui-ci pouvant être altéré par des mutations génétiques ou des conditions environnementales anormales. La déplétion totale des hormones hypophysaires (LH et FSH) induit des perturbations sévères de la spermatogenèse.

Chez le primate non humain, une déficience en gonadotrophines induit une diminution de la population spermatogoniale ainsi qu'une rétention de spermatides allongées. A long terme, une disparition des stades les plus avancés de la spermatogenèse est observée, allant jusqu'à son arrêt total en l'absence de traitement pour rétablir la production de LH/FSH (Ramaswamy et Weinbauer, 2014). Des résultats similaires sont observés chez l'homme (McLachlan *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2018). Dans le modèle rongeur, une azoospermie due à la rétention des spermatides est aussi observée en cas d'absence de gonadotrophines à long terme. Cependant, contrairement aux tissus de primates, le tissu testiculaire de rat semble répondre différemment : les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes semblent les premiers à être affectés avec la manifestation précoce de dégénérescence cellulaire tandis que les spermatides sont bloquées au stade 19 sans parvenir à être libérées dans la lumière tubulaire. L'apoptose cellulaire se déclenche spécifiquement aux stades VII et VIII de l'épithélium séminifère. À long terme, un maintien des spermatocytes ainsi que des spermatides rondes est observé en l'absence de LH et FSH (McLachlan *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2018).

De même, une augmentation des taux circulants de gonadotrophines et de testostérone a été montrée comme faisant partie des causes d'infertilité liée à une azoospermie chez l'homme (Gangwar *et al.*, 2020).

A) Rôle de la FSH

La FSH est l'une des deux hormones hypophysaires agissant sur le tissu testiculaire. Par son action sur les cellules de Sertoli, elle va indirectement stimuler la spermatogenèse. L'inactivation chez la souris d'un gène codant pour le récepteur à FSH ou pour la sous-unité beta de la FSH induit une réduction d'efficacité de la spermatogenèse, sans pourtant être à l'origine d'un arrêt de celle-ci (Abel *et al.*, 2000; Kumar, 2018). Une réduction des populations de cellules germinales et somatiques intratubulaires ainsi qu'une réduction de la taille du testicule sont observées. La production de spermatozoïdes étant toujours présente, la perturbation du mécanisme d'action de la FSH implique une diminution du rendement spermatique, sans affecter la fertilité de l'individu. En cas de surproduction de cette hormone, la prolifération des spermatogonies est stimulée, induisant une augmentation de la taille du testicule, chez le primate non-humain (Ramaswamy et Weinbauer, 2014) ou chez l'homme, suite à un adénome hypophysaire (Bercovici *et al.*, 1985; Dahlqvist *et al.*, 2010). Lorsque la procédure d'orchidectomie unilatérale pouvant être utilisée chez l'homme, est appliquée chez le rat, une augmentation des taux de FSH est observé. Cependant, aucun changement n'est observé dans le testicule controlatéral (Rombaut *et al.*, 2016).

B) Rôle de la voie LH/testostérone/œstradiol

La LH stimule la spermatogenèse *via* son action sur les cellules de Leydig. Une inhibition de l'action de la LH - par inactivation de son récepteur chez la souris -, sur le tissu testiculaire entraîne une diminution drastique de la concentration en testostérone ainsi que l'absence d'une spermatogenèse effective. En contrepartie, la concentration en œstradiol est augmentée dans le sérum. Une diminution du poids et de la taille des éléments du tractus génital est observée (Lei *et al.*, 2001). Une activité normale des testicules est reprise lorsque la production de testostérone est restaurée dans les testicules (Oduwole *et al.*, 2014).

Afin d'étudier la fonction de la signalisation androgénique dans le testicule, des souris KO (*Knock-Out*) conditionnelles pour le gène AR (AR-KO) ont été générées (Smith et Walker, 2014). L'inactivation de ce gène dans les cellules péricubulaires (Welsh *et al.*, 2009), les cellules de Leydig (Xu *et al.*, 2007) et les cellules de Sertoli (De Gendt *et al.*, 2004) induit un

arrêt de la spermatogenèse ainsi qu'une azoospermie. *A contrario*, aucun effet n'est observé quand le gène AR est invalidé dans les cellules germinales (Tsai *et al.*, 2006) ou dans l'endothélium vasculaire (O'Hara et Smith, 2012). Dans le cas d'une augmentation de l'expression de AR dans les cellules de Sertoli, une perturbation du développement des cellules testiculaires est observée, se traduisant par une accélération de la cinétique de maturation cellulaire et une diminution du nombre de cellules germinales post-méiotiques et de cellules de Leydig (Hazra *et al.*, 2013). En plus de la production des androgènes, une altération de la concentration de la protéine de transport associée, l'*Androgen-Binding Protein* (ABP), a montré un effet délétère sur la spermatogenèse *via* une réduction du nombre de cellules post-méiotiques (Jeyaraj *et al.*, 2002). De plus, il a été montré qu'un excès de testostérone induit une apoptose des cellules germinales (Zhou *et al.*, 2001), ainsi qu'une azoospermie (World Health Organization Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility, 1996), tandis qu'une concentration faible induit une augmentation de l'activité des caspases ainsi que de la fragmentation de l'ADN dans les cellules de Sertoli (Tesarik *et al.*, 2002). La perturbation de la signalisation androgénique induit donc une altération de la spermatogenèse se traduisant par un arrêt de maturation des cellules germinales.

Une inhibition de la réponse induite par la signalisation œstrogénique *via* la réalisation d'un double KO des récepteurs α et β aux œstrogènes induit une infertilité chez la souris adulte. Cela est dû à une incapacité des spermatozoïdes produits, en faible quantité, à féconder des ovocytes lors d'une fécondation *in vitro* (Couse *et al.*, 2001). Ce défaut est accompagné d'une augmentation des taux de LH, de testostérone et d'œstradiol et d'une hyperplasie des cellules de Leydig. Au niveau histologique, une atrophie de l'épithélium séminifère ainsi qu'une dilatation de la lumière tubulaire, du *rete testis* et des canaux efférents sont observées (Eddy *et al.*, 1996; Couse *et al.*, 2001). Malgré ce phénotype très marqué, le récepteur ER α ne semble pas nécessaire à la différenciation des cellules germinales et interviendrait alors, préférentiellement dans la fonctionnalité des cellules somatiques (Hamilton *et al.*, 2014). Un phénotype partiellement identique est obtenu lorsque l'enzyme aromatase codée par le gène *CYP19* est déplétée dans les tissus, entraînant cependant un arrêt de maturation au stade spermatide ronde (Simpson, 2000). L'exposition à des doses non physiologiques de composés œstrogéniques durant le développement néonatal est un facteur de risque accentuant les possibilités d'infertilité. La présence de ces xéno-œstrogènes entraîne chez le rongeur une diminution de la production de testostérone ainsi que de LH et FSH, accompagnée d'une diminution du poids testiculaire et d'une augmentation de l'apoptose des cellules germinales.

Après la puberté, la morphologie et la fonctionnalité des spermatozoïdes semblent toujours être altérées (Delbès *et al.*, 2006).

2.7. Troubles de l'homéostasie testiculaire

2.7.1. Température

La thermorégulation est un des mécanismes essentiels au maintien de l'activité et de l'intégrité nucléaire des cellules germinales. Des défauts dans les échanges de température entre le système veineux et le système artériel contribuent à l'augmentation de la température testiculaire. Les conditions environnementales ou génétiques peuvent aussi être à l'origine de cette augmentation de température. Des pathologies telles que la varicocèle ou la cryptorchidie induisent une hyperthermie testiculaire pouvant conduire à une infertilité (Durairajanayagam *et al.*, 2015). Dans le cas de la cryptorchidie, modèle classique d'étude du réchauffement testiculaire, le maintien des cellules germinales à la température corporelle induit l'apparition de mutations, conduisant à une altération des CSS, la formation de tumeurs et une déplétion progressive des cellules germinales (Cobellis *et al.*, 2014). Une augmentation de la température scrotale induite par l'environnement affecte également négativement la spermatogenèse (Hjollund *et al.*, 2000; Kastelic *et al.*, 2019). Cela peut se traduire par une diminution du rendement spermatique (Hjollund *et al.*, 2002), ou par un arrêt de maturation des cellules germinales ou azoospermie (Lue *et al.*, 2002).

Parmi les cellules germinales, les cellules en prophase I de méiose sont les plus sensibles aux différences de température. En effet, lors d'une hyperthermie transitoire, les cellules aux stades spermatocyte pachytène, diplotène mais aussi les spermatides rondes semblent les plus susceptibles d'entrer en apoptose (Chowdhury et Steinberger, 1970; Lue *et al.*, 1999; Rockett *et al.*, 2001). En plus de l'apoptose des cellules germinales, d'autres mécanismes tels que la réponse au stress (Paul *et al.*, 2009), l'autophagie (Zhang *et al.*, 2012), les dommages à l'ADN (Yin *et al.*, 1997) et la génération ERO (Espèces réactives de l'oxygène) (Peltola *et al.*, 1995) sont aussi observés. Une altération de la fonction des cellules de Sertoli (Cai *et al.*, 2011) et de Leydig (Kanter et Aktas, 2009) a été mise en évidence, ainsi que la dérégulation de la signalisation androgénique au sein du testicule (Shiraishi *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2019), les rendant inaptes à accomplir leur rôle de soutien de la spermatogenèse.

2.7.2. Facteurs métaboliques et nutritionnels

Le testicule étant un lieu à forte activité de division cellulaire, l'apport de nutriments et le maintien du métabolisme sont des facteurs déterminants pour le déroulement correct de la spermatogenèse. En effet, il a été très tôt démontré que l'absence de vitamine A, non synthétisée par les cellules et apportée uniquement par l'alimentation, entraînait une apoptose des cellules entrant en méiose ainsi qu'une desquamation de l'épithélium séminifère (Morales et Cavicchia, 2002). Il a ainsi été observé la présence de tubes ayant une apparence dite « *Sertoli cell-only* » mais aussi certains tubes avec une persistance des spermatogonies à la base des tubes ainsi que quelques spermatoocytes pré-leptotènes. Des analyses plus poussées ont montré une perturbation de la barrière hémato-testiculaire, responsable de l'apoptose des cellules germinales en différenciation (Morales et Cavicchia, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus suite à des régimes sans vitamine B (Pastén-Hidalgo *et al.*, 2020) ou D (Fu *et al.*, 2017), mais avec des effets moindres. Une carence en ces vitamines induit une altération de la spermatogenèse qui se traduit par une perturbation des paramètres spermatiques (Fu *et al.*, 2017; Pastén-Hidalgo *et al.*, 2020) et parfois par une baisse importante des taux sériques et intratubulaires de testostérone (Fu *et al.*, 2017). Malgré leur importance dans le maintien d'une spermatogenèse normale, une ingestion en excès de vitamines impacte négativement ce processus. Dans le cas de la vitamine A, une dégénérescence des tubes, une altération des paramètres spermatiques, mais surtout la présence de vacuoles au sein de l'épithélium séminifère et une production excessive de testostérone par les cellules de Leydig ont pu être observés (Yokota *et al.*, 2019). De manière plus générale, l'apport et la qualité des nutriments sont des facteurs essentiels de la régulation de la spermatogenèse (Benatta *et al.*, 2020).

Les différentes vitamines font partie du métabolisme testiculaire et ont un rôle essentiel dans sa régulation (Godoy-Parejo *et al.*, 2020). Une altération du métabolisme, comme il est observé dans le syndrome métabolique, induit une toxicité sévère au sein du testicule. Chez le rat, il a été observé une inhibition de la stéroïdogénèse, induisant une réduction de la quantité de testostérone produite et par conséquent une diminution du rendement spermatique, de la mobilité spermatique ainsi qu'une augmentation des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Rahali *et al.*, 2020). Les mêmes observations ont été réalisées chez le lapin (Marchiani *et al.*, 2015). Ces altérations sont les conséquences du stress oxydatif et du mécanisme d'inflammation déclenché par la modification du métabolisme (Leisegang *et al.*, 2019; Rahali *et al.*, 2020).

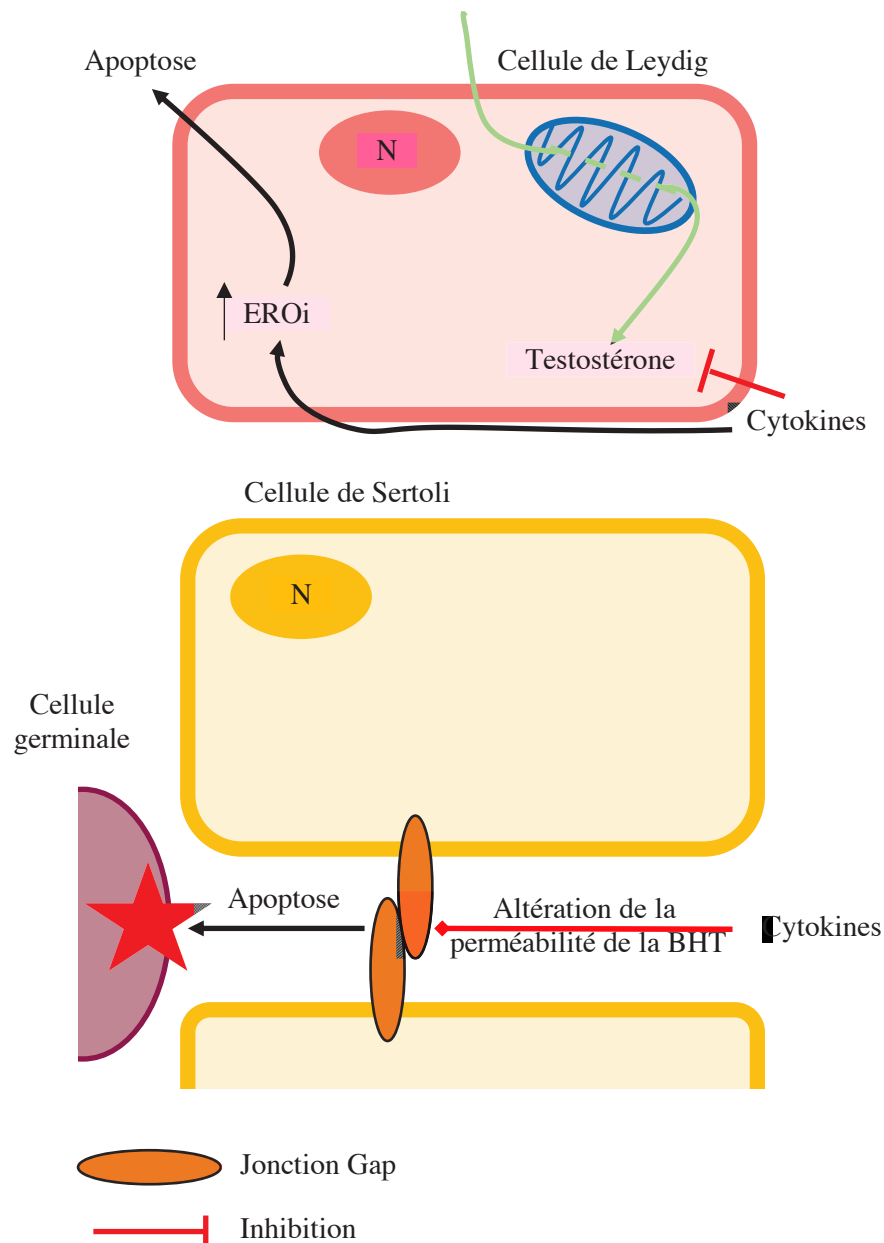


Figure 20 : Régulation de la spermatogenèse par les cytokines.

Les cytokines produites par les macrophages lors de la réponse inflammatoire, s'accompagne par la production d'ERO pouvant entraîner une apoptose cellulaire en cas de surproduction. Les cytokines régulent la stéroïdogenèse par une modulation des niveaux physiologiques de testostérone ainsi que la perméabilité de la BHT. Une dérégulation de la BHT peut conduire à une apoptose des cellules germinales. BHT, Barrière hémato-testiculaire ; ERO, Espèces réactives de l'oxygène ; N, Noyau.

2.7.3. Inflammation

Le processus inflammatoire est une réponse du système immunitaire à une intervention extérieure considérée comme hostile. Les cytokines, produites en réponse à l'inflammation régulent la nature, l'intensité, la durée de la réponse inflammatoire et modulent la communication entre les différentes cellules du système immunitaire (Loveland *et al.*, 2017). Les cytokines, telles que l'IL-1 (Interleukine I) et le TNF- α (*Tumor necrosis factor α*), sont en partie produites par les macrophages afin de promouvoir le processus inflammatoire, et s'accompagnent de la production d'ERO ou de chimiokines (Syriou *et al.*, 2018). Elles sont également produites par les cellules de Leydig et Sertoli en réponse à une stimulation par les gonadotrophines hypophysaires (Huleihel et Lunenfeld, 2004). De plus, il a été mis en évidence que les cytokines régulent la stéroïdogénèse des cellules de Leydig, *via* la modulation du niveau physiologique de testostérone produite (Hedger et Meinhardt, 2003; Winter *et al.*, 2014). Leurs influences sur la production de testostérone en font des régulateurs de l'homéostasie testiculaire, en plus de leur fonction de modulation de l'inflammation (Zhao *et al.*, 2014). De plus, il leur est attribuée une fonction de régulation de la perméabilité de la BHT (Yan *et al.*, 2008; Lie *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2014) permettant le passage des spermatocytes dans le compartiment adluminal *via* une restructuration des *Gap junctions* (Lui et Cheng, 2007; Chojnacka *et al.*, 2016).

Comme dans de nombreux processus biologiques, un maintien du niveau physiologique de ces molécules est indispensable au bon déroulement de la spermatogenèse. En cas d'inflammation, on observe un recrutement de cellules immunitaires produisant de grandes quantités de cytokines, perturbant l'environnement immunitaire du testicule. En effet, les cellules germinales possèdent des récepteurs aux cytokines tels que TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*), IL-6R (*Interleukine-6 receptor*) et FAS (*Fas cell surface death receptor*), activés par les cytokines pro-inflammatoires et conduisant à une entrée en apoptose des cellules germinales et à une infertilité (Jacobo *et al.*, 2011). La stéroïdogénèse étant régulée par TNF- α dans les cellules de Leydig (Mealy *et al.*, 1990; van der Poll *et al.*, 1993), on observe une diminution de la production de testostérone, *via* l'activation du récepteur TLR2 (*Toll like receptor 2*) (Wu *et al.*, 2016), et *via* l'activation du NF κ B (*nuclear factor kappa-B*), qui va inhiber la transactivation de récepteurs nucléaires orphelins, responsables de la régulation de la stéroïdogénèse (Hong *et al.*, 2004) (Figure 20). Les modulations des niveaux de cytokines peuvent alors avoir un effet immédiat par une régulation négative de la fonction de reproduction

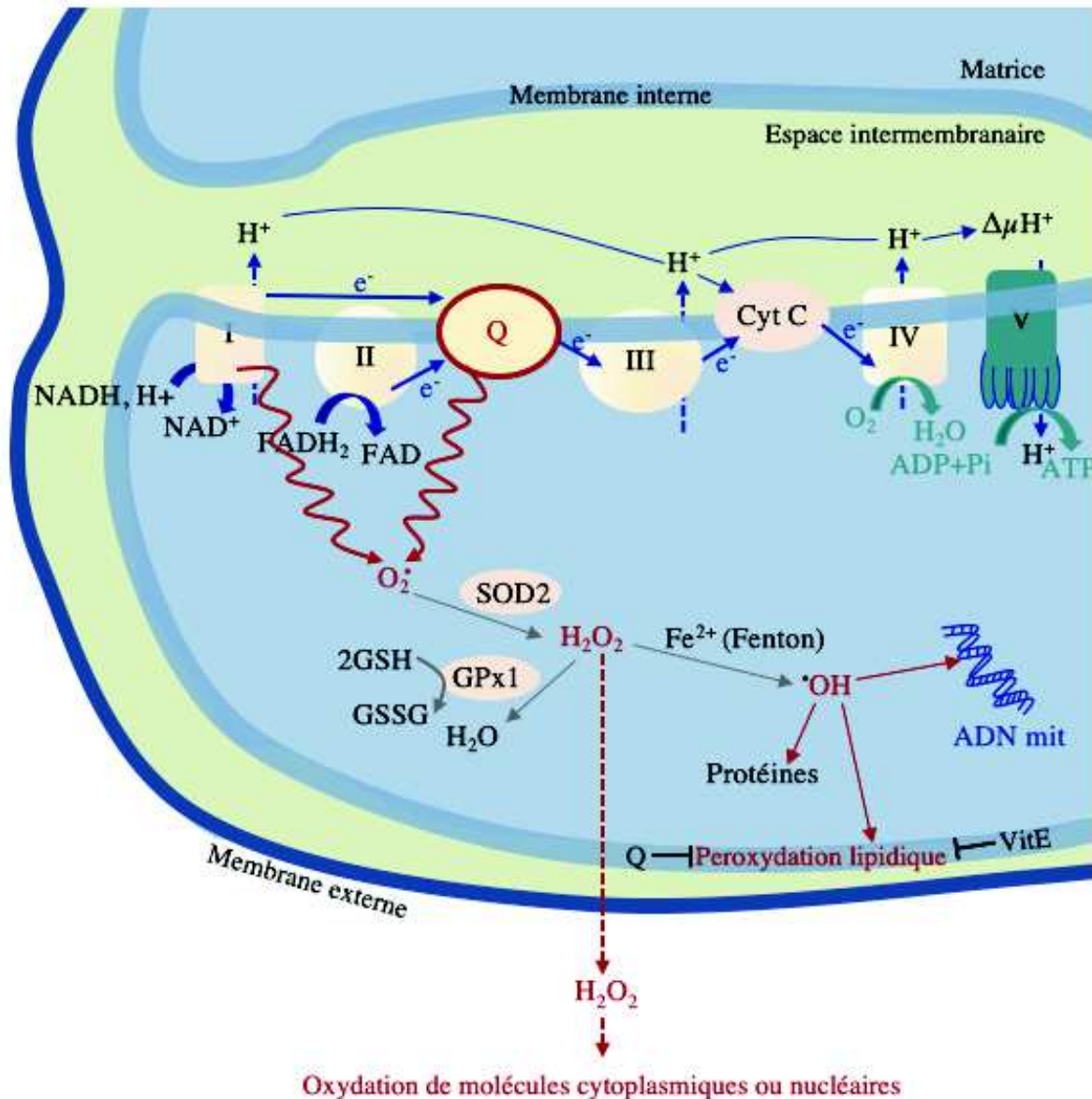


Figure 21 : Chaîne respiratoire mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde

Lors de la production d'ATP par la chaîne respiratoire des mitochondries, il peut y avoir des fuites d'électrons et la production d'anion superoxyde (O_2^-) par le complexe I et le coenzyme Q. O_2^- est par la suite pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD) et transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il peut être décomposé en H_2O par le glutathion peroxydase (GPx1), se transformer en radical hydroxyle ($\cdot OH$) par la réaction de Fenton et diffuser à travers la membrane mitochondriale externe et procéder à l'oxydation de diverses molécules. $\cdot OH$ peut également peroxyder les lipides et altérer l'ADN mitochondrial. Son action peut être limitée par des antioxydants tels que le coenzyme Q et la vitamine E (Adapté de Carrière *et al.*, 2006).

I : complexe I ; II : complexe II ; III : complexe III ; IV : complexe IV ; V : complexe V ; ADP : adénosine di-phosphate ; ADN : acide désoxyribonucléique ; ATP : adénosine tri-phosphate ; e^- : électron ; FAD : flavine adénine dinucléotide oxydée ; $FADH_2$: flavine adénine dinucléotide réduit ; GPx1 : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; H : hydrogène ; H_2O : eau ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé ; $NADH$: nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; O_2 : dioxygène ; O_2^- : anion superoxyde ; $\cdot OH$: radical hydroxyle ; Pi : pyrophosphate ; Q : coenzyme Q ; SOD : superoxyde dismutase ; VitE : vitamine E.

mâle, pouvant conduire à une infertilité via une hypospermatogenèse ou un sperme de qualité moindre (Leisegang *et al.*, 2019).

2.8. Altérations des cellules germinales

2.8.1. Altérations induites par le stress oxydant

Les ERO, appelées aussi radicaux libres, sont des espèces chimiques portant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, les rendant instables. La source la plus importante d'ERO est la mitochondrie, responsable de la production d'énergie pour la cellule sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Au sein de la membrane interne de la mitochondrie, différents substrats sont soumis à des réactions d'oxydo-réduction par la chaîne respiratoire, conduisant à la formation d'un flux d'électrons se terminant par la synthèse d'ATP et la réduction d'oxygène en eau (Carrière *et al.*, 2006; Baskaran *et al.*, 2020). Lors de ce processus, une partie de l'oxygène subit une réduction mono-électronique conduisant à la formation d'ions superoxyde (Figure 21).

Pour limiter une accumulation d'ERO, la cellule possède des systèmes permettant de contrer l'oxydation (Carrière *et al.*, 2006) :

- En inhibant leur formation, par séquestration des métaux de transition et inhibition de la réaction de Fenton.
- En les métabolisant grâce à des enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase ou la glutathion peroxydase, neutralisant leur effet d'oxydation
- Par la mise en place de pièges de radicaux libres tels que le glutathion, les vitamines C, E et le coenzyme Q. Dans le cas des vitamines, la Vitamine C piège les radicaux d'oxygène dans la phase aqueuse, tandis que la vitamine E piège les radicaux d'oxygène dans les membranes. La Vitamine C régénère la Vitamine E en réduisant les radicaux de Vitamine E formés (Niki, 1987).
- Par réparation des dommages oxydatifs, par des molécules capables de réduire les résidus cystéine préalablement oxydés, telles que le glutathion et la thiorédoxine réduite

Dans le testicule, les ERO agissent comme des médiateurs cellulaires et sont requis pour une spermatogenèse normale. Ils interviennent également dans la régulation du métabolisme, sont des médiateurs de l'effet de l'hypoxie et sont impliqués dans le vieillissement cellulaire

(Carrière *et al.*, 2006). Les ERO sont indispensables au maintien du pool de CSS dans le testicule de souris, une légère augmentation stimulant la prolifération cellulaire. Cependant, une concentration élevée en H₂O₂ (Péroxyde d'hydrogène) entraîne une réduction de la croissance cellulaire (Morimoto *et al.*, 2013). Lors de la spermiogenèse, les ERO agissent sur l'ADN spermatique en facilitant la condensation de la chromatine lors de la phase finale de maturation cellulaire (Baskaran *et al.*, 2020). Les ERO sont produits en partie lors de la stéroïdogénèse, et dans la limite des niveaux critiques, jouent un rôle dans sa régulation (Tai et Ascoli, 2011). Lors de la spermatogenèse, par modulation de la voie de signalisation des récepteurs à domaines de mort et de la mitochondrie, les ERO permettent une apoptose des cellules germinales surnuméraires ou déficientes, afin de respecter un nombre constant de cellules germinales par cellule de Sertoli (Chetra *et al.*, 2000; Shaha *et al.*, 2010; Mathur et D'Cruz, 2011; Redza-Dutordoir et Averill-Bates, 2016).

Les ERO sont produits durant divers processus tels que dans l'inflammation, ou sous conditions de stress par trouble de l'homéostasie. Il est possible d'observer un excès de production d'ERO dans le cas d'un apport excédentaire en substrat énergétique, tout comme l'ajout de biomolécules et agents pharmacologiques. En condition physiologique, la production d'ERO est réalisée par les leucocytes phagocytaires ainsi qu'une partie des cellules germinales (Carrière *et al.*, 2006; Mathur et D'Cruz, 2011).

Un maintien de la production d'ERO est indispensable pour le bon déroulement de divers processus biologiques. Cependant, une perturbation de l'homéostasie testiculaire peut avoir des effets néfastes, notamment par une production excessive d'ERO. Un niveau excessif en ERO renverse la balance d'oxydo-réduction vers un état d'oxydation qui va altérer la fonction physiologique des protéines, entraîne une peroxydation lipidique et une oxydation de l'ADN conduisant à des dommages cellulaires (Bardaweel *et al.*, 2018). Au sein du testicule, les spermatogonies et spermatocytes sont particulièrement sensibles aux ERO de par leur forte activité mitotique et méiotique, respectivement (Oldereid *et al.*, 1998). Les spermatozoïdes possèdent une membrane riche en acides gras polyinsaturés, ce qui accroît leur sensibilité aux ERO. Leur cytoplasme étant très réduit, ils ne possèdent que très peu d'antioxydants (Aitken, 1999; Agarwal *et al.*, 2014a, b). Le processus de stéroïdogénèse est une cible directe des ERO, ceux-ci ciblant l'enzyme CYP50scc, la rendant inactive et inhibant ainsi la production de testostérone (Quinn et Payne, 1985; Peltola *et al.*, 1996). Chez l'homme, des altérations de l'intégrité de l'ADN sont observées après un stress oxydant, avec une augmentation du taux de fragmentation de l'ADN spermatique. Une oxydation des protamines entraîne un niveau

moindre de compaction de l'ADN, le rendant encore plus sensible à l'oxydation (Santi *et al.*, 2018).

2.8.2. Fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN consiste en une accumulation de cassures de l'ADN simple ou double brin. Ces cassures de l'ADN peuvent être physiologiques, comme celles produites lors de la méiose au stade spermatocyte I, puis sont réparées par divers mécanismes. Une fragmentation de l'ADN survient également en fin d'apoptose, ce mécanisme permettant d'éliminer l'excès de cellules produites durant les phases de prolifération et de cellules potentiellement nuisibles (Gunes *et al.*, 2015).

Il existe trois causes possibles de formation de cassures de l'ADN dans le testicule (Gunes *et al.*, 2015; Muratori et De Geyter, 2019) :

- Les ERO, produits suite à divers événements perturbant l'homéostasie testiculaire, oxydent l'ADN, pouvant entraîner sa fragmentation.
- Par défaut de maturation de l'ADN spermatique, suite à un échec de réparation des cassures de l'ADN produites pour favoriser la transition histones-protamines dans les spermatides. Ces défauts de condensation de la chromatine permettent un accès à l'ADN favorisant l'apparition de cassures.
- L'apoptose cellulaire, qui est considérée comme physiologique ou non, ainsi que l'apoptose abortive qui se produit dans le testicule et qui résulte en la production et le relargage de spermatozoïdes présentant des caractéristiques apoptotiques dans le liquide séminal.

Différentes conditions environnementales peuvent être à l'origine de la fragmentation de l'ADN. C'est notamment le cas du stress thermique (Kaushik *et al.*, 2019), de l'exposition à divers produits chimiques (Simon *et al.*, 2019), ou à des radiations ionisantes (Cordelli *et al.*, 2012).

2.8.3. Anomalies méiotiques

La méiose est un processus complexe, hautement régulé et soumis à plusieurs points de contrôle. Une perturbation de ces différents mécanismes peut entraîner une altération de la qualité des gamètes produits ou un arrêt de la spermatogenèse (Hann *et al.*, 2011).

Au sein des cellules germinales, le processus de recombinaison méiotique est essentiel au bon déroulement de la méiose. Des anomalies telles que des asynapsis peuvent compromettre la progression méiotique et sont associées à une apoptose des spermatocytes au stade pachytène, avec pour conséquence une hypofertilité ou une infertilité (Burgoyne *et al.*, 2009).

Il existe deux causes possibles à l'entrée en apoptose des spermatocytes présentant des asynapsis : l'intervention des DSBs et des points de contrôle méiotique, ou le défaut de *silencing* des chromosomes sexuels (Burgoyne *et al.*, 2009) (Figure 14).

Les DSB sont produites durant le stade spermatocyte leptotène, pour *in fine* participer à la formation des CO, et sont réparées lors de la transition zygotène-pachytène. Lorsque les mécanismes de réparation ne sont pas opérationnels, il est possible que certaines des cassures induites ne soient pas réparées, entraînant un asynapsis. Une accumulation des protéines BRCA1 et ATR est alors observée au niveau des zones non-synapsées des chromosomes, y compris au niveau des zones non appariées des chromosomes X et Y (Turner *et al.*, 2004). La persistance du signal issu des DSB non réparées va être alors détectée par les points de contrôle méiotique, qui vont entraîner une apoptose (Burgoyne *et al.*, 2009). Comme il a été précédemment mentionné, il est possible que des spermatocytes présentant des régions chromosomiques non appariées puissent passer le point de contrôle si le nombre de foci γ H2AX est inférieur à 20 (Deckbar *et al.*, 2007). Chez les patients diagnostiqués pour une azoospermie non-obstructive, une diminution du nombre ou une absence de recombinaisons méiotiques, augmente la fréquence des aneuploïdies ou arrêts de la spermatogenèse (Hann *et al.*, 2011).

La deuxième voie d'apoptose des spermatocytes est liée à l'échec d'inactivation de la transcription des gonosomes (Burgoyne *et al.*, 2009). Lors de la réactivation de la transcription à la transition zygotène-pachytène, les chromosomes X et Y sont soumis à une répression transcriptionnelle. La modélisation de cette inhibition est visible sous la forme du corps XY au stade spermatocyte pachytène, repérable par une accumulation massive de l'histone H2AX et de la protéine BRCA1 (Turner *et al.*, 2004). La présence de ces protéines est essentielle au bon déroulement de la méiose. L'invalidation de γ H2AX entraîne un échec de l'inactivation transcriptionnelle des chromosomes X et Y et un échec de la condensation de la chromatine (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003). En présence d'une forte proportion d'asynapsis entre les bivalents, il a été observé une baisse du recrutement des protéines BRCA et ATR aux gonosomes et une rétention aux sites d'asynapsis (Mahadevaiah *et al.*, 2008). Une perturbation de l'inactivation des chromosomes sexuels conduit à une transcription partielle des gènes du

chromosome X, et une apoptose des cellules germinales au stade spermatocyte pachytène (Homolka *et al.*, 2007; Turner, 2007).

Le deuxième point hautement régulé est l'alignement et la ségrégation des chromosomes homologues. Durant le cycle cellulaire, le SAC s'assure de la fidélité de la ségrégation des chromosomes. Contrairement à la mitose, la méiose permet la production de gamètes haploïdes et nécessite donc la ségrégation des chromosomes homologues. La formation des bivalents, grâce à l'intervention des CO, est une étape essentielle (Hughes et Hawley, 2020). La perte prématurée de la cohésion centromérique ainsi que l'absence de chiasmas/CO génèrent toutes deux des configurations chromosomiques anormales détectées par le SAC (Lane et Kauppi, 2019).

Le SAC assure la surveillance des liaisons microtubes-kinétochores et contrôle la progression de la métaphase vers l'anaphase. Une altération de sa fonction peut conduire à la formation de gamètes aneuploïdes (Gorbsky, 2015). Le déséquilibre génétique qui en découle peut conduire à une apoptose du spermatocyte, ou dans le cas de survie, à la production de gamètes aneuploïdes, qui après fécondation, conduisent à un arrêt du développement embryonnaire (Lane et Kauppi, 2019).

Partie 3. Apport de la transcriptomique dans la compréhension de la spermatogenèse normale et pathologique

L'avancée des techniques de biologie moléculaire, permet actuellement de mieux connaître les mécanismes de régulation intracellulaires. Depuis le développement du séquençage de l'ADN par Sanger en 1977, les méthodes de séquençage ainsi que les techniques de biologie moléculaire ont beaucoup évolué. Il est maintenant possible de séquencer le génome entier d'un organisme ainsi que d'obtenir le transcriptome d'une cellule à un temps donné.

2.9. Principe de base du séquençage haut débit

Les ARN sont le reflet de la vie cellulaire. En regardant le transcriptome d'une cellule, nous pouvons dorénavant déterminer sa fonction, mais aussi de nombreux paramètres en lien avec les expressions de gènes. Le transcriptome correspond à l'ensemble des ARN produits, issus de la transcription du génome. Ce transcriptome peut varier en fonction du type cellulaire, de son état de différenciation ou encore des conditions environnementales.

Afin de pouvoir analyser les ARN d'intérêt, différents protocoles sont disponibles : isolement des ARN messagers, ARN ribosomaux, micro-ARN, et autres ARN non codants ... Classiquement, les ARN totaux sont extraits des échantillons concernés puis envoyés aux plateformes de séquençage. Des ADNc seront synthétisés à partir des ARN transmis. Afin de former les banques à ADN, aussi appelées librairies, 4 étapes principales sont nécessaires (Hrdlickova *et al.*, 2017):

- La fragmentation des ADN est indispensable, la taille des fragments formés étant dépendante de la technologie de séquençage utilisée. Elle peut être réalisée soit par réaction enzymatique, soit par sonication.
- Une réparation des extrémités peut être réalisée, la sonication n'entraînant pas la formation de cassures franches de l'ADN.

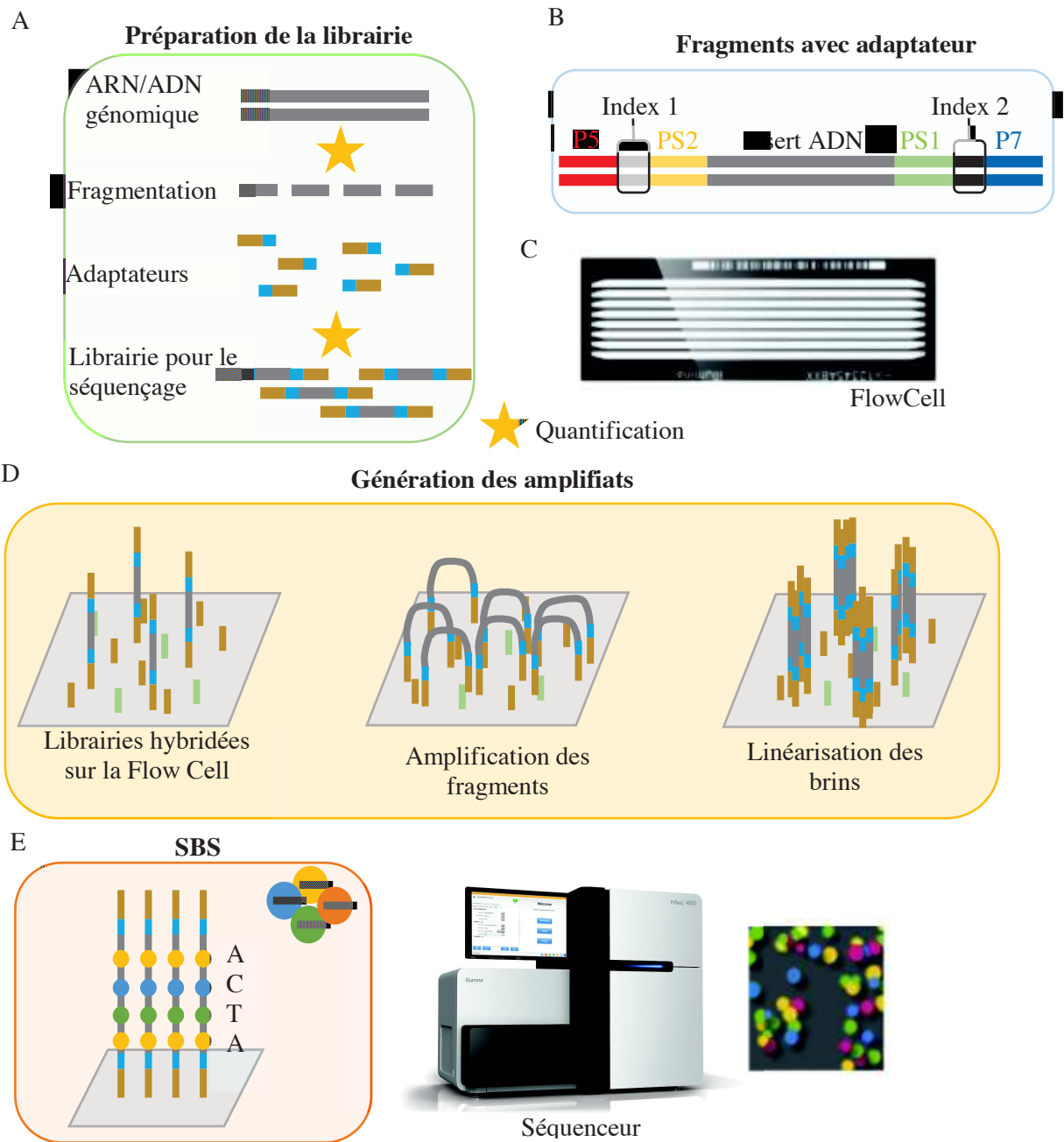


Figure 22 : Préparation des librairies et séquençage selon la technologie d'Illumina

(A) La préparation des librairies est généralement composée des étapes couplées à sa quantification avant le séquençage. (B) Les adaptateurs comportent des régions P5 et P7 permettant leur fixation à la surface de la FlowCell. Les index permettent d'identifier chaque insert. Les régions PS1 et PS2 sont des zones de fixation des amorces de séquençage. (C) La FlowCell est composée de lamelles de verre comportant des canaux, où se produit la chimie du séquençage. (D) La génération d'amplifiats est le processus par lequel chaque fragment de la librairie est cloné en milliers de copies identiques. Après hybridation sur la FlowCell, les molécules à brin unique s'hybrident aux amorces adjacentes. Une polymérase synthétise le brins antisens, ce processus est répété plusieurs fois. Les brins sont par la suite linéarisés pour la préparation au séquençage. (E) Lorsque la FlowCell est imagée, des nucléotides fluorescents, émettent une intensité de longueur d'onde unique qui permet de les identifier. Durant chaque cycle de séquençage, une base nucléotidique est ajoutée sur le brin de la librairie, détectée par l'instrument. SBS, Séquençage par synthèse (Adapté de Illumina Support).

- Une liaison à un adaptateur (séquence d'ADN double brin synthétique) est ensuite réalisée, permettant l'identification de l'échantillon mais aussi la liaison au support de séquençage.
- Une amplification de la banque est nécessaire afin que le signal reçu par le séquenceur soit assez puissant pour être détecté efficacement.

Ces différentes étapes peuvent avoir un déroulement différent en fonction de la technologie utilisée.

La banque produite est ensuite séquencée à une profondeur de lecture de 10 à 30 millions de lectures par échantillon sur une plateforme à haut débit (Stark *et al.*, 2019). La technologie NGS la plus utilisée est la technologie Illumina®. Cette technologie se base sur l'amplification clonale et le séquençage par synthèse (Figure 22). Le processus permet d'identifier simultanément les bases nucléotidiques lorsqu'elles sont incorporées dans la chaîne d'acides nucléiques. Chaque base émet un signal de fluorescence unique lorsqu'elle est ajoutée au brin en cours de synthèse, détecté par le séquenceur et permettant de déterminer la séquence d'ADN (Illumina Support).

Les dernières étapes sont informatisées : alignement et/ou assemblage des lectures de séquençage sur un génome, quantification des lectures qui chevauchent les transcrits, filtrage et normalisation entre les échantillons, et modélisation statistique des changements significatifs dans les niveaux d'expression des gènes individuels et/ou des transcrits entre les groupes d'échantillons (Stark *et al.*, 2019).

2.10. Différentes technologies d'analyse du transcriptome utilisées

Plusieurs stratégies peuvent être adoptées pour analyser le transcriptome de différents échantillons. L'analyse sur puces à ADN est la plus ancienne stratégie permettant une analyse de plusieurs gènes à partir d'un même échantillon. Par la suite, les développements technologiques et l'affluence de connaissances ont permis de développer les technologies RNA-seq, réalisant une analyse au niveau du génome entier. Les avantages et inconvénients de chacune de ces deux stratégies sont présentés dans le tableau 2.

	Puce à ADN	RNA-Seq
Reproductibilité	Haute	Haute
Niveau de précision	Limité	Élevé
Sensibilité de détection des évènements rares	Constante	Dépend de la profondeur de séquençage
Détection des isoformes	Limitée	Élevée
Saturation de détection	Présente	Absente
Détection de SNP	Impossible	Possible
Quantité de gènes étudiés	Portion du génome	Génome entier
Coût	Normal	Très élevé
Temps d'analyse	Normal	Très long
Littérature	Abondante	Limitée

Tableau 2 : Comparaison entre les puces à ADN et le RNA-sequencing.

2.10.1. Puces à ADN

La première puce à ADN a été utilisée en 1995 et était composée de 45 sondes fluorescentes d'*Arabidopsis thaliana*, permettant d'obtenir des mesures parallèles de la concentration de plusieurs ARNm (Acide ribonucléique messager) (Schena *et al.*, 1995). Ces puces sont composées d'un ensemble de spots microscopiques constitués de molécules d'ADN fixées (=sondes) sur une surface et dont la position exacte est connue. Elles permettent de mesurer simultanément les niveaux d'expression d'un grand nombre de gènes pour un même échantillon. Les ADNc fluorescents déposés sur la matrice d'ADN vont s'hybrider sur leur séquence homologue, le nombre de fixation reflétant le niveau d'expression du gène. Pour chaque puce, les ADNc vont être mis en compétition pour se fixer aux brins matrices. Les puces à ADN permettent ainsi de réaliser des profils d'expression de gènes sélectionnés, le rapport d'intensité de fluorescence traduisant la concentration relative d'ARNm d'une condition par rapport à une autre (Koo *et al.*, 2019).

2.10.2. Bulk RNA-Seq

Le *Bulk RNA-seq*, ou RNA-seq global, est une technique permettant l'analyse du transcriptome entier d'un échantillon, par le séquençage des ARN totaux obtenus après extraction à partir d'un lot de cellules ou d'un fragment tissulaire. Cette technique récente (années 2000) et assez complexe permet de séquencer des millions de fragments courts d'ADN dans un temps relativement rapide. Cette évolution du séquençage de Sanger a surpassé les puces à ADN par son extrême sensibilité ainsi que sa résolution, permettant une détection à la base près. En plus de quantifier les ARN, cette technique permet de détecter les événements rares, de détecter les petits transcrits et d'étudier l'impact de ces ARN dans divers mécanismes de régulation. De par sa capacité à donner une valeur moyenne à l'expression de chaque gène pour une large population de cellules, le RNA-seq global est un outil utilisé en transcriptomique comparative afin de mettre en évidence des différences d'expression entre espèces (Breschi *et al.*, 2017) ou dans le cadre de maladies (Winge *et al.*, 2018). Différents échantillons peuvent être analysés : des fragments tissulaires, des populations cellulaires cultivées, ou encore des cellules isolées à partir de tissus. Cette méthode d'analyse montre ses limites lors du séquençage de structures très hétérogènes telles que le cerveau, les résultats obtenus ne pouvant être attribués à un type cellulaire précis. Afin de pallier cela, certaines équipes ont opté pour l'utilisation de microdissection laser sur coupe de tissus, permettant de séquencer le transcriptome d'un type cellulaire précis (Jan *et al.*, 2018).

2.10.3. RNA-Seq sur cellules isolées

Suite à une évolution très rapide des techniques de séquençage haut débit, une nouvelle technologie est apparue, le *Single-cell RNA-seq* (Tang *et al.*, 2009). Le développement de nouveaux protocoles quelques années plus tard en a fait une des techniques les plus révolutionnaires et accessibles, permettant d'étudier de nouvelles problématiques, comme l'évolution du transcriptome au cours de la différenciation d'un type cellulaire ainsi que le transcriptome spécifique à chaque type cellulaire, l'impact d'un facteur sur différentes voies de régulation ... Cette évolution a permis de passer du transcriptome à l'échelle d'un groupe de cellules, à une cellule unique (Stark *et al.*, 2019).

2.11. Mise en évidence de mécanismes testiculaires

Les nombreuses applications des analyses transcriptomiques ont permis de franchir un cap dans la compréhension des mécanismes spécifiques à la spermatogenèse. En plus de permettre d'identifier le transcriptome de chaque type cellulaire impliqué dans ce processus, l'utilisation de cette approche permet actuellement de mettre en évidence différents facteurs d'infertilité en comparant des individus fertiles et non fertiles.

2.11.1. Compréhension de la spermatogenèse normale

A) Première vague de la spermatogenèse

La première vague de la spermatogenèse représente un modèle de choix dans la compréhension des facteurs génétiques régulant les différents stades de la spermatogenèse. En effet, une variation des profils d'expression des gènes est observée au fur et à mesure de la différenciation cellulaire initiée quelques jours après la naissance dans le modèle murin (Sree *et al.*, 2014). Une synchronisation de l'entrée en méiose lors de la première vague de la spermatogenèse *via* une manipulation du niveau d'acide rétinolique a permis d'identifier le transcriptome testiculaire, contenant une population définie et homogène de cellules germinales (Evans *et al.*, 2014). D'autres stratégies, basées sur une analyse comparée des différents temps d'apparition des cellules germinales au cours de la 1^{re} vague, ont montré une variation de l'expression des gènes sertoliens suite à la différenciation et la croissance du contenu en cellules germinales (Laiho *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2015). Les gènes en lien avec la stéroïdogénèse montrent aussi une dynamique propre, suite à la différenciation des cellules de Leydig (Laiho *et al.*, 2013). L'utilisation d'animaux KO couplée aux technologies d'analyse du transcriptome permet également de préciser le rôle des gènes. En effet, une analyse *via* l'utilisation de puces à ADN sur tissus testiculaires de souris KO pour le gène *E2f1* (*E2F transcription factor1*) a montré une différence de sa fonction lors de la maturation du tissu et une implication dans l'auto-renouvellement des SSC (Rotgers *et al.*, 2015).

B) Puberté

L'entrée en puberté est un phénomène indispensable à la bonne santé reproductive à l'âge adulte. Lors de celle-ci, des modifications de l'expression des gènes sont observées, en lien avec la maturation des cellules germinales et somatiques. Étudiés à travers le transcriptome

des cellules de Sertoli, des profils spécifiques de réponse aux hormones à chaque stade de maturation de ces cellules ont été observés (immature, en cours de puberté et adulte) (Gautam *et al.*, 2018). Ces résultats mettent en évidence les fonctions différentielles des cellules de Sertoli au cours de la maturation : une fonction ciblée vers la croissance et la différenciation cellulaire, le métabolisme et la production de cytokines dans un tissu prépubère, tandis que dans le tissu ayant réalisé sa puberté, les processus biologiques mis en avant sont liés au métabolisme du glucose, à la phagocytose cellulaire ainsi qu'à la voie de l'insuline (Gautam *et al.*, 2018). Récemment, une analyse du transcriptome de tissus testiculaires issus d'enfants prépubères, péripubères et d'adultes a permis de réaliser un atlas de la dynamique transcriptionnelle du testicule en développement (Guo *et al.*, 2020). Ces résultats ont mis en évidence la présence d'un progéniteur commun entre les cellules de Leydig et les cellules myoïdes périlitubulaires, mais aussi de délimiter les facteurs candidats du contrôle de la différenciation pubertaire (Guo *et al.*, 2020).

C) Age adulte

Du fait du développement des analyses du transcriptome réalisées sur cellule unique, il est maintenant possible d'identifier les différentes populations cellulaires au sein du testicule grâce à leurs profils d'expression de gènes caractéristiques. En effet, une étude très récente a montré la présence de 11 profils correspondant aux différents types cellulaires présents dans le testicule, une partie de ceux-ci étant des profils signatures jusqu'alors non disponibles dans la littérature (Hermann *et al.*, 2018). Une très grande hétérogénéité des profils d'expression entre les différents types cellulaires a été mise en évidence. Ce travail permet notamment d'étudier plus en détail les populations de spermatogonies afin de déterminer les marqueurs spécifiques des cellules souches. Le regroupement de plusieurs analyses du transcriptome a permis de mettre en évidence l'importance des protéines de la lame basale pour le maintien de la spermatogenèse (Kurek *et al.*, 2021). L'utilisation du *Bulk* RNA-seq a quant à elle montré de façon globale les gènes impliqués dans la spermatogenèse chez l'adulte, par une comparaison entre tissu adulte et tissu immature (Li *et al.*, 2020).

2.11.2. Étude de la spermatogenèse altérée/pathologique

A) Études toxicologiques

L'environnement a une influence certaine sur le développement et la maturation du testicule. L'utilisation des technologies d'analyse du transcriptome permet de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, induits/altérés par l'environnement. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une altération du transcriptome après une exposition à des facteurs influant sur la voie œstrogénique (Nakamura *et al.*, 2019; Duliban *et al.*, 2020), à des polluants environnementaux (Colli-Dula *et al.*, 2018), à des stress chroniques (Chen *et al.*, 2020) ou encore suite à une alimentation entraînant une obésité (El-Shehawi *et al.*, 2020).

B) Azoospermie/ arrêt de maturation

Afin de comprendre l'origine des arrêts de maturation et des azoospermies non-obstructives, des analyses comparatives de tissus ont été réalisées. Ces études, généralement réalisées sur de grandes cohortes de patients, ont permis de révéler certains gènes tels que *Tex11* (*Testis expressed 11*), responsable d'arrêts de maturation méiotique (Yatsenko *et al.*, 2015). D'autres études, comparant des tissus présentant une azoospermie, immatures ou adultes mettent en évidence différents gènes potentiellement dérégulés dans l'azoospermie non-obstructive et donc important pour la spermatogenèse (Chalmel *et al.*, 2012; Shiraishi *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021). Les azoospermies sont caractérisées par une absence de production de spermatozoïdes, mais sont aussi accompagnées par une altération des cellules de Sertoli (Zhao *et al.*, 2020). Dans le cas de causes congénitales, les cellules de Sertoli semblent matures, mais une dérégulation des gènes et une réponse immunitaire anormale sont observées. Dans les cas d'azoospermies non congénitales, des cellules de Sertoli immatures ont été retrouvées (Zhao *et al.*, 2020). Les données obtenues grâce aux différentes analyses transcriptomiques apportent plusieurs pistes quant aux origines de certaines infertilités, des possibilités de développement de contraception masculine, mais plus particulièrement, des pistes quant aux traitements ou interventions permettant une restauration de la fertilité. Suite à ces analyses, Zhao et collaborateurs ont réalisé des cultures de cellules de Sertoli issues d'individus présentant une azoospermie non congénitale et ont obtenu une maturation de ces cellules *in vitro*, par inhibition de la voie *Wnt* (*wingless-type MMTV integration site family*), précédemment montrée comme étant dérégulée. La mutation *Tex11* a été montrée comme étant responsable d'infertilité à l'âge

adulte (Yatsenko *et al.*, 2015). Des thérapies géniques basées sur ces données ont permis de restaurer la fertilité de souris KO pour ce gène (Wang *et al.*, 2021).

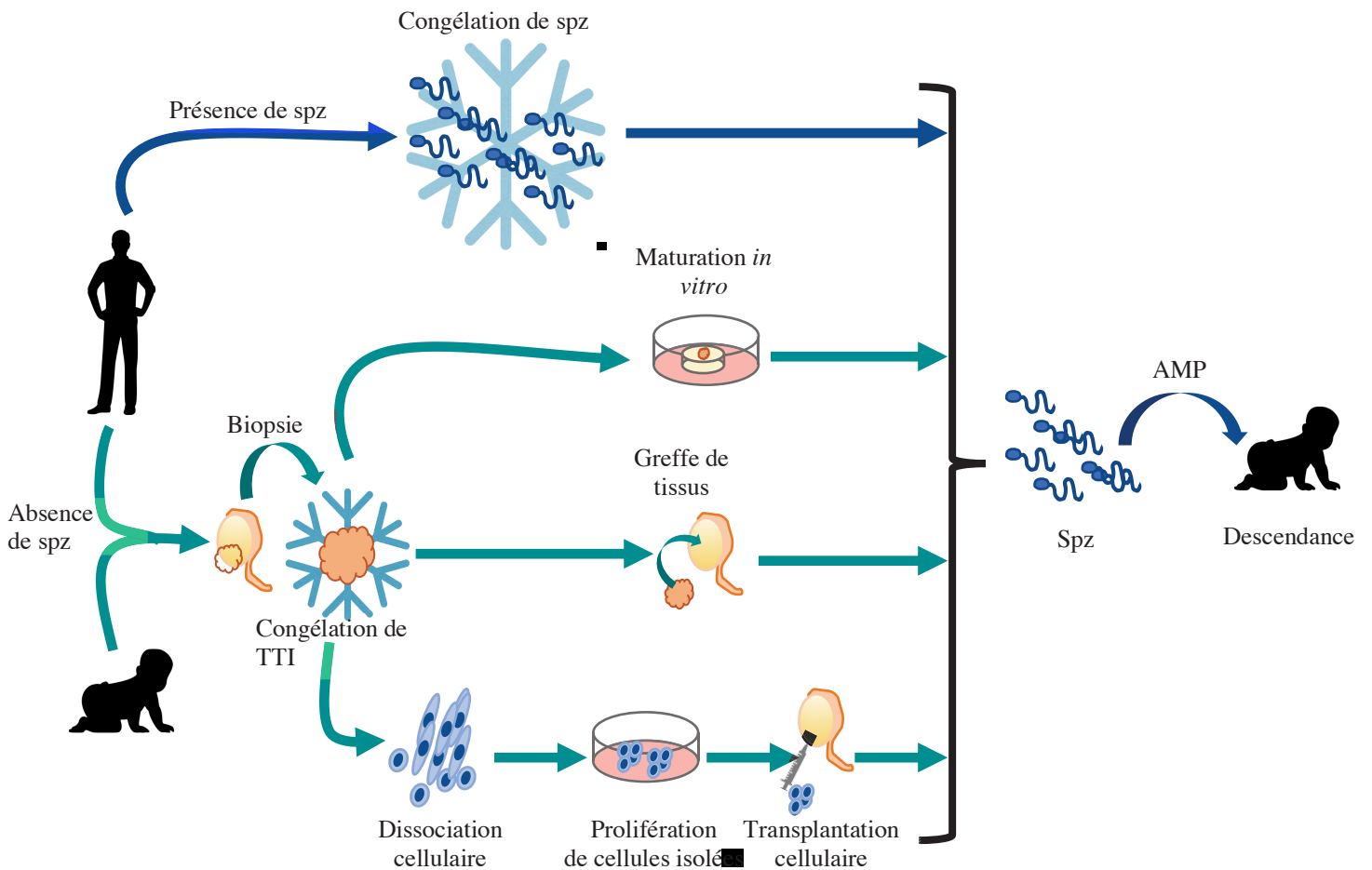


Figure 23 : Préservation de la fertilité chez l'homme

Les flèches bleues indiquent les techniques couramment utilisées et ont montré leur faisabilité en clinique, par la production d'une descendance en bonne santé. Les flèches vertes indiquent les techniques en cours de développement. AMP, Assistance médicale à la procréation ; Spz, Spermatozoïdes ; TTI, Tissu testiculaire immature (Adapté de Medrano *et al.*, 2018).

Chapitre 3. Préservation de la fertilité

La préservation de la fertilité est une notion de plus en plus abordée par les oncologues, offrant une opportunité de protéger la capacité future de reproduction des patients (Jensen *et al.*, 2011). Ce domaine représente une part importante de la prise en charge du patient, par une amélioration de la qualité de vie après la maladie (Pereira et Schattman, 2017). En effet, les traitements tels que la chimiothérapie et la radiothérapie ont une toxicité gonadique connue (Stukenborg *et al.*, 2018). Une exposition des gonades à ces traitements peut entraîner de nombreux dysfonctionnements testiculaires ainsi qu'une azoospermie et stérilité (Delessard *et al.*, 2020a).

Diverses techniques sont aujourd'hui possibles pour préserver la fertilité de ces patients. Chez l'homme adulte, la congélation de spermatozoïdes est une pratique courante, permettant de constituer un stock suffisant pour l'utilisation en AMP (Assistance médicale à la procréation). Ces spermatozoïdes peuvent être par la suite utilisés par insémination intra-utérine, FIV (fécondation *in vitro*) classique ou par ICSI (*Intra-cytoplasmic sperm injection*). La technique utilisée varie en fonction de la qualité, du nombre de paillettes conservées, la conservation de spermatozoïdes devant être réalisée avant la mise en place des traitements potentiellement gonadotoxiques. Lors d'échecs de recueil multiples ou d'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat, des biopsies testiculaires sont réalisées. Elles vont ainsi permettre de récupérer des spermatozoïdes ou de congeler des fragments de tissus testiculaires (Chaput *et al.*, 2018) (Figure 23).

Chez l'enfant n'ayant pas effectué sa puberté, la congélation de spermatozoïdes est impossible. L'exposition à des traitements gonadotoxiques pouvant entraîner une stérilité à l'âge adulte, diverses techniques de préservation de la fertilité ont alors été développées. Une biopsie testiculaire et une congélation du tissu ou cellules testiculaires isolées sont réalisées (Onofre *et al.*, 2016). Une analyse histologique est par la suite effectuée afin de s'assurer de la présence d'un nombre suffisant de cellules souches spermatogoniales et de la présence, ou non, de cellules tumorales (Chaput *et al.*, 2018) (Figure 23).

3.1. Traitements gonadotoxiques et fertilité

3.1.1. Impact de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur le testicule

Les agents de chimiothérapie sont utilisés dans le traitement contre le cancer. Leurs actions sur les cellules à division rapide en font de parfaits combattants du cancer, mais peuvent induire des effets néfastes pour la reproduction. Le testicule étant un organe riche en CSS, l'injection de chimiothérapie peut entraîner une déplétion de cette population cellulaire à forte activité mitotique. En effet, il a été montré une sensibilité accrue des spermatogonies à ces traitements, et un effet moindre sur les cellules de Leydig (Smart *et al.*, 2018). L'effet des chimiothérapies sur l'organisme varie en fonction de la nature pharmacologique des molécules utilisées, des doses, ainsi que de leur effet antimitotique. Différents effets génotoxiques sont observés tels que la fragmentation de l'ADN, des défauts de condensation de la chromatine ou encore des aneuploïdies (Chaput *et al.*, 2018; Delessard *et al.*, 2020a).

Contrairement aux traitements par chimiothérapie, la radiothérapie peut être réalisée localement. Son effet gonadotoxique varie en fonction de la dose totale délivrée, de l'âge du patient, du site de l'irradiation ainsi que du fractionnement ou non de la dose. À doses égales, les irradiations fractionnées semblent plus délétères pour le testicule que l'irradiation à dose unique (Champetier *et al.*, 2010). Les cellules germinales semblent les plus sensibles avec une altération de l'épithélium germinatif dès 0,15 Gy (Grey) et une oligozoospermie transitoire observée entre 3 et 12 Gy. En comparaison, les cellules de Leydig sont considérées comme étant fortement radio-résistantes avec l'apparition de lésions permanentes à partir de 20 Gy (Chaput *et al.*, 2018). Des lésions de la fonction endocrine du testicule sont observées à partir de 20 Gy dans le testicule prépubère et à partir de 30 Gy chez l'adulte (Champetier *et al.*, 2010; Trost et Brannigan, 2012). Il est alors unanimement admis que même une dose minimale d'irradiation peut conduire à des perturbations aiguës de la spermatogenèse. Toute dose d'irradiation est alors considérée comme augmentant de façon significative le risque d'altération de la spermatogenèse (Skinner *et al.*, 2017).

3.1.2. Traitements gonadotoxiques chez le garçon prépubère

En France, environ 2500 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués chaque année chez les enfants et les adolescents (Desandes *et al.*, 2016). Les taux de survie à long terme des enfants atteints de cancer se sont considérablement améliorés grâce aux progrès réalisés en matière de diagnostic et de thérapeutique (Ward *et al.*, 2014; Gies *et al.*, 2015). La survie des enfants ayant eu un cancer avant l'âge de la puberté atteignant dorénavant plus de 80%, la prise en charge de leur future fertilité a d'autant plus été mise en place (Gatta *et al.*, 2009). Cependant, les différents traitements du cancer utilisés peuvent avoir des effets gonadotoxiques, en ciblant et en épuisant le *pool* de spermatogonies présent dans les testicules prépubère (Jahnukainen *et al.*, 2015; Stukenborg *et al.*, 2018). En effet, les spermatogonies A_{pale} , considérées comme ayant une très forte activité de prolifération, sont très sensibles aux agents de chimiothérapie et peuvent entrer en apoptose après administration de doses très faibles. Les spermatogonies A_{dark} , à faible activité de prolifération, sont endommagées de manière significative à des doses plus élevées, pouvant entraîner une déplétion permanente en cellule germinale et une infertilité (Trost et Brannigan, 2012).

Il a été récemment montré que contrairement aux idées préconçues, le statut quiescent des gonades mâles prépubères ne lui conférait pas une protection face aux différents traitements du cancer (Delessard *et al.*, 2020b). Il apparaît alors nécessaire de mettre en œuvre des stratégies de préservation de la fertilité pour ces enfants.

3.2. Méthodes de préservation de la fertilité

La préservation de la fertilité des garçons prépubères est depuis plusieurs années développée au sein des diverses structures médicales les prenant en charge. Au sein des différents pays ou regroupement de régions, différents consensus essaient de se mettre en place mais les approches et paramètres diffèrent (Goossens *et al.*, 2020). Cette préservation passe par une congélation des cellules testiculaires soit sous forme isolée, après dilacération ou digestion enzymatique des tissus, soit sous forme de fragments testiculaire. À cela s'ajoutent les différentes techniques de congélation pouvant faire intervenir des automates, comme la congélation lente contrôlée, l'utilisation simple de congélateurs, avec la congélation lente non contrôlée, et l'utilisation d'azote liquide pour la vitrification (Goossens *et al.*, 2020). De par

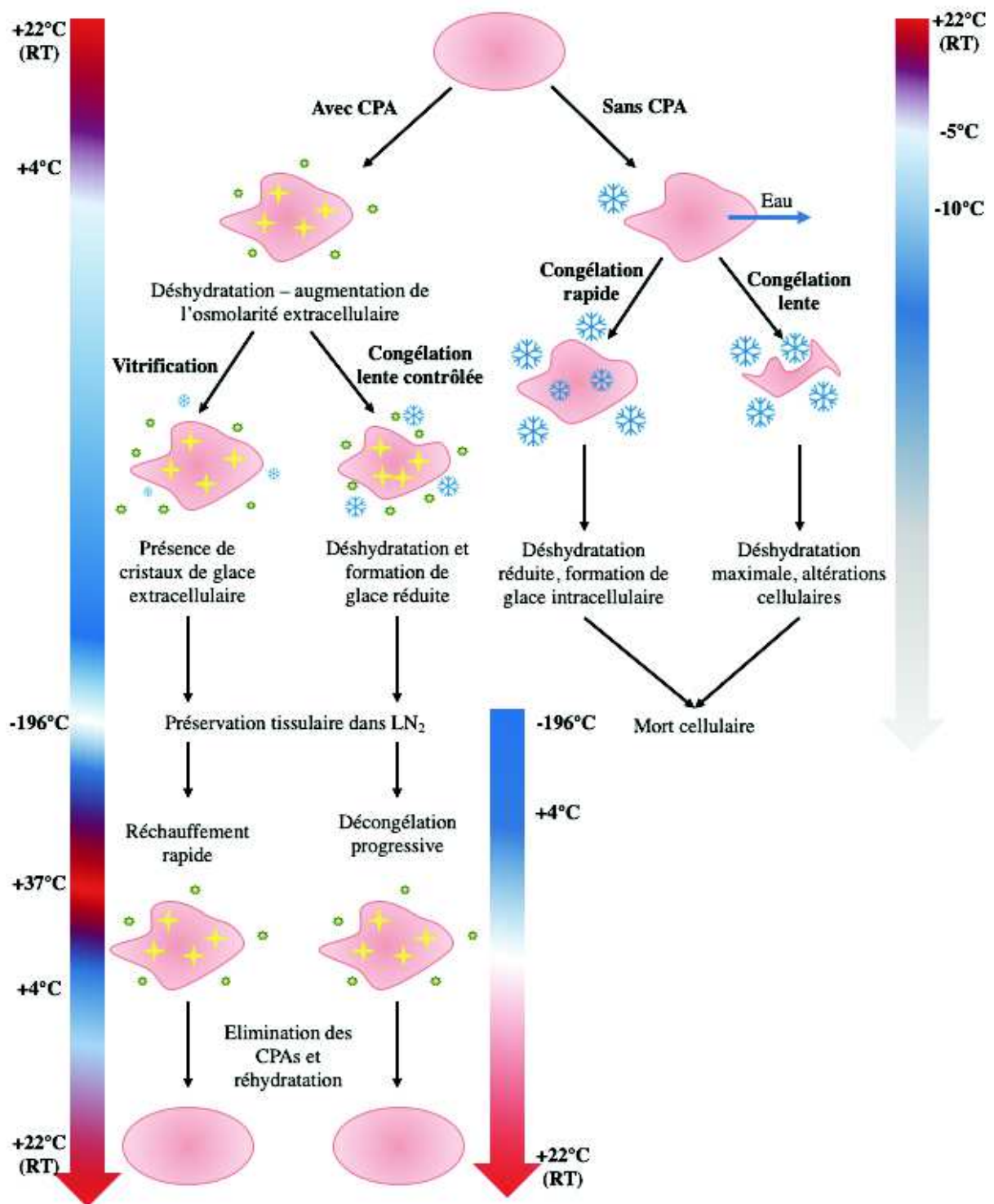


Figure 24 : Principe de la congélation lente contrôlée et de la vitrification de tissus

La vitrification permet de réduire la déshydratation cellulaire et la formation de glace par la formation d'un passage à un état vitreux. Lors de la congélation lente contrôlée, une déshydratation progressive des cellules est observée ainsi que la formation de glace extracellulaire. En l'absence de cryoprotecteurs, une congélation trop rapide induit la formation de glace intracellulaire tandis qu'une congélation lente induit une déshydratation extrême de la cellule, toutes deux délétères pour la cellule. CPA, Agent cryoprotecteur.

leurs spécificités, ces techniques nécessitent une adaptation du milieu de congélation utilisé afin de protéger le tissu, ou les cellules, des dommages pouvant être causés lors du passage de l'eau de la phase aqueuse à la phase solide (Mazur, 1970).

3.2.1. Congélation de cellules ou tissus testiculaires

A) Principe de la congélation

L'habileté des basses températures à réduire le taux de réactions chimiques permet de réaliser des préservations cellulaires et tissulaires sur le long terme. Le fait de réduire la température à un niveau très faible permet « une suspension cryogénique de la vie ». Le succès de la congélation de tissus commence par la compréhension des mécanismes fondamentaux biologiques qui régissent ce processus (Fuller et Paynter, 2004). En effet, tout au long de la congélation, des perturbations de l'équilibre osmotique sont observées, altérant ainsi les mécanismes cellulaires vitaux. Le point le plus important de ce processus est de faire passer l'eau de l'état liquide à un état solide, de glace (Figure 24).

La formation de la glace au sein du tissu commence à partir de -5°C . À cette température, des cristaux commencent à apparaître dans le milieu extracellulaire, sans pourtant apparaître dans le cytoplasme cellulaire. Entre -5°C et -10°C , un important refroidissement cellulaire est observé, avec une progression de la formation de cristaux de glace dans l'espace extracellulaire. Cette formation de glace induit une exclusion des solutés, ou électrolytes dans l'espace extracellulaire. La membrane plasmique ainsi que les petits volumes de la cellule la protègent de la formation de glace mais la variation de concentration qui en découle produit un gradient osmotique, en défaveur des cellules. L'eau intracellulaire va migrer dans l'espace extracellulaire hyperosmotique, afin de rétablir l'osmolarité du tissu. Il est alors observé une déshydratation de la cellule et des dommages cellulaires liés à sa variation de volume. Entre -10°C et -15°C , la formation de glace extracellulaire progresse et produit un rapprochement des cellules et une augmentation des contacts entre la glace et les membranes cellulaires. Cette variation du volume de l'espace extracellulaire est à l'origine de lésions cellulaires. Entre -15°C et -60°C , le refroidissement cellulaire étant très important, des connexions sont formées entre l'espace extracellulaire et intracellulaire, conduisant à une équilibration de l'osmolarité et la congélation de la cellule, à l'origine de nombreux dégâts très importants. Cette transition est l'une des étapes critiques du processus de congélation. Le stockage dans l'azote liquide à -196°C induit la formation de cristaux ainsi qu'un arrêt total des mécanismes cellulaires,

permettant théoriquement un stockage indéfini (Mazur, 1970, 1977; Fuller et Paynter, 2004). L'utilisation d'une congélation ultra-rapide permet d'éviter la formation de cristaux de glace au sein du tissu, mais mal réalisée, peut être délétère pour les cellules (Yavin et Arav, 2007).

Sur tissu entier, il est plus compliqué d'obtenir une diminution de température régulière et uniforme du fait du volume de l'échantillon. Ce processus est facilité par l'isolement des cellules. De plus, la complexité cellulaire d'un tissu tel que le testicule rend difficile la congélation homogène et optimale des différents types cellulaires (Karlsson et Toner, 1996). Fuller et Paynter ont ainsi décrit qu'il existe quatre caractéristiques qui font que des types cellulaires réagissent différemment à la congélation :

- Les caractéristiques osmotiques, prenant en compte la perméabilité de la membrane plasmique et le volume d'eau contenu dans la cellule
- Les changements de la perméabilité de l'eau avec le refroidissement,
- La vitesse de refroidissement, dépendant de la température et du temps
- Les changements de pression et le contenu en solutés intra- et extracellulaire au moment de l'augmentation de cristaux de glace (Fuller et Paynter, 2004).

Malgré les avancées scientifiques réalisées depuis l'analyse du processus de congélation, il est encore difficile de déterminer la cause exacte des dommages cellulaires observés (Jang *et al.*, 2017). Peter Mazur a avancé l'hypothèse des deux facteurs possibles : l'effet de solution, induit par le milieu de congélation et l'effet de la formation de cristaux de glace. L'effet de solution fait intervenir différents événements : le retrait de l'eau sous forme de glace, la concentration en solutés de haut ou bas poids moléculaires, la diminution du volume cellulaire, ainsi que la précipitation des solutés. Le deuxième facteur – la formation de cristaux de glace – semble d'autant moins compris que la principale hypothèse porte sur l'induction de rupture membranaire par les cristaux de glace, que ce soit au niveau cellulaire ou des organelles, entraînant une apoptose cellulaire (Mazur, 1970).

B) Agents cryoprotecteurs (CPA)

En 1974, Karow a défini les agents cryoprotecteurs comme « tout additif qui peut être administré aux cellules avant la congélation et qui donne une survie après décongélation plus élevée que celle obtenue en son absence » (Karow, 1974). L'action des CPA passe par une réduction de la formation des cristaux de glace et une modification de la concentration en

solutés, responsables des dommages observés lors du processus de congélation. Il existe deux classes de CPA : les CPA pénétrants (ou internes) et les CPA non-pénétrants (ou externes).

Les CPA pénétrants sont de petites molécules, des solutés neutres capables de former des ponts hydrogène avec les molécules d'eau. Leur principale propriété est de traverser les membranes cellulaires et d'être à faibles doses, non toxiques pour les cellules. Ils réalisent un effet « tampon de sel » permettant de prévenir la mise en place d'une concentration élevée dans la fraction résiduelle de glace jusqu'à ce que le tissu soit entièrement congelé à très basse température (Fuller et Paynter, 2004). Ils remplacent donc l'eau intracellulaire et protègent les membranes cellulaires (Figure 24). Une réduction du stress oxydant produit par le processus de congélation a aussi été observée, *via* une liaison des CPA aux ERO (Fleck *et al.*, 2000). L'ajout de CPA avec activité antioxydante ou de simples antioxydants ont permis d'améliorer la survie et la prolifération cellulaire après congélation (Ha *et al.*, 2016; Safa *et al.*, 2016). Parmi les CPA pénétrants, on retrouve le glycérol, le DMSO (DiméthylSulfOxyde), le formamide, l'éthylène glycol et le propylène glycol (Jang *et al.*, 2017).

Les CPA non-pénétrants permettraient de réduire la concentration intracellulaire en eau et de ce fait, limiter la présence et la propagation de la formation de glace intracellulaire. Les CPA non-pénétrants tels que les sucres (sucrose, tréhalose, dextrane, lactose ...), le PVP (polyvinylpyrrolidone), le polyéthylène glycol et l'albumine sont les plus communément utilisés (Bagchi *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014a; Onofre *et al.*, 2016).

Même si leurs mécanismes d'action ne sont pas complètement élucidés, leur impact positif sur les tissus congelés est réel. En 1986, Nash a montré qu'une très haute concentration de CPA permettait d'inhiber la formation de glace durant la congélation lente (Nash, 1966). Il est cependant à noter qu'une surexposition à ces CPA peut être responsable d'une cytotoxicité. La variation de volume induite par l'ajout et le retrait des CPA représente également une cause possible de dommages cellulaires (Pegg, 2002). C'est pourquoi il est important de déterminer la concentration et le temps d'exposition optimal du tissu aux CPA.

3.2.2. Choix de la stratégie

La congélation de tissu est composée de quatre phases : (i) l'ajout de CPA avant la congélation, (ii) la congélation du tissu à très basse température et le stockage, (iii) le réchauffement du tissu et (iv) l'élimination progressive des CPA après réchauffement. Parmi

les différentes méthodes de congélation, la congélation lente et la vitrification sont les plus utilisées. Elles présentent toutes deux des avantages et des inconvénients (Tableau 3).

Paramètres	Congélation lente contrôlée	Vitrification
Durée de réalisation	Longue (2h à 4h)	Courte (30 min)
Reproductibilité	Bonne	Faible
Instrumentation/Coût	Nécessaire, couteuse	Non, peu couteux
Dommmages mécaniques	Modérés	Peu ou pas
Formation de glace intracellulaire	Modérée	Très faible
Concentration en CPA	Faible	Élevée
Risques cytotoxiques	Présents	Élevés
Choc thermique prolongé	Oui	Non
Viabilité post-réchauffement	Élevée	Élevée
Système utilisé	Fermé uniquement	Ouvert ou fermé
Manipulation	Facile	Difficile

Tableau 3 : Comparaison entre la congélation lente contrôlée et la vitrification

CPA : Agent cryoprotecteur (*CryoProtective Agent*)(D'après Jang et al., 2017).

A) Congélation lente

Du fait de sa reproductibilité et du faible impact cytotoxique sur le tissu, la congélation lente est beaucoup utilisée pour la conservation de tissus ou cellules isolées (Onofre *et al.*, 2016). La congélation en elle-même est précédée d'une étape d'équilibration avec la solution de congélation contenant les CPA. Cette phase durant généralement 30 minutes peut être réalisée à température ambiante ou 4°C, en fonction du protocole utilisé, et est nécessaire afin de préparer le tissu à la congélation. La solution et les CPA vont progressivement remplacer l'eau présente au sein du tissu pour pouvoir le protéger. Deux types de congélation lente sont rapportées : (i) la congélation lente non contrôlée, *via* l'utilisation d'un conteneur de tubes laissé à -80°C pendant un temps donné et permettant une descente approximative de -1°C/min et (ii) la congélation lente contrôlée, *via* l'utilisation d'un automate permettant une descente progressive et contrôlée de la température au sein de l'échantillon ainsi que des phases de stabilisation. Cette deuxième méthode étant entièrement contrôlable, elle permet une haute reproductibilité, nécessaire à l'utilisation de ce protocole en clinique. Il est possible d'incrémenter au sein de la congélation lente contrôlée une étape dite de *seeding*, permettant d'induire la formation des premiers cristaux de glace dans le milieu extracellulaire, permettant

ainsi de limiter les conséquences induites par la formation de glace non contrôlée (Karlsson et Toner, 1996). Le *seeding* se réalise par l'apposition d'un support préalablement refroidi à très basse température sur les échantillons au cours de la descente en température, ou par une injection rapide d'azote liquide par la machine au sein de l'habitacle contenant les échantillons.

L'optimisation des protocoles de congélation lente contrôlée au sein du laboratoire a permis de mettre en place un protocole de congélation pour le tissu testiculaire prépubère humain basé sur les recherches menées chez la souris (Milazzo *et al.*, 2008). Des améliorations de ce protocole ont été réalisées, par l'ajout de vitamine E au sein du milieu de congélation et décongélation (Arkoun *et al.*, 2019). Des essais doivent cependant être menés afin de vérifier la validité de cette supplémentation dans d'autres espèces.

B) Vitrification

La vitrification est une technique de congélation ultra-rapide, n'étant expérimentée sur le tissu testiculaire prépubère que depuis quelques années (Curaba *et al.*, 2011a). En effet, les effets néfastes de l'exposition prolongée des tissus aux CPA et la formation de cristaux de glace lors de la congélation lente contrôlée, ont poussé les chercheurs à développer de nouvelles techniques. Ce système permet un refroidissement rapide (~ -20.000 à $-10.000^\circ\text{C}/\text{min}$) (Criado Scholz, 2012; Jang *et al.*, 2017). La vitrification permet d'éviter la formation de glace, par le passage du tissu à un état vitreux, suite à une augmentation de la viscosité des solutés. Cette technique nécessite cependant une très grande concentration de CPA et une vitesse de réchauffement ultra-rapide, afin de permettre la transformation des liquides en un solide amorphe dépourvu de cristaux de glace (Wyns *et al.*, 2013). Cette congélation peut être réalisée avec des systèmes ouverts ou fermés et ne nécessite pas de matériel spécifique coûteux. Cependant, les contacts directs possibles avec l'azote liquide posent la question de la contamination des échantillons (Criado Scholz, 2012).

Des protocoles de vitrification de tissu testiculaire murin ont récemment été testés au sein du laboratoire et ont montré des résultats encourageants quant à leur utilisation pour la préservation de la fertilité, avec une conservation de la fonction endocrine et exocrine du tissu (Dumont *et al.*, 2015).

3.2.3. Étape de réchauffement

L'étape de réchauffement cellulaire est tout aussi importante que la congélation du tissu. Le passage de l'eau de l'état solide à liquide ainsi que l'exposition prolongée aux CPA peuvent entraîner des dommages cellulaires. Par conséquent, la mise en place de procédures optimales de décongélation et d'élimination des CPA est également essentielle pour la survie des tissus testiculaires après congélation. Les tissus sont décongelés par un réchauffement rapide afin d'éliminer les cristaux de glace et un retrait progressif des CPA est réalisé (Onofre *et al.*, 2016). Il a été montré qu'un minimum de dommages cellulaires était observé lorsque les étapes de congélation/décongélation étaient réalisées de la même manière : une décongélation lente suite à une congélation lente contrôlée et un réchauffement rapide à la suite d'une vitrification (Whittingham *et al.*, 1972).

3.3. État des lieux de la congélation de tissus testiculaires

Le fait de congeler des fragments testiculaires permet de conserver sa structure tridimensionnelle ainsi que les interactions cellulaires, assurant le maintien des CSS dans leur niche cellulaire présentes. Tenant compte des différents paramètres à moduler afin d'obtenir une congélation optimale (nature des CPA, concentration, temps et température d'équilibration, vitesse de refroidissement et de réchauffement, ...), différents protocoles de congélation ont vu le jour, résumés dans le Tableau 4. Cette table regroupe les articles scientifiques portant sur la congélation de tissus testiculaires prépubères de mammifères.

3.3.1. Modèle animal

La congélation de tissu a été développée dans de nombreuses espèces, permettant de récolter des données quant à l'impact des paramètres et compositions des milieux de congélation sur l'intégrité et la fonctionnalité du tissu.

Malgré l'absence d'un consensus sur le choix du milieu et de la technique optimale de congélation à utiliser pour chaque espèce, des tendances apparaissent vers l'utilisation préférentielle de certains CPA et protocoles de descente en température. En effet, qu'il s'agisse de la congélation lente contrôlée, ou non contrôlée, la composition du milieu de congélation reste très proche dans les différentes espèces. Une utilisation commune du DMSO à 1,5 ou 0,7 M comme CPA externe, associé au SVF (Sérum de veau fœtal) -généralement utilisé à 10%-, et/ou à un sucre tel que le sucrose ou le tréhalose comme CPA externe, est la combinaison la

plus commune retrouvée chez la souris (Schlatt *et al.*, 2002; Goossens *et al.*, 2008; Milazzo *et al.*, 2008; Travers *et al.*, 2013; Yildiz *et al.*, 2018; Onofre *et al.*, 2020), les primates non-humain (Jahnukainen *et al.*, 2007, 2012; Luetjens *et al.*, 2008; Fayomi *et al.*, 2019), le rat (Travers *et al.*, 2011; Unni *et al.*, 2012; Pothana *et al.*, 2016; Radaelli *et al.*, 2017), le lapin (Shinohara *et al.*, 2002) ou encore le porc (Zeng *et al.*, 2009; Abrishami *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014b). A notre connaissance, la préservation de tissus testiculaires prépubères chez le bovin (Devi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018), le cerf (Pothana *et al.*, 2015) et le mouton (Pukazhenthii *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2019) a uniquement été réalisée selon les protocoles de congélation lente non-contrôlée.

Lors de la vitrification de tissus, des concentrations plus importantes de ces CPA sont nécessaires avec une association DMSO, éthylène glycol et sucrose la plus souvent retrouvée chez la souris (Baert *et al.*, 2012; Gholami *et al.*, 2013a, b; Dumont *et al.*, 2015; Yamini *et al.*, 2016; Oblette *et al.*, 2019). Contrairement à la congélation lente, les concentrations de CPA utilisés varient en fonction des équipes de recherches, ne permettant pas de s'orienter vers une concentration idéale en fonction des espèces. La vitrification étant utilisée moins couramment que la congélation lente, hormis pour la souris, le manque de recul ne permet pas de conclure sur les conditions idéales de vitrification dans les autres espèces. Cependant, une augmentation progressive de la concentration en CPA ainsi qu'un temps réduit de contact entre le tissu et le milieu de congélation à haute concentration en CPA, et le milieu de réchauffement est observé.

Le développement de l'utilisation de ces modèles animaux a permis de mettre en évidence les protocoles les plus adaptés pour la préservation du tissu testiculaire immature, conduisant à leur optimisation pour une utilisation en clinique (Milazzo *et al.*, 2008). Les suppléments en vitamine E chez la souris (Arkoun *et al.*, 2019; Oblette *et al.*, 2020), le fluide oculaire de bœuf chez le rat et le bovin (Pothana *et al.*, 2016) ou de macromolécules comme le Ficoll-70 (Yildiz *et al.*, 2018), ont été évaluées afin de réduire les effets délétères de la congélation sur le tissu.

3.3.2. Chez l'homme

Dans le cadre de la préservation de la fertilité des garçons prépubères, le protocole de congélation lente contrôlée avec *seeding* est le plus couramment utilisé (Kvist *et al.*, 2006; Keros *et al.*, 2007; Wyns *et al.*, 2007, 2008; Ginsberg *et al.*, 2010; Curaba *et al.*, 2011a; Babayev *et al.*, 2013; Poels *et al.*, 2013, 2014; Pietzak *et al.*, 2015; de Michele *et al.*, 2017, 2018a, b; Ho *et al.*, 2017; Aboufoul-Azab *et al.*, 2018; Portela *et al.*, 2019a). L'utilisation de la congélation

lente non contrôlée a été quelques fois rapportée (Bahadur *et al.*, 2000; Van Saen *et al.*, 2013; Baert *et al.*, 2018; Medrano *et al.*, 2018b; Ntemou *et al.*, 2019), ainsi que l'utilisation de la vitrification (Curaba *et al.*, 2011a; Poels *et al.*, 2013). Nous pouvons observer une utilisation quasi-systématique du DMSO comme CPA interne chez l'homme, associé au sucrose et au sérum (CPA externe) quelle que soit la technique utilisée.

Étude bibliographique – Chapitre 3 – Préservation de la fertilité

Espèce	Âge	Milieu de congélation	Temps d'équilibration	Protocole de congélation	Étape de réchauffement	Références
Congélation lente contrôlée						
Souris	5 à 7 jpp	DMSO + SVF 10%	10 min – 4°C	-2°C/min -> -7°C; 10 min stab.; 0,3°C/min -> -30°C; LN;	37°C WB; 3x (DMEM + 10% SVF)	Shinohara <i>et al.</i> , 2002
	10 et 80 jpp	L-15 + DMSO 1,5 M + Suc 0,1 M + HSA 1%	20 min – 0°C	-2°C/min -> -7°C; seeding; -0,3°C/min -> -40°C; -10°C/min -> -140°C; LN;	1 min – RT; 1 min – 37°C WB; 3 min – DMSO 1 M, suc 0,1 M, HSA 1%; 3 min – DMSO 0,5 M, Suc 0,1 M, HSA 1% ; 3 min L15 – 37°C WB; 3x DMEM	Schlatt <i>et al.</i> , 2002
	6 jpp	L-15 + DMSO 1,5 M, Suc 0,05 M + SVF 10%	30 min – 4°C	-2°C/min -> -9°C; 2 min stab.; -0,3°C/min -> -40°C; -25°C/min -> -150°C	1 min RT; 2 min – 37°C WB; 5 min – DMSO 1 M, suc 0,05 M, SVF 10%; 5 min – DMSO 0,5 M, suc 0,05 M, SVF 10%; 5 min – suc 0,05 M; 5 min – L15	Milazzo <i>et al.</i> , 2008
	6 jpp	L-15 + DMSO 1,5 M + Suc 0,05 M + SVF 10%	30 min – 4°C	-2°C/min -> -9°C; 7 min stab.; -0,3°C/min -> -40°C; -25°C/min -> -150°C; LN;	37°C WB; 5 min – DMSO 1 M, suc 0,05 M, 10% SVF; 5 min – DMSO 0,5 M, suc 0,05 M, SVF 10%; 5 min – suc 0,05 M; 5 min – L-15	Milazzo <i>et al.</i> , 2010; Dumont <i>et al.</i> , 2015, 2016, 2017
	6 jpp	DMEM + DMSO 1,5 M + Suc 0,1 M + HSA 10g/L	60 min – 4°C	-2°C/min -> -7°C; seeding; -0,3°C/min -> -40°C; -10°C/min -> -140°C	1 min – RT; 1 min – 37°C WB; 3 min – DMSO 1,0 M, Suc 0,1 M, HSA 1%; 3 min – DMSO 0,5 M, suc 0,1 M, HSA 1%	Curaba <i>et al.</i> , 2011b
	6 - 7 jpp	L-15 + DMSO 1,5 M + Suc 0,05 M + SVF 10%	30 min – 4°C	-2°C/min -> -8°C; stab. 8 min ; -0,3°C/min -> -40°C; -25°C/min -> -150°C; LN;	Idem Milazzo <i>et al.</i> ; 2008	Travers <i>et al.</i> , 2013
	1 jpp	HBSS + DMSO 0,7 M + SVF 5%	10 min – 4°C	-1°C/min -> 0°C; seeding; stab. 5 min; -0,5°C/min -> -8°C; stab. 15 min; -0,5°C/min -> -40°C; 10 min stab. ; -7°C/min -> -80°C; LN;	1 min – 37°C WB; 3x HBSS	Yildiz <i>et al.</i> , 2013
	6,5 jpp	L-15 + DMSO 1,5 M + Suc 0,05 M + SVF 10%	30 min – 4°C	-2°C/min -> -9°C; 8 min stab.; -0,3°C/min -> -40°C; -25°C/min -> -150°C; LN;	Idem Milazzo <i>et al.</i> ; 2008	Arkoun <i>et al.</i> , 2016; Oblette <i>et al.</i> , 2017, 2019
	1 jpp	HBSS + SVF 5% + DMSO 0,7 M	10 min – 4°C	-1°C/min -> 0°C; 5 min stab.; seeding; -0,5°C/min -> -8°C; stab. 15 min; -0,5°C/min -> -40°C; stab. 10 min; -7°C/min -> -80°C; LN;	37°C WB; 3x HBSS	Yildiz <i>et al.</i> , 2018

Étude bibliographique – Chapitre 3 – Préservation de la fertilité

Espèce	Âge	Milieu de congélation	Temps d'équilibration	Protocole de congélation	Étape de réchauffement	Références
	6,5 jpp	L-15 + DMSO 1,5 M, Suc 0,05 M + SVF 10% + VitE 3,4 mM	Idem Arkoun <i>et al.</i> , 2015b			Arkoun <i>et al.</i> , 2019; Oblette <i>et al.</i> , 2020
Homme	2 - 14 ans	HBSS + DMSO 0,7 M + Suc 0,1 M + HSA 1%	9 min – 0°C	0,5°C/min -> -8°C; 5 min stab.; seeding manuel; 15 min stab.; -0,5°C/min -> -40°C; 10 min stab.; -7°C/min -> -80°C; LN.	2 min – RT; 2 min – 37°C WB; 5 min – suc 0,1 M; 5 min – suc 0,05 M; 5 min – HBSS	Wyns <i>et al.</i> , 2007, 2008; Curaba <i>et al.</i> , 2011a; Poels <i>et al.</i> , 2013, 2014; de Michele <i>et al.</i> , 2017, 2018a, b; Ho <i>et al.</i> , 2017
	12 - 66 mois	L-15 ou PBS + EG 1,5 M + Suc 0,1 M + HSA 1%	10 min – 2°C	-2°C -> -9°C; 5 min stab.; seeding; -0,3°C/min -> -40°C; -10°C/min -> -140°C; LN.	37°C WB; 5 min – EG 0,75 M, suc 0,1 M; 5 min – suc 0,1 M; 5 min – PBS	Kvist <i>et al.</i> , 2006
	2 - 14 ans	HBSS + DMSO 0,7 M + HSA 5%	30 min – 4°C	-1°C/min -> 0°C; 5 min stab.; -0,5°C/min -> -8°C; seeding; 10 min stab.; -0,5°C/min -> -40°C; 10 min stab.; -7°C/min -> -70°C	3°C WB; HBSS	Keros <i>et al.</i> , 2007; Ginsberg <i>et al.</i> , 2010; Pietzak <i>et al.</i> , 2015
	Immature	DMSO 1,5 M + Sérum 10% + Suc 0,1 M	30 min – 4°C	0°C; -2°C/min -> -7°C; 10 min stab.; seeding; -0,3°C/min -> -40°C; -10°C/min -> -140°C; LN.	+100°C/min; Lavages avec concentration décroissante de CPA	Babayev <i>et al.</i> , 2013
		HBSS + DMSO 5% + HSA 5%	30 min – 4°C	-1°C/min -> 0°C; 5 min stab.; -0,5°C/min -> -8°C; 10 min stab.; -0,5°C/min -> -40°C; 10 min stab.; -7°C/min -> -70°C; LN.		Sadri-Ardekani <i>et al.</i> , 2016; Abdelaal <i>et al.</i> , 2021
	6 - 14 ans	Fluide tubaire humain-HEPES + DMSO 5% + Albumine 5%	Idem Keros <i>et al.</i> , 2007			Portela <i>et al.</i> , 2019a
	7 ans	HBSS + DMSO 5% + HSA 10% + Suc 3,5%	30 min – 4°C	-0,5°C/min -> 0°C; 9 min stab.; -0,5°C -> -8°C; 5 min stab.; seeding; 15 min stab.; -0,5°C/min -> -40°C; -0,7°C/min -> -80°C; LN.	RT; PBS	Abofoul-Azab <i>et al.</i> , 2018
Ouistiti	1 mois	DMEM + DMSO 1,5M + Suc 0,1M + HSA 1%	60 min – 4°C	-2°C/min -> -7°C; seeding; -0,3°C/min -> -40°C; -10°C/min -> -140°C; LN.	1 min – RT; 1 min – 37°C WB; 3 min – DMSO 1 M; suc 0,1 M, HSA 1%; 3 min – DMSO 0,5M, suc 0,1 M, HSA 1%; 3 min – DMEM	Luetjens <i>et al.</i> , 2008
Singe rhésus	38 - 40 mois	αMEM + SVF 5% + DMSO 5%	30 min – 4°C	-1°C/min -> 0°C; 5 min stab.; -0,5°C/min -> -8°C; seeding; -0,5°C/min -> -40°C; 10 min stab.; -1,5°C/min -> -80°C; LN.	37°C WB; HBSS	Fayomi <i>et al.</i> , 2019

Étude bibliographique – Chapitre 3 – Préservation de la fertilité

Espèce	Âge	Milieu de congélation	Temps d'équilibration	Protocole de congélation	Étape de réchauffement	Références
Rat	6 jpp	L-15 + DMSO 1,5 M + Suc 0,05 M + SVF 10%	30 min – 4°C	-2°C/min -> -9°C; 7 min stab.; -0,3°C/min -> -40°C; -25°C/min -> -150°C; LN;	Idem Milazzo <i>et al.</i> , 2008	Travers <i>et al.</i> , 2011
	17 - 22 jpp	DMEM/F12 + ITS 0,1% + SVF 20% + DMSO 0,5 M	15 min – RT	-2°C/min -> -9°C; 5 min stab.; seeding; -0,3°C/min -> -40°C; 10 min stab.; -10°C/min -> -140°C; LN;	2 min – 37°C; + 2 volumes (DMEM + SVF 20%); DMEM	Unni <i>et al.</i> , 2012
	13 à 30 jpp	NaCl 10% + DMSO 1,0 M + Suc 0,05 M	30 min – 4°C	-2°C/min -> -9°C; seeding; -0,3°C/min -> -40°C; LN;	37°C; 5 min – DMSO 1,0 M, suc 0,05 M, NaCl 10%; 5 min – DMSO 0,5 M, suc 0,05 M; NaCl 10%; 5 min – suc 0,05 M, NaCl 10%; 5 min – NaCl 10%	Radaelli <i>et al.</i> , 2017
	8,5 jpp	Idem Arkoun <i>et al.</i> , 2019				Saulnier <i>et al.</i> , 2020
Lapin	1 à 6 semaines	DMSO + SVF 10%	10 min – 4°C	-2°C/min -> -7°C; 10 min stab.; 0,3°C/min -> -30°C; LN;	37°C WB; 3x (DMEM + 10% SVF)	Shinohara <i>et al.</i> , 2002
Porc	1- 2 semaines	L-15 + 2% SVF + 10% DMSO	15 min – RT	A partir de 20°C; -2°C/min -> 4°C; seeding; -0,3°C/min -> -30°C; -10°C/min -> 130°C; LN;	1 min – RT; 1 min – 25°C WB; L-15	Zeng <i>et al.</i> , 2009
	1 semaine	DMEM + Glycérol 1,0 M + 5% SVF	10 min – 22°C	-1°C/min -> 4°C; 5 min stab.; -0,3°C/min -> -8°C; 10 min stab.; -0,5°C/min -> -50°C; -10°C/min -> -90°C; 10 min stab.	~11s – 37°C WB; 1 min – suc 0,5 M, SVF 20%; 1-2 min – 20% SVF, 37°C; 37°C	Abrishami <i>et al.</i> , 2010
Congélation lente non-contrôlée						
Souris	Post-natal	DMSO 1,5 M + BIOBANKER	10 min – 4°C	7-10 jours à -80°C	37°C WB; 3x DMEM	Ohta et Wakayama, 2005
	6 jpp	DMEM/F12 + DMSO 1,5 M + Suc 0,07M	10 min – RT	2h à -80°C (-1°C/min)	37°C WB; 2x 10 min – DMEM/F12, SVF 10%	Goossens <i>et al.</i> , 2008
	0,5 à 5,5 jpp	Cell Banker 1	30 min – 4°C	-20°C O/N; LN;	37°C; 5 min – 3x α -MEM + KSR 10%	Yokonishi <i>et al.</i> , 2014
	5 - 6 jpp	DMEM/F12-Hepes + DMSO 10% + BuOF 20%	Idem Devi <i>et al.</i> , 2014			Pothana <i>et al.</i> , 2016
	3 - 5 jpp	DMEM/F12 + DMSO 1,5 M + Suc 70 mM	10 min – 4°C	-80°C (-1°C/min); LN;	37°C WB; 2x(DMEM/F12 + SVF 10%); 4°C	Onofre <i>et al.</i> , 2020
Rat	5 - 6 jpp	DMEM/F12-Hepes + DMSO 10% + BuOF 20%	Idem Devi <i>et al.</i> , 2014			Pothana <i>et al.</i> , 2016

Étude bibliographique – Chapitre 3 – Préservation de la fertilité

Espèce	Âge	Milieu de congélation	Temps d'équilibration	Protocole de congélation	Étape de réchauffement	Références
	Immature	3,8 KHPO ₄ , 1,02 KHPO ₃ , 0,57 KCl, 0,43 NaOHCO ₃ , 68,4 suc	5 min – sans DMSO; 10 min – DMSO 5%; 10 min – DMSO 10%; 10 min – DMSO 15%	-90°C	37°C WB; 10 min – Solution DMSO 10%; 10 min – Solution DMSO 5%; 10 min – Solution sans DMSO	Kirpatovskii <i>et al.</i> , 2018
Homme	8 et 13 ans	Jaune d'œuf + Glycérol 10% Milieu FIV + Glycérol 10% + Sérum inactivé 10% PBS + PROH 1,5 M + Suc 0,1 M	4°C PBS, 15/20 min – RT, 30 min – 4°C PBS, 10 min – 4°C	Vapeur de LN ₂ – 1,5 h (~ -10°C/min); LN ₂	ND	Bahadur <i>et al.</i> , 2000
	2,5 - 12,5 ans	DMEM + DMSO 1,4M + Suc 150 mM + HSA 10%	15 min – 4°C	-80°C - O/N; LN ₂	2 min – 37°C WB; 2x (DMEM + HSA 10%)	Van Saen <i>et al.</i> , 2013; Ntemou <i>et al.</i> , 2019
	ND	DMEM/F12 + DMSO 1,5 M + HSA 10% + Suc 0,15 M	4 min – 15°C	4h - -80°C (au moins); LN ₂	2 min – 37°C WB; 5 min – 2x DMEM + HSA 10%; 4°C; DMEM	Baert <i>et al.</i> , 2018
	7 - 14 ans	DMEM/F12 + HSA 10% + DMSO 1,5 M + Suc 0,15 M	15 min – 4°C	-80°C (-1°C/min); LN ₂	2 min – 37°C WB; 2x (DMEM/F12 + HSA 10%)	Medrano <i>et al.</i> , 2018b
Singe rhésus	18 - 49 mois	L-15 + DMSO 1,4 M + SVF 10%	40 min – 2°C	1h – -20°C; LN ₂	2 min – 37°C WB; 4°C milieu	Jahnukainen <i>et al.</i> , 2007, 2012
Porc	1- 2 semaines	DMEM + SVF 20% + DMSO 20%	ND	-70°C O/N (-1°C/min)	1 min – RT; 1 min – 25°C WB; 3x DMEM	Honaramooz <i>et al.</i> , 2002; Zeng <i>et al.</i> , 2009
	16 semaines	a-MEM + DMSO 10% + SVF 10% + Trh 200 mM	15 min – 4°C	-80°C; O/N	2,5 min – 37°C WB	Lee <i>et al.</i> , 2014b
	Immature	PBS	ND	-80°C	37°C WB; 2x (15 min – PBS)	Vermeulen <i>et al.</i> , 2018
Bovin	8 semaines	DMEM/F12 + DMSO 20% + SVF 20%	30 min – 4°C	13h – -80°C (~-1°C/min); LN ₂	34°C WB; 5 volumes DMEM/F12; SVF 10%; 3x lavages	Devi <i>et al.</i> , 2014
	1 jour	MEM + DMSO 10% + NCS 2,5%	ND	24h – -80°C; LN ₂	3 min – 37°C WB; 2 volumes (NCS 10%; Glutamine 2 mM; HEPES 15 mM)	Cai <i>et al.</i> , 2016
	6 mois	DMEM + DMSO 10% + SVF 10% + Tréhalose 15%	4°C – 1h	2h – -20°C; 12h – -80°C; LN ₂	2 min – 37°C WB; 2 volumes DMEM + SVF 20%; DMEM	Zhang <i>et al.</i> , 2015

Étude bibliographique – Chapitre 3 – Préservation de la fertilité

Espèce	Âge	Milieu de congélation	Temps d'équilibration	Protocole de congélation	Étape de réchauffement	Références
	2 mois	DMEM/F12-Hepes + DMSO 20% + BuOF 20%	Idem Devi <i>et al.</i> , 2014			Pothana <i>et al.</i> , 2016
	6 mois	DMEM + DMSO 10% + SVF 10%	2h – 4°C	2h – -20°C; 12h – -80°C; LN;	2 min – 37°C WB; + 2 volumes (DMEM; SVF 10%); DMEM	Zhang <i>et al.</i> , 2017
	1 jpp	a-MEM + DMSO 10% + KSR 10%	ND	24h – -80°C; LN;	37°C WB	Jiang <i>et al.</i> , 2020
	6 semaines	DMEM + DMSO 5% + SVF 10% + BSA 30 mg/ml	1h – 4°C	2h – 4°C; 2h – -20°C; 12h – -80°C; LN; (-1°C/min)	2 min – 37°C WB; 3x (5 min -PBS)	Li <i>et al.</i> , 2018
Cerf	15 et 30 jpp	DMEM/F12 + DMSO 1,5 M + SVF 80%	30 min – 4°C	24h – -80°C (-1°C/min); LN;	37°C WB; 5 volumes (DMEM/F12 HEPES; SVF 10%; pénicilline-streptomycine 100 UI/ml; gentamicine 40µl); 3x DMEM/F12	Pothana <i>et al.</i> , 2015
Mouton	3 - 5 semaines	DMEM + HEPES + DMSO 2,8 M + 20% SVF	ND	24h – -80°C (~1°C/min); LN;	1 min – RT; 1 min – 25°C WB; 2 min – DMEM +SVF 20%, RT; 3x (5min - DMEM +20% SVF)	Pukazhenti <i>et al.</i> , 2015; Singh <i>et al.</i> , 2019
Vitrification						
Souris	6 jpp	MEM + Glutamax + DMSO 2,8 M + EG 2,8 M + HSA 25 g/L	5 min – 25% 4°C, 10 min – 50%, 10 min – 100%	Paillettes	3 min – Suc 1,0 M 37°C; 5 min – Suc 0,5 M 4°C; 5 min – Suc 0,25 M 4°C; 5 min – suc 0,125 M 4°C	Curaba <i>et al.</i> , 2011b
	6 jpp	DPBS + NaCl 0.9% + EG 7,2 M + Raff 0,5 M	5 min – 12,5% RT, 5 min – 25%, 15 min – 50% 4°C	Cryotubes	Réchauffement 4°C; + 50% 1.0ml; 10 min à 4°C – 50% ; 10 min – 25% ; 10 min RT – 12,5%; 10 min – DPBS	Hemadi <i>et al.</i> , 2011, 2014
	6 - 10 jpp	PBS + EG 7,2 M + Suc 0,6 M	5 min – 10% EG 37°C, 2 min – 17,5%, 3 min – 25%, 2 min – 32,5%, 0,3M Suc, 3 min – 40%, 0,6M Suc	Double paillette	5 min – suc 1,0 M; 5 min – suc 0,25 M; 2x 5 min – PBS	Gouk <i>et al.</i> , 2011
	5 à 10 jpp	DMEM/F12 + DMSO 2,1 M + EG 2,7 M + Suc 0,5 M + 20% SVF	10 min – 50% – 22°C, 5 min – 100%	SSV	2 min – suc 0,5 M, SVF 20%, 37°C; 2 min – SVF 20%, 37°C	Baert <i>et al.</i> , 2012
	6 jpp	DMSO 2,1 M + EG 2,7 M + Suc 0,5 M + 20% SVF	10 min – 50% RT, 10 min 100% , 10 min – 100% + 20% SVF	Cryotubes	30s – RT; 37°C WB; 5 min – 0,5 M Suc 4°C; 5 min – 0,25 M suc; 5 min – 0,125 M Suc	Gholami <i>et al.</i> , 2013b, a

Étude bibliographique – Chapitre 3 – Préservation de la fertilité

Espèce	Âge	Milieu de congélation	Temps d'équilibration	Protocole de congélation	Étape de réchauffement	Références
jpp	0,5 à 5,5	Stem Cell Keep	2 min – RT	Cryotubes	37°C α -MEM + 10% KSR; 5 min – 3x α -MEM + 10% KSR; RT	Yokonishi <i>et al.</i> , 2014
	6,5 jpp	DMEM/F12 + DMSO 2,1 M + EG 2.7 M	10 min – 50%, 5 min – 100%, + suc 0,5 M, SVF 20%	SSV	2-3 s – RT; 5 min – 4x milieu 4°C	Dumont <i>et al.</i> , 2015, 2016, 2017; Oblette <i>et al.</i> , 2017, 2019; Rondanino <i>et al.</i> , 2017
	7 jpp	DMEM + DMSO 2,8 M + EG 2,8 M + SVF 20%	5 min – 25%, 10 min – 50%, 10 min – 100%	Tubes	3 min – 37°C; Suc 1,0M; 5 min – 4°C; Suc 0,5M; 5 min – 4°C; Suc 0,25M; 5 min – 4°C Suc 0,125M	Hajiaghalou <i>et al.</i> , 2016
	6 jpp	DMEM/F12 + 7,5% DMSO + 7,5% EG + 0,25M Suc, 10% SVF	10 min – 4°C	Grille en métal puis cryotube	1 min – 35°C, suc 1,0 M, 10% SVF, DMEM/F12; 3 min – 35°C, suc 0,5 M, SVF 10%, DMEM/F12; 3 min – 35°C, suc 0,25 M, SVF 10%, DMEM/F12; 3 min – 35°C, SVF 10%, DMEM/F12	Yamini <i>et al.</i> , 2016
jpp	1 jpp	DPBS + EG 40% + Ficoll-70 18% + Suc 0,35 M	10 min – 4°C DPBS, SVF 15%; 6 min – 4°C, 100%	Cryotubes	1 min – 37°C WB; 10 min – RT, DPBS, Suc 0,5 M; 10 min – RT, DPBS, Suc 0,25 M, DPBS	Yildiz <i>et al.</i> , 2018
Rat	13 - 30 jpp	DMSO 15% + EG 15% + Suc 0,5M	10 min – 4°C, 50% (sans suc), 2 min – 4°C 100%	Cryotubes contenant LN.	1 min – 37°C, Suc 1,0 M; 5 min – Suc 0,5 M; 5 min – Tampon	Radaelli <i>et al.</i> , 2017
	25 jpp	Ingamed® : EG 15% + DMSO 15%	10 min – 4°C, 50%; 5 min – 4°C, 100%, Suc 0,5 M	Cryotubes contenant LN.	1 min – 37°C, Solution 1; 5 min – Solution 2; 5 min – Solution 3	Benvenuti <i>et al.</i> , 2018
	8,5 jpp	Idem Dumont <i>et al.</i> , 2015				Saulnier <i>et al.</i> , 2020
Homme	6 - 12 ans	Idem Curaba <i>et al.</i> , 2011b				Curaba <i>et al.</i> , 2011a
	2 - 12 ans	Idem Poels <i>et al.</i> , 2012				Poels <i>et al.</i> , 2013
Singe rhésus	4 ans	L-15 + DMSO 2,1 M + EG 2,7 M + suc 0,5 M + 25 g/L HSA	10 min – 4°C, 50%, 5 min – 100%	Paillettes	1,0 M Suc, HSA 25 g/L, 35°C; 5 min – 0,5 M suc; 5 min – suc 0,25 M; 5 min – L-15	Poels <i>et al.</i> , 2012
Porc	1 - 2 semaines	DPBS + (EG + NaCl 0,9% + 0,5 M raff)	5 min – RT, 12,5%; 5 min – RT, 25%; 15 min – 4°C, 50%; 100%	Cryotubes	4°C WB; 10 min – 50%; 10 min – 25%; 10 min – RT; 12,5%; 10 min – RT; DPBS	Zeng <i>et al.</i> , 2009
	1 semaine	DMEM + DMSO 2,1 M + EG 2,7 M + Suc 0,5 M + SVF 20%	10 min – 50%, 22°C; 5 min – 100% + 20% SVF	SSV	30s – RT; 1-2 min – suc 0,5 M, SVF 20%, 37°C; 2x (1-2 min – SVF 20%, 37°C)	Abrishami <i>et al.</i> , 2010

Étude bibliographique – Chapitre 3 – Préservation de la fertilité

Espèce	Âge	Milieu de congélation	Temps d'équilibration	Protocole de congélation	Étape de réchauffement	Références
	9 - 11 <i>jpp</i>	M(NCSU)-37 + EG 6,3 M + PVP 5% + Treh 0,3M + 4 g/L BSA	15 min – EG 4%, RT; 20 min – 100%, RT	SSV	2 min – Treh 0,4 M, 37°C; 2 min – Treh 0,2 M, RT; 2 min – Treh 0,1 M ; 2 min – Treh 0,05M; 2 min – NaCl 0,9%	Kaneko <i>et al.</i> , 2013, 2014, 2019, 2020
Mouton		DMEM + HEPES + DMSO 2,8 M + EG 3,6 M + SVF 20%	25 min – 37,5%, RT; 15 min – 100%	Bande aluminium	1 min – suc 1,0 M, SVF 20%, 37°C; 5 min – suc 0,5 M, SVF 20%, RT; 3x (10 min – DMEM + 20% FCS)	Pukazhenthii <i>et al.</i> , 2015
Chat	3 - 5 mois	MEM + DMSO 5,6 M + Glycerol 5,6 M + Suc 0,5 M + SVF 10%	10 min – 25%, Suc 0,25 M (pas SVF), RT; 5 min – 50%, Suc 0,5M, SVF 10%, RT; 100%	SSV	1 min – RT; 1 min – WB, 37°C; 5 min – suc 0,5 M, SVF 20%; 5 min – suc 0,25 M, SVF 20%; 5 min – MEM + SVF 20%	Lima <i>et al.</i> , 2017
		Idem Lima <i>et al.</i> , 2017, excepté Cryotubes				Lima <i>et al.</i> , 2018
Bovin	40 <i>jpp</i>	TCM199 + HEPES 25 mM + EG 18% + DMSO 18% + BSA 0,6% + treh 0,5M	5 min – RT, TCM199, HEPES 25 mM, EG 7,5%, DMSO 7,5%, SVF 20%; 5 min – RT	Paillettes	5 min – 38,6°C, TCM199, SVF 20%, Suc 1,0 M; 5 min – 38,6°C, TCM199, SVF 20%, Suc 0,5M; 5 min – 38,6°C, TCM199, SVF 20%, Suc 0,25 M	Bebbere <i>et al.</i> , 2019

Tableau 4 : Protocoles de congélation du tissu testiculaire immature de mammifères

a-MEM, Minimum Essential Medium α ; BSA, Bovine Serum Albumin ; BuOF, Fluide Oculaire Bovin ; CPA, Agent Cryoprotecteur ; DMEM/F12, Dulbecco's Modified Eagle; Medium/Nutrient Mixture F-12; DMSO, Diméthylsulfoxyde; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; EG, Ethylène Glycol; FIV, Fécondation in vitro; HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HSA, Human Serum Albumin; ITS, Insuline-Transferrine-Selenium; *jpp*, jours post-partum; K₂HPO₄, Hydrogénophosphate de potassium; KCl, Potassium Chloride; KH₂PO₄, Phosphate monopotassium; L-15, Leibovitz L-15; LN₂, Azote; min, minutes; NaCl, Sodium Chloride; O/N, *Overnight*, Sur la nuit; PBS, Phosphate Buffered Saline; PROH, 1,2-propanediol; PVP, Polyvinylpyrrolidone; Raff, Raffinose; RT, Room Temperature; SSV, Surface Solid Vitrification; Stab, stabilisation ; suc, sucrose ; SVF, Serum de Veau Foetal ; Treh, Trehalose; WB, *Water Bath*, Bain marie.

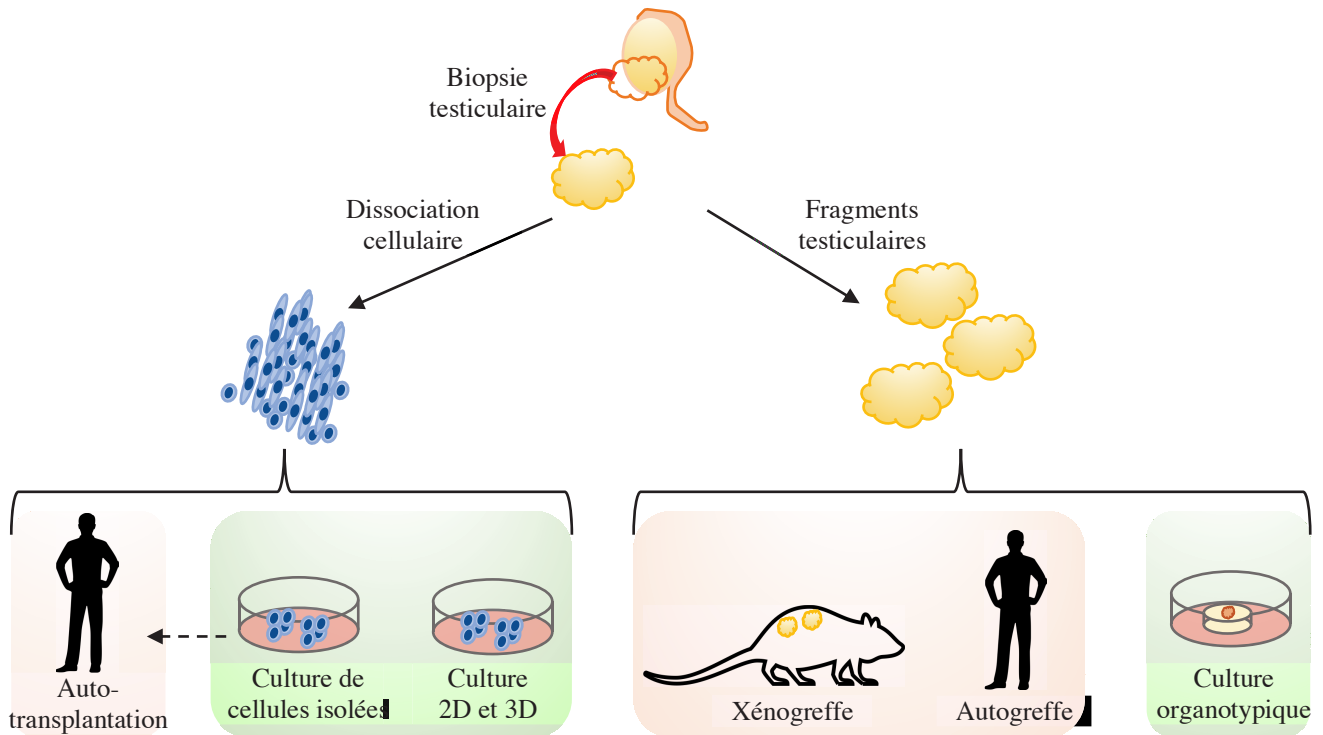


Figure 25 : Méthodes de restauration de la fertilité à partir de testicules prépubères

Les approches *in vivo* sont représentées en rose et les approches *in vitro* en vert. L'utilisation de cellules dissociées permettrait de réaliser une auto-transplantation de cellules souches spermatogoniales, précédée ou non d'une étape de prolifération cellulaire à partir de culture de cellules isolées, de cultures 2D (avec couche de cellule de support) ou de cultures 3D (au sein d'une matrice ou sous forme d'organoïde). L'utilisation des fragments testiculaires pourrait être envisagée sous forme d'autogreffe, de maturation *in vivo* (xéno greffe) ou sous forme de maturation *in vitro* (culture organotypique).

Chapitre 4. Restauration de la fertilité

L'obtention de spermatozoïdes fonctionnels à partir de tissu testiculaire de garçon prépubère n'est à ce jour, pas encore possible. Cependant, de nombreuses techniques expérimentales sont en cours de développement. Une utilisation sous forme de cellules testiculaires isolées après dissociation cellulaire peut être envisagée. Ces cellules testiculaires peuvent être maturées *in vitro*, ou transplantées chez l'individu. Dans le cas d'une utilisation de fragments testiculaires, la greffe tissulaire peut être envisagée ainsi que la culture organotypique *in vitro* à interface gaz/liquide (Figure 25). Cependant, chacune de ces différentes approches présente leurs propres avantages tout comme diverses limites, dans certains cas, d'ordre éthiques (Tableau 5) (Goossens *et al.*, 2020).

	Techniques	Avantages	Inconvénients
Cellules isolées	Transplantation de cellules	Évite le risque de réintroduction de cellules cancéreuses si cellules triées	Perte de la « niche » et des interactions cellulaires, risque d'altérations cellulaires
	Culture de cellules		et Risque de réintroduction de cellules cancéreuses
Fragments testiculaires	Autogreffe	Préservation de la « niche » et de l'architecture du tissu	Risque de réintroduction de cellules cancéreuses
	Xéno greffe		Modifications épigénétiques, limites éthiques et sanitaires
	Culture organotypique	Évite le risque de réintroduction de cellules cancéreuses, préservation de la « niche » et de l'architecture du tissu	Risques épigénétiques

Tableau 5 : Principaux avantages et inconvénients des possibles techniques de restauration de la fertilité d'enfants prépubères.

4.1. Transplantation de cellules souches spermatogoniales

Les CSS sont les cellules germinales présentes au sein du testicule prépubère, ayant pour fonction principale l'auto-renouvellement cellulaire afin de permettre la production de spermatozoïdes durant toute la vie adulte (de Rooij, 2009). Du fait de leur capacité à initier la spermatogénèse, l'utilisation de ces cellules semble prometteuse pour la restauration de la

fertilité des patients présentant une azoospermie après traitement du cancer. L'utilisation de cellules testiculaires provenant de patients ayant une localisation testiculaire des cellules tumorales est pour le moment inenvisageable, en raison d'un potentiel risque de réintroduction de cellules tumorales chez ces patients (Jahnukainen *et al.*, 2001). Plusieurs techniques de tri cellulaire ont été testées, cependant aucune n'est parvenue jusqu'à présent à éliminer complètement les cellules malignes (Fujita *et al.*, 2006; Geens *et al.*, 2007; Dovey *et al.*, 2013). Il serait donc envisageable d'utiliser cette technique uniquement chez des patients présentant un faible risque de contamination des testicules par des cellules tumorales (Del Vento *et al.*, 2018).

4.1.1. Transplantation autologue de CSS

Le premier succès de transplantation de CSS chez la souris a été réalisé par Brinster en 1994. À partir de suspensions de cellules testiculaires isolées injectées au sein de testicules d'animaux stériles, une spermatogenèse complète conduisant à la formation de spermatozoïdes matures a été obtenue (Brinster et Zimmermann, 1994). Cette technique fut appliquée à d'autres espèces telles que le primate non humain et a conduit à l'obtention d'embryons à partir de spermatozoïdes issus de CSS injectées au sein d'individus adultes ayant été traités avec des chimiothérapies (Hermann *et al.*, 2012). Chez la souris, une conception naturelle à partir d'une transplantation de cellules testiculaires prépubères a été obtenue (Goossens *et al.*, 2009, 2010). Cette technique a montré ses preuves chez d'autres espèces telles que la chèvre (Honaramooz, 2003) ou le mouton (Herrid *et al.*, 2009). Afin d'augmenter la proportion de CSS, une expansion *in vitro* de CSS peut être réalisée avant transplantation (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003). Ces CSS de souris cultivées ont ainsi pu coloniser le testicule lors de la transplantation et produire des cellules germinales différenciées, utilisées pour générer une descendance saine après ROSI (*Round spermatid injection*) et ICSI. À ce jour, aucune étude publiée n'a montré une transplantation de CSS chez l'homme.

4.1.2. Transplantation hétérologue de CSS

La transplantation hétérologue de CSS consiste à transférer des cellules issues d'une espèce au sein du testicule d'un hôte d'une espèce différente. Contrairement à la transplantation autologue, la transplantation hétérologue ne donne pas d'aussi bons résultats. En effet, très peu d'études ont montré une spermatogenèse complète après transplantation hétérologue, notamment à partir de CSS de rats transplantées chez la souris (Clouthier *et al.*, 1996; Russell

et Brinster, 1996). Récemment, une spermatogenèse complète a été obtenue après transplantation de CSS provenant d'ocelot, chez le chat (Silva *et al.*, 2020). Des tentatives récentes ont aussi été réalisées chez la souris à partir d'autres espèces, telles que le chien (Lee *et al.*, 2016; Pieri *et al.*, 2019), le primate non humain (Mao *et al.*, 2021), aucune ne permettant une différenciation des CSS au-delà du stade spermatogonie. Une colonisation des tubes et un maintien du pool de CSS est observés. Des résultats comparables ont été obtenus avec des CSS humaines (Sadri-Ardekani *et al.*, 2009; Zohni *et al.*, 2012). Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par la distance phylogénétique entre les espèces donneuses et receveuses.

4.2. Greffe de tissu testiculaire

La greffe de tissu testiculaire est une alternative à la transplantation de CSS. Elle présente l'avantage de conserver l'architecture et la structure tridimensionnelle du tissu, permettant le maintien des interactions cellulaires, indispensables au bon développement des cellules germinales. Tout comme la transplantation cellulaire, il est indispensable de s'assurer que les greffons ne contiennent pas de cellules tumorales, pouvant se disséminer chez l'hôte (Jahnukainen *et al.*, 2015).

Différents types de greffe sont envisageables : l'autogreffe, où le donneur et l'hôte sont le même individu, l'allogreffe où le donneur et l'hôte sont de la même espèce et la xéno greffe où l'hôte est d'une espèce différente de celle du donneur. Le greffon peut être positionné au niveau du testicule, il s'agit d'une greffe orthotopique. Le greffon peut être positionné sur une partie du corps différente de sa localisation physiologique, la greffe est dite hétérotopique. Suite à la maturation *in vivo* du tissu greffé, il sera alors nécessaire de récupérer le greffon et d'isoler les spermatozoïdes produits afin de les utiliser en AMP (Rives *et al.*, 2017).

4.2.1. Allo-/auto-greffe

L'allo-/auto-greffe de tissu testiculaire a permis la restauration de la fertilité chez la souris et le rat avec l'obtention d'une spermatogenèse complète (Goossens *et al.*, 2008; Van Saen *et al.*, 2009; Baert *et al.*, 2012; Kirpatovskii *et al.*, 2019) et la formation de spermatozoïdes féconds ayant donné une descendance (Shinohara *et al.*, 2002; Pullium *et al.*, 2008) à partir de tissus testiculaires frais ou décongelés.

Afin de se rapprocher de l'homme, des essais d'autogreffe ont été réalisés chez les primates non humains et ont permis d'obtenir une spermatogenèse complète (Luetjens *et al.*,

2008; Jahnukainen *et al.*, 2012). Récemment, une étude a permis de donner naissance à un singe rhésus après autogreffe de tissu testiculaire prépubère décongelé et ICSI (Fayomi *et al.*, 2019). À notre connaissance, aucune autogreffe de tissu testiculaire prépubère n'a été réalisée chez l'homme.

4.2.2. Xénogreffe

De nombreuses études ont réalisé des greffes de tissu testiculaire prépubère provenant de différentes espèces animales sous la peau de souris immunodéficientes. Le statut immunitaire de ces souris est indispensable pour éviter tout risque de rejet des greffons. Ces essais ont conduit à la maturation du tissu testiculaire et à une spermatogenèse complète chez le cochon, la chèvre et le hamster (Honaramooz *et al.*, 2002; Schlatt *et al.*, 2002; Nakai *et al.*, 2010). Des résultats identiques ont été obtenus à partir de tissus testiculaires prépubères congelés dans différentes espèces : lapin (Shinohara *et al.*, 2002), cochon (Honaramooz *et al.*, 2002; Abrishami *et al.*, 2010; Kaneko *et al.*, 2013), mouton (Pukazhenthii *et al.*, 2015) et primate non humain (Jahnukainen *et al.*, 2012). Une descendance a été obtenue à partir de spermatozoïdes issus de xénogreffes issus de lapin, de cochon et macaques (Shinohara *et al.*, 2002; Kaneko *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016a).

Chez l'homme, aucune tentative de greffe de tissu testiculaire humain chez la souris n'a à ce jour permis d'obtenir une spermatogenèse complète. Des essais à partir de tissus testiculaires fœtaux (Yu *et al.*, 2006), prépubères (Wyns *et al.*, 2007, 2008; Goossens *et al.*, 2008; Poels *et al.*, 2013), ou adultes (Schlatt *et al.*, 2006; Van Saen *et al.*, 2011) ont été réalisés montrant une différenciation limitée des cellules germinales allant jusqu'au stade spermatocyte pachytène. Des tentatives avec supplémentation en antioxydants et testostérone (Poels *et al.*, 2014) ainsi qu'en FSH (Van Saen *et al.*, 2011) n'ont pas permis d'améliorer la progression de la spermatogenèse.

De par l'intervention d'une espèce animale au sein du protocole, de nombreuses limites du point de vue éthique sont présentes quant à l'utilisation de cette technique pour la restauration de la fertilité chez l'homme, du fait de la possible transmission de contaminants d'origine animale ou d'agents infectieux (Patience *et al.*, 1998; Kimsa *et al.*, 2014).

4.3. Maturation *in vitro* de cellules testiculaires isolées

En raison de la possibilité de réintroduire des cellules cancéreuses *via* l'utilisation d'approches de maturation *in vivo*, de nombreuses techniques de maturation *in vitro* ont été développées. L'utilisation de cellules isolées permet de s'affranchir de la contrainte de la présence de cellules tumorales mais entraîne cependant une perte des connections cellulaires nécessaires au bon développement des cellules germinales.

Les cellules testiculaires isolées peuvent être cultivées en phase liquide (culture bidimensionnelle) ou en phase solide (culture tridimensionnelle). A notre connaissance, la culture de cellules isolées n'a pas encore permis de produire des spermatozoïdes fonctionnels, chez l'homme.

4.3.1. Culture 2D

La culture bidimensionnelle en phase liquide n'a pour le moment pas permis d'obtenir une spermatogenèse complète. Les premiers essais menés chez le cochon d'Inde (Jordan *et al.*, 1961) ont très vite été suivis par une amélioration de ce modèle par co-culture avec des cellules de Sertoli, permettant une différenciation jusqu'au stade spermatocyte pachytène (Tres et Kierszenbaum, 1983). Depuis, la production réussie de cellules germinales haploïdes a été obtenue à partir de CSS isolées chez la souris (Wang *et al.*, 2014b), le veau (Izadyar *et al.*, 2003) et le rat (Iwanami *et al.*, 2006). Certaines études ont également mis en évidence l'importance de la présence de facteurs tels que la testostérone et la FSH (Minaee Zanganeh *et al.*, 2013).

Récemment, une étude a rapporté la différenciation de CSS de souris prépubères en spermatides allongées dans un système de culture cellulaire 2D, (Ibtisham *et al.*, 2021), aucune autre étude n'ayant atteint ce niveau de différenciation. Étant donné le rôle primordial des CSS dans l'initiation et le maintien de la spermatogenèse, un système de culture cellulaire bidimensionnelle pourrait permettre une augmentation exponentielle du nombre de CSS qui, si elle était suivie d'une induction de la différenciation, pourrait permettre d'outrepasser les problèmes liés au nombre limité de CSS dans les biopsies testiculaires de patients ayant subi des traitements gonadotoxiques.

4.3.2. Culture 3D

La culture tridimensionnelle standard consiste à insérer des cellules isolées au sein d'une matrice permettant le développement et la différenciation cellulaire à travers la néoformation de l'architecture tissulaire. Ce système de culture a été utilisé pour produire des cellules post-méiotiques à partir de cellules testiculaires prépubères de souris (Stukenborg *et al.*, 2008, 2009; Abu Elhija *et al.*, 2012) et de rat (Lee *et al.*, 2011). Des cellules germinales post-méiotiques ont également été générées à partir de cellules testiculaires prépubères de singe rhésus (Huleihel *et al.*, 2015). Des essais réalisés à partir de cellules issues de tissus testiculaires d'hommes présentant une azoospermie non-obstructive ont montré une augmentation de la proportion de cellules haploïdes suite à la culture (Lee *et al.*, 2007). Une étude a récemment réalisé des cultures de cellules issues de tissus testiculaires d'enfants traités par chimiothérapie au sein d'une matrice de méthylcellulose. Des analyses moléculaires ont révélé qu'une partie des biopsies utilisées étaient porteuses de marqueurs de cellules post-méiotiques après culture (Abofoul-Azab *et al.*, 2018).

Récemment, l'amélioration du système de culture tridimensionnelle a conduit à la formation d'organoïdes testiculaires en culture. Le concept d'organoïde testiculaire a été introduit dans l'ingénierie tissulaire pour désigner les organisations de cellules testiculaires modélisant l'architecture et la fonction des testicules. L'approche des organoïdes testiculaires permet de contrôler la composition et la structure formée, ce qui n'est pas possible dans les cultures organotypiques. Cependant, les conditions permettant la réassociation des cellules testiculaires en un substitut testiculaire fonctionnel *in vitro* ne sont pas encore connues (Richer *et al.*, 2020). Les premières données disponibles sur les organoïdes testiculaires ont été obtenues par Baert en 2017, à partir de tissu testiculaire prépubère et adulte humain (Baert *et al.*, 2017). Des organoïdes ont aussi été obtenus dans les modèles rat, souris, macaque et chez l'homme (Alves-Lopes *et al.*, 2017; Pendergraft *et al.*, 2017; Baert *et al.*, 2019; Rezaei Topraggaleh *et al.*, 2019; Sakib *et al.*, 2019a, b). Ces études ont pour le moment montré la fonctionnalité des structures produites par la production de testostérone et un maintien des CSS au sein de l'organoïde.

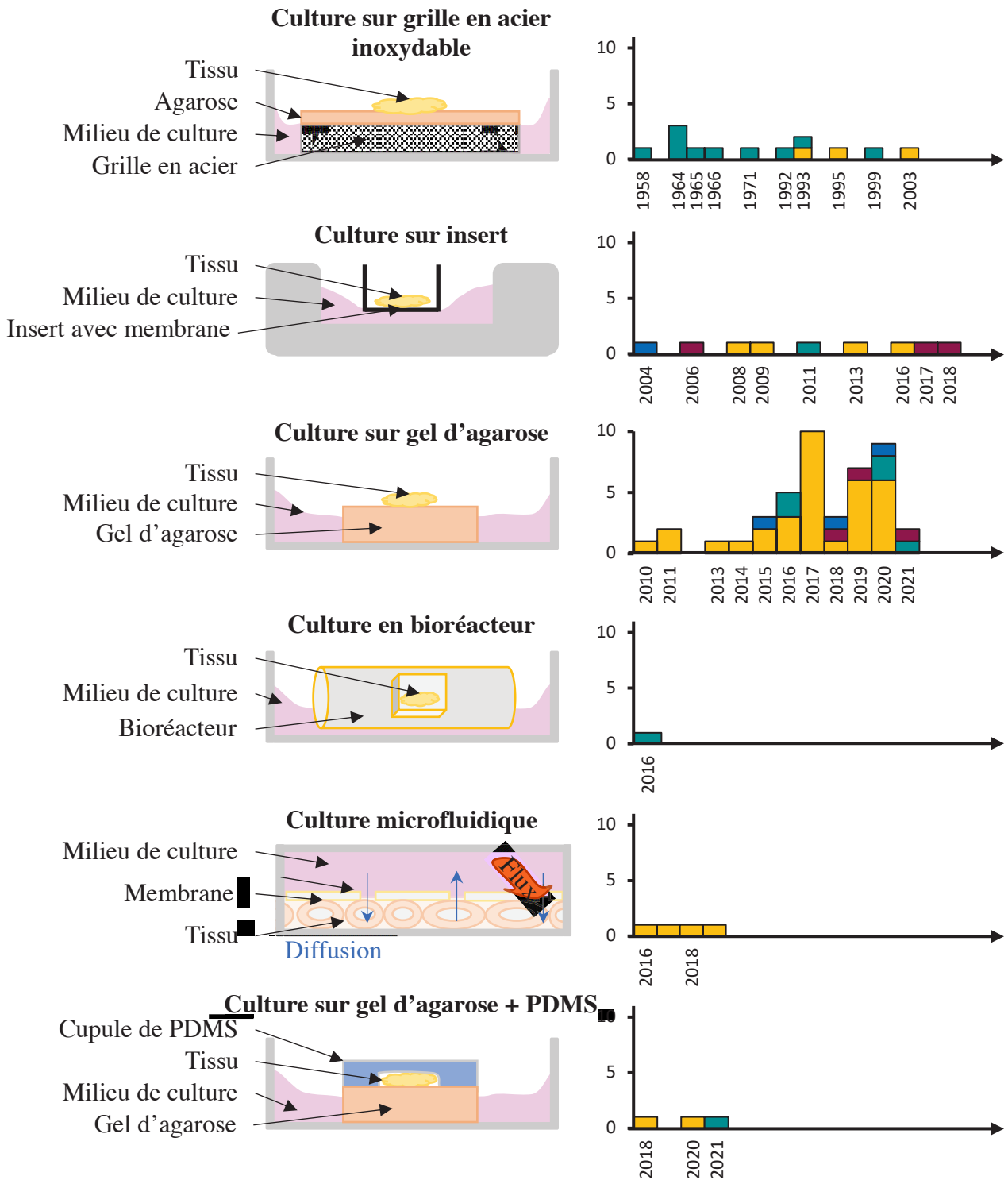


Figure 26 : Évolution de la culture organotypique

Organisation des différents supports de culture utilisés en culture organotypique et nombre de publications rapportées utilisant ces modèles par année et par espèce. Histogrammes : Jaune, Souris; Vert, Rat; Rouge, Homme; Bleu, autres espèces; PDMS, polydiméthylsiloxane.

4.4. Maturation *in vitro* de fragments tissulaires

La culture de fragments testiculaires est une alternative aux cultures de cellules testiculaires isolées. Elle permet également d'éviter la réintroduction de cellules tumorales au sein de l'individu tout en conservant l'architecture tissulaire et les interactions cellulaires. L'objectif de cette culture est de reproduire au mieux les conditions physiologiques au sein du tissu cultivé afin de produire des spermatozoïdes utilisables en AMP.

La culture de fragments tissulaires peut se réaliser en interface gaz-liquide ou *via* l'utilisation d'un système de microfluidique récemment développé.

4.4.1. Évolution du support de culture

La culture organotypique, faisant référence à l'utilisation de fragments tissulaires, est une méthode de culture ancienne permettant actuellement d'obtenir des avancées dans la réalisation d'une spermatogenèse complète *in vitro*. Les premiers essais menés à partir de testicules prépubères ont été réalisés par Trowell en 1959 à partir de tissus de rats, cultivés à court terme sur une grille en acier inoxydable recouverte d'une bande d'agarose en contact avec le milieu de culture et l'air ambiant (Trowell, 1959) (Figure 26). Malgré l'incapacité de ce système à induire une différenciation des cellules germinales, cette méthode de culture fut rapidement reprise par les époux Steinberger et qui ont par la suite réalisé de nombreux tests à partir de testicules prépubères de rats. L'utilisation d'animaux à différents âges ainsi que la variation des composants du milieu de culture ont conduit à une entrée en méiose des spermatogonies, et la production de quelques spermatocytes pachytènes (Steinberger *et al.*, 1964a–c; Steinberger et Steinberger, 1965, 1966, 1971). L'utilisation de la grille d'acier couplée à l'agarose fut utilisée durant plusieurs années et a permis d'obtenir chez la souris les premières spermatides rondes *in vitro* en 2003 (Suzuki et Sato, 2003). Le modèle évolua par la suite vers une membrane semi-perméable en polycarbonate, possédant des pores de 0,45 à 3 μm de diamètre. L'utilisation des inserts facilite le maintien sur une courte durée de l'architecture du tissu, mais aussi d'obtenir une différenciation cellulaire jusqu'au stade spermatocyte pachytène chez la souris (Milazzo *et al.*, 2008; Travers *et al.*, 2011). Des études menées sur le veau (Oatley *et al.*, 2004) et l'homme (Kvist *et al.*, 2006; de Michele *et al.*, 2017, 2018a) ont montré une absence de maturation des spermatogonies. Par la suite, des cellules post-méiotiques ont été obtenues à partir de tissus testiculaires congelés provenant d'enfants âgés entre 2 et 12 ans (de Michele *et al.*, 2018b). Très rapidement, les inserts ont été remplacés par

le système de culture organotypique sur gel d'agarose qui est encore aujourd'hui majoritairement utilisé.

La première utilisation de ce modèle sur le testicule prépubère date de 2010, où des spermatozoïdes ronds ont été obtenus à partir de tissus provenant de souris (Gohbara *et al.*, 2010). Un engouement pour ce modèle est né suite à l'obtention d'une spermatogenèse complète à partir de tissus testiculaires de souris prépubères, accompagnée de la production d'une descendance viable et fertile issue des spermatozoïdes produits *in vitro* (Sato *et al.*, 2011a, b). Ce support, repris par plusieurs équipes de recherche, a montré son efficacité à soutenir la différenciation cellulaire jusqu'au stade spermatozoïdes chez la souris (Yokonishi *et al.*, 2014; Arkoun *et al.*, 2015; Reda *et al.*, 2017). Plusieurs essais ont été réalisés dans d'autres espèces telles que le rat (Liu *et al.*, 2016b; Reda *et al.*, 2016; Nakamura et Sloper, 2020; Matsumura *et al.*, 2021), l'homme (Medrano *et al.*, 2018b; Portela *et al.*, 2019a), le veau (Kim *et al.*, 2015), le chat (Silva *et al.*, 2018) et le ouistiti (Heckmann *et al.*, 2020), sans parvenir à obtenir une spermatogenèse complète *in vitro*.

Parallèlement à l'optimisation des conditions de culture sur gel d'agarose, plusieurs équipes ont commencé à développer de nouveaux modèles de culture *via* l'intervention de la bio-ingénierie. L'équipe de Phillippe Durand a rapporté la production de spermatozoïdes à partir de tissu testiculaire prépubère de rat et d'homme adultes (en parcours de transidentité) au sein d'une toute nouvelle matrice : l'hydrogel de chitosan (Perrard *et al.*, 2016). Le chitosan est utilisé sous forme de tubes, ayant un diamètre interne de 2 mm pour une membrane de 1 mm d'épaisseur. Une portion de tubes séminifères est insérée au sein du tube qui sera par la suite scellé et cultivé dans une boîte de culture. Pour le moment, ces résultats n'ont pas encore été reproduits par une autre équipe.

La même année, l'équipe du Pr Ogawa a reproduit des essais de culture avec un système automatisé réalisant un flux de milieu de culture : la microfluidique. La culture testiculaire utilisant ce système est une grande avancée dans la bio-ingénierie médicale. En effet, cette technologie préalablement développée pour la culture de divers organes (Xiao *et al.*, 2017) n'avait jusqu'à présent pas été testée sur le testicule. Cette technique consiste en l'ajout d'un système de pompe péristaltique à la culture tissulaire, afin de générer un flux constant de milieu, un apport de nutriments régulier et renouvelé aux explants testiculaires. Ce flux vise à remplacer le flux vasculaire, absent en culture (Sharma *et al.*, 2020). Le flux de milieu est séparé du tissu par une membrane de polycarbonate poreuse. De plus, dans ce système de culture, l'étalement du tissu permet d'augmenter la surface de contact entre le tissu et le flux, ainsi qu'une meilleure

oxygénation du tissu (Komeya *et al.*, 2016, 2017). Ce système a été développé chez la souris et a permis de produire des spermatozoïdes féconds, ayant donné naissance à plusieurs souriceaux après ICSI (Komeya *et al.*, 2016). Une conservation du tissu en culture et une production spermatique au-delà de 6 mois ont été obtenues. Un système microfluidique sans pompe a été développé, mais semble cependant peu pratique à utiliser (Komeya *et al.*, 2017). Une dernière version de ce dispositif a permis d'observer le mécanisme de spermiogenèse durant la culture (Yamanaka *et al.*, 2018). Cette approche a pour le moment été utilisée uniquement chez la souris.

Plus récemment, en parallèle du développement du système microfluidique, l'équipe du Pr Ogawa a cherché à optimiser le système de culture sur gel d'agarose. L'ajout d'une matrice en PDMS perméable à l'oxygène recouvrant le fragment testiculaire permet d'étaler le tissu afin qu'un maximum de tubes soient en contact avec la surface de l'agarose, celui-ci servant à transporter les nutriments présents dans le milieu de culture. Une première publication en 2018 a mis en évidence une meilleure croissance du tissu en condition PDMS en comparaison avec la culture sur gel d'agarose standard, ainsi qu'une disparition de la zone centrale nécrotique pouvant être observée après culture sur gel d'agarose (Kojima *et al.*, 2018). L'année suivante, ce système de culture permit la production de spermatozoïdes féconds, avec obtention d'une descendance après ICSI (Komeya *et al.*, 2019). Des résultats encourageants ont été obtenus chez le rat, par la production d'une plus grande quantité de cellules méiotiques et la production de spermatides après culture de tissus prépubères (Matsumura *et al.*, 2021).

4.4.2. Évolution des conditions de culture

Les modifications apportées aux supports de culture ne sont pas les seules à avoir permis une amélioration des conditions de culture *in vitro*. En effet, les conditions de culture telles que la température, le pourcentage de dioxyde de carbone ou oxygène dans l'incubateur, ainsi que les composants du milieu de culture influent sur l'évolution de la spermatogenèse.

Les premières cultures réalisées chez le rat variaient principalement par la composition du milieu de culture. La majorité des essais, réalisés à 31°C, ont conduit à un arrêt prématuré de la maturation du tissu, voire une absence totale de maturation (Steinberger *et al.*, 1964c; Steinberger et Steinberger, 1965; Boitani *et al.*, 1993; Schlatt *et al.*, 1999). Les mêmes observations ont été obtenues chez la souris (Zhou *et al.*, 1993; Suzuki et Sato, 2003; Gohbara *et al.*, 2010). Ces tests étaient réalisés principalement avec des molécules connues pour agir sur le système reproductif comme la FSH, la LH, l'acide rétinoïque ou encore l'insuline ainsi

qu'avec une supplémentation en SVF. Suite à la publication par l'équipe du Pr Ogawa de la production de spermatozoïdes *in vitro* de souris grâce à un milieu de culture supplémenté en KSR (*Knock-out Serum*) (Sato *et al.*, 2011b), les milieux de culture ont été adaptés. Les milieux contenant du KSR plutôt que du sérum de veau foetal ont été par la suite privilégiés pour induire la spermatogenèse dans des cultures organotypiques de tissus de souris (Sato *et al.*, 2011a). L'utilisation de ce milieu de culture ainsi que les conditions standards de 34°C, 20% de CO₂ sont alors devenues la norme. Afin d'optimiser les conditions de culture, de nombreuses molécules ont été ajoutées et le rendement/la progression de la spermatogenèse ont été évalués chez la souris. L'ajout de rétinol (vitamine A) - le précurseur de l'acide rétinoïque, qui stimule la différenciation des spermatogonies et l'initiation de la méiose (Chung et Wolgemuth, 2004; Raverdeau *et al.*, 2012) - a favorisé la spermatogenèse *in vitro* de souris dans des explants testiculaires frais (Arkoun *et al.*, 2015) ou décongelés (Arkoun *et al.*, 2016; Dumont *et al.*, 2016). D'autres molécules telles que l'extrait de réglisse (Wang *et al.*, 2016), la mélatonine (Reda *et al.*, 2017), l'IGF-1 (Yao *et al.*, 2017), ou encore le JWH133 (Dumont *et al.*, 2020) ont montré leurs capacités à stimuler la spermatogenèse *in vitro*. En parallèle, chez le rat, l'utilisation de ces mêmes conditions de culture n'a pas permis d'obtenir une spermatogenèse complète (Reda *et al.*, 2016). Il apparaît donc que les produits contenus dans le KSR et le milieu de culture ne permettent pas chez le rat d'obtenir les mêmes résultats que chez la souris. L'utilisation de milieux complexes, contenant des facteurs de croissance a aussi été rapportée comme ayant un effet bénéfique sur la spermatogenèse *in vitro* dans le modèle souris (Dumont *et al.*, 2017). Cependant, la complexité évidente de ces milieux ne permet pas de déterminer quel(s) composé(s) est (sont) réellement responsables de ces résultats. Récemment, une promotion de la spermatogenèse de souris jusqu'au stade spermatide ronde a été obtenue avec un milieu chimiquement défini contenant du rétinol, de l'acide rétinoïque, ainsi qu'une combinaison de quatre hormones connues pour favoriser la prolifération et la différenciation des cellules germinales (FSH, LH, testostérone, triiodothyronine) (Sanjo *et al.*, 2018).

Afin de comprendre ce qui est réellement nécessaire aux tissus en culture et d'améliorer le rendement en cellules germinales différenciées, des analyses du transcriptome ont été réalisées. À notre connaissance, seules trois études rapportent l'utilisation de telles analyses sur du tissu testiculaire prépubère mûri *in vitro*. Une première étude portant sur l'analyse de spermatides rondes, récupérées par microdissection laser dans du tissu testiculaire de souris cultivé, a montré une diminution de l'expression du gène *Igf1*, impliqué dans la régulation de l'apoptose et le cycle cellulaire (Yao *et al.*, 2017). Une supplémentation du milieu de culture

en IGF1 a permis d'obtenir une augmentation du rendement en cellules haploïdes, ainsi qu'une diminution de l'apoptose (Yao *et al.*, 2017). Dans la continuité de cet objectif, une analyse réalisée par l'équipe du Pr Ogawa a mis en évidence une surexpression de gènes en lien avec l'inflammation dans les cultures de tissus testiculaires de souris (Abe *et al.*, 2020a). Une supplémentation du milieu de culture avec un inhibiteur de la voie TLR4 (*Toll like receptor 4*)-NFκB, a permis de réduire le nombre de macrophages testiculaires, responsables de cette inflammation. Cette même stratégie avait été utilisée précédemment pour permettre de produire *in vitro* des ovocytes dans un modèle de culture de tissu ovariens présentant jusqu'alors un arrêt de maturation (Morohaku *et al.*, 2016). Les récentes avancées dans la compréhension des facteurs indispensables à la spermatogenèse ont montré une altération de la production de la protéine LAMA1 (*Laminin subunit alpha 1*) lors de la culture de tissus testiculaires d'enfants sur gel d'agarose, protéine précédemment montrée comme étant indispensable à la formation de la lame basale (Kurek *et al.*, 2021). L'ajout de facteurs favorisant la réparation et le renforcement de la lame basale pourrait alors être une piste à l'amélioration des conditions de culture de tissus humains.

4.4.3. État des lieux de la culture organotypique

A) Modèle animal

Malgré les nombreux essais déjà réalisés, la culture organotypique ne permet pas pour le moment d'obtenir une spermatogenèse complète dans toutes les espèces (Tableau 6). Le modèle souris a permis de faire de nombreuses avancées dans ce domaine. L'utilisation de KSR à 10%, tout comme l'évolution des supports de culture sont à l'origine de ces avancées. Grâce à cela, une analyse épigénétique des embryons produits après ICSI (Oblette *et al.*, 2020) ainsi que l'obtention d'une descendance fertile (Yokonishi *et al.*, 2014) ont été possibles et ont montré la faisabilité et la validité de cette technique de restauration de la fertilité chez la souris.

Les méthodes de culture développées chez la souris ne semblent pas être adaptées au modèle rat. En effet, peu de cellules méiotiques sont produites (Reda *et al.*, 2016) et leur obtention semble peu reproductible (Matsumura *et al.*, 2021). Cette dernière étude (Matsumura *et al.*, 2021) a très récemment mis en avant de nouveaux facteurs permettant une plus grande progression de la spermatogenèse *in vitro* dans le modèle rat. Contrairement aux résultats obtenus chez la souris, l'AlbuMAX™ à 20 mg/mL semble plus apte à soutenir le tissu que la dose de 40 mg/mL ou le KSR 10% utilisés couramment chez la souris. De plus, une réduction

du taux d'oxygénation ainsi qu'un milieu enrichi en antioxydants et hormones semblent stimuler la spermatogenèse. Cependant, un développement des cellules germinales post-méiotiques jusqu'au stade spermatozoïde n'a toujours pas été obtenu chez le rat avec le système de culture organotypique sur gel d'agarose. Une spermatogenèse complète a néanmoins été obtenues lors de cultures de tissus prépubères dans une matrice de chitosan (Perrard *et al.*, 2016).

Des cultures de tissus testiculaires prépubères ont été réalisées dans d'autres modèles animaux tels que le primate non humain (Heckmann *et al.*, 2020), le veau (Oatley *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2015) ou le chat (Silva *et al.*, 2018), mais aucune cellule post-méiotique n'a été obtenue.

B) Chez l'homme

La production de spermatozoïdes *in vitro* à partir de tissus testiculaires d'enfants prépubères représenterait une très grande avancée dans le domaine de la restauration de la fertilité. La faible disponibilité des échantillons couplée aux traitements reçus avant préservation tissulaire représentent des obstacles, qu'il semble compliqué de résoudre *via* la culture organotypique. Afin de passer outre, des modèles animaux tels que la souris ou le rat sont prioritairement utilisés. Néanmoins, suite à l'évolution progressive des supports et conditions de culture, des essais sur tissus humains ont été réalisés.

A notre connaissance, uniquement 7 articles ont été publiés sur la culture organotypique de tissus testiculaires de garçons prépubères. Parmi ces études une seule a abouti à la formation de cellules germinales post-méiotiques (de Michele *et al.*, 2018b). Ces cellules ont été obtenues à partir de tissus provenant d'enfants âgés de 2 à 12 ans ne présentant aucune différenciation des cellules germinales. Après une vingtaine de jours de culture seulement, des cellules haploïdes ont été identifiées, ces cellules étant présentes jusqu'à 140 jours de culture. Les milieux de culture utilisés afin d'obtenir cette différenciation ont été supplémentés en KSR 10%, ainsi qu'en FSH. Malgré l'absence de production de spermatozoïdes, ces résultats restent encourageants pour le développement de la culture organotypique en vue d'une application clinique.

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
Souris							
Nouveauté	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%	Supplémentations : SVF 10% ou une combinaison de transferrine 5 µg/mL, insuline 20 µg/mL et acide rétinolique 50 ng/mL ou AMH	1 à 7 jours - 37°C	Spermatocyte I	DMEM/F12, pénicilline 100 UI/mL, streptomycine 100 µg/mL, L-glutamine 1 mg/mL, transferrine 5 µg/mL, insuline 20 µg/mL, acide rétinolique 50 ng/mL, AMH	Zhou <i>et al.</i> , 1993
Nouveauté	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%	Supplémentations : SVF 10%, TIRA (transferrine 5 µg/mL, insuline 20 µg/mL, acide rétinolique 50 ng/mL), hCG 0,1 à 2,0 UI/mL, MIS 0,5 µg/mL	7 jours - 37°C	Spermatocyte I	DMEM-Ham's F12, L-glutamine 1 mg/mL, Pénicilline 100 UI, streptomycine 200 mg, MIS 0,5 µg/mL	Zhou et Hutson, 1995
5 jpp	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%	-	2 semaines - 32,5°C	Spermatide Ronde	DMEM, (alanine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, proline et sérine) 0,1 mM, pyruvate 1,0 mM, SVF 10%, glutamine	Suzuki et Sato, 2003
6-7 jpp	Frais et CLC	Insert avec membrane en polycarbonate (taille des pores 0,45 µm)	Origine du tissu : Frais, CLC	9 jours - 33°C	Spermatocyte pachytène	DMEM/F-12, acide L-ascorbic, α-tocopherol, rétinol, pyruvate, insuline, pénicilline G, gentamicine, FSH 50 UI/l, HCG 5 UI/l	Milazzo <i>et al.</i> , 2008
8 jpp	Frais	Insert avec membrane (maillage 74 µm)	Supplémentations : hCG, FSH, bicalutamide, kétoconazole Milieux : αMEM, DMEM, StemPro-34 SFM	48h - 37°C	Spermatogonie	-	De Gendt <i>et al.</i> , 2009
10,5 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : SVF 10%, StemPro supplement, LE540 1 µM T° : 32°C, 34°C et 37°C Age des souris : 7,5 à 4,5 jpp % d'oxygène : 20% et 10% Supplémentations : SVF 10%, KSR 10%, Albumax™, B27, TKM, HGF 5 ng/mL, activine A 100 ng/mL, FSH 200 ng/mL, testostérone 1 µM, BMP-4 humaine recombinante 20 ng/mL, BMP-7 20 ng/mL, extraits hypophysaires bovins 50 µg/mL	34°C, 20% O ₂	Spermatide Ronde	αMEM, SVF 10%	Gohbara <i>et al.</i> , 2010
0,5 à 11,5 jpp	Frais ou CLC	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Albumax™, B27, TKM, HGF 5 ng/mL, activine A 100 ng/mL, FSH 200 ng/mL, testostérone 1 µM, BMP-4 humaine recombinante 20 ng/mL, BMP-7 20 ng/mL, extraits hypophysaires bovins 50 µg/mL	15 à 45 jours - 34°C	Spermatide flagellée, descendance	αMEM, KSR 10%	Sato <i>et al.</i> , 2011a, b; Yokonishi <i>et al.</i> , 2013
6-7 jpp	Frais et CLC	Insert avec membrane en polycarbonate (taille des pores 0,45 µm)	Supplémentations : rétinol (3,3.10 ⁻⁶ M, 10 ⁻⁶ M, 10 ⁻⁶ M, 10 ⁻⁶ M) et acide rétinolique (3,3.10 ⁻⁶ M, 10 ⁻⁶ M, 10 ⁻⁶ M)	7, 9 et 11 jours - 32°C	Spermatocyte I	DMEM/F12, gentamicine 25 µg/mL, streptomycine 50 mg/L, pénicilline 39 UI/mL, pyruvate 10 ⁻⁶ M, insuline 10 mg/L, apo-transferrine 10 mg/L, LH 10 UI/L, FSH 50 UI/L,	Travers <i>et al.</i> , 2013

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
0,5 à 5,5 jpp	CLC et vitrification	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : KSR 10%, AlbuMAX™ 40 mg/mL (w/v)	36 à 46 jours - 34°C 2,5 jpp : 34, 38 et 60 jours 6,5 jpp : 4 à 36 jours - 34°C	Spermatozoïde, descendance par ROSI	vitamine C 10 ⁻⁶ M, vitamine E 2.10 ⁻⁶ M, rétinol 10 ⁻⁶ M	Yokonishi <i>et al.</i> , 2014
2,5 et 6,5 jpp	Frais et CLC	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : rétinol 10 ⁻⁶ M, FSH 500 UI/L, et LH 50 UI/L	30 jours - 34°C	Spermatozoïde	αMEM, KSR 10%, gentamicine 5 μg/mL, rétinol 10 ⁻⁶ M	Arkoun <i>et al.</i> , 2015, 2016
6,5 jpp	Frais, CLC et SSV	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	-	30 jours - 34°C	Spermatozoïde	αMEM, KSR 10%, gentamicine 5 μg/mL	Dumont <i>et al.</i> , 2015
2,5 et 6,5 jpp	Frais et SSV	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : Rétinol 10 ⁻⁶ M Taille du tissu : 0,75 mm ³ ou 1mm ³	30 jours - 34°C	Spermatozoïde	αMEM, KSR 10%, gentamicine 5 μg/mL, rétinol 10 ⁻⁶ M	Dumont <i>et al.</i> , 2016
7 jpp	Frais, vitrification et CLC	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	-	20 h - 34°C	Spermatogonie	RPMI, KSR 10%	Hajiaghali <i>et al.</i> , 2016
0,5 - 5,5 jpp	Frais	Système microfluidique - Tissu contre membrane de polycarbonate (Pore de 10 μm)	Méthode de culture : microfluidique ou gel d'agarose	6 mois - 34°C 24 semaines - 34°C	Spermatozoïde et descendance	αMEM, AlbuMAX™ 40 mg/mL	Komeya <i>et al.</i> , 2016
6 jpp	Frais	Insert avec membrane en polycarbonate (taille des pores 0,2 μm)	Supplémentations : extrait de réglisse (0,2, 2 et 20 μmol/L), FSH 200 μg/L	72 h - 32°C	Spermatocyte I	DMEM, BSA 0,1%, extrait de réglisse 20 μmol/l	Wang <i>et al.</i> , 2016
5 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Milieu de culture : KSR 10% ou AlbuMAX™ Conditions de culture : rotations constantes	49 jours - 34°C	Spermatide allongée	αMEM, AlbumMAX™ (avec rotation constante)	Nakamura <i>et al.</i> , 2017
3 jpp	Frais	Gel d'agarose (0,35%) (w/v) mélangé avec le MC	Supplémentations : mélatonine 10 ⁻⁶ M, Glutamax 1,87 mM, KSR 0,1, 10 or 20%	56 jours - 34,5°C	Spermatides allongées	αMEM, KSR 10% ou mélatonine 10 ⁻⁶ M	Reda <i>et al.</i> , 2017
6 et 10 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : KSR 10%, AlbuMAX™ 4% (w/v)	55 et 89 jours, respective	Spermatozoïde	αMEM, bicarbonate de sodium 2,2.10 ⁻² M, pénicilline 10 000 u/mL et streptomycine 10 000 μg/mL, KSR 10%	Isoler-Alcaraz <i>et al.</i> , 2017

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
6-7 jpp	Frais, CLC et SSV	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	-	34°C - 30 jours	Spermatozoïde	αMEM, KSR 10%, gentamicine 5 µg/mL, rétinol 10-6 M, vitamine E 3,4 mM	Oblotte <i>et al.</i> , 2017
0,5 - 4,5 jpp	Frais	Système microfluidique - Tissu contre membrane de polycarbonate (Pore de 10 µm) et gel d'agarose	Méthode de culture : Système microfluidique avec ou sans pompe, gel d'agarose	3 mois- 34°C	Spermatide allongée	αMEM, AlbuMAX™ 40 mg/mL	Komeya <i>et al.</i> , 2017
6-7 jpp	Frais, CLC et SSV	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentation : rétinol 10-6 M Milieu de culture : αMEM ou StemPro 34 SFM (Stempro-34 Nutrient supplement, insuline-transferrine-sélénium 10, 5,5 et 6,7 ng/mL), L-glutamine 2 mM, D-(+)-glucose 6 mg/mL, solution d'acides aminés non essentiels 1%, solution de vitamines 1%, gentamicine 50 µg/mL, pyruvate de sodium 1 mM, vitamine C 0,1 mM, acide lactique 1 g/mL, β-oestradiol 30 ng/mL, progesterone 60 ng/mL, BSA 0.2%, KSR 1%, EGF 20 ng/mL, bFGF 10 ng/mL, GDNF 10 ng/mL et LIF 103 U/mL Supplémentations : rétinol 10 ⁻⁶ M, FSH 500 IU/l, LH 50 UI/L, Vitamine E 3,4 mM	30 jours - 34°C	Spermatide allongée	αMEM, KSR 10%, gentamicine 5 µg/mL, rétinol 10-6 M	Rondanino <i>et al.</i> , 2017
2,5 - 6,5 jpp	Frais, CLC et SSV	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit		30 à 60 jours - 34°C	Spermatozoïde	αMEM, KSR 10%, gentamicine 5 µg/mL	Dumont <i>et al.</i> , 2017
6 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	-	12 semaines - 34°C	Spermatocyte	αMEM, KSR 10% (v/v), penicilline/streptomycine 1% (v/v), bicarbonate de sodium 3,5% (v/v)	Alrahel <i>et al.</i> , 2018
5,5 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,2%) (w/v) incubation dans MC O/N	Supplémentation : IGF-1 10 ng/mL	31 jours - 34°C	Spermatide allongée	αMEM, KSR 10% (v/v), IGF-1 10 ng/mL	Yao <i>et al.</i> , 2017
5 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC O/N	Supplémentations : Glucose 5, 25 ou 50 mM	21 jours - 35°C	Spermatocyte I	αMEM, KSR 10%	Tavares <i>et al.</i> , 2017

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
4,5 à 6,6 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	<p>Supplémentations : AlbuMAX® 1, BSA purifié par chromatographie, BSA fractionné par choc thermique, BSA fractionné par éthanol 40 mg/mL, acide stéarique 600 µM, acide palmitique 600 µM, acide oléique 600 µM, acide linorénique 100 µM, acide linorénique 50 µM, cholestérol 3,2 µg/mL, phosphatidylcholine 20 µg/mL, sphingomyéline 3,5 µg/mL, acide rétinolique 1 µM, rétinol 1 M, LH 1 ng/mL, FSH 1 ng/mL, testostérone 1 µM, Triiodothyronine 2 ng/mL, NaHCO₃ 1,82 g/L, pénicilline 100 UI/mL, streptomycine 100 ng/mL, amphotéricine 250 ng/mL</p> <p>Système de culture : agarose, agarose + cupule PDMS</p> <p>Profondeur de la cupule : 60, 100, 140, 180 µm</p> <p>Milieu de culture / Supplémentations : Milieu standard (αMEM, AlbuMAX™ 40 mg/mL), Milieu GS (StemPro-34 SFM, StemPro supplement, insuline 25 µg/mL, transferrine 100 µg/mL, putrescine 60 µM, sélénite de sodium 30 nM, D-(+)-glucose 6 mg/mL, pyruvate de sodium 38,5 µg/mL, acide lactique 1 µl/mL, BSA 5 mg/mL, L-glutamine 2 mM, 2-mercaptoéthanol 5.10⁻⁴ M, 1% (vol/vol) MEM solution de vitamines MEM, solution d'acides aminés non essentiels MEM 1% (v/v), acide ascorbique 10⁻⁴ M, D-biotine 10 µg/mL, rEGF 20 ng/mL, FGF 10 ng/mL, GDNF 10 ng/mL, β-estradiol 30 ng/mL, progesterone 60 ng/mL et SVF 1%); FGF9, Activin-A, FSH</p>	41 jours – 34°C	Spermatide ronde	αMEM, BSA fractionné à l'éthanol 40mg/mL, acide stéarique 600 µM, acide palmitique 600 µM, acide oléique 600 µM, acide linorénique 100 µM, acide linorénique 50 µM, cholestérol 3,2 µg/mL, phosphatidylcholine 20 µg/mL, sphingomyéline 3,5 µg/mL, acide rétinolique 1 µM, rétinol 1 M, LH 1 ng/mL, FSH 1 ng/mL, testostérone 1 µM, Triiodothyronine 2 ng/mL	Sanjo <i>et al.</i> , 2018
1,5 jpp	Frais	Gel d'agarose 1,5%, cupule de PDMS	<p>Supplémentations : AlbuMAX® 1, BSA purifié par chromatographie, BSA fractionné par choc thermique, BSA fractionné par éthanol 40 mg/mL, acide stéarique 600 µM, acide palmitique 600 µM, acide oléique 600 µM, acide linorénique 100 µM, acide linorénique 50 µM, cholestérol 3,2 µg/mL, phosphatidylcholine 20 µg/mL, sphingomyéline 3,5 µg/mL, acide rétinolique 1 µM, rétinol 1 M, LH 1 ng/mL, FSH 1 ng/mL, testostérone 1 µM, Triiodothyronine 2 ng/mL, NaHCO₃ 1,82 g/L, pénicilline 100 UI/mL, streptomycine 100 ng/mL, amphotéricine 250 ng/mL</p> <p>Système de culture : agarose, agarose + cupule PDMS</p> <p>Profondeur de la cupule : 60, 100, 140, 180 µm</p> <p>Milieu de culture / Supplémentations : Milieu standard (αMEM, AlbuMAX™ 40 mg/mL), Milieu GS (StemPro-34 SFM, StemPro supplement, insuline 25 µg/mL, transferrine 100 µg/mL, putrescine 60 µM, sélénite de sodium 30 nM, D-(+)-glucose 6 mg/mL, pyruvate de sodium 38,5 µg/mL, acide lactique 1 µl/mL, BSA 5 mg/mL, L-glutamine 2 mM, 2-mercaptoéthanol 5.10⁻⁴ M, 1% (vol/vol) MEM solution de vitamines MEM, solution d'acides aminés non essentiels MEM 1% (v/v), acide ascorbique 10⁻⁴ M, D-biotine 10 µg/mL, rEGF 20 ng/mL, FGF 10 ng/mL, GDNF 10 ng/mL, β-estradiol 30 ng/mL, progesterone 60 ng/mL et SVF 1%); FGF9, Activin-A, FSH</p>	- 34°C	Non évalué	αMEM, AlbuMAX™ 40 mg/mL, insuline 25 µg/mL	Kojima <i>et al.</i> , 2018

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
0,5 - 5,5 jpp	Frais	Système microfluidique - Chambre de 2 mm, flux horizontal	Système de culture : Microfluidique, gel d'agarose	6 mois - 34°C	Spermatide allongée	α MEM, AlbuMAX™ 40 mg/mL	Yamanaka <i>et al.</i> , 2018
4 - 8 jpp	Frais	Agarose 0,35% (w/v), incubation dans MC O/N	Souche de souris : C57BL/6 et B6D2F	6 semaines - 34°C	Spermatide allongée (C57BL/6) et Spermatocyte I (B6D2F)	α MEM, KSR 10%, penicilline/streptomycine 1%	Portela <i>et al.</i> , 2019b
5 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	-	20 jours - 34°C	Spermatide ronde	α MEM, AlbuMAX™	Nakamura <i>et al.</i> , 2018, 2019
0,5 - 9,5 jpp	Frais	Gel d'agarose 1,5%, cupule de PDMS (200 μ m)	Système de culture : agarose, agarose + cupule PDMS Profondeur de la cupule : 50, 100, 150, 200, 250 μ m	4 semaines - 34°C	Spermatide allongée	α MEM, AlbuMAX™ 40 mg/mL	Komeya <i>et al.</i> , 2019
6 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	-	49 jours - 34°C	Spermatozoïde	α MEM, AlbuMAX™	Pence <i>et al.</i> , 2019
6 - 7 jpp	Frais, CLC et SSV	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : rétinol 10 ⁻⁶ M ou alternance rétinol, FSH 500 UI/L Origine du tissu : Frais, CLC et SSV	30 jours - 34°C	Spermatozoïde	α MEM, KSR 10%, rétinol 10 ⁻⁶ M, gentamicin 5 μ g/mL	Oblotte <i>et al.</i> , 2019
6,5 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : JWH133 10 nM, 100 nM, 1 μ M et 10 μ M	30 jours - 34°C	Spermatide allongée	α MEM, KSR 10%, rétinol 10 ⁻⁶ M, JWH133 1 μ M, gentamicine 5 μ g/mL	Dumont <i>et al.</i> , 2020
7 jpp	Frais	Gel d'agarose 1,5%, cupule de PDMS	Supplémentation : inhibiteur TLR4-NFkB	28 jours - 34°C	Spermatocyte I	α MEM, AlbuMAX™ 40 mg/mL	Abe <i>et al.</i> , 2020b, a
0 - 4 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : Sphingomyéline 3,5 μ g/mL, acetate d' α -tocophérol 0,3 – 1 mM, vitamine C 0,1 – 3 mM, glutathion 0,3 – 1 mM, LPC 100 μ g/mL, LPA 0,55 μ g/mL	42 jours - 34°C	Spermatide ronde	α MEM, BSA fractionné à l'éthanol 40 mg/mL, acide stéarique 600 μ M, acide palmitique 600 μ M, acide oléique 600 μ M, acide linoléique 100 μ M, acide linoléique 50 μ M, cholestérol 3,2 μ g/mL, phosphatidylcholine 20 μ g/mL, sphingomyéline 3,5 μ g/mL, acide rétinolique 1 μ M, rétinol 1 M, LH 1 ng/mL, FSH 1 ng/mL, testostérone 1 μ M, Triiodothyronine 2 ng/mL, Sphingomyéline 3,5 μ g/mL, acétate d' α -tocophérol 0,3 – 1 mM, vitamine C 0,1 –	Sanjo <i>et al.</i> , 2020

Étude bibliographique – Chapitre 4 – Restauration

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
5,5 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,2%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	-	30 jours - 34°C	Spermatocyte I	3 mM, glutathion 0,3 – 1 mM, LPC 100 µg/mL, LPA 0,55 µg/mL αMEM, KSR 10%	Park <i>et al.</i> , 2020a, b
6 - 7 jpp	Frais et CLC	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Origine du tissu : Frais, CLC Origine du spermatozoïde : <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> frais, <i>in vitro</i> congelé	34 à 36 jours - 34°C	Spermatozoïde, blastocyste	αMEM, KSR 10%, rétinol 10-6 M, vitamine 3,4 mM, gentamicin 5µg/mL	Oblotte <i>et al.</i> , 2020
6 jpp	Frais	Gel d'agarose (0,35%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Phase d'attente du testicule : 4°C, 22°C, 34°C	35 jours - 34°C	Spermatide allongée	αMEM, Glutamax, KSR 10%, acide rétinolique 0,3 µg/mL	Salian <i>et al.</i> , 2020
Rat							
ND (200g rat)	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%	Milieu de culture " T8 " : NaCl 104 mM, KCl 6 mM, CaCl ₂ 2 mM, MgSO ₄ · 7H ₂ O 1 mM, NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 3 mM, NaHCO ₃ 33,5 mM, Glucose 22 mM, L-Aéginine HCl 0,1 mM, L-Cystéine HCl 0,3 mM, L-Histidine HCl 0,05 mM, L-isoleucine 0,2 mM, L-leucine 0,2 mM, L-Lysine HCl 0,2 mM, DL-Méthionine 0,05 mM, DL-Phényl-alanine 0,1 mM, DL-Thréonine 0,2 mM, L-Tryptophane 0,02 mM, L-Tyrosine 0,1 mM, L-Valine 0,2 mM, Thiamine HCl 0,05 mM, Acide P-Aminobenzoïque 0,25 mM, Insuline 0,001 mM, Chloramphénicol 0,1 mM, Rouge de phénol 0,03 mM (Eagle's modifié) Supplémentations : sérum de veau 10 ou 30%, sérum de rat adulte 10 ou 30%, 2x concentration normale en glutamine et vitamines, hydrolysats de lactalbumine 0,7%, extraits d'embryons de poulet 2%, sérum de cheval 20% Niveau gaz : 5%, 10% CO ₂ Température : 37, 35, 33 or 31°C pH : de 6,8 à 7,6	2 à 9 jours - 37°C	Figures méiotiques	Milieu T8	Trowell, 1959
14 jpp	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%		Plusieurs mois - 31°C, 5% CO ₂	Spermatocyte pachytène	Eagle's MEM, pyruvate de sodium 1,0 mM, alanine 0,1 mM, asparagine 0,1 mM, acide aspartique 0,1 mM, glycine 0,1 mM, proline 0,1 mM, sérine 0,1 mM, pénicilline 100 u/mL, streptomycine 100 u/mL, Fungizone 5 mcg/mL, sérum de veau 10% pH 7,0+/- 0,2	Steinberger <i>et al.</i> , 1964b; Steinberger et Steinberger, 1971

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
Multiple	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%	Age des rats : 0, 14, 24, 37 <i>jpp</i> et adulte	1 à 64 jours - 31°C	Dégénérescence des cellules germinales	Cf. Steinberger <i>et al.</i> , 1964b	Steinberger <i>et al.</i> , 1964c
4 <i>jpp</i>	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%	Supplémentations : hCG 20, 50, 100 IU/mL, NIH-FSH-S-1 20, 50, 100 µg/mL, vitamine C 50 µg/mL, vitamine A 1, 12, 60 UI/mL, acétate d'α-tocopherol 10, 60, 120, 600 µg/mL	64 jours - 31°C	Spermatocyte	MEM d'Eagle, pyruvate de sodium 1,0 mM, alanine 0,1 mM, asparagine 0,1 mM, acide aspartique 0,1 mM, glycine 0,1 mM, proline 0,1 mM, sérine 0,1 mM, pénicilline 100 u/mL, streptomycine 100 u/mL, amphotéricine B 5 µg/mL, sérum de veau 10%, vitamine C 50 µg/mL, vitamine A 12 UI/mL, vitamine E 120 µg/mL	Steinberger <i>et al.</i> , 1964a
12 et 60 <i>jpp</i>	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%	-	6 semaines - 31°C	Spermatocyte pachytène	cf Steinberger <i>et al.</i> , 1964a	Steinberger et Steinberger, 1965
4 <i>jpp</i>	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%	Supplémentations : vitamine A 60 u, vitamine C 50 µg, vitamine E 120 µg/mL, glutamine 2 ou 6 mM	5 semaines - 31°C	Spermatocyte pachytène	Milieu essentiel minimal d'Eagle, pyruvate 1 mM, alanine 0,1 mM, acide aspartique 0,1 mM, acide glutamique 0,1 mM, glycine 0,1 mM, proline 0,1 mM, sérine 0,1 mM, vitamine A 60 u, vitamine C 50 µg, vitamine E 120 µg/mL, glutamine 6 mM.	Steinberger et Steinberger, 1966
Nouveauté	Frais	Grille en acier inoxydable	-	1 à 4 jours - 37°C	Spermatogonie	DMEM, acides aminés non essentiels 0,1 mM, pyruvate de sodium 1,0 mM, glutamine 2 mM, pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, fungizone 2,0 µg/mL	McGuinness et Orth, 1992
9 <i>jpp</i>	Frais	Grille en acier inoxydable recouverte d'une couche d'agarose 2%	Supplémentations : O-FSH-17 200 ng/mL, O-LH-23 10 ng/mL, testostérone 0,2 µM, vitamine A 0,35 µM, vitamine C 50 µg/mL et vitamine E 200 ng/mL	32°C - 3 semaines	Spermatocyte pachytène	MEM d'Eagle avec sel d'Earle, glutamine 2 mM, Hepes 15 mM, acides aminés non essentiels, pénicilline 100 UI/mL, streptomycine 100 mg/mL et gentamicine 40 mg/mL, vitamine A 0,35 µM, vitamine C 50 µg/mL et vitamine E 200 ng/mL	Boitani <i>et al.</i> , 1993
0 à 10 <i>jpp</i>	Frais	Grille en acier inoxydable	Supplémentations : FSH 200 ng/mL, activine A 100 ng/mL, ou les deux	72h - 32°C	Spermatogonie	DMEM, FSH 200 ng/mL, activine A 100 ng/mL	Schlatt <i>et al.</i> , 1999
6 <i>jpp</i>	Frais et CLC	Insert avec membrane en	-	15 jours - 32°C	Spermatocyte I Spermatogonie	Cf. Milazzo <i>et al.</i> , 2008	Travers <i>et al.</i> , 2011

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
8 et 20 jpp	Frais	polycarbonate (taille des pores 0,45µm) Cylindre creux d'hydrogel de chitosane	-	39 jours et 61 (respectivement) - 33°C	Spermatozoïde	DMEM/F12, NaHCO3 1,2 g/L, insuline 10 µg/mL, transferrine 10 µg/mL, vitamine C 10 ⁻⁴ M, vitamine E 10 µg/mL, acide rétinolique 3,3.10 ⁻⁷ M, rétinol 3.3.10 ⁻⁷ M, pyruvate 10 ⁻³ M, testostérone 10 ⁻⁷ M (après 5 jours de culture), FSH 1 ng/mL	Perrard <i>et al.</i> , 2016
7 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : SVF 5, 10 ou 15%, KSR 5, 10 ou 15%	4 semaines - 34°C	Cellule spermatique	DMEM/F-12, KSR 10%	Liu <i>et al.</i> , 2016b
5 jpp	Frais	Gel d'agarose 0,35% (w/v) incubé MC O/N	Supplémentations : mélatonine 10 ⁻⁶ M, Glutamax®, acide rétinolique 10 ⁻⁶ M, co-culture avec tissu adipeux épидидymaire - 1 mm	52 jours - 34,5°C	Spermatide Ronde	αMEM, KSR 10%, pénicilline/streptomycine 1%	Reda <i>et al.</i> , 2016
8,5 jpp	Frais, CLC et SSV	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Milieu de culture : Milieu A (αMEM, KSR 10%, Vitamine C 0,1 µM, Vitamine E 3400 µM, Rétinol 1 µM, testostérone 0,1 µM), Milieu B (αMEM, KSR 10%, Vitamine E 3400 µM, rétinol 1 µM), Milieu C (DMEM/F12, Vitamine C 0,1 mM, Vitamine E 23,2 µM, rétinol 0,33 µM, acide rétinolique 0,33 µM, FSH 50 ng/mL, testostérone 0,1 µM, Insuline 10 µg/mL, Apo-transferrine 10 µg/mL, pyruvate 1 mM), Milieu D (milieu C + KSR 10%), Milieu E (idem Travers <i>et al.</i> , 2013), Milieu F (milieu E + KSR 10%)	45 jours - 34°C	Spermatocyte I	Milieus A et B	Saulnier <i>et al.</i> , 2020
5 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : KSR ou AlbuMAX™	63 jours - 34°C	Spermatocyte pachytène	α, AlbuMAX™	Nakamura et Sloper, 2020
3 - 9 jpp	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit, cupule de PDMS	Supplémentations : KSR 10%, AlbuMAX™ 10 à 40 mg/mL, vitamine E 1 mM, vitamine C 1 mM, glutathion 1 mM, testostérone 1 µM, triiodothyronine 2 ng/mL, LH 1 ng/mL, FSH 1 ng/mL, LPC 100 µg/mL, LysoPS 1 µM Système de culture : gel d'agarose, PDMS	11 semaines - 34°C, 5% CO ₂ , 20% O ₂ (avec PDMS)	Spermatide ronde	αMEM, AlbuMAX™ 20 mg/mL, Vitamine E 1 mM, Vitamine C 1 mM, glutathion 1mM, testostérone 1 µM, triiodothyronine 2 ng/mL, LH 1 ng/mL, FSH 1 ng/mL, LPC 100 µg/mL, LysoPS 1 µM	Matsumura <i>et al.</i> , 2021

Étude bibliographique – Chapitre 4 – Restauration

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
			Concentration en oxygène dans l'air : 10, 15, 20%				
Homme							
12-66 mois	Frais et CLC	Insert avec membrane en polycarbonate (taille des pores 3 µm)	Origine du tissu : Frais, CLC	2 semaines - 34°C	Spermatogonie	TCM (DMEM/F12, transferrine 5 µg/mL, insuline 20 µg/mL, L-glutamine 30 mg/mL, pénicilline 50 UI/mL, streptomycine 50 µg/mL)	Kvist <i>et al.</i> , 2006
2, 11 et 12 ans	CLC	Insert	Supplémentations : testostérone, hCG	139 jours - 34°C	Spermatogonie	DMEM/F12, ITS 10 µg/mL, gentamicine 10 µg/mL, L-glutamine 0,35 mg/mL, pyruvate 0,0025 M, vitamine A 10 ⁻⁶ M, vitamine C 0,05 mg/mL, HSA 10 mg/mL Jour 2: ajouter FSH 50 UI/L, propionate de testostérone 7.10 ⁻⁶ M ou hCG 1 UI/L Jour 16: testostérone x2	de Michele <i>et al.</i> , 2017, 2018a
2 – 12 ans	CLC	Insert	Milieu de culture : Milieu A (DMEM/F-12, KSR 10%, FSH 5 UI/L, Gentamicine 10 µg/mL, Ceftazidime 3 mg/L, hCG 1 UI/L, L-Glutamine 0,35 mg/mL, Rétinol 10 ⁻⁶ M, Vitamine C 0,05 mg/mL, pyruvate 0,0025 M, T3 5 pmol/L, cholestérol 20 µM/L, GDNF 10 ng/mL, prolactine 5 mg/mL), Milieu B (DMEM/F-12, KSR 10%, FSH 5 UI/L, Gentamicine 10 µg/mL, Ceftazidime 3 mg/L) Température : 34 ou 37°C Supplémentations : KOS 10%, SVF 10%, FSH et LH 5 UI/L	16, 32, 64 et 139 jours - 34°C	Spermatide	Pas de différence entre les deux milieux de culture	de Michele <i>et al.</i> , 2018b
7 - 14 ans	CLC	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : KOS 10%, SVF 10%, FSH et LH 5 UI/L	70 jours	Spermatocyte I	αMEM, KOS 10%, FSH et LH 5 UI/L	Medrano <i>et al.</i> , 2018b
6 à 14 ans	Frais et CLC	Gel d'agarose (0,35%) (w/v)	Supplémentation : FSH/LH 3 UI/L	5 semaines - 34°C	Spermatogonie	αMEM, KSR 10%, mélatonine 10 ⁻⁷ M, acide rétinolique 10 ⁻⁶ M	Portela <i>et al.</i> , 2019a
1,6 à 13,4 ans	CLC	Gel d'agarose (0,35%) (w/v)	-	14 Jours - 35°C	Cellules germinales	NutriStem, KO-SR 10%, mélatonine 10 ⁻⁷ M	Kurek <i>et al.</i> , 2021
Primate non-humain							
4 et 8 mois	Frais	Gel d'agarose 0,35% (w/v)	Milieux de culture : Milieu 1 (αMEM, KSR 10%, Mélatonine 10 ⁻⁶ M), Milieu 2 (milieu 1 + Acide rétinolique 10 ⁻⁶ M), Milieu 3 (Milieu 2 + L-Glutamine 2 mM, FSH 500 UI/L, LH 5 UI/L)	42 jours - 35°C	Spermatocyte I	Pas de différence entre les milieux de culture	Heckmann <i>et al.</i> , 2020

Age	Tissu	Méthode de culture	Paramètres de culture testées	Temps de culture - T°C*	Stade le plus avancé obtenu	Meilleur milieu de maturation	Références
Bovin							
1 - 2 semaines	Frais	Membrane avec pore de 0,45 μ m	-	2 semaines - 32°C	Spermatogonie	DMEM, SVF 10%, 30 mg/mL pénicilline, et 50 mg/mL streptomycine	Oatley <i>et al.</i> , 2004
10 à 14 semaines	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubé dans mSFM+KSR 10%, 3 à 4 jours avant culture	Température : 34 ou 37°C Milieux de cultures : DMEM/F12, Milieu sans sérum (SFM) StemPro-34® (StemPro), α MEM, SFM de souris (mSFM) et SFM de rat (rSFM). Suppléments : KSR 10% , FSH 10 ng/mL, T3 1 nM/mL, GDNF 20 ng/mL, SCF 100 ng/mL, LIF 103 unités/mL	1 et 3 mois - 37°C	Cellules spermatogéniques	mSFM, KSR 10%	Kim <i>et al.</i> , 2015
Chat							
Prépubère	Frais	Gel d'agarose (1,5%) (w/v) incubation dans MC sur la nuit	Supplémentations : KSR 10% (v/v), 17 β -oestradiol 100 nM, AlbuMAX™ II 4% (v/v)	15 à 56 jours - 35°C	Spermatogonie	α MEM, Pénicilline/streptomycine 1% (v/v), Fungizone 1% (v/v)	Silva <i>et al.</i> , 2018

Tableau 6 : Protocoles de culture organotypique du tissu testiculaire immature de mammifères.

α MEM, Minimum Essential Medium α ; AMH, Anti-müllerian hormone; bFGF, basic Fibroblast Growth Factor; BSA, Bovine Serum Albumin; CLC, Congélation Lente Contrôlée; DMEM/F12, Dulbecco's Modified Eagle, Medium/Nutrient Mixture F-12; EGF, Epidermal Growth Factor; FGF9, Fibroblast Growth Factor 9; FSH, Follicle Stimulating Hormone; GDNF, Glial Cell Derived Neurotrophic Factor; hCG, human Chorionic Gonadotropin; IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1; *jpp*, jours post-partum; KO-SR, KOS, KSR, knockout serum replacement; LH, Luteinizing Hormone; LIF, Leukemia Inhibitory Factor; LPC, lysophosphatidylcholine; LPA, lysophosphatidic acid; LysoPC, lysophosphatidylserine; MC, Milieu de Culture; MIS, Müllerian Inhibitory Substance; ND, pas d'information ; PDMS, Polydiméthylsiloxane; rEDF, ecombinant human epidermal growth factor; RPMI, Roswell Park Memorial Institute Medium; SSV, Solid Surface Vitrification ; SVF, Sérum de Veau Fœtal; TIRA, Transferrine -Insuline-Acide rétinolique

Chapitre 5. Objectifs de l'étude

La préservation de la fertilité des enfants atteints de cancer est dorénavant une priorité dans la prise en compte de la qualité de vie après le cancer. Le développement de la technique de congélation lente contrôlée, utilisée au sein des Centres d'Étude et de Conservation des Œufs et du Sperm (CECOS), permet actuellement de préserver des biopsies testiculaires de jeunes patients avant les traitements par chimio/radiothérapie. Ce même protocole est actuellement utilisé chez la souris, et a été développé sur ce même modèle au sein de notre équipe de recherche (Milazzo *et al.*, 2008). Parallèlement, la vitrification du tissu testiculaire, permettant une congélation ultra-rapide, réduisant la formation de glace intracellulaire a été validé chez la souris (Dumont *et al.*, 2015).

Afin de restaurer la fertilité de ces patients, des méthodes de maturation tissulaire ont vu le jour. Parmi celles-ci, la culture organotypique a l'avantage de conserver l'architecture du tissu, les interactions cellulaires et la niche spermatogoniale. Elle permet également dans le cas de cancers testiculaires ou de leucémies, d'éviter la réintroduction de cellules malignes chez le patient guéri. Jusqu'à présent, seule le modèle souris a permis d'obtenir une spermatogenèse complète *in vitro* après culture sur gel d'agarose. Le développement de modèles animaux est une première étape indispensable avant d'envisager une application clinique.

En effet, aucune étude menée chez l'homme ou le rat n'a permis d'obtenir des spermatozoïdes *in vitro*. La durée de la spermatogenèse chez le rat (53 jours) étant intermédiaire entre celle de la souris (35 jours) et l'homme (74 jours), ce modèle représente donc une alternative pertinente au développement des milieux et supports de culture propices à la réalisation d'une spermatogenèse *in vitro*. Afin de se rapprocher des conditions de conservation du tissu humain, il est dans un premier temps primordial de s'assurer de la reproductibilité du protocole de congélation utilisé chez le garçon prépubère dans le modèle rat.

Les origines des blocages de la spermatogenèse observés en culture peuvent être multiples : absence de composés indispensables au bon fonctionnement du tissu, absence de maturation des cellules somatiques nécessaire au développement des cellules germinales, dérégulation hormonale et de l'homéostasie testiculaire ... Certaines études ont montré une progression de la spermatogenèse en utilisant d'autres supports de culture. Il est donc

indispensable de tester ces différents milieux en culture sur gel d'agarose et d'étudier la différenciation des cellules germinales au cours de la culture.

La spermatogenèse étant un processus complexe faisant intervenir de nombreux acteurs, il est également important d'étudier au niveau moléculaire les tissus maturés *in vitro* et de comparer les données obtenues aux contrôles *in vivo*. L'utilisation des technologies « omiques », notamment RNA-Seq, permet l'analyse moléculaire des tissus maturés *in vitro* et *in vivo* à l'échelle du génome. L'approche RNA-Seq permettrait de mettre en évidence les gènes différentiellement exprimés entre les conditions *in vitro* et *in vivo*, pouvant être à l'origine d'arrêts de la spermatogenèse.

Les principaux objectifs de mes travaux de thèse ont été :

- D'évaluer l'impact des procédures de congélation sur l'intégrité et la fonctionnalité du tissu testiculaire prépubère de rat,
- D'analyser la progression de la spermatogenèse *in vitro* via la réalisation d'une cinétique, associée à l'évaluation de milieux de culture de compositions différentes,
- De rechercher l'origine du blocage de la spermatogenèse par une analyse histologique et cytologique des cellules germinales ainsi qu'une analyse transcriptomique globale des tissus maturés *in vitro*,
- De réaliser des tentatives de suppléments des milieux de culture organotypique

Travaux personnels

Publications en tant que 1^{ère} auteure

Publication 1

Improving freezing protocols and organotypic culture: A histological study on rat prepubertal testicular tissue

Saulnier J., Oblette A., Delessard M., Dumont L., Rives N. and Rondanino C.

Ann Biomed Eng. 2021 Jan;49(1):203-218.

Doi: 10.1007/s10439-020-02535-8.

Publication 2

Understanding the underlying mechanisms of meiotic arrest in organotypic culture of rat testicular tissue: a transcriptomic approach

Saulnier J., Chalmel F., Moutard L., Delessard M., Ziegler F., Dumont L., Rives-Feraille A., Rondanino C. and Rives N.

En préparation

Publication 1

Improving freezing protocols and organotypic culture: A histological study on rat prepubertal testicular tissue

Saulnier J., Oblette A., Delessard M., Dumont L., Rives N.
and Rondanino C.

Ann Biomed Eng. 2021 Jan;49(1):203-218.

Doi: 10.1007/s10439-020-02535-8.

La culture organotypique à interface gaz-liquide est une technique de plus en plus utilisée ces dernières années afin d'obtenir une spermatogenèse complète *in vitro* à partir de tissus testiculaires prépubères. Cependant, la réussite observée dans le modèle souris ne semble pas reproductible dans d'autres espèces. Il est par ailleurs important de s'assurer qu'une spermatogenèse peut être maintenue *in vitro* et achevée au-delà de 30 jours (durée de la culture organotypique chez la souris). Dans le cadre de la préservation et de la restauration de la fertilité d'enfants traités pour le cancer, il est primordial de développer des approches permettant la formation de cellules haploïdes matures à partir de tissus testiculaires prépubères préalablement congelés.

Chez le rat et l'homme, un arrêt de maturation précoce est observé lors de la culture organotypique (Reda *et al.*, 2016; de Michele *et al.*, 2017). Le rat ayant une durée de la spermatogenèse intermédiaire entre celle de l'homme et la souris (53 jours vs 74 et 35 jours, respectivement), il représente un modèle adéquat pour comprendre le blocage méiotique observé chez ces deux espèces. Plusieurs modifications du protocole de culture organotypique ont été évaluées lors des essais menés chez le rat (Reda *et al.*, 2016). Afin d'identifier les paramètres optimaux, permettant un maintien des cellules germinales sur le long terme, des cultures de tissus provenant de rats prépubères âgés de 5 ou 8 jpp, réalisées sur gels d'agarose à 0,35 ou 1,5%, dans des milieux de culture supplémentés en antibiotique(s) (gentamicine ou pénicilline/streptomycine) ont été réalisées. Pour évaluer l'impact de ces paramètres sur la maturation du tissu testiculaire, le pourcentage de tubes séminifères au stade le plus avancé a été quantifié sur coupes histologiques.

Les protocoles utilisés afin de préserver la fertilité des enfants traités pour un cancer au sein de l'équipe hospitalière liée au laboratoire, ont été préalablement testés chez la souris afin d'obtenir un minimum d'altérations, pouvant impacter la fonctionnalité du tissu après décongélation (Milazzo *et al.*, 2008). Une évaluation de l'impact des procédures de congélation (congélation lente contrôlée et vitrification) sur le tissu testiculaire prépubère de rat a été réalisée directement après décongélation ou après 20h de culture. Pour cela, les altérations tissulaires ont été évaluées avec un score lésionnel. Des analyses par immunofluorescence permettant de mettre en évidence la prolifération cellulaire (Ki67, *marker of proliferation Ki-67*), l'apoptose (Caspase 3 clivée) et la technique TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP nick-end labeling*) permettant de détecter la fragmentation de l'ADN, ont été réalisées. Les procédures de congélation pouvant entraîner la production

d'ERO, l'ajout de vitamine E à 3,4 mM lors des procédures de congélation/décongélation a parallèlement été testé.

La spermatogenèse durant 53 jours chez le rat, nous avons par la suite testé 6 différents milieux de culture, précédemment publiés dans d'autres modèles de culture ou espèces (Travers *et al.*, 2013; Perrard *et al.*, 2016; Oblette *et al.*, 2017). Une cinétique permettant d'évaluer les temps d'apparition des divers types cellulaires lors de la première vague de la spermatogenèse (16, 28, 36 et 45 jours de culture) a été réalisée dans les cultures de tissus frais, congelés lents ou vitrifiés.

Les principaux résultats obtenus par ce travail ont permis de déterminer les conditions de culture les plus adaptées – 8 jpp et agarose à 1,5% – aux tissus de rats, et de montrer un effet mineur des procédures de congélation. Suite aux tentatives de culture, aucune cellule post-méiotique n'a été observée, quelle que soit la méthode de congélation utilisée et quel que soit le milieu de culture testé. Ce travail met néanmoins en évidence un impact différent des différents milieux sur la différenciation des cellules germinales, données pouvant être utilisées par la suite dans des protocoles de cultures séquentielles.

Ces travaux ont été présentés sous forme de communications orale et affichée lors du congrès ReproSciences (Toulouse, 2019) et sous forme de communication orale lors de l'Assemblée générale des Biologistes des Laboratoires d'Étude de la Fécondation et de la Conservation de l'Œuf (BLEFCO, Paris, 2019). Ils ont aussi été présentés sous forme de communication affichée lors du Congrès de la Fédération Française d'étude de la Reproduction (FFER, Lyon, 2018), lors de la Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB, Rouen, 2018), à la Société d'Andrologie de Langue Française (SALF, Paris, 2019), et lors de la Journée de l'École Doctorale Normande 497 (JED, Caen, 2019).



Original Article

Improving Freezing Protocols and Organotypic Culture: A Histological Study on Rat Prepubertal Testicular Tissue

JUSTINE SAULNIER , ANTOINE OBLETTE , MARION DELESSARD ,
 LUDOVIC DUMONT , AURÉLIE RIVES , NATHALIE RIVES ,
 and CHRISTINE RONDANINO

Department of Reproductive Biology–CECOS, Rouen University Hospital, EA 4308 “Gametogenesis and Gamete Quality”,
 UNIROUEN, Normandie Univ, 22 Boulevard Gambetta, 76000 Rouen, France

(Received 22 January 2020; accepted 13 May 2020)

Associate Editor Emmanuel Opara oversaw the review of this article.

Abstract—Testicular tissue freezing before gonadotoxic treatments allows the preservation of fertility for children suffering from cancer. Recently, the testis organ culture method was presented as a relevant method to restore the fertility of these patients. However, the yield of spermatozoa production is low in the mouse model and no gamete has been obtained *in vitro* in the rat model. Here, we assess different cryopreservation protocols and culture conditions to improve the efficiency of *in vitro* maturation of rat prepubertal testes. Testes from male rats aged 5 or 8 days *post-partum* were cultured onto agarose gels of different percentages. After determining the best culture conditions, different cryopreservation protocols were assessed. Finally, testicular tissues were cultured with media of various compositions and analyzed at different time points. Our results show that the cryopreservation protocols allow the preservation of tissue architecture, cell proliferation, with no or moderate increase of cell death. *In vitro* spermatogenesis did not proceed beyond the pachytene spermatocyte stage. Only 2 of the 6 tested media allowed the survival of differentiated germ cells over the 45-day culture period. In conclusion, this study highlights the necessity to further improve the organ culture method before applying it into the clinics.

Keywords—Testis, Cryopreservation, Freezing procedure, *In vitro* spermatogenesis, Germ cells, Fertility restoration.

CSF Controlled slow freezing
 Dpp Days *post-partum*
 Dx Day *x* of culture
 FT Fresh tissues

INTRODUCTION

Long-term survival rates of children with cancer have greatly improved thanks to progress in diagnosis and therapeutics. However, cancer treatment can have gonadotoxic effects, by targeting and depleting the spermatogonia present in prepubertal testes.³⁰ Cryopreservation of testicular tissue or cell suspension is therefore proposed to young patients before the beginning of treatment in order to preserve their future fertility.³⁵ We previously described an optimized controlled slow freezing (CSF) protocol for the cryopreservation of mouse²² and rat³² prepubertal testicular tissues, as well as an optimized solid surface vitrification (SSV) procedure for prepubertal mouse testes.¹¹ The *in vitro* maturation of cryopreserved prepubertal testicular tissues is one of the potential fertility restoration approaches that could be used to produce spermatozoa, especially in cases where testicular tissue grafting or cell transplantation cannot be envisaged (e.g. contamination of testicular tissues by cancer cells). *In vitro* maturation strategies are currently developed in animal models.³³ Three-dimensional (3D) culture systems have been used to produce spermatozoa from mouse prepubertal testicular cells⁷ and post-

ABBREVIATIONS

SSV Solid surface vitrification

Address correspondence to Christine Rondanino, Department of Reproductive Biology–CECOS, Rouen University Hospital, EA 4308 “Gametogenesis and Gamete Quality”, UNIROUEN, Normandie Univ, 22 Boulevard Gambetta, 76000 Rouen, France. Electronic mail: christine.rondanino@univ-rouen.fr

Saulnier *et al.*

meiotic cells from rhesus monkey prepubertal testicular cells.¹³ Organotypic culture, which consists in culturing testicular tissue fragments rather than dissociated cells offers the advantage of preserving the natural microenvironment surrounding spermatogonia. Mouse spermatozoa have been successfully produced from fresh, slow frozen and vitrified prepubertal testes using the organotypic culture system at a gas–liquid interphase.^{4,11,34} A better spermatogenic yield was obtained in cultures of mouse SSV tissues than in CSF tissues.¹¹ Culture media containing different supplements have been tested and have been shown to improve the efficiency of *in vitro* spermatogenesis.^{4,12,29} Recently, a promotion of mouse spermatogenesis until the round spermatid stage was obtained with a medium containing retinol, retinoic acid, as well as a combination of four hormones known to promote germ cell proliferation and differentiation (FSH, LH, testosterone, triiodothyronine).²⁸

The rat model, whose duration of spermatogenesis (53 days) is intermediate between mouse (35 days) and human (74 days), is a relevant model for the optimization of a long-term *in vitro* maturation system. So far, a complete *in vitro* spermatogenesis has not been achieved in cultures of rat testes.^{27,32} Post-meiotic germ cells have been produced in 3D cultures of 18 days-old rat testicular cells, but spermatocytes were already present in the tissue at the beginning of the cultures.¹⁷ *In vitro* differentiation of rat spermatogonia into round spermatids has been obtained in fresh testicular tissues using the organotypic culture system, albeit with a very low efficiency.²⁷ Spermatozoa-like cells have been observed with this culture system starting from 7 days *post-partum* (dpp) rat testes¹⁸ or after culture of seminiferous tubules retrieved from 8 dpp-old rats in chitosan bioreactors.²⁵ These results need however to be confirmed using specific germ cell markers.

The aim of the present study was to assess the impact of cryopreservation (CSF and SSV) protocols on rat prepubertal testicular tissues before *in vitro* maturation and to determine the best culture conditions for the differentiation of spermatogonia with the gas–liquid interphase method.

MATERIALS AND METHODS

For more detailed information and the origins of all reagents, please see “supplementary Materials and methods”.

Experimental Design

In order to determine the best culture conditions, a preliminary study was performed: 5.5 or 8.5 dpp rat

testes, which contain respectively gonocytes and spermatogonia or only spermatogonia, were cultured on 0.35 or 1.5% agarose gels in basal medium with 1% penicillin/streptomycin or 0.01% gentamicin for either 52 days or 49 days (Fig. 1a). These different culture conditions have been previously used for the *in vitro* maturation of prepubertal rodent testes at a gas–liquid interphase.^{5,27,32} We compared them by analyzing the progression of spermatogenesis.

In a clinical context, cryopreserved prepubertal testicular tissues could be used for *in vitro* maturation to restore fertility. The impact of cryopreservation procedures (CSF/thawing or SSV/warming) on 8.5 dpp rat testicular tissues was assessed before long-term culture. Vitamin E, which has anti-oxidant properties, was added or not during the freezing and the thawing/warming steps (Fig. 1b). Alterations of the tissue architecture, intratubular cell proliferation, DNA fragmentation and apoptosis were assessed in CSF, CSF + VitE, SSV and SSV + VitE tissues either immediately after thawing/warming or after a 20 h-culture period, as well as in fresh control tissues.

Thereafter, different media (previously used for the culture of mouse tissues on polycarbonate inserts, the culture of rat seminiferous tubules in chitosan bioreactors, the culture of mouse tissues onto agarose gels^{23,25,31} or slightly modified) were tested (Fig. 1c). Fresh tissues (FTs) were first cultured until D16, D28, D36 and D45. Then, cryopreserved testicular tissues (without vitamin E) were cultured until the same time points with the two best selected media (media A and B).

Rat Testicular Tissue Collection and Ethical Approval

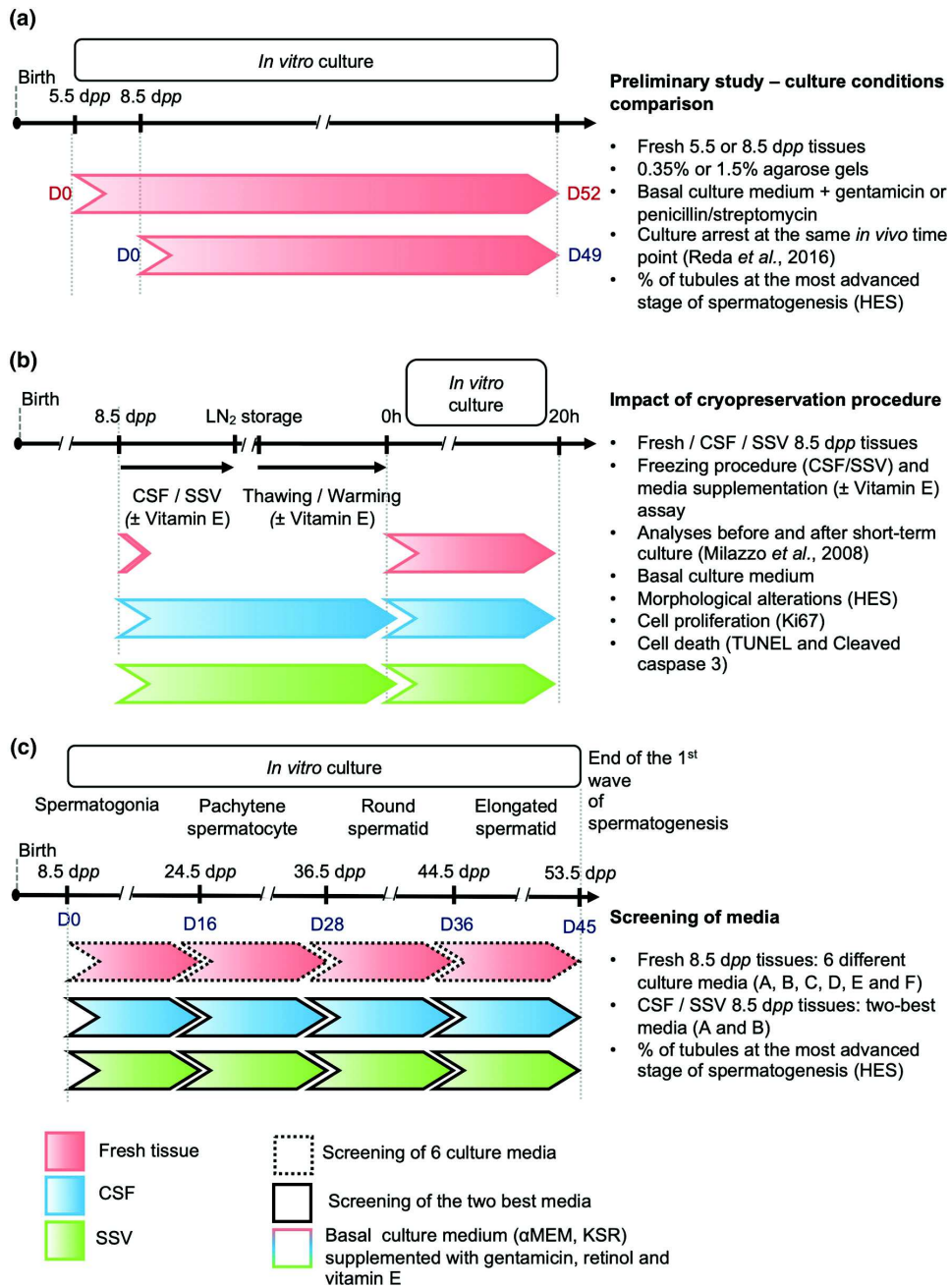
All the experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Rouen University under the Licence/Protocol Number N/22-11-12/45/11-15.

Testicular tissues from 5.5 or 8.5 dpp Wistar male rats were biopsied and cultured either directly (culture of FT) or after cryopreservation (culture of CSF or SSV tissues). Moreover, testes from rats aged 8.5, 24.5, 36.5, 44.5 and 53.5 dpp were used as *in vivo* controls.

Organotypic Cultures

Testicular tissue culture was performed as previously described.^{5,27,29} Testicular tissue fragments were cultured on 0.35% (w/v) or 1.5% (w/v) agarose gels. Different culture media (Table 1) were tested. For each culture time point and each experimental condition tested, organotypic cultures were repeated six times (from different testes). Six different testes were used for each *in vivo* control.

Freezing Protocols and Testicular Culture Assessment



Saulnier *et al.*

◀ **FIGURE 1.** Flow chart of the study design. (a) Fresh testicular samples from 5.5 or 8.5 dpp rats were cultured until D52 or D49 respectively, onto 1.5 or 0.35% (w/v) agarose gels, with basal culture medium [α -MEM + 10% (v/v) KSR] containing either 1% (v/v) penicillin/streptomycin or 0.01% (v/v) gentamicin. (b) After selection of the best condition, the impact of CSF and SSV on the testicular tissues was assessed either immediately after thawing/warming or after a 20-h culture period. (c) FT were cultured until D16, D28, D36 and D45 with six different media and the progression of spermatogenesis was examined and compared to age-matched *in vivo* controls. CSF and SSV tissues were cultured until the same time points with the two best media and analyzed. CSF controlled slow freezing, D day, dpp days post-partum, HES hemalun–eosin–safron, KSR knockout serum replacement, LN₂ liquid nitrogen, α -MEM minimum essential medium α , SSV solid surface vitrification, TUNEL terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling.

Histological and Immunohistochemical Analyses

Testicular tissues and cultured explants were fixed for 2 or 24 h in Bouin’s solution or in paraformaldehyde. Embedding, sectioning, deparaffinization and rehydration of the tissue samples were performed as previously published.²⁴

Hemalun–eosin–safron (HES) staining and periodic acid-Schiff reaction (PAS) were used to analyze the tissue architecture and the progression of spermatogenesis, as previously described.²² Briefly, a global lesional score (0–10) was given for each testicular explant (0–5 for epithelium integrity and 0–5 for nuclear alterations, with 0 representing the complete absence of alteration and 5 representing the most important damages). The identification of the different type of germ cells was based on the morphological aspect of their nucleus and their localization in the seminiferous tubules.¹⁶ Analyzes were conducted with

a light microscope (DM4000B, Leica Microsystem GmbH) equipped with Leica Application Suite software. For each replicate, 25–30 seminiferous tubules were counted.

Ki67 and cleaved Caspase 3 immunostainings were conducted to assess intratubular cell proliferation and apoptosis, respectively. After incubation with antibodies and counterstaining with DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole), sections were analyzed at a \times 900 magnification with a BX61 epifluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan). For all the analyzes, 25–30 tubular cross-sections per fragment were counted. The percentage of positive cells was obtained from the total number of cells counted in positive tubules.

Freezing and Thawing of Testicular Tissues

Testes were frozen/thawed by CSF in the presence of cryoprotectants, using a previously described protocol.³² Otherwise, testes were cut into 6 fragments (approximately 5 mg each), incubated with cryoprotectants and preserved by SSV, as previously described.¹¹ Frozen samples were then stored into liquid nitrogen. To evaluate the effect of an anti-oxidant in the freezing media, (\pm)- α -tocopherol (vitamin E) at 3.4 mM was added or not in each bath.

TUNEL Assays

Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) assays were performed using the *In Situ* Cell Death kit POD following the manufacturer’s instructions. After counterstaining with DAPI, cell DNA fragmentation was analyzed at a

TABLE 1. Composition of the culture media used for *in vitro* maturation of prepubertal rat testicular tissues.

	A	B	C	D	E	F
References	Oblotte <i>et al.</i> (2017)		Perrard <i>et al.</i> (2017)		Travers <i>et al.</i> (2013)	
Medium	α -MEM	α -MEM	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
KSR	10% (v/v)	10% (v/v)	–	10% (v/v)	–	10% (v/v)
Vitamin C	0.1 μ M	–	0.1 mM	0.1 mM	0.1 μ M	0.1 μ M
Vitamin E (μ M)	3400	3400	23.2	23.2	23.2	23.2
Retinol (μ M)	1	1	0.33	0.33	1	1
Retinoic acid (μ M)	–	–	0.33	0.33	0.33	0.33
FSH (ng/mL)	–	–	50	50	7.33	7.33
hCG (ng/mL)	–	–	–	–	1.1	1.1
Testosterone (μ M)	0.1	–	0.1	0.1	–	–
Insulin (μ g/mL)	–	–	10	10	10	10
Apo-transferrin (μ g/mL)	–	–	10	10	10	10
Pyruvic acid (mM)	–	–	1	1	1	1
Antibiotic	Gentamicin	Gentamicin	Gentamicin + P/S	Gentamicin + P/S	Gentamicin + P/S	Gentamicin + P/S

Testes from 8.5 dpp rats were cultured until D16, D28, D36 and D45 with different culture media.

DMEM/F12 Dulbecco’s modified Eagle’s medium/nutrient mixture F12, dpp days post-partum, FSH follicle stimulating hormone, hCG human chorionic gonadotropin, KSR knockout serum replacement, α -MEM minimum essential medium α , P/S penicillin/streptomycin.

Freezing Protocols and Testicular Culture Assessment

× 900 magnification with a BX61 epifluorescence microscope. For analyzes, 30 tubular cross-sections per fragment were counted. The percentage of positive cells was obtained from the total number of cells counted in positive tubules.

Statistical Analyzes

Statistical analyzes were carried out with the GraphPad Prism v6.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Data are expressed as mean ± s.e.m. Non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple comparison test were performed to assess differences in the preliminary study. The results obtained with the different freezing procedures and culture media were compared with the non-parametric Mann–Whitney test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Comparison of Different Culture Conditions of Rat Prepubertal Testes

We first compared different culture conditions previously used for the *in vitro* maturation of prepubertal rodent testes at a gas–liquid interphase^{5,27,32} (Fig. 2a; Table 2). The initiation of meiosis occurred in all the cultured tissues but did not proceed beyond the pachytene spermatocyte stage (Figs. 2b and 2c). A significantly higher proportion of tubules with meiotic cells was observed when tissues were cultured under the D49 1.5% P/S condition compared to the D52 0.35% G ($p = 0.023$) and D52 0.35% P/S ($p = 0.0068$) (Fig. 2c). More pachytene spermatocytes were found in 8.5 dpp tissues cultured with the D49 1.5% P/S condition than in 5.5 dpp tissues cultured with the D52 0.35% P/S condition ($p = 0.0087$).

Considering the data obtained, 8.5 dpp testicular tissues were therefore cultured on 1.5% agarose gels for the rest of the study.

Impact of Cryopreservation Procedures on Rat Prepubertal Testicular Tissues

Impact of the Cryopreservation Protocols

The structural integrity of prepubertal testicular tissues was poorly affected by the cryopreservation processes. Indeed, even though the global morphological alteration scores were significantly higher in CSF ($p = 0.0043$) and CSF + VitE tissues ($p = 0.0065$) than in FT, these scores remain low (below 1 on a scale from 0 to 10) and reflect the preservation of the tissue architecture (Figs. 3a and

3c). Higher lesional scores were also found for SSV ($p = 0.0022$) and SSV + VitE tissues ($p = 0.0022$) compared to controls (Fig. 3c). After a 20-h culture period, the global morphological alteration scores remain higher for CSF ($p = 0.048$), CSF + VitE ($p = 0.0087$) and SSV tissues ($p = 0.026$) compared to FT but are still within an acceptable range (lower than 0.9) (Fig. 3c). In contrast, similar lesional scores were found after 20 h between fresh and SSV + VitE tissues (Fig. 3c). Finally, few differences were found between the two cryopreservation protocols. More nuclear alterations were found in the SSV + VitE than CSF + VitE tissues ($p = 0.0022$). After a 20-h culture period, the epithelial alteration score was slightly increased in CSF + VitE compared to SSV + VitE tissues ($p = 0.013$) (Fig. 3c).

The proportion of tubules with proliferating cells and the percentage of Ki67 positive cells were similar between fresh and cryopreserved tissues (Figs. 3b and 3d). After 20 h, a similar proportion of tubules with proliferating cells was found in fresh, CSF, CSF + VitE and SSV tissues (Fig. 3d). However, the proportion of tubules with proliferating cells was decreased in SSV + VitE tissues compared to controls ($p = 0.0087$) (Fig. 3d). Less proliferating cells were found after 20 h in Ki67-positive tubules in CSF ($p = 0.0022$), CSF + VitE ($p = 0.0022$), SSV ($p = 0.0022$) and SSV + VitE tissues ($p = 0.0022$) in comparison with fresh controls (Fig. 3d). When comparing the two cryopreservation procedures, a higher proportion of proliferating tubules was found in SSV than in CSF tissues ($p = 0.015$) immediately after thawing/warming, while the percentage of proliferating cells was higher in SSV than in CSF tissues ($p = 0.015$) after 20 h of culture (Fig. 3d).

The percentage of tubules containing cells with fragmented DNA was increased only in CSF tissues compared to FT ($p = 0.043$) (Figs. 4a and 4c). After a 20-h culture period, more TUNEL-positive tubules were detected in CSF ($p = 0.0022$), CSF + VitE ($p = 0.0022$), SSV ($p = 0.013$) and SSV + VitE tissues ($p = 0.0022$) than in controls (Fig. 4c). The percentage of cells with DNA fragmentation per tubule remained however unchanged between fresh and cryopreserved tissues (Fig. 4c). More tubules with DNA damages were observed after CSF than SSV after a 20-h culture period ($p = 0.015$) (Fig. 4c).

The proportions of tubules with apoptotic cells and of apoptotic cells per tubule were not significantly increased after the cryopreservation procedures (Figs. 4b and 4d). After 20 h, the percentage of cleaved caspase 3-positive tubules was only increased in CSF + VitE tissues compared to FT ($p = 0.026$) (Fig. 4d).

Freezing Protocols and Testicular Culture Assessment

◀ **FIGURE 2.** Comparison of different culture conditions of prepubertal rat testes. (a) Representative images of HES-stained fresh testicular tissues from 5.5 to 8.5 dpp rats. Seminiferous tubules contain Sertoli cells (green arrowhead). Gonocytes (black arrowhead) are present at 5.5 dpp, while spermatogonia (red arrowhead) are the only germ cells present at 8.5 dpp. Magnification $\times 500$; Scale bar 50 μm . (b) Fresh testicular tissues from 5.5 or 8.5 dpp rats were cultured for 52 days (A_{1,2,5,6}) or 49 days (A_{3,4,7,8}) on 0.35 or 1.5% (w/v) agarose gels with basal medium containing antibiotics [1% (v/v) penicillin/streptomycin or 0.01% (v/v) gentamicin]. Representative images of the peripheral area of the cultured explants stained with the PAS reaction. Magnifications $\times 200$ and $\times 500$ (left and right panels, respectively); scale bars 50 μm . (c) Percentage of seminiferous tubules at the most advanced stage of spermatogenesis or devoid of germ cells under different culture conditions. The column “Sertoli cell” shows the percentage of Sertoli cell-only tubules in testicular explants. Columns “LZ spermatocytes” and “Pachytene spermatocyte” were compiled onto “Meiotic cells” to compare the proportion of tubules containing at least one meiotic germ cell, independently of the stage of meiosis. Values are expressed as mean \pm s.e.m. Different superscript letters indicate significant differences among the groups ($p < 0.05$). A common letter or no letter indicates no significant difference. D day, dpp days post-partum, G gentamicin, LZ leptotene/zygotene, P/S penicillin/streptomycin.

Impact of Cryopreservation with Vitamin E

No impact of the addition of vitamin E on the structural integrity of frozen/thawed and vitrified/warmed tissues was noticed (Figs. 3a and 3c). In CSF samples, cell proliferation, DNA fragmentation and apoptosis were not affected by vitamin E either (Figs. 3b, 3d, and 4). The percentages of Ki67-positive tubules ($p = 0.015$) and of Ki67-positive cells ($p = 0.0043$) were decreased after using the SSV + VitE rather than the SSV protocol (Fig. 3d). The same observation was made after the 20-h culture ($p = 0.030$ and 0.0022 , respectively) (Fig. 3d). The percentage of TUNEL-positive tubules was also higher in SSV + VitE tissues than in SSV tissues after 20 h ($p = 0.0022$) (Fig. 4c). Moreover, the proportions of

tubules with apoptotic cells ($p = 0.026$) and of apoptotic cells per tubule ($p = 0.043$) were increased in SSV + VitE tissues compared to SSV tissues after 20 h (Fig. 4d).

Influence of Media Composition on the Progression of In Vitro Spermatogenesis in Cultures of Fresh Tissues

At D16 and at 24.5 dpp (age-matched *in vivo* controls), leptotene/zygotene and pachytene spermatocytes were the most differentiated types of germ cells whatever the culture medium used (Figs. 5; S1; Table 3). The proportion of tubules containing leptotene/zygotene spermatocytes was similar in 24.5 dpp testes and in tissues cultured for 16 days with media A, B and F, and lower with media C ($p = 0.48$), D ($p = 0.024$) and E ($p = 0.0065$) than with medium A (Table 3). The proportion of tubules with pachytene spermatocytes was significantly lower after *in vitro* maturation than in the physiological conditions (Table 3). The lowest percentage of tubules with pachytene spermatocytes was obtained after a 16-day culture with medium B in comparison with media A ($p = 0.028$), D ($p = 0.0022$), E ($p = 0.041$) and F ($p = 0.030$) (Table 3). At 36.5 dpp but not at D28, round and elongated spermatids were observed in the testes (Table 3). More tubules contained leptotene/zygotene spermatocytes when cultures were performed with medium A than with media C ($p = 0.041$), D ($p = 0.015$) and E ($p = 0.015$) and compared to 36.5 dpp controls ($p = 0.041$) (Table 3). Moreover, the higher percentage of tubules with pachytene spermatocytes was obtained when testicular tissues were cultured with medium A than with media B ($p = 0.0087$), C ($p = 0.0022$), D ($p = 0.0022$) and E ($p = 0.0022$) (Table 3). At 44.5 dpp, the majority of seminiferous tubules contained elongated spermatids, whereas no haploid germ cells were found in *in vitro* matured testicular tissues at D36 (Table 3). In addition, no or very

TABLE 2. Description of the different culture conditions tested on prepubertal rat testes.

Protocol designation	Testis (dpp)	Agarose (%) (w/v)	Antibiotic (v/v)	Basal medium
D52 0.35% G	5.5	0.35	Gentamicin 0.01%	α -MEM KSR 10% (v/v)
D52 0.35% P/S			Penicillin/streptomycin 1%	
D52 1.5% G			Gentamicin 0.01%	
D52 1.5% P/S	8.5	1.5	Penicillin/streptomycin 1%	
D49 0.35% G			Gentamicin 0.01%	
D49 0.35% P/S			Penicillin/streptomycin 1%	
D49 1.5% G			Gentamicin 0.01%	
D49 1.5% P/S			Penicillin/streptomycin 1%	

Testes from 5.5 or 8.5 dpp rats were used and cultured on 0.35 or 1.5% (w/v) agarose gels in basal medium [α -MEM + 10% (v/v) KSR] containing antibiotics [1% (v/v) penicillin/streptomycin or 0.01% (v/v) gentamicin]. Testes were cultured for 52 and 49 days, respectively. D day, dpp days post-partum, G gentamicin, KSR knockout serum replacement, α -MEM minimum essential medium α , P/S penicillin/streptomycin.

Saulnier *et al.*

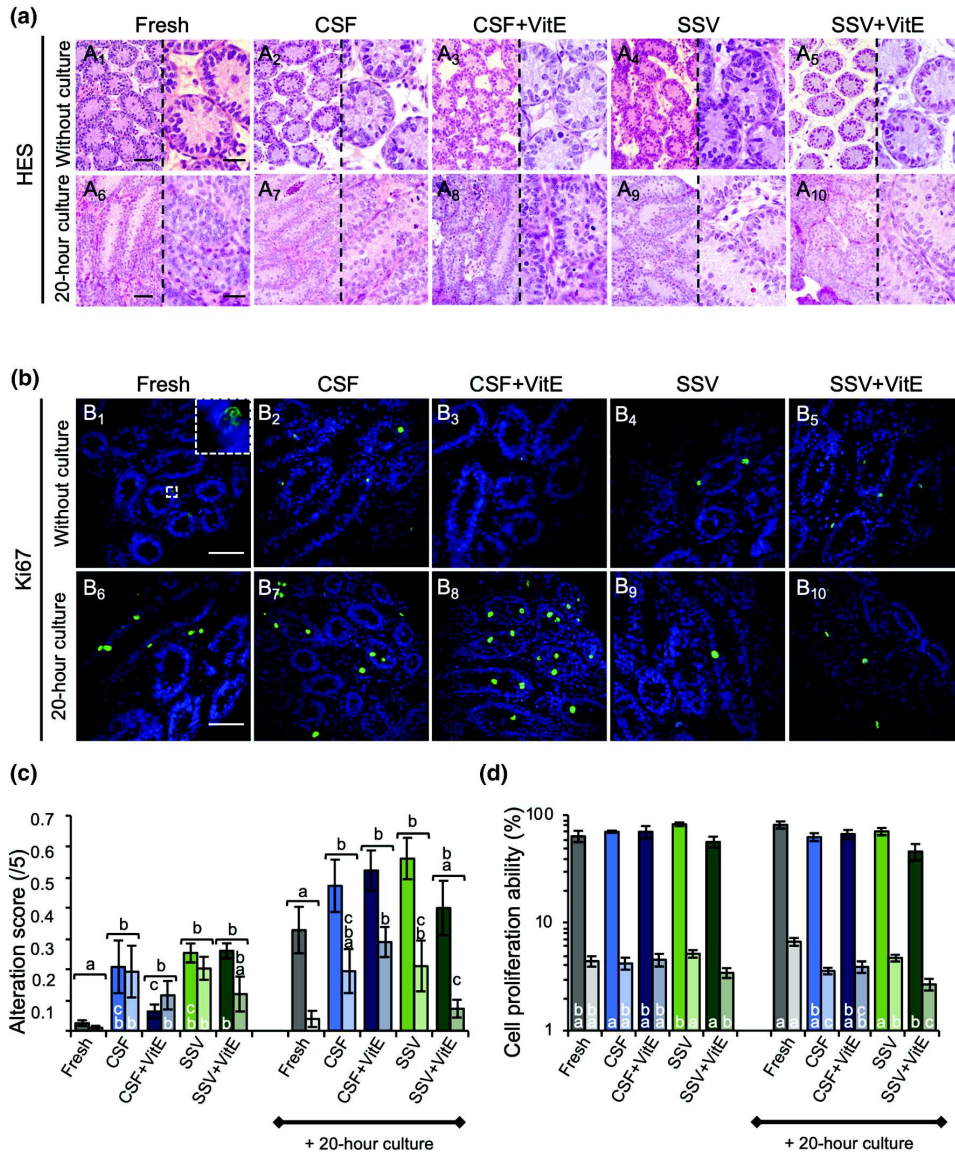


FIGURE 3. Lesional scores and cell proliferation in prepubertal rat testes following thawing/warming. (a, b) Representative images of (a) HES staining and (b) Ki67 immunofluorescence. Fresh testicular tissues from 8.5 *dpp* rats were analyzed either immediately (Fresh: A₁, B₁) or after a 20-h culture period (Fresh 20 h: A₆, B₆). Testicular tissues from 8.5 *dpp* rats frozen in the presence or absence of vitamin E were analyzed either immediately after thawing/warming (CSF: A₂, B₂; CSF + VitE: A₃, B₃; SSV: A₄, B₄; SSV + VitE: A₅, B₅) or 20 h after thawing (CSF 20 h: A₇, B₇; CSF + VitE 20 h: A₈, B₈) or warming (SSV 20 h: A₉, B₉; SSV + VitE 20 h: A₁₀, B₁₀). An enlarged view of a Ki67-positive cell is shown on the upper right corner of panel B₁. Magnifications $\times 200$ and $\times 500$ (HES, left and right panels, respectively) or $\times 960$ (Ki67); scale bars 50 μm . (c, d) Histograms representing (c) nuclear alteration scores (0–5, dark colour) and epithelial alteration scores (0–5, light colour) and (d) intratubular cell proliferation: the percentage of Ki67-positive tubules (dark colour) and the percentage of Ki67-positive cells (light colour) are represented for each condition. Grey, blue and green columns represent fresh, CSF and SSV testicular fragments, respectively. Data are expressed as mean \pm s.e.m. with $n = 6$ fragments. Different superscript letters indicate significant differences among the groups ($p < 0.05$). A common letter or no letter indicates no significant difference. Significant differences between global morphological alteration scores (0–10) are represented above brackets in panel c. CSF controlled slow freezing, *dpp* days *post-partum*, HES hemalun–eosin–safran, SSV solid surface vitrification, VitE vitamin E.

Freezing Protocols and Testicular Culture Assessment

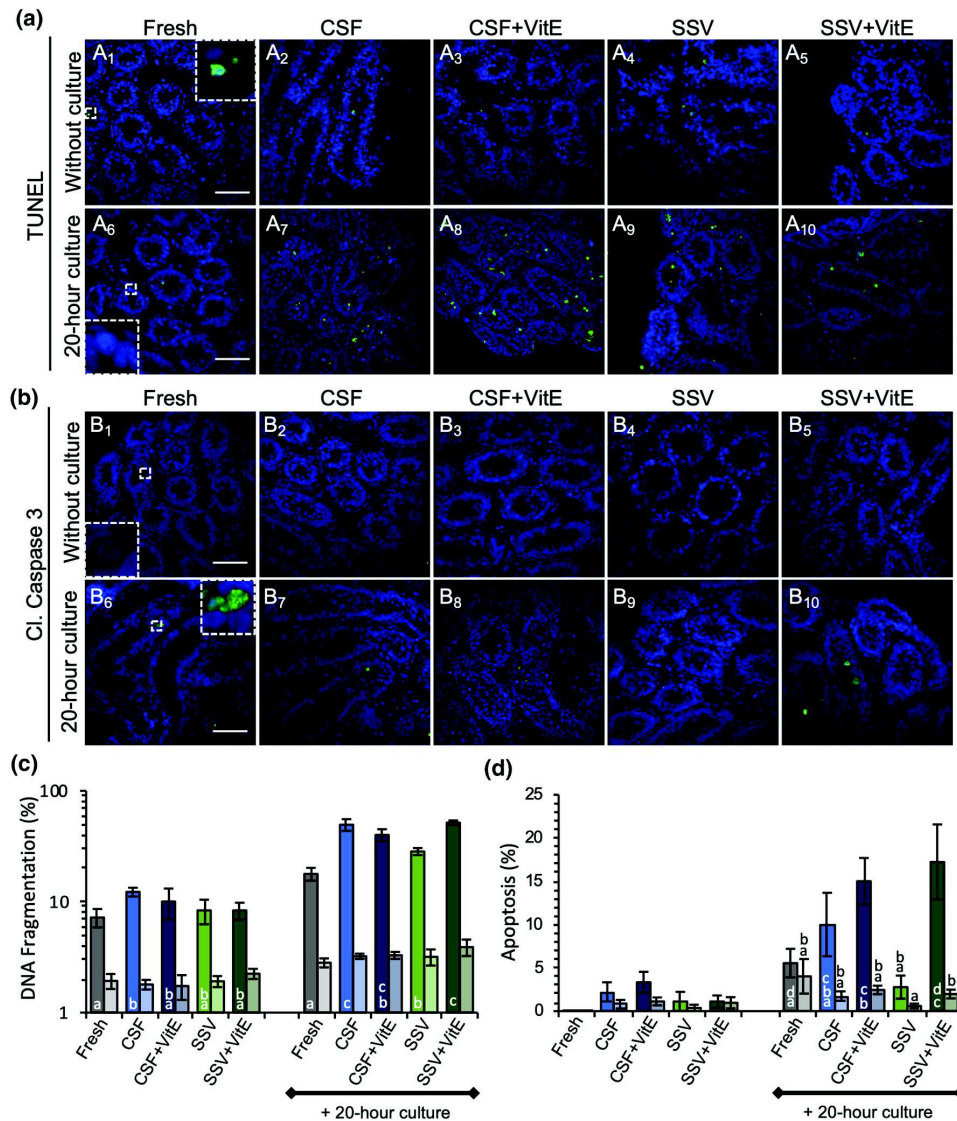
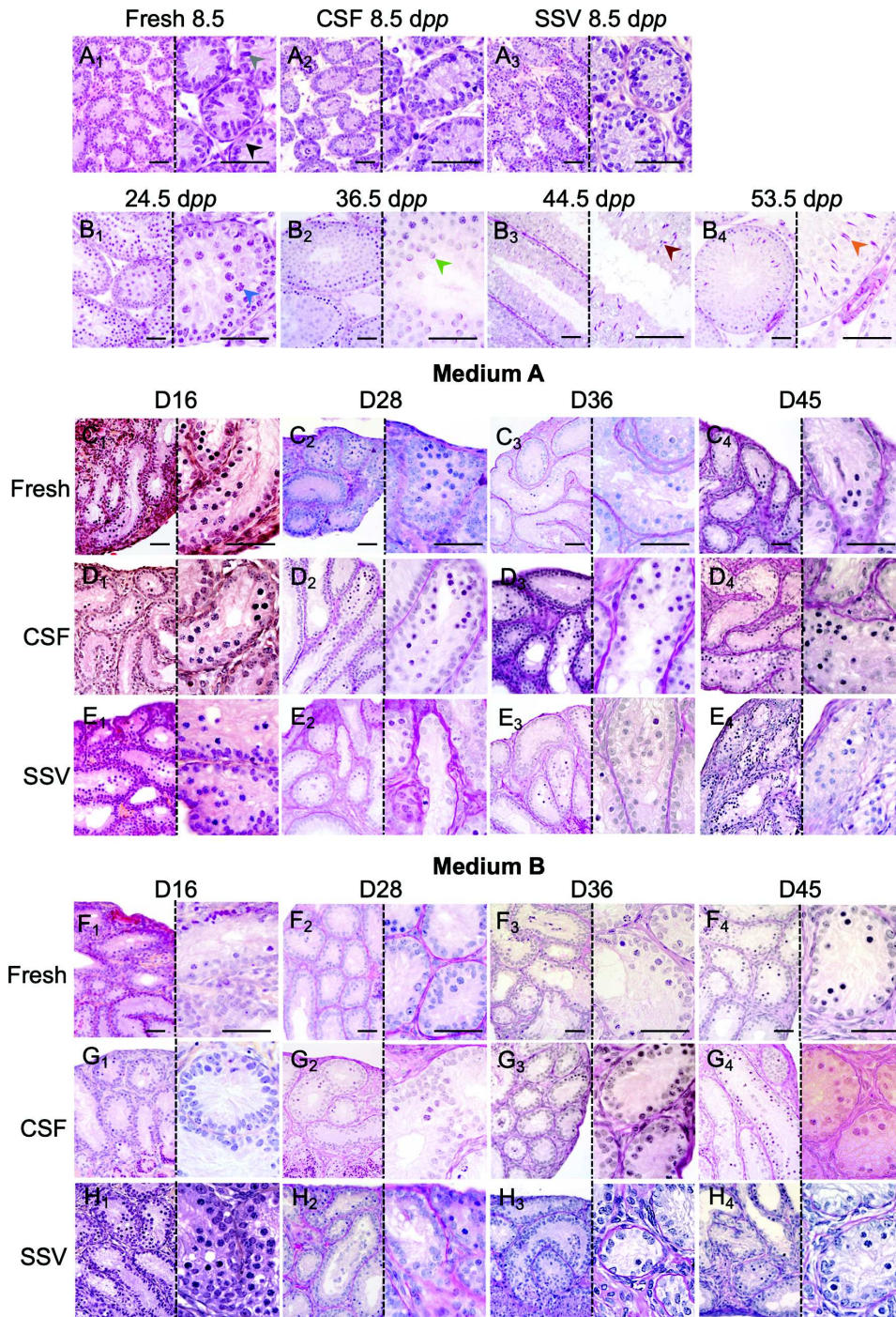


FIGURE 4. DNA fragmentation and apoptosis in prepubertal rat testes following thawing/warming. (a, b) Representative images of (a) TUNEL assays and (b) cleaved Caspase-3 immunofluorescence. Fresh testicular tissues from 8.5 *dpp* rats were analyzed either immediately (Fresh: A₁, B₁) or after a 20-h culture period (Fresh 20 h: A₆, B₆). Testicular tissues from 8.5 *dpp* rats frozen in the presence or absence of vitamin E were analyzed either immediately after thawing/warming (CSF: A₂, B₂; CSF + VitE: A₃, B₃; SSV: A₄, B₄; SSV + VitE: A₅, B₅) or 20 h after thawing (CSF 20 h: A₇, B₇; CSF + VitE 20 h: A₈, B₈) or warming (SSV 20 h: A₉, B₉; SSV + VitE 20 h: A₁₀, B₁₀). Panels on the lower left corner and upper right corner represent enlarged views of negative and positive cells, respectively. Magnification $\times 960$; Scale bar 50 μm . (c, d) Histograms representing (c) intratubular DNA fragmentation and (d) intratubular apoptosis. The percentage of TUNEL- or cleaved Caspase 3-positive tubules (dark colour) and the percentage of TUNEL- or cleaved Caspase 3-positive cells (light colour) are represented for each condition. Grey, blue and green columns represent fresh, CSF and SSV testicular fragments, respectively. Data are expressed as mean \pm s.e.m. with $n = 6$ fragments. Different superscript letters indicate significant differences among the groups ($p < 0.05$). A common letter or no letter indicates no significant difference. *Cl. Caspase 3* cleaved Caspase 3, *CSF* controlled slow freezing, *dpp* days post-partum, *SSV* solid surface vitrification, *TUNEL* terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling, *VitE* vitamin E.

Saulnier *et al.*



Freezing Protocols and Testicular Culture Assessment

◀ **FIGURE 5.** Progression of the first spermatogenic wave in rat testes during postnatal development and *in vitro* maturation. Differentiated germ cells were identified in 24.5, 36.5, 44.5 or 53.5 dpp (*in vivo* controls, B₁–B₄) and in fresh (A₁, C₁–C₄, F₁–F₄), CSF (A₂, D₁–D₄, G₁–G₄) or SSV (A₃, E₁–E₄, H₁–H₄) testicular tissues at D0 (A₁–A₃), after culture with medium A until D16 (C₁–E₁), D28 (C₂–E₂), D36 (C₃–E₃) or D45 (C₄–E₄), or after culture with medium B until D16 (F₁–H₁), D28 (F₂–H₂), D36 (F₃–H₃) or D45 (F₄–H₄). HES staining was performed at 8.5 dpp, 24.5 dpp and D16, and PAS reaction was performed to visualize the acrosomal cap in round to elongated spermatids at 36.5 dpp, 44.5 dpp, 53.5 dpp, D28, D36 and D45. Representative images are shown. At 8.5 dpp, only spermatogonia (black arrowhead) and Sertoli cells (grey arrowhead) are present in seminiferous tubules. Pachytene spermatocytes (blue arrowhead), round spermatid (green arrowhead), elongating spermatid (brown arrowhead) and elongated spermatid (orange arrowhead) are observed at 24.5, 36.5, 44.5 and 53.5 dpp, respectively. Magnifications × 200 and × 500 (left and right panels, respectively); scale bars 50 μm. CSF controlled slow freezing, D day, dpp days post-partum, HES hemalun–eosin–safran, PAS periodic acid–Schiff reaction, SSV solid surface vitrification.

few tubules with leptotene/zygotene and pachytene spermatocytes were found in tissues cultured with media C, D, E and F (Table 3). At this time point, $29.4 \pm 6.05\%$ and $15.3 \pm 4.05\%$ tubules were composed of pachytene spermatocytes with media A and B, respectively (Table 3). At the end of the first spermatogenic wave in *in vivo* controls, all tubules contained haploid cells. At D45, spermatogenesis did not proceed beyond the pachytene spermatocyte stage with media A and B or beyond the spermatogonia stage with media C, D, E and F (Table 3). No difference in the proportion of tubules at the pachytene stage was observed between media A and B (Table 3).

Progression of In Vitro Spermatogenesis in Cultures of Cryopreserved Rat Testicular Tissues

Impact of the CSF Protocol and Culture Media

8.5 dpp CSF testicular tissues were cultured on 1.5% agarose gels and compared to cultures of FT (Fig. 5; Table 4). At D16, pachytene spermatocytes were the most advanced type of germ cells in fresh and CSF tissues cultured with medium A (Table 4). The proportion of tubules containing this type of germ cells was lower in CSF tissues cultured with medium A than in FT ($p = 0.028$) (Table 4). No leptotene/zygotene and pachytene spermatocyte was found in CSF tissues cultured with medium B at this time point (Table 4). At D28, D36 and D45, spermatogenesis was arrested at the leptotene/zygotene or pachytene spermatocyte stage in CSF tissues cultured with both media (Table 4). At D36, less leptotene/zygotene ($p = 0.0022$) and pachytene spermatocyte ($p = 0.015$) was found in CSF tissues than FT cultured with medium B. After a

45-day culture with media A and B, the percentage of tubules containing leptotene/zygotene and pachytene spermatocytes was similar between fresh and CSF tissues (Table 4).

Impact of the SSV Protocol and Culture Media

8.5 dpp SSV testicular tissues were cultured on 1.5% agarose gels with media A or B and compared to cultures of FT (Fig. 5; Table 4). Leptotene/zygotene and pachytene spermatocytes were obtained in SSV tissues at all the culture time points (Table 4). At D16, the proportion of tubules with pachytene spermatocytes was lower in SSV tissues cultured with medium A than in FT ($p = 0.0043$) (Table 4). At D36, less leptotene/zygotene spermatocyte was found in SSV tissues than FT ($p = 0.039$) cultured with medium B. No haploid germ cells were detected in SSV tissues at D28, D36 and D45 whatever the medium used. At D45, the proportion of tubules containing leptotene/zygotene spermatocytes was higher in SSV tissues than FT ($p = 0.035$) cultured with medium A. The proportion of tubules with pachytene spermatocytes was not significantly different between fresh and SSV tissues cultured with media A and B at this time point (Table 4).

Finally, few differences were observed between cultures of CSF and SSV tissues. A higher proportion of leptotene/zygotene spermatocytes was produced in SSV than CSF tissues at D16 ($p = 0.0022$), D36 ($p = 0.015$) and D45 ($p = 0.015$) with medium B. No difference was observed with medium A.

DISCUSSION

The present work shows that both the CSF and SSV cryopreservation protocols maintain the architecture of rat prepubertal testicular tissues as well as intratubular cell proliferation, with no or moderate increase in DNA fragmentation and apoptosis. Moreover, *in vitro* spermatogenesis up to the pachytene stage was obtained from D16 to D45 in fresh, CSF and SSV testicular tissues cultured with media from Oblette *et al.*²³

Cryopreservation of prepubertal testicular tissues is currently the only option for fertility preservation of patients with childhood cancer. Mouse spermatozoa have been successfully produced from cryopreserved (by CSF or SSV) prepubertal testicular tissues^{4,11,23} using the organotypic culture system at a gas–liquid interphase.²⁹ The optimization of this culture system in different species is required, before a human application can be envisaged. Indeed, the yield of mouse *in vitro* spermatogenesis is low.²³ Moreover, no sper-

SAULNIER *et al.*

TABLE 3. Percentage of seminiferous tubules at the most advanced differentiation stage of spermatogenesis or devoid of germ cells after *in vitro* maturation of fresh testicular tissues with six different media.

Cell types	<i>In vivo</i> /media A–F	24.5 dpp/D16	36.5 dpp/D28	44.5 dpp/D36	53.5 dpp/D45
Sertoli cells (%)	<i>In vivo</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	A	0.00 ± 0.00 ^a	0.57 ± 0.56 ^{ac}	0.56 ± 0.56 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	B	6.67 ± 3.44 ^a	4.44 ± 3.82 ^a	4.52 ± 4.94 ^{ac}	0.00 ± 0.00 ^a
	C	0.00 ± 0.00 ^a	43.0 ± 9.53 ^{bc}	42.7 ± 15.5 ^{abc}	30.6 ± 5.19 ^b
	D	0.00 ± 0.00 ^a	34.9 ± 16.4 ^b	48.6 ± 9.71 ^b	13.6 ± 5.59 ^a
	E	1.11 ± 1.11 ^a	30.3 ± 9.92 ^b	21.7 ± 15.5 ^{abc}	42.9 ± 5.46 ^b
	F	3.33 ± 3.33 ^a	17.8 ± 6.97 ^{abc}	8.89 ± 2.94 ^c	0.56 ± 0.56 ^a
Spermatogonia (%)	<i>In vivo</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	A	62.2 ± 9.95 ^{bc}	65.3 ± 6.48 ^b	63.9 ± 6.85 ^b	83.9 ± 3.59 ^b
	B	81.7 ± 3.92 ^b	81.1 ± 5.28 ^c	49.2 ± 7.39 ^b	66.1 ± 8.58 ^{bcd}
	C	66.7 ± 12.9 ^{bc}	56.4 ± 9.68 ^b	57.3 ± 15.5 ^b	69.4 ± 5.19 ^{cd}
	D	47.2 ± 10.5 ^c	65.1 ± 16.4 ^{bc}	50.8 ± 10.2 ^b	86.4 ± 5.59 ^{bce}
	E	77.8 ± 4.69 ^b	69.1 ± 9.78 ^{bc}	78.3 ± 15.5 ^{bc}	57.1 ± 5.46 ^d
	F	57.8 ± 5.35 ^c	68.9 ± 5.94 ^{bc}	90.6 ± 3.03 ^c	96.7 ± 1.72 ^e
Leptotene/zygotene spermatocytes (%)	<i>In vivo</i>	7.22 ± 2.91 ^{ab}	0.56 ± 0.56 ^{ac}	0.00 ± 0.00 ^a	0.56 ± 0.56 ^a
	A	7.22 ± 1.34 ^a	8.52 ± 2.95 ^b	6.11 ± 0.56 ^b	4.44 ± 1.11 ^b
	B	5.56 ± 2.68 ^{ab}	8.89 ± 3.30 ^{abc}	31.1 ± 7.76 ^c	13.3 ± 7.84 ^{ab}
	C	2.22 ± 1.41 ^b	0.58 ± 0.67 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	D	1.67 ± 1.14 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	E	1.11 ± 0.70 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	F	4.44 ± 1.65 ^{ab}	2.22 ± 1.11 ^{abc}	0.00 ± 0.00 ^a	0.56 ± 0.56 ^a
Pachytene spermatocytes (%)	<i>In vivo</i>	92.8 ± 2.91 ^a	12.8 ± 3.98 ^{ac}	0.56 ± 0.56 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	A	30.6 ± 9.64 ^{bd}	25.6 ± 4.31 ^a	29.4 ± 6.05 ^b	11.7 ± 3.31 ^b
	B	6.11 ± 3.49 ^c	5.56 ± 2.53 ^{bc}	15.3 ± 4.05 ^b	20.6 ± 7.72 ^b
	C	31.1 ± 11.8 ^{bcd}	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	D	51.1 ± 9.84 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.56 ± 0.57 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	E	20.0 ± 4.55 ^d	0.56 ± 0.56 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	F	34.4 ± 7.92 ^{bd}	11.1 ± 7.39 ^{abc}	0.56 ± 0.56 ^a	2.22 ± 1.65 ^a
Round spermatids (%)	<i>In vivo</i>	0.00 ± 0.00	81.7 ± 1.88 [*]	22.8 ± 3.69 [*]	5.00 ± 1.43 [*]
Elongated spermatids (%)	<i>In vivo</i>	0.00 ± 0.00	5.00 ± 2.69	76.7 ± 3.65 [*]	94.4 ± 1.41 [*]

The “Sertoli cells” row shows the percentage of Sertoli cell-only tubules in the testicular tissues. The percentage of seminiferous tubules arrested at the spermatogonia, leptotene/zygotene or pachytene spermatocyte, round or elongated spermatid stage is shown in the other rows.

Values are expressed as mean ± s.e.m. Different superscript letters indicate significant differences among the groups ($p < 0.05$). A common letter indicates no significant difference.

D day, dpp days *post-partum*.

* $p < 0.05$ compared to all the other media and controls.

matozoa has been obtained so far in cultures of rat or human prepubertal testes with this approach.^{21,27}

Cryopreservation processes induce minor epithelial and nuclear alterations in mouse prepubertal testicular tissue.²² Although an increase in morphological alterations was here observed after both types of cryopreservation, the global lesional score remained low thereby showing that the structural integrity of tissues was maintained. These data are consistent with previous results obtained with the CSF protocol³² and show for the first time that the SSV protocol could be an alternative approach to cryopreserve rat prepubertal testes as previously demonstrated in mice.¹¹ In addition, we found a similar proportion of tubules containing proliferating cells before cryopreservation and after thawing or warming. A lower percentage of Ki67-

positive cells was however noticed in CSF and SSV rat tissues after a 20-h culture period. A decreased proliferative capacity of intratubular cells has also been reported for mouse prepubertal testes after CSF or SSV^{11,22} and for rat prepubertal testes post-CSF.³² In this study, a higher proportion of tubules containing cells with fragmented DNA but a similar proportion of TUNEL-positive cells was observed in cryopreserved tissues compared to FT after 20 h of culture. This result reflects the damaging effects of cryopreservation protocols on intratubular cells.

Besides, our data show an increase in the percentage of tubules with apoptotic cells only when vitamin E, which displays anti-oxidant properties, was added to the freezing and thawing steps of the CSF protocol. Reactive oxygen species (ROS) are indeed produced

Freezing Protocols and Testicular Culture Assessment

TABLE 4. Percentage of seminiferous tubules at the most advanced differentiation stage of spermatogenesis or devoid of germ cells after *in vitro* maturation of fresh, CSF and SSV testicular tissues with two different media.

Cell types	Tissues	Media	D16	D28	D36	D45
Sertoli cells (%)	Fresh	A	0.00 ± 0.00 ^A	0.57 ± 0.56	0.56 ± 0.56	0.00 ± 0.00 ^A
		B	6.67 ± 3.44 ^A	4.44 ± 3.82	4.52 ± 4.94 ^A	0.00 ± 0.00
	CSF	A	6.78 ± 2.26 ^{AB}	2.22 ± 1.41	2.22 ± 1.41 ^a	17.2 ± 11.0 ^{AB}
		B	58.8 ± 10.5 ^{BB}	10.6 ± 3.59	40.6 ± 5.12 ^{BB}	21.1 ± 7.44
	SSV	A	32.8 ± 7.12 ^{aC}	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	31.6 ± 8.21 ^{aB}
		B	1.67 ± 1.67 ^{BA}	0.00 ± 0.00	2.27 ± 1.89 ^A	0.00 ± 0.00 ^b
Spermatogonia (%)	Fresh	A	62.2 ± 9.95 ^{AB}	65.3 ± 6.48 ^a	63.9 ± 6.85	83.9 ± 3.59 ^A
		B	81.7 ± 3.92 ^A	81.1 ± 5.28 ^b	49.2 ± 7.39 ^A	66.1 ± 8.58
	CSF	A	78.5 ± 7.05 ^{aA}	82.8 ± 8.92	76.7 ± 8.92	71.1 ± 11.1 ^A
		B	41.2 ± 10.5 ^{BB}	75.6 ± 7.78	58.9 ± 5.07 ^A	58.3 ± 6.48
	SSV	A	51.7 ± 6.31 ^{aB}	68.3 ± 6.98	62.7 ± 5.35	39.2 ± 4.83 ^{aB}
		B	75.6 ± 6.65 ^{BA}	89.6 ± 1.56	82.4 ± 5.27 ^B	63.3 ± 7.30 ^b
Leptotene/zygotene spermatocytes (%)	Fresh	A	7.22 ± 1.34	8.52 ± 2.95	6.11 ± 0.56 ^a	4.44 ± 1.11 ^A
		B	5.56 ± 2.68 ^{AB}	8.89 ± 3.30	31.1 ± 7.76 ^{BA}	13.3 ± 7.84 ^{AB}
	CSF	A	10.2 ± 4.06	7.22 ± 4.42	7.22 ± 4.42	5.56 ± 2.22 ^{AB}
		B	0.00 ± 0.00 ^A	1.11 ± 0.70	0.56 ± 0.56 ^B	0.00 ± 0.00 ^A
	SSV	A	15.0 ± 5.88	5.00 ± 1.88	4.52 ± 2.66	12.9 ± 3.95 ^B
		B	14.4 ± 4.69 ^B	2.44 ± 0.79	11.4 ± 3.78 ^C	13.9 ± 4.67 ^B
Pachytene spermatocytes (%)	Fresh	A	30.6 ± 9.64 ^{aA}	25.6 ± 4.31 ^a	29.4 ± 6.05	11.7 ± 3.31
		B	6.11 ± 3.49 ^b	5.56 ± 2.53 ^b	15.3 ± 4.05 ^A	20.6 ± 7.72
	CSF	A	4.52 ± 2.73 ^B	7.78 ± 4.44	13.9 ± 4.44	6.11 ± 4.25
		B	0.00 ± 0.00	12.8 ± 9.60	0.00 ± 0.00 ^B	20.6 ± 12.5
	SSV	A	0.56 ± 0.56 ^B	26.7 ± 7.55	32.8 ± 5.63 ^a	16.4 ± 2.97
		B	8.33 ± 2.95	7.93 ± 1.26	3.96 ± 1.59 ^{BA}	22.8 ± 3.38

The "Sertoli cells" row shows the percentage of Sertoli cell-only tubules in the testicular explants. The percentage of seminiferous tubules arrested at the spermatogonia, leptotene/zygotene or pachytene spermatocyte stage is shown in the other rows.

Values are expressed as mean ± s.e.m. Different superscript letters indicate significant differences among the groups ($p < 0.05$). A common letter or no letter indicates no significant difference. Lowercase letters were used to compare media A and B within the Fresh, CSF or SSV condition. Uppercase letters were used to compare the freezing effect (CSF vs. Fresh, SSV vs. Fresh and CSF vs. SSV) for each medium.

CSF controlled slow freezing, D day, SSV solid surface vitrification.

during and after cryopreservation processes,³ while anti-oxidant defences are disturbed.⁸ An excess of ROS production can cause membrane lipid peroxidation, DNA damages and cell apoptosis.¹ In our study, no beneficial effect of the addition of vitamin E to the CSF freezing and thawing media was observed. These results are in contradiction with several studies demonstrating that vitamin E promotes the proliferation of testicular cells, increases their viability² and reduces ROS accumulation after slow freezing protocols.⁶ In addition, we detected harmful effects (decline in cell proliferation and rise in DNA fragmentation and apoptosis) after vitrification and warming in the presence of vitamin E. Because of its hydrophobic nature, vitamin E could attach itself to tissues and reduce the cooling rate.²⁰ The use of other anti-oxidants will have to be tested in order to better protect cryopreserved cells.

A complete *in vitro* spermatogenesis has not been obtained so far in the rat model with the 3D and standard organotypic culture systems when starting

from the spermatogonia stage.^{9,27} Spermatozoa-like cells were observed after *in vitro* maturation inside chitosan bioreactors²⁵ or on agarose gels,¹⁸ however these results need to be confirmed with germ cell markers. Spermatogenesis occurs in a specific and complex microenvironment, which *in vitro* cultures try to reproduce.^{14,29} Different culture conditions were tested in the current study to mature rat prepubertal testes. The influence of the germ cell content on the efficiency of *in vitro* spermatogenesis was first assessed. Indeed, it has been previously shown in the mouse model that *in vitro* germ cell differentiation was more efficient when prepubertal testes contained spermatogonia rather than gonocytes.⁵ In our study, a higher proportion of seminiferous tubules containing the most differentiated germ cell type (i.e. pachytene spermatocytes) was obtained when maturing 8.5 dpp rather than 5.5 dpp rat testes. Our data further show that the use of 1.5% agarose gels was preferable to 0.35% gels. We could not reproduce previous results reporting the generation of few round spermatids in

Saulnier *et al.*

cultures of fresh prepubertal testes.²⁷ This discrepancy might come from the difficulty to detect these rare germ cells in testicular explants or to strain difference (Wistar or Sprague–Dawley rats). Both strains have endocrine differences which could influence tissue development.¹⁵ Moreover, it has been recently published that the genetic background could influence spermatogenic progression in mouse testicular tissues cultured on agarose gels.²⁶

In order to promote the progression of rat *in vitro* spermatogenesis, six culture media containing various supplements known to stimulate germ cell survival and differentiation were then used. A complete *in vitro* spermatogenesis has been previously obtained in the mouse model with medium B²³ and potentially in the rat model with medium C.²⁵ Medium E has been used for the *in vitro* culture of mouse testicular fragments.³¹ Medium A corresponds to medium B supplemented with 0.1 μ M vitamin C and 0.1 μ M testosterone. Media D and F correspond respectively to media C and E supplemented with 10% KSR. Indeed, the addition of KSR to the culture medium has been shown to be vital for the success of *in vitro* spermatogenesis in the mouse model.²⁹ Pachytene spermatocytes were obtained at D16 in cultures of FT, whatever the medium used. However, spermatids were not observed at the other culture time points. Media A and B, but not C–F, allowed the maintenance of pachytene spermatocytes from D16 to D45. In CSF and SSV tissues cultured with media A and B, spermatogenesis was also arrested at the pachytene spermatocyte stage. At this stage, synapsis and recombination of homologous chromosomes occur. Defects in these processes may lead to the arrest of meiosis at the pachytene spermatocyte stage, an increase of apoptosis and meiotic sex chromosome inactivation failure.^{10,19} Deregulated expression of genes involved in meiotic crossover or checkpoint may explain this maturation arrest. Molecular studies will have to be undertaken in order to decipher the mechanisms leading to the arrest of rat *in vitro* spermatogenesis at the pachytene stage and to overcome this blockage.

In conclusion, the CSF and SSV procedures described in the current study can be used for the cryopreservation of rat prepubertal tissues. The organotypic culture system allowed the initiation of meiosis with all the culture media tested. However, rat *in vitro* spermatogenesis did not proceed beyond the pachytene spermatocyte stage in cultures of fresh, CSF and SSV tissues, regardless of the spermatogenesis stimulating factors added to the culture media. Much remains to be done to understand the reason of the arrest in germ cell differentiation. Indeed, the optimization of the organotypic culture conditions on rat prepubertal testicular tissues could be a stepping stone

for the translation of this approach in a human application.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10439-020-02535-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Shirley Troche and Dimitri Hamel for excellent technical assistance, Amandine Bironneau and Véronique Sétif for their technical advices. This work was supported by a PhD Grant from University of Rouen Normandy (awarded to Justine Saulnier) and funding from Fondation de l’Avenir under Grant AP-RM-18-031, 2020.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

- Agarwal, A., G. Virk, C. Ong, and S. S. du Plessis. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J. Mens Health* 32:1–17, 2014.
- Aliakbari, F., M. A. S. Gilani, F. Amidi, M. Baazm, M. Korouji, F. Izadyar, H. Yazdekhesti, and M. Abbasi. Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. *Cell. Reprogramming* 18:87–95, 2016.
- Aliakbari, F., M. A. S. Gilani, H. Yazdekhesti, M. Korouji, H. R. Asgari, M. Baazm, F. Izadyar, E. K. Nejad, M. Khanezad, and M. Abbasi. Effects of antioxidants, catalase and α -tocopherol on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed mice spermatogonial stem cells. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 45:63–68, 2016.
- Arkoun, B., L. Dumont, J.-P. Milazzo, C. Rondanino, A. Bironneau, J. Wils, and N. Rives. Does soaking temperature during controlled slow freezing of pre-pubertal mouse testes influence course of *in vitro* spermatogenesis? *Cell Tissue Res.* 364:661–674, 2016.
- Arkoun, B., L. Dumont, J.-P. Milazzo, A. Way, A. Bironneau, J. Wils, B. Macé, and N. Rives. Retinol improves *in vitro* differentiation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells into sperm during the first wave of spermatogenesis. *PLoS ONE* 10:e0116660, 2015.
- Arkoun, B., L. Galas, L. Dumont, A. Rives, J. Saulnier, M. Delessard, C. Rondanino, and N. Rives. Vitamin E but not GSH decreases reactive oxygen species accumulation and enhances sperm production during *in vitro* maturation of frozen-thawed prepubertal mouse testicular tissue. *Int. J. Mol. Sci.* 20:5380, 2019.

Freezing Protocols and Testicular Culture Assessment

- ⁷Baert, Y., K. Dvorakova-Hortova, H. Margaryan, and E. Goossens. Mouse in vitro spermatogenesis on alginate-based 3D bioprinted scaffolds. *Biofabrication* 11(3):035011, 2019.
- ⁸Bilodeau, J. F., S. Chatterjee, M. A. Sirard, and C. Gagnon. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55:282–288, 2000.
- ⁹Boitani, C., M. G. Politi, and T. Menna. Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biol. Reprod.* 48:761–767, 1993.
- ¹⁰Burgoyne, P. S., S. K. Mahadevaiah, and J. M. A. Turner. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat. Rev. Genet.* 10:207–216, 2009.
- ¹¹Dumont, L., B. Arkoun, F. Jumeau, J.-P. Milazzo, A. Bironneau, D. Liot, J. Wils, C. Rondanino, and N. Rives. Assessment of the optimal vitrification protocol for prepubertal mice testes leading to successful in vitro production of flagellated spermatozoa. *Andrology* 3:611–625, 2015.
- ¹²Dumont, L., A. Oblette, C. Rondanino, F. Jumeau, A. Bironneau, D. Liot, V. Duchesne, J. Wils, and N. Rives. Vitamin A prevents round spermatid nuclear damage and promotes the production of motile sperm during in vitro maturation of vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue. *Mol. Hum. Reprod.* 22:819–832, 2016.
- ¹³Huleihel, M., S. Nourashrafeddin, and T. M. Plant. Application of three-dimensional culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Asian J. Androl.* 17:972–980, 2015.
- ¹⁴Komeya, M., H. Kimura, H. Nakamura, T. Yokonishi, T. Sato, K. Kojima, K. Hayashi, K. Katagiri, H. Yamanaka, H. Sanjo, M. Yao, S. Kamimura, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, T. Fujii, and T. Ogawa. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Sci. Rep.* 6:21472, 2016.
- ¹⁵Kühn, E. R., K. Bellon, L. Huybrechts, and W. Heyns. Endocrine differences between the Wistar and Sprague-Dawley laboratory rat: influence of cold adaptation. *Horm. Metab. Res.* 15:491–498, 1983.
- ¹⁶Leblond, C. P., and Y. Clermont. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55:548–573, 1952.
- ¹⁷Lee, J. H., H. J. Kim, H. Kim, S. J. Lee, and M. C. Gye. In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials* 27:2845–2853, 2006.
- ¹⁸Liu, F., C. Cai, X. Wu, Y. Cheng, T. Lin, G. Wei, and D. He. Effect of KnockOut serum replacement on germ cell development of immature testis tissue culture. *Theriogenology* 85:193–199, 2016.
- ¹⁹Mahadevaiah, S. K., D. Bourc’his, D. G. de Rooij, T. H. Bestor, J. M. A. Turner, and P. S. Burgoyne. Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J. Cell Biol.* 182:263–276, 2008.
- ²⁰Mazur, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14:251–272, 1977.
- ²¹Medrano, J. V., M. M. del Andrés, S. García, S. Herraiz, T. Vilanova-Pérez, E. Goossens, and A. Pellicer. Basic and clinical approaches for fertility preservation and restoration in cancer patients. *Trends Biotechnol.* 36:199–215, 2018.
- ²²Milazzo, J. P., L. Vaudreuil, B. Cauliez, E. Gruel, L. Massé, N. Mousset-Siméon, B. Macé, and N. Rives. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum. Reprod.* 23:17–28, 2008.
- ²³Oblette, A., N. Rives, L. Dumont, A. Rives, F. Verhaeghe, F. Jumeau, and C. Rondanino. Assessment of sperm nuclear quality after in vitro maturation of fresh or frozen/thawed mouse pre-pubertal testes. *Mol. Hum. Reprod.* 23:674–684, 2017.
- ²⁴Oblette, A., J. Rondeaux, L. Dumont, M. Delessard, J. Saulnier, A. Rives, N. Rives, and C. Rondanino. DNA methylation and histone post-translational modifications in the mouse germline following in vitro maturation of fresh or cryopreserved prepubertal testicular tissue. *Reprod. Biomed. Online* 39:383–401, 2019.
- ²⁵Perrard, M.-H., N. Sereni, C. Schluth-Bolard, A. Blondet, S. G. D. Estaing, I. Plotton, N. Morel-Journel, H. Lejeune, L. David, and P. Durand. Complete human and rat ex vivo spermatogenesis from fresh or frozen testicular tissue. *Biol. Reprod.* 95:8, 2016.
- ²⁶Portela, J. M. D., C. L. Mulder, S. K. M. van Daalen, C. M. de Winter-Korver, J.-B. Stukenborg, S. Repping, and A. M. M. van Pelt. Strains matter: Success of murine in vitro spermatogenesis is dependent on genetic background. *Dev. Biol.* 456:25–30, 2019.
- ²⁷Reda, A., M. Hou, T. R. Winton, R. E. Chapin, O. Söder, and J.-B. Stukenborg. In vitro differentiation of rat spermatogonia into round spermatids in tissue culture. *Mol. Hum. Reprod.* 22:601–612, 2016.
- ²⁸Sanjo, H., M. Komeya, T. Sato, T. Abe, K. Katagiri, H. Yamanaka, Y. Ino, N. Arakawa, H. Hirano, T. Yao, Y. Asayama, A. Matsuhisa, M. Yao, and T. Ogawa. In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *PLoS ONE* 13:e0192884, 2018.
- ²⁹Sato, T., K. Katagiri, A. Gohbara, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, Y. Kubota, and T. Ogawa. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nat. Lett.* 471:504–508, 2011.
- ³⁰Stukenborg, J.-B., J. P. Alves-Lopes, M. Kurek, H. Albalushi, A. Reda, V. Keros, V. Töhönen, R. Bjarnason, P. Romerius, M. Sundin, U. Norén Nyström, C. Langenskiöld, H. Vogt, L. Henningssohn, R. T. Mitchell, O. Söder, C. Petersen, and K. Jahnukainen. Spermatogonial quantity in human prepubertal testicular tissue collected for fertility preservation prior to potentially sterilizing therapy. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 33:1677–1683, 2018.
- ³¹Travers, A., B. Arkoun, A. Safsaf, J.-P. Milazzo, A. Absyte, A. Bironneau, A. Perdrix, L. Sibert, B. Macé, B. Cauliez, and N. Rives. Effects of vitamin A on in vitro maturation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells. *PLoS ONE* 8:e82819, 2013.
- ³²Travers, A., J. P. Milazzo, A. Perdrix, C. Metton, A. Bironneau, B. Macé, and N. Rives. Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. *Theriogenology* 76:981–990, 2011.
- ³³Yokonishi, T., and T. Ogawa. Cryopreservation of testis tissues and in vitro spermatogenesis. *Reprod. Med. Biol.* 15:21–28, 2016.
- ³⁴Yokonishi, T., T. Sato, M. Komeya, K. Katagiri, Y. Kubota, K. Nakabayashi, K. Hata, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, and T. Ogawa. Offspring production with sperm

SAULNIER *et al.*

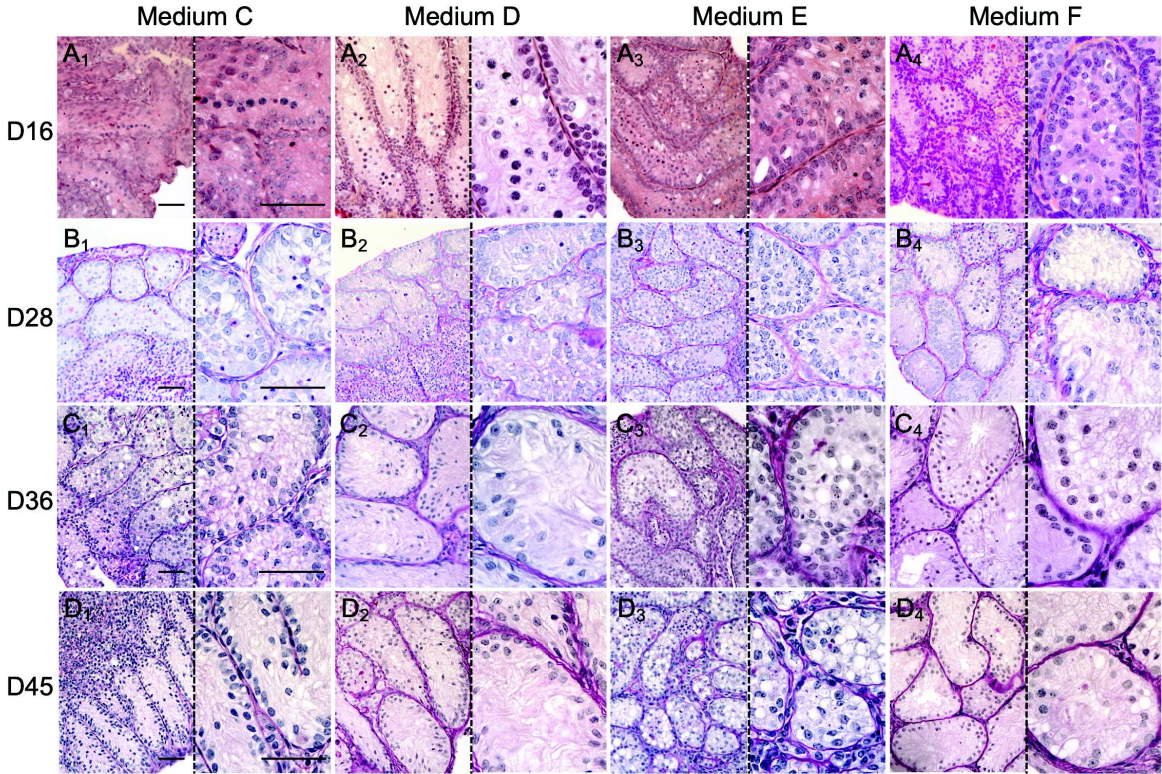
grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat. Commun.* 5:4320, 2014.

³⁵Zarandi, N. P., G. Galdon, S. Kogan, A. Atala, and H. Sadri-Ardekani. Cryostorage of immature and mature human testis tissue to preserve spermatogonial stem cells (SSCs): a systematic review of current experiences toward

clinical applications. *Stem Cells Cloning Adv. Appl.* 11:23–38, 2018.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary figure 1



Supplementary Figure legends:

Supplementary figure 1. Progression of the first spermatogenic wave in rat testes during *in vitro* maturation with four different media.

Differentiated cells were identified in fresh testicular tissues cultured with medium C (**A₁-D₁**), medium D (**A₂-D₂**), medium E (**A₃-D₃**) and medium F (**A₄-D₄**) until D16 (**A₁-A₄**), D28 (**B₁-B₄**), D36 (**C₁-C₄**) or D45 (**D₁-D₄**). HES staining was performed at D16 and PAS reaction was performed to visualize the acrosomal cap in round to elongated spermatids at D28, D36 and D45. Representative images are shown. Magnifications: ×200 and ×500 (left and right panels, respectively); scale bars: 50 μm.

D: day; HES: hemalun-eosin-saffron; PAS: periodic acid-Schiff reaction

Supplementary materials and methods:

Rat testicular tissue collection

Wistar rats were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Rats were housed in a controlled environment (12h light/12h darkness and temperature 21°C +/- 1°C) with free access to food and water *ad libitum*. D0 represents the pups day of birth.

Prepubertal testes, in which gonocytes and spermatogonia (5.5-day old rats) or spermatogonia (8.5-day old rats) are the most advanced type of germ cells, were obtained after euthanasia by decapitation. They were rinsed in α-MEM medium (22561-021, Gibco Life Technologies, Saint-Aubin, France) at 4°C and the tunica albuginea was removed with two needles under a binocular magnifier (S8AP0, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), before organotypic culture or cryopreservation. Rats aged 24.5 to 53.5 *dpp* were euthanized by CO₂ asphyxiation.

Organotypic cultures

Testicular tissue culture at a gas-liquid interphase was performed according to the previously published *in vitro* organ culture technique (Sato *et al.*, 2011). To prepare the agarose gels, 0.7% agarose solution (A6013, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was mixed with an equal volume of the relevant basal medium to obtain 0.35% agarose gels, as described by Reda *et al.*, 2016. For 1.5% agarose gels, we used the protocol developed by Arkoun *et al.*, 2015. The day before the beginning of each culture, 0.35% or 1.5% agarose gels were placed in 6-well plates, 1 gel per well, and soaked overnight in 2 ml culture medium (α -MEM or DMEM (31330-038, Gibco Life Technologies) in the incubator. At the day of the beginning of culture, soaking media was replaced by 1 ml of the relevant media (basal medium or media A, B, C, D, E and F, **Table 1**). Testes were cut in six (approximately 5 mg each) with a sterile scalpel and testicular tissue fragments were slightly included and spread onto the agarose gels. Tissues were cultured under 5% CO₂-95% air at 34°C.

The basic culture medium used for assessment of the culture conditions (depending on the culture condition tested) consisted of α -MEM, supplemented with knockout serum replacement (KSR, 10828-010, Gibco Life Technologies) and either 0.01% gentamicin or 1% penicillin/streptomycin. Six different culture media were tested: (1) medium A: α -MEM + 10% KSR + 0.1 μ M vitamin C (L-ascorbic acid, A5960, Sigma-Aldrich) + 3400 μ M vitamin E ((+/-)- α -Tocopherol, T3251, Sigma-Aldrich) + 1 μ M retinol (R7632, Sigma-Aldrich) + 0.1 μ M testosterone (T1500, Sigma-Aldrich) + gentamicin (G1397, Sigma-Aldrich), (2) medium B: α -MEM + 10% KSR + 3400 μ M vitamin E + 1 μ M retinol + gentamicin, (3) medium C: DMEM/F12 + 0.1 mM vitamin C + 23.2 μ M vitamin E + 0.33 μ M retinol + 0.33 μ M retinoic acid (R2625, Sigma-Aldrich) + 50 ng/ml FSH (Puregon, MSD France, Courbevoie, France) + 0.1 μ M testosterone + 10 μ g/ml insulin (I2643, Sigma-Aldrich) + 10 μ g/ml apo-transferrin (T2036,

Sigma-Aldrich) + 1 mM pyruvic acid (P3662, Sigma-Aldrich) + gentamicin + penicillin/streptomycin, (4) medium D: medium C + 10% KSR, (5) medium E: DMEM/F12 + 0.1 μ M vitamin C + 23.2 μ M vitamin E + 1 μ M retinol + 0.33 μ M retinoic acid + 7.33 ng/ml FSH + 1.1 ng/ml hCG (Gonadotrophine Chorionique Endo, MSD France) + 10 μ g/ml insulin + 10 μ g/ml apo-transferrin + 1 mM pyruvic acid + gentamicin + penicillin/streptomycin, (6) medium F: medium E + 10% KSR. The different culture media tested were prepared and replaced at D2, D4 and then every 4 days.

Histological and immunohistochemical analyses

Testicular tissues and cultured explants were fixed for 2 hours (cultured tissues and 8.5 *dpp* tissues) or 24 hours (other *in vivo* controls) at room temperature in Bouin's solution (HT10132, Sigma-Aldrich) for histological and or in 4% paraformaldehyde (P6148, Sigma-Aldrich) for immunofluorescence and TUNEL analyses. They were dehydrated in successive ethanol/xylene baths in the Citadel 2000 tissue processor (Shandon, Cheshire, UK) and embedded in paraffin (Paraplast X-TRA, 39603002, Leica, Fisher scientific, Illkirch, France). Tissue sections (3 μ m thick) were cut with the JungRM 2015 microtome (Leica microsystem GmbH) and mounted on Polysine slides (Thermo Fischer Scientific, Saint-Aubin, France) and dried overnight. Tissue sections were then deparaffinized in xylene and rehydrated with decreasing concentrations of ethanol at the moment of analyzes.

For hemalun eosin saffron (HES) staining, sections were incubated with hemalun (diluted at 1:2, 720-0330, RAL Diagnostics, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) for 2 minutes and washed under tap water for 10 minutes. The sections were then incubated in 2% eosin (E4382, Fisher Bioreagent, Thermo Fischer Scientific) for 15 minutes and then briefly rinsed with distilled water. The sections were dehydrated with bath of alcohol before incubation with

2% saffron (720-1203, RAL diagnostics, VWR International) for 10 minutes. The sections were then rinsed in 100% alcohol, followed by two xylene baths. For periodic acid-Schiff (PAS) reaction, which allows the visualization of the acrosomal cap of spermatids, the sections were incubated with 0.5% periodic acid (BP581-100, Sigma-Aldrich) for 10 minutes, and were then washed with distilled water for 5 minutes. Afterward, the sections were incubated with Schiff's reagent (1.090033.0500, Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines) for 30 minutes and washed 3 times in distilled water for 2 minutes. The sections were counterstained with hemalun for 2 minutes and then rinsed again with distilled water for 5 minutes. Sections were then dehydrated in successive baths of ascending concentration of alcohol before two xylene baths, each for 5 minutes each. The sections were mounted with Eukitt (03989, Sigma-Aldrich).

The integrity of the seminiferous epithelium was scored as follows: (i) detachment of cells from the basement membrane was scored as 0 if absent, as 2 if partial and as 3 if total or observed on more than the half of the tubular circumference, (ii) gap formation and shrinkage were scored as 0 if absent, as 2 if slight and as 3 if more obvious. Intratubular nuclear alterations were scored as follows: (i) distinction between Sertoli cells and spermatogonia nuclei was scored as 0 if easy, 1 if difficult and 2 if impossible, (ii) observation of nucleoli was scored as 0 if easy (visible in the majority of cells) and scored as 1 if impossible (iii) nuclei condensation was scored as 0 if absent or present in only 1 nucleus, as 1 if few nuclei were condensed and as 2 if more than 25% were pyknotic. The global score (between 0 and 10) results from the sum of the epithelial and nuclear scores (Milazzo *et al.*, 2008).

For Ki67 and cleaved Caspase 3 immunostaining, sections were first washed for 3 minutes in 0.05% (v/v) Tween-20 in Tris buffer (TBST), boiled for 40 minutes at 96°C in 0.7 mM citrate buffer pH 6.0 (T0050, Diapath, Microm Microtech, Francheville, France) and then cooled at

room temperature for 20 minutes. They were washed in distilled water for 5 minutes and permeabilized with 0.01% (v/v) Triton X-100 (T6778, Sigma-Aldrich) at room temperature for 15 minutes (for Ki67 staining only). Non-specific sites were blocked with 5% (w/v) bovine serum albumin (A7906, Sigma-Aldrich) and 0.12% (v/v) horse serum (H1270, Sigma-Aldrich). Sections were then incubated for 60 or 90 minutes at room temperature with rabbit monoclonal anti-Ki67 IgGs (1:500, Ab16667) or rabbit polyclonal anti-cleaved Caspase 3 IgGs (1:200, Ab49822), respectively. After a 5-minute wash in TBST, sections were incubated with goat polyclonal anti-rabbit IgGs coupled to Alexa Fluor® 488 (1:200, AB150077) for 1 hour at room temperature. Negative controls were performed with pre-immune rabbit IgGs (SC-2027, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Sections were rinsed, dehydrated with ethanol and mounted in Vectashield with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (H-1200, Vector, Eurobio, Les Ulis, France).

CSF and thawing

Testes were frozen by CSF using a previously described protocol, with slight modifications (Travers *et al.*, 2011). Briefly, testes from rats aged 8.5 dpp were cut in half (approximately 15 mg) in petri dishes containing Leibovitz L15 (11415-049, Gibco Life Technologies) medium and placed into cryovials containing 1.3 ml of the cryoprotective medium composed of Leibovitz L15 medium, 1.5 M dimethylsulfoxide (DMSO, D8418, Sigma-Aldrich), 0.05 M sucrose (S0389, Sigma-Aldrich), 10% (v/v) FCS (10270-098, Gibco Life Technologies), supplemented or not with 3.4 mM vitamin E. After a 30-minute equilibration at 4°C, testicular fragments were frozen in a programmable freezer (Freezal, Air Liquide, Marne-la-Vallée, France) with the following protocol: start at 5°C, then -2°C/minute until reaching -9°C,

temperature stabilization for 7 minutes, then $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ until -40°C and $-10^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ down to -140°C . Frozen samples were then stored into liquid nitrogen.

After 1 minute at room temperature, samples were thawed during 3 minutes at 30°C in a thermostatic water bath and then incubated at 4°C into several baths containing decreasing concentrations of cryoprotectants for 5 minutes each: (i) 1 M DMSO, 0.05 M sucrose, 10% FCS in Leibovitz L15; (ii) 0.5 M DMSO, 0.05 M sucrose, 10% FCS in Leibovitz L15; (iii) 0.05 M sucrose, 10% FCS in Leibovitz L15 and (iv) 10% FCS in Leibovitz L15. Vitamin E at 3.4 mM was added or not in each bath.

SSV and warming

Testes from rats aged 8.5 *dpp* were cut into 6 fragments (approximately 5 mg each). Fragments were incubated in DMEM/F12, then in DMEM/F12 supplemented with 2.1 M DMSO and 1.35 M ethylene glycol for 10 minutes at 4°C , and finally in DMEM/F12 supplemented with 2.1 M DMSO, 2.7 M ethylene glycol (E9129, Sigma-Aldrich), 0.5 M sucrose and 20% FCS for 5 minutes at 4°C (Dumont *et al.*, 2015). Vitamin E at 3.4 mM was added or not in each bath. Samples were dropped off on aluminium boats floating in liquid nitrogen. Vitrified fragments were transferred into pre-cooled cryovials and stored in liquid nitrogen. After 2-3 seconds at room temperature, vitrified testicular samples were warmed at 37°C in DMEM/F12 supplemented with 0.5 M sucrose and 20% FCS for 2 minutes, and then in DMEM/F12 supplemented with 20% FCS for 2 minutes. To remove a maximum of cryoprotectants, testes were then successively transferred in four baths of DMEM/F12 supplemented with 20% FCS for 5 minutes each at 4°C . Vitamin E at 3.4 mM was added or not in each bath.

TUNEL assays

Tissue sections were warmed for 2 minutes at 37°C, rehydrated for 10 minutes in PBS and incubated in acetone (400971, Carlo Erba, Dominique Dutscher, Brumath, France) for 2 minutes. Then, tissue sections were rinsed two times in distilled water for 10 minutes. Afterward, slides were incubated with the enzyme solution (5 µl enzyme + 45 µl substrate, *In Situ* Cell Death kit POD, Roche, Mannheim, Germany) for 60 minutes at 37°C in a pre-warmed humidified chamber. After been rinsed two times in PBS, sections were progressively dehydrated in ascending concentration of alcohol. Sections were mounted in Vectashield with DAPI. Positive controls were performed by incubating tissues with DNase I before TUNEL assays and negative controls were carried out by omitting the enzyme solution.

Publication 2

Understanding the underlying mechanisms of meiotic arrest in organotypic culture of prepubertal rat testicular tissue: a transcriptomic approach

Saulnier J., Chalmel F., Moutard L., Delessard M., Ziegler F.,
Dumont L., Rives-Feraille A., Rondanino C. and Rives N.

En préparation

Notre première étude a mis en évidence un arrêt de maturation précoce des cellules germinales en prophase I de la méiose au cours de la maturation *in vitro*. Afin de comprendre l'origine de cet arrêt, des analyses histologiques ont été menées sur le tissu après culture (J28). La composition en cellules germinales et cellules de Sertoli ainsi que la prolifération intratubulaire ont été évaluées par immunofluorescence et comparées au temps correspondant *in vivo* (36,5 *jpp*), ainsi qu'au temps d'entrée en méiose (14,5 *jpp*). La fragmentation de l'ADN, plus particulièrement dans les spermatocytes I, a été étudiée après un double immunomarquage SYCP3 (*synaptonemal complex protein 3*)/TUNEL. Afin d'évaluer plus précisément les altérations conduisant à cet arrêt, des étalements chromosomiques ont été réalisés, et l'intégrité du complexe synaptonémal (SYCP3/SYCP1 [*synaptonemal complex protein 1*]) ainsi que l'efficacité de l'inactivation des chromosomes sexuels (SYCP3/ γ H2AX) ont été analysées par immunofluorescence et microscopie confocale (Plateforme PRIMACEN, Mont-Saint-Aignan). La fonctionnalité des cellules de Leydig a été vérifiée par dosage de la testostérone intratesticulaire et dans le milieu de culture par RIA (*Radio-immuno assay*), en collaboration avec le service d'hormonologie du CHU de Rouen. Une analyse du transcriptome par RNA-sequencing (Plateforme GenomEast, Illkirch), a été effectuée afin d'identifier les mécanismes moléculaires potentiellement modifiés lors de la culture.

Les résultats principaux obtenus sont en faveur d'un maintien du statut immature du tissu testiculaire mûré *in vitro*, celui-ci conservant les paramètres comparables à ceux observés à 14,5 *jpp*, plutôt qu'au temps contrôle d'âge équivalent. Les analyses cytologiques ont révélé des anomalies de la mise en place du complexe synaptonémal et du corps sexuel. L'analyse du transcriptome suggère une dérégulation des gènes impliqués dans la spermatogenèse, la stéroïdogénèse ainsi qu'une surexpression des gènes qui interviennent dans la réponse immunitaire, l'inflammation et le stress cellulaire. Une analyse complémentaire réalisée avec le logiciel IPA, permettant de mettre en évidence de potentiels régulateurs de nos données, a révélé une part importante de l'inflammation dans la dérégulation des gènes lors de la culture.

Ces travaux ont été présentés sous forme de communication affichée au congrès de la FFER (Caen, 2019) et de la SALF (Nancy, 2020).

1 **Running title:** Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

2

3 **Title:** Understanding the underlying mechanisms of meiotic arrest in organotypic culture of
4 prepubertal rat testicular tissues: a transcriptomic approach

5

6

7 Justine Saulnier¹, Frédéric Chalme², Laura Moutard¹, Marion Delessard¹, Frédéric Ziegler³,
8 Ludovic Dumon¹, Aurélie Rives-Feraille¹, Christine Rondanino¹ and Nathalie Rives¹

9

10 ¹Normandie Univ, UNIROUEN, EA 4308 “Gametogenesis and Gamete Quality”, Rouen
11 University Hospital, Department of Reproductive Biology–CECOS, 22 Boulevard Gambetta,
12 F-76000 Rouen, France

13 ²Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail)
14 - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

15 ³Department of General Biochemistry, Rouen University Hospital, Rouen, France.

16

17 **Corresponding author:** Pr Nathalie Rives, MD-PhD; Phone: +33232888225,
18 nathalie.rives@chu-rouen.fr

19

20 Key words: organotypic culture, rat prepubertal testis, meiosis, spermatocyte, meiotic arrest,
21 transcriptomic analyses

Abstract

22 *In vitro* spermatogenesis appears as a promising approach to restore the fertility of survivors of
23 childhood cancer. Spermatozoa have been successfully produced from mouse prepubertal
24 testicular tissues using the organotypic culture approach. However, the rat model has proven to
25 be challenging, since a complete rat *in vitro* spermatogenesis has not yet been achieved with
26 the organ culture system. The aim of the present study was to study and identify the origin of
27 the meiotic maturation arrest observed in rat cultured tissues, by a histological and
28 transcriptomic approach.

29 We report that, despite meiotic entry, *in vitro* matured rat prepubertal testicular tissues
30 displayed an immature feature. RNA-sequencing analyses were conducted in order to unravel
31 the molecular mechanisms of meiotic arrest in organotypic cultures. Principal component
32 analysis confirmed the immature status of testicular tissues cultured for 28 days, whose
33 transcriptomic profile was close to that of 14.5 dpp testes. An upstream regulator analysis
34 further highlighted the presence of an important immune reaction in the cultured explants, that
35 could alter the progression of meiosis.

36 By analyzing for the first time *in vitro* matured rat prepubertal testicular tissues at the molecular
37 level, this study therefore revealed that the deregulation of genes involved in immune cell
38 recruitment and inflammation could be at the origin of maturation arrest in organotypic cultures.

39 **Introduction**

40 With the improvement of biomedical research, the survival of children with childhood cancer
41 has increased. Quality of life after cancer has therefore become an important issue in the
42 management of these patients. Oncological treatments are mainly based on chemo- and
43 radiotherapy, whose gonadotoxicity could lead to gonadal dysfunction and infertility
44 (Delessard et al., 2020). To preserve the future fertility of prepubertal patients, cryopreservation
45 procedures of immature testicular fragments containing spermatogonial stem cells have been
46 developed (Picton et al., 2015). Several fertility restoration approaches have also started to
47 emerge (Onofre et al., 2016) and are currently the object of research, such as (i) *in vitro*
48 maturation in 3D cultures (Huleihel et al., 2015; Rezaei Topraggaleh et al., 2019) or in
49 organotypic cultures (Arkoun et al., 2015; Oblette et al., 2020; Sato et al., 2011) and (ii) *in vivo*
50 maturation by testicular tissue grafting (Fayomi et al., 2019; Pullium et al., 2008) or
51 spermatogonial stem cell transplantation (Hermann et al., 2012; Kanatsu-Shinohara et al.,
52 2003). Among these different strategies, organotypic culture presents the advantage of
53 maintaining the tissue architecture and cellular interactions that are necessary for germ cell
54 maturation as well as avoiding the potential reintroduction of tumor cells in cured patients.
55 Using this approach, fertilizing spermatozoa have been obtained *in vitro* from mouse
56 prepubertal testes (Oblette et al., 2020; Sato et al., 2011). The development and optimization of
57 organotypic culture procedures in animal models is essential before a human application can be
58 envisaged. The rat model, whose duration of spermatogenesis is intermediate between mice and
59 humans (53 days vs 36 and 74 days) and showing (as in humans) a germ cell maturation arrest
60 in organotypic cultures (de Michele et al., 2018; Kurek et al., 2021; Matsumura et al., 2021;
61 Medrano et al., 2018; Reda et al., 2016; Saulnier et al., 2020), appears as a relevant model for
62 the improvement of *in vitro* culture conditions.

63 Spermatogenesis is an essential process by which haploid spermatozoa develop from
64 spermatogonial stem cells in the seminiferous tubules of the testis. Meiosis is the step during
65 which genetic recombinations occur in diploid spermatocytes and at the end of which haploid
66 spermatids are generated. A single round of DNA replication is followed by two consecutive
67 rounds of nuclear meiotic divisions. The first meiotic division (meiosis I) is characterized by a
68 prolonged prophase phase during which chromosome synapsis, crossovers and homologous
69 recombination take place (Zickler and Kleckner, 2015) and by the segregation of homologous
70 chromosomes, each composed of a pair of sister chromatids. Synapsis and recombinations
71 occur following the formation of a proteinaceous structure between the homologous
72 chromosomes, called the synaptonemal complex (Gao and Colaiácovo, 2018). The production
73 of at least one crossover per homologous chromosome pair is required for an accurate
74 segregation of chromosomes (Youds and Boulton, 2011). Homologous recombinations require
75 the generation of DNA double-strand breaks (DSBs) by the endonuclease SPO11 (Keeney et
76 al., 1997). Most of the generated DSBs are involved in chromosome pairing and alignment
77 (Zickler and Kleckner, 2015). The repair of SPO11-induced DSBs is essential for stable
78 homologous chromosome pairing and synapsis during prophase (Baudat et al., 2000; Carofiglio
79 et al., 2018). During meiosis II, sister chromatids separate within two haploid daughter cells.
80 Meiosis is therefore a complex process involving many genes, whose deregulation of
81 expression can be at the origin of meiotic arrest as demonstrated in transgenic mouse (de Rooij
82 and de Boer, 2003; Roeder and Bailis, 2000). Numerous studies have investigated the causes
83 of meiotic arrests in a fundamental or purely medical context (Kui et al., 2019; Stahl et al.,
84 2012; Wang et al., 2021; Yatsenko et al., 2015). Progressively, lists of genes leading to
85 infertility have emerged as a result of the development of high-throughput sequencing (Ghieh
86 et al., 2019). Meiotic arrest could be due to a chromosome abnormality, such as Y microdeletion
87 and aneuploidy, or gene mutations. A splice site mutation of the gene SYCE1 (coding for

88 synaptonemal complex central element 1) (Maor-Sagie et al., 2015) have been demonstrated as
89 disrupting the acceptor site of intron 3, leading to an absence of this protein in the seminiferous
90 tubules. SYCE1 is one of the four components of the synaptonemal complex required for
91 chromosome pairing. Its absence leads to the disruption of synapsis in mice (Bolcun-Filas et
92 al., 2009). Some studies have highlighted the involvement of different checkpoints in cases of
93 maturation arrest (Barchi et al., 2005; Smirnova et al., 2006). These checkpoints, such as the
94 pachytene checkpoint, have a fundamental role in meiotic progression. The pachytene
95 checkpoint is involved in the repair of DSBs induced during meiotic recombination and in the
96 detection of asynapsis. The retention of ATM/ATR kinases at DSB sites acts as a prevention of
97 cell division, followed by an amplification of this signal involving the BRCA1 protein and the
98 histone H2AX. It informs the cell of the persistence of DSBs on asynapsed chromosome
99 fragments. However, the presence of numerous asynapsis induces a defect in the recruitment of
100 ATR and BRCA1 proteins on the asynapsed sections of the sex chromosomes. Retention of
101 these proteins on autosome asynapsis thus leads to a defect in sex chromosome inactivation and
102 cell apoptosis (Mahadevaiah et al., 2008). It appears that mutant genes involved in the same
103 biological process can induce arrest at different stages of the cell cycle/meiosis (Barchi et al.,
104 2005). The same is true for proteins involved in synapsis or silencing of sex chromosomes
105 (ElInati et al., 2017; Xu et al., 2003). However, genetic alterations are not the only cause of
106 meiotic arrests. Because spermatogenesis is finely regulated by different factors such as
107 temperature, hormones and nutrients, abrupt changes in the environment can affect its
108 progression (Chen et al., 2016; Durairajanayagam et al., 2015; Manfo et al., 2014). Indeed, an
109 early deprivation in vitamin A in prepubertal mice leads to a disruption of the blood-testis
110 barrier (BTB), an arrest in meiosis and germ cell apoptosis (Chihara et al., 2013; Li et al., 2011).
111 In cases of cryptorchidism in humans, the maintenance of germ cells at body temperature

112 induces the appearance of mutations, leading to germ cell alterations, tumor formation and
113 progressive germ cell depletion (Cobellis et al., 2014).

114 A meiotic blockage has been evidenced during *in vitro* maturation of rat (Saulnier et al., 2020)
115 or human prepubertal testicular tissues (de Michele et al., 2018). The identification of
116 deregulated gene sets or pathways *in vitro* would contribute to a better understanding of the
117 mechanisms involved in meiotic blockage. Transcriptomic approaches has proven to be useful
118 in highlighting downregulation of genes involved in the control of cell cycle such as *Igf-1* (Yao
119 et al., 2017) or upregulation of genes involved in immune response (Abe et al., 2020) in cultures
120 of mouse prepubertal testes. Supplementations of culture media with IGF-1 (Yao et al., 2017)
121 or an inhibitor of the TLR4-NFκB signaling pathway (Abe et al., 2020) led to a significant
122 increase in sperm yield and a reduction in the activation of macrophages, respectively. RNA
123 sequencing (RNA-Seq) analyses also allowed to identify differentially expressed genes (DEGs)
124 between *in vitro* and *in vivo* matured mouse ovarian tissues, thereby enabling the optimization
125 of culture conditions and the successful completion of *in vitro* oogenesis (Morohaku et al.,
126 2016).

127 The aim of the present study was therefore to understand the underlying mechanisms of meiotic
128 arrest in rat organotypic cultures, using histological analyses and in particular, a bulk
129 transcriptomic approach.

130

131 **Results**

132 **Germ cells survive in cultured testicular tissues but do not achieve their differentiation**

133 As previously described (Saulnier et al., 2020), rat prepubertal testicular tissues were cultured
134 on agarose gels for 28 days (D28). In order to characterize and identify the origin of the meiotic
135 arrest in *in vitro* cultured tissues, histological and immunohistochemical analyses were first
136 performed and compared to age-matched *in vivo* controls (36.5 dpp) and prepubertal *in vivo*

137 controls (14.5 *dpp*). Six replicates were performed for each condition, composed of 6 different
 138 testes for *in vivo* controls and 2-3 testicular tissue fragments for cultured explants. In sections
 139 of 14.5 *dpp* and 36.5 *dpp* rat testes, all the expected stages of spermatogenesis were observed,
 140 with meiotic cells present in the adluminal compartment of seminiferous tubules (**Fig. 1A,B**).
 141 In sections of D28 cultured tissues, an early meiotic arrest at the spermatocyte I stage was
 142 observed. Therefore, no staging of the seminiferous epithelium was possible. The tubules
 143 remained quite empty and few spermatocytes I were observed (**Fig. 1A,B**). The
 144 immunolabeling of DDX4, a protein expressed in the germline and involved in germline
 145 integrity, confirmed that the germ cell content was decreased after organotypic culture, with the
 146 presence of Sertoli cell-only tubules and a decrease in germ cells/Sertoli cells ratios compared
 147 to age-matched *in vivo* controls. In contrary to Sertoli cells, a lower number of germ cells per
 148 tubules was observed in cultured tissues compared to the age-matched control (**Fig. 1C,D**,
 149 **Fig.S1**). In cultured tissues, the nuclei of some germ cells appeared pyknotic. However, the
 150 germ cells/Sertoli cells ratios were similar between D28 cultured tissues and 14.5 *dpp* immature
 151 testes (**Fig. 1D, Fig.S1**).

152 We next determined whether germ cell depletion in cultured tissues was the result of an
 153 imbalance between proliferation and apoptosis. Ki67 immunostaining revealed that the
 154 proliferative activity of intratubular cells was maintained throughout the culture process (**Fig.**
 155 **1E,F, Fig.S1**). The proliferative activity in D28 cultured tissues was closer to that of the
 156 immature 14.5 *dpp* tissues than to that of the age-matched 36.5 *dpp* controls, suggesting that an
 157 impairment of tissue maturation may be a possible cause of the meiotic arrest.-To evaluate the
 158 DNA integrity of produced spermatocyte, we combined a TUNEL reaction with a SYCP3
 159 immunostaining. As expected, an increased proportion of intratubular cells with fragmented
 160 DNA (TUNEL positive) was detected in cultured tissues, partially due to the culture condition
 161 (**Fig. 1G, H**). However, the proportion of tubules containing TUNEL positive-spermatocytes

162 at D28 was not different from *in vivo* controls (**Fig. 1I**). The percentage of spermatocytes with
 163 DNA fragmentation was below 0.2% in cultured tissues (**Fig. S1**), which is insufficient to
 164 explain the cell maturation arrest. The first wave of spermatogenesis is characterized by an
 165 extensive apoptosis of A spermatogonia and spermatocytes at the zygote-pachytene transition
 166 (Jahnukainen et al., 2004). Furthermore, DNA breaks reparation default can also lead to cell
 167 death (Burgoyne et al., 2009).

168 The formation of the XY body was then assessed by immunolabeling γ H2A.X on paraffin slides
 169 (**Fig. 1J**), a protein involved in DSB and transcriptional silencing of the XY body. When
 170 physiologically expressed, γ H2AX is present at the zygotene stage on the chromosomal
 171 asynapsis region whereas it becomes restricted and highly expressed in the XY body at the
 172 pachytene stage (Blanco-Rodríguez, 2009). In D28 cultured tissues, arrested spermatocytes
 173 displayed an indistinguishable XY body formation and dispersed γ H2AX staining within the
 174 nuclei, around the chromosomes (**Fig. 1J**). To confirm this observation, meiotic chromosome
 175 spreads were prepared from D28 cultured tissues and age-matched *in vivo* controls. Using
 176 confocal microscopy, we found supplemental γ H2AX spots in the pachytene spermatocytes
 177 generated *in vitro*, which were localized on the chromosome axes, in comparison to the unique
 178 γ H2AX spot detected in pachytene spermatocytes *in vivo* (**Fig. 2A**). Since γ H2AX
 179 overexpression could be due to an asynapsis or an absence of DSBs repair, the integrity of the
 180 synaptonemal complex was investigated by performing double SYCP3/SYCP1
 181 immunostaining. A slight asynapsis could be observed in part of the spermatocytes generated
 182 during culture, whereas some of them seems to be correctly synapsed (**Fig. 2B**).

183 Next, to determine if the cell maturation arrest was due to a hormonal deregulation, the
 184 functional integrity of Leydig cells was assessed by measuring testosterone secretion into the
 185 media throughout the culture period (D0, D6, D16, D22, D28), as well as intratesticular
 186 testosterone levels at the different culture time points and the corresponding *in vivo* controls

187 (8.5 *dpp*, 14.5 *dpp*, 24.5 *dpp*, 30.5 *dpp*, 36.5 *dpp*). As expected, high intratesticular testosterone
188 levels during the first days of postnatal life, corresponding to minipuberty, were evidenced by
189 RIA (Radio-Immuno Assay) (**Fig. 3A**). These levels progressively decreased during the first
190 wave of *in vivo* spermatogenesis. Similar levels (except at D6) were found *in vitro*, suggesting
191 that the functionality of Leydig cells was well preserved in organotypic cultures (**Fig. 3A**). A
192 decrease in testosterone secretion was also observed during the culture period (**Fig. 3B**).

193

194 ***In vitro* and *in vivo* matured testicular tissues have distinct transcriptomic profiles**

195 In order to identify the molecular mechanisms involved in the spermatogenic arrest during
196 organotypic culture, bulk RNA sequencing analyses were conducted on *in vitro* and *in vivo*
197 matured testicular tissues in order to compare their transcriptomic profiles. For each time point,
198 three replicates were analyzed, with three different testes for *in vivo* controls and twelve pooled
199 cultured explants per replicate for the *in vitro* conditions. One 14.5 *dpp* tissue, which displayed
200 a different transcriptomic profile compared to the other two replicates, was excluded from the
201 downstream analyses.

202 A PCA (Principal Component Analysis) revealed the biological relevance of the resulting
203 transcriptomic dataset: the first component (or dimension) containing 84.8% of variances
204 indeed appeared strongly correlated with the tissue maturity of samples (**Fig. 4A**). Indeed, *in*
205 *vivo* samples at each developmental stage (24.5, 30.5, 36.5 and 53.5 *dpp*) clustered together,
206 whereas immature 14.5 *dpp* tissues clustered with all the *in vitro* cultured tissues (D6, D16,
207 D22, D28). A more precise analysis showed that in this last cluster, 14.5 *dpp* tissues clustered
208 away from cultured explants (Dimension 1, 52.4% of variance), demonstrating a persistent
209 difference between *in vivo* and *in vitro* matured testicular tissues (**Fig. 4B**). The analysis of
210 DEGs confirmed the differences between *in vivo* and *in vitro* conditions from the outset of the
211 first wave of spermatogenesis (**Fig. S2**).

212 Based on the above PCA and on histological observations, we compared the transcriptomes of
 213 cultured tissues to those of 14.5 *dpp* tissues to highlight genes involved in the initiation of germ
 214 cell maturation, that could be deregulated during cultures, thereby leading to a premature
 215 spermatogenic arrest (**Fig. 4C**). By applying stringent selection parameters, we were able to
 216 highlight 1,240 DEGs (Differentially Expressed Genes), among which 600 were deregulated in
 217 each comparison (**Fig. 4C, Table S1**). A clustering analysis on the resulting set of genes
 218 allowed us to generate 7 expression patterns (termed P1-7), which can be organized into two
 219 broad clusters, P1-P4 and P5-P7, regrouped due to their extremely broad expression profile
 220 (**Fig. 4D, Table S1**): cluster P1-4 corresponds to 215 genes transiently expressed in the testis
 221 during its maturation and predominantly down-regulated in cultured tissues and cluster P5-7
 222 corresponds to 385 genes poorly expressed during the maturation process but up-regulated in
 223 cultured tissues (**Fig. 4D, Table S1**).

224

225 **The functional analysis revealed associations with specific biological processes**

226 In order to investigate the molecular pathways involved in this defective maturation process,
 227 we performed a functional analysis based on a GO (Gene Ontology) enrichment on the seven
 228 resulting expression patterns. This functional analysis highlighted 1,056 enriched GO terms
 229 (**Table S2**) significantly associated with the P1-4 and P5-7 patterns, among which 35 biological
 230 processes have been selected for representation (**Fig. 5A**). Out of the 215 genes belonging to
 231 the P1-4 pattern, 42 are involved in reproductive process (p value $< 4.58E-06$), 52 in cell cycle
 232 ($4.13E-25$) and 58 in cell differentiation (0.037) (**Fig. 5A**). The P1-4 pattern was also found to
 233 be enriched in genes involved in chromosome segregation (number of genes = 29,
 234 p value $< 9.23E-18$), cell cycle checkpoint (11, 0.0002) as well as genes involved in
 235 metaphase/anaphase transition (7, 0.0002) (**Fig. 5A**), reflecting the clear defect in synaptonemal
 236 complex organization. The 385 genes downregulated in *in vivo* controls and gradually

237 upregulated during the culture process (pattern P5-7) (**Fig. 4D**) appeared to be mainly involved
 238 in general mechanisms such as tissue development (66, 7.97E-07), cell development (52,
 239 0.007), cell death (71, 6.24E-08), stress (110, 4.52E-09) or inflammation (16, 0.007) (**Fig. 5A**).
 240 Interestingly, more specific terms which may influence spermatogenesis are also enriched.
 241 Indeed, due to the culture condition, explants were exposed to a more harmful environment
 242 than under physiological conditions, with a direct exposure to oxygen, and finally oxidative
 243 stress. It was reflected by a significant association with the oxygen level GO term (26, 3.30E-
 244 05) (**Fig. 5A**). Also, genes whose expression could be affected by the culture media and its
 245 supplementation were enriched for gene sets involved in nutrient level (32, 0.0003), response
 246 to hormonal stimulation (54, 2.10E-07) as well as growth factors (26, 0.0008) (**Fig. 5A**).
 247 By exploring these gene sets with a manual bibliography, we identified 102 genes clearly
 248 related to spermatogenesis and/or SSC (Spermatogonial Stem Cell) maintenance. Among them,
 249 51 belongs to the pattern P1-4 and 51 to the pattern P5-7 (**Table 1, Table S3**). The top-15 most
 250 differentially expressed genes (according to their adjusted F-values) associated with
 251 spermatogenesis were *Cyp17a1*, *Insl3*, *Tesk1*, *Cdc34*, *Kif11*, *Ube2c*, *Incenp*, *Plk1*, *Ccnf*, *Cks2*,
 252 *Alox15*, *Bub1b*, *Ccna2*, *Cbx2* and *Aspm* for the pattern P1-4 (**Table 1**), *Mmp9*, *Vldlr*, *Nr1d1*,
 253 *Igfbp3*, *Cxcl10*, *Abca1*, *Fstl3*, *Wnt4*, *Cd14*, *Ctsh*, *Stat3*, *Cx3cl1*, *Kdr*, *Srebfl1* and *Tf* for the
 254 pattern P5-7 (**Table 1**). At least 43 out of 102 genes related to gametogenesis were expressed
 255 in spermatocytes, which included 6 genes (*Cbx2*, *Sohlh2*, *Tex12*, *Trip13*, *Plk1* and *Plk2*) related
 256 to the synaptonemal complex. Most of them were down-regulated in cultured tissues, and may
 257 be related to the synapsis defect observed *in vitro* (**Table 1, Table S3**).
 258 Moreover, genes involved in DSBs and crossover formation (*Top2a*, *Eme1*, *Trip13* and *Bard1*)
 259 were down-regulated (**Table 1, Table S3**). These gene expression patterns were consistent with
 260 our previous observations. In addition, numerous genes related to inflammation and stress
 261 response pathway were deregulated such as *Cxcl10*, *Cd14*, *Cx3cl1*, *Alox15*, *Ccl2*, *Ccl5*, *Socs3*

262 and *Fcgr3a* (**Table 1, Table S3**). The immunological response of the tissue is extremely
263 important for its protection but could induce in some cases an immunological sterility (Fijak et
264 al., 2011; Jiang et al., 2014). The recruitment of immune cells by the interstitium **appeared** to
265 be extremely stimulated under our culture condition (**Table 1, Table S3**). However, some genes
266 involved in tissue growth and tissue homeostasis were upregulated (*Srebfl1*, *Slc2a1*, *Igf2* and
267 *Igfbp3*) in response to the nutrients provided by the culture media, reflecting the beginning of
268 testicular cell maturation (**Table 1, Table S3**). In that respect, we observed an overexpression
269 of genes involved in reorganization of the BTB junctions (*Icam1*, *Ctsl*, *Mmp9*, *Mmp2* and
270 *Spp1*), which are essential for spermatogenic differentiation (**Table 1, Table S3**). In
271 contradiction with RIA data, we observed a significant down-regulation of key steroidogenic
272 enzymes (*Cyp17a1*, *Cyp11a1* and *Hsd3b1*) – aiming to produce progesterone from circulating
273 cholesterol – in cultured tissues (**Table 1, Table S3**). In addition, genes involved in the
274 regulation of steroidogenesis (*Shbg*, *Pdpm*, *Lpar1*, *Apoe*, *Adrb1*, *Igfbp3*, *Adm*, *Hsd11b1*, *Ngfr*
275 and *Nr1d1*) were all up-regulated, suggesting a weak testosterone production by Leydig cells
276 (**Table 1, Table S3**). Finally, at least 52 genes out of 102 are involved in cell cycle processes,
277 such as SSC self-renewal (*Ccna2*, *Igf2*, *Epha2*), spindle organization and chromosomal
278 segregation (*Kif11*, *Aspm*, *Cdca2*, *Haus7*), cell cycle checkpoint (*Ube2c*, *Incenp*, *Plk1*, *Bub1b*)
279 or meiotic entry (*Vldlr*, *Nr1d1*, *Rbp1*) (**Table 1, Table S3**).

280 In summary, our cultured tissues were characterized by an upregulation of genes involved in
281 tissue response to stress with the inflammation response and cell death. As expected, a
282 deregulation of genes involved in meiotic cells and cell cycle progression was observed.

283 The expression pattern of selected spermatogenesis-related genes was confirmed for the most
284 part in 14.5 dpp testes and cultured explants by RT-qPCR. Indeed, our data showed a significant
285 decrease in *Cbx2*, *Cks2*, *Top2a* and *Ube2c* mRNA levels during culture (**Fig. S3**). Consistently
286 with RNA-seq data, similar *Dlk1* mRNA levels were found in 14.5 dpp and *in vitro* cultured

287 tissues, whereas *Ngfr* mRNA levels were deregulated in organotypic cultures (**Fig. S3**).
288 However, differences in *Bub1b* and *Sohlh2* mRNA levels were observed between RNA-seq and
289 RT-qPCR analyses (**Fig. S3**). In general, qRT-PCR data were found to have similar tendency
290 with results received by RNA-seq. Information's about relative primers are available in
291 supplementary figure (**Table S4**).

292

293 **The *in vitro* maturation process was associated with the inflammatory process**

294 To identify a potential common regulator of these genes, the upstream regulator tool from
295 *Ingenuity Pathway Analyses* (IPA) software was used. IPA analyses clearly demonstrated that
296 zinc finger and BTB domain containing 17 (ZBTB17), tumor necrosis factor (TNF) and
297 CCAAT/enhancer binding protein beta (CEBPB) were the top 3 predicted upstream regulators
298 of the 594 deregulated genes between 14.5 *dpp* and D28 cultured tissues, among the 600
299 candidate genes (**Fig. 5B, Table S5**). Most of the top 10 predicted upstream regulators were
300 involved in inflammatory process or immune cell recruitment. These results suggest that the
301 maturation arrest observed *in vitro* was associated with a strong response of the local
302 inflammatory system, probably generated by the resident macrophages.

303

304 **Discussion**

305 The current study, explored the *in vitro* maturation of rat prepubertal testicular tissues at the
306 molecular level in order to unravel the mechanisms underlying meiotic arrest observed *in vitro*.
307 Indeed, although organotypic culture has proven to be a promising approach to generate
308 spermatozoa from immature tissues in the mouse model, a complete *in vitro* spermatogenesis
309 has not yet been achieved on agarose gels in other species, including rat and human prepubertal
310 testicular tissues, thereby delaying its use in the clinics for fertility restoration of survivors of
311 childhood cancer.

312 Consistently with our previous findings (Saulnier et al., 2020), no germ cells beyond the
313 pachytene spermatocyte stage have been observed in rat organotypic cultures. *In vitro* cultured
314 tissues were analyzed at D28 (corresponding *in vivo* time point 36.5 dpp), time at which round
315 spermatids should be detected in seminiferous tubules. The proliferative activity of intratubular
316 cells was maintained under the culture conditions. However, because of the meiotic blockage,
317 a significant decrease in germ cell content was found within seminiferous tubules compared to
318 age-matched *in vivo* controls. Although more tubules showed DNA fragmentation when
319 comparing *in vitro* to *in vivo* conditions, few pachytene spermatocytes were TUNEL positive,
320 suggesting that either apoptosis occurred after this stage or that pachytene spermatocytes
321 presenting abnormalities were phagocytosed by Sertoli cells (Nakagawa et al., 2005). In another
322 study (Reda et al., 2016), very few round spermatids were obtained after *in vitro* maturation of
323 rat prepubertal testes.

324 Two distinct meiotic arrest mechanisms occur during the prophase of male meiosis have
325 been described in human (Jan et al., 2018): (i) type I arrested spermatocytes are characterized
326 by the absence of a discernible XY body and a dispersed γ H2AX nuclear staining, (ii) type II
327 arrested spermatocytes display normal features, i.e. the presence of an XY body displaying
328 γ H2AX staining. Here, the arrested rat spermatocytes displayed an indistinguishable XY body
329 formation due to a zygotene-like phenotype of the γ H2AX staining. The cytological analyses
330 of the rat spermatocytes generated *in vitro* moreover revealed a disorganization of the
331 synaptonemal complex and asynapsis, which are known to induce a defect in the recruitment
332 of ATR and BRCA1, thereby leading to a defective inactivation of XY chromosomes and to
333 apoptosis (Mahadevaiah et al., 2008).

334 Meiotic arrest could be due to a genetic mutation (Hung et al., 2007; Jiao et al., 2021), hypoxia
335 (Gat et al., 2010) or hormonal deregulation (Weedin et al., 2011). In order to overcome the
336 maturation arrest, it is essential to understand the molecular mechanisms that are deregulated

337 during *in vitro* culture. Interestingly, our bulk RNA-Seq analyses revealed that D16, D22 and
338 D28 cultured tissues showed immature features, with transcriptomic profiles close to 14.5 *dpp*
339 *in vivo* controls. A total of 600 DEGs were identified between *in vitro* and *in vivo* matured
340 testicular tissues. Using gene ontology analyses, different GO terms in relation with
341 spermatogenesis or tissue homeostasis were highlighted. Moreover, IPA analyses performed on
342 our dataset led to the identification of predictive upstream regulators. We found that the top ten
343 upstream regulators were involved in inflammation and in regulation of spermatogenesis.
344 Among them, TNF α is partly produced by macrophages to promote the inflammatory process,
345 and its expression is accompanied by the production of ROS or chemokines (Syriou et al.,
346 2018). In addition, TNF α has been shown to be activated by the NF- κ B signalling pathway
347 which contributes to immune cell survival and proliferation, followed by the production of
348 various cytokines (Zhao et al., 2014). These results are consistent with a recent transcriptomic
349 analysis that revealed the presence of a drastic and overwhelming immune reaction involving
350 the TLR4-NF- κ B signalling pathway in cultures of prepubertal mouse testicular tissues (Abe
351 et al., 2020). Moreover, we have previously shown that cytoplasmic and nuclear ROS are
352 generated in *in vitro* cultured mouse testes (Arkoun et al., 2019). Cytokines have been shown
353 to regulate the steroidogenic function of Leydig cells by modulating testosterone production
354 (Hedger and Meinhardt, 2003; Winter et al., 2014). A downregulation of steroidogenic genes
355 (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*) was evidenced in organotypic cultures in the current study.
356 Cytokines also regulate the permeability of the blood-testis barrier by restructuring gap
357 junctions (Lie et al., 2011; Yan et al., 2008; Yáñez-Mó et al., 2015).

358 Very recently, Matsumura and colleagues have reported the production of round spermatids
359 from rat prepubertal testicular tissues with an optimized version of the organotypic culture
360 system, which uses polydimethylsiloxane ceiling chips, lower oxygen concentration and
361 supplementation of culture medium with hormones, antioxidants and lysophospholipids

362 (Matsumura et al., 2021). By countering inflammation in agreement with our transcriptomic
363 data and using these optimized culture conditions, an increased number of round spermatids
364 could thus be generated *in vitro*.

365 In conclusion, through a combination of histological and molecular analyses, we deciphered for
366 the first time the underlying mechanisms of meiotic arrest observed in cultures of rat
367 prepubertal testicular tissues. Our data converge towards the possibility of a very strong impact
368 of the inflammatory process and of the deregulation of genes related to this process on the
369 meiotic progression of germ cells. The exploitation of all the transcriptomic data obtained in
370 this study will be useful to further optimize the *in vitro* tissue maturation protocol, particularly
371 the crucial meiotic step, before considering a clinical application.

372

373 **Materials and Methods**

374

375 Animal care and handling

376 All the experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use
377 Committee of Rouen Normandy University under the license/protocol number 26016-
378 2020061209299793. Rats were housed in a temperature- and humidity-controlled environment,
379 under a 12h light/dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*. Pubertal and adult rats
380 were euthanized by CO₂ asphyxiation, whereas pups aged 8.5 *dpp* were decapitated.

381

382 Animals and tissue samples

383 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle,
384 France) and bred in our animal facility. After euthanasia, testes were biopsied and rinsed in
385 α MEM (Gibco Life Technologies, Saint-Aubin, France) at 4°C. The tunica albuginea was
386 removed with two needles under a binocular magnifier (S8AP0, Leica Microsystems, Wetzlar,
387 Germany).

388 For organotypic cultures, testicular tissues were collected at 8.5 *dpp* and prepared as described
389 below. For histology and immunohistochemistry, tissues from *in vivo* controls or from *in vitro*
390 cultures were fixed at room temperature in Bouin's fixative solution (Sigma-Aldrich, Saint-
391 Quentin Fallavier, France) or 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich). They were then
392 dehydrated in successive ethanol/xylene baths, embedded in paraffin and cut into thin sections
393 (3 μ m thick). After two xylene baths, tissue sections were rehydrated in successive descending
394 ethanol baths and plunged into PBS. For immunocytological analyses, cells from *in vivo*
395 controls or cultured explants were spread onto glass slides. For molecular analyses, the central
396 necrotic area in cultured explants was removed with two thin needles, before storage into liquid
397 nitrogen.

398

399 Organotypic cultures

400 Testicular explants were cultured using the gas-liquid interphase method as described before
401 (Saulnier et al., 2020). Briefly, 8.5 *dpp* testes were cut into 6 fragments and cultured onto
402 agarose gels (Sigma-Aldrich) in 6-well plates (ThermoFisher Scientific, Saint-Aubin, France).
403 The day before the beginning of each culture, agarose gels were soaked completely in basal
404 medium (α MEM + 0.01% gentamicin) and kept overnight in the incubator (Sato et al., 2011;
405 Saulnier et al., 2020). (Arkoun et al., 2015; Reda et al., 2016) Tissues were maintained under
406 5% CO₂-95% air at 34°C for 6, 16, 22 or 28 days. The culture medium was composed of α MEM
407 supplemented with 10% Knock-out serum replacement (Gibco Life Technologies), 10⁻⁶ M
408 retinol (Sigma-Aldrich) and 3.4 mM vitamin E (Sigma-Aldrich). The medium was prepared
409 and replaced every 3-4 days. Juvenile male rats at 14.5, 24.5, 30.5 and 36.5 *dpp* were used as
410 *in vivo* controls.

411

412 Histological and immunohistochemical analyses

413 Hemalun-Eosin-Saffron staining was performed to identify the different meiotic germ cells and
414 division figures (Clermont, 1972). Data representing the most advanced stage of differentiation
415 were analyzed with the Kruskal-Wallis test to determine significant differences.

416 All the antibodies used in this study for immunohistochemical analyses are presented in **Table**
417 **S6**. For γ H2AX immunostaining, tissue sections fixed with Bouin's solution were incubated in
418 citrate buffer at 96°C for 10 minutes for antigen retrieval and cooled down for 5 minutes at RT.
419 After rinsing with distilled water, endogenous peroxidases were blocked with HP block (Dako,
420 Les Ulis, France) for 15 minutes at RT. After 3 washes in PBST, nonspecific binding sites were
421 then blocked for 30 minutes at RT with 20% goat serum, 5% BSA in PBS-Tween 0.05%. Tissue
422 sections were incubated for 2 hours at RT with anti- γ H2AX antibodies diluted in blocking

423 buffer. Subsequently, primary antibodies were detected with polyvalent secondary antibodies
424 for 5 minutes at RT. Staining was achieved after incubation with a streptavidin-horseradish
425 peroxidase solution (ThermoFisher Scientific) for 15 minutes at RT followed by 3,3'-
426 diaminobenzidine substrate for 30 seconds at RT. After nuclear counterstaining with
427 hematoxylin (Diapath), sections were dehydrated in successive ethanol baths of increasing
428 concentrations, followed by two xylene baths and mounting with Eukitt (Sigma-Aldrich).

429 To assess cell proliferation (Ki67) and germ cell (DDX4)/Sertoli cell ratio, tissues sections were
430 subjected to a standard immunofluorescence protocol as described below. Tissue sections fixed
431 in PFA were incubated in citrate buffer (Diapath) at 96°C for 40 minutes and cooled for
432 20 minutes at RT. After rinsing in distilled water, sections were permeabilized in PBS-
433 Triton X-100 0.01% for 15 minutes at RT (only for Ki67). To avoid nonspecific staining,
434 sections were blocked with 5% BSA + 5% horse serum (Ki67) or with 20% goat serum +
435 5% BSA (DDX4). Slides were then incubated overnight with primary antibodies at 4°C.
436 Negative controls were performed with pre-immune IgGs. After 3 washes in PBST, sections
437 were incubated with secondary antibodies coupled to Alexa Fluor® 488 for 1 hour at RT.
438 Sections were rinsed, dehydrated with ethanol and mounted in Vectashield (Vector, Eurobio,
439 Les Ulis, France) with Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific).

440 To detect DNA fragmentation and spermatocytes in the same samples, tissue sections were first
441 subjected to TUNEL assays (*In Situ* Cell Death kit POD, Roche, Mannheim, Germany),
442 following the manufacturer's instructions. Then, sections were post-fixed with 4% PFA for
443 15 minutes at RT and finally underwent the standard immunofluorescence protocol described
444 above (without the permeabilization step). Rabbit anti-SYCP3 antibodies were used and
445 revealed with secondary antibodies coupled to Alexa Fluor® 594. Positive controls were
446 performed with DNase I before TUNEL assays and negative controls were carried out by
447 omitting the enzyme solution (TUNEL) or with pre-immune IgGs (SYCP3 immunostaining).

448 Histological analyses were conducted on 6 replicates. For each replicate, at least 2 levels of the
449 testis/explant and 30 seminiferous tubules were analyzed. Each level was separated by at least
450 30 μ m. For each *in vitro* replicate, 2-3 testicular explants were analyzed. In total, approximately
451 360 tubules were counted for *in vivo* controls and at least 720 for the *in vitro* condition, per
452 analysis. The Kruskal-Wallis test was used to determine significant differences.

453

454 Chromosome spreads

455 Preparations of meiotic chromosome spreads from rat spermatocytes were adapted from
456 previously published protocols (Milazzo et al., 2006; Peters et al., 1997) with slight
457 modifications. Briefly, testicular tissue fragments from *in vivo* controls and *in vitro* cultured
458 testicular explants were placed into a hypotonic extraction buffer (30 mM Tris, 50 mM sucrose,
459 17 mM sodium citrate, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM
460 phenylmethanesulfonyl fluoride, 118 mM potassium chloride, pH 8.2) for 40 to 60 minutes at
461 RT. Fragments were then placed on a 20 μ L drop of 100 mM sucrose and the central necrotic
462 area from *in vitro* cultured testicular explants was removed (2-3 explants per drop). Tissues
463 were mechanically dispersed with two needles to obtain a cell suspension. After adding a 20 μ L
464 drop of sucrose solution and removing the remnant seminiferous tubules, cells were gently
465 resuspended and spread (according to the drying-down technique) onto two Superfrost Plus
466 glass slides previously coated with 1% PFA + 0.15% Triton X-100. Nuclei were air dried at
467 least 2 hours in a humidified chamber. Finally, preparations were washed twice for 2 minutes
468 in freshly prepared 0.4% Photoflo (Kodak) and dried at RT. Preparations were stored at -20°C
469 and used within 2 weeks.

470

471 Analysis of chromosome synapsis

472 After 2 minutes at 37°C, chromosome spreads were rehydrated in PBST for SYCP3/SYCP1
473 immunostaining or in successive Triton X-100 baths (5 minutes in PBS + 0.5% Triton-100, 5
474 minutes in PBS + 0.05% Triton X-100) for SYCP3/ γ H2AX immunostaining. Spreads were
475 blocked for 30 minutes at RT with 5% BSA + 5% horse serum in PBS (SYCP3/SYCP1) or with
476 2% BSA + 0.05% Triton-X100 in PBS (SYCP3/ γ H2AX). They were then incubated overnight
477 with primary antibodies at 4°C (SYCP3/SYCP1) or RT (SYCP3/ γ H2AX) in a humidified
478 chamber. Negative controls were performed with pre-immune antibodies. After 3 washes,
479 preparations were incubated with appropriate secondary antibodies. Biotin was revealed with
480 Alexa Fluor® 594 coupled to streptavidin for 30 minutes at RT. Preparations were rinsed,
481 dehydrated with ethanol and mounted in Vectashield (Vector). The slides were sealed with
482 polish for confocal microscopy.

483 For the analysis of chromosome synapsis, spermatocytes were isolated from at least three
484 36.5 *dpp* control rat testes and D28 *in vitro* cultured tissues. The Chi² test was used to determine
485 significant differences.

486

487 Classification of prophase I stages

488 The classification was performed as previously described (Ishishita et al., 2014). Briefly,
489 spermatocyte stages were identified by the morphology of the lateral elements (LE) revealed
490 by SYCP3 immunostaining. At the early leptotene stage, LE appear as thin, dot-like fragments.
491 At the leptotene stage, they are numerous and appear as short fragments. At the zygotene stage,
492 LE elongate to form filaments. At the early zygotene stage, synapsis are not apparent or only
493 in few and short fragments. The mid-zygotene stage is characterized by synapsis extension. At
494 the late zygotene stage, LE are shorter than in mid-zygotene and almost all the chromosomes
495 are synapsed extensively with their homologs, only few areas are not yet synapsed. At the

496 pachytene stage, LE are shorter and all the chromosomes are synapsed. At the diplotene stage,
497 synapsed LE begin to be released and chiasmata can be observed.

498

499 Microscopy analysis

500 HES-stained testicular tissues were analyzed with a DM4000B light microscope (Leica
501 Microsystems) equipped with a Leica Application Suite software (LAS; Leica Microsystems).
502 Confocal images (1024×1024 pixels) of meiotic chromosome spreads were acquired using an
503 upright fixed-stage Leica TCS SP8 CFS confocal microscope (Leica Microsystems) equipped
504 with diode lasers (Coherent, Les Ulis, France) at 488 nm to excite Alexa Fluor 448® and at
505 552 nm to excite Alexa Fluor 594® and a conventional scanner at 400 Hz. Using a 63x (1.40,
506 oil immersion) fluorescence emission was sequentially detected through a hybrid detector
507 (Leica Microsystems) in a photon counting mode with a specific band from XXX to XXX nm
508 for Alexa Fluor 488® and XXX to XXX nm for Alexa Fluor 594®. Z-stack images were
509 acquired using an adapted step-size from Nyquist Criteria. ImageJ (Rasband W.S., U.S.
510 National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2020)
511 was used to adjust brightness and contrast and to perform z projections of 3D images (xyz).

512

513 Radioimmunoassay (RIA)

514 Intratesticular testosterone levels and release of testosterone into the organotypic culture media
515 were measured by RIA (IM1087; Beckman Coulter, Villepinte, France) according to the
516 manufacturer's instructions. Hormone levels were measured at D0, D6, D16, D22 and D28 in
517 cultured testicular explants and culture media, and at 14.5 *dpp*, 24.5 *dpp*, 30.5 *dpp* and 36.5 *dpp*
518 in control testes. Freshly prepared media were used as controls. Six different animals were used
519 per condition and all samples were analyzed in duplicates. RIA had a lower sensitivity of

520 0.05 ng/mL with an intra- and inter-assay variation coefficient \leq 11.6 and 13.5%, respectively.

521 The Mann-Whitney test was used to determine significant differences.

522

523 RNA extraction

524 Total RNA was extracted using RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the

525 manufacturer's instructions and stored at -20°C until use. Genomic DNA was removed by

526 incubation with Turbo DNase (Invitrogen) and RNA quality control was performed before RNA

527 sequencing and RT-qPCR on Agilent Bioanalyzer (Les Ulis, France). All the samples chosen for

528 the analyses displayed an RNA Integrity Number (RIN) value greater than or equal to 8.5.

529

530 RNA-seq library preparation and sequencing

531 RNA-Seq libraries were generated from 400 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA

532 LT Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA), according to the manufacturer's

533 instructions. Briefly, following purification with poly(T)-oligo attached magnetic beads,

534 mRNA was fragmented using divalent cations at 94°C for 2 minutes. The cleaved RNA

535 fragments were copied into first strand cDNA using reverse transcriptase and random primers.

536 Strand specificity was achieved by replacing dTTP with dUTP during second strand cDNA

537 synthesis using DNA polymerase I and RNase H. Following addition of a single 'A' base and

538 subsequent ligation of the adapter on double stranded cDNA fragments, the products were

539 purified and enriched with PCR (30 seconds at 98°C; [10 seconds at 98°C, 30 seconds at 60°C,

540 30 seconds at 72°C] \times 12 cycles; 5 minutes at 72°C) to create the cDNA library. The excess

541 of PCR primers was further removed by purification using AMPure XP beads (Beckman-

542 Coulter) and the final cDNA libraries were checked for quality and quantified using capillary

543 electrophoresis. Libraries were then single-read sequenced with a length of 50 bp on an Illumina

544 Hiseq4000 sequencer. Image analysis and base calling were carried out using RTA v.2.7.7 and
545 bcl2fastq v.2.17.1.14.

546 For each time point, three independent sets of total RNA were isolated and used as a template
547 for RNA-seq library preparation. In addition, for each cultured sample, testicular tissue
548 fragments originated from a minimum of 3 juvenile males. Thus, a minimum of 9 animals per
549 time point was used to minimize/normalize the effect of genetic variability. The Kruskal-
550 Wallis test was used to determine significant differences.

551

552 RNA-seq analysis

553 *Read mapping.* Reads from each individual sample were aligned to the rn6 release of the rat
554 genome with STAR (version 2.5.2a) (Dobin et al., 2013) using previously published approaches
555 (Chalmel et al., 2014; Pauli et al., 2012; Trapnell et al., 2012; Zimmermann et al., 2015).
556 Briefly, STAR program was first run for each fastq file, using the RefSeq transcript annotation
557 (GTF format) of rat genome (release rn6) downloaded in November 2017. Exon junction
558 outputs were then added to a splice junction set. STAR was next run a second time
559 complemented by the splice junction dataset to produce a final alignment file (BAM format)
560 for each sample.

561 *Transcriptome quantification.* RefSeq transcripts were quantified with StringTie (version
562 1.3.3), with default settings applied (Pertea et al., 2016). Transcript abundances were next
563 normalized with Ballgown (available in the StringTie suite), expressed as reads per kilobase of
564 exon model per million reads mapped (RPKM).

565 *Principal component analysis.* Principal component analysis (PCA) was performed based on
566 the gene abundance values with the FactoMineR package to graphically evaluate the
567 distribution of sequenced samples (Lê et al., 2008).

568 *Statistical filtration and clustering analysis.* The statistical filtration of the genes showing a
569 differential expression (DE) across experimental samples was performed using AMEN
570 (Chalmel and Primig, 2008). Out of 17'322 genes in the dataset, we first selected 11,701
571 “detectable” or “expressed” genes, defined as those for which abundance levels exceeded 0.5
572 RPKM in at least one experimental condition (median value of sample duplicates). The D6
573 condition was removed due to the differences in cellular composition (**Fig. S4**). Next, we
574 compared 14.5 *dpp* testicular tissue samples to D16, D22 and D28 cultured tissue conditions
575 and selected 1,490 genes yielding at least one-fold change greater or equal to 2.0 (median values
576 of sample duplicates). A Linear Models for Microarray Data (LIMMA) statistical test was used
577 to identify 1,240 genes with significant abundance variations across samples (F-value adjusted
578 with the FDR method: $P \leq 0.05$) (Smyth, 2004). Finally, we intersected the three sets of DEGs
579 to select 600 genes showing significant differential abundances in all three comparisons. The
580 resulting 600 genes were next clustered into seven expression patterns (P1-P7) with the
581 unsupervised HCPC algorithm, respectively (Lê et al., 2008). The resulting patterns were
582 ordered according to peak expression levels in the different cell types.

583

584 Functional analysis

585 AMEN (Chalmel and Primig, 2008) was used to calculate the Fisher exact probability, and the
586 Gaussian hypergeometric test to identify significantly enriched terms from the gene ontology
587 in the seven expression patterns (P1-P7). A specific annotation term was considered enriched
588 in a group of coexpressed genes if the P value was <0.01 and the number of genes in this cluster
589 showing this annotation was >5 . Upstream regulator analysis was performed using the
590 Ingenuity Pathway Analysis software (Ingenuity, Qiagen).

591

592 Validation of the transcriptome data by RT-qPCR

593 To check the accuracy of the transcriptome data, DEGs identified as important for the process
594 of spermatogenesis were selected for RT-qPCR. Each reaction was performed using three
595 technical replicates and three biological replicates for the robustness of our analysis. Briefly,
596 after RNA extraction, RNA integrity was analyzed by capillary gel electrophoresis on RNA
597 6000 Nano chips (Agilent Technologies, Courtabœuf, France) with the Bioanalyzer 21 000
598 (Agilent Technologies).

599 *Reverse transcription.* cDNA synthesis was performed using qScript™ cDNA SuperMix
600 (Quanta Biosciences by VWR, Fontenay-sous-Bois, France) according to the manufacturer's
601 instructions using the following program: 5 minutes at 25°C, 30 minutes at 42°C and 5 minutes
602 at 85°C.

603 *qPCR.* cDNA amplifications were carried out in a total volume of 13 µl containing 6 ng of
604 cDNA templates, 6.5 µl of SYBR Green (ThermoFisher Scientific) and 300 nM of each primer.
605 Specific primers are listed in **Table S4**. Samples were dispensed using the Bravo pipetting robot
606 (Agilent Technologies). Reactions were performed in 384-well plates (Life Technologies) in a
607 QuantStudio 12K Flex system . The amplification condition was 20 seconds at 95°C followed
608 by 40 cycles (1 second at 95°C, 20 seconds at 60°C) and a final step of denaturation of 15
609 seconds at 95°C, 1 minute at 60°C and 15 seconds at 95°C. Melting curves were also obtained
610 to ensure the specificity of PCR amplifications. The size of the amplicons was verified by
611 agarose gel electrophoresis (E-gel 4%, Life Technologies). The relative expression level of each
612 gene was normalized to two housekeeping genes as recommended by the MIQE guidelines
613 (Bustin et al., 2009): *Gapdh* and actin β (*Actb*), which were identified and validated as the most
614 stable and suitable genes for RT-qPCR analysis in rodent testis development (Gong et al., 2014).
615 Data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The Kruskal-Wallis
616 test was used to determine significant differences.

617

618 **Acknowledgements**

619 The authors are grateful to Damien Schapman and Ludovic Galas for their technical advices
620 during the confocal microscopy acquisitions. PCR data and confocal microscopy images were
621 obtained at PRIMACEN (<http://primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, IRIB,
622 Faculty of Sciences, Rouen Normandy University, 76281 Mont-Saint-Aignan.

623

624 **Author's contributions**

625 JS designed the study, performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript; FC
626 performed bioinformatic analyses, analyzed data and revised the manuscript; FZ performed
627 RIA experiments and revised the manuscript; LM, MD, LD, ARF revised the manuscript; NR and
628 CR designed the study, obtained the financial support, supervised the study and revised the
629 manuscript. All the authors approved the final version of the manuscript.

630

631 **Competing interest**

632 No competing interest declared

633

634 **Funding**

635 This work was supported by a PhD grant from Rouen Normandy University (awarded to Justine
636 Saulnier) and funding from Fondation de l'Avenir under Grant # AP-RM-18-031, 2021
637 (awarded to Nathalie Rives).

638

639 **Data availability**

640 Raw data files (fastq) and expression data for all transcripts have been submitted to the NCBI
641 Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number **GSEXXXX**. All data are also

642 conveniently accessible through the ReproGenomics Viewer (Darde et al., 2015; Darde et al.,
643 2019).

644 References

645 **Abe, T., Nishimura, H., Sato, T., Suzuki, H., Ogawa, T. and Suzuki, T.** (2020). Transcriptome
646 analysis reveals inadequate spermatogenesis and immediate radical immune reactions during
647 organ culture in vitro spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

648 **Adams, R. R., Eckley, D. M., Vagnarelli, P., Wheatley, S. P., Gerloff, D. L., Mackay, A. M.,
649 Svingen, P. A., Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C.** (2001). Human INCENP colocalizes with
650 the Aurora-B/AIRK2 kinase on chromosomes and is overexpressed in tumour cells.
651 *Chromosoma* **110**, 65–74.

652 **Aghazadeh, Y., Zirkin, B. R. and Papadopoulos, V.** (2015). Pharmacological regulation of the
653 cholesterol transport machinery in steroidogenic cells of the testis. *Vitam. Horm.* **98**, 189–227.

654 **Arkoun, B., Dumont, L., Milazzo, J.-P., Way, A., Bironneau, A., Wils, J., Macé, B. and Rives,
655 N.** (2015). Retinol improves in vitro differentiation of pre-pubertal mouse spermatogonial
656 stem cells into sperm during the first wave of spermatogenesis. *PLoS ONE* **10**, e0116660.

657 **Arkoun, B., Galas, L., Dumont, L., Rives, A., Saulnier, J., Delessard, M., Rondanino, C. and
658 Rives, N.** (2019). Vitamin E but Not GSH Decreases Reactive Oxygen Species Accumulation and
659 Enhances Sperm Production during In Vitro Maturation of Frozen-Thawed Prepubertal Mouse
660 Testicular Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5380.

661 **Aubry, F., Habasque, C., Satie, A. P., Jégou, B. and Samson, M.** (2000). Expression and
662 regulation of the CXC-chemokines, GRO/KC and IP-10/mob-1 in rat seminiferous tubules. *Eur.
663 Cytokine Netw.* **11**, 690–698.

664 **Barchi, M., Mahadevaiah, S., Di Giacomo, M., Baudat, F., de Rooij, D. G., Burgoyne, P. S.,
665 Jasin, M. and Keeney, S.** (2005). Surveillance of different recombination defects in mouse
666 spermatocytes yields distinct responses despite elimination at an identical developmental
667 stage. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7203–7215.

668 **Baudat, F., Manova, K., Yuen, J. P., Jasin, M. and Keeney, S.** (2000). Chromosome Synapsis
669 Defects and Sexually Dimorphic Meiotic Progression in Mice Lacking Spo11. *Mol. Cell* **6**, 989–
670 998.

671 **Baumann, C. and De La Fuente, R.** (2011). Role of polycomb group protein cbx2/m33 in

672 meiosis onset and maintenance of chromosome stability in the Mammalian germline. *Genes*
673 **2**, 59–80.

674 **Ben-Eliezer, I., Pomerantz, Y., Galiani, D., Nevo, N. and Dekel, N.** (2015). Appropriate
675 expression of Ube2C and Ube2S controls the progression of the first meiotic division. *FASEB J.*
676 **29**, 4670–4681.

677 **Bhattacharya, I., Basu, S., Pradhan, B. S., Sarkar, H., Nagarajan, P. and Majumdar, S. S.**
678 (2019). Testosterone augments FSH signaling by upregulating the expression and activity of
679 FSH-Receptor in Pubertal Primate Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **482**, 70–80.

680 **Blanco-Rodríguez, J.** (2009). γ H2AX marks the main events of the spermatogenic process.
681 *Microsc. Res. Tech.* **72**, 823–832.

682 **Blangy, A., Lane, H. A., d'Hérin, P., Harper, M., Kress, M. and Nigg, E. A.** (1995).
683 Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related
684 motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* **83**, 1159–1169.

685 **Bolcun-Filas, E., Hall, E., Speed, R., Taggart, M., Grey, C., de Massy, B., Benavente, R. and**
686 **Cooke, H. J.** (2009). Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link
687 between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet.* **5**,
688 e1000393.

689 **Bott, R. C., Clopton, D. T., Fuller, A. M., McFee, R. M., Lu, N., McFee, R. M. and Cupp, A. S.**
690 (2010). KDR-LacZ-expressing cells are involved in ovarian and testis-specific vascular
691 development, suggesting a role for VEGFA in the regulation of this vasculature. *Cell Tissue Res.*
692 **342**, 117–130.

693 **Boyer, A., Yeh, J. R., Zhang, X., Paquet, M., Gaudin, A., Nagano, M. C. and Boerboom, D.**
694 (2012). CTNNB1 signaling in sertoli cells downregulates spermatogonial stem cell activity via
695 WNT4. *PloS One* **7**, e29764.

696 **Bromfield, E. G., Mihalas, B. P., Dun, M. D., Aitken, R. J., McLaughlin, E. A., Walters, J. L. H.**
697 **and Nixon, B.** (2017). Inhibition of arachidonate 15-lipoxygenase prevents 4-hydroxynonenal-
698 induced protein damage in male germ cells. *Biol. Reprod.* **96**, 598–609.

699 **Bromfield, E. G., Walters, J. L. H., Cafe, S. L., Bernstein, I. R., Stanger, S. J., Anderson, A. L.,**
700 **Aitken, R. J., McLaughlin, E. A., Dun, M. D., Gadella, B. M., et al.** (2019). Differential cell death
701 decisions in the testis: evidence for an exclusive window of ferroptosis in round spermatids.
702 *Mol. Hum. Reprod.* **25**, 241–256.

703 **Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol

704 content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11041–11048.

705 **Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K. and Turner, J. M. A.** (2009). The consequences of
706 asynapsis for mammalian meiosis. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 207–216.

707 **Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R.,**
708 **Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., et al.** (2009). The MIQE guidelines: minimum
709 information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–
710 622.

711 **Butz, N., Ruetz, S., Natt, F., Hall, J., Weiler, J., Mestan, J., Ducarre, M., Grossenbacher, R.,**
712 **Hauser, P., Kempf, D., et al.** (2005). The human ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 controls
713 cellular proliferation through regulation of p27Kip1 protein levels. *Exp. Cell Res.* **303**, 482–493.

714 **Caires, K. C., de Avila, J. and McLean, D. J.** (2009). Vascular endothelial growth factor regulates
715 germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. *Reprod.*
716 *Camb. Engl.* **138**, 667–677.

717 **Carofiglio, F., Sleddens-Linkels, E., Wassenaar, E., Inagaki, A., van Cappellen, W. A.,**
718 **Grootegoed, J. A., Toth, A. and Baarends, W. M.** (2018). Repair of exogenous DNA double-
719 strand breaks promotes chromosome synapsis in SPO11-mutant mouse meiocytes, and is
720 altered in the absence of HORMAD1. *DNA Repair* **63**, 25–38.

721 **Chalmel, F. and Primig, M.** (2008). The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN)
722 suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics* **9**, 86.

723 **Chalmel, F., Lardenois, A., Evrard, B., Rolland, A. D., Sallou, O., Dumargne, M.-C., Coiffec, I.,**
724 **Collin, O., Primig, M. and Jégou, B.** (2014). High-resolution profiling of novel transcribed
725 regions during rat spermatogenesis. *Biol. Reprod.* **91**, 5.

726 **Chen, J.-X., Xu, L.-L., Wang, X.-C., Qin, H.-Y. and Wang, J.-L.** (2011). Involvement of c-
727 Src/STAT3 signal in EGF-induced proliferation of rat spermatogonial stem cells. *Mol. Cell.*
728 *Biochem.* **358**, 67–73.

729 **Chen, Q., Deng, T. and Han, D.** (2016). Testicular immunoregulation and spermatogenesis.
730 *Semin. Cell Dev. Biol.* **59**, 157–165.

731 **Chihara, M., Otsuka, S., Ichii, O. and Kon, Y.** (2013). Vitamin A deprivation affects the
732 progression of the spermatogenic wave and initial formation of the blood-testis barrier,
733 resulting in irreversible testicular degeneration in mice. *J. Reprod. Dev.* **59**, 525–535.

734 **Choi, E. and Lee, H.** (2008). Chromosome damage in mitosis induces BubR1 activation and
735 prometaphase arrest. *FEBS Lett.* **582**, 1700–1706.

- 736 **Clermont, Y.** (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle
 737 and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* **52**, 198–236.
- 738 **Cobellis, G., Noviello, C., Nino, F., Romano, M., Mariscoli, F., Martino, A., Parmeggiani, P.**
 739 **and Papparella, A.** (2014). Spermatogenesis and cryptorchidism. *Front. Endocrinol.* **5**, 63.
- 740 **Darde, T. A., Sallou, O., Becker, E., Evrard, B., Monjeaud, C., Le Bras, Y., Jégou, B., Collin, O.,**
 741 **Rolland, A. D. and Chalmel, F.** (2015). The ReproGenomics Viewer: an integrative cross-
 742 species toolbox for the reproductive science community. *Nucleic Acids Res.* **43**, W109-116.
- 743 **Darde, T. A., Lecluze, E., Lardenois, A., Stévant, I., Alary, N., Tüttelmann, F., Collin, O., Nef,**
 744 **S., Jégou, B., Rolland, A. D., et al.** (2019). The ReproGenomics Viewer: a multi-omics and cross-
 745 species resource compatible with single-cell studies for the reproductive science community.
 746 *Bioinforma. Oxf. Engl.* **35**, 3133–3139.
- 747 **de Michele, F., Poels, J., Giudice, M. G., De Smedt, F., Ambroise, J., Vermeulen, M., Gruson,**
 748 **D. and Wyns, C.** (2018). In-vitro formation of the blood-testis barrier during long-term
 749 organotypic culture of human prepubertal tissue: comparison with a large cohort of
 750 pre/peripubertal boys. *Mol. Hum. Reprod.*
- 751 **de Rooij, D. G. and de Boer, P.** (2003). Specific arrests of spermatogenesis in genetically
 752 modified and mutant mice. *Cytogenet. Genome Res.* **103**, 267–276.
- 753 **Delessard, M., Saulnier, J., Rives, A., Dumont, L., Rondanino, C. and Rives, N.** (2020).
 754 Exposure to Chemotherapy During Childhood or Adulthood and Consequences on
 755 Spermatogenesis and Male Fertility. *Int. J. Mol. Sci.* **21**,
- 756 **Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M.**
 757 **and Gingeras, T. R.** (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma. Oxf. Engl.*
 758 **29**, 15–21.
- 759 **Dong, Y. -s, Hou, W. -g, Li, Y., Liu, D. -b, Hao, G. -z, Zhang, H. -f, Li, J. -c, Zhao, J., Zhang, S.,**
 760 **Liang, G. -b, et al.** (2016). Unexpected requirement for a binding partner of the syntaxin family
 761 in phagocytosis by murine testicular Sertoli cells. *Cell Death Differ.* **23**, 787–800.
- 762 **Durairajanayagam, D., Agarwal, A. and Ong, C.** (2015). Causes, effects and molecular
 763 mechanisms of testicular heat stress. *Reprod. Biomed. Online* **30**, 14–27.
- 764 **Ellnati, E., Russell, H. R., Ojarikre, O. A., Sangrithi, M., Hirota, T., de Rooij, D. G., McKinnon,**
 765 **P. J. and Turner, J. M. A.** (2017). DNA damage response protein TOPBP1 regulates X
 766 chromosome silencing in the mammalian germ line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 12536–12541.
- 767 **Ergün, S., Kiliç, N., Fiedler, W. and Mukhopadhyay, A. K.** (1997). Vascular endothelial growth

768 factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **131**, 9–20.

769 **Fayomi, A. P., Peters, K., Sukhwani, M., Valli-Pulaski, H., Shetty, G., Meistrich, M. L., Houser,**

770 **L., Robertson, N., Roberts, V., Ramsey, C., et al.** (2019). Autologous grafting of cryopreserved

771 prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science* **363**, 1314.

772 **Ferder, I. C., Fung, L., Ohguchi, Y., Zhang, X., Lassen, K. G., Capen, D., Brown, D., Xavier, R. J.**

773 **and Wang, N.** (2019). Meiotic gatekeeper STRA8 suppresses autophagy by repressing Nr1d1

774 expression during spermatogenesis in mice. *PLoS Genet.* **15**, e1008084.

775 **Fijak, M., Bhushan, S. and Meinhardt, A.** (2011). Immunoprivileged sites: the testis. *Methods*

776 *Mol. Biol. Clifton NJ* **677**, 459–470.

777 **Fischer, K. A., Van Leyen, K., Lovercamp, K. W., Manandhar, G., Sutovsky, M., Feng, D.,**

778 **Safranski, T. and Sutovsky, P.** (2005). 15-Lipoxygenase is a component of the mammalian

779 sperm cytoplasmic droplet. *Reprod. Camb. Engl.* **130**, 213–222.

780 **Fon Tacer, K., Kalanj-Bognar, S., Waterman, M. R. and Rozman, D.** (2003). Lanosterol

781 metabolism and sterol regulatory element binding protein (SREBP) expression in male germ

782 cell maturation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **85**, 429–438.

783 **Forti, G., Barni, T., Vannelli, B. G., Balboni, G. C., Orlando, C. and Serio, M.** (1989). Sertoli cell

784 proteins in the human seminiferous tubule. *J. Steroid Biochem.* **32**, 135–144.

785 **Gao, J. and Colaiácovo, M. P.** (2018). Zipping and Unzipping: Protein Modifications Regulating

786 Synaptonemal Complex Dynamics. *Trends Genet. TIG* **34**, 232–245.

787 **Gat, Y., Gornish, M., Chakraborty, J., Perlow, A., Levinger, U. and Pasqualotto, F.** (2010).

788 Azoospermia and maturation arrest: malfunction of valves in erect poster of humans leads to

789 hypoxia in sperm production site. *Andrologia* **42**, 389–394.

790 **Ghieh, F., Mitchell, V., Mandon-Pepin, B. and Vialard, F.** (2019). Genetic defects in human

791 azoospermia. *Basic Clin. Androl.* **29**, 4.

792 **Giménez-Abián, J. F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J.**

793 **and Peters, J.-M.** (2004). Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms.

794 *Curr. Biol. CB* **14**, 1187–1193.

795 **Gong, Z.-K., Wang, S.-J., Huang, Y.-Q., Zhao, R.-Q., Zhu, Q.-F. and Lin, W.-Z.** (2014).

796 Identification and validation of suitable reference genes for RT-qPCR analysis in mouse testis

797 development. *Mol. Genet. Genomics MGG* **289**, 1157–1169.

798 **Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E. A. and Inagaki,**

799 **M.** (2006). Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase

- 800 transition. *Nat. Cell Biol.* **8**, 180–187.
- 801 **Habasque, C., Satie, A.-P., Aubry, F., Jégou, B. and Samson, M.** (2003). Expression of
 802 fractalkine in the rat testis: molecular cloning of a novel alternative transcript of its gene that
 803 is differentially regulated by pro-inflammatory cytokines. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 449–455.
- 804 **Hao, Z., Zhang, H. and Cowell, J.** (2012). Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2C: molecular
 805 biology, role in tumorigenesis, and potential as a biomarker. *Tumour Biol. J. Int. Soc.*
 806 *Oncodevelopmental Biol. Med.* **33**, 723–730.
- 807 **Haraguchi, C. M., Ishido, K., Kominami, E. and Yokota, S.** (2003). Expression of cathepsin H in
 808 differentiating rat spermatids: immunoelectron microscopic study. *Histochem. Cell Biol.* **120**,
 809 63–71.
- 810 **Haraguchi, S., Ikeda, M., Akagi, S. and Hirao, Y.** (2020). Dynamic Changes in pStat3 are
 811 Involved in Meiotic Spindle Assembly in Mouse Oocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **21**,.
- 812 **Hara-Yokoyama, M., Kurihara, H., Ichinose, S., Matsuda, H., Ichinose, S., Kurosawa, M.,**
 813 **Tada, N., Iwahara, C., Terasawa, K., Podyma-Inoue, K. A., et al.** (2019). KIF11 as a Potential
 814 Marker of Spermatogenesis Within Mouse Seminiferous Tubule Cross-sections. *J. Histochem.*
 815 *Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **67**, 813–824.
- 816 **Hedger, M. P. and Meinhardt, A.** (2003). Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod.*
 817 *Immunol.* **58**, 1–26.
- 818 **Hermann, B. P., Sukhwani, M., Winkler, F., Pascarella, J. N., Peters, K. A., Sheng, Y., Valli, H.,**
 819 **Rodriguez, M., Ezzelarab, M., Dargo, G., et al.** (2012). Spermatogonial Stem Cell
 820 Transplantation into Rhesus Testes Regenerates Spermatogenesis Producing Functional
 821 Sperm. *Cell Stem Cell* **11**, 715–726.
- 822 **Hu, J., You, S., Li, W., Wang, D., Nagpal, M. L., Mi, Y., Liang, P. and Lin, T.** (1998). Expression
 823 and regulation of interferon-gamma-inducible protein 10 gene in rat Leydig cells.
 824 *Endocrinology* **139**, 3637–3645.
- 825 **Hu, J., Zhang, Y.-Q., Liu, X.-P., Wang, R.-A., Jin, Y. and Xu, R.-J.** (2003). Expression and
 826 localization of Smad1, Smad2 and Smad4 proteins in rat testis during postnatal development.
 827 *Asian J. Androl.* **5**, 51–55.
- 828 **Huleihel, M., Nourashrafeddin, S. and Plant, T. M.** (2015). Application of three-dimensional
 829 culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus
 830 monkey (*Macaca mulatta*). *Asian J. Androl.* **17**, 972–980.
- 831 **Hung, A. J., King, P. and Schlegel, P. N.** (2007). Uniform testicular maturation arrest: a unique

- 832 subset of men with nonobstructive azoospermia. *J. Urol.* **178**, 608–612; discussion 612.
- 833 **Ishishita, S., Matsuda, Y. and Kitada, K.** (2014). Genetic evidence suggests that Spata22 is
834 required for the maintenance of Rad51 foci in mammalian meiosis. *Sci. Rep.* **4**, 6148.
- 835 **Izumi, H., Matsumoto, Y., Ikeuchi, T., Saya, H., Kajii, T. and Matsuura, S.** (2009). BubR1
836 localizes to centrosomes and suppresses centrosome amplification via regulating Plk1 activity
837 in interphase cells. *Oncogene* **28**, 2806–2820.
- 838 **Jahnukainen, K., Chrysis, D., Hou, M., Parvinen, M., Eksborg, S. and Söder, O.** (2004).
839 Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and
840 primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol. Reprod.* **70**, 290–296.
- 841 **Jan, S. Z., Jongejan, A., Korver, C. M., van Daalen, S. K. M., van Pelt, A. M. M., Repping, S.**
842 **and Hamer, G.** (2018). Distinct prophase arrest mechanisms in human male meiosis. *Dev.*
843 *Camb. Engl.* **145**, dev160614.
- 844 **Jeganathan, K. B. and van Deursen, J. M.** (2006). Differential mitotic checkpoint protein
845 requirements in somatic and germ cells. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 583–586.
- 846 **Jiang, X.-H., Bukhari, I., Zheng, W., Yin, S., Wang, Z., Cooke, H. J. and Shi, Q.-H.** (2014). Blood-
847 testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically-modified mice. *Asian J. Androl.*
848 **16**, 572–580.
- 849 **Jiang, Q., Wang, F., Shi, L., Zhao, X., Gong, M., Liu, W., Song, C., Li, Q., Chen, Y., Wu, H., et al.**
850 (2017). C-X-C motif chemokine ligand 10 produced by mouse Sertoli cells in response to
851 mumps virus infection induces male germ cell apoptosis. *Cell Death Dis.* **8**, e3146.
- 852 **Jiao, S.-Y., Yang, Y.-H. and Chen, S.-R.** (2021). Molecular genetics of infertility: loss-of-function
853 mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice. *Hum. Reprod. Update* **27**,
854 154–189.
- 855 **Jordan, B. K., Shen, J. H.-C., Olaso, R., Ingraham, H. A. and Vilain, E.** (2003). Wnt4
856 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by
857 repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**,
858 10866–10871.
- 859 **Jordan, P. W., Karppinen, J. and Handel, M. A.** (2012a). Polo-like kinase is required for
860 synaptonemal complex disassembly and phosphorylation in mouse spermatocytes. *J. Cell Sci.*
861 **125**, 5061.
- 862 **Jordan, P. W., Karppinen, J. and Handel, M. A.** (2012b). Polo-like kinase is required for
863 synaptonemal complex disassembly and phosphorylation in mouse spermatocytes. *J. Cell Sci.*

- 864 **125**, 5061–5072.
- 865 **Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. and**
 866 **Shinohara, T.** (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse
 867 male germline stem cells. *Biol. Reprod.* **69**, 612–616.
- 868 **Kapitein, L. C., Peterman, E. J. G., Kwok, B. H., Kim, J. H., Kapoor, T. M. and Schmidt, C. F.**
 869 (2005). The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature*
 870 **435**, 114–118.
- 871 **Keeney, S., Giroux, C. N. and Kleckner, N.** (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks
 872 are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**, 375–384.
- 873 **Kominami, E., Tsukahara, T., Bando, Y. and Katunuma, N.** (1985). Distribution of cathepsins
 874 B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **98**, 87–93.
- 875 **Kong, M., Barnes, E. A., Ollendorff, V. and Donoghue, D. J.** (2000). Cyclin F regulates the
 876 nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO J.* **19**, 1378–1388.
- 877 **Kui, F., Ye, H., Chen, X.-L. and Zhang, J.** (2019). Microarray meta-analysis identifies candidate
 878 genes for human spermatogenic arrest. *Andrologia* **0**, e13301.
- 879 **Kumar, S., Tinson, A., Mulligan, B. P. and Ojha, S.** (2016). Gelatin Binding Proteins in
 880 Reproductive Physiology. *Indian J. Microbiol.* **56**, 383–393.
- 881 **Kurek, M., Åkesson, E., Yoshihara, M., Oliver, E., Cui, Y., Becker, M., Alves-Lopes, J. P.,**
 882 **Bjarnason, R., Romerius, P., Sundin, M., et al.** (2021). Spermatogonia Loss Correlates with
 883 LAMA 1 Expression in Human Prepubertal Testes Stored for Fertility Preservation. *Cells* **10**,.
- 884 **Kurzawski, M., Kaczmarek, M., Kłysz, M., Malinowski, D., Kazienko, A., Kurzawa, R. and**
 885 **Droździk, M.** (2017). MMP2, MMP9 and TIMP2 polymorphisms affect sperm parameters but
 886 not fertility in Polish males. *Andrologia* **49**,.
- 887 **Lê, S., Josse, J. and Husson, F.** (2008). FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *J.*
 888 *Stat. Softw.* **25**,.
- 889 **Le Goffic, R., Mouchel, T., Aubry, F., Patard, J.-J., Ruffault, A., Jégou, B. and Samson, M.**
 890 (2002). Production of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1, regulated on
 891 activation normal T cell expressed and secreted protein, growth-related oncogene, and
 892 interferon-gamma-inducible protein-10 is induced by the Sendai virus in human and rat
 893 testicular cells. *Endocrinology* **143**, 1434–1440.
- 894 **Lécureuil, C., Staub, C., Fouchécourt, S., Maurel, M. C., Fontaine, I., Martinat, N., Gauthier,**
 895 **C., Daudignon, A., Delaleu, B., Sow, A., et al.** (2007). Transferrin overexpression alters

- 896 testicular function in aged mice. *Mol. Reprod. Dev.* **74**, 197–206.
- 897 **Lee, W.-Y., Do, J. T., Park, C., Kim, J. H., Chung, H.-J., Kim, K.-W., Gil, C.-H., Kim, N.-H. and**
 898 **Song, H.** (2016). Identification of Putative Biomarkers for the Early Stage of Porcine
 899 Spermatogonial Stem Cells Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One* **11**, e0147298.
- 900 **Legesse-Miller, A., Elemento, O., Pfau, S. J., Forman, J. J., Tavazoie, S. and Collier, H. A.** (2009).
 901 let-7 Overexpression leads to an increased fraction of cells in G2/M, direct down-regulation
 902 of Cdc34, and stabilization of Wee1 kinase in primary fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **284**, 6605–
 903 6609.
- 904 **Li, H., Palczewski, K., Baehr, W. and Clagett-Dame, M.** (2011). Vitamin A deficiency results in
 905 meiotic failure and accumulation of undifferentiated spermatogonia in prepubertal mouse
 906 testis. *Biol. Reprod.* **84**, 336–341.
- 907 **Li, C., Zhang, L., Ma, T., Gao, L., Yang, L., Wu, M., Pang, Z., Wang, X., Yao, Q., Xiao, Y., et al.**
 908 (2021). Bisphenol A attenuates testosterone production in Leydig cells via the inhibition of
 909 NR1D1 signaling. *Chemosphere* **263**, 128020.
- 910 **Lie, P. P. Y., Cheng, C. Y. and Mruk, D. D.** (2011). Interleukin-1alpha is a regulator of the blood-
 911 testis barrier. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **25**, 1244–1253.
- 912 **Lin, T., Wang, D., Nagpal, M. L., Shimasaki, S. and Ling, N.** (1993). Expression and regulation
 913 of insulin-like growth factor-binding protein-1, -2, -3, and -4 messenger ribonucleic acids in
 914 purified rat Leydig cells and their biological effects. *Endocrinology* **132**, 1898–1904.
- 915 **Liu, D., Davydenko, O. and Lampson, M. A.** (2012). Polo-like kinase-1 regulates kinetochore-
 916 microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing. *J. Cell Biol.* **198**, 491–499.
- 917 **Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-
 918 time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–
 919 408.
- 920 **Lue, Y., Swerdloff, R., Liu, Q., Mehta, H., Hikim, A. S., Lee, K.-W., Jia, Y., Hwang, D., Cobb, L.**
 921 **J., Cohen, P., et al.** (2010). Opposing roles of insulin-like growth factor binding protein 3 and
 922 humanin in the regulation of testicular germ cell apoptosis. *Endocrinology* **151**, 350–357.
- 923 **Lydka, M., Bilinska, B., Cheng, C. Y. and Mruk, D. D.** (2012). Tumor necrosis factor α-mediated
 924 restructuring of the Sertoli cell barrier in vitro involves matrix metalloprotease 9 (MMP9),
 925 membrane-bound intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and the actin cytoskeleton.
 926 *Spermatogenesis* **2**, 294–303.
- 927 **Ma, F., Wang, X., Chung, S. S. W., Sicinski, P., Shang, E. and Wolgemuth, D. J.** (2020). Cyclin

- 928 A2 is essential for mouse gonocyte maturation. *Cell Cycle Georget. Tex* **19**, 1654–1664.
- 929 **Mahadevaiah, S. K., Bourc’his, D., de Rooij, D. G., Bestor, T. H., Turner, J. M. A. and Burgoyne,**
 930 **P. S.** (2008). Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed
 931 chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J. Cell Biol.* **182**,
 932 263–276.
- 933 **Manfo, F. P. T., Nantia, E. A. and Mathur, P. P.** (2014). Effect of environmental contaminants
 934 on mammalian testis. *Curr. Mol. Pharmacol.* **7**, 119–135.
- 935 **Maor-Sagie, E., Cinnamon, Y., Yaacov, B., Shaag, A., Goldsmidt, H., Zenvirt, S., Laufer, N.,**
 936 **Richler, C. and Frumkin, A.** (2015). Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-
 937 obstructive azoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* **32**, 887–891.
- 938 **Matsubara, N., Yanagisawa, M., Nishimune, Y., Obinata, M. and Matsui, Y.** (1995). Murine
 939 polo like kinase 1 gene is expressed in meiotic testicular germ cells and oocytes. *Mol. Reprod.*
 940 *Dev.* **41**, 407–415.
- 941 **Matsumura, S., Toyoshima, F. and Nishida, E.** (2007). Polo-like kinase 1 facilitates
 942 chromosome alignment during prometaphase through BubR1. *J. Biol. Chem.* **282**, 15217–
 943 15227.
- 944 **Matsumura, T., Sato, T., Abe, T., Sanjo, H., Katagiri, K., Kimura, H., Fujii, T., Tanaka, H.,**
 945 **Hirabayashi, M. and Ogawa, T.** (2021). Rat *in vitro* spermatogenesis promoted by chemical
 946 supplementations and oxygen-tension control. *Sci. Rep.* **11**, 3458.
- 947 **Medrano, J. V., Vilanova-Pérez, T., Fornés-Ferrer, V., Navarro-Gomezlechón, A., Martínez-**
 948 **Triguero, M. L., García, S., Gómez-Chacón, J., Povo, I., Pellicer, A., Andrés, M. M., et al.**
 949 (2018). Influence of temperature, serum, and gonadotropin supplementation in short- and
 950 long-term organotypic culture of human immature testicular tissue. *Fertil. Steril.* **110**, 1045-
 951 1057.e3.
- 952 **Merkl, M., Ertl, R., Handschuh, S., Aurich, C. and Schäfer-Somi, S.** (2016). The cholesterol
 953 transporter ABCA1 is expressed in stallion spermatozoa and reproductive tract tissues.
 954 *Theriogenology* **85**, 1080–1089.
- 955 **Milazzo, J. P., Rives, N., Mousset-Siméon, N. and Macé, B.** (2006). Chromosome constitution
 956 and apoptosis of immature germ cells present in sperm of two 47,XYY infertile males. *Hum.*
 957 *Reprod. Oxf. Engl.* **21**, 1749–1758.
- 958 **Mohagheghi, S., Khodadadi, I., Karami, M., Amiri, I. and Tavailani, H.** (2018). Gene
 959 Polymorphism of Matrix Metalloproteinase 9 in Asthenozoospermic Male Subjects. *Int. J.*

- 960 *Fertil. Steril.* **11**, 247–252.
- 961 **Mondal, G., Ohashi, A., Yang, L., Rowley, M. and Couch, F. J.** (2012). Tex14, a Plk1-regulated
 962 protein, is required for kinetochore-microtubule attachment and regulation of the spindle
 963 assembly checkpoint. *Mol. Cell* **45**, 680–695.
- 964 **Morohaku, K., Tanimoto, R., Sasaki, K., Kawahara-Miki, R., Kono, T., Hayashi, K., Hirao, Y.
 965 and Obata, Y.** (2016). Complete *in vitro* generation of fertile oocytes from mouse primordial
 966 germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 9021–9026.
- 967 **Murphy, K., Carvajal, L., Medico, L. and Pepling, M.** (2005). Expression of Stat3 in germ cells
 968 of developing and adult mouse ovaries and testes. *Gene Expr. Patterns GEP* **5**, 475–482.
- 969 **Nagasawa, K., Imura-Kishi, K., Uchida, A., Hiramatsu, R., Kurohmaru, M. and Kanai, Y.** (2018).
 970 Regionally distinct patterns of STAT3 phosphorylation in the seminiferous epithelia of mouse
 971 testes. *Mol. Reprod. Dev.* **85**, 262–270.
- 972 **Nakagawa, A., Shiratsuchi, A., Tsuda, K. and Nakanishi, Y.** (2005). *In vivo* analysis of
 973 phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.* **71**, 166–177.
- 974 **Oatley, J. M. and Brinster, R. L.** (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes.
 975 *Physiol. Rev.* **92**, 577–595.
- 976 **Oblette, A., Rives-Feraille, A., Dumont, L., Delessard, M., Saulnier, J., Rives, N. and
 977 Rondanino, C.** (2020). Dynamics of epigenetic modifications in ICSI embryos from *in vitro*-
 978 produced spermatozoa. *Andrology*.
- 979 **Oldknow, K. J., Seebacher, J., Goswami, T., Villen, J., Pitsillides, A. A., O’Shaughnessy, P. J.,
 980 Gygi, S. P., Schneyer, A. L. and Mukherjee, A.** (2013). Follistatin-like 3 (FSTL3) mediated
 981 silencing of transforming growth factor β (TGF β) signaling is essential for testicular aging and
 982 regulating testis size. *Endocrinology* **154**, 1310–1320.
- 983 **Onofre, J., Baert, Y., Faes, K. and Goossens, E.** (2016). Cryopreservation of testicular tissue or
 984 testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum. Reprod. Update* **22**,
 985 744–761.
- 986 **Orwig, K. E., Ryu, B.-Y., Master, S. R., Phillips, B. T., Mack, M., Avarbock, M. R., Chodosh, L.
 987 and Brinster, R. L.** (2008). Genes involved in post-transcriptional regulation are
 988 overrepresented in stem/progenitor spermatogonia of cryptorchid mouse testes. *Stem Cells*
 989 *Dayt. Ohio* **26**, 927–938.
- 990 **Osborne, T. F.** (2000). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of
 991 nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* **275**, 32379–32382.

- 992 **Palladino, M. A., Fasano, G. A., Patel, D., Dugan, C. and London, M.** (2018). Effects of
 993 lipopolysaccharide-induced inflammation on hypoxia and inflammatory gene expression
 994 pathways of the rat testis. *Basic Clin. Androl.* **28**, 14.
- 995 **Park, H.-J., Lee, W.-Y., Park, C., Hong, K. and Song, H.** (2019). CD14 is a unique membrane
 996 marker of porcine spermatogonial stem cells, regulating their differentiation. *Sci. Rep.* **9**, 9980.
- 997 **Parra, M. T., Viera, A., Gómez, R., Page, J., Carmena, M., Earnshaw, W. C., Rufas, J. S. and**
 998 **Suja, J. A.** (2003). Dynamic relocalization of the chromosomal passenger complex proteins
 999 inner centromere protein (INCENP) and aurora-B kinase during male mouse meiosis. *J. Cell Sci.*
 1000 **116**, 961.
- 1001 **Parra, M. T., Gómez, R., Viera, A., Llano, E., Pendás, A. M., Rufas, J. S. and Suja, J. A.** (2009).
 1002 Sequential assembly of centromeric proteins in male mouse meiosis. *PLoS Genet.* **5**,
 1003 e1000417–e1000417.
- 1004 **Pati, D., Meistrich, M. L. and Plon, S. E.** (1999). Human Cdc34 and Rad6B ubiquitin-conjugating
 1005 enzymes target repressors of cyclic AMP-induced transcription for proteolysis. *Mol. Cell. Biol.*
 1006 **19**, 5001–5013.
- 1007 **Pauli, A., Valen, E., Lin, M. F., Garber, M., Vastenhouw, N. L., Levin, J. Z., Fan, L., Sandelin,**
 1008 **A., Rinn, J. L., Regev, A., et al.** (2012). Systematic identification of long noncoding RNAs
 1009 expressed during zebrafish embryogenesis. *Genome Res.* **22**, 577–91.
- 1010 **Perteua, M., Kim, D., Perteua, G. M., Leek, J. T. and Salzberg, S. L.** (2016). Transcript-level
 1011 expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat. Protoc.*
 1012 **11**, 1650–1667.
- 1013 **Peters, J.-M.** (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond.
 1014 *Mol. Cell* **9**, 931–943.
- 1015 **Peters, A., Plug, A., van Vugt, M. and de Boer, P.** (1997). A drying-down technique for the
 1016 spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.*
 1017 *Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* **5**, 66–68.
- 1018 **Petrie, R. G. and Morales, C. R.** (1992). Receptor-mediated endocytosis of testicular
 1019 transferrin by germinal cells of the rat testis. *Cell Tissue Res.* **267**, 45–55.
- 1020 **Picton, H. M., Wyns, C., Anderson, R. A., Goossens, E., Jahnukainen, K., Kliesch, S., Mitchell,**
 1021 **R. T., Pennings, G., Rives, N., Tournaye, H., et al.** (2015). A European perspective on testicular
 1022 tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum.*
 1023 *Reprod. Oxf. Engl.* **30**, 2463–2475.

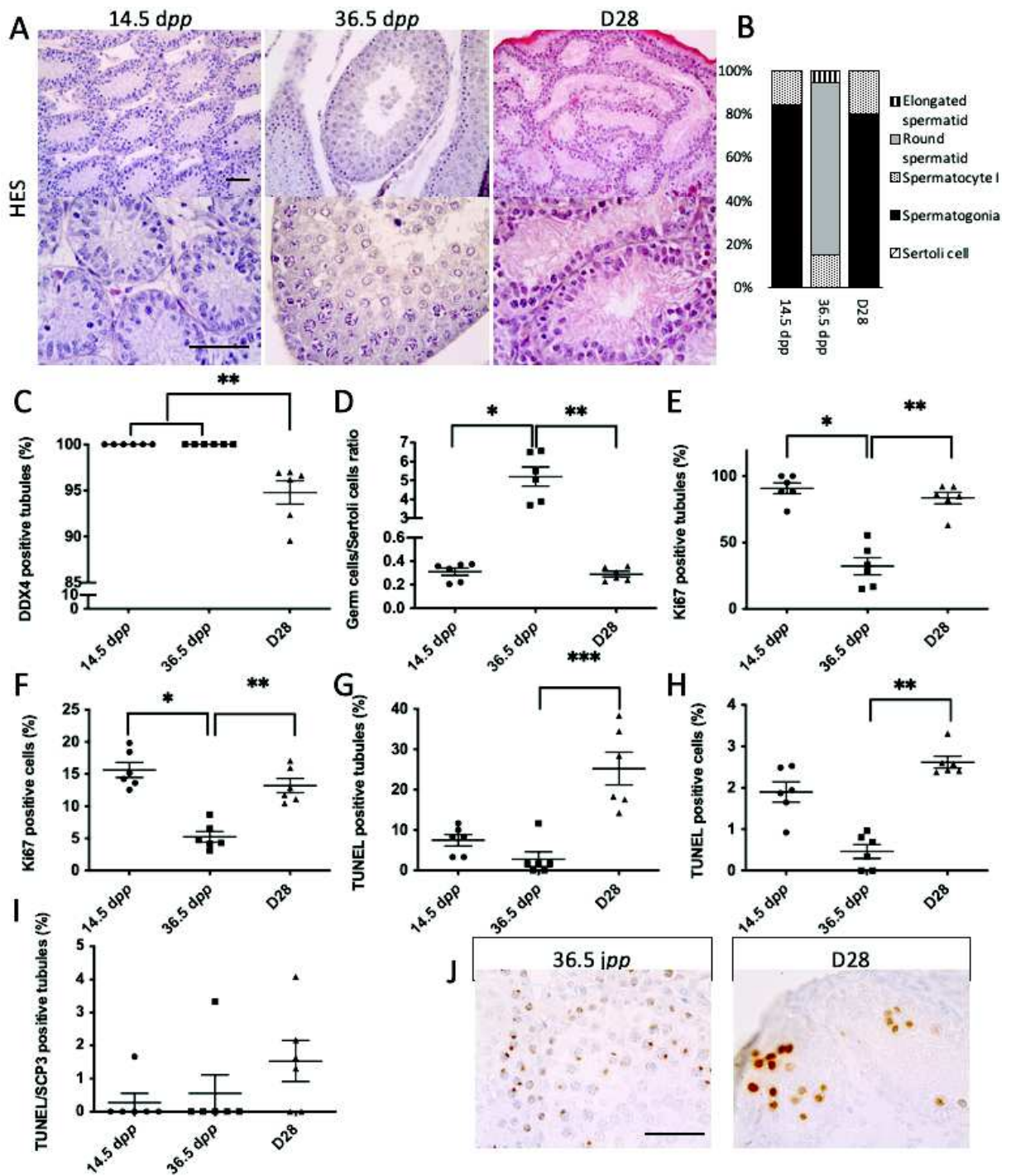
- 1024 **Pullium, J. K., Milner, R., Tuma, G. A. and Lin, P. H.** (2008). Fertility after homologous
1025 prepubertal testis transplantation in the dog. *Transplant. Proc.* **40**, 2744–2749.
- 1026 **Rappaport, M. S. and Smith, E. P.** (1995). Insulin-like growth factor (IGF) binding protein 3 in
1027 the rat testis: follicle-stimulating hormone dependence of mRNA expression and inhibition of
1028 IGF-I action on cultured Sertoli cells. *Biol. Reprod.* **52**, 419–425.
- 1029 **Ravnik, S. E. and Wolgemuth, D. J.** (1996). The developmentally restricted pattern of
1030 expression in the male germ line of a murine cyclin A, cyclin A2, suggests roles in both mitotic
1031 and meiotic cell cycles. *Dev. Biol.* **173**, 69–78.
- 1032 **Ravnik, S. E. and Wolgemuth, D. J.** (1999). Regulation of meiosis during mammalian
1033 spermatogenesis: the A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases are
1034 differentially expressed in the germ-cell lineage. *Dev. Biol.* **207**, 408–418.
- 1035 **Reda, A., Hou, M., Winton, T. R., Chapin, R. E., Söder, O. and Stukenborg, J.-B.** (2016). In vitro
1036 differentiation of rat spermatogonia into round spermatids in tissue culture. *Mol. Hum.*
1037 *Reprod.* **22**, 601–612.
- 1038 **Rezaei Topraggaleh, T., Rezazadeh Valojerdi, M., Montazeri, L. and Baharvand, H.** (2019). A
1039 testis-derived macroporous 3D scaffold as a platform for the generation of mouse testicular
1040 organoids. *Biomater. Sci.* **7**, 1422–1436.
- 1041 **Riaz, M. A., Stammler, A., Borgers, M. and Konrad, L.** (2017). Clusterin signals via
1042 ApoER2/VLDLR and induces meiosis of male germ cells. *Am. J. Transl. Res.* **9**, 1266–1276.
- 1043 **Robinson, L. L., Sznajder, N. A., Riley, S. C. and Anderson, R. A.** (2001). Matrix
1044 metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and
1045 ovary. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 641–648.
- 1046 **Roeder, G. S. and Bailis, J. M.** (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* **16**, 395–403.
- 1047 **Rother, K., Dengl, M., Lorenz, J., Tschöp, K., Kirschner, R., Mössner, J. and Engeland, K.**
1048 (2007). Gene expression of cyclin-dependent kinase subunit Cks2 is repressed by the tumor
1049 suppressor p53 but not by the related proteins p63 or p73. *FEBS Lett.* **581**, 1166–1172.
- 1050 **Sansone, A., Kliesch, S., Isidori, A. M. and Schlatt, S.** (2019). AMH and INSL3 in testicular and
1051 extragonadal pathophysiology: what do we know? *Andrology* **7**, 131–138.
- 1052 **Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y. and Ogawa,**
1053 **T.** (2011). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*
1054 **471**, 504.
- 1055 **Saulnier, J., Oblette, A., Delessard, M., Dumont, L., Rives, A., Rives, N. and Rondanino, C.**

- 1056 (2020). Improving Freezing Protocols and Organotypic Culture: A Histological Study on Rat
 1057 Prepubertal Testicular Tissue. *Ann. Biomed. Eng.*
- 1058 **Saxena, N. K., Vertino, P. M., Anania, F. A. and Sharma, D.** (2007). leptin-induced growth
 1059 stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and
 1060 mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J. Biol. Chem.* **282**, 13316–
 1061 13325.
- 1062 **Sisakhtnezhad, S. and Heshmati, P.** (2018). Comparative analysis of single-cell RNA
 1063 sequencing data from mouse spermatogonial and mesenchymal stem cells to identify
 1064 differentially expressed genes and transcriptional regulators of germline cells. *J. Cell. Physiol.*
 1065 **233**, 5231–5242.
- 1066 **Siu, M. K. Y. and Cheng, C. Y.** (2004). Interactions of proteases, protease inhibitors, and the
 1067 beta1 integrin/laminin gamma3 protein complex in the regulation of ectoplasmic
 1068 specialization dynamics in the rat testis. *Biol. Reprod.* **70**, 945–964.
- 1069 **Siu, M. K. Y. and Cheng, C. Y.** (2008). Extracellular matrix and its role in spermatogenesis. *Adv.*
 1070 *Exp. Med. Biol.* **636**, 74–91.
- 1071 **Siu, M. K. Y., Lee, W. M. and Cheng, C. Y.** (2003). The Interplay of Collagen IV, Tumor Necrosis
 1072 Factor- α , Gelatinase B (Matrix Metalloprotease-9), and Tissue Inhibitor of Metalloproteases-
 1073 1 in the Basal Lamina Regulates Sertoli Cell-Tight Junction Dynamics in the Rat Testis.
 1074 *Endocrinology* **144**, 371–387.
- 1075 **Smirnova, N. A., Romanienko, P. J., Khil, P. P. and Camerini-Otero, R. D.** (2006). Gene
 1076 expression profiles of Spo11-/- mouse testes with spermatocytes arrested in meiotic prophase
 1077 I. *Reprod. Camb. Engl.* **132**, 67–77.
- 1078 **Spruck, C. H., de Miguel, M. P., Smith, A. P. L., Ryan, A., Stein, P., Schultz, R. M., Lincoln, A.**
 1079 **J., Donovan, P. J. and Reed, S. I.** (2003). Requirement of Cks2 for the First
 1080 Metaphase/Anaphase Transition of Mammalian Meiosis. *Science* **300**, 647.
- 1081 **Stahl, P. J., Mielnik, A. N., Barbieri, C. E., Schlegel, P. N. and Paduch, D. A.** (2012). Deletion or
 1082 underexpression of the Y-chromosome genes CDY2 and HSFY is associated with maturation
 1083 arrest in American men with nonobstructive azoospermia. *Asian J. Androl.* **14**, 676–682.
- 1084 **Stocchi, L., Giardina, E., Varriale, L., Sechi, A., Vagnini, A., Parri, G., Valentini, M. and**
 1085 **Capalbo, M.** (2018). Can Tangier disease cause male infertility? A case report and an overview
 1086 on genetic causes of male infertility and hormonal axis involved. *Mol. Genet. Metab.* **123**, 43–
 1087 49.

- 1088 **Sun, Y., Fu, L., Xue, F., Li, Y., Xu, H. and Chen, J.** (2019). Digital gene expression profiling and
 1089 validation study highlight Cyclin F as an important regulator for sperm motility of chickens.
 1090 *Poult. Sci.* **98**, 5118–5126.
- 1091 **Sweeney, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S. E., Hawkins, C. F., Wolgemuth, D. J. and**
 1092 **Carrington, M.** (1996). A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Dev. Camb.*
 1093 *Engl.* **122**, 53–64.
- 1094 **Syriou, V., Papanikolaou, D., Kozyraki, A. and Goulis, D. G.** (2018). Cytokines and male
 1095 infertility. *Eur. Cytokine Netw.* **29**, 73–82.
- 1096 **Tacken, P. J., van der Zee, A., Beumer, T. L., Florijn, R. J., Gijpels, M. J., Havekes, L. M., Frants,**
 1097 **R. R., van Dijk, K. W. and Hofker, M. H.** (2001). Effective generation of very low density
 1098 lipoprotein receptor transgenic mice by overlapping genomic DNA fragments: high testis
 1099 expression and disturbed spermatogenesis. *Transgenic Res.* **10**, 211–221.
- 1100 **Tian, R., Yang, S., Zhu, Y., Zou, S., Li, P., Wang, J., Zhu, Z., Huang, Y., He, Z. and Li, Z.** (2016).
 1101 VEGF/VEGFR2 Signaling Regulates Germ Cell Proliferation in vitro and Promotes Mouse
 1102 Testicular Regeneration in vivo. *Cells Tissues Organs* **201**, 1–13.
- 1103 **Toshima, J., Ohashi, K., Okano, I., Nunoue, K., Kishioka, M., Kuma, K., Miyata, T., Hirai, M.,**
 1104 **Baba, T. and Mizuno, K.** (1995). Identification and characterization of a novel protein kinase,
 1105 TESK1, specifically expressed in testicular germ cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 31331–31337.
- 1106 **Toshima, J., Koji, T. and Mizuno, K.** (1998). Stage-specific expression of testis-specific protein
 1107 kinase 1 (TESK1) in rat spermatogenic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 107–112.
- 1108 **Toshima, J., Toshima, J. Y., Suzuki, M., Noda, T. and Mizuno, K.** (2001). Cell-type-specific
 1109 expression of a TESK1 promoter-linked lacZ gene in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res.*
 1110 *Commun.* **286**, 566–573.
- 1111 **Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S.**
 1112 **L., Rinn, J. L. and Pachter, L.** (2012). Differential gene and transcript expression analysis of
 1113 RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–78.
- 1114 **Truman, L. A., Ford, C. A., Pasikowska, M., Pound, J. D., Wilkinson, S. J., Dumitriu, I. E.,**
 1115 **Melville, L., Melrose, L. A., Ogden, C. A., Nibbs, R., et al.** (2008). CX3CL1/fractalkine is released
 1116 from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* **112**, 5026–5036.
- 1117 **Tsuchida, K., Arai, K. Y., Kuramoto, Y., Yamakawa, N., Hasegawa, Y. and Sugino, H.** (2000).
 1118 Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for
 1119 the TGF-beta family. *J. Biol. Chem.* **275**, 40788–40796.

- 1120 **Vannelli, B. G., Orlando, C., Barni, T., Natali, A., Serio, M. and Balboni, G. C.** (1986).
 1121 Immunostaining of transferrin and transferrin receptor in human seminiferous tubules. *Fertil.*
 1122 *Steril.* **45**, 536–541.
- 1123 **Walters, J. L. H., De Iuliis, G. N., Dun, M. D., Aitken, R. J., McLaughlin, E. A., Nixon, B. and**
 1124 **Bromfield, E. G.** (2018). Pharmacological inhibition of arachidonate 15-lipoxygenase protects
 1125 human spermatozoa against oxidative stress. *Biol. Reprod.* **98**, 784–794.
- 1126 **Wang, Y.-H., Yan, M., Zhang, X., Liu, X.-Y., Ding, Y.-F., Lai, C.-P., Tong, M.-H. and Li, J.-S.**
 1127 (2021). Rescue of male infertility through correcting a genetic mutation causing meiotic arrest
 1128 in spermatogonial stem cells. *Asian J. Androl.*
- 1129 **Weedin, J. W., Bennett, R. C., Fenig, D. M., Lamb, D. J. and Lipshultz, L. I.** (2011). Early versus
 1130 late maturation arrest: reproductive outcomes of testicular failure. *J. Urol.* **186**, 621–626.
- 1131 **Winnall, W. R. and Hedger, M. P.** (2013). Phenotypic and functional heterogeneity of the
 1132 testicular macrophage population: a new regulatory model. *J. Reprod. Immunol.* **97**, 147–158.
- 1133 **Winter, A. G., Zhao, F. and Lee, R. K.** (2014). Androgen deficiency and metabolic syndrome in
 1134 men. *Transl. Androl. Urol.* **3**, 50–58.
- 1135 **Xia, Y., Sidis, Y. and Schneyer, A.** (2004). Overexpression of follistatin-like 3 in gonads causes
 1136 defects in gonadal development and function in transgenic mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*
 1137 **18**, 979–994.
- 1138 **Xu, X., Aprelikova, O., Moens, P., Deng, C.-X. and Furth, P. A.** (2003). Impaired meiotic DNA-
 1139 damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform
 1140 deficient mice. *Dev. Camb. Engl.* **130**, 2001–2012.
- 1141 **Yan, H. H. N., Mruk, D. D., Lee, W. M. and Cheng, C. Y.** (2008). Blood-testis barrier dynamics
 1142 are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of
 1143 protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**,
 1144 1945–1959.
- 1145 **Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas,**
 1146 **K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., et al.** (2015). Biological properties of extracellular
 1147 vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **4**,.
- 1148 **Yao, J., Zuo, H., Gao, J., Wang, M., Wang, D. and Li, X.** (2017). The effects of IGF-1 on mouse
 1149 spermatogenesis using an organ culture method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **491**, 840–
 1150 847.
- 1151 **Yatsenko, A. N., Georgiadis, A. P., Röpke, A., Berman, A. J., Jaffe, T., Olszewska, M.,**

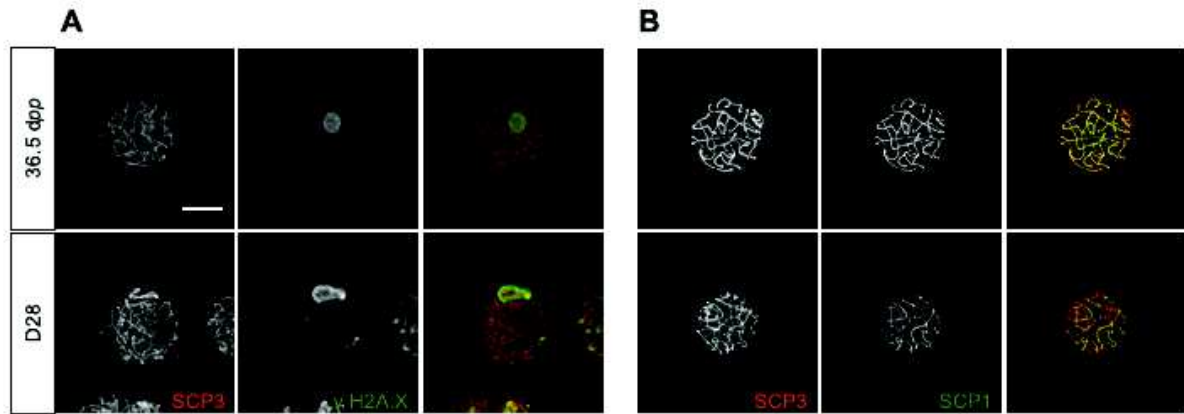
- 1152 **Westernströer, B., Sanfilippo, J., Kurpisz, M., Rajkovic, A., et al.** (2015). X-Linked TEX11
1153 Mutations, Meiotic Arrest, and Azoospermia in Infertile Men. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2097–2107.
- 1154 **Youds, J. L. and Boulton, S. J.** (2011). The choice in meiosis - defining the factors that influence
1155 crossover or non-crossover formation. *J. Cell Sci.* **124**, 501–513.
- 1156 **Zhang, Q.-H., Yuen, W. S., Adhikari, D., Flegg, J. A., FitzHarris, G., Conti, M., Sicinski, P., Nabti,
1157 I., Marangos, P. and Carroll, J.** (2017). Cyclin A2 modulates kinetochore-microtubule
1158 attachment in meiosis II. *J. Cell Biol.* **216**, 3133–3143.
- 1159 **Zhao, S., Zhu, W., Xue, S. and Han, D.** (2014). Testicular defense systems: immune privilege
1160 and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **11**, 428–437.
- 1161 **Zickler, D. and Kleckner, N.** (2015). Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during
1162 Meiosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**,.
- 1163 **Zimmermann, C., Stévant, I., Borel, C., Conne, B., Pitetti, J.-L., Calvel, P., Kaessmann, H.,
1164 Jégou, B., Chalmel, F. and Nef, S.** (2015). Research resource: the dynamic transcriptional
1165 profile of sertoli cells during the progression of spermatogenesis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md*
1166 **29**, 627–42.
- 1167
- 1168



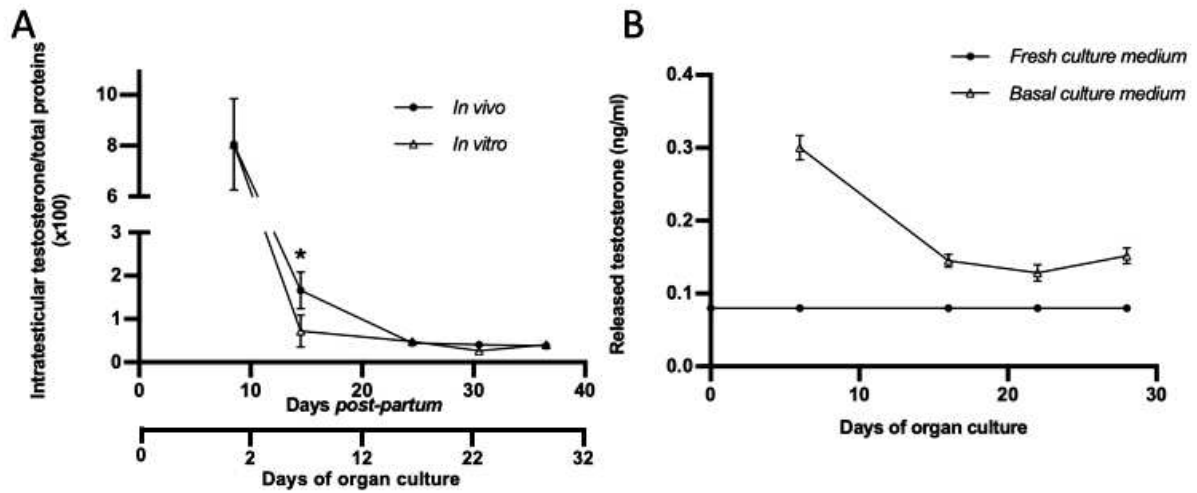
1169 **Fig. 1. Histological evaluation of D28 *in vitro* cultured testicular tissues**

1170 (A) HES staining labeled cytoplasm in pink, collagen fibers in yellow and nuclei in blue in
 1171 paraffin-embedded testicular tissue sections. Scale bar: 50 μ m; Magnification: \times 200 (upper
 1172 panel) and \times 500 (lower panel). Tissues cultured for 28 days (D28), from an age-matched *in*
 1173 *vivo* control (36.5 dpp) and from an immature *in vivo* control (14.5 dpp) were analyzed. The
 1174 most advanced stage of spermatogenesis (B) was evaluated. DDX4 immunostaining was

1175 performed to determine the percentage of seminiferous tubules containing germ cells (C) and
1176 the intratubular germ cells/Sertoli cells ratio. (E) Percentage of Ki67-positive tubules and (F)
1177 Ki67-positive cells. (G) Percentage of TUNEL-positive tubules and (H) TUNEL-positive cells.
1178 (I) Percentage of SCP3-positive cells (spermatocytes) presenting DNA fragmentation (TUNEL
1179 positive). (J) Immunohistochemical localization of γ H2A.X in paraffin-embedded testicular
1180 tissue sections from 36.5 *jpp* (left) and D28 cultured tissues (right). Indistinguishable XY body
1181 formation and a dispersed staining within the nuclei were observed in cultured tissues. Scale
1182 bar: 50 μ m; Magnification: \times 500. Data are expressed as mean \pm s.e.m. **p* value <0.05; ***p*
1183 value <0.01; ****p* value <0.001; *dpp*, days *postpartum*; HES, Hemalun eosin saffron.



1184 **Fig. 2. Immunofluorescence staining of meiotic chromosome spread preparations from**
 1185 **D28 *in vitro* cultured tissues and 36.5 dpp *in vivo* controls.**
 1186 (A,B) γ H2A.X (A), SYCP1 (B) and SYCP3 (A,B) immunostaining. Representative pachytene
 1187 spermatocytes at 36.5 dpp and D28 are shown in the upper and lower row, respectively. Scale
 1188 bar: 10 μ m, Magnification: \times 630. dpp, days *postpartum*



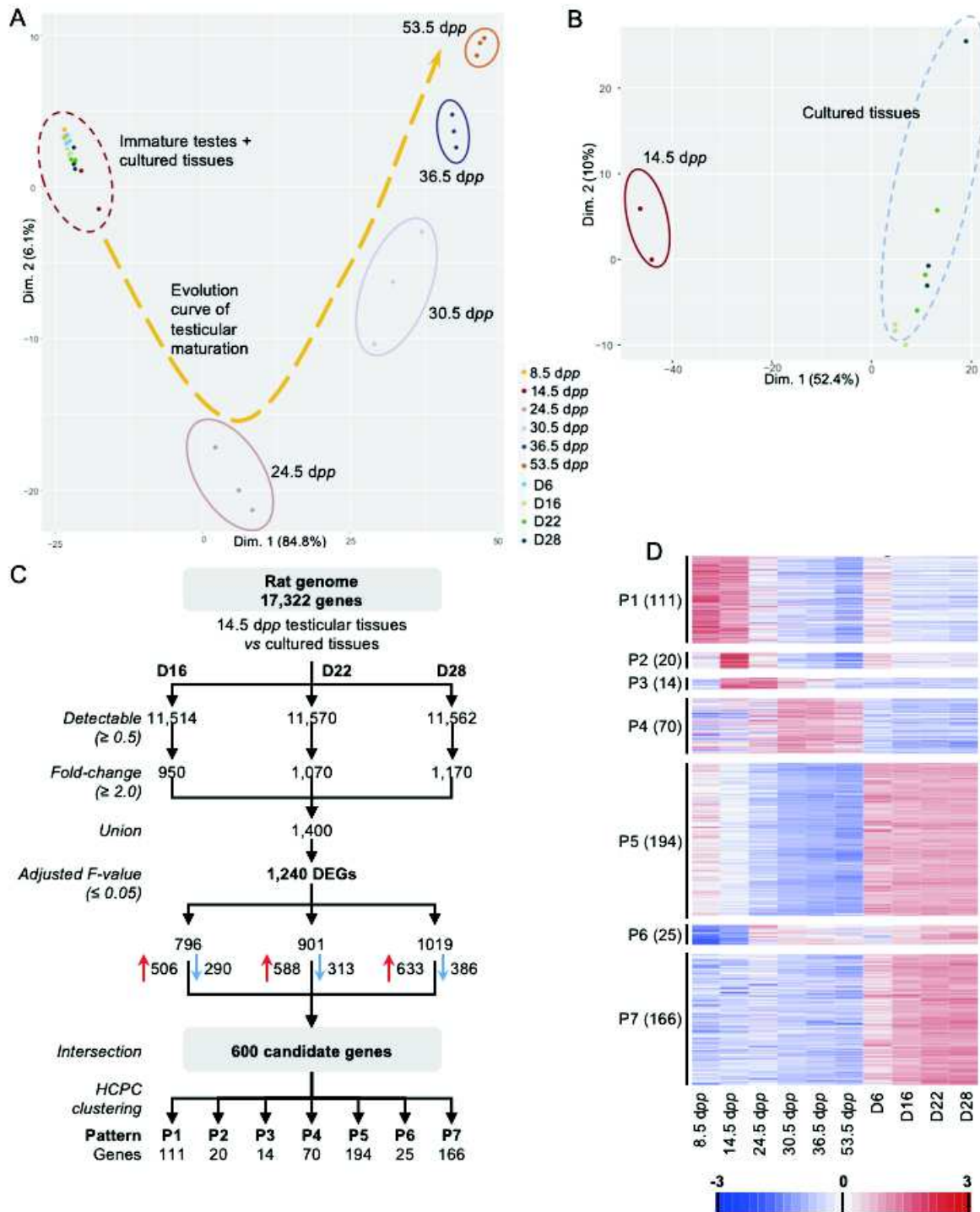
1189 **Fig. 3. Intratesticular testosterone levels and release of testosterone into the media during**
 1190 **organotypic culture**

1191 (A) Testosterone levels in *in vitro* cultured testicular tissues and age-matched *in vivo* controls.

1192 (B) Testosterone levels in organotypic culture media (ng/mL). For each time point, 6 samples

1193 per testis were analyzed (n = 6). Data are expressed as mean \pm s.e.m. *p value <0.05. RIA,

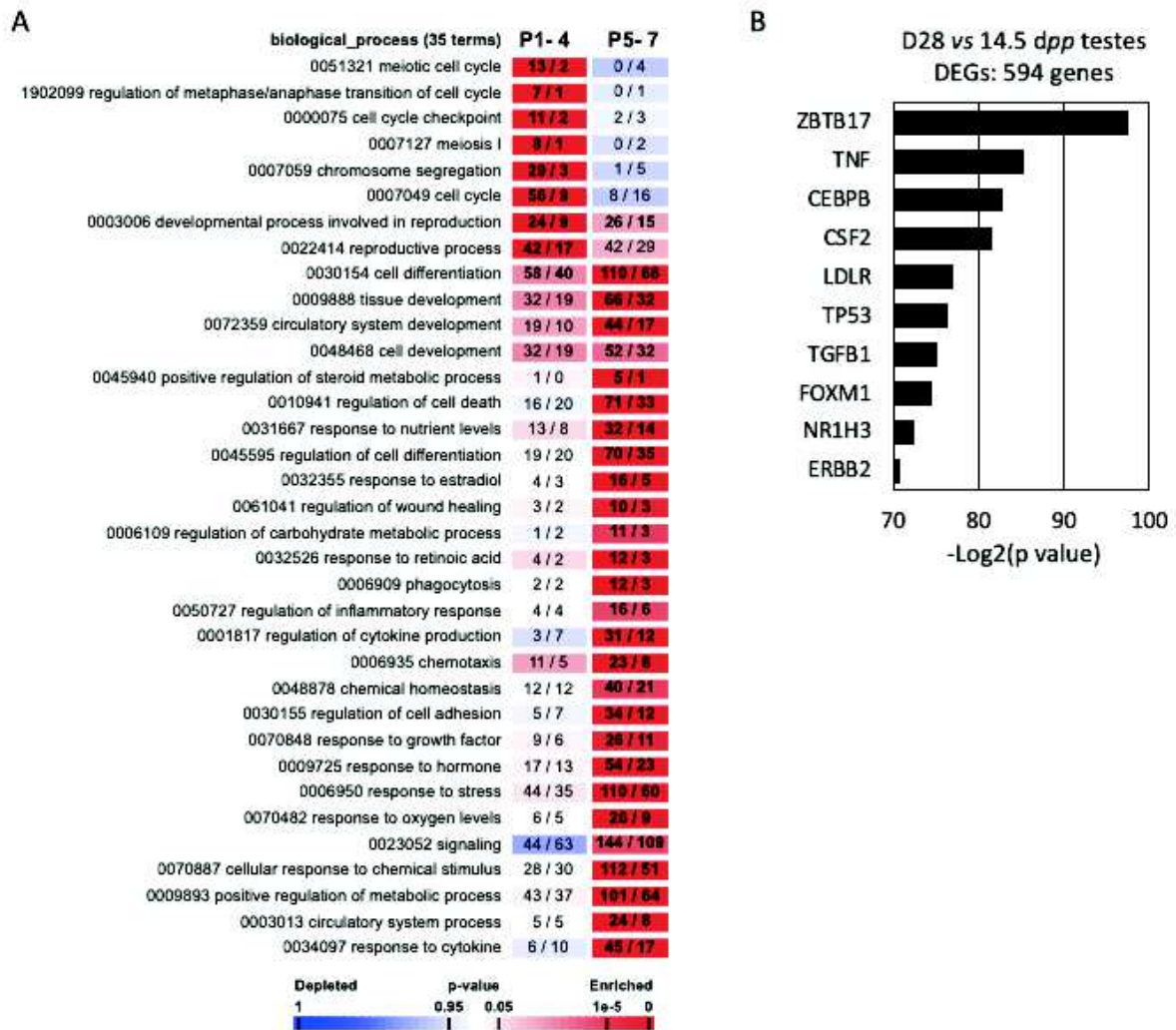
1194 radioimmunoassay.



1195 **Fig. 4. Transcriptomic analyses of *in vitro* and *in vivo*-matured testicular tissues.**

1196 (A) Scatter plot representing the position of each sample along the first two dimensions. Each
 1197 point represents the average expression level of transcripts, one dot per replicate. The variability
 1198 between samples is mainly explained by their age of development (Dimension 1, 84.8%). The
 1199 different clusters, represented by coloured circles, highlight the distance between each group of
 1200 transcriptomes. An evolution curve of the transcriptome of maturing testicular tissues is

1201 represented in yellow. (B) PCA analysis conducted on the red dotted circle shown in panel A,
1202 corresponding to cultured tissues and 14.5 *dpp* immature testes. The variability between groups
1203 is mainly explained by the origin of the tissue (*in vivo* vs *in vitro*). All the *in vitro* matured
1204 tissues display similar transcriptomic profiles. (C) Flow chart summarizing the filtration and
1205 clustering strategies. The numbers below the cluster ID indicate the genes falling into each
1206 cluster. (D) A false-colour heatmap summarizes the 7 patterns defining the global
1207 concentrations for transcripts across the entire sample set. Each line corresponds to a gene and
1208 each row to the mean expression value of a replicate. P1 to P7 refers to the number of patterns,
1209 followed by the number of genes included in each pattern in parenthesis. A colour scale is
1210 shown for standardized RPKM (Reads Per Kilobase of transcript, per Million mapped reads)
1211 values.



1212

1213 **Fig. 5. Gene Ontology enrichment and upstream regulator analysis in cultured testicular**
1214 **tissues**

1215 (A) Each cluster is matched with a selection of enriched GO terms from the ontologies
1216 “biological process” and “cellular component”. Significantly enriched “biological process”
1217 terms and their identification numbers are given followed by the total number of genes
1218 associated with the term and the numbers of genes observed *vs* expected by chance Significant
1219 Go term for each patterns were highlight with bold values. A colour code indicates
1220 overrepresentation (red) and underrepresentation (blue) as indicated in the *p* value scale bar.
1221 (B) Predicted upstream transcriptional regulators of 594 DEGs between D28 *in vitro* cultured
1222 tissues and 14.5 dpp *in vivo* controls.

1223

Table 1: Biological information of the top 15 DEG in each pattern (1-4 and 5-7) related to spermatogenesis

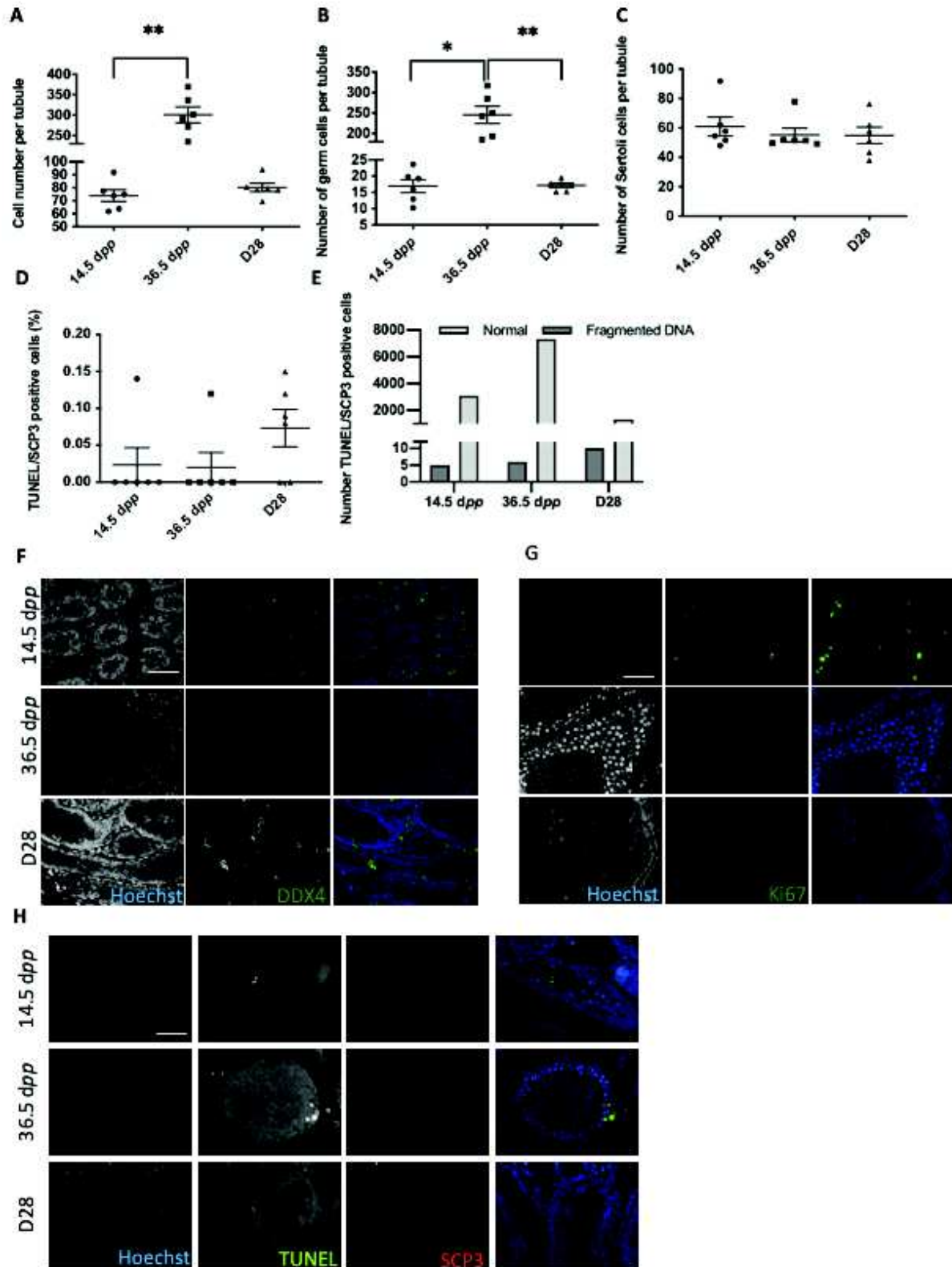
Patterns 1-4								
ID	Gene	Adjusted F-value	Pattern	Fold Change (Log(2))			Cell type (Testis)	Function in spermatogenesis
				D16	D22	D28		
25146	<i>Cyp17a1</i>	4.10E-05	P4	Down (-7.47)	Down (-7.13)	Down (-7.46)	Leydig cells (Aghazadeh et al., 2015)	Conversion of progesterone into dehydroepiandrosterone (Aghazadeh et al., 2015)
114215	<i>Insl3</i>	4.10E-05	P4	Down (-5.65)	Down (-4.63)	Down (-4.24)	Leydig cells and post-meiotic cells (Sansone et al., 2019)	Testicular descent (Sansone et al., 2019)
29460	<i>Tesk1</i>	5.20E-05	P4	Up (1.43)	Up (1.60)	Up (1.78)	Spermatocytes (late pachytene) to round spermatids (Toshima et al., 1995; Toshima et al., 1998; Toshima et al., 2001)	Cytoskeleton reorganization (Toshima et al., 2001)
362187	<i>Ccdc34</i>	9.00E-05	P4	Down (-1.39)	Down (-1.51)	Down (-1.38)	Meiotic and post-meiotic cells (Pati et al., 1999)	Regulation of cell cycle G2/M (Butz et al., 2005; Legesse-Miller et al., 2009; Pati et al., 1999)
171304	<i>Kif11</i>	1.10E-04	P1	Down (-1.47)	Down (-1.53)	Down (-1.81)	Spermatogonia, spermatocytes, spermatids and Sertoli cells (Hara-Yokoyama et al., 2019)	Chromosomes separation (Blangy et al., 1995; Kapitein et al., 2005)
296368	<i>Ube2c</i>	1.10E-04	P4	Down (-2.14)	Down (-2.05)	Down (-2.24)	Meiotic cells (Ben-Eliezer et al., 2015)	Regulation of metaphase/anaphase transition (Hao et al., 2012; Peters, 2002)
293733	<i>Incenp</i>	1.20E-04	P1	Down (-1.40)	Down (-1.25)	Down (-1.44)	Dividing cells (Adams et al., 2001; Goto et al., 2006; Parra et al., 2003)	Metaphase/anaphase progression (Goto et al., 2006) Chromatids cohesion (Parra et al., 2003)
25515	<i>Plk1</i>	1.20E-04	P4	Down (-1.82)	Down (-1.86)	Down (-1.77)	Spermatocytes (diplotene), spermatocytes II and round spermatids (Jordan et al., 2012a; Matsubara et al., 1995)	Metaphase/anaphase transition checkpoint and chromosomes segregation (Liu et al., 2012; Mondal et al., 2012) Phosphorylation of the central element of the synaptonemal complex (Jordan et al., 2012b) Cohesion of sister chromatids (Giménez-Abián et al., 2004) Chromosomes alignment (Matsumura et al., 2007)
117524	<i>Ccnf</i>	1.40E-04	P1	Down (-1.78)	Down (-1.76)	Down (-1.67)	Dividing cells (Kong et al., 2000), spermatozoa (Sun et al., 2019)	Cell cycle (Kong et al., 2000) Potentially involved in proliferation and sperm motility (Sun et al., 2019)
498709	<i>Cks2</i>	1.40E-04	P4	Down (-1.36)	Down (-1.36)	Down (-1.56)	Meiotic cells (Rother et al., 2007)	Regulation of meiotic cell cycle, contribution to the control of the first metaphase/anaphase transition during mammalian meiosis (Rother et al., 2007; Smirnova et al., 2006; Spruck et al., 2003)
81639	<i>Alox15</i>	1.70E-04	P1	Down (-7.34)	Down (-6.72)	Down (-5.39)	Spermatozoa (Fischer et al., 2005)	Contribution to spermiogenesis with formation and resorption of the cytoplasmic droplet (Fischer et al., 2005) Constituent of the oxidative stress pathway (Bromfield et al., 2017; Bromfield et al., 2019; Walters et al., 2018)
171576	<i>Bub1b</i>	1.70E-04	P1	Down (-1.26)	Down (-1.42)	Down (-1.49)	Mitotic and meiotic cells (Izumi et al., 2009)	Regulation of the SAC and chromosomal alignment, interaction with Plk1 (Choi and Lee, 2008; Jeganathan and van Deursen, 2006; Matsumura et al., 2007; Parra et al., 2009)
114494	<i>Ccna2</i>	1.70E-04	P1	Down (-1.54)	Down (-1.61)	Down (-1.68)	SSC, spermatogonia, spermatocytes (preleptotene), Sertoli cells (Ravnik and Wolgemuth, 1996; Ravnik and Wolgemuth, 1999; Sweeney et al., 1996)	Formation of the SSC pool (Ma et al., 2020) Regulation of microtubule dynamics during the rapid formation of the metaphase II spindle (by similarity with oocytes) (Zhang et al., 2017)
303730	<i>Cbx2</i>	1.80E-04	P1	Down (-1.12)	Down (-1.22)	Down (-1.12)	Germ cells (Baumann and De La Fuente, 2011)	Establishment of the synaptonemal complex (Baumann and De La Fuente, 2011)

Publication 2 - Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

Patterns 5-7									
ID	Gene	Adjusted F-value	Pattern	Fold Change (Log(2))			Cell type (Testis)	Function in spermatogenesis	
				D16	D22	D28			
81687	<i>Mmp9</i>	4.10E-05	P7	Up (8.06)	Up (8.32)	Up (7.94)	Early SSC (Lee et al., 2016), gonocytes and Sertoli cells (Kumar et al., 2016; Kurzawski et al., 2017; Robinson et al., 2001), spermatocytes and spermatids (Lydka et al., 2012)	Cell junctions and BTB maintenance (Lydka et al., 2012; Siu and Cheng, 2004; Siu and Cheng, 2008; Siu et al., 2003) Sperm motility (Mohagheghi et al., 2018)	
25696	<i>Vldlr</i>	4.10E-05	P7	Up (2.28)	Up (2.90)	Up (2.48)	Spermatocytes (pachytene) and Leydig cells (Riaz et al., 2017)	Regulation of meiosis (Riaz et al., 2017; Tacken et al., 2001)	
252917	<i>Nr1d1</i>	4.70E-05	P7	Up (1.31)	Up (1.43)	Up (1.80)	Leydig cells (Li et al., 2021) and germ cells (Ferder et al., 2019)	Regulation of meiotic entry, Stra8/Nr1d1 balance (Ferder et al., 2019) Stimulation of testosterone production and steroidogenic gene expression (Li et al., 2021)	
24484	<i>Igf1</i>	5.20E-05	P5	Up (3.62)	Up (3.69)	Up (3.70)	Sertoli cells (Rappaport and Smith, 1995), Leydig cells (Lin et al., 1993)	Regulation of testicular cell homeostasis <i>via</i> apoptosis (Lue et al., 2010), inhibition of IGF1 stimulation of steroidogenesis (Lin et al., 1993)	
245920	<i>Cxcl10</i>	9.70E-05	P5	Up (2.35)	Up (2.78)	Up (2.72)	Leydig cells, T cells and macrophages (Hu et al., 1998; Le Goffic et al., 2002), peritubular and Sertoli cells during inflammation (Aubry et al., 2000)	Role in inflammatory process, induction of germ cell apoptosis (Aubry et al., 2000; Jiang et al., 2017)	
313210	<i>Abca1</i>	1.10E-04	P5	Up (1.47)	Up (1.27)	Up (1.69)	Leydig and Sertoli cells, round spermatids, spermatozoa (Dong et al., 2016; Merkl et al., 2016)	Cholesterol transporter (Merkl et al., 2016) Modulation of Sertoli cell phagocytosis (Dong et al., 2016) Impact on fertility (Stocchi et al., 2018)	
114031	<i>Fstl3</i>	1.10E-04	P5	Up (1.94)	Up (2.04)	Up (2.08)	Leydig cells, spermatogonia, mature spermatids (Xia et al., 2004)	Regulation of gonadal development <i>via</i> interaction with activin (Oldknow et al., 2013; Tsuchida et al., 2000; Xia et al., 2004)	
84426	<i>Wnt4</i>	1.10E-04	P7	Up (3.34)	Up (3.90)	Up (4.18)	SSC (Boyer et al., 2012) and Leydig cells (Jordan et al., 2003)	Cell activity and apoptosis (Boyer et al., 2012)	
60350	<i>Cd14</i>	1.40E-04	P5	Up (2.28)	Up (2.53)	Up (2.85)	Putative SSC and early spermatogonia (Orwig et al., 2008; Park et al., 2019) Macrophages (Hu et al., 2003)	Inflammatory response signaling pathway (Palladino et al., 2018) Immunoregulation of the testicular environment (Winnall and Hedger, 2013)	
25125	<i>Stat3</i>	1.40E-04	P5	Up (1.29)	Up (1.60)	Up (1.71)	Gonocytes, pro-spermatogonia, round spermatids (Murphy et al., 2005) Sertoli cells (Rete testis) (Nagasawa et al., 2018)	Cell cycle regulation of G1 to S phase transition (Saxena et al., 2007) Promotion of SSC differentiation (Oatley and Brinster, 2012; Sisakhtnezhad and Heshmati, 2018) Cell viability (Chen et al., 2011) Assembly of the meiotic spindle (by similarity with oocytes) (Haraguchi et al., 2020)	
25425	<i>Ctsh</i>	1.40E-04	P7	Up (1.25)	Up (1.25)	Up (1.38)	Germ cells, Sertoli and Leydig cells (Haraguchi et al., 2003; Kominami et al., 1985)	Germ cells, Sertoli and Leydig cells (Haraguchi et al., 2003; Kominami et al., 1985)	
89808	<i>Cx3cl1</i>	1.60E-04	P5	Up (1.51)	Up (2.04)	Up (2.42)	Interstitial tissue (Habasque et al., 2003), Sertoli and Leydig cells, spermatogonia, spermatocytes and peritubular cells	Inflammation process (Habasque et al., 2003) Stimulation of macrophages recruitment (Truman et al., 2008)	
25589	<i>Kdr</i>	1.70E-04	P5	Up (1.57)	Up (1.74)	Up (1.91)	Spermatids, Sertoli and Leydig cells, <i>lamina propria</i> and blood vessels (Bott et al., 2010; Ergün et al., 1997)	Participation to germ cell survival and enhancement of vascularization (Caires et al., 2009; Tian et al., 2016)	

Publication 2 - Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

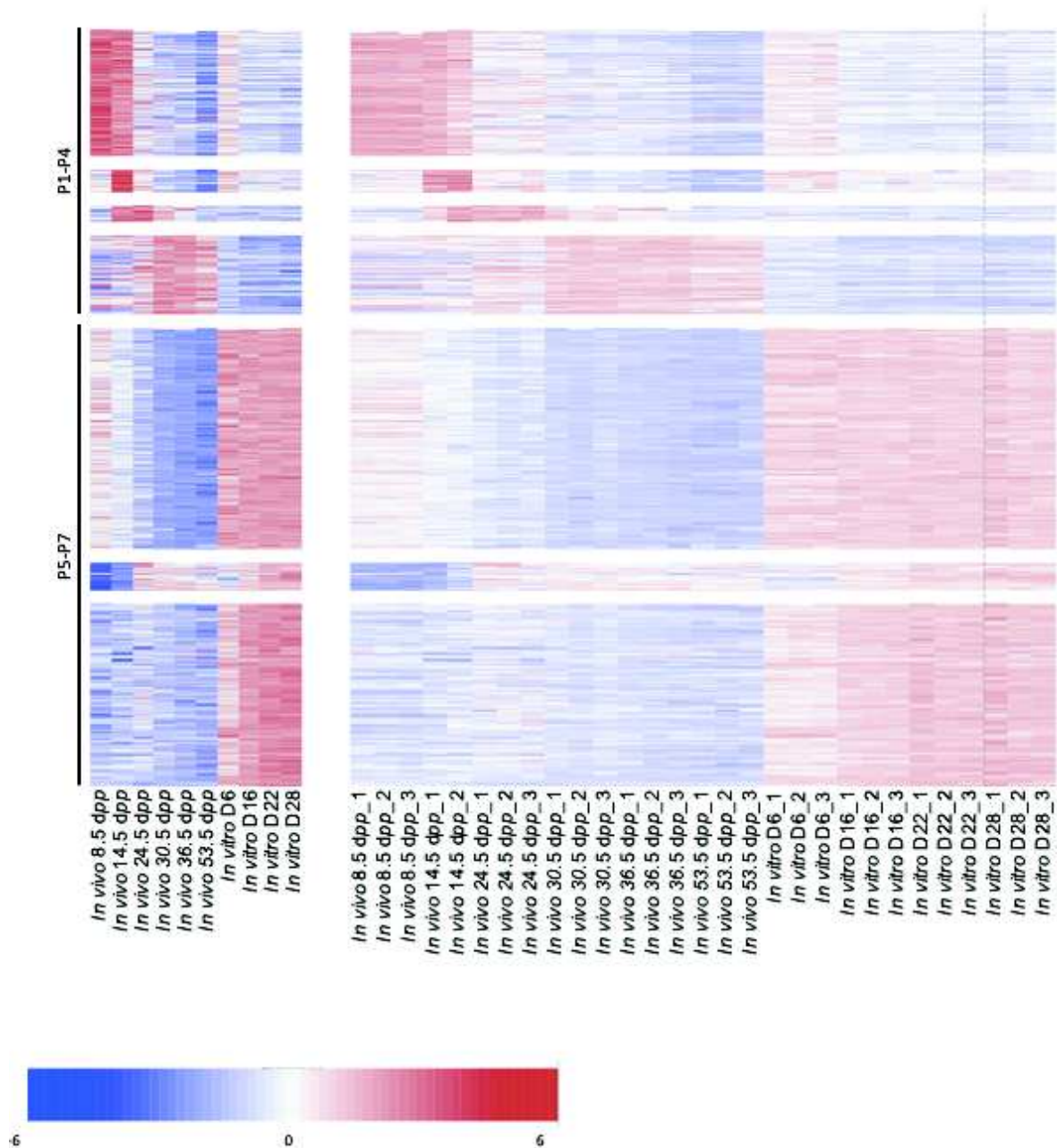
78968	<i>Srebf1</i>	1.70E-04	P5	Up (1.22)	Up (1.46)	Up (1.74)	Germ cells (Fon Tacer et al., 2003)	Regulation of cholesterol transport (Brown and Goldstein, 1999) Glucose homeostasis and fat metabolism (Osborne, 2000)
24825	<i>Tf</i>	1.70E-04	P7	Up (3.25)	Up (3.52)	Up (2.95)	Sertoli cells, spermatocytes and early spermatids (Bhattacharya et al., 2019; Forti et al., 1989; Petrie and Morales, 1992; Vannelli et al., 1986)	Regulation of sperm yield (Lécureuil et al., 2007)



1225

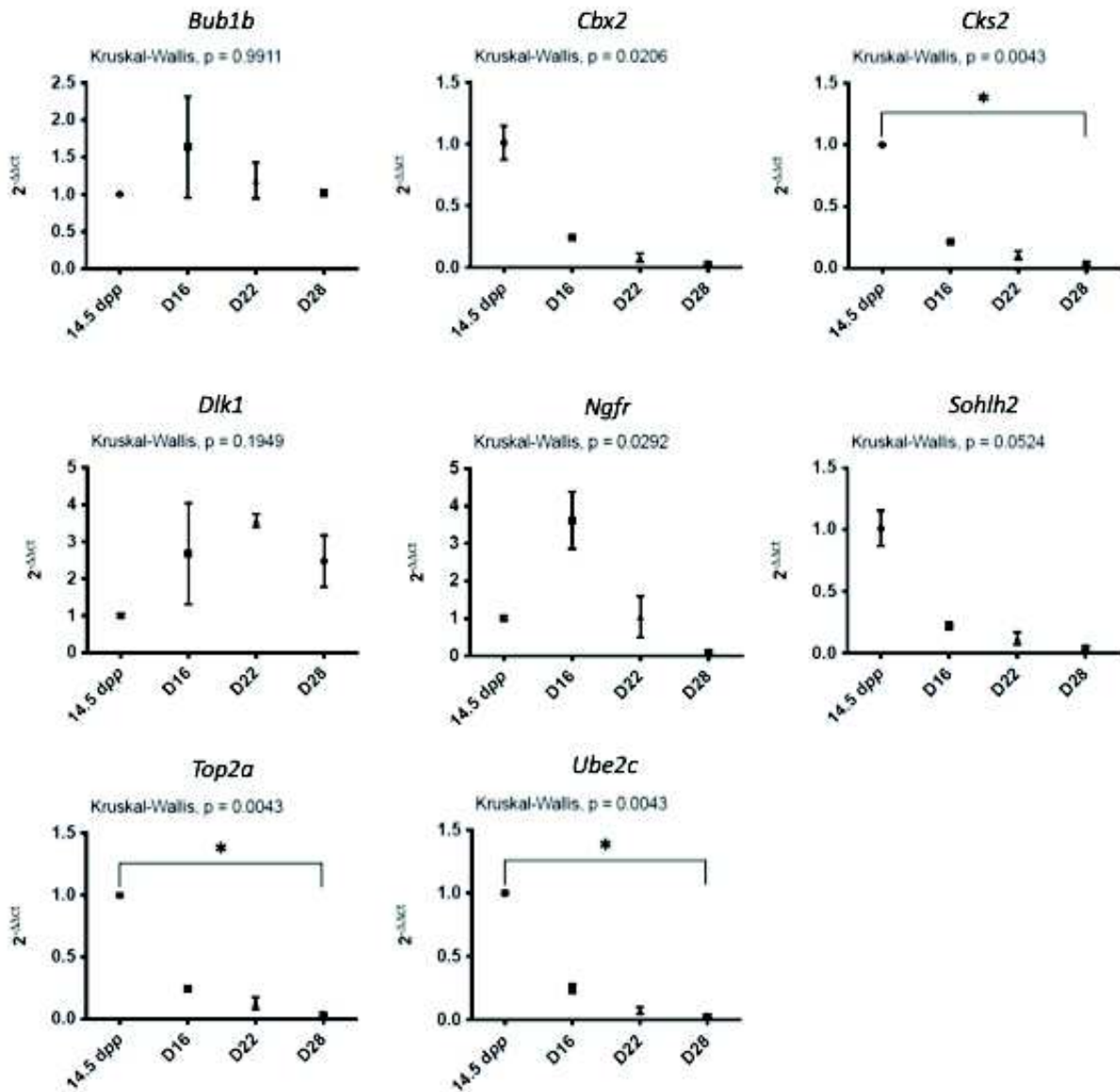
1226 **Fig. S1. Histological evaluation of D28 *in vitro* cultured testicular tissues**

1227 Tissues cultured for 28 days (D28), from an age-matched *in vivo* control (36.5 *dpp*) and from
1228 an immature *in vivo* control (14.5 *dpp*) were analyzed. (A) DDX4 immunostaining was
1229 performed to determine the number of cells per seminiferous tubule and the number of germ
1230 cells (B) and Sertoli cells (C) per tubule. (D) Percentage of TUNEL/SCP3-positive cells. (E)
1231 Number of spermatocytes with or without DNA fragmentation. Data are expressed as mean \pm
1232 s.e.m. Localization by immunofluorescence of DDX4 (F), Ki67 (G) and TUNEL/SCP3 (H) in
1233 paraffin-embedded testicular tissue sections counterstained with Hoechst. Scale bar: 50 μ m,
1234 Magnification: \times 960.



1235 **Fig. S2. Transcriptomic analyses of *in vitro* and *in vivo*-matured rat testicular tissues**

1236 A false-colour heatmap summarizes the 7 patterns defining the global concentrations for
 1237 transcripts across the entire sample set. Each line corresponds to a gene and each row to a
 1238 replicate. A colour scale is shown for standardized RPKM (Reads Per Kilobase of transcript,
 1239 per Million mapped reads) values.

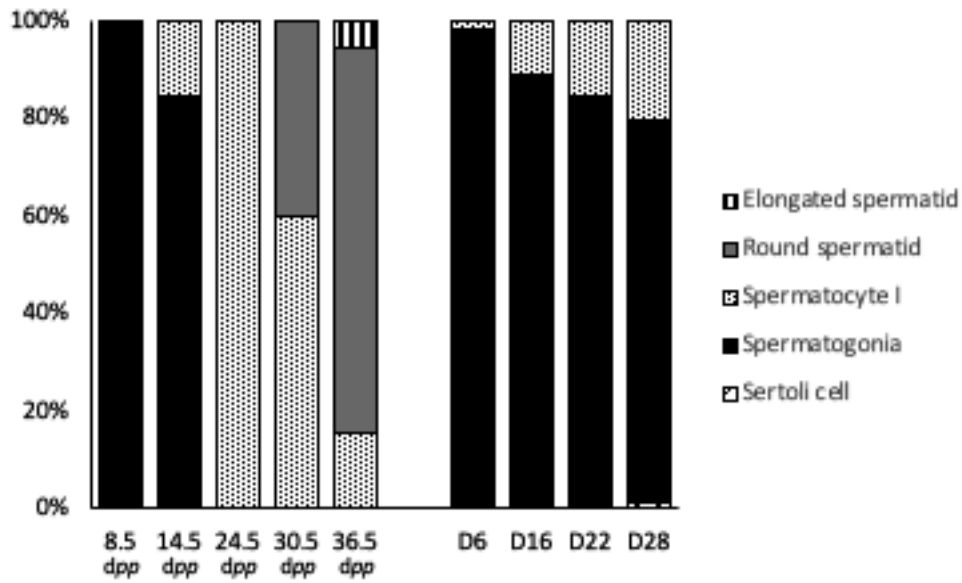


1240 Fig. S3. Relative mRNA levels of spermatogenesis-related genes (normalized to *Gapdh* and

1241 *Actb*) in *in vitro* cultured testicular tissues and 14.5 dpp *in vivo* controls.

1242 Data expressed as mean \pm s.e.m., 3 replicates were realized for each samples. *Dpp*, days post-

1243 *partum*



1244 **Fig. S4: Most advanced stage of spermatogenesis in *in vitro* cultured tissues and age-**
 1245 **matched *in vivo* controls.**

1246 The culture starting point (8.5 *dpp*) was added. Contrary to other culture time points, tissues at
 1247 D6 contained very few seminiferous tubules with meiotic cells. *dpp*, days *postpartum*

1248 **Table S1: Differentially expressed genes between cultured tissues and 14.5 dpp controls**

1249

1250 **Table S2: GO term enrichment**

1251 Information on enrichment of statistically significant annotation terms. Note that: r corresponds
1252 to the total number of genes (NCBI Entrez gene identifiers) associated with a given GO term
1253 and belonging to a given expression cluster; R is the total number of genes belonging to a given
1254 expression cluster; n is the total number of genes associated with a given GO term; N is the
1255 total number of genes; $rEXP$ is the total number of genes associated with a given GO term and
1256 belonging to a given expression cluster expected by chance; r/R is the proportion of genes
1257 associated with a given GO term within a given expression cluster; $p(BH)$ corresponds to the
1258 FDR-corrected p-value (Fisher exact probability). A term was considered significantly enriched
1259 in a group of genes if the false discovery rate-corrected *P value* was 0.05 and the number of
1260 genes bearing this annotation was 5

1261 **Table S3: Biological information of the down-regulated and up-regulated genes related to spermatogenesis.**

1262

ID	Gene	Adjusted F-value	Pattern	Fold Change (Log(2))			Cell type (Testis)	Function in spermatogenesis
				D16	D22	D28		
25146	<i>Cyp17a1</i>	4.10E-05	P4	-7.47	-7.13	-7.46	Leydig cells (Aghazadeh et al., 2015)	Conversion of progesterone into dehydroepiandrosterone (Aghazadeh et al., 2015)
114215	<i>Insl3</i>	4.10E-05	P4	-5.65	-4.63	-4.24	Leydig cells and post-meiotic cells (Sansone et al., 2019)	Testicular descent (Sansone et al., 2019)
81687	<i>Mmp9</i>	4.10E-05	P7	8.06	8.32	7.94	Early SSC (Lee et al., 2016), gonocytes and Sertoli cells (Kumar et al., 2016; Kurzawski et al., 2017; Robinson et al., 2001), spermatocytes and spermatids (Lydka et al., 2012)	Cell junctions and BTB maintenance (Lydka et al., 2012; Siu and Cheng, 2004a; Siu and Cheng, 2008; Siu et al., 2003) Sperm motility (Mohagheghi et al., 2018)
25696	<i>Vldlr</i>	4.10E-05	P7	2.28	2.90	2.48	Spermatocytes (pachytene) and Leydig cells (Riaz et al., 2017)	Regulation of meiosis (Riaz et al., 2017; Tacke et al., 2001)
252917	<i>Nr1d1</i>	4.70E-05	P7	1.31	1.43	1.80	Leydig cells (Li et al., 2021) and germ cells (Ferder et al., 2019)	Regulation of meiotic entry, Stra8/Nr1d1 balance (Ferder et al., 2019) Stimulation of testosterone production and steroidogenic gene expression (Li et al., 2021)
24484	<i>Igf1bp3</i>	5.20E-05	P5	3.62	3.69	3.70	Sertoli cells (Rappaport and Smith, 1995), Leydig cells (Lin et al., 1993)	Regulation of testicular cell homeostasis via apoptosis (Lue et al., 2010), inhibition of IGF1 stimulation of steroidogenesis (Lin et al., 1993)
29460	<i>Tesk1</i>	5.20E-05	P4	1.43	1.60	1.78	Spermatocytes (late pachytene) to round spermatids (Toshima et al., 1995; Toshima et al., 1998; Toshima et al., 2001)	Cytoskeleton reorganization (Toshima et al., 2001)
362187	<i>Ccdc34</i>	9.00E-05	P4	-1.39	-1.51	-1.38	Meiotic and post-meiotic cells (Pati et al., 1999)	Regulation of cell cycle G2/M (Butz et al., 2005; Legesse-Miller et al., 2009; Pati et al., 1999)
245920	<i>Cxcl10</i>	9.70E-05	P5	2.35	2.78	2.72	Leydig cells, T cells and macrophages (Hu et al., 1998; Le Goffic et al., 2002), peritubular and Sertoli cells during inflammation (Aubry et al., 2000b)	Role in inflammatory process, induction of germ cell apoptosis (Aubry et al., 2000b; Jiang et al., 2017)
313210	<i>Abca1</i>	1.10E-04	P5	1.47	1.27	1.69	Leydig and Sertoli cells, round spermatids, spermatozoa (Dong et al., 2016; Merkl et al., 2016)	Cholesterol transporter (Merkl et al., 2016) Modulation of Sertoli cell phagocytosis (Dong et al., 2016) Impact on fertility (Stocchi et al., 2018)
114031	<i>Fstl3</i>	1.10E-04	P5	1.94	2.04	2.08	Leydig cells, spermatogonia, mature spermatids (Xia et al., 2004)	Regulation of gonadal development via interaction with activin (Oldknow et al., 2013; Tsuchida et al., 2000; Xia et al., 2004)
171304	<i>Kif11</i>	1.10E-04	P1	-1.47	-1.53	-1.81	Spermatogonia, spermatocytes, spermatids and Sertoli cells (Hara-Yokoyama et al., 2019)	Chromosomes separation (Blangy et al., 1995; Kapitein et al., 2005)
296368	<i>Ube2c</i>	1.10E-04	P4	-2.14	-2.05	-2.24	Meiotic cells (Ben-Eliezer et al., 2015)	Regulation of metaphase/anaphase transition (Hao et al., 2012; Peters, 2002)
84426	<i>Wnt4</i>	1.10E-04	P7	3.34	3.90	4.18	SSC (Boyer et al., 2012) and Leydig cells (Jordan et al., 2003)	Cell activity and apoptosis (Boyer et al., 2012)
293733	<i>Incenp</i>	1.20E-04	P1	-1.40	-1.25	-1.44	Dividing cells (Adams et al., 2001; Goto et al., 2006; Parra et al., 2003)	Metaphase/anaphase progression (Goto et al., 2006) Chromatids cohesion (Parra et al., 2003)

Publication 2 - Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

25515	<i>Plk1</i>	1.20E-04	P4	-1.82	-1.86	-1.77	Spermatocytes (diplotene), spermatocytes II and round spermatids (Jordan et al., 2012a; Matsubara et al., 1995)	Metaphase/anaphase transition checkpoint and chromosomes segregation (Liu et al., 2012; Mondal et al., 2012) Phosphorylation of the central element of the synaptonemal complex (Jordan et al., 2012b) Cohesion of sister chromatids (Giménez-Abián et al., 2004) Chromosomes alignment (Matsumura et al., 2007)
117524	<i>Ccnf</i>	1.40E-04	P1	-1.78	-1.76	-1.67	Dividing cells (Kong et al., 2000a), spermatozoa (Sun et al., 2019)	Cell cycle (Kong et al., 2000b) Potentially involved in proliferation and sperm motility (Sun et al., 2019)
60350	<i>Cd14</i>	1.40E-04	P5	2.28	2.53	2.85	Putative SSC and early spermatogonia (Orwig et al., 2008; Park et al., 2019) Macrophages (Hu et al., 2003)	Inflammatory response signaling pathway (Palladino et al., 2018) Immunoregulation of the testicular environment (Winnall and Hedger, 2013)
498709	<i>Cks2</i>	1.40E-04	P4	-1.36	-1.36	-1.57	Meiotic cells (Rother et al., 2007)	Regulation of meiotic cell cycle, contribution to the control of the first metaphase/anaphase transition during mammalian meiosis (Rother et al., 2007; Smirnova et al., 2006; Spruck et al., 2003)
25425	<i>Ctsh</i>	1.40E-04	P7	1.25	1.25	1.38	Germ cells, Sertoli and Leydig cells (Haraguchi et al., 2003; Kominami et al., 1985)	Germ cells, Sertoli and Leydig cells (Haraguchi et al., 2003; Kominami et al., 1985)
25125	<i>Stat3</i>	1.40E-04	P5	1.29	1.60	1.71	Gonocytes, pro-spermatogonia, round spermatids (Murphy et al., 2005) Sertoli cells (Rete testis) (Nagasawa et al., 2018)	Cell cycle regulation of G1 to S phase transition (Saxena et al., 2007) Promotion of SSC differentiation (Oatley and Brinster, 2012; Sisakhtnezhad and Heshmati, 2018) Cell viability (Chen et al., 2011b) Assembly of the meiotic spindle (by similarity with oocytes) (Haraguchi et al., 2020)
89808	<i>Cx3cl1</i>	1.60E-04	P5	1.51	2.04	2.42	Interstitial tissue (Habasque et al., 2003), Sertoli and Leydig cells, spermatogonia, spermatocytes and peritubular cells	Inflammation process (Habasque et al., 2003) Stimulation of macrophages recruitment (Truman et al., 2008)
81639	<i>Alox15</i>	1.70E-04	P1	-7.34	-6.72	-5.39	Spermatozoa (Fischer et al., 2005)	Contribution to spermiogenesis with formation and resorption of the cytoplasmic droplet (Fischer et al., 2005) Constituent of the oxidative stress pathway (Bromfield et al., 2017; Bromfield et al., 2019; Walters et al., 2018)
171576	<i>Bub1b</i>	1.70E-04	P1	-1.26	-1.42	-1.49	Mitotic and meiotic cells (Izumi et al., 2009)	Regulation of the SAC and chromosomal alignment, interaction with Plk1 (Choi and Lee, 2008; Jeganathan and van Deursen, 2006; Matsumura et al., 2007; Parra et al., 2009)
114494	<i>Ccna2</i>	1.70E-04	P1	-1.54	-1.61	-1.68	SSC, spermatogonia, spermatocytes (preleptotene), Sertoli cells (Ravnik and Wolgemuth, 1996; Ravnik and Wolgemuth, 1999; Sweeney et al., 1996)	Formation of the SSC pool (Ma et al., 2020) Regulation of microtubule dynamics during the rapid formation of the metaphase II spindle (by similarity with oocytes) (Zhang et al., 2017)
25589	<i>Kdr</i>	1.70E-04	P5	1.57	1.74	1.91	Spermatids, Sertoli and Leydig cells, <i>lamina propria</i> and blood vessels (Bott et al., 2010; Ergün et al., 1997)	Participation to germ cell survival and enhancement of vascularization (Caires et al., 2009a; Tian et al., 2016)

Publication 2 - Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

78968	<i>Srebfl</i>	1.70E-04	P5	1.22	1.46	1.74	Germ cells (Fon Tacer et al., 2003)	Regulation of cholesterol transport (Brown and Goldstein, 1999) Glucose homeostasis and fat metabolism (Osborne, 2000)
24825	<i>Tf</i>	1.70E-04	P7	3.25	3.52	2.95	Sertoli cells, spermatocytes and early spermatids (Bhattacharya et al., 2019; Forti et al., 1989; Petrie and Morales, 1992; Vannelli et al., 1986)	Regulation of sperm yield (Lécureuil et al., 2007)
303730	<i>Cbx2</i>	1.80E-04	P1	-1.12	-1.22	-1.12	Germ cells (Baumann and De La Fuente, 2011)	Establishment of the synaptonemal complex (Baumann and De La Fuente, 2011)
60628	<i>Cxcr4</i>	1.90E-04	P7	2.58	2.61	2.72	Inhibition of CXCR4 signaling in testes of adult mice Impairment of SSC maintenance, leading to loss of the germline (Yang et al., 2013) Gonocytes and spermatogonia (Westernströer et al., 2014) Macrophages (Habasque et al., 2002) Putative SSC (Goissis et al., 2018)	Modulation of PGC migration and germ cell survival (Lee et al., 2017; Li et al., 2016; Molyneaux et al., 2003)
246273	<i>Trib3</i>	1.90E-04	P7	6.20	7.36	6.75	SSC (Zhang et al., 2014b)	Expression during early tissue development (Zhang et al., 2014b)
289054	<i>Aspm</i>	2.00E-04	P4	-1.66	-1.48	-1.65	Spermatocytes (leptotene to pachytene)	Spindle function (Zhong et al., 2005) Necessary for germline maintenance (Pulvers et al., 2010)
114496	<i>Bik</i>	2.10E-04	P5	2.17	2.26	2.38	Testis (Coultas et al., 2005)	Testis development, first wave apoptosis (Coultas et al., 2005)
24770	<i>Ccl2</i>	2.10E-04	P7	6.10	6.27	6.05	Interstitial cells (Guazzone et al., 2003a) and peritubular cells (Aubry et al., 2000a)	Mobilization and migration of immune cells in the interstitium (Guazzone et al., 2003b; Guazzone et al., 2009)
305984	<i>Cdca2</i>	2.10E-04	P4	-1.26	-1.32	-1.65	Dividing cells (Vagnarelli et al., 2011; Wurzenberger et al., 2012)	Chromosomes segregation (Wurzenberger et al., 2012) Chromatin remodelling (Vagnarelli et al., 2006; Vagnarelli et al., 2011)
59326	<i>Rapgef3</i>	2.10E-04	P5	1.27	1.55	1.60	Spermatozoa (Itzhakov et al., 2019; Tomes, 2015)	Element of the acrosome reaction signaling pathway (Itzhakov et al., 2019; Tomes, 2015)
24483	<i>Igf2</i>	2.20E-04	P5	3.49	3.19	3.04	ND	Correlation with sperm motility and count (Rajender et al., 2011; Tang et al., 2018) Biological redundancy with OGF1 and insulin (Griffeth et al., 2014) Regulation of spermatogonial proliferation (Söder et al., 1992)
25026	<i>Adm</i>	2.30E-04	P7	4.14	4.58	4.87	Sertoli and Leydig cells (Chan et al., 2008a; Chan et al., 2008b)	Regulation of steroidogenesis (Chan et al., 2008a)
363071	<i>Stra6</i>	2.50E-04	P1	-1.38	-1.45	-1.86	Sertoli cells (Kelly et al., 2016)	Vitamin transport across BTB (Kelly et al., 2016)
363088	<i>Ccnb2</i>	2.70E-04	P4	-1.30	-1.30	-1.35	Spermatocytes (pachytene, diplotene, metaphase), early round spermatids (Brandeis et al., 1998; Chapman and Wolgemuth, 1993)	Not decisive for spermatogenesis (Brandeis et al., 1998) Expression counterbalanced by CCNB1 (Chotiner et al., 2019) Drives G2-M transition in mitosis with CDK1 (oocyte) (Chotiner et al., 2019; Daldello et al., 2019)
266776	<i>Cst12</i>	3.00E-04	P6	1.58	2.39	2.57	Sertoli cells and spermatozoa (Hsia and Cornwall, 2003; Li et al., 2005)	May play a functional role in sperm maturation (Li et al., 2005; Whelley et al., 2016)
25116	<i>Hsd11b1</i>	3.00E-04	P7	2.87	3.48	3.82	Leydig cells (Lin et al., 2014)	Regulation of corticosterone and testosterone level (Lin et al., 2014)

Publication 2 - Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

25464	<i>Icam1</i>	3.20E-04	P5	1.82	1.95	2.13	Sertoli cells (Mruk and Cheng, 2015), spermatogonia, spermatids (Cai et al., 2016)	BTB and testicular homeostasis (Cai et al., 2016; Lydka et al., 2012; Mruk and Cheng, 2015; Xiao et al., 2012)
360243	<i>Top2a</i>	3.50E-04	P1	-1.44	-1.52	-1.87	Spermatogonia, spermatocytes, round spermatids and early elongating spermatids (Bakshi et al., 2001b; Chen et al., 2001)	Appears as the unique enzyme responsible for transient double-stranded breaks in elongating spermatids (Bakshi et al., 2001b) May be involved in mediating DNA modifications and maintaining nuclear organization during spermatogenesis (Bakshi et al., 2001a; Chen et al., 2001; Roca and Mezquita, 1989; Sukhacheva et al., 2003)
360348	<i>Hsd3b1</i>	3.60E-04	P4	-3.04	-2.35	-1.98	Leydig cells (Payne and Hales, 2004; Zirkin and Papadopoulos, 2018)	Key enzyme for steroidogenesis (Miller and Auchus, 2011)
294074	<i>Cep55</i>	3.70E-04	P1	-1.37	-1.35	-1.54	Sertoli cells (Iwamori et al., 2010), spermatocytes, spermatids and germ cell intercellular bridge (Chang et al., 2010)	Cytokinesis (Iwamori et al., 2010; Zhao et al., 2006) Could induce germ cell apoptosis during overexpression (Sinha et al., 2018)
25697	<i>Ctsl</i>	3.70E-04	P5	1.41	1.37	1.57	Inactive <i>Ctsl</i> induces atrophy of the seminiferous tubules and altered differentiation into pachytene spermatocytes (Wright et al., 2003) Sertoli cells (Charron et al., 2003; Charron et al., 2007; Visone et al., 2009; Zabludoff et al., 2001) Dying or dead germ cells (Kim and Wright, 1997) Testis (Sluka et al., 2002) Intratubular cells (Gye and Kim, 2004) Leydig cells, Sertoli cells, germ cells (Mathur et al., 1997)	Involved in seminiferous tubules structure and germ cell differentiation (Wright et al., 2003) Facilitation of spermatids movement toward the lumen of seminiferous tubules (Erickson-Lawrence et al., 1991), formation of Sertoli cell junctions (Mruk et al., 1997)
315330	<i>Espl1</i>	4.10E-04	P4	-1.34	-1.26	-1.27	Mitotic and meiotic cells (Fan et al., 2006; Kudo et al., 2009)	Removal of sister chromatids cohesion in anaphase by cleaving the cohesin complex, target Rec8 phosphorylated (Fan et al., 2006; Stemmann et al., 2001)(by similarity to mitosis) (Kucej and Zou, 2010; Sun et al., 2009; Touati et al., 2012) (mouse oocyte) (Katis et al., 2010; Kudo et al., 2009) (yeast)
292263	<i>Fbxo5</i>	4.10E-04	P1	-1.30	-1.31	-1.63	Testis (Tategu et al., 2008)	Cell cycle regulation via Plk1 interaction (Guardavaccaro et al., 2003; Margottin-Gouquet et al., 2003; Moshe et al., 2011; Tategu et al., 2008)
294286	<i>Kifc1</i>	4.40E-04	P1	-1.56	-1.42	-1.50	Spermatocytes (pachytene), spermatids (Zhi et al., 2016)	Nuclear shaping (Zhi et al., 2016) and acrosome biogenesis (Ma et al., 2017; Yang and Sperry, 2003)
295661	<i>Spc25</i>	4.40E-04	P1	-1.27	-1.33	-1.72	Dividing cells (Janke et al., 2001; McClelland et al., 2004)	SAC cells (Janke et al., 2001; McClelland et al., 2004)
25240	<i>Aqp1</i>	4.70E-04	P5	3.95	3.76	3.68	Rete testis epithelium (adult) (Danyu et al., 2008; Domeniconi et al., 2008)	Participation to the reabsorption of the tubal fluid (Badran and Hermo, 2002; Domeniconi et al., 2008)
81780	<i>Ccl5</i>	4.80E-04	P1	-1.94	-1.87	-1.52	Upregulation impacts negatively sperm fertilizing capacity (Barbonetti et al., 2008) Leydig cells, Sertoli cells and germ cells (Rebourcet et al., 2010) Immune cells (Schall, 1991)	Produced during inflammatory response (Klein et al., 2016; Schall, 1991)
25678	<i>Ddr1</i>	4.80E-04	P7	1.26	1.53	1.75	Testis (Müllenbach et al., 2006), germ cells and peritubular cells (Ramaswamy and Weinbauer, 2014)	Deregulation associated with non-obstructive azoospermia (Ramaswamy and Weinbauer, 2014)

Publication 2 - Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

114592	<i>Aurkb</i>	4.90E-04	P1	-1.60	-1.92	-2.26	Spermatogonia, spermatocytes (Chieffi et al., 2004) Mitotic and meiotic cells (Parra et al., 2003; Tang et al., 2006)	Participation to homologous chromosomes alignment and segregation (Kimmins et al., 2007; Mallampalli et al., 2013; Shuda et al., 2009) (oocyte) (Ditchfield et al., 2003; Maia et al., 2010)
304951	<i>Nuf2</i>	5.70E-04	P1	-1.09	-1.18	-1.18	Dividing cells (Hori et al., 2003)	Cell cycle progression, chromosomes segregation (Asakawa et al., 2005; Hori et al., 2003; Zhang et al., 2015b)
25203	<i>Ccnb1</i>	6.00E-04	P1	-1.38	-1.56	-1.63	The meiotic G2/M transition is associated with high levels of Cyclin B1 (Godet et al., 2000) Spermatogonia, spermatocytes (pachytene, II), round spermatids and Sertoli cells (Chapman and Wolgemuth, 1994; Godet et al., 2000; Gromoll et al., 1997; Lau et al., 2011)	Potentially essential for SSC renewal and spermatocytes differentiation (Lau et al., 2011; Tang et al., 2017)
29680	<i>Cyp11a1</i>	6.00E-04	P4	-3.17	-3.76	-3.25	Leydig cells (Papadopoulos and Miller, 2012; Zirkin and Papadopoulos, 2018)	Enzyme of steroidogenesis, determines the biosynthesis capacity of Leydig cells (Papadopoulos and Miller, 2012; Zirkin and Papadopoulos, 2018)
114482	<i>Nek2</i>	6.10E-04	P4	-1.77	-1.53	-1.72	Spermatocytes (pachytene and diplotene), early round spermatids (Tanaka et al., 1997)	Meiotic progression (Rhee and Wolgemuth, 2002), chromatin condensation (Di Agostino et al., 2004) and SAC (Wei et al., 2011b)
298441	<i>Nasp</i>	6.30E-04	P4	-1.22	-1.12	-1.40	Spermatocytes I, round spermatids and spermatozoa (O'Rand et al., 1992; Welch and O'Rand, 1990)	Potentially related to acrosome reaction (O'Rand et al., 1992) Histone transport protein (Richardson et al., 2000)
24925	<i>Adrb1</i>	6.80E-04	P7	3.32	3.75	4.03	Sertoli and Leydig cells (Heindel et al., 1981), testis (Hellgren et al., 2000)	Stimulation of testosterone production (Heindel et al., 1981)
54320	<i>Pdgn</i>	6.80E-04	P5	1.41	1.34	1.48	Sertoli cells (Gao et al., 2017)	Proliferation and maturation of Sertoli cells, stimulation of ABP production (Gao et al., 2017)
291023	<i>Id4</i>	7.10E-04	P4	1.17	1.68	1.75	SSC (Sun et al., 2015)	SSC self-renewal (26621350, 28087628, 21543770)(Helsel et al., 2017; Oatley et al., 2011; Sun et al., 2015))
619575	<i>Sohlh2</i>	7.20E-04	P3	-1.37	-1.54	-1.52	Overexpression induces a lower proliferation level (by similarity with female cells) (Zhang et al., 2014a) Meiotic cells (Park et al., 2016) Spermatogonia, Sertoli cells, Leydig cells and smooth muscle of blood vessel wall (Hao et al., 2008; Zhang et al., 2015a)	Critical for the formation of synaptonemal complexes via the regulation of Sycp1 expression (Park et al., 2016) Progression and viability of differentiating spermatogonia via Kit stimulation (Barrios et al., 2012; Hao et al., 2008) Regulation of meiotic entry by interaction with STRA8 (Desimio et al., 2015)
24854	<i>Clu</i>	8.80E-04	P7	1.09	1.75	2.08	KO = uKO mice were fertile and had essentially normal spermatogenesis with the exception of some incomplete spermiation after stage VIII Spermatozoa, Sertoli cells and degenerating germ cells (Ahuja et al., 1996; Han et al., 2012; Matsushita et al., 2016; O'Bryan et al., 1994)	Possibly involved in sperm maturation and capacitation (Saewu et al., 2017)
54238	<i>Cdkn2c</i>	9.00E-04	P4	-2.13	-1.96	-2.46	Spermatocytes (pachytene), round spermatids, elongated spermatids and Leydig cells (Buchold et al., 2007; Zindy et al., 2001)	Sperm cell development and proliferation (Zalzali et al., 2018) Regulation of spermatogenesis via inhibition of CDKs, mitotic exit and normal meiotic maturation of spermatocytes (Zindy et al., 2001)
81686	<i>Mmp2</i>	9.20E-04	P5	2.13	1.85	1.88	Spermatogonia, spermatocytes, round spermatids, spermatozoa and Sertoli cells (Chen et al., 2011a)	Regulation of SSC stemness (Liu et al., 2019) Migration of spermatogonia and spermatocytes (Chen et al., 2011a)

Publication 2 - Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

							Ferrer et al., 2012; Longin et al., 2001; Siu and Cheng, 2004b; Warinrak et al., 2015; Yao et al., 2009)	Regulation of BTB tight junctions (Barone et al., 2017; Siu et al., 2003) Regulation of the elongated spermatid dynamics (Siu and Cheng, 2004c)
58919	<i>Ccnd1</i>	9.90E-04	P2	-1.26	-1.32	-1.25	Gonocytes and spermatogonia (Beumer et al., 2000a) Sertoli cells (Lucas et al., 2014a)	Modulation of Sertoli cell proliferation (Lucas et al., 2014b; Rindone et al., 2018) Regulation of SSC renewal and differentiation (Beumer et al., 2000b; Carthon et al., 2005; He et al., 2013)
64557	<i>Bard1</i>	1.10E-03	P1	-1.29	-1.17	-1.35	Spermatogonia, spermatocytes, spermatids (Feki et al., 2004)	Modulation of meiotic recombinations (Zhao et al., 2017)
293844	<i>Haus7</i>	1.10E-03	P5	1.23	1.18	1.00	KO led to spindle defects, chromosomes misalignment and disruption of γ -tubulin localization in the spindle poles (by similarities with oocytes) (Wang et al., 2013) Spermatocytes (Pandey et al., 2019)	Could be associated with oligozoospermia (29017965) Involved in spindle formation during meiotic maturation (by similarity with oocytes) (Wang et al., 2013)
116744	<i>Lpar1</i>	1.10E-03	P5	1.23	1.21	1.23	Germ cells (Ye et al., 2008)	Related to testosterone production and germ cell survival (Ye, 2008; Ye et al., 2008)
25728	<i>ApoE</i>	1.30E-03	P5	1.91	1.60	1.94	Sertoli cells and germ cells, interstitial cells (Law et al., 1997; Olson et al., 1994; Olson et al., 1995; Schleicher et al., 1993)	Regulation of cholesterol biosynthesis and steroidogenesis (Fofana et al., 1996; Kanimozhi et al., 2018) Lipid transport for sperm maturation (Anderson et al., 2008)
83785	<i>Vegfa</i>	1.30E-03	P7	3.01	3.98	3.66	KO induces subfertility and a reduced sperm count (Lu et al., 2013) Germ cells, Sertoli cells and Leydig cells (Bott et al., 2006; Caires et al., 2009a; Caires et al., 2012)	Support germ cell production (Caires et al., 2009b; Caires et al., 2012) Development of vasculature and seminiferous cords (Baltes-Breitwisch et al., 2010; Bott et al., 2006)
79131	<i>Fabp3</i>	1.90E-03	P5	1.06	1.02	1.02	Testis (Oresti et al., 2013a)	Associated with the functional differentiation of interstitial cells (Oresti et al., 2013b)
89829	<i>Socs3</i>	1.90E-03	P5	1.37	2.17	2.24	Sertoli cells (Gautam et al., 2018)	Involved in inflammatory response pathway (Huang et al., 2016) Linked with female infertility (Özkan et al., 2018)
24778	<i>Slc2a1</i>	2.00E-03	P5	1.34	1.70	1.69	Blood vessels (Kokk et al., 2004), spermatocytes and spermatids (Rauch et al., 2006)	Glucose transporter (Rauch et al., 2006)
685161	<i>Eppin</i>	2.20E-03	P3	-2.91	-1.48	-1.50	Spermatozoa (O'Rand and Widgren, 2012; Zhang et al., 2010a) Round spermatids, elongated spermatids (Silva et al., 2012)	Control of sperm motility and acrosomal reaction <i>via</i> modulating internal calcium levels (Bian et al., 2009; O'Rand and Widgren, 2012; Zhang et al., 2010b)
24167	<i>Adcyap1r1</i>	2.50E-03	P5	2.20	2.13	1.92	Leydig cells, endothelial cells, primary spermatocytes (Prisco et al., 2020)	Probably related to fertility rate (Reglodi et al., 2018)
140588	<i>Gli3</i>	2.50E-03	P1	-1.64	-1.54	-1.53	Sertoli cells, spermatogonia (Persengiev et al., 1997), spermatocytes and round spermatids (Szczepny et al., 2006)	Inhibition of Sertoli cell proliferation (Yao et al., 2016)
64515	<i>Cdc20</i>	2.60E-03	P4	-1.73	-1.70	-1.59	Mutation led to dysfunction during the transition from metaphase to anaphase (Li et al., 2017) Spermatocytes (pachytene), round spermatids, elongated spermatids (Goto and Eddy, 2004a)	Involved in metaphase/anaphase transition (Goto and Eddy, 2004b) Critical for spindle assembly and chromosomes segregation (Jin et al., 2010; Yang et al., 2014) (by similarity with oocytes)
292071	<i>Cdt1</i>	2.90E-03	P1	-1.19	-1.19	-1.42	Testis (Eward et al., 2004)	Contribution to genomic stability (Arias and Walter, 2007)
29366	<i>Serpine2</i>	3.20E-03	P5	1.21	1.18	1.30	Germ cells, Leydig cells (Lu et al., 2011)	Prevention of cholesterol efflux (Lu et al., 2011)

Publication 2 - Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

313484	<i>Dmrtb1</i>	3.30E-03	P4	-1.57	-2.52	-1.48	Spermatogonia, spermatocytes (preleptotene to pachytene) (Grive, 2019; Hilbold et al., 2019), Grive 2019, 25249458)	Coordination of the mitosis/meiosis transition (Hilbold et al., 2019)
304966	<i>Fcgr3a</i>	3.40E-03	P7	3.72	4.39	4.79	Natural killer cells (by similarity with female) (Lukassen et al., 2003) Lymphocytes (Gil et al., 1998)	Involved in immunological sterility (Gil et al., 1998) Female infertility (Aksu et al., 2016)
84392	<i>Kif3a</i>	4.50E-03	P4	-1.42	-1.51	-1.63	Spermatocytes, round spermatids, elongating spermatids, spermatozoa (Lehti et al., 2013)	Microtubular transport and formation of sperm (Wang et al., 2019; Zhao et al., 2018)
24182	<i>Agtr2</i>	8.10E-03	P5	1.22	1.01	0.98	Testis (Kanehara et al., 1998), spermatozoa (Gianzo et al., 2016)	Probably related to tissue growth (Hirai et al., 1998; Kanehara et al., 1998), correlated with sperm motility (Gianzo et al., 2016)
54237	<i>Cdk1</i>	8.30E-03	P1	-1.75	-1.97	-2.46	Upregulation of CDK1 inhibits separase action (Stemmann et al., 2001) Spermatogonia and spermatocytes (I and II) (Godet et al., 2004; Ravnik and Wolgemuth, 1999; Redgrove et al., 2016)	Progression of the meiotic division (Clement et al., 2015; Godet et al., 2000; Godet et al., 2004; Li et al., 2019; Rattani et al., 2014)
301701	<i>Ndc80</i>	8.50E-03	P4	-1.84	-1.57	-1.81	Mitotic and meiotic cells (Wei et al., 2014) (by similarity with oocytes) (DeLuca et al., 2005), mitosis (Sun et al., 2011) (by similarity with oocytes)	Chromosomes alignment and spindle organization (Sun et al., 2011; Wei et al., 2014) (by similarity with oocytes) (Diaz-Rodriguez et al., 2008; Wei et al., 2011a), somatic cells (DeLuca et al., 2003; Lin et al., 2006), mitosis (Chen et al., 2020; Helgeson et al., 2018; Zhang et al., 2012) Involved in G2-M transition (Gui and Homer, 2013)
294503	<i>Nodal</i>	9.80E-03	P5	2.20	1.94	1.87	Germ cells (He et al., 2009; Tian et al., 2015)	Regulation of male germ cell potency (He et al., 2009; Spiller et al., 2012; Tassinari et al., 2015) and Sertoli cell proliferation (Tian et al., 2015)
690393	<i>Tex12</i>	1.00E-02	P3	-4.04	-3.47	-2.08	Spermatocytes (Hamer et al., 2006a; Hamer et al., 2008a)	Component of the central element and structure of the synaptonemal complex, pairing of homologous chromosomes by the establishment of SYCP1 (Hamer et al., 2006b; Hamer et al., 2008b; Hernández-Hernández et al., 2016) Phosphorylated by PLK1, for the disassembly of the synaptonemal complex (Jordan et al., 2012b)
24775	<i>Shbg</i>	1.10E-02	P7	0.89	1.62	1.49	Sertoli cells (Hammond, 2011; Wood et al., 2011) and Leydig cells (Della-Maria et al., 2002; Herbert et al., 2005) Germ cells (endocytosis) (Gerard et al., 1994)	Androgen transport protein, facilitation of the transport of testosterone or dihydrotestosterone into seminiferous tubules (Della-Maria et al., 2002) Influence on the dynamic of germ cell proliferation (Jeyaraj et al., 2002) Extracellular transport of androgens (Hammond, 2011)
366492	<i>Epha2</i>	1.20E-02	P5	1.04	1.26	1.44	SSC (Morimoto et al., 2020, 31403678)	Critical modifier of self-renewal signals in SSC (Morimoto et al., 2020)
292206	<i>Trip13</i>	1.20E-02	P2	-1.68	-1.58	-1.74	Upregulation probably silences the mitotic checkpoint (Wang et al., 2014) Mitotic cells and spermatocytes (Pacheco et al., 2015; Roig et al., 2010; Wang et al., 2014)	Participation to the formation of the synaptonemal complex, efficient synapsis of sex chromosomes and for sex body formation, crossover formation and recombination (Li et al., 2007; Pacheco et al., 2015; Roig et al., 2010) Involved in chromosomal instability (Ma and Poon, 2016) Regulation of DSBs repair (Clairmont et al., 2020)

Publication 2 - Histological and transcriptomic analyses of *in vitro* matured testis

25353	<i>Spp1</i>	2.40E-02	P5	1.89	1.91	1.96	Spermatogonia to early pachytene spermatocytes (Luedtke et al., 2002) SSC (Yoo et al., 2010)	Suggests a role as an adhesive protein binding to the basement membrane and adjacent Sertoli cells (Luedtke et al., 2002) Potentially involved in SSC proliferation (Yoo et al., 2010) Initiation of meiotic recombination, DSB (yeast) (Acquaviva et al., 2013; Adam et al., 2018; Karányi et al., 2018; Sommermeyer et al., 2013)
25056	<i>Rbp1</i>	3.70E-02	P5	1.52	1.32	1.75	Reduced CRBP I mRNA levels in vitamin A deficient testis (Perozzi et al., 1998) Spermatocytes, Sertoli cells and peritubular cells (Eskild et al., 2000; Faraonio et al., 1993; Pandey et al., 2019)	May regulate the intracellular concentration of retinoids (Faraonio et al., 1993)
25345	<i>Prm2</i>	4.00E-02	P4	-0.45	-3.51	-0.45	Round spermatids and elongating spermatids (Carrell et al., 2007; Domenjoud et al., 1991)	Essential for sperm DNA compaction (Carrell et al., 2007)
24840	<i>Tnp2</i>	4.20E-02	P4	-2.40	-2.60	-3.84	Round spermatids and elongating spermatids (Domenjoud et al., 1991; Wykes et al., 1995)	Allows the histone to protamine transition in spermatids (Culp et al., 1980)
83722	<i>Plk2</i>	4.30E-04	P6	2.156504	2.102189	1.878657	Spermatocytes (Jordan et al., 2012c; Pattabiraman et al., 2017), at the crossover sites (32997737)	Stabilization of the synaptonemal complex (Pattabiraman et al., 2017)
24596	<i>Ngfr</i>	4.90E-04	P5	2.185249	1.833839	1.468167	Sertoli cells (Persson et al., 1990)	Regulation of entry into the second meiotic division (Perrard et al., 2007) Regulation of meiosis via androgen pathway and fixation to NGF produced by germ cells (Persson et al., 1990)
364382	<i>Prmt5</i>	1.00E-03	P3	-1.21228	-1.27504	-1.18728	Germ cells (Wang et al., 2015; Zhu et al., 2019)	Indispensable for germ cell survival and meiotic progression (Wang et al., 2015; Zhu et al., 2019)
287634	<i>Eme1</i>	1.90E-03	P4	-2.33741	-1.9649	-1.72282	Spermatocytes (Holloway et al., 2008)	Component of the crossover pathway (Holloway et al., 2008; Wang et al., 2016; Wechsler et al., 2011)
289175	<i>Slc19a2</i>	5.60E-03	P6	1.049012	1.210315	1.180235	ND	Necessary for survival of pachytene spermatocytes (Fleming et al., 2003; Oishi et al., 2004)

1264 **Table S4: Primers and parameters used for RT-qPCR**
 1265 bp, base pair; RT-qPCR, Reverse transcription-quantitative Polymerase Chain reaction

Gene name	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Tm (°C)	Size (bp)
<i>Cbx2</i>	CAAGGGCAAGCTGGAGTACC T	TCGGGTCCAAGATGTTCTCT TC	80.2	89
<i>Cks2</i>	GGAGGAGACTTGGTGTTC AAC AG	AATATGCGGTTCTGGCTCAT G	74.5	71
<i>Top2a</i>	GAACTGGCTTCAAATCAGTAT GTGA	CCTTATATGTCTGGGTCCAT GTTCT	74.0	109
<i>Ube2c</i>	AGCCCTTTGAACACACATGCT	TGGTTGGAGACCTGCTTTGA ATA	75.5	95
<i>Dlk1</i>	GTGAAGAACCATGGCAGTGT GT	GCAAGCCCGAATATCTATTT CG	76.5	74
<i>Bub1b</i>	ACTACAGAAGTCATCCCTGCA AATG	ATGATGGCATCTTCACTCAA AGG	73.0	92
<i>Sohlh2</i>	TCCCTTCAGAGCAATAAGAGG TTT	CATAGCATCTCCCCTCTGTG ATG	77.3	93
<i>Ngfr</i>	GGGCCTTGTGGCCTATATTG	GCGCCTTGTTTATTTTGTTTG C	78.0	63
<i>Actb</i>	ACCGTGAAAAGATGACCCAG AT	CACAGCCTGGATGGCTACGT A	76.0	74
<i>Gapdh</i>	CAGCCTCGTCTCATAGACAAG ATG	CAATGTCCACTTTGTCACAA GAGAA	79.0	

Table S5: IPA analysis of the 594 differentially expressed genes in *in vitro* cultured tissues (D28)

Upstream Regulator	Molecule Type	Activation z-score	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset	Mechanistic Network
ZBTB17	transcription regulator		4.56E-30	ASPM,AURKB,BUB1B,CCNA2,CCNB1,C CNB2,CDC20,CDCA8,CDK1,CENPF,CEP 55,CKAP2,ECT2,FOXM1,HMMR,IQGAP3 ,KIF11,KIF18B,KIF22,MKI67,NDC80,NU F2,NUSAP1,PBK,PIMREG,PLK1,PRC1,T OP2A,UBE2C	166 (7)
TNF	cytokine	6.201	2.15E-26	ABCA1,ACTA2,ADCY5,ADM,ADORA2A ,AOC3,APLN,APOE,ARSI,ATF3,B2M,BH LHE40,BIK,CASP4,CCL11,CCL2,Ccl2,CC L5,Ccl7,CCND1,CD14,CDH13,CDH2,CEB PD,CFB,CH25H,CLU,CNN1,CTSK,CTSS, CX3CL1,CXCL10,CXCL13,CXCL2,CXCR 4,CYP11A1,CYP17A1,DUSP5,EFNA1,FC GR2B,G0S2,GADD45A,GM2A,H19,HLA A,ICAM1,IER3,IGF2,IGFBP3,IL4R,ISG15, JUNB,LRRC8C,LTBP2,MGP,MGST1,MG ST2,MMP12,MMP2,MMP9,MYLK,NQO1, OSMR,PDPN,PENK,PLA2G2A,PLSCR1,P RSS23,RASD1,RBP1,SAT1,SERPINB9,SE RPINE2,SLC2A1,SOCS3,SPSB1,SREBF1, STAT3,STEAP4,STMN1,TAGLN,TF,TGM 2,TMEM176B,VEGFA	177 (17)
CEBPB	transcription regulator	-2.669	1.15E-25	ACTA2,APLN,APLNR,AURKB,BARD1,B UB1B,C1QC,C3AR1,Ccl2,CCL5,CCNA2,C CNB2,CCND1,CD14,CDC20,CDCA3,CDC A8,CDH3,CDK1,CDKN2C,CDT1,CEBPD, CXCL10,CXCR4,CYP11A1,CYP17A1,DE PDC1,DIAPH3,DLGAP5,ESPL1,FBLN1,F CGR1A,FCGR3A/FCGR3B,FZD1,GADD4 5A,HBB,HMMR,HSD11B1,IER3,IGFBP3, KIF18B,KIF22,LGMN,LMNB1,MELK,MK I67,MXD3,NASP,PLK1,SPC25,SPP1,SRE BF1,STAT3,STMN1,TACC3,TF,TK1,TO P2A,TRIB3,TRIP13,VLDLR	245 (18)
CSF2	cytokine	-1.175	2.91E-25	ABCA1,BUB1B,CCL2,Ccl2,CCNA2,CCN B1,CCNF,CD14,CDC20,CDCA2,CDCA3,C DCA8,CDK1,CSF2RB,CXCL10,E2F7,FBX O5,FCGR2B,FOXM1,HJURP,ICAM1,IER3 ,IFITM3,JUNB,KIF11,LCP1,MKI67,MMP9 ,NUSAP1,OSMR,PLK1,PRC1,RBBP4,REC QL4,REG3G,SLC2A1,SNTB1,SOCS3,SPC 25,SPP1,SREBF1,STMN1,TGM2,TO P2A,TRIP13,UBE2C,UHRF1	185 (18)

LDLR	transporter	1.664	6.9E-24	ABCA1,APOE,AURKB,BUB1B,CCL2,Ccl2,CCL5,Ccl7,CCNA2,CCNB1,CCNB2,CCND1,CDCA3,CDK1,CENPA,CENPF,CFB,CX3CL1,E2F7,FCGR1A,FOXM1,GAPDH,GJA4,ICAM1,IER3,IRF7,LYZ,mir23,MKI67,MMP2,MMP9,NUSAP1,PFKL,PLK1,PRC1,SLC2A1,SPP1,SREBF1,TOP2A,UBE2C,UHRF1,VLDLR	156 (14)
TP53	transcription regulator	3.98	9.41E-24	ACSL6,ACTA2,ADGRB1,ALOX15,APOE,ATF3,AURKB,BCL6B,BHLHE40,BIK,BUB1B,C1QC,CASP4,Ccl2,CCL5,CCNA2,CCNB1,CCNB2,CCND1,CD82,CDC20,CDH3,CDK1,CDT1,CENPF,CEP55,CKAP2,CKMT2,CLIC4,CLU,CNN1,CPT1B,CXCL10,CXCL2,DDR1,DGKA,DLGAP1,DUSP4,DUSP5,EPHA2,ESPL1,FABP3,FGF7,FKBP5,FOXO1,FSTL3,FUCA1,GADD45A,GADD45B,GAPDH,GPR157,GTSE1,H2BC5,HMMR,ID3,IER3,IGF2,IGFBP3,IL4R,INKA2,IRF7,ISG15,JUNB,KCNJ2,KCNJ4,KDR,KIFC1,LY6H,LYZ,MGST2,mir23,mir27,MKI67,MMP2,MMP23B,MMP9,NDC80,NDRG1,NR2F1,PBK,PECAM1,PLK1,PLK2,PRAG1,PRC1,PTPRM,RBBP4,RECQL4,RFC4,RRM1,RUNX1,SAT1,SERPINE2,SERPINE2,SESN2,SLC19A2,SLC2A1,SPC25,SPP1,SREBF1,STAT3,STMN1,TGM2,THBS1,TOX2,TRIB3,TYMS,UBE2C,UHRF1,UNC5B,VASN,VEGFA,VLDLR,WNT10A	231 (23)
TGFB1	growth factor	2.01	2.54E-23	ACTA2,ADM,AQP1,ASPM,BARD1,BHLHE40,BUB1B,CASP4,CCL11,CCL2,Ccl2,CCL5,Ccl7,CCNA2,CCNB1,CCNB2,CCND1,CDC20,CDH2,CDK1,CDKN2C,CDT1,CENPA,CENPF,CKS2,CLDN4,CNN1,CXCL10,CXCL2,CXCR4,CYP11A1,CYP17A1,ELN,ENPP1,ESPL1,FAM107A,FBLN5,FSTL3,FZD1,HTRA1,ICAM1,IER3,IGF2,IGFBP3,JUNB,JUP,KDR,LTBP2,mir196,MKI67,MMP12,MMP2,MMP9,MXD3,NDC80,PECAM1,PRC1,RFC4,S1PR3,SEMA7A,SOC3,SPP1,STAT3,TAGLN,TGM2,THBS1,TOX2,VEGFA	204 (20)
FOXM1	transcription regulator	-2.555	3.68E-23	AURKB,BUB1B,CCNA2,CCNB1,CCNB2,CCND1,CCNF,CDC20,CDCA2,CDCA8,CDH2,CDK1,CENPA,CENPF,CKS2,CTNNA1,FZD1,GTSE1,KDR,MKI67,MMP2,MMP9,NUF2,PECAM1,PLK1,PRC1,PRR11,SKP2,STAT3,STMN1,VEGFA	245 (19)

NR1H3	ligand-dependent nuclear receptor	0.381	1.59E-22	ABCA1,APOE,ATF3,AURKB,BUB1B,CC L2,Ccl2,CCL5,Ccl7,CCNA2,CCNB1,CCN B2,CDCA3,CDK1,CENPA,CENPF,CFB,C H25H,CX3CL1,CXCL10,CXCL2,E2F7,FC GR1A,FOXMI,HSD11B1,IFIT2,IRF7,LYZ, MELK,MKI67,MMP9,MYLIP,NUSAP1,PL K1,PRC1,SREBF1,TOP2A,UBE2C,UHRF1	173 (16)
ERBB2	kinase	0.202	5.2E-22	ANGPT2,ASPM,ATF3,BARD1,BHLHE40, BUB1B,CAVIN2,CCL11,CCL2,CCL5,Ccl7 ,CCNA2,CCNB1,CCNB2,CCND1,CD82,C DC20,CDCA2,CDCA3,CDCA7,CDCA8,C DH2,CDK1,CDKN2C,CDT1,CENPA,CEN PF,CKS2,CLDN4,CST8,CXCL10,E2F7,ES PL1,ETV1,FSTL3,GALNT18,HOMER2,H TRA1,ICAM1,IL17B,JUNB,JUP,LTBP2,L UM,mir23,mir27,MKI67,MMP12,MMP16, MMP9,MXD3,NDC80,NOTCH4,NUP210, PENK,PRC1,RFC4,RRM1,SLC2A1,STAT3 ,STEAP4,TAGLN,THBS1,TK1,TOP2A,TY MS,UNC5B,VEGFA	263 (24)

Table S6: Antibodies used in the current study

IF, Immunofluorescence; IHC, ImmunoHistoChemistry

Category	Antibody/protein	Host	Dilution	Reference	Supplier
Primary	γ H2AX	Mouse	1:200 (IHC) 1:500 (IF)	05-636	Merck
	DDX4	Rabbit	1:800 (IF)	Ab13840	Abcam
	Ki67	Rabbit	1:500 (IF)	ab16667	Abcam
	SYCP3	Rabbit	1:200 (IF)	ab15093	Abcam
	SYCP3	Mouse	1:200 (IF)	ab97672	Abcam
	SYCP1	Rabbit	1:200 (IF)	ab175191	Abcam
Secondary	Anti-rabbit (Alexa Fluor 488®- conjugated)	Goat	1:200 (IF)	ab150077	Santa Cruz Biotechnologies
	Anti-rabbit (Alexa Fluor® 594- conjugated)	Goat	1:200 (IF)	ab150080	Santa Cruz Biotechnologies
	Anti-mouse (Alexa Fluor®488- conjugated)	Goat	1:200 (IF)	Ab150113	Santa Cruz Biotechnologies
	Anti-mouse (Biotin-conjugated)	Goat	1:200 (IF)		Abcam
	Polyvalent (Biotin-conjugated)	Goat	Prediluted (IHC)	TP-60-BN	ThermoFisher Scientific
Control IgGs		Rabbit	1:200 (IF, IHC)	02-6102	Invitrogen
		Mouse	1:200 (IF, IHC)	Sc-2025	Santa Cruz Biotechnologies
	Alexa Fluor® 594-conjugated streptavidin	/	1:200 (IF)	S11227	Invitrogen

Discussion

Les travaux de recherche réalisés au cours de cette thèse ont tenté de répondre à plusieurs questions :

- Les protocoles de congélation utilisés chez la souris et l'homme permettent-ils de préserver la structure et l'intégrité du tissu testiculaire prépubère de rat ?
- La culture organotypique à interface gaz-liquide sur gel d'agarose du tissu testiculaire prépubère permet-elle de produire des spermatozoïdes de rat *in vitro* ?
- Quels sont les mécanismes moléculaires dérégulés au cours de la culture organotypique de tissu testiculaire prépubère de rat, entraînant l'arrêt de maturation des cellules germinales *in vitro* ?

Dans cette partie du manuscrit, nous discuterons *dans un premier temps* la pertinence du modèle murin choisi pour réaliser cette étude. *Dans un second temps*, les résultats obtenus au travers des deux articles présentés seront discutés, notamment la validation des protocoles de congélation de tissu testiculaire chez le rat prépubère, la culture organotypique du tissu testiculaire de rat prépubère, l'optimisation de cette approche de maturation *in vitro* et enfin les hypothèses quant à l'origine de l'arrêt de maturation observé en culture.

Modèle murin utilisé – Choix du rat par comparaison à la souris

Depuis plusieurs décennies, le rongeur est un modèle de choix pour la réalisation d'études cliniques et fondamentales. En effet, son temps de génération et d'âge de maturité sexuelle en fait un modèle particulièrement prisé, permettant d'obtenir rapidement des résultats. Les 90% de similitude avec le génome humain en font un parfait candidat pour l'étude de la fonction de gènes (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004). La spermatogenèse présente également de nombreuses similitudes entre les rongeurs et l'homme. Que ce soit chez l'homme, le primate non humain, le rat ou la souris, la spermatogenèse est un mécanisme hautement conservé, permettant la production de cellules haploïdes à partir de cellules diploïdes. Dans chacune de ces espèces, la structure des tubes séminifères ainsi que l'organisation du testicule sont identiques. De plus, ces trois espèces exorchides ont toutes trois une spermatogenèse ayant lieu de façon optimale à 34°C. Cependant, de nombreuses divergences sont néanmoins présentes entre ces espèces. En effet, tandis qu'un rat produira ses

premiers spermatozoïdes au bout de 53 jours *post partum* et a 35 jours *post partum* chez la souris, l'initiation de la puberté chez l'homme se produit autour de 13 ans (Clermont, 1972). Cette différence de cinétique du développement testiculaire est aussi le reflet du développement des spermatogonies à différents stades de maturité, avec une entrée en méiose dès 8 jours *postpartum* chez la souris, 12 jours *postpartum* chez le rat alors que l'âge auquel la méiose commence chez le garçon est variable d'un individu à l'autre, tout comme la quantité de spermatogonies présentes dans les tubes séminifères (Masliukaite *et al.*, 2016). Les étapes de prolifération et différenciation des spermatogonies diffèrent aussi entre le rongeur et l'homme, avec 7 stades successifs chez le rat et la souris contre 3 pour les primates (Oatley et Brinster, 2012). De plus, des différences de régulation hormonale pouvant être observées entre différentes espèces de rat (Kühn *et al.*, 1983), il est tout à fait possible que des différences soient présentes entre le rongeur et l'homme.

La première étude qui a rapporté l'obtention d'une spermatogenèse complète *in vitro* ayant été réalisée chez la souris (Sato *et al.*, 2011b), très peu d'équipes se sont intéressées à évaluer ces mêmes conditions de culture dans d'autres espèces. Chez l'homme et le rat, très rapidement, un arrêt de maturation précoce des cellules germinales a été observé (Reda *et al.*, 2016; de Michele *et al.*, 2017). La divergence d'une partie des mécanismes physiologiques entre la souris et l'homme, associée à la durée de la spermatogenèse deux fois plus courte chez la souris que chez l'homme (35 jours vs 74 jours) font de la souris un modèle moins approprié pour une transposition directe de la procédure de culture organotypique chez l'homme. Contrairement à la souris, le modèle rat possède une durée de la spermatogenèse intermédiaire de 53 jours et un cycle de l'épithélium séminifère de 13 jours, contre 8,6 jours pour la souris et 16 jours pour l'homme (Perey *et al.*, 1961). De plus, l'hypothèse selon laquelle le blocage observé chez l'homme pouvant être identique, ou en partie, à celui observé chez le rat en fait un modèle pertinent pour l'optimisation des conditions et milieux de culture, avant d'envisager des essais chez l'homme.

Une constante évolution des modèles est nécessaire afin de se trouver au plus proche des échantillons initiaux. Le modèle murin présente de nombreux avantages tels que la disponibilité des tissus ainsi que la taille importante des portées générées. Cependant, au-delà de la dimension d'accessibilité aux tissus, il est important de prendre en compte la distance

phylogénétique. L'organisation hélicoïdale des cycles de l'épithélium séminifère est commune entre le ouistiti (*Callithrix jacchus*) et l'homme, tandis qu'une organisation segmentée est observée chez les rongeurs (Millar *et al.*, 2000). L'utilisation d'un modèle de primate non humain tel que le ouistiti permettrait de prendre en compte divers paramètres, potentiellement spécifiques au genre primate.

Validation des protocoles de congélation

La congélation de tissu testiculaire prépubère est actuellement mise en œuvre afin de préserver la fertilité des enfants traités pour le cancer. Malgré son utilisation courante, cette technique n'est cependant pas sans danger pour le tissu si le protocole est mal réalisé. En effet, la congélation est un processus permettant le passage de l'eau d'un état liquide à un état solide. Cette transformation induit la formation de cristaux de glace, pouvant entraîner des dommages sévères aux cellules ainsi qu'un effet de solution, par concentration des solutés et donc une déshydratation cellulaire. Ces dommages sont à l'origine de mort cellulaire après décongélation (Mazur, 1970). Afin d'éviter ces effets néfastes, les protocoles de congélation ont été adaptés avec l'ajout de CPA, permettant une meilleure survie cellulaire après décongélation.

Afin de préserver au mieux l'intégrité structurale et fonctionnelle du tissu testiculaire prépubère, des travaux de recherche permettant d'obtenir les conditions de congélation optimales ont été menés. Le tissu testiculaire d'enfants étant disponible en trop petite quantité, le tissu testiculaire de souris prépubères a été utilisé afin de réaliser les premières mises au point au sein du laboratoire (Milazzo *et al.*, 2008). Différents protocoles ont été comparés et différents paramètres évalués : la nature et la concentration du CPA interne utilisé (DMSO ou PROH), la courbe de descente en température (contrôlée ou non contrôlée, lente ou rapide) et la présence ou non d'un *seeding*. Le protocole optimal nécessite l'utilisation d'un milieu de congélation contenant du DMSO à 1,5 M, du sucrose à 0,05 M et 10% de SVF, une étape d'équilibration du tissu dans le milieu de congélation de 30 minutes à 4°C, suivie d'une étape de congélation lente contrôlée sans *seeding* automatisée. Ce protocole a permis de maintenir l'intégrité tissulaire, ainsi que la fonction endocrine (production de testostérone par les cellules de Leydig) du tissu testiculaire de souris prépubères congelé/décongelé mis en culture (Milazzo *et al.*, 2008). Actuellement, la congélation lente contrôlée est utilisée au sein du Laboratoire de Biologie de la Reproduction du CHU de Rouen, et permet de préserver l'intégrité structurale

du tissu testiculaire prépubère humain après décongélation (Rives-Feraille *et al.*, en révision). En France, plus de 700 enfants ont pu bénéficier de ce protocole mis au point au sein du laboratoire, utilisé au niveau national.

Bien que le protocole de congélation optimisé et l'utilisation d'agents cryoprotecteurs permettent le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du tissu testiculaire prépubère chez la souris et l'homme, il restait à démontrer que cette procédure peut aussi être utilisée chez le rat. La congélation lente contrôlée a préalablement été testée au sein du laboratoire dans le modèle rat (Travers *et al.*, 2011). Cependant, ce protocole n'a jusqu'alors pas été comparé à la vitrification, récemment mise au point chez la souris prépubère (Dumont *et al.*, 2015). Nos résultats ont montré une conservation de l'intégrité structurale des tissus après congélation lente contrôlée et décongélation, ainsi que la capacité proliférative des cellules testiculaires. Une légère augmentation du pourcentage de tubes présentant une fragmentation de l'ADN a cependant été observée. Ces résultats sont cohérents avec les études menées précédemment au sein du laboratoire dans le modèle souris (Milazzo *et al.*, 2008; Dumont *et al.*, 2015) et rat (Travers *et al.*, 2011). Afin d'évaluer l'impact des procédures de congélation/décongélation à court terme, les mêmes évaluations histologiques ont été effectuées 20h après décongélation. Si les altérations tissulaires déjà présentes immédiatement après congélation/décongélation sont encore observées 20h après la congélation/décongélation, le score lésionnel reste toutefois inférieur à 1 sur une échelle de 10, considéré comme étant en faveur d'un tissu modérément ou pas altéré après décongélation (Milazzo *et al.*, 2008). Après 20h, la capacité proliférative des cellules testiculaires est conservée au sein du tissu, avec néanmoins une légère diminution du pourcentage de cellules en prolifération par tube. A l'inverse, le pourcentage de tubes présentant une fragmentation de l'ADN est augmenté. Les cellules pourraient avoir été endommagées par les CPA lors des procédures de congélation/décongélation. En effet, les CPA peuvent aussi avoir un effet cytotoxique, en particulier si leurs concentrations et leurs temps d'exposition ne sont pas adaptés (Pegg, 2002). Au total, les procédures de congélation/décongélation utilisées chez la souris et l'homme sont aussi adaptées au modèle rat, les altérations tissulaires observées après décongélation étant modérées.

Afin de limiter la formation de glace intracellulaire lors de la congélation, la technique de vitrification a été développée. Elle permet une descente en température ultra-rapide. Utilisée principalement sur le tissu testiculaire prépubère de souris, ont été réalisées sur le tissu testiculaire chez le garçon prépubère (Curaba *et al.*, 2011a; Poels *et al.*, 2013). Une étude

préalable menée au sein du laboratoire sur le modèle souris a permis de comparer les différentes procédures de vitrification et la congélation lente contrôlée (Dumont *et al.*, 2015). Une supériorité du protocole de vitrification sur surface solide a été mise en évidence avec des altérations tissulaires moindres après vitrification par comparaison à la congélation lente contrôlée (Dumont *et al.*, 2015). Chez le rat, nos résultats montrent que le score lésionnel est similaire après vitrification ou congélation lente contrôlée. Cependant, une meilleure capacité de prolifération des cellules intratubulaires est observée après décongélation dans les tissus vitrifiés tandis qu'une augmentation de la proportion de cellules ayant un ADN fragmenté est observée dans les tissus obtenus après congélation lente. Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine d'une altération des cellules testiculaires plus importante après congélation lente contrôlée qu'après vitrification. Contrairement à la vitrification, la CLC nécessite un temps d'équilibration de 30 minutes, suivie d'une phase de refroidissement lente, prolongeant le temps d'exposition du tissu aux CPA, mais aussi à l'origine d'un choc thermique et pouvant conduire à la formation de glace intracellulaire. La vitrification, non automatisée, nécessite cependant une phase d'apprentissage plus longue.

Chez la souris, un meilleur rendement spermatique a été obtenu dans les cultures de tissus vitrifiés par rapport aux cultures de tissus congelés (Dumont *et al.*, 2015). Une autre étude a montré la possibilité d'obtenir une descendance à partir de spermatozoïdes de souris issus de cultures de tissus congelés ou vitrifiés, sans mettre en évidence la supériorité d'un des deux protocoles (Yokonishi *et al.*, 2014). Concernant la progression de la spermatogenèse *in vitro* dans le modèle rat, nos résultats n'ont montré aucune différence significative entre cultures de tissus congelés ou vitrifiés.

Les protocoles de congélation lente contrôlée et de vitrification, optimisés dans le modèle souris permettent donc un maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du tissu testiculaire de rat prépubère. Cependant, une proportion non négligeable des cellules testiculaires semble être altérée durant ces processus. La sortie du testicule de son environnement physiologique et les processus de congélation/décongélation induisent la formation d'ERO (Aliakbari *et al.*, 2016a), qui peut être concomitante avec une altération des voies de défenses anti-oxydantes (Bilodeau *et al.*, 2000). Un excès de production d'ERO peut conduire à une peroxydation des lipides membranaires, des dommages à l'ADN ainsi qu'une apoptose cellulaire (Agarwal *et al.*, 2014a). Le tissu testiculaire étant particulièrement riche en acides gras polyinsaturés, il se trouve être particulièrement sensible à la peroxydation lipidique

(Aitken et Roman, 2008). Afin de réduire au maximum les effets délétères des ERO, la vitamine E a été ajoutée dans les milieux de congélation/décongélation. Les travaux publiés de notre équipe sur le sujet ont montré une amélioration de la préservation du tissu testiculaire de souris prépubères en présence de vitamine E à 3,4 mM et de la production de spermatozoïdes *in vitro* (Arkoun *et al.*, 2019). La vitamine E est un antioxydant lipophile qui est démontré comme étant vital pour le maintien de la spermatogenèse chez les mammifères (Johnson, 1979). En revanche, nos résultats montrent que l'ajout de vitamine E à 3,4 mM dans les milieux de congélation/décongélation de tissu testiculaire de rats prépubères est associé à une augmentation de l'apoptose et de la fragmentation de l'ADN dans les tubes séminifères des tissus congelés ou vitrifiés. La concentration de vitamine E utilisée dans notre étude n'est peut-être pas adaptée pour le tissu testiculaire de rats prépubères. Un effet bénéfique de la vitamine E sur la prolifération de cellules testiculaires isolées de souris et sur leur viabilité a été obtenue à des concentrations plus élevées : 4,6 mM (Aliakbari *et al.*, 2016b) et 220 mM (Aliakbari *et al.*, 2016a). Une deuxième hypothèse, beaucoup plus plausible, est que la vitamine E pourrait se fixer aux tissus et réduire de façon locale la vitesse de refroidissement (Mazur, 1977). L'utilisation d'autres antioxydants tels que la vitamine C, les caroténoïdes ou l'acide urique (Cadenas, 1989) devraient être testés afin de protéger plus efficacement les cellules lors des phases de congélation/décongélation.

Culture organotypique – Progression de la spermatogenèse et optimisation des conditions de culture

La culture organotypique sur gel d'agarose est un modèle utilisé depuis les années 1930 et dont la structure a évolué au cours du temps. Sa mise en œuvre relativement simple en fait un modèle prisé. Malgré la réussite dans l'obtention d'une spermatogenèse complète *in vitro* dans les cultures de tissus testiculaires prépubères de souris, des optimisations de ce système de culture sont à réaliser afin d'obtenir la même réussite dans d'autres espèces ou améliorer les résultats déjà obtenus.

Outre l'arrêt de maturation des cellules germinales et le faible rendement spermatique constatés respectivement dans les cultures organotypiques de rat et de souris, une zone « nécrotique » apparaît assez tôt (dès 20h de culture) au centre des explants tissulaires mis en culture. L'approvisionnement en nutriments et en oxygène, assuré dans les conditions

physiologiques par le système circulatoire, semble être insuffisant au centre des explants pour permettre la survie cellulaire.

Bien qu'elle vise à mimer au mieux les conditions physiologiques, la culture organotypique sur gel d'agarose n'a pas permis jusqu'à maintenant de produire des spermatozoïdes *in vitro* chez le rat à partir de tissus testiculaires prépubères. Plusieurs études ont utilisé des conditions de culture différentes de celles développées chez la souris. En 2016, l'équipe du Pr Stukenborg a obtenu de rares spermatides rondes à partir de tissus testiculaires de rats prépubères (Reda *et al.*, 2016). Des gels d'agarose à 0,35%, et non à 1,5% comme chez la souris, ont été utilisés dans cette étude. De plus, les tissus mis en culture provenant de rats âgés de 5 *jpp* contiennent encore des gonocytes tandis que les seules cellules germinales présentes au moment de la mise en culture des tissus de souris de 6 *jpp* sont des spermatogonies. Afin de déterminer les conditions de culture permettant la progression de la spermatogenèse *in vitro* chez le rat, des cultures tissulaires faisant varier ces paramètres ont été réalisées. Nos résultats montrent qu'une proportion plus élevée de tubes séminifères contenant des spermatocytes est obtenue lorsque des tissus âgés de 8,5 *jpp* (contenant uniquement des spermatogonies) plutôt que de 5,5 *jpp* sont mis en culture. Ces résultats sont cohérents avec la littérature : en effet, une étude menée chez la souris a montré que la différenciation des cellules germinales *in vitro* était plus efficace lorsque les testicules prépubères contenaient des spermatogonies plutôt que des gonocytes au moment de la mise en culture (Arkoun *et al.*, 2015). Nos données montrent également que l'utilisation de gels d'agarose à 1,5% est préférable aux gels d'agarose à 0,35%. Un maillage plus serré permet une diffusion plus lente des macromolécules au sein des gels d'agarose. L'utilisation du protocole développé par Reda et collaborateurs ne nous a pas permis d'obtenir des spermatides rondes. Seuls 4% des tubes contenant au minimum une spermatide ronde (Reda *et al.*, 2016), il est possible que nous n'ayons pas détecté ces rares cellules germinales au sein des explants tissulaires. Une autre explication pourrait être la différence de souches de rats utilisées : des rats Wistar dans notre étude et des rats Sprague-Dawley dans l'étude de Reda et collaborateurs. Une étude récente a montré une différence d'efficacité de maturation *in vitro* de tissu testiculaire prépubère entre les souches de souris C57BL/6 et B6D2F, avec un arrêt de maturation des cellules germinales au stade spermatocyte I pour les souris de souche B6D2F (Portela *et al.*, 2019b).

Des milieux de compositions différentes issus de la littérature ont ensuite été comparés. Ces milieux sont supplémentés avec des facteurs favorisant la progression de la spermatogenèse ou indispensables à la survie cellulaire.

L'une des premières modifications du milieu de culture ayant permis une progression significative de la spermatogenèse *in vitro* fut le remplacement du SVF par du KSR. Ce sérum, jamais utilisé auparavant lors de la culture organotypique pour maturer *in vitro* des spermatogonies, est couramment utilisé dans la culture de cellules embryonnaires souches, permettant de promouvoir leur différenciation tout en conservant leur état indifférencié. L'utilisation du KSR à 10% a ainsi permis d'obtenir pour la première fois une spermatogenèse complète *in vitro* à partir de tissus testiculaires de souris prépubères (Sato *et al.*, 2011b). Parallèlement, les auteurs ont rapporté un effet similaire de l'AlbuMAX™, qui est composé d'albumine sérique riche en lipides. Cet effet bénéfique sur la progression de la spermatogenèse serait plus lié à la présence de facteur(s) de stimulation dans le KSR ou l'AlbuMAX™ qu'à un effet inhibiteur du SVF, la combinaison SVF + AlbuMAX™ permettant une différenciation cellulaire similaire à celle observée en présence d'AlbuMAX™ seul (Sato *et al.*, 2011b). Dans le modèle rat, nos résultats montrent une proportion de tubes séminifères au stade spermatocyte pachytène plus importante après 16 jours de culture avec des milieux supplémentés en KSR (milieux D : 51,1% et F : 34,4%) en comparaison aux mêmes milieux sans KSR (milieux C : 31,1% et E : 20,0%), même si ces résultats ne sont pas significatifs. Il apparaît nécessaire de supplémenter les milieux de culture avec d'autres facteurs afin de promouvoir la différenciation des cellules germinales jusqu'au stade spermatozoïde dans les cultures organotypiques de rat. La composition chimique du KSR n'étant pas définie, l'équipe du Pr Ogawa a tenté d'obtenir une spermatogenèse complète *in vitro* chez la souris en utilisant des milieux de culture chimiquement définis dépourvus de sérum (Sanjo *et al.*, 2018, 2020). Jusqu'à maintenant, ces milieux ont permis d'obtenir une progression de la spermatogenèse *in vitro* jusqu'au stade spermatide ronde chez la souris (Sanjo *et al.*, 2020).

Différentes études ont utilisé le rétinol ou son métabolite actif l'acide rétinoïque pour obtenir une spermatogenèse complète *in vitro* chez la souris et le rat, sans y parvenir (Steinberger *et al.*, 1964b; Zhou *et al.*, 1993). L'intérêt de l'ajout du rétinol lors de la culture organotypique sur gel d'agarose a été mis en évidence dans une série de travaux réalisés au sein de notre équipe. En effet, la production de spermatozoïdes *in vitro* chez la souris est un événement rare, dont le rendement nécessite d'être amélioré. Ces travaux ont montré qu'une supplémentation en rétinol à 1 μ M permettait d'augmenter significativement la quantité de

spermatides rondes et de spermatozoïdes produits en culture organotypique de tissu testiculaire prépubère chez la souris (Arkoun *et al.*, 2015). De plus, une stimulation significative de la différenciation des CSS exprimant c-KIT (*KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase*) et de leur entrée en méiose par l'expression de STRA8 a été observée en présence de rétinol (Arkoun *et al.*, 2015). Plus récemment, une étude a confirmé l'impact de la signalisation du rétinol par une promotion de la différenciation des spermatogonies lors de la culture organotypique chez la souris après ajout de rétinol et acide rétinoïque dans le milieu de culture (Sanjo *et al.*, 2018). En effet, l'acide rétinoïque est connu pour agir au sein du testicule *via* son association aux récepteurs RAR et RXR (Endo *et al.*, 2017). Une étude récente a mis en évidence que la source d'*atRA* dérivée des cellules germinales n'est pas indispensable à la spermiation, au contraire de l'*atRA* issu des cellules de Sertoli. L'*atRA* permettant la différenciation des CSS, ne serait cependant pas responsable de l'entrée en méiose des spermatogonies et de l'expression de *Stras8* (Teletin *et al.*, 2019). Ces résultats défient dogme actuel de la signalisation du rétinol comme étant à l'origine de l'entrée en méiose des spermatogonies (Endo *et al.*, 2017). L'identification des facteurs nécessaires à l'entrée en méiose pourrait permettre de développer des milieux de cultures, plus aptes à simuler l'environnement physiologique et permettant une différenciation optimale des CSS lors de la culture *in vitro*.

Associée aux régulations paracrines omniprésentes au sein du testicule, une régulation endocrine de la spermatogenèse par la LH et la FSH est aussi à prendre en considération. En effet, ces hormones sont indispensables au bon déroulement de la spermatogenèse. Une inactivation des gènes codants pour les récepteurs à la FSH et aux androgènes conduit à un effondrement de la population de cellules germinales, lié à leur incapacité à progresser au-delà du stade spermatocyte pachytène précoce (Abel *et al.*, 2008). De plus, l'inhibition de la FSH par l'injection d'anticorps anti-FSH entre 14 et 18 *jpp* chez le rat conduit à une apoptose des spermatogonies et des spermatocytes leptotènes (Ruwanpura *et al.*, 2008). Des suppléments hormonaux ont couramment été utilisés lors des cultures organotypiques (Steinberger *et al.*, 1964a; Boitani *et al.*, 1993; Arkoun *et al.*, 2015; Dumont *et al.*, 2017; de Michele *et al.*, 2018b; Kojima *et al.*, 2018; Medrano *et al.*, 2018b; Sanjo *et al.*, 2018; Portela *et al.*, 2019a). Cependant, très peu d'études se sont intéressées à l'effet individuel de chacune de ces hormones sur les tissus cultivés *in vitro*. Au sein du laboratoire, des suppléments en FSH/LH ont montré un effet significatif de ces hormones sur la production de spermatides rondes dans le modèle murin, sans pourtant augmenter la proportion de spermatides allongées. Un effet délétère de l'association rétinol/FSH/LH a été observé, pouvant être dû à des effets

antagonistes de ces molécules entres-elles (Arkoun *et al.*, 2015). Néanmoins, une seconde étude réalisant une supplémentation en FSH seule, à la même concentration que la première étude, a mis en évidence une diminution de la proportion de tubes séminifères contenant des spermatides allongées (Oblette *et al.*, 2019). La composition particulièrement complexe des milieux de culture organotypique de tissus testiculaires de rat, utilisée dans cette première étude (Travers *et al.*, 2013; Perrard *et al.*, 2016; Oblette *et al.*, 2017), ne permet pas de savoir quelle est la contribution des supplémentations hormonales sur la maturation *in vitro* des cellules germinales. Afin de pouvoir étudier l'effet individuel de la FSH, de la LH ou de la testostérone, des cultures d'explants testiculaires pourraient être réalisées avec chacune de ces hormones à des concentrations physiologiques. Leur effet synergique serait également intéressant à étudier.

Comme mentionné précédemment, des ERO peuvent être produits lorsque le tissu testiculaire est en dehors des conditions physiologiques. Afin de limiter le stress oxydant au sein des explants tissulaires, des antioxydants comme les vitamines C et E peuvent être ajoutés dans les milieux de culture. Tout comme la vitamine E, la vitamine C contribue au maintien de la spermatogenèse, au moins en partie grâce à sa capacité à réduire la vitamine E et à maintenir cet antioxydant dans un état actif (Aitken et Roman, 2008). Une carence en vitamines C ou E entraîne un état de stress oxydant dans les testicules qui perturbe à la fois la spermatogenèse et la production de testostérone (Johnson, 1979). À l'inverse, l'administration de vitamine C à des rats adulte stimule la production de spermatozoïdes et la sécrétion de testostérone (Sönmez *et al.*, 2005). La supplémentation des milieux de culture en vitamine E a permis une augmentation de la production de spermatozoïdes *in vitro* (Arkoun *et al.*, 2019).

Différents milieux de culture comportant tout ou partie des supplémentations discutées précédemment ont été comparés dans notre travail de thèse afin d'évaluer leur impact sur la progression de la spermatogenèse *in vitro* chez le rat prépubère.

Les milieux dont la composition est la plus complexe (milieux C, D, E et F) n'ont pas permis de maintenir les spermatocytes tout au long de la culture. En effet, une différenciation des spermatogonies jusqu'au stade spermatocyte pachytène a été obtenue avec ces milieux à J16, suivie d'une déplétion en spermatocytes, à l'exception du milieu F. Étonnamment, le milieu C avait permis d'obtenir une différenciation des spermatogonies en spermatozoïdes dans des cultures de tubes séminifères de rats prépubères au sein d'un bioréacteur d'hydrogel composé de chitosan (Perrard *et al.*, 2016). La différence entre les résultats obtenus est

probablement liée à la nature des échantillons utilisés (fragments testiculaires *vs* tubes séminifères isolés), au mode de culture (en interface gaz-liquide *vs* au sein d'une matrice) et au support de culture utilisé (agarose *vs* chitosan). L'incorporation des tubes séminifères au sein de la matrice de chitosan permet d'éviter leur exposition directe à l'air ambiant et potentiellement les effets délétères du stress oxydant, contrairement au système de culture en interface gaz-liquide. De plus, au sein de la matrice de chitosan, la surface de contact entre les tubes séminifères et le milieu de culture est plus importante, permettant un meilleur approvisionnement en nutriments et en oxygène. Des études récentes ont montré que l'étalement des fragments testiculaires sur gel d'agarose, sous une matrice de PDMS, permet également d'augmenter la surface d'échange entre le tissu et le milieu de culture et d'éviter le contact du tissu avec l'air ambiant (Matsumura *et al.*, 2021). Les résultats de Perrard et collaborateurs n'ont à ce jour jamais été reproduits et sous réserve qu'ils puissent l'être, le milieu C pourrait donc contenir les facteurs nécessaires à l'initiation et à l'achèvement d'une spermatogenèse *in vitro* chez le rat. Le milieu E, dont la composition est très proche du milieu C et qui avait été testé au sein du laboratoire pour des cultures organotypiques de souris sur inserts de polycarbonate (Travers *et al.*, 2013), permet uniquement une progression de la spermatogenèse chez le rat jusqu'au stade spermatocyte pachytène, avec une perte de ces cellules au-delà de 16 jours de culture.

Un arrêt de maturation précoce au stade spermatocyte pachytène a également été obtenu avec les milieux A et B. Cependant, les spermatocytes pachytènes sont maintenus en culture jusqu'à J45 avec ces milieux, contrairement aux milieux C, D, E et F. À ce stade de la méiose, les chromosomes homologues sont théoriquement complètement appariés grâce au complexe synaptonémal et les recombinaisons génétiques doivent avoir lieu. Des anomalies lors de ces événements, telles que l'absence d'appariement des chromosomes, l'absence de recombinaisons génétiques et l'absence de réparation des DSBs, peuvent entraîner un arrêt méiotique au stade pachytène, un échec de l'inactivation des chromosomes sexuels menant ainsi à une apoptose (Mahadevaiah *et al.*, 2008; Burgoyne *et al.*, 2009). Une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans les recombinaisons génétiques ou les points de contrôle méiotique pourrait expliquer cet arrêt de maturation. Ces hypothèses sont appuyées par les données obtenues lors de notre analyse transcriptomique réalisée sur les tissus de rats prépubères maturés *in vitro*. En effet, une dérégulation de gènes ayant un rôle connu dans les DSBs ainsi que les recombinaisons génétiques a été mise en évidence. De plus, près de 29 gènes en lien avec la ségrégation méiotique des chromosomes et 11 avec les checkpoints cellulaires sont

observés comme étant dérégulés. Les tissus utilisés ayant été choisis pour leur contenu cellulaire proche, il est plus que probable que les dérégulations observées soient dues à une expression erronée de ces gènes dans les spermatoocytes produits *in vitro*. Ces résultats sont appuyés par l'analyse cytologique faisant apparaître la présence d'asynapsis des chromosomes au stade spermatoocytes pachytènes et de plusieurs *foci* γ H2AX. Parmi nos 600 gènes d'intérêts, 17 sont des gènes codés par le chromosome X, dont l'expression est inhibée au stade spermatoocyte pachytène. Cette analyse ayant été réalisée sur du tissu testiculaire entier et non sur cellules isolées, il est impossible de déterminer le type cellulaire exprimant chacun de ces différents gènes. Une hybridation *in situ* des ARNm sur coupe de tissus pourrait permettre d'identifier le ou les types cellulaires à l'origine de cette expression génique et de déterminer si une perturbation de l'inactivation des chromosomes sexuels est bien présente.

Les résultats obtenus avec les différents milieux de culture soulèvent de nouvelles possibilités d'optimisation des conditions de culture. En effet, les milieux C, D, E et F permettent d'obtenir des spermatoocytes pachytènes à J16 et les milieux A et B permettent en plus un maintien de ces cellules jusqu'à J45. Il est important de noter que plus de 50% des tubes séminifères analysés à J16 contenaient des spermatoocytes pachytènes avec le milieu D contre 30% et 6% avec les milieux A et B, respectivement. L'absence de spermatoocyte pachytène observée avec les milieux C, D, E et F à partir de J28 pourrait être la conséquence d'un épuisement des différentes populations de spermatogonies, associé à une apoptose des spermatoocytes. Il est cependant important de prendre en compte qu'une préservation de l'activité proliférative des cellules intratubulaire est observée *in vitro* avec le milieu B (milieu utilisé lors de nos cultures de tissus dans la deuxième étude de cette thèse), sans pour autant permettre la différenciation des cellules germinales au-delà du stade spermatoocyte I. Il serait cependant intéressant d'évaluer ce paramètre au sein des différents milieux utilisés afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse. Une association de ces deux types de milieux sous forme de cultures séquentielles, avec une première phase de différenciation (milieu D) suivie d'une phase de maintien et différenciation des cellules germinales (milieux A ou B), est en cours d'évaluation.

Spermatogenèse *in vitro* – Fonctionnalité du tissu testiculaire

Diverses étiologies peuvent être responsables d'arrêts de maturation. L'azoospermie non obstructive observée chez les hommes infertiles peut être liée à des anomalies génétiques, des altérations de la fonction endocrine testiculaire, ou des conditions environnementales délétères pour la prolifération et la différenciation des cellules de la lignée germinale. Ces mêmes dérégulations, peuvent être à l'origine de notre arrêt de maturation.

Afin d'obtenir une progression de la spermatogenèse *in vitro* dans le modèle rat, il est indispensable de comprendre les mécanismes altérés au sein des explants testiculaires durant la culture. C'est pourquoi, dans la deuxième étude de cette thèse, (i) nous avons analysé dans un premier temps la fonctionnalité du tissu testiculaire, mais aussi la qualité des spermatoocytes pachytènes obtenus lors des cultures de tissus frais, puis (ii) dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires dérégulés lors de la culture organotypique, pouvant altérer la progression de la spermatogenèse *in vitro*.

Différents évènements ont lieu durant la première vague de la spermatogenèse. Que ce soit la mise en place de la BHT ou la vague majeure d'apoptose des cellules germinales, ces processus vont influencer le devenir du tissu. Ces évènements, indispensables durant la maturation du tissu *in vivo*, peuvent devenir délétères en cas de dérégulation. En effet, l'apoptose des cellules germinales est contre-productive dans le cadre de la maturation *in vitro* du tissu. La mise en place de la BHT est quant à elle indispensable pour la génération des cellules méiotiques et post-méiotiques, et est conditionnée par l'état de différenciation des cellules de Sertoli, grandement influencées par l'environnement testiculaire.

Afin d'évaluer l'impact de la culture sur la fonctionnalité des explants testiculaires, nous avons analysé les tissus au moment où des spermatoïdes rondes sont présentes dans la majorité des tubes séminifères, soit théoriquement à J28 dans les cultures d'explants et à 36,5 *jpp* dans les contrôles *in vivo* d'âges correspondants.

En accord avec la première étude de cette thèse, aucune cellule germinale au-delà du stade spermatoocyte I n'a été observée en culture. Comme discuté précédemment, l'équipe du Professeur Stukenborg a obtenu de rares spermatoïdes rondes, mais nous n'avons pas réussi à reproduire ces résultats (Reda *et al.*, 2016). Très récemment, Matsumura et collaborateurs ont

réussi à obtenir des spermatides rondes à partir de tissus testiculaires de rats prépubères en utilisant le système de culture organotypique sur gel d'agarose recouvert d'une matrice de PDMS (Matsumura *et al.*, 2021). Dans cette publication, les auteurs ont aussi souligné la difficulté rencontrée à reproduire les résultats de Reda et collaborateurs en utilisant les mêmes conditions de culture. Ces derniers résultats sont prometteurs mais il semble que l'étape de la spermiogenèse, visant à produire des spermatozoïdes, soit encore difficile à surmonter.

Dans le testicule, chaque cellule de Sertoli peut supporter un nombre défini de cellules germinales en développement. En effet, il est essentiel de conserver un pool important de cellules germinales dans le tissu cultivé *in vitro*, en veillant au maintien de la balance entre prolifération et apoptose des cellules germinales au cours de la première vague de spermatogenèse. Ainsi, une inhibition de l'apoptose physiologique des cellules germinales lors de l'initiation de la spermatogenèse peut entraîner une perturbation de la spermatogenèse à l'âge adulte (Rodriguez *et al.*, 1997). Afin de déterminer si un excès ou une diminution en cellules germinales est à l'origine de l'arrêt de maturation *in vitro*, nous avons analysé le nombre de cellules germinales et de cellules de Sertoli intratubulaires. Nos résultats ont montré une perturbation du *ratio* cellules germinales/cellules de Sertoli à J28 de culture, par comparaison aux contrôles *in vivo*. Cette perturbation est due à une différence du nombre de cellules germinales différenciées au sein des tubes séminifères, le nombre de cellules de Sertoli étant conservé entre le tissu cultivé *in vitro* et les contrôles *in vivo* (14,5 *jpp* et 36,5 *jpp*).

Les données publiées dans la littérature montrent que l'hypoxie peut être à l'origine d'un arrêt de maturation (Gat *et al.*, 2010). Un pourcentage d'oxygène à 15% s'est avéré bénéfique pour le tissu testiculaire de rats prépubères mûré *in vitro*, tout comme une supplémentation du milieu de culture associant testostérone (1 μ M), triiodothyronine (2 ng/mL), LH (1 ng/mL) et FSH (1 ng/mL) (Matsumura *et al.*, 2021).

De manière intéressante, nos données montrent qu'après 28 jours de culture, le tissu testiculaire ressemble phénotypiquement au tissu testiculaire immature provenant de rats âgés de 14,5 *jpp*, correspondant au temps de l'initiation de la spermatogenèse. Trois hypothèses pourraient être envisagées pour expliquer le blocage de la spermatogenèse *in vitro* :

- Une diminution ou une absence de spermatogonies aptes à proliférer, entraînant un épuisement très rapide du pool de spermatogonies capables de se différencier,
- Une absence totale de différenciation des spermatogonies, les tissus ayant été mis en culture avant l'entrée en méiose des spermatogonies (12 à 14 *jpp*),

- Un échec de la spermatogenèse dû à un blocage de la méiose, phénotype fréquemment observée chez les patients présentant un arrêt de maturation (Yogev *et al.*, 2000, 2002).

Afin de vérifier ces hypothèses, nous nous sommes intéressés à la prolifération des cellules intratubulaires. Nos résultats montrent une forte activité proliférative des cellules intratubulaires, réfutant la première hypothèse proposée. Il semble en effet logique de penser que la majorité des cellules en prolifération sont des spermatogonies, puisqu'en condition physiologique la prolifération des cellules de Sertoli est achevée au temps correspondant *in vivo* (36,5 jpp). Un double marquage des cellules de Sertoli par le GATA4 (*GATA binding protein 4*) et des cellules en prolifération avec le Ki67 permettrait de déterminer le type cellulaire des cellules en prolifération. Pour aller plus loin, il serait intéressant de réaliser un double marquage DDX4 (*DEAD-box helicase 4*) /BrdU (BromodésoxyUridine), le BrdU marquant les cellules en prolifération. Ce marquage permettrait de déterminer si les cellules différenciées sont issues de la première vague méiotique des spermatogonies ou d'un retard de différenciation.

Au cours de la première vague de la spermatogenèse, une vague d'apoptose des cellules germinales est observée. Les cellules les plus sensibles à ce processus sont les spermatogonies et les spermatocytes I (Jahnukainen *et al.*, 2004). Un pourcentage plus élevé de tubes séminifères contenant des cellules avec un ADN fragmenté a été observé dans les cultures de tissus testiculaires de rat par rapport aux contrôles *in vivo*. Notre équipe a précédemment montré une augmentation de l'expression de facteurs pro-apoptotiques dans les cultures de tissus testiculaires prépubères de souris, qui n'empêchait cependant pas l'achèvement de la spermatogenèse *in vitro* dans ce modèle (Dumont *et al.*, 2017).

Pour compléter ces travaux, une analyse de la maturité et de la fonctionnalité des cellules de Sertoli devrait être réalisée. En effet, le métabolisme des cellules de Sertoli est fortement influencé par le milieu extérieur. Servant de cellules nourricières aux cellules germinales, une altération de leur fonctionnalité se traduit par des perturbations de la spermatogenèse (Rato *et al.*, 2012). Des immunomarquages AMH/AR permettraient d'évaluer le degré de maturation des cellules de Sertoli. Leur fonctionnalité pourrait aussi être évaluée par le dosage de l'inhibine B dans le milieu de culture. De plus, il apparaît nécessaire de s'assurer de l'intégrité de la BHT. En effet, une altération de la BHT conduit à une apoptose des cellules germinales en cours de méiose, induite par les cellules du système immunitaire (Jiang *et al.*, 2014). Une étude préalablement menée au sein de l'équipe sur des cultures organotypiques de souris a observé la mise en place d'une BHT fonctionnelle dans la majorité des tubes séminifères

(Rondanino *et al.*, 2017). La BHT étant aussi responsable du transport des métabolites (Pointis *et al.*, 2010) ainsi que du passage des spermatoocytes pré-leptotènes du compartiment basal vers le compartiment adluminal (Chihara *et al.*, 2013), une dérégulation de celle-ci pourrait être à l'origine de notre arrêt de maturation. De manière cohérente avec cette hypothèse, une dérégulation des gènes impliqués dans la réorganisation des jonctions cellulaires a été observée. Afin d'évaluer la mise en place et l'intégrité de la BHT, des analyses réalisées à l'aide de biotine imperméable à cette barrière sont actuellement en cours de réalisation.

Les altérations du système endocrine sont connues pour être à l'origine de perturbations de la spermatogenèse. L'intégrité fonctionnelle des cellules de Leydig a été évaluée par la mesure des taux de testostérone intra-testiculaire et du relargage de testostérone dans le milieu de culture, à différents temps au cours de la première vague de la spermatogenèse. Des taux similaires de testostérone intra-testiculaire ont été observés *in vitro* et *in vivo*. Une légère diminution a été observée à J6, probablement due à la mise en culture du tissu. Ces résultats suggèrent une préservation de la fonctionnalité des cellules de Leydig ainsi qu'une maturation similaire de ces cellules entre les conditions *in vitro* et *in vivo*. De la même manière, Reda et collaborateurs avaient observé une concentration élevée en testostérone intratesticulaire au début de la culture de tissu testiculaire de rats prépubères, suivie d'une diminution rapide (Reda *et al.*, 2016). Une ré-augmentation progressive de la concentration en testostérone intratesticulaire est néanmoins observée en fin de culture (équivalent à 57 *jpp*) (Reda *et al.*, 2016). En effet, la production d'androgènes varie tout au long de la première vague de la spermatogenèse. Suite à la mini-puberté, les cellules de Leydig progénitrices entrent en prolifération à partir de 8 *jpp* chez le rat, tandis que les cellules de Leydig fœtales sont progressivement remplacées. Les cellules de Leydig progénitrices commencent à produire de l'androstérone (Haider, 2004), sous l'action de la LH. À partir de 25 *jpp*, les cellules de Leydig commencent à produire progressivement de la testostérone, stimulant la spermatogenèse. Entre 35 et 45 *jpp*, les cellules de Leydig matures, présentes en grande quantité, produisent de la testostérone à des taux similaires à ceux observés à l'âge adulte (Picut *et al.*, 2015). Nos résultats ne montrent pas d'augmentation des taux de testostérone intra-testiculaire, ni des taux de testostérone libérée dans les milieux de culture. Des dosages de testostérone intratesticulaires après 45 jours de culture permettraient d'évaluer si l'activité stéroïdogène des cellules de Leydig est conservée dans le temps, et si elle reste similaire à celle observée *in vivo*.

Le spermatocyte I étant le stade le plus différencié de la méiose obtenu *in vitro*, nous sommes intéressés aux évènements caractéristiques de ce stade : la formation du complexe synaptonémal et la formation/réparation des cassures physiologiques de l'ADN double-brin. Récemment, Jan et collaborateurs ont réalisé des analyses de plusieurs biopsies testiculaires de patients présentant un arrêt de maturation au stade spermatocyte I. Leurs résultats ont mis en évidence deux phénotypes : les arrêts méiotiques de type I et de type II. Les spermatocytes pachytènes de type I se caractérisent par l'absence d'un corps XY, discernable par un espace vide au sein du noyau, et par une localisation dispersée de γ H2AX (Jan *et al.*, 2018). Les spermatocytes pachytènes de type II, qui présentent un immunomarquage γ H2AX restreint au niveau du corps sexuel XY, sont similaires aux spermatocytes pachytènes contrôles (Jan *et al.*, 2018). Nos analyses immunohistochimiques ont révélé un autre phénotype : la présence d'un immunomarquage γ H2AX tout le long de la chromatine condensée. Il est intéressant de noter que quelques spermatocytes présentaient également une fragmentation de leur ADN nucléaire, pouvant refléter le marquage γ H2AX observé.

Nos analyses réalisées sur cellules isolées ont montré un défaut de mise en place des éléments latéraux du complexe synaptonémal ainsi qu'une persistance des DSB au stade spermatocyte pachytène. La présence de nombreuses asynapsis est connue pour induire un défaut dans le recrutement des protéines ATR et BRCA1 impliquées dans les processus de DSB et de recombinaisons génétiques, conduisant à un défaut d'inactivation des chromosomes sexuels et à l'apoptose (Mahadevaiah *et al.*, 2008). Des analyses cytologiques en cours visent à déterminer le pourcentage de spermatocytes pachytènes présentant ces anomalies. Des analyses complémentaires par immunofluorescence révélant les protéines RAD51 et MLH1 (*MutL homolog 1*) permettraient de déterminer si des défauts dans la réparation des DSB ou de la réalisation des recombinaisons, respectivement, seraient aussi à l'origine de l'arrêt de maturation. En effet, en présence de nombreuses asynapsis et non-réparation des DSB, le *DNA damages checkpoint* se met en place, bloquant la maturation des cellules aberrantes, et pouvant entraîner leur apoptose (Burgoyne *et al.*, 2009). En effet, ce checkpoint permet le passage des cellules germinales au stade suivant en deçà d'un seuil de 20 foci γ H2AX (Deckbar *et al.*, 2007). Il serait donc important de s'interroger sur la qualité des gamètes produits suite à la différenciation des spermatocytes pachytènes dans le cas d'un achèvement de la spermatogenèse *in vitro*. En effet, malgré la présence dans nos cultures organotypiques de spermatocytes pachytènes anormaux contenant plusieurs foci γ H2AX, des spermatocytes diplotènes ont aussi été observés. Il est donc à supposer qu'une progression de la

spermatogenèse au-delà du stade spermatocyte pachytène est obtenue dans nos explants testiculaires, mais les spermatocytes diplotènes seraient générés en trop faible quantité pour permettre leur observation dans les coupes histologiques.

Spermatogenèse *in vitro* – Mécanismes moléculaires mis en jeu

Afin de comprendre l'origine de l'arrêt de maturation des cellules germinales observé *in vitro*, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires dérégulés dans les cultures organotypiques. Pour cela, nous avons comparé trois temps de culture *in vitro* (D16, D22 et D28) à des contrôles *in vivo* de 14,5 jpp. Le choix de ces différents temps s'appuie sur les données histologiques obtenues lors de notre première étude. L'arrêt de maturation étant au stade spermatocyte I, il était indispensable de se concentrer sur des temps de culture courts, ainsi qu'à un temps *in vivo* correspondant à l'entrée en méiose. De plus, le contenu cellulaire des tissus qui ont été comparés au niveau moléculaire était similaire.

L'analyse de l'ontologie de nos 600 DEG a permis de mettre en évidence les mécanismes globaux dérégulés lors de la culture organotypique. De façon cohérente avec nos résultats précédents, une dérégulation de l'expression des gènes en lien avec la mise en place du complexe synaptonémal, la ségrégation des chromosomes ou les *checkpoints* cellulaires a été observée. Un regroupement des gènes avec une fonction similaire est observée au sein des patterns 1-4 et 5-7. Le premier pattern étant composé majoritairement de gènes en lien avec la reproduction et le cycle cellulaire, et le deuxième pattern en lien avec des processus plus généraux tels que le développement cellulaire, la mort cellulaire et la réaction au stress. Parmi les 102 gènes ayant un lien avec la spermatogenèse ou le testicule, 53 sont exprimés dans les spermatocytes pachytènes, suggérant une forte perturbation de la physiologie de ce type cellulaire. De façon cohérente avec nos résultats précédents, une dérégulation de gènes en lien avec la mise en place du complexe synaptonémal et les DSBs a été observé. Une sous-expression de ces gènes peut entraîner une perturbation de la mise en place de ces processus et une activation des checkpoints cellulaires responsable d'une apoptose cellulaire (Barchi *et al.*, 2005; Burgoyne *et al.*, 2009). En effet, les gènes *Ube2c*, *Incenp*, *Plk1* et *Bub1b* impliqués dans les checkpoints cellulaires se trouvent également être dérégulés. La présence d'asynapsis et de

DSBs non réparées entraînent des perturbations de l'alignement et de la ségrégation des chromosomes homologues lors de la métaphase et de l'anaphase, pouvant conduire à des aneuploïdies ou à une activation des checkpoints méiotiques (Musacchio, 2015; Lane et Kauppi, 2019). Cependant, un dysfonctionnement de ces checkpoints peut aussi permettre à des cellules présentant des anomalies conduisant normalement à une apoptose cellulaire de progresser plus loin dans le cycle cellulaire. L'utilisation d'hybridation *in situ*, tel que la technologie RNAScope® (Biotechne, rennes, France) permettrait d'identifier les différents types cellulaires contenant nos ARN dérégulés, ainsi que de quantifier par cellule, la quantité d'ARN présents et de vérifier nos hypothèses.

D'autres termes de GO en lien avec la maturité des cellules somatiques ont également été mis en évidence. En effet, les enzymes clés de la stéroïdogénèse *Cyp17a1*, *Cyp11a1* et *Hsd3b1* sont sous-exprimés durant la culture *in vitro* de tissus testiculaires de rats prépubères. Ces enzymes, responsables de la conversion du cholestérol en progestérone puis androstènedione sont indispensables aux premières étapes de la stéroïdogénèse et donc à la production de la testostérone par la voie $\Delta 4$ (Saint-Dizier *et al.*, 2014). Une réduction de la transcription de ces gènes peut conduire à une réduction de la production de testostérone, et donc entraîner une altération de la spermatogénèse. De plus, différents gènes intervenant dans la voie de signalisation de la stéroïdogénèse sont *up*-régulés, tel que le *Ngfr*, connue pour être réprimé par les androgènes (Persson *et al.*, 1990). Ces données suggèrent donc une réduction de la production de la testostérone au cours de la culture de tissus *in vitro*. Ces résultats sont cohérents avec les données obtenues par RIA. En effet, nous avons comparé les tissus de 14,5 *jpp* aux tissus en culture. Or, une plus grande quantité de testostérone est détectée à ce temps *in vivo*, par comparaison au tissu cultivé *in vitro*. Une analyse plus approfondie de nos données de transcriptomiques a montré une diminution du taux de transcrits des enzymes de la stéroïdogénèse par comparaison aux temps équivalents de tissus *in vivo* et cultivés *in vitro* (données non montrées). Une validation de ces données par réalisation de western-blot est indispensable afin de valider ces hypothèses. La limite de détection de l'analyse RIA pourrait être compensée par la réalisation d'analyse par spectrométrie de masse, possédant une plus haute résolution. Un dosage des précurseurs de la voie androgénique, de la testostérone et des œstrogènes permettraient de compléter ces résultats.

Dans un second temps, une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans la réorganisation de la BHT a été mise en évidence. Son intégrité pourrait être évaluée par la réalisation d'un test de perméabilité à l'aide d'une Biotine. En cas d'altération de la BHT, une

analyse de la localisation des protéines qui la compose pourrait être réalisée, comme précédemment effectuée chez la souris (Rondanino *et al.*, 2017).

Certains gènes dérégulés sont impliqués dans des processus comme la mort cellulaire, la réponse au stress ou encore l'inflammation. En raison des conditions de culture, les explants testiculaires sont exposés à un environnement moins propice au développement et à la survie du tissu que dans des conditions physiologiques. Des résultats similaires ont été obtenus lors de culture de tissus testiculaires de souris prépubères, montrant une forte dérégulation des gènes en lien avec la réaction inflammatoire et le système immunitaire (Abe *et al.*, 2020a).

Une analyse IPA a été effectuée sur les DEG afin d'identifier les régulateurs situés en amont, pouvant être à l'origine des dérégulations observées dans notre jeu de données. Cette approche a mis en évidence une part importante des processus inflammatoires. En effet, parmi les 10 premiers *upstream regulators* identifiés, différentes cytokines et acteurs de l'inflammation pourraient être à l'origine des dérégulations. Parmi ceux-ci, le TNF α placé en deuxième position, est en partie produit par les macrophages pour promouvoir le processus inflammatoire. Son expression s'accompagne de la production d'ERO et de chimiokines (Syriou *et al.*, 2018). En outre, le TNF α est connu pour être activé par la voie de signalisation NF- κ B qui contribue à la survie et à la prolifération des cellules immunitaires, ainsi qu'impliqué dans la production de diverses cytokines (Zhao *et al.*, 2014). Le NF κ B est lui aussi retrouvé comme potentiel *upstream regulator*.

Les cytokines apparaissent comme étant des facteurs régulateurs de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig en modulant la production de testostérone (Hedger et Meinhardt, 2003; Winter *et al.*, 2014). Ces observations semblent cohérentes avec notre jeu de données qui montre une diminution des transcrits codant pour des enzymes de la stéroïdogénèse et une surexpression des gènes codant pour des cytokines ou impliqués dans des processus inflammatoires. De plus, les cytokines peuvent modifier la perméabilité de la BHT (Yan *et al.*, 2008; Lie *et al.*, 2011; Yáñez-Mó *et al.*, 2015), permettant le passage des spermatoocytes dans le compartiment adluminal par restructuration des jonctions Gap (Lui and Cheng, 2007; Chojnacka *et al.*, 2016). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la réponse inflammatoire au sein des explants tissulaires pourrait perturber l'activité stéroïdogène des cellules de Leydig et la fonctionnalité des cellules de Sertoli, impactant la BHT et pourrait être donc à l'origine de l'appauvrissement des cultures organotypiques en cellules germinales. L'étude des mécanismes inflammatoires ainsi que la supplémentation des milieux de culture en molécules anti-

inflammatoires pourraient s'avérer pertinentes pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, mais aussi pour outrepasser l'arrêt de maturation observé. L'étude menée par Abe et collaborateurs a conduit à une supplémentation du milieu de culture avec du TAK242, un inhibiteur de la voie de signalisation TLR4-NF κ B, qui a réduit de manière significative le nombre de macrophages testiculaires.

Pour aller plus loin, il pourrait être intéressant d'étudier les gènes dérégulés et les variations métaboliques au sein des spermatocytes pachytènes après isolement de ces cellules par microdissection laser (ou analyse *single-cell*) et séquençage du transcriptome et du métabolome. Ces analyses permettraient alors de confirmer, ou non, nos hypothèses sur l'origine de l'arrêt de maturation. Il est cependant important de noter que ces analyses portant sur un seul type de cellules isolées peuvent conduire à une mise en évidence des conséquences de l'arrêt de maturation, plutôt que l'identification de son origine. Il faut donc prendre en compte les résultats obtenus sur les différents types cellulaires qui composent le tissu testiculaire, et les associer à l'état de maturation du tissu. Des cultures organotypiques avec un inhibiteur de la voie NF κ B ou un anti-inflammatoire à large spectre pourraient permettre d'améliorer les conditions de culture et ainsi d'obtenir une spermatogenèse complète *in vitro* dans le modèle rat.

Conclusions et Perspectives

La préservation et la restauration de la fertilité représentent dorénavant un enjeu sociétal très important. En effet, par l'amélioration des traitements de chimio- et radiothérapie, le pourcentage d'enfants guéris d'un cancer augmente progressivement. La qualité de vie après le cancer prend dorénavant en compte la fonction de reproduction et par conséquent la fertilité à l'âge adulte, qui peuvent être altérée suite aux traitements. Bien que la restauration de la fertilité à partir de tissus testiculaires prépubères ne soit pas pour le moment proposée, les nombreux travaux de recherche en cours tendent à se rapprocher progressivement d'une application clinique. Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans cette thématique, ayant pour but l'optimisation des conditions de congélation du tissu testiculaire prépubère dans le modèle rat, l'étude de la progression de la spermatogenèse *in vitro* et l'étude à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire de l'arrêt de maturation *in vitro* des cellules germinales de rat.

Nous avons, tout d'abord, mis en évidence que la procédure de congélation lente contrôlée actuellement utilisée chez le garçon prépubère au sein du CHU de Rouen et au niveau national, permettait de maintenir l'intégrité structurale et fonctionnelle du tissu testiculaire de rat. La méthode de vitrification sur surface solide est également efficace pour préserver le tissu testiculaire de rats prépubères. L'ajout de vitamine E dans les milieux de congélation/décongélation et vitrification/réchauffement n'a pas permis d'améliorer ces deux procédures de congélation du tissu testiculaire dans le modèle rat. L'optimisation des conditions de culture et l'utilisation de plusieurs milieux de composition différente n'ont pas permis d'obtenir une spermatogenèse complète *in vitro* à partir de tissu testiculaire de rats prépubères. La réalisation d'une cinétique a cependant permis d'observer différents effets des milieux de culture sur le contenu en cellules germinales au cours du temps. En utilisant ces informations, il pourrait être intéressant de réaliser des cultures séquentielles et de déterminer si ce mode de culture permet une meilleure progression de la spermatogenèse *in vitro*. Cette approche pourrait permettre de se rapprocher des conditions physiologiques. Des résultats préliminaires montrent que la culture séquentielle a permis d'obtenir une différenciation des spermatogonies de rat jusqu'au stade spermatide en élongation (Stade 8-11).

Dans notre deuxième étude, nous avons montré que le tissu testiculaire prépubère mûré *in vitro* conservait des caractéristiques de tissu testiculaire immature. Les résultats obtenus par analyses cytologiques ont mis en évidence une altération de la mise en place du complexe synaptonémal au stade pachytène de la prophase I, ainsi que la conservation de DSB. Au niveau moléculaire, une dérégulation de l'expression des gènes en lien avec la méiose et

l'homéostasie testiculaire a été montrée. L'analyse IPA a permis de mettre en avant des régulateurs présomptifs pouvant être à l'origine de l'arrêt de maturation. S'agissant d'expression génique, il va être indispensable de valider ces résultats au niveau protéique par *western-blot* et immunomarquages. De plus, il pourrait être intéressant de vérifier la mise en place de la BHT au sein des explants tissulaires, celle-ci protégeant les cellules en cours de méiose du système immunitaire local. Par la suite, des supplémentations des cultures organotypiques avec des anti-inflammatoires pourraient être testées.

Malgré l'absence d'obtention d'une spermatogenèse complète *in vitro* à partir du tissu testiculaire de rat prépubère, nos résultats sont encourageants. En effet, diverses pistes ont été identifiées afin d'améliorer les conditions de culture. Une association de ces diverses pistes à travers l'utilisation de cultures séquentielles et d'anti-inflammatoires pourrait permettre d'améliorer la progression de la spermatogenèse *in vitro* dans les cultures du tissu testiculaire de rats prépubères. Cette association de milieux couplée à une modification du support de culture par l'ajout d'une matrice de PDMS pourraient être envisagées afin d'obtenir une spermatogenèse complète *in vitro* dans le modèle rat. De plus, l'utilisation d'une lignée de rats exprimant la GFP dans les cellules germinales, en particulier dans les cellules post-méiotiques, permettrait d'évaluer plus facilement la progression de la spermatogenèse au sein des explants tissulaires, comme actuellement réalisé chez la souris. La difficulté à obtenir une spermatogenèse complète *in vitro* dans d'autres espèces que la souris tend à supposer qu'une adaptation des supplémentations semble indispensable en fonction des espèces.

L'analyse de nos résultats de transcriptomique pourrait aussi permettre d'apporter de nouvelles connaissances fondamentales sur les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la première vague de la spermatogenèse. L'analyse du métabolome et de l'épigénome permettrait d'obtenir une description plus complète de cette période d'initiation de la puberté.

L'utilisation de modèles animaux intermédiaires comme le primate non humain pourrait être envisagée. L'étude d'espèces comme le ouistiti, le singe rhésus ou le macaque à différents âges pourrait permettre de déterminer si les conditions de culture organotypique doivent être adaptées en fonction de la maturité du tissu (tissus prépubère ou péri-pubère). Outre l'âge, d'autres paramètres doivent être pris en considération chez l'homme (type de cancer, stade du cancer et traitements du cancer reçus avant la congélation du tissu testiculaire) et font de la restauration de la fertilité un véritable défi. Les recherches menées sur plusieurs modèles

animaux permettront de progresser dans la mise au point d'approches de restauration de la fertilité, afin de pouvoir proposer un protocole adapté à chaque patient.

Références bibliographiques

- Abdelaal O, Deebel NA, Zarandi NP, Kogan S, Marini FC, Pranikoff T, Stogner-Underwood K, McLean TW, Atala A and Sadri-Ardekani H (2021) Fertility preservation for pediatric male cancer patients: illustrating contemporary and future options; a case report. *Translational Andrology and Urology* 10 520–526.
- Abe T, Nishimura H, Sato T, Suzuki H, Ogawa T and Suzuki T (2020a) Transcriptome analysis reveals inadequate spermatogenesis and immediate radical immune reactions during organ culture in vitro spermatogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Abe T, Nishimura H, Sato T, Suzuki H, Ogawa T and Suzuki T (2020b) Time-course microarray transcriptome data of in vitro cultured testes and age-matched in vivo testes. *Data in Brief* 33 106482.
- Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG and Charlton HM (2000) The Effect of a Null Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene on Mouse Reproduction¹. *Endocrinology* 141 1795–1803.
- Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Guillou F and O’Shaughnessy PJ (2008) Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology* 149 3279–3285.
- Abofoul-Azab M, AbuMadighem A, Lunenfeld E, Kapelushnik J, Shi Q, Pinkas H and Huleihel M (2018) Development of Postmeiotic Cells In Vitro from Spermatogonial Cells of Prepubertal Cancer Patients. *Stem Cells and Development* 27 1007–1020.
- Abrishami M, Anzar M, Yang Y and Honaramooz A (2010) Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology* 73 86–96.
- Abu Elhija M, Lunenfeld E, Schlatt S and Huleihel M (2012) Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in a soft agar culture system. *Asian Journal of Andrology* 14 285–293.
- Adham IM, Emmen JM and Engel W (2000) The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. *Molecular and Cellular Endocrinology* 160 11–16.
- Agarwal A, Virk G, Ong C and du Plessis SS (2014a) Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men’s Health* 32 1–17.
- Agarwal A, Mulgund A, Sharma R and Sabanegh E (2014b) Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 60 206–216.
- Aghazadeh Y, Zirkin BR and Papadopoulos V (2015) Pharmacological regulation of the cholesterol transport machinery in steroidogenic cells of the testis. *Vitamins and Hormones* 98 189–227.
- Aitken RJ (1999) The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility* 115 1–7.

- Aitken RJ and Roman SD (2008) Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1 15–24.
- Albrecht KH and Eicher EM (2001) Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental Biology* 240 92–107.
- Aliakbari F, Gilani MAS, Yazdekhashti H, Koruji M, Asgari HR, Baazm M, Izadyar F, Nejad EK, Khanezad M and Abbasi M (2016a) Effects of antioxidants, catalase and α -tocopherol on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed mice spermatogonial stem cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 45 63–68.
- Aliakbari F, Gilani MAS, Amidi F, Baazm M, Korouji M, Izadyar F, Yazdekhashti H and Abbasi M (2016b) Improving the Efficacy of Cryopreservation of Spermatogonia Stem Cells by Antioxidant Supplements. *Cellular Reprogramming* 18 87–95.
- Alrahel A, Movahedin M, Mazaheri Z and Amidi F (2018) Study of Tnp1, Tekt1, and Plzf Genes Expression During an in vitro Three-Dimensional Neonatal Male Mice Testis Culture. *Iranian Biomedical Journal*.
- Alves-Lopes JP, Söder O and Stukenborg J-B (2017) Testicular organoid generation by a novel in vitro three-layer gradient system. *Biomaterials* 130 76–89.
- Amann RP (2008) The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *Journal of Andrology* 29 469–487.
- Arkoun B, Dumont L, Milazzo J-P, Way A, Bironneau A, Wils J, Macé B and Rives N (2015) Retinol improves in vitro differentiation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells into sperm during the first wave of spermatogenesis. *PLoS ONE* 10 e0116660.
- Arkoun B, Dumont L, Milazzo J-P, Rondanino C, Bironneau A, Wils J and Rives N (2016) Does soaking temperature during controlled slow freezing of pre-pubertal mouse testes influence course of in vitro spermatogenesis? *Cell and Tissue Research* 364 661–674.
- Arkoun B, Galas L, Dumont L, Rives A, Saulnier J, Delessard M, Rondanino C and Rives N (2019) Vitamin E but Not GSH Decreases Reactive Oxygen Species Accumulation and Enhances Sperm Production during In Vitro Maturation of Frozen-Thawed Prepubertal Mouse Testicular Tissue. *International Journal of Molecular Sciences* 20 5380.
- Babayev SN, Arslan E, Kogan S, Moy F and Oktay K (2013) Evaluation of ovarian and testicular tissue cryopreservation in children undergoing gonadotoxic therapies. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 30 3–9.
- Baert Y, Goossens E, Saen D van, Ning L, Veld P in't and Tournaye H (2012) Orthotopic grafting of cryopreserved prepubertal testicular tissue: in search of a simple yet effective cryopreservation protocol. *Fertility and Sterility* 97 1152–1157.

- Baert Y, De Kock J, Alves-Lopes JP, Söder O, Stukenborg J-B and Goossens E (2017) Primary Human Testicular Cells Self-Organize into Organoids with Testicular Properties. *Stem Cell Reports* 8 30–38.
- Baert Y, Onofre J, Saen DV and Goossens E (2018) Cryopreservation of Human Testicular Tissue by Isopropyl-Controlled Slow Freezing. In *Sertoli Cells*, pp 287–294. Humana Press, New York, NY.
- Baert Y, Rombaut C and Goossens E (2019) Scaffold-Based and Scaffold-Free Testicular Organoids from Primary Human Testicular Cells. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 1576 283–290.
- Bagchi A, Woods EJ and Critser JK (2008) Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. *Expert Review of Medical Devices* 5 359–370.
- Bahadur G, Chatterjee R and Ralph D (2000) Testicular tissue cryopreservation in boys. Ethical and legal issues: case report. *Human Reproduction* (Oxford, England) 15 1416–1420.
- Barchi M, Mahadevaiah S, Di Giacomo M, Baudat F, de Rooij DG, Burgoyne PS, Jasin M and Keeney S (2005) Surveillance of different recombination defects in mouse spermatocytes yields distinct responses despite elimination at an identical developmental stage. *Molecular and Cellular Biology* 25 7203–7215.
- Bardaweel SK, Gul M, Alzweiri M, Ishaqat A, ALSalamat HA and Bashatwah RM (2018) Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *The Eurasian Journal of Medicine* 50 193–201.
- Baskaran S, Finelli R, Agarwal A and Henkel R (2020) Reactive oxygen species in male reproduction: A boon or a bane? *Andrologia* e13577.
- Baudat F and de Massy B (2007) Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 15 565–577.
- Bebbere D, Pinna S, Nieddu S, Natan D, Arav A and Ledda S (2019) Gene expression analysis of ovine prepubertal testicular tissue vitrified with a novel cryodevice (E.Vit). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36 2145–2154.
- Benatta M, Kettache R, Buchholz N and Trinchieri A (2020) The impact of nutrition and lifestyle on male fertility. *Archivio Italiano Di Urologia, Andrologia: Organo Ufficiale [Di] Societa Italiana Di Ecografia Urologica E Nefrologica* 92.
- Benvenuti L, Salvador RA, Til D, Senn AP, Tames DR, Amaral NLL and Amaral VLL (2018) Wistar rats immature testicular tissue vitrification and heterotopic grafting. *JBRA Assisted Reproduction* 22 167–173.
- Bercovici J-P, Nahoul K, Ducasse M, Tater D, Kerlan V and Scholler R (1985) Leydig Cell Tumor with Gynecomastia: Further Studies—The Recovery after Unilateral Orchiectomy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 61 957–962.

- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA and Gagnon C (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 55 282–288.
- Boitani C, Politi MG and Menna T (1993) Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biology of Reproduction* 48 761–767.
- Breschi A, Gingeras TR and Guigó R (2017) Comparative transcriptomics in human and mouse. *Nature Reviews. Genetics* 18 425–440.
- Brinster RL and Zimmermann JW (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 11298–11302.
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK and Turner JMA (2009) The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nature Reviews Genetics* 10 207–216.
- Cadenas E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* 58 79–110.
- Cai H, Ren Y, Li X-X, Yang J-L, Zhang C-P, Chen M, Fan C-H, Hu X-Q, Hu Z-Y, Gao F et al. (2011) Scrotal heat stress causes a transient alteration in tight junctions and induction of TGF- β expression: Tight junctions and TGF- β expression in heat-treated testes. *International Journal of Andrology* 34 352–362.
- Cai H, Tang B, Wu JY, Zhao XX, Wang ZZ, An XL, Lai LX, Li ZY and Zhang XM (2016) Enrichment and in vitro features of the putative gonocytes from cryopreserved testicular tissue of neonatal bulls. *Andrology* 4 1150–1158.
- Carofiglio F, Sleddens-Linkels E, Wassenaar E, Inagaki A, van Cappellen WA, Grootegoed JA, Toth A and Baarends WM (2018) Repair of exogenous DNA double-strand breaks promotes chromosome synapsis in SPO11-mutant mouse meiocytes, and is altered in the absence of HORMAD1. *DNA Repair* 63 25–38.
- Carreau S and Hess RA (2010) Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365 1517–1535.
- Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona M-C, Pénicaud L and Casteilla L (2006) [Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]. *Medecine Sciences: M/S* 22 47–53.
- Cerilli LA, Kuang W and Rogers D (2010) A practical approach to testicular biopsy interpretation for male infertility. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134 1197–1204.
- Chalmel F, Lardenois A, Evrard B, Mathieu R, Feig C, Demougin P, Gattiker A, Schulze W, Jégou B, Kirchhoff C et al. (2012) Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)* 27 3233–3248.

- Champetier C, Gross E, Pointreau Y, Zaccariotto A, Dubergé T, Guerder C, Ortholan C and Chauvet B (2010) Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains : les testicules. *Cancer/Radiothérapie* 14 376–378.
- Chandra J, Samali A and Orrenius S (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 29 323–333.
- Chaput L, Grémeau A-S, Vorilhon S, Pons H, Chabrot C, Grèze V, Pouly J-L and Brugnion F (2018) Préservation de la fertilité en cancérologie. *Bulletin Du Cancer* 105 99–110.
- Chen S-R and Liu Y-X (2015) Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction (Cambridge, England)* 149 R159-167.
- Chen W, Guo X, Jin Z, Li R, Shen L, Li W, Cai W and Zhang G (2020) Transcriptional alterations of genes related to fertility decline in male rats induced by chronic sleep restriction. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 66 99–111.
- Chihara M, Ikebuchi R, Otsuka S, Ichii O, Hashimoto Y, Suzuki A, Saga Y and Kon Y (2013) Mice stage-specific claudin 3 expression regulates progression of meiosis in early stage spermatocytes. *Biology of Reproduction* 89 3.
- Childs AJ, Cowan G, Kinnell HL, Anderson RA and Saunders PTK (2011) Retinoic Acid Signalling and the Control of Meiotic Entry in the Human Fetal Gonad. *PLOS ONE* 6 e20249.
- Chojnacka K, Bilinska B and Mruk DD (2016) Interleukin 1alpha-induced disruption of the Sertoli cell cytoskeleton affects gap junctional communication. *Cellular Signalling* 28 469–480.
- Chowdhury AK and Steinberger E (1970) Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. *Journal of Reproduction and Fertility* 22 205–212.
- Chung SSW and Wolgemuth DJ (2004) Role of retinoid signaling in the regulation of spermatogenesis. *Cytogenetic and Genome Research* 105 189–202.
- Clement TM, Bhandari RK, Sadler-Riggelman I and Skinner MK (2011) SRY directly regulates the neurotrophin 3 promoter during male sex determination and testis development in rats. *Biology of Reproduction* 85 277–284.
- Clermont Y (1963) The cycle of the seminiferous epithelium in man. *The American Journal of Anatomy* 112 35–51.
- Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* 52 198–236.
- Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE and Brinster RL (1996) Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature* 381 418–421.
- Cobellis G, Noviello C, Nino F, Romano M, Mariscoli F, Martino A, Parmeggiani P and Papparella A (2014) Spermatogenesis and cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology* 5 63.

- Colli-Dula RC, Fang X, Moraga-Amador D, Alborno-Abud N, Zamora-Bustillos R, Conesa A, Zapata-Perez O, Moreno D and Hernandez-Nuñez E (2018) Transcriptome analysis reveals novel insights into the response of low-dose benzo(a)pyrene exposure in male tilapia. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands) 201 162–173.
- Combes AN, Wilhelm D, Davidson T, Dejana E, Harley V, Sinclair A and Koopman P (2009) Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology* 326 112–120.
- Cordelli E, Eleuteri P, Grollino MG, Benassi B, Blandino G, Bartoleschi C, Pardini MC, Di Caprio EV, Spanò M, Pacchierotti F et al. (2012) Direct and delayed X-ray-induced DNA damage in male mouse germ cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 53 429–439.
- Couse JE, Mahato D, Eddy EM and Korach KS (2001) Molecular mechanism of estrogen action in the male: insights from the estrogen receptor null mice. *Reproduction, Fertility, and Development* 13 211–219.
- Criado Scholz E (2012) The Problem of Contamination: Open vs. Closed vs. Semi-Closed Vitrification Systems | IntechOpen.
- Curaba M, Verleysen M, Amorim CA, Dolmans M-M, Langendonck AV, Hovatta O, Wyns C and Donnez J (2011a) Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. *Fertility and Sterility* 95 1229-1234.e1.
- Curaba M, Poels J, Langendonck A van, Donnez J and Wyns C (2011b) Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? *Fertility and Sterility* 95 2123.e9-2123.e12.
- Dahlqvist P, Koskinen L-OD, Brännström T and Hägg E (2010) Testicular enlargement in a patient with a FSH-secreting pituitary adenoma. *Endocrine* 37 289–293.
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PTK, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lécurveuil C et al. (2004) A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 1327–1332.
- De Gendt K, McKinnell C, Willems A, Saunders PTK, Sharpe RM, Atanassova N, Swinnen JV and Verhoeven G (2009) Organotypic cultures of prepubertal mouse testes: a method to study androgen action in sertoli cells while preserving their natural environment. *Biology of Reproduction* 81 1083–1092.
- Deckbar D, Birraux J, Krempler A, Tchouandong L, Beucher A, Walker S, Stiff T, Jeggo P and Löbrich M (2007) Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *The Journal of Cell Biology* 176 749–755.
- Del Vento F, Vermeulen M, de Michele F, Giudice MG, Poels J, des Rieux A and Wyns C (2018) Tissue Engineering to Improve Immature Testicular Tissue and Cell Transplantation Outcomes: One Step Closer to Fertility Restoration for Prepubertal Boys Exposed to Gonadotoxic Treatments. *International Journal of Molecular Sciences* 19.

- Delbès G, Levacher C and Habert R (2006) Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction (Cambridge, England)* 132 527–538.
- Delessard M, Saulnier J, Rives A, Dumont L, Rondanino C and Rives N (2020a) Exposure to Chemotherapy During Childhood or Adulthood and Consequences on Spermatogenesis and Male Fertility. *International Journal of Molecular Sciences* 21.
- Delessard M, Saulnier J, Dumont L, Rives-Feraille A, Rives N and Rondanino C (2020b) Paradoxical risk of reduced fertility after exposure of prepubertal mice to vincristine or cyclophosphamide at low gonadotoxic doses in humans. *Scientific Reports* 10 17859.
- Desandes E, Lacour B and Clavel J (2016) Les cancers des adolescents et des jeunes patients : vision épidémiologique et organisations des soins en France. *Bulletin du Cancer* 103 957–965.
- Devi L, Makala H, Pothana L, Nirmalkar K and Goel S (2014) Comparative efficacies of six different media for cryopreservation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) calf testis. *Reproduction, Fertility, and Development* 28 872–885.
- Dorval-Coiffec I, Delcros J-G, Hakovirta H, Toppari J, Jégou B and Piquet-Pellorce C (2005) Identification of the leukemia inhibitory factor cell targets within the rat testis. *Biology of Reproduction* 72 602–611.
- Dostalova P, Zatecka E and Dvorakova-Hortova K (2017) Of Oestrogens and Sperm: A Review of the Roles of Oestrogens and Oestrogen Receptors in Male Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences* 18.
- Dovey SL, Valli H, Hermann BP, Sukhwani M, Donohue J, Castro CA, Chu T, Sanfilippo JS and Orwig KE (2013) Eliminating malignant contamination from therapeutic human spermatogonial stem cells. *The Journal of Clinical Investigation* 123 1833–1843.
- Duliban M, Gurgul A, Szmatoła T, Pawlicki P, Milon A, Arent ZJ, Grzmil P, Kotula-Balak M and Bilinska B (2020) Mouse testicular transcriptome after modulation of non-canonical oestrogen receptor activity. *Reproduction, Fertility, and Development* 32 903–913.
- Dumont L, Arkoun B, Jumeau F, Milazzo J-P, Bironneau A, Liot D, Wils J, Rondanino C and Rives N (2015) Assessment of the optimal vitrification protocol for pre-pubertal mice testes leading to successful in vitro production of flagellated spermatozoa. *Andrology* 3 611–625.
- Dumont L, Oblette A, Rondanino C, Jumeau F, Bironneau A, Liot D, Duchesne V, Wils J and Rives N (2016) Vitamin A prevents round spermatid nuclear damage and promotes the production of motile sperm during in vitro maturation of vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue. *Molecular Human Reproduction* 22 819–832.
- Dumont L, Chalmel F, Oblette A, Berby B, Rives A, Duchesne V, Rondanino C and Rives N (2017) Evaluation of apoptotic- and autophagic-related protein expressions before and after IVM of fresh, slow-frozen and vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue. *Molecular Human Reproduction* 23 738–754.

- Dumont L, Rives-Feraille A, Delessard M, Saulnier J, Rondanino C and Rives N (2020) Activation of the cannabinoid receptor type 2 by the agonist JWH133 promotes the first wave of in vitro spermatogenesis. *Andrology*.
- Dupont J, Musnier A, Decourtye J, Boulo T, Lécureuil C, Guillou H, Valet S, Fouchécourt S, Pitetti J-L, Nef S et al. (2010) FSH-stimulated PTEN activity accounts for the lack of FSH mitogenic effect in prepubertal rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 315 271–276.
- Durairajanayagam D, Agarwal A and Ong C (2015) Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive Biomedicine Online* 30 14–27.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB and Korach KS (1996) Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137 4796–4805.
- El Yakoubi W and Wassmann K (2017) Meiotic Divisions: No Place for Gender Equality. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1002 1–17.
- El-Shehawi AM, El-Shazly S, Ahmed M, Alkafafy M, Sayed S, Farouk S, Alotaibi SS and Elseehy MM (2020) Transcriptome Analysis of Testis from HFD-Induced Obese Rats (*Rattus norvegicus*) Indicated Predisposition for Male Infertility. *International Journal of Molecular Sciences* 21.
- Endo T, Freinkman E, de Rooij DG and Page DC (2017) Periodic production of retinoic acid by meiotic and somatic cells coordinates four transitions in mouse spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 E10132–E10141.
- Endo T, Mikedis MM, Nicholls PK, Page DC and de Rooij DG (2019) Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules* 9.
- Enguita-Marruedo A, Sleddens-Linkels E, Ooms M, de Geus V, Wilke M, Blom E, Dohle GR, Looijenga LHJ, van Cappellen W, Baart EB et al. (2019) Meiotic arrest occurs most frequently at metaphase and is often incomplete in azoospermic men. *Fertility and Sterility* 112 1059-1070.e3.
- Evans E, Hogarth C, Mitchell D and Griswold M (2014) Riding the spermatogenic wave: profiling gene expression within neonatal germ and sertoli cells during a synchronized initial wave of spermatogenesis in mice. *Biology of Reproduction* 90 108.
- Fawcett DW, Neaves WB and Flores MN (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction* 9 500–532.
- Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich ML, Houser L, Robertson N, Roberts V, Ramsey C et al. (2019) Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science* 363 1314.
- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P and Nussenzweig A (2003) H2AX is required

- for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Developmental Cell* 4 497–508.
- Flannigan R and Schlegel PN (2017) Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Reproduction and Genetics* 44 26–37.
- Fleck RA, Benson EE, Bremner DH and Day JG (2000) Studies of free radical-mediated cryoinjury in the unicellular green alga *Euglena gracilis* using a non-destructive hydroxyl radical assay: a novel approach for developing protistan cryopreservation strategies. *Free Radical Research* 32 157–170.
- França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC and Griswold MD (2016) The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4 189–212.
- Fu L, Chen Y-H, Xu S, Ji Y-L, Zhang C, Wang H, Yu D-X and Xu D-X (2017) Vitamin D deficiency impairs testicular development and spermatogenesis in mice. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.) 73 241–249.
- Fujita K, Tsujimura A, Miyagawa Y, Kiuchi H, Matsuoka Y, Takao T, Takada S, Nonomura N and Okuyama A (2006) Isolation of Germ Cells from Leukemia and Lymphoma Cells in a Human In vitro Model: Potential Clinical Application for Restoring Human Fertility after Anticancer Therapy. *Cancer Research* 66 11166–11171.
- Fuller B and Paynter S (2004) Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive Biomedicine Online* 9 680–691.
- Gangwar PK, Sankhwar SN, Pant S, Krishna A, Singh BP, Mahdi AA and Singh R (2020) Increased Gonadotropins and prolactin are linked to infertility in males. *Bioinformation* 16 176–182.
- Gat Y, Gornish M, Chakraborty J, Perlow A, Lvinger U and Pasqualotto F (2010) Azoospermia and maturation arrest: malfunction of valves in erect poster of humans leads to hypoxia in sperm production site. *Andrologia* 42 389–394.
- Gatta G, Zigon G, Capocaccia R, Coebergh JW, Desandes E, Kaatsch P, Pastore G, Peris-Bonet R, Stiller CA, and EURO CARE Working Group (2009) Survival of European children and young adults with cancer diagnosed 1995-2002. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990) 45 992–1005.
- Gautam M, Bhattacharya I, Rai U and Majumdar SS (2018) Hormone induced differential transcriptome analysis of Sertoli cells during postnatal maturation of rat testes. *PLoS One* 13 e0191201.
- Geens M, Van de Velde H, De Block G, Goossens E, Van Steirteghem A and Tournaye H (2007) The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients. *Human Reproduction* 22 733–742.
- Gholami M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A and Mohammad-di-asl J (2013a) Effect of Melatonin on the Expression of Apoptotic Genes in Vitrified-thawed Spermatogonia Stem Cells Type A of 6-Day-Old Mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 16 906–909.

- Gholami M, Hemadi M, Saki G, Zendedel A, Khodadadi A and Mohammadi-Asl J (2013b) Does prepubertal testicular tissue vitrification influence spermatogonial stem cells (SSCs) viability? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 30 1271–1277.
- Gies I, De Schepper J and Tournaye H (2015) Progress and prospects for fertility preservation in prepubertal boys with cancer. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 22 203–208.
- Ginsberg JP, Carlson CA, Lin K, Hobbie WL, Wigo E, Wu X, Brinster RL and Kolon TF (2010) An experimental protocol for fertility preservation in prepubertal boys recently diagnosed with cancer: a report of acceptability and safety. *Human Reproduction (Oxford, England)* 25 37–41.
- Godoy-Parejo C, Deng C, Zhang Y, Liu W and Chen G (2020) Roles of vitamins in stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 77 1771–1791.
- Gohbara A, Katagiri K, Sato T, Kubota Y, Kagechika H, Araki Y, Araki Y and Ogawa T (2010) In vitro murine spermatogenesis in an organ culture system. *Biology of Reproduction* 83 261–267.
- Goossens E, Frederickx V, Geens M, De Block G and Tournaye H (2008) Cryosurvival and spermatogenesis after allografting prepubertal mouse tissue: comparison of two cryopreservation protocols. *Fertility and Sterility* 89 725–727.
- Goossens E, De Rycke M, Haentjens P and Tournaye H (2009) DNA methylation patterns of spermatozoa and two generations of offspring obtained after murine spermatogonial stem cell transplantation. *Human Reproduction (Oxford, England)* 24 2255–2263.
- Goossens E, de Vos P and Tournaye H (2010) Array comparative genomic hybridization analysis does not show genetic alterations in spermatozoa and offspring generated after spermatogonial stem cell transplantation in the mouse. *Human Reproduction (Oxford, England)* 25 1836–1842.
- Goossens E, Jahnukainen K, Mitchell RT, van Pelt A, Pennings G, Rives N, Poels J, Wyns C, Lane S, Rodriguez-Wallberg KA et al. (2020) Fertility preservation in boys: recent developments and new insights †. *Human Reproduction Open* 2020 hoaa016.
- Gorbisky GJ (2015) The spindle checkpoint and chromosome segregation in meiosis. *The FEBS Journal* 282 2471–2487.
- Gouk SS, Loh YFJ, Kumar SD, Watson PF and Kuleshova LL (2011) Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. *Fertility and Sterility* 95 2399–2403.
- Griswold MD (2016) Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews* 96 1–17.
- Guerquin M-J, Duquenne C, Lahaye J-B, Tourpin S, Habert R and Livera G (2010) New testicular mechanisms involved in the prevention of fetal meiotic initiation in mice. *Developmental Biology* 346 320–330.

- Gunes S, Al-Sadaan M and Agarwal A (2015) Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reproductive Biomedicine Online* 31 309–319.
- Guo J, Nie X, Giebler M, Mlcochova H, Wang Y, Grow EJ, DonorConnect, Kim R, Tharmalingam M, Matilionyte G et al. (2020) The Dynamic Transcriptional Cell Atlas of Testis Development during Human Puberty. *Cell Stem Cell* 26 262-276.e4.
- Gupta D, Zarzycki J and Rager K (1975) Plasma testosterone and dihydrotestosterone in male rats during sexual maturation and following orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism. *Steroids* 25 33–42.
- Ha S-J, Kim B-G, Lee Y-A, Kim Y-H, Kim B-J, Jung S-E, Pang M-G and Ryu B-Y (2016) Effect of Antioxidants and Apoptosis Inhibitors on Cryopreservation of Murine Germ Cells Enriched for Spermatogonial Stem Cells. *PloS One* 11 e0161372.
- Haider SG (2004) Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. In *International Review of Cytology*, pp 181–241. Academic Press.
- Hajiaghalou S, Ebrahimi B, Shahverdi A, Sharbatoghli M and Beigi Boroujeni N (2016) Comparison of apoptosis pathway following the use of two protocols for vitrification of immature mouse testicular tissue. *Theriogenology* 86 2073–2082.
- Hamilton KJ, Arao Y and Korach KS (2014) Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reproductive Biology* 14 3–8.
- Hann MC, Lau PE and Tempest HG (2011) Meiotic recombination and male infertility: from basic science to clinical reality? *Asian Journal of Andrology* 13 212–218.
- Hazra R, Jimenez M, Desai R, Handelsman DJ and Allan CM (2013) Sertoli cell androgen receptor expression regulates temporal fetal and adult Leydig cell differentiation, function, and population size. *Endocrinology* 154 3410–3422.
- Heckmann L, Langenstroth-Röwer D, Wistuba J, Portela JMD, Pelt AMM, Redmann K, Stukenborg JB, Schlatt S and Neuhaus N (2020) The initial maturation status of marmoset testicular tissues has an impact on germ cell maintenance and somatic cell response in tissue fragment culture. *Molecular Human Reproduction*.
- Hedger MP and Meinhardt A (2003) Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of Reproductive Immunology* 58 1–26.
- Hemadi M, Zargar M, Sobhani A and Sobhani A (2011) Assessment of morphological and functional changes in neonate vitrified testis grafts after host treatment with melatonin. *Folia Morphologica* 70 95–102.
- Hemadi M, Shokri S, Moramezi F, Nikbakht R and Sobhani A (2014) Potential use of melatonin supplementation to protect vitrified testicular grafts from hypoxic-ischaemic damage. *Andrologia* 46 513–521.
- Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, Valli H, Rodriguez M, Ezzelarab M, Dargo G et al. (2012) Spermatogonial Stem Cell Transplantation into Rhesus Testes Regenerates Spermatogenesis Producing Functional Sperm. *Cell Stem Cell* 11 715–726.

- Hermann BP, Cheng K, Singh A, Roa-De La Cruz L, Mutoji KN, Chen I-C, Gildersleeve H, Lehle JD, Mayo M, Westernströer B et al. (2018) The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. *Cell Reports* 25 1650-1667.e8.
- Hermo L, Pelletier R-M, Cyr DG and Smith CE (2010a) Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique* 73 241–278.
- Hermo L, Pelletier R-M, Cyr DG and Smith CE (2010b) Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microscopy Research and Technique* 73 279–319.
- Herrid M, Olejnik J, Jackson M, Suchowerska N, Stockwell S, Davey R, Hutton K, Hope S and Hill JR (2009) Irradiation Enhances the Efficiency of Testicular Germ Cell Transplantation in Sheep. *Biology of Reproduction* 81 898–905.
- Hess RA and Renato de Franca L (2008) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 636 1–15.
- Hjollund NH, Bonde JP, Jensen TK and Olsen J (2000) Diurnal scrotal skin temperature and semen quality. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *International Journal of Andrology* 23 309–318.
- Hjollund NHI, Storgaard L, Ernst E, Bonde JP and Olsen J (2002) Impact of diurnal scrotal temperature on semen quality. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 16 215–221.
- Ho WLC, Bourne H, Gook D, Clarke G, Kemertzis M, Stern K, Agresta F, Heloury Y, Clark H, Orme L et al. (2017) A short report on current fertility preservation strategies for boys. *Clinical Endocrinology* 87 279–285.
- Homolka D, Ivanek R, Capkova J, Jansa P and Forejt J (2007) Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Research* 17 1431–1437.
- Honaramooz A (2003) Fertility and Germline Transmission of Donor Haplotype Following Germ Cell Transplantation in Immunocompetent Goats. *Biology of Reproduction* 69 1260–1264.
- Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Schöler H, Dobrinski I and Schlatt S (2002) Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 418 778–781.
- Hong CY, Park JH, Ahn RS, Im SY, Choi H-S, Soh J, Mellon SH and Lee K (2004) Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. *Molecular and Cellular Biology* 24 2593–2604.
- Hrdlickova R, Toloue M and Tian B (2017) RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 8.

- Hu T, Luo S, Xi Y, Tu X, Yang X, Zhang H, Feng J, Wang C and Zhang Y (2021) Integrative bioinformatics approaches for identifying potential biomarkers and pathways involved in non-obstructive azoospermia. *Translational Andrology and Urology* 10 243–257.
- Hughes SE and Hawley RS (2020) Meiosis: Location, Location, Location, How Crossovers Ensure Segregation. *Current Biology* 30 R311–R313.
- Huleihel M and Lunenfeld E (2004) Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian Journal of Andrology* 6 259–268.
- Huleihel M, Nourashrafeddin S and Plant TM (2015) Application of three-dimensional culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Asian Journal of Andrology* 17 972–980.
- Ibtisham F, Zhao Y, Nawab A, Wu J, Mei X, Honaramooz A and An L (2021) In vitro production of haploid germ cells from murine spermatogonial stem cells using a two-dimensional cell culture system. *Theriogenology* 162 84–94.
- Illumina Support Séquençage : La Technologie d'Illumina.
- Isoler-Alcaraz J, Fernández-Pérez D, Larriba E and del Mazo J (2017) Cellular and molecular characterization of gametogenic progression in ex vivo cultured prepuberal mouse testes. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 15.
- Iwanami Y, Kobayashi T, Kato M, Hirabayashi M and Hochi S (2006) Characteristics of rat round spermatids differentiated from spermatogonial cells during co-culture with Sertoli cells, assessed by flow cytometry, microinsemination and RT-PCR. *Theriogenology* 65 288–298.
- Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M and De Rooij DG (2003) Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biology of Reproduction* 68 272–281.
- Jacobo P, Guazzone VA, Theas MS and Lustig L (2011) Testicular autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 10 201–204.
- Jahnukainen K, Hou M, Petersen C, Setchell B and Söder O (2001) Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia. *Cancer Research* 61 706–710.
- Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S and Söder O (2004) Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biology of Reproduction* 70 290–296.
- Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD and Schlatt S (2007) Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Human Reproduction (Oxford, England)* 22 1060–1067.

- Jahnukainen K, Ehmecke J, Nurmio M and Schlatt S (2012) Autologous ectopic grafting of cryopreserved testicular tissue preserves the fertility of prepubescent monkeys that receive sterilizing cytotoxic therapy. *Cancer Research* 72 5174–5178.
- Jahnukainen K, Mitchell RT and Stukenborg J-B (2015) Testicular function and fertility preservation after treatment for haematological cancer. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 22 217–223.
- Jan SZ, Jongejan A, Korver CM, van Daalen SKM, van Pelt AMM, Repping S and Hamer G (2018) Distinct prophase arrest mechanisms in human male meiosis. *Development (Cambridge, England)* 145 dev160614.
- Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR and Han J (2017) Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research* 6 12–18.
- Jégou B (1993) The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *International Review of Cytology* 147 25–96.
- Jensen JR, Morbeck DE and Coddington CC (2011) Fertility preservation. *Mayo Clinic Proceedings* 86 45–49.
- Jeyaraj DA, Grossman G, Weaver C and Petrusz P (2002) Dynamics of testicular germ cell proliferation in normal mice and transgenic mice overexpressing rat androgen-binding protein: a flow cytometric evaluation. *Biology of Reproduction* 66 877–885.
- Jiang X-H, Bukhari I, Zheng W, Yin S, Wang Z, Cooke HJ and Shi Q-H (2014) Blood-testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically-modified mice. *Asian Journal of Andrology* 16 572–580.
- Jiang Y, Zhu W-Q, Zhu X-C, Cai N-N, Yang R, Cai H and Zhang X-M (2020) Cryopreservation of calf testicular tissues with knockout serum replacement. *Cryobiology*.
- Johnson FC (1979) The antioxidant vitamins. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 11 217–309.
- Jordan RT, Katsh S and Destackelburgn null (1961) Spermatocytogenesis with possible spermiogenesis of guinea pig testicular cells grown in vitro. *Nature* 192 1053–1055.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S and Shinohara T (2003) Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction* 69 612–616.
- Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Somfai T, Noguchi J, Tanihara F, Ito J and Kashiwazaki N (2013) Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *PloS One* 8 e70989.
- Kaneko H, Kikuchi K, Tanihara F, Noguchi J, Nakai M, Ito J and Kashiwazaki N (2014) Normal reproductive development of pigs produced using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *Theriogenology* 82 325–331.

- Kaneko H, Kikuchi K, Men NT and Noguchi J (2019) Embryo production by intracytoplasmic injection of sperm retrieved from Meishan neonatal testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*.
- Kaneko H, Kikuchi K, Men NT, Dang-Nguyen TQ, Oyadomari M, Touma S, Suzuki N and Katagiri Y (2020) Embryo production by intracytoplasmic injection of sperm retrieved from neonatal testicular tissue of Agu pigs after cryopreservation and grafting into nude mice. *Animal Science Journal* 91.
- Kanter M and Aktas C (2009) Effects of scrotal hyperthermia on Leydig cells in long-term: a histological, immunohistochemical and ultrastructural study in rats. *Journal of Molecular Histology* 40 123–130.
- Karlsson JO and Toner M (1996) Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 17 243–256.
- Karow A (1974) Cryopreservation: pharmacological considerations. In *Organ Preservation for Transplantation.*, pp 86-107. Boston: Little Brown.
- Kashimada K and Koopman P (2010) Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development (Cambridge, England)* 137 3921–3930.
- Kastelic JP, Wilde RE, Bielli A, Genovese P, Rizzoto G and Thundathil J (2019) Hyperthermia is more important than hypoxia as a cause of disrupted spermatogenesis and abnormal sperm. *Theriogenology* 131 177–181.
- Kaushik K, Kaushal N, Mittal PK and Kalla NR (2019) Heat induced differential pattern of DNA fragmentation in male germ cells of rats. *Journal of Thermal Biology* 84 351–356.
- Kemper CH and Peters PW (1987) Migration and proliferation of primordial germ cells in the rat. *Teratology* 36 117–124.
- Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K and Hovatta O (2007) Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Human Reproduction (Oxford, England)* 22 1384–1395.
- Kim K-J, Kim B-G, Kim Y-H, Lee Y-A, Kim B-J, Jung S-E, Cho Y-J, Lee S-H and Ryu B-Y (2015) In vitro spermatogenesis using bovine testis tissue culture techniques. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12 314–323.
- Kimsa M, Strzalka-Mrozik B, Kimsa M, Gola J, Nicholson P, Lopata K and Mazurek U (2014) Porcine Endogenous Retroviruses in Xenotransplantation—Molecular Aspects. *Viruses* 6 2062–2083.
- Kirpatovskii VI, Efremov GD and Frolova EV (2018) Ectopic Organogenesis after Allotransplantation of Freshly Removed or Cryopreserved Neonatal Testicle under the Renal Capsule in Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 166 268–273.

- Kirpatovskii VI, Efremov GD, Frolova EV and Kudryavtseva LV (2019) Stimulation of Spermatogenesis and Synthesis of Testosterone by Allotransplantation of Neonatal Testicular Tissue under Tunica Albuginea of Cryptorchid Testis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 166 497–502.
- Kobayashi T, Kobayashi H, Goto T, Takashima T, Oikawa M, Ikeda H, Terada R, Yoshida F, Sanbo M, Nakauchi H et al. (2020) Germline development in rat revealed by visualization and deletion of Prdm14. *Development (Cambridge, England)* 147.
- Kojima K, Nakamura H, Komeya M, Yamanaka H, Makino Y, Okada Y, Akiyama H, Torikai N, Sato T, Fujii T et al. (2018) Neonatal testis growth recreated in vitro by two-dimensional organ spreading. *Biotechnology and Bioengineering* 115 3030–3041.
- Komeya M, Kimura H, Nakamura H, Yokonishi T, Sato T, Kojima K, Hayashi K, Katagiri K, Yamanaka H, Sanjo H et al. (2016) Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Scientific Reports* 6 21472.
- Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, Sato T, Yao M, Kimura H, Fujii T et al. (2017) Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. *Scientific Reports* 7 15459.
- Komeya M, Yamanaka H, Sanjo H, Yao M, Nakamura H, Kimura H, Fujii T, Sato T and Ogawa T (2019) In vitro spermatogenesis in two-dimensionally spread mouse testis tissues. *Reproductive Medicine and Biology* 18 362–369.
- Koo M, Squires JM, Ying D and Huang J (2019) Making a Tissue Microarray. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1897 313–323.
- Krausz C and Riera-Escamilla A (2018) Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology* 15 369–384.
- Kubota H, Avarbock MR and Brinster RL (2004) Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 16489–16494.
- Kühn ER, Bellon K, Huybrechts L and Heyns W (1983) Endocrine differences between the Wistar and Sprague-Dawley laboratory rat: influence of cold adaptation. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* 15 491–498.
- Kui F, Ye H, Chen X-L and Zhang J (2019) Microarray meta-analysis identifies candidate genes for human spermatogenic arrest. *Andrologia* 0 e13301.
- Kumar TR (2018) Fshb Knockout Mouse Model, Two Decades Later and Into the Future. *Endocrinology* 159 1941–1949.
- Kurek M, Åkesson E, Yoshihara M, Oliver E, Cui Y, Becker M, Alves-Lopes JP, Bjarnason R, Romerius P, Sundin M et al. (2021) Spermatogonia Loss Correlates with LAMA 1 Expression in Human Prepubertal Testes Stored for Fertility Preservation. *Cells* 10.

- Kvist K, Thorup J, Byskov AG, Høyer PE, Møllgård K and Yding Andersen C (2006) Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Human Reproduction (Oxford, England)* 21 484–491.
- Laiho A, Kotaja N, Gyenesei A and Sironen A (2013) Transcriptome profiling of the murine testis during the first wave of spermatogenesis. *PloS One* 8 e61558.
- Lane S and Kauppi L (2019) Meiotic spindle assembly checkpoint and aneuploidy in males versus females. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 76 1135–1150.
- Leblond CP and Clermont Y (1952) Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *The American Journal of Anatomy* 90 167–215.
- Lee J-H, Gye MC, Choi KW, Hong JY, Lee YB, Park D-W, Lee SJ and Min CK (2007) In vitro differentiation of germ cells from nonobstructive azoospermic patients using three-dimensional culture in a collagen gel matrix. *Fertility and Sterility* 87 824–833.
- Lee JH, Oh JH, Lee JH, Kim MR and Min CK (2011) Evaluation of in vitro spermatogenesis using poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based macroporous biodegradable scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5 130–137.
- Lee Y-A, Kim Y-H, Ha S-J, Kim B-J, Kim K-J, Jung M-S, Kim B-G and Ryu B-Y (2014a) Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells. *Fertility and Sterility* 101 1165-1175.e5.
- Lee Y-A, Kim Y-H, Ha S-J, Kim K-J, Kim B-J, Kim B-G, Choi S-H, Kim I-C, Schmidt JA and Ryu B-Y (2014b) Cryopreservation of porcine spermatogonial stem cells by slow-freezing testis tissue in trehalose. *Journal of Animal Science* 92 984–995.
- Lee KH, Lee WY, Kim DH, Lee SH, Do JT, Park C, Kim JH, Choi YS and Song H (2016) Vitrified canine testicular cells allow the formation of spermatogonial stem cells and seminiferous tubules following their xenotransplantation into nude mice. *Scientific Reports* 6 21919.
- Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X and Rao ChV (2001) Targeted Disruption of Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptor Gene. *Molecular Endocrinology* 15 184–200.
- Leisegang K, Henkel R and Agarwal A (2019) Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* 82 e13178.
- Li H, Bian Y-L, Schreurs N, Zhang X-G, Raza SHA, Fang Q, Wang L-Q and Hu J-H (2018) Effects of five cryoprotectants on proliferation and differentiation-related gene expression of frozen-thawed bovine calf testicular tissue. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 53 1211–1218.
- Li B, He X, Zhao Y, Bai D, Du M, Song L, Liu Z, Yin Z and Manglai D (2020) Transcriptome profiling of developing testes and spermatogenesis in the Mongolian horse. *BMC Genetics* 21 46.

- Lie PPY, Cheng CY and Mruk DD (2011) Interleukin-1alpha is a regulator of the blood-testis barrier. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 1244–1253.
- Lima D, Silva T, Morais GB, Aquino-Cortez A, Evangelista J, Xavier Júnior F, Viana DA and Silva L (2017) Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 52 Suppl 2 235–241.
- Lima DBC, Silva TFP da, Aquino-Cortez A, Leiva-Revilla J and Silva LDM da (2018) Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. *Theriogenology* 110 110–115.
- Linck RW, Chemes H and Albertini DF (2016) The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 33 141–156.
- Liu Z, Nie Y-H, Zhang C-C, Cai Y-J, Wang Y, Lu H-P, Li Y-Z, Cheng C, Qiu Z-L and Sun Q (2016a) Generation of macaques with sperm derived from juvenile monkey testicular xenografts. *Cell Research* 26 139–142.
- Liu F, Cai C, Wu X, Cheng Y, Lin T, Wei G and He D (2016b) Effect of KnockOut serum replacement on germ cell development of immature testis tissue culture. *Theriogenology* 85 193–199.
- Livera G, Rouiller-Fabre V, Durand P and Habert R (2000) Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biology of Reproduction* 62 1303–1314.
- Loveland KL, Klein B, Poeschl D, Indumathy S, Bergmann M, Loveland BE, Hedger MP and Schuppe H-C (2017) Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. *Frontiers in Endocrinology* 8 307.
- Lucas-Herald AK and Bashamboo A (2014) Gonadal development. *Endocrine Development* 27 1–16.
- Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A and Wang C (1999) Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 140 1709–1717.
- Lue Y-H, Lasley BL, Laughlin LS, Swerdloff RS, Hikim APS, Leung A, Overstreet JW and Wang C (2002) Mild testicular hyperthermia induces profound transitional spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of Andrology* 23 799–805.
- Luetjens CM, Stukenborg J-B, Nieschlag E, Simoni M and Wistuba J (2008) Complete spermatogenesis in orthotopic but not in ectopic transplants of autologously grafted marmoset testicular tissue. *Endocrinology* 149 1736–1747.
- Lui W-Y and Cheng CY (2007) Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis: a molecular and biochemical perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18 299–311.

- Mahadevaiah SK, Bourc'his D, de Rooij DG, Bestor TH, Turner JMA and Burgoyne PS (2008) Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *The Journal of Cell Biology* 182 263–276.
- Mäkelä J-A and Hobbs RM (2019) Molecular regulation of spermatogonial stem cell renewal and differentiation. *Reproduction* (Cambridge, England).
- Mao G-P, Niu M-H, Cui Y-H, Tang R-L, Chen W, Liu B and He Z (2021) Characterization, isolation, and culture of spermatogonial stem cells in *Macaca fascicularis*. *Asian Journal of Andrology*.
- Marchiani S, Vignozzi L, Filippi S, Gurrieri B, Comeglio P, Morelli A, Danza G, Bartolucci G, Maggi M and Baldi E (2015) Metabolic syndrome-associated sperm alterations in an experimental rabbit model: relation with metabolic profile, testis and epididymis gene expression and effect of tamoxifen treatment. *Molecular and Cellular Endocrinology* 401 12–24.
- Masliukaite I, Hagen JM, Jahnukainen K, Stukenborg J-B, Repping S, van der Veen F, van Wely M and van Pelt AMM (2016) Establishing reference values for age-related spermatogonial quantity in prepubertal human testes: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility* 106 1652-1657.e2.
- de Massy B (2013) Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annual Review of Genetics* 47 563–599.
- Mathur PP and D'Cruz SC (2011) The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian Journal of Andrology* 13 585–591.
- Matsumura T, Sato T, Abe T, Sanjo H, Katagiri K, Kimura H, Fujii T, Tanaka H, Hirabayashi M and Ogawa T (2021) Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control. *Scientific Reports* 11 3458.
- Matzuk MM and Lamb DJ (2008) The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* 14 1197–1213.
- Mayer C, Adam M, Walenta L, Schmid N, Heikelä H, Schubert K, Flenkenthaler F, Dietrich K-G, Gruschka S, Arnold GJ et al. (2018) Insights into the role of androgen receptor in human testicular peritubular cells. *Andrology* 6 756–765.
- Mayerhofer A (2013) Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction* (Cambridge, England) 145 R107-116.
- Mazur P (1970) Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* (New York, N.Y.) 168 939–949.
- Mazur P (1977) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14 251–272.
- McGuinness MP and Orth JM (1992) Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats in vivo and in vitro. *The Anatomical Record* 233 527–537.

- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de K, Pratis K and Robertson DM (2002) Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *Journal of Andrology* 23 149–162.
- Mealy K, Robinson B, Millette CF, Majzoub J and Wilmore DW (1990) The testicular effects of tumor necrosis factor. *Annals of Surgery* 211 470–475.
- Medrano JV, Andrés M del M, García S, Herraiz S, Vilanova-Pérez T, Goossens E and Pellicer A (2018a) Basic and Clinical Approaches for Fertility Preservation and Restoration in Cancer Patients. *Trends in Biotechnology* 36 199–215.
- Medrano JV, Vilanova-Pérez T, Fornés-Ferrer V, Navarro-Gomezlechón A, Martínez-Triguero ML, García S, Gómez-Chacón J, Povo I, Pellicer A, Andrés MM et al. (2018b) Influence of temperature, serum, and gonadotropin supplementation in short- and long-term organotypic culture of human immature testicular tissue. *Fertility and Sterility* 110 1045-1057.e3.
- Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M et al. (2000) Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science (New York, N.Y.)* 287 1489–1493.
- de Michele F, Poels J, Weerens L, Petit C, Evrard Z, Ambroise J, Gruson D and Wyns C (2017) Preserved seminiferous tubule integrity with spermatogonial survival and induction of Sertoli and Leydig cell maturation after long-term organotypic culture of prepubertal human testicular tissue. *Human Reproduction (Oxford, England)* 32 32–45.
- de Michele F, Poels J, Giudice MG, De Smedt F, Ambroise J, Vermeulen M, Gruson D and Wyns C (2018a) In-vitro formation of the blood-testis barrier during long-term organotypic culture of human prepubertal tissue: comparison with a large cohort of pre/peripubertal boys. *Molecular Human Reproduction*.
- de Michele F, Poels J, Vermeulen M, Ambroise J, Gruson D, Guiot Y and Wyns C (2018b) Haploid Germ Cells Generated in Organotypic Culture of Testicular Tissue From Prepubertal Boys. *Frontiers in Physiology* 9 1413.
- Milazzo JP, Vaudreuil L, Cauliez B, Gruel E, Massé L, Mousset-Siméon N, Macé B and Rives N (2008) Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Human Reproduction* 23 17–28.
- Milazzo JP, Travers A, Bironneau A, Safsaf A, Gruel E, Arnoult C, Macé B, Boyer O and Rives N (2010) Rapid Screening of Cryopreservation Protocols for Murine Prepubertal Testicular Tissue by Histology and PCNA Immunostaining. *Journal of Andrology* 31 617–630.
- Millar MR, Sharpe RM, Weinbauer GF, Fraser HM and Saunders PT (2000) Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. *International Journal of Andrology* 23 266–277.
- Minaee Zanganeh B, Rastegar T, Habibi Roudkenar M, Ragerdi Kashani I, Amidi F, Abolhasani F and Barbarestani M (2013) Co-culture of spermatogonial stem cells with

- sertoli cells in the presence of testosterone and FSH improved differentiation via up-regulation of post meiotic genes. *Acta Medica Iranica* 51 1–11.
- Monesi V (1965) Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. *Experimental Cell Research* 39 197–224.
- Morales A and Cavicchia JC (2002) Spermatogenesis and blood-testis barrier in rats after long-term Vitamin A deprivation. *Tissue & Cell* 34 349–355.
- Morimoto H, Iwata K, Ogonuki N, Inoue K, Atsuo O, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto T, Yabe-Nishimura C and Shinohara T (2013) ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 12 774–786.
- Morohaku K, Tanimoto R, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K, Hirao Y and Obata Y (2016) Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 9021–9026.
- Morrison SJ and Kimble J (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441 1068–1074.
- Mruk DD and Cheng CY (2015) The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocrine Reviews* 36 564–591.
- Muratori M and De Geyter C (2019) Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 33 117–126.
- Musacchio A (2015) The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current Biology: CB* 25 R1002-1018.
- Nakai M, Kaneko H, Somfai T, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Ito J, Kashiwazaki N and Kikuchi K (2010) Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reproduction (Cambridge, England)* 139 331–335.
- Nakamura N and Sloper DT (2020) Comparison of germ cell differentiation of rat testis fragments cultured in knockout serum replacement versus Albumax™ I. *Birth Defects Research*.
- Nakamura N, Merry GE, Inselman AL, Sloper DT, Del Valle PL, Sato T, Ogawa T and Hansen DK (2017) Evaluation of Culture Time and Media in an In Vitro Testis Organ Culture System. *Birth Defects Research* 109 465–474.
- Nakamura N, Sloper DT and Del Valle PL (2018) Evaluation of an in vitro mouse testis organ culture system for assessing male reproductive toxicity. *Birth Defects Research*.
- Nakamura N, Sloper DT and Del Valle PL (2019) Gene expression profiling of cultured mouse testis fragments treated with ethinylestradiol. *The Journal of Toxicological Sciences* 44 667–679.

- Nash T (1966) Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In *Cryobiology*, Merryman HT, pp 179-213. New York: Academic Press.
- Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS and Goldstein M (2016) Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 59 10–26.
- Niki E (1987) Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 498 186–199.
- Ntemou E, Kadam P, Van Laere S, Van Saen D, Vicini E and Goossens E (2019) Effect of recombinant human vascular endothelial growth factor on testis tissue xenotransplants from prepubertal boys: a three-case study. *Reproductive Biomedicine Online* 39 119–133.
- Oatley JM and Brinster RL (2012) The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiological Reviews* 92 577–595.
- Oatley JM, de Avila DM, Reeves JJ and McLean DJ (2004) Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction* 70 625–631.
- Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW and Brinster RL (2009) Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development (Cambridge, England)* 136 1191–1199.
- Oblette A, Rives N, Dumont L, Rives A, Verhaeghe F, Jumeau F and Rondanino C (2017) Assessment of sperm nuclear quality after in vitro maturation of fresh or frozen/thawed mouse pre-pubertal testes. *Molecular Human Reproduction* 23 674–684.
- Oblette A, Rondeaux J, Dumont L, Delessard M, Saulnier J, Rives A, Rives N and Rondanino C (2019) DNA methylation and histone post-translational modifications in the mouse germline following in-vitro maturation of fresh or cryopreserved prepubertal testicular tissue. *Reproductive Biomedicine Online* 39 383–401.
- Oblette A, Rives-Feraille A, Dumont L, Delessard M, Saulnier J, Rives N and Rondanino C (2020) Dynamics of epigenetic modifications in ICSI embryos from in vitro-produced spermatozoa. *Andrology*.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME and Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22 289–318.
- Oduwole OO, Vydra N, Wood NEM, Samanta L, Owen L, Keevil B, Donaldson M, Naresh K and Huhtaniemi IT (2014) Overlapping dose responses of spermatogenic and extragonadal testosterone actions jeopardize the principle of hormonal male contraception. *The FASEB Journal* 28 2566–2576.
- O'Hara L and Smith LB (2012) Androgen receptor signalling in Vascular Endothelial cells is dispensable for spermatogenesis and male fertility. *BMC Research Notes* 5 16.

- Ohta H and Wakayama T (2005) Generation of normal progeny by intracytoplasmic sperm injection following grafting of testicular tissue from cloned mice that died postnatally. *Biology of Reproduction* 73 390–395.
- Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP and White SS (1980) Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine Reviews* 1 228–257.
- Olaso R and Habert R (2000) Genetic and cellular analysis of male germ cell development. *Journal of Andrology* 21 497–511.
- Oldereid NB, Thomassen Y and Purvis K (1998) Selenium in human male reproductive organs. *Human Reproduction (Oxford, England)* 13 2172–2176.
- Onofre J, Baert Y, Faes K and Goossens E (2016) Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Human Reproduction Update* 22 744–761.
- Onofre J, Kadam P, Baert Y and Goossens E (2020) Testicular tissue cryopreservation is the preferred method to preserve spermatogonial stem cells prior to transplantation. *Reproductive Biomedicine Online* 40 261–269.
- Orth JM (1982) Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *The Anatomical Record* 203 485–492.
- Orth JM, Gunsalus GL and Lamperti AA (1988) Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122 787–794.
- Park M, Lee Y, Jang H, Lee O-H, Park S-W, Kim J-H, Hong K, Song H, Park S-P, Park Y-Y et al. (2016) SOHLH2 is essential for synaptonemal complex formation during spermatogenesis in early postnatal mouse testes. *Scientific Reports* 6 20980–20980.
- Park H-J, Lee W-Y, Zhang M, Hong K-H, Park C, Kim J-H and Song H (2020a) Evaluation of Resmethrin Toxicity to Neonatal Testes in Organ Culture. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 173 53–64.
- Park H-J, Zhang M, Lee W-Y, Hong K-H, Do JT, Park C and Song H (2020b) Toxic Effects of Nonylphenol on Neonatal Testicular Development in Mouse Organ Culture. *International Journal of Molecular Sciences* 21.
- Pastén-Hidalgo K, Riverón-Negrete L, Sicilia-Argumedo G, Canul-Medina G, Salazar-Anzures T, Tapia-Rodríguez M, Hernández-González EO, Roa-Espitia AL, Cedillo-Peláez C and Fernandez-Mejia C (2020) Dietary Biotin Supplementation Impairs Testis Morphology and Sperm Quality. *Journal of Medicinal Food* 23 535–544.
- Patience C, Takeuchi Y and Weiss RA (1998) Zoonosis in xenotransplantation. *Current Opinion in Immunology* 10 539–542.
- Paul C, Teng S and Saunders PTK (2009) A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biology of Reproduction* 80 913–919.

- Pegg DE (2002) The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine* 20 5–13.
- Peltola V, Huhtaniemi I and Ahotupa M (1995) Abdominal Position of the Rat Testis is Associated with High Level of Lipid Peroxidation¹. *Biology of Reproduction* 53 1146–1150.
- Peltola V, Huhtaniemi I, Metsa-Ketela T and Ahotupa M (1996) Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology* 137 105–112.
- Pence LM, Schmitt TC, Beger RD, Del Valle PL and Nakamura N (2019) Testicular function in cultured postnatal mouse testis fragments is similar to that of animals during the first wave of spermatogenesis. *Birth Defects Research*.
- Pendergraft SS, Sadri-Ardekani H, Atala A and Bishop CE (2017) Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro. *Biology of Reproduction* 96 720–732.
- Pereira N and Schattman GL (2017) Fertility Preservation and Sexual Health After Cancer Therapy. *Journal of Oncology Practice* 13 643–651.
- Perey B, Clermont Y and Leblond CP (1961) The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *American Journal of Anatomy* 108 47–77.
- Pérez CV, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Galardo MN, Naito M, Lustig L and Jacobo PV (2014) IL17A impairs blood-testis barrier integrity and induces testicular inflammation. *Cell and Tissue Research* 358 885–898.
- Perrard M-H, Sereni N, Schluth-Bolard C, Blondet A, D Estaing SG, Plotton I, Morel-Journel N, Lejeune H, David L and Durand P (2016) Complete Human and Rat Ex Vivo Spermatogenesis from Fresh or Frozen Testicular Tissue. *Biology of Reproduction* 95 89.
- Persson H, Ayer-Le Lievre C, Soder O, Villar M, Metsis M, Olson L, Ritzen M and Hokfelt T (1990) Expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone. *Science* 247 704.
- Picut CA, Remick AK, de Rijk EPCT, Simons ML, Stump DG and Parker GA (2015) Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicologic Pathology* 43 326–342.
- Pieri NCG, Mançaneres ACF, de Souza AF, Fernandes H, Diaza AMG, Bressan FF, Roballo KCS, Casals JB, Binelli M, Ambrósio CE et al. (2019) Xenotransplantation of canine spermatogonial stem cells (cSSCs) regulated by FSH promotes spermatogenesis in infertile mice. *Stem Cell Research & Therapy* 10 135.
- Pietzak EJ, Tasian GE, Tasian SK, Brinster RL, Carlson C, Ginsberg JP and Kolon TF (2015) Histology of Testicular Biopsies Obtained for Experimental Fertility Preservation Protocol in Boys with Cancer. *The Journal of Urology* 194 1420–1424.
- Pines J (2006) Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends in Cell Biology* 16 55–63.

- Pitetti J-L, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F, Cederroth CR, Urner F, Fumel B, Crausaz M et al. (2013) An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.) 27 814–827.
- Poels J, Van Langendonck A, Dehoux JP, Donnez J and Wyns C (2012) Vitrification of non-human primate immature testicular tissue allows maintenance of proliferating spermatogonial cells after xenografting to recipient mice. *Theriogenology* 77 1008–1013.
- Poels J, Van Langendonck A, Many M-C, Wese F-X and Wyns C (2013) Vitrification preserves proliferation capacity in human spermatogonia. *Human Reproduction* 28 578–589.
- Poels J, Abou-Ghannam G, Herman S, Van Langendonck A, Wese F-X and Wyns C (2014) In Search of Better Spermatogonial Preservation by Supplementation of Cryopreserved Human Immature Testicular Tissue Xenografts with N-acetylcysteine and Testosterone. *Frontiers in Surgery* 1 47.
- Pointis G, Gilleron J, Carette D and Segretain D (2010) Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365 1607–1620.
- van der Poll T, Romijn JA, Endert E and Sauerwein HP (1993) Effects of tumor necrosis factor on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in healthy men. *Metabolism: Clinical and Experimental* 42 303–307.
- Portela JMD, de Winter-Korver CM, van Daalen SKM, Meißner A, de Melker AA, Repping S and van Pelt AMM (2019a) Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre)pubertal boys during organ culture as a strategy for in vitro spermatogenesis. *Human Reproduction* (Oxford, England) 34 2443–2455.
- Portela JMD, Mulder CL, van Daalen SKM, de Winter-Korver CM, Stukenborg J-B, Repping S and van Pelt AMM (2019b) Strains matter: Success of murine in vitro spermatogenesis is dependent on genetic background. *Developmental Biology* 456 25–30.
- Pothana L, Makala H, Devi L, Varma VP and Goel S (2015) Germ cell differentiation in cryopreserved, immature, Indian spotted mouse deer (*Moschiola indica*) testes xenografted onto mice. *Theriogenology* 83 625–633.
- Pothana L, Devi L, Venna NK, Pentakota N, Varma VP, Jose J and Goel S (2016) Replacement of serum with ocular fluid for cryopreservation of immature testes. *Cryobiology* 73 356–366.
- Potter SJ and DeFalco T (2017) Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction* (Cambridge, England) 153 R151–R162.
- Prior M, Stewart J, McEleny K, Dwyer AA and Quinton R (2018) Fertility induction in hypogonadotropic hypogonadal men. *Clinical Endocrinology* 89 712–718.

- Pryor JL, Hughes C, Foster W, Hales BF and Robaire B (2000) Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environmental Health Perspectives* 108 Suppl 3 491–503.
- Pukazhenthil BS, Nagashima J, Travis AJ, Costa GM, Escobar EN, França LR and Wildt DE (2015) Slow freezing, but not vitrification supports complete spermatogenesis in cryopreserved, neonatal sheep testicular xenografts. *PloS One* 10 e0123957.
- Pulliam JK, Milner R, Tuma GA and Lin PH (2008) Fertility after homologous prepubertal testis transplantation in the dog. *Transplantation Proceedings* 40 2744–2749.
- Quinn PG and Payne AH (1985) Steroid product-induced, oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in Leydig cell cultures. Relationship to desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 260 2092–2099.
- Radaelli MRM, Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Cerialli PMA, Nassif AE and Gonçalves AJ (2017) A comparison between a new vitrification protocol and the slow freezing method in the cryopreservation of prepubertal testicular tissue. *JBRA Assisted Reproduction* 21 188–195.
- Rahali D, Dallagi Y, Hupkens E, Veegh G, Mc Entee K, Asmi ME, El Fazaa S and El Golli N (2020) Spermatogenesis and steroidogenesis disruption in a model of metabolic syndrome rats. *Archives of Physiology and Biochemistry* 1–11.
- Ramaswamy S and Weinbauer GF (2014) Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis* 4 e996025, 1–14.
- Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428 493–521.
- Rato L, Socorro S, Cavaco JEB and Oliveira PF (2010) Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: ion transporters and aquaporins in Sertoli cells. *The Journal of Membrane Biology* 236 215–224.
- Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE and Oliveira PF (2012) Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews Urology* 9 330–338.
- Raverdeau M, Gely-Pernot A, Féret B, Dennefeld C, Benoit G, Davidson I, Chambon P, Mark M and Ghyselinck NB (2012) Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 16582–16587.
- Reda A, Hou M, Winton TR, Chapin RE, Söder O and Stukenborg J-B (2016) In vitro differentiation of rat spermatogonia into round spermatids in tissue culture. *Molecular Human Reproduction* 22 601–612.
- Reda A, Albalushi H, Cisnero Montalvo S, Nurmio M, Sahin Z, Hou M, Geijsen N, Toppari J, Söder O and Stukenborg J-B (2017) Knock-Out Serum Replacement and Melatonin Effects on Germ Cell Differentiation in Murine Testicular Explant Cultures. *Annals of Biomedical Engineering* 45 1783–1794.

- Redza-Dutordoir M and Averill-Bates DA (2016) Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1863 2977–2992.
- Rezaei Topraggaleh T, Rezazadeh Valojerdi M, Montazeri L and Baharvand H (2019) A testis-derived macroporous 3D scaffold as a platform for the generation of mouse testicular organoids. *Biomaterials Science* 7 1422–1436.
- Richer G, Baert Y and Goossens E (2020) In-vitro spermatogenesis through testis modelling: Toward the generation of testicular organoids. *Andrology* 8 879–891.
- Rives N, Dumont L, Oblette A, Rives A, Delessard M, Saulnier J, Sibert L, Liard-Zmuda A and Rondanino C (2017) La greffe du tissu testiculaire. *Médecine Thérapeutique / Médecine de La Reproduction, Gynécologie et Endocrinologie* 19 270–278.
- Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C and Dix DJ (2001) Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biology of Reproduction* 65 229–239.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I and Vassalli P (1997) An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO Journal* 16 2262–2270.
- Rombaut C, Faes K and Goossens E (2016) The Effect of a Unilateral Orchiectomy before Gonadotoxic Treatment on the Contralateral Testis in Adult and Prepubertal Rats. *PLOS ONE* 11 e0164922.
- Rondanino C, Maouche A, Dumont L, Oblette A and Rives N (2017) Establishment, maintenance and functional integrity of the blood-testis barrier in organotypic cultures of fresh and frozen/thawed prepubertal mouse testes. *Molecular Human Reproduction* 23 304–320.
- de Rooij DG (2009) The spermatogonial stem cell niche. *Microscopy Research and Technique* 72 580–585.
- de Rooij DG and de Boer P (2003) Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenetic and Genome Research* 103 267–276.
- Ross AJ and Capel B (2005) Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 16 19–25.
- Rossi P and Dolci S (2013) Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of Mammalian spermatogenesis. *Frontiers in Endocrinology* 4 181.
- Rotgers E, Nurmio M, Pietilä E, Cisneros-Montalvo S and Toppari J (2015) E2F1 controls germ cell apoptosis during the first wave of spermatogenesis. *Andrology* 3 1000–1014.
- Rotgers E, Jørgensen A and Yao HH-C (2018) At the Crossroads of Fate-Somatic Cell Lineage Specification in the Fetal Gonad. *Endocrine Reviews* 39 739–759.

- Russell LD and Brinster RL (1996) Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *Journal of Andrology* 17 615–627.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Stanton PG, Loveland KL and Meachem SJ (2008) Pathways involved in testicular germ cell apoptosis in immature rats after FSH suppression. *The Journal of Endocrinology* 197 35–43.
- Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SKM, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, Hovingh S, de Reijke TM, de la Rosette JJMCH, van der Veen F et al. (2009) Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* 302 2127–2134.
- Sadri-Ardekani H, McLean TW, Kogan S, Sirintrapun J, Crowell K, Yousif MQ, Hodges SJ, Petty J, Pranikoff T, Sieren L et al. (2016) Experimental testicular tissue banking to generate spermatogenesis in the future: A multidisciplinary team approach. *Methods* 99 120–127.
- Safa S, Moghaddam G, Jozani RJ, Daghigh Kia H and Janmohammadi H (2016) Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Animal Reproduction Science* 174 100–106.
- Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S and coll. (2014) *La reproduction animale et humaine -*. Quæ.
- Sakib S, Uchida A, Valenzuela-Leon P, Yu Y, Valli-Pulaski H, Orwig K, Ungrin M and Dobrinski I (2019a) Formation of organotypic testicular organoids in microwell culture.
- Sakib S, Yu Y, Voigt A, Ungrin M and Dobrinski I (2019b) Generation of Porcine Testicular Organoids with Testis Specific Architecture using Microwell Culture. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*.
- Salian SR, Pandya RK, Laxminarayana SLK, Krishnamurthy H, Cheredath A, Tholeti P, Uppangala S, Kalthur G, Majumdar S, Schlatt S et al. (2020) Impact of Temperature and Time Interval Prior to Immature Testicular-Tissue Organotypic Culture on Cellular Niche. *Reproductive Sciences*.
- Salonia A, Bettocchi C, Carvalho J, Corona G, Jones TH, Kadiog˘lu A, Martinez-Salamanca JI, Minhas S, Serefog˘lu EC and Verze P (2017) *EAU Guidelines on Sexual and Reproductive Health*.
- Sanjo H, Komeya M, Sato T, Abe T, Katagiri K, Yamanaka H, Ino Y, Arakawa N, Hirano H, Yao T et al. (2018) In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *PLoS ONE* 13 e0192884.
- Sanjo H, Yao T, Katagiri K, Sato T, Matsumura T, Komeya M, Yamanaka H, Yao M, Matsuhisa A, Asayama Y et al. (2020) Antioxidant vitamins and lysophospholipids are critical for inducing mouse spermatogenesis under organ culture conditions. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 9480–9497.

- Sansone A, Kliesch S, Isidori AM and Schlatt S (2019) AMH and INSL3 in testicular and extragonadal pathophysiology: what do we know? *Andrology* 7 131–138.
- Santi D, Spaggiari G and Simoni M (2018) Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reproductive BioMedicine Online* 37 315–326.
- Santi D, Crépieux P, Reiter E, Spaggiari G, Brigante G, Casarini L, Rochira V and Simoni M (2020) Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action on Spermatogenesis: A Focus on Physiological and Therapeutic Roles. *Journal of Clinical Medicine* 9.
- Sato T, Katagiri K, Yokonishi T, Kubota Y, Inoue K, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A and Ogawa T (2011a) In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nature Communications* 2 472.
- Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Kubota Y and Ogawa T (2011b) In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471 504.
- Saulnier J, Oblette A, Delessard M, Dumont L, Rives A, Rives N and Rondanino C (2020) Improving Freezing Protocols and Organotypic Culture: A Histological Study on Rat Prepubertal Testicular Tissue. *Annals of Biomedical Engineering*.
- Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (New York, N.Y.)* 270 467–470.
- Schlatt S, Zhengwei Y, Meehan T, de Kretser DM and Lakoski Loveland K (1999) Application of morphometric techniques to postnatal rat testes in organ culture: insights into testis growth. *Cell and Tissue Research* 298 335–343.
- Schlatt S, Kim SS and Gosden R (2002) Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction (Cambridge, England)* 124 339–346.
- Schlatt S, Honaramooz A, Ehmcke J, Goebell PJ, Rübber H, Dhir R, Dobrinski I and Patrizio P (2006) Limited survival of adult human testicular tissue as ectopic xenograft. *Human Reproduction (Oxford, England)* 21 384–389.
- Schultz N, Hamra FK and Garbers DL (2003) A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 12201–12206.
- Schuppe H-C and Meinhardt A (2005) Immune privilege and inflammation of the testis. *Chemical Immunology and Allergy* 88 1–14.
- Sekido R and Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453 930–934.
- Sertoli E (2018) The structure of seminiferous tubules and the development of [spermatids] in rats. *Biology of Reproduction* 99 482–503.

- Setchell BP (2008) Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 636 212–233.
- Shaha C, Tripathi R and Mishra DP (2010) Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365 1501–1515.
- Sharma S, Venzac B, Burgers T, Le Gac S and Schlatt S (2020) Microfluidics in male reproduction: is ex vivo culture of primate testis tissue a future strategy for ART or toxicology research? *Molecular Human Reproduction*.
- Shen H, Fan X, Zhang Z, Xi H, Ji R, Liu Y, Yue M, Li Q and He J (2019) Effects of elevated ambient temperature and local testicular heating on the expressions of heat shock protein 70 and androgen receptor in boar testes. *Acta Histochemica* 121 297–302.
- Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Kogishi K et al. (2002) Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Human Reproduction (Oxford, England)* 17 3039–3045.
- Shiraishi K, Takihara H and Matsuyama H (2010) Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. *World Journal of Urology* 28 359–364.
- Shiraishi K, Tabara M and Matsuyama H (2020) Transcriptome Analysis to Identify Human Spermatogonial Cells from Sertoli Cell-Only Testes. *The Journal of Urology* 203 809–816.
- Silva AF, Escada-Rebello S, Amaral S, Tavares RS, Schlatt S, Ramalho-Santos J and Mota PC (2018) Can we induce spermatogenesis in the domestic cat using an in vitro tissue culture approach? *PloS One* 13 e0191912.
- Silva AM da, Pereira AF, Comizzoli P and Silva AR (2020) Cryopreservation and Culture of Testicular Tissues: An Essential Tool for Biodiversity Preservation. *Biopreservation and Biobanking*.
- Simon L, Emery B and Carrell DT (2019) Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1166 87–105.
- Simpson ER (2000) Genetic mutations resulting in loss of aromatase activity in humans and mice. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 7 S18-21.
- Singh RP, Escobar E, Wildt D, Patel S, Costa GMJ and Pukazhenthil B (2019) Effect of sphingosine-1-phosphate on cryopreserved sheep testicular explants cultured in vitro. *Theriogenology* 128 184–192.
- Skinner R, Mulder RL, Kremer LC, Hudson MM, Constine LS, Bardi E, Boekhout A, Borgmann-Staudt A, Brown MC, Cohn R et al. (2017) Recommendations for gonadotoxicity surveillance in male childhood, adolescent, and young adult cancer survivors: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group in collaboration with the PanCareSurFup Consortium. *The Lancet. Oncology* 18 e75–e90.

- Smart E, Lopes F, Rice S, Nagy B, Anderson RA, Mitchell RT and Spears N (2018) Chemotherapy drugs cyclophosphamide, cisplatin and doxorubicin induce germ cell loss in an in vitro model of the prepubertal testis. *Scientific Reports* 8 1773.
- Smith LB and Walker WH (2014) The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 30 2–13.
- Sönmez M, Türk G and Yüce A (2005) The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology* 63 2063–2072.
- Sree S, Radhakrishnan K, Indu S and Kumar PG (2014) Dramatic changes in 67 miRNAs during initiation of first wave of spermatogenesis in *Mus musculus* testis: global regulatory insights generated by miRNA-mRNA network analysis. *Biology of Reproduction* 91 69.
- Stark R, Grzelak M and Hadfield J (2019) RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews. Genetics* 20 631–656.
- Steinberger A and Steinberger E (1965) Differentiation of rat seminiferous epithelium in organ culture. *Journal of Reproduction and Fertility* 9 243–248.
- Steinberger A and Steinberger E (1966) Stimulatory effect of vitamins and glutamine on the differentiation of germ cells in rat testes organ culture grown in chemically defined media. *Experimental Cell Research* 44 429–435.
- Steinberger A and Steinberger E (1971) Replication Pattern of Sertoli Cells in Maturing Rat Testis in Vivo and in Organ Culture. *Biology of Reproduction* 4 84–87.
- Steinberger E, Steinberger A and Perloff WH (1964a) Initiation of spermatogenesis in vitro. *Endocrinology* 74 788–792.
- Steinberger A, Steinberger E and Perloff WH (1964b) Mammalian testes in organ culture. *Experimental Cell Research* 36 19–27.
- Steinberger E, Steinberger A and Perloff WH (1964c) Studies on growth in organ culture of testicular tissue from rats of various age. *The Anatomical Record* 148 581–589.
- Stukenborg J-B, Wistuba J, Luetjens CM, Elhija MA, Huleihel M, Lunenfeld E, Gromoll J, Nieschlag E and Schlatt S (2008) Coculture of spermatogonia with somatic cells in a novel three-dimensional soft-agar-culture-system. *Journal of Andrology* 29 312–329.
- Stukenborg J-B, Schlatt S, Simoni M, Yeung C-H, Elhija MA, Luetjens CM, Huleihel M and Wistuba J (2009) New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Molecular Human Reproduction* 15 521–529.
- Stukenborg J-B, Alves-Lopes JP, Kurek M, Albalushi H, Reda A, Keros V, Töhönen V, Bjarnason R, Romerius P, Sundin M et al. (2018) Spermatogonial quantity in human prepubertal testicular tissue collected for fertility preservation prior to potentially sterilizing therapy. *Human Reproduction (Oxford, England)* 33 1677–1683.

- Subramanian VV and Hochwagen A (2014) The meiotic checkpoint network: step-by-step through meiotic prophase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 a016675–a016675.
- Suzuki S and Sato K (2003) The fertilising ability of spermatogenic cells derived from cultured mouse immature testicular tissue. *Zygote (Cambridge, England)* 11 307–316.
- Syed V, Stéphan JP, Gérard N, Legrand A, Parvinen M, Bardin CW and Jégou B (1995) Residual bodies activate Sertoli cell interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) release, which triggers IL-6 production by an autocrine mechanism, through the lipoxygenase pathway. *Endocrinology* 136 3070–3078.
- Syriou V, Papanikolaou D, Kozyraki A and Goulis DG (2018) Cytokines and male infertility. *European Cytokine Network* 29 73–82.
- Tai P and Ascoli M (2011) Reactive oxygen species (ROS) play a critical role in the cAMP-induced activation of Ras and the phosphorylation of ERK1/2 in Leydig cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 25 885–893.
- Tanaka SS and Nishinakamura R (2014) Regulation of male sex determination: genital ridge formation and Sry activation in mice. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 71 4781–4802.
- Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A et al. (2009) mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Methods* 6 377–382.
- Tavares RS, Portela JMD, Sousa MI, Mota PC, Ramalho-Santos J and Amaral S (2017) High glucose levels affect spermatogenesis: an in vitro approach. *Reproduction, Fertility, and Development* 29 1369–1378.
- Teletin M, Vernet N, Yu J, Klopfenstein M, Jones JW, Féret B, Kane MA, Ghyselinck NB and Mark M (2019) Two functionally redundant sources of retinoic acid secure spermatogonia differentiation in the seminiferous epithelium. *Development* dev.170225.
- Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C and Greco E (2002) In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Human Reproduction (Oxford, England)* 17 1811–1819.
- Travers A, Milazzo JP, Perdrix A, Metton C, Bironneau A, Macé B and Rives N (2011) Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. *Theriogenology* 76 981–990.
- Travers A, Arkoun B, Safsaf A, Milazzo J-P, Absyte A, Bironneau A, Perdrix A, Sibert L, Macé B, Cauliez B et al. (2013) Effects of vitamin A on in vitro maturation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells. *PloS One* 8 e82819.
- Tres LL and Kierszenbaum AL (1983) Viability of rat spermatogenic cells in vitro is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone-supplemented

- medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 3377–3381.
- Trost LW and Brannigan RE (2012) Oncofertility and the male cancer patient. *Current Treatment Options in Oncology* 13 146–160.
- Trowell OA (1959) The culture of mature organs in a synthetic medium. *Experimental Cell Research* 16 118–147.
- Tsai M-Y, Yeh S-D, Wang R-S, Yeh S, Zhang C, Lin H-Y, Tzeng C-R and Chang C (2006) Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 18975–18980.
- Turner JMA (2007) Meiotic sex chromosome inactivation. *Development (Cambridge, England)* 134 1823–1831.
- Turner JMA (2015) Meiotic Silencing in Mammals. *Annual Review of Genetics* 49 395–412.
- Turner JMA, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GVR, Barrett JC, Burgoyne PS and Deng C-X (2004) BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Current Biology: CB* 14 2135–2142.
- Turner JMA, Mahadevaiah SK, Ellis PJI, Mitchell MJ and Burgoyne PS (2006) Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Developmental Cell* 10 521–529.
- Unni S, Kasiviswanathan S, D’Souza S, Khavale S, Mukherjee S, Patwardhan S and Bhartiya D (2012) Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. *Fertility and Sterility* 97 200-208.e1.
- Van Saen D, Goossens E, De Block G and Tournaye H (2009) Regeneration of spermatogenesis by grafting testicular tissue or injecting testicular cells into the testes of sterile mice: a comparative study. *Fertility and Sterility* 91 2264–2272.
- Van Saen D, Goossens E, Bourgain C, Ferster A and Tournaye H (2011) Meiotic activity in orthotopic xenografts derived from human postpubertal testicular tissue. *Human Reproduction (Oxford, England)* 26 282–293.
- Van Saen D, Goossens E, Haentjens P, Baert Y and Tournaye H (2013) Exogenous administration of recombinant human FSH does not improve germ cell survival in human prepubertal xenografts. *Reproductive BioMedicine Online* 26 286–298.
- Vermeulen M, Del Vento F, de Michele F, Poels J and Wyns C (2018) Development of a Cytocompatible Scaffold from Pig Immature Testicular Tissue Allowing Human Sertoli Cell Attachment, Proliferation and Functionality. *International Journal of Molecular Sciences* 19 227.
- Waites GM (1970) Temperature regulation and the testis. In *The Testis, Development, Anatomy and Physiology*. New York and London: Johnson A.D., Gomes W.R., Vandemark M.L., eds.

- Wang P, Suo L-J, Wang Y-F, Shang H, Li G-X, Hu J-H and Li Q-W (2014a) Effects of GDNF and LIF on mouse spermatogonial stem cells proliferation in vitro. *Cytotechnology* 66 309–316.
- Wang P, Suo L-J, Shang H, Li Y, Li G-X, Li Q-W and Hu J-H (2014b) Differentiation of spermatogonial stem cell-like cells from murine testicular tissue into haploid male germ cells in vitro. *Cytotechnology* 66 365–372.
- Wang C, Jin Y and Jin Y (2016) Promoting effect of licorice extract on spermatogonial proliferation and spermatocytes differentiation of neonatal mice in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 52 149–155.
- Wang Y-Q, Chen S-R and Liu Y-X (2018) Selective deletion of WLS in peritubular myoid cells does not affect spermatogenesis or fertility in mice. *Molecular Reproduction and Development* 85 559–561.
- Wang Y-H, Yan M, Zhang X, Liu X-Y, Ding Y-F, Lai C-P, Tong M-H and Li J-S (2021) Rescue of male infertility through correcting a genetic mutation causing meiotic arrest in spermatogonial stem cells. *Asian Journal of Andrology*.
- Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B and Jemal A (2014) Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 64 83–103.
- Warren DW, Haltmeyer GC and Eik-Nes KB (1973) Testosterone in the fetal rat testis. *Biology of Reproduction* 8 560–565.
- Welsh M, Saunders PTK, Atanassova N, Sharpe RM and Smith LB (2009) Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 4218–4230.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science (New York, N.Y.)* 178 411–414.
- Winge SB, Dalgaard MD, Jensen JM, Graem N, Schierup MH, Juul A, Rajpert-De Meyts E and Almstrup K (2018) Transcriptome profiling of fetal Klinefelter testis tissue reveals a possible involvement of long non-coding RNAs in gonocyte maturation. *Human Molecular Genetics* 27 430–439.
- Winter AG, Zhao F and Lee RK (2014) Androgen deficiency and metabolic syndrome in men. *Translational Andrology and Urology* 3 50–58.
- World Health Organization Task Force on Methods for the Regulation of Male Fertility (1996) Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertility and Sterility* 65 821–829.
- Wu H, Shi L, Wang Q, Cheng L, Zhao X, Chen Q, Jiang Q, Feng M, Li Q and Han D (2016) Mumps virus-induced innate immune responses in mouse Sertoli and Leydig cells. *Scientific Reports* 6 19507.
- Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B, Van Langendonckt A, François-Xavier W and Donnez J (2007) Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term

- orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Human Reproduction (Oxford, England)* 22 1603–1611.
- Wyns C, Van Langendonck A, Wese F-X, Donnez J and Curaba M (2008) Long-term spermatogonial survival in cryopreserved and xenografted immature human testicular tissue. *Human Reproduction (Oxford, England)* 23 2402–2414.
- Wyns C, Abu-Ghannam G and Poels J (2013) Vitrification du tissu testiculaire : évolution ou révolution ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 41 558–561.
- Xavier F and Allard S (2003) Anti-Müllerian hormone, beta-catenin and Müllerian duct regression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 211 115–121.
- Xiao S, Coppeta JR, Rogers HB, Isenberg BC, Zhu J, Olalekan SA, McKinnon KE, Dokic D, Rashedi AS, Haiseneder DJ et al. (2017) A microfluidic culture model of the human reproductive tract and 28-day menstrual cycle. *Nature Communications* 8 ncomms14584.
- Xie Y, Wei B-H, Ni F-D and Yang W-X (2021) Conversion from spermatogonia to spermatocytes: Extracellular cues and downstream transcription network. *Gene* 764 145080.
- Xu Q, Lin H-Y, Yeh S-D, Yu I-C, Wang R-S, Chen Y-T, Zhang C, Altuwaijri S, Chen L-M, Chuang K-H et al. (2007) Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine* 32 96–106.
- Yamanaka H, Komeya M, Nakamura H, Sanjo H, Sato T, Yao M, Kimura H, Fujii T and Ogawa T (2018) A monolayer microfluidic device supporting mouse spermatogenesis with improved visibility. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Yamini N, Pourmand G, Amidi F, Salehnia M, Ataei Nejad N and Mougahi SM (2016) Developmental Potential of Vitrified Mouse Testicular Tissue after Ectopic Transplantation. *Cell Journal* 18 74–82.
- Yan W and McCarrey JR (2009) Sex chromosome inactivation in the male. *Epigenetics* 4 452–456.
- Yan HHN, Mruk DD, Lee WM and Cheng CY (2008) Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 1945–1959.
- Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J et al. (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 4.
- Yao J, Zuo H, Gao J, Wang M, Wang D and Li X (2017) The effects of IGF-1 on mouse spermatogenesis using an organ culture method. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 491 840–847.

- Yatsenko AN, Georgiadis AP, Röpke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, Westernströer B, Sanfilippo J, Kurpisz M, Rajkovic A et al. (2015) X-Linked TEX11 Mutations, Meiotic Arrest, and Azoospermia in Infertile Men. *New England Journal of Medicine* 372 2097–2107.
- Yavin S and Arav A (2007) Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 67 81–89.
- Yildiz C, Mullen B, Jarvi K, McKerlie C and Lo KC (2013) Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. *Cryobiology* 67 70–75.
- Yildiz C, Mullen B, Jarvi K, McKerlie C and Lo KC (2018) Comparison of cryosurvival and spermatogenesis efficiency of cryopreserved neonatal mouse testicular tissue between three vitrification protocols and controlled-rate freezing. *Cryobiology*.
- Yin Y, Hawkins KL, DeWolf WC and Morgentaler A (1997) Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *Journal of Andrology* 18 159–165.
- Yogev L, Gamzu R, Kleiman S, Botchan A, Hauser R and Yavetz H (2000) Evaluation of meiotic impairment of azoospermic men by fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility* 74 228–233.
- Yogev L, Gamzu R, Paz G, Kleiman S, Botchan A, Hauser R and Yavetz H (2002) Rate of homologous chromosome bivalents in spermatocytes may predict completion of spermatogenesis in azoospermic men. *Human Genetics* 110 30–35.
- Yokonishi T, Sato T, Katagiri K and Ogawa T (2013) In vitro spermatogenesis using an organ culture technique. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 927 479–488.
- Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A et al. (2014) Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nature Communications* 5 4320.
- Yokota S, Shirahata T, Yusa J, Sakurai Y, Ito H and Oshio S (2019) Long-term dietary intake of excessive vitamin A impairs spermatogenesis in mice. *The Journal of Toxicological Sciences* 44 257–271.
- Yu J, Cai Z-M, Wan H-J, Zhang F-T, Ye J, Fang J-Z, Gui Y-T and Ye J-X (2006) Development of neonatal mouse and fetal human testicular tissue as ectopic grafts in immunodeficient mice. *Asian Journal of Andrology* 8 393–403.
- Zeng W, Snedaker AK, Megee S, Rathi R, Chen F, Honaramooz A and Dobrinski I (2009) Preservation and transplantation of porcine testis tissue. *Reproduction, Fertility, and Development* 21 489–497.
- Zhang M, Jiang M, Bi Y, Zhu H, Zhou Z and Sha J (2012) Autophagy and Apoptosis Act as Partners to Induce Germ Cell Death after Heat Stress in Mice. *PLoS ONE* 7 e41412.
- Zhang X-G, Wang Y-H, Han C, Hu S, Wang L-Q and Hu J-H (2015) Effects of trehalose supplementation on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine calf testicular tissue. *Cryobiology* 70 246–252.

- Zhang X-G, Li H and Hu J-H (2017) Effects of various cryoprotectants on the quality of frozen-thawed immature bovine (Qinchuan cattle) calf testicular tissue. *Andrologia* 49.
- Zhao S, Zhu W, Xue S and Han D (2014) Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 11 428–437.
- Zhao L, Yao C, Xing X, Jing T, Li P, Zhu Z, Yang C, Zhai J, Tian R, Chen H et al. (2020) Single-cell analysis of developing and azoospermia human testicles reveals central role of Sertoli cells. *Nature Communications* 11 5683.
- Zhou Q and Griswold MD (2008) Regulation of spermatogonia. In *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute.
- Zhou B and Hutson JM (1995) Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Fails to Stimulate Gonocyte Differentiation in Newborn Mouse Testes in Organ Culture. *The Journal of Urology* 153 501–505.
- Zhou B, Watts LM and Hutson JM (1993) Germ cell development in neonatal mouse testes in vitro requires müllerian inhibiting substance. *The Journal of Urology* 150 613–616.
- Zhou XC, Wei P, Hu ZY, Gao F, Zhou RJ and Liu YX (2001) Role of Fas/FasL genes in azoospermia or oligozoospermia induced by testosterone undecanoate in rhesus monkey. *Acta Pharmacologica Sinica* 22 1028–1033.
- Zhou R, Wu J, Liu B, Jiang Y, Chen W, Li J, He Q and He Z (2019) The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 76 2681–2695.
- Zickler D and Kleckner N (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Review of Genetics* 32 619–697.
- Zickler D and Kleckner N (2015) Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7.
- Zimmermann C, Stévant I, Borel C, Conne B, Pitetti J-L, Calvel P, Kaessmann H, Jégou B, Chalmel F and Nef S (2015) Research resource: the dynamic transcriptional profile of sertoli cells during the progression of spermatogenesis. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 29 627–642.
- Zohni K, Zhang X, Tan SL, Chan P and Nagano M (2012) CD9 is expressed on human male germ cells that have a long-term repopulation potential after transplantation into mouse testes. *Biology of Reproduction* 87 27.

Annexes



Review

Exposure to Chemotherapy During Childhood or Adulthood and Consequences on Spermatogenesis and Male Fertility

Marion Delessard, Justine Saulnier, Aurélie Rives, Ludovic Dumont , Christine Rondanino 
and Nathalie Rives *

EA 4308 “Gametogenesis and Gamete Quality”, Normandie Univ, UNIROUEN, Rouen University Hospital, Biology of Reproduction–CECOS Laboratory, 76000 Rouen, France; marion.delessard@etu.univ-rouen.fr (M.D.); justine.saulnier@etu.univ-rouen.fr (J.S.); aurelie.rives@chu-rouen.fr (A.R.); ludovic.dumont1@univ-rouen.fr (L.D.); christine.rondanino@univ-rouen.fr (C.R.)

* Correspondence: nathalie.rives@chu-rouen.fr; Tel.: +33-2-3288-8225

Received: 20 December 2019; Accepted: 13 February 2020; Published: 20 February 2020



Abstract: Over the last decade, the number of cancer survivors has increased thanks to progress in diagnosis and treatment. Cancer treatments are often accompanied by adverse side effects depending on the age of the patient, the type of cancer, the treatment regimen, and the doses. The testicular tissue is very sensitive to chemotherapy and radiotherapy. This review will summarize the epidemiological and experimental data concerning the consequences of exposure to chemotherapy during the prepubertal period or adulthood on spermatogenic progression, sperm production, sperm nuclear quality, and the health of the offspring. Studies concerning the gonadotoxicity of anticancer drugs in adult survivors of childhood cancer are still limited compared with those concerning the effects of chemotherapy exposure during adulthood. In humans, it is difficult to evaluate exactly the toxicity of chemotherapeutic agents because cancer treatments often combine chemotherapy and radiotherapy. Thus, it is important to undertake experimental studies in animal models in order to define the mechanism involved in the drug gonadotoxicity and to assess the effects of their administration alone or in combination on immature and mature testis. These data will help to better inform cancer patients after recovery about the risks of chemotherapy for their future fertility and to propose fertility preservation options.

Keywords: chemotherapy; fertility; adulthood exposure; childhood exposure

1. Introduction

In recent years, the number of cancer survivors has continuously increased thanks to earlier detection of cancer and progress in cancer treatment and medical care. In the United States, nearly 14.5 million cancer survivors have been identified in January 2014 and this number will probably reach 19 million by January 2024 [1]. Using data from 153 cancer registries in 62 countries, a study reports that the incidence of cancer in children under the age of 14 was 140 per million persons per year during 2001–2010 [2]. In France, approximately 2200 new cases of cancer are diagnosed each year among children and adolescents [3,4]. These cancers are the second most frequent cause of death for children under 15 years of age. Leukaemia (29%), mainly acute lymphoblastic leukaemia, is among the most common childhood cancer in addition to central nervous system tumours (23%) and lymphoma (12%) [4]. The five-year survival rate of children and adolescents with cancer has improved significantly in recent decades, with nearly 82% for all types of cancer [3]. Among adolescents and young adults, 2400 cases of cancer have been registered during 2000–2008. In this population, the most frequently

observed cancers are lymphomas (23%) including Hodgkin's lymphomas (17,8%) and non-Hodgkins lymphoma (4.4%), germ cell tumours (16.7%), melanomas (10.9%), and thyroid cancers (10.9%) [3].

The improvement of the quality of life of cancer survivors has thus become a major public healthcare issue. Cancer treatment-related toxicities can generate late and long-term side effects in cured patients and infertility could be one of them [5,6]. In fact, the prevalence of male infertility is 46% in adult survivors of childhood cancer versus 17.5% in siblings [7]. Nevertheless, given the urgency of diagnosis and the implementation of effective therapy for children, the toxicity of cancer treatments on the gonad was overshadowed for a long time. Moreover, earlier studies suggested that the childhood period provide protection against chemotherapy-induced gonad damage owing to the supposed “quiescent stage” of the testis during this period. Recent studies have shown that the testis can be affected by cancer treatments at all stages of life, and consequently of development [8,9]. However, very few studies concerning the gonadotoxicity of anticancer drugs in adult survivors of childhood cancer are available compared with those concerning the effects of chemotherapy exposure during adulthood.

In order to increase the effectiveness of cancer treatments, combinations of molecules are frequently used such as MOPP (mechlorethamine, vincristine, procarbazine, and prednisone) and ABVD (adriamycin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine) for the treatment of Hodgkin's lymphoma and CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone) for non-Hodgkins lymphoma. In most cases, the regimen of treatment received by children, adolescents, and young adults contains alkylating agents (e.g., chlorambucil, cyclophosphamide, cisplatin, busulphan), which are associated with a high risk of infertility [10,11]. Most chemotherapy molecules have been classified according to their gonadotoxic risk, that is, according to the degree of spermatogenesis impairment ranging from oligozoospermia to non-obstructive azoospermia after recovery (Table 1) [12,13]. Thus, DNA intercalating agents (e.g., irinotecan, daunorubicin, doxorubicin, etoposide, bleomycin) that induce or stabilize DNA strand breaks, antimetabolites (e.g., methotrexate, cytarabine) that impact DNA biosynthesis, and spindle poisons (e.g., vincristine, vinblastine) that interact with tubulin have been considered as moderate and low risk for fertility [14,15]. This classification indicates the risks of infertility after chemotherapy exposure during childhood or adulthood and helps clinicians to better refer patients for fertility preservation option. However, this classification remains questionable as it appears to be difficult to identify the risk of each molecule, generally administered in combination. Moreover, it should be noticed that very few data are available on the gonadotoxicity of chemotherapy administered during the prepubertal period and most of them are deduced from adult studies [14].

Table 1. Risks of the main anticancer drugs on men fertility diagnosed in adulthood or in childhood.

Agents (Cumulative Dose for Effect)	Class of Anticancer Drugs	Risk on Fertility after Adulthood Exposure [12]	Risk on Fertility after Childhood Exposure [13]
Chlorambucil (1.4 g/m ²)	Alkylating agent	High (Prolonged azoospermia)	High
Cyclophosphamide (19 g/m ²)			High (7.5 g/m ²)
Procarbazine (4 g/m ²)			High
Melphalan (140 mg/m ²)			High
Cisplatin (500 mg/m ²)			High
Busulfan (600 mg/kg)	Alkylating agent	Moderate (Likelihood of azoospermia, but always given with other sterilizing agents)	High
Ifosfamide (42 g/m ²)			High (4 g/m ²)
Carmustin (300 mg/m ²)			Low
Dactinomycin	DNA Intercalating		Low
Carboplatin (2 g/m ²)	Alkylating agent		Moderate
Thiotepa (400 mg/m ²)			Moderate
Doxorubicin (770 mg/m ²)	DNA Intercalating		Moderate
Cytarabine (1 g/m ²)			Moderate
Vinblastine (50 g/m ²)	Spindle poison		Low
Vincristine (8 g/m ²)			Low
		Low	

Table 1. Cont.

Agents (Cumulative Dose for Effect)	Class of Anticancer Drugs	Risk on Fertility after Adulthood Exposure [12]	Risk on Fertility after Childhood Exposure [13]
Dacarbazine	Alkylating agent	(Temporary reduction in sperm counts)	Moderate
Daunorubicin Mitoxantrone	DNA Intercalating		Moderate Moderate
Bleomycin	DNA strand breaks inducer		Low
Etoposide	Topoisomerase II inhibitor		Low
Fludarabine	Antimetabolite		Unknown
Fluorouracil			Low
Mercaptopurine			Low
Methotrexate			Low
Thioguanine			Unknown

In the current review, the epidemiological and experimental data about the effects of chemotherapy exposure during the prepubertal period or adulthood on spermatogenesis, sperm production, sperm nuclear quality, and offspring's health are presented.

2. Consequences of Chemotherapy Exposure During Childhood on Future Male Fertility

The testes have a dual function: an exocrine function via the production of spermatozoa in the seminiferous tubules and an endocrine function via the secretion of testosterone by Leydig cells in the interstitial compartment. Thus, the testis is traditionally divided into two interdependent compartments: the seminiferous tubules—the site of spermatogenesis—and the interstitial tissue—containing Leydig cells and blood capillaries [16]. Spermatogenesis is a process of cell division and differentiation leading to the production of spermatozoa from puberty to senescence. It takes place inside the seminiferous tubules in the testis, which are composed of Sertoli and germ cells. This process can be divided into three phases after puberty: (i) spermatogonial proliferation; (ii) spermatocyte meiosis leading to the production of haploid spermatids; and (iii) spermiogenesis, during which spermatids differentiate into spermatozoa. The duration of spermatogenesis differs according to species: 74 days are required to obtain spermatozoa in humans, 52 days in rats, and 35 days in mice [17].

Spermatogonial stem cells (SSCs) allow the continuous production of spermatozoa and support spermatogenesis. In the seminiferous tubules, Sertoli cells are known to maintain close interactions with SSCs and to form a proper microenvironment—the so-called “niche”—essential for their self-renewal and differentiation. In humans, undifferentiated spermatogonia are composed by A_{dark} and A_{pale} spermatogonia [18]. Spermatogonia A_{dark} form the quiescent reserve of the stem cell population, while maintaining their mitotic activity in the case of spermatogonia depletion. The A_{pale} population is mitotically active and able to differentiate into type B spermatogonia. Differentiating spermatogonia (type B) divide, through mitosis, gives spermatocytes [18]. In rodents, undifferentiated spermatogonia consist of A_{single} (SSCs), A_{paired} , and A_{aligned} . A_{aligned} spermatogonia differentiate into A1 spermatogonia that, in turn, give six generation of differentiating spermatogonia (A_{1-4} , A_{in} , B) [17,19]. Rats and mice are the most commonly used animal models to study the gonadotoxicity of chemotherapeutic molecules [14].

Childhood has been often considered as a quiescent period of testicular development, protecting the testes from the adverse effects of chemotherapy. Thus, very few data are available on the impact of chemotherapy exposure during childhood on testicular functions and most of them are deduced from adult studies. However, prepubertal human testis is quietly active with an increase in testicular volume, proliferation of immature Sertoli cells, and rise in the number of Leydig cells [20]. Successful establishment of these physiological modifications influences the pubertal development of the testis, and consequently adult fertility. Therefore, chemotherapy may disrupt them. It should be noted that most of the studies listed in the current review define “chemotherapy exposure during

childhood”, including not only the administration of cancer treatment in prepubertal boys, but also in postpubertal adolescents.

2.1. Effects of Chemotherapy on Somatic Cells and Spermatogenic Progression in Adulthood

2.1.1. Effects of Chemotherapy on Somatic Cells

Infertility observed after chemotherapy exposure can be the result of direct injury on germ cells or indirect damages on endocrine and paracrine control of somatic cells [21]. In fact, during infancy, Sertoli cells proliferate actively, which makes them a potential target of childhood cancer treatment toxicity [20]. Few data are available on the long-term impact of chemotherapy exposure during childhood on Sertoli cells. A case report has demonstrated the presence of immature Sertoli cells (expressed Cytokeratin-18 normally absent after puberty) in an azoospermic man who underwent chemotherapy treatment at 13 years old [22]. Moreover, reduced sperm counts found in male survivors of paediatric cancer were systemically associated with increased follicle stimulating hormone (FSH) levels, indirectly reflecting Sertoli cell alteration [8,23]. However, in contrast to germ cells, Sertoli cells seemed to develop a better resistance to chemotherapeutic agents in an animal model. In vitro studies using prepubertal rat testis showed no impact on the Sertoli cell number after 48 h exposure to doxorubicin, cisplatin, or cyclophosphamide [24]. Another study highlighted cell death resistance in primary Sertoli cells isolated from prepubertal rat, after 24 h in vitro exposure to cisplatin and etoposide. The Sertoli cell survival can be explained by a mechanism of apoptosis and autophagy inhibition [25]. However, an increased oxidative stress has been measured in an immature Sertoli cell line (Ser-W3) after doxorubicin exposure [26]. Moreover, the administration of DNA topoisomerase II inhibitor led to morphological and nuclear alterations, resulting in cytoplasmic vacuolization and abnormal chromatin condensation, respectively [27,28]. Sertoli cell dysfunction was observed after in vivo exposure to chemotherapeutic molecules with a decreased production of androgen binding protein (ABP) and transferrin, two proteins involved in the regulation of spermatogenesis [29,30].

Despite their important role in the spermatogenesis support and the maintenance of spermatogonial stem cell niche, little attention has been paid to myoid cells and Leydig cells and no studies have focused on macrophages [14]. To the best of our knowledge, only one experimental study investigated the peritubular myoid cells and demonstrated that the in vitro exposure to doxorubicin did not affect the proliferation of myoid cells in the rat testicular tissue [31].

Leydig cell function is impaired in survivors of paediatric cancer [23,32,33]. Some patients present a small drop of testosterone plasmatic level and an important increase of luteinizing hormone (LH) plasmatic level owing to an amplified response of LH to gonadotropin releasing hormone to compensate for Leydig cell dysfunction [33–35]. Many studies have reported the negative impact of chemotherapy on the gonad endocrine function. Indeed, childhood cancer survivors have an increased risk of hypogonadism compared with the overall population [36]. The estimation of the hypogonadism risk would improve patient care and ensure a better prevention of the long-term complications of androgen deficiency [36]. Although most children treated for cancer develop secondary sexual characteristics and enter into puberty at a normal age, some patients might display sex hormone deficiency, delayed onset of puberty, and small testicular volume, suggesting a potential spermatogenesis impairment in addition to testicular endocrine dysfunction [34,37,38]. In animal models, few data are available on the impact of chemotherapy exposure on Leydig cells. No change in Leydig cells function and morphology has been observed in the pre-pubertal testis after 48 h in vitro exposure to doxorubicin [31]. Similarly, recent data have reported that Leydig cell density was unaffected after 24 h in vitro exposure to cisplatin, cyclophosphamide, and doxorubicin [24]. Although no change has been observed in rodent Leydig cells in in vitro studies, elevated LH levels found in survivors of paediatric cancer might suggest Leydig cell alteration; the few studies available do not currently allow conclusions to be drawn about the impact of chemotherapy exposure during childhood on testicular somatic cells.

2.1.2. Effects of Chemotherapy on Spermatogonia and Spermatoocytes

Exposure to alkylating agents during childhood has been particularly associated with testicular damages characterized by Sertoli cell only tubules, reduced tubular diameter, and interstitial fibrosis [39,40]. Moreover, a long-term reduction of the SSC pool has been observed in prepubertal patients exposed to cancer treatment including alkylating agents, and the risk of infertility appears to increase with the proportion of altered SSCs [11,41]. Most of the time, the SSC pool is not totally depleted and the surviving germ cells allow spermatogenesis recovery [42,43]. Similarly, in adult rats treated with low daily doses of etoposide during the prepubertal period (30- to 60-day-old rats), testicular weight is reduced and testicular tissues display severe alterations with Sertoli cell only tubules persisting in 113-day-old rats [44]. It should be noted that most of the data concerning prepubertal chemotherapy exposure are based on studies with 25–30-day-old rats or 14-day-old mice corresponding to an exposure during the first wave of spermatogenesis. Very few data are available on the impact of the administration of chemotherapy before entry into meiosis (before day 7–8 in mouse and around day 12 in rat model) [45,46] (Figure 2). Therefore, a depletion of spermatogonia characterized by Sertoli cell only tubules has been observed in testicular tissue from five-day-old mouse cultured *in vitro* after exposure to the irinotecan metabolite SN38 [47]. With the same culture condition, a significant loss of SSCs after cyclophosphamide, vincristine, and doxorubicin exposure at concentrations used in humans has been reported [24]. Two *in vivo* studies have shown that tyrosine kinase inhibitors such as imatinib mesylate, when administered during the early postnatal period in rodent, impair the formation of the SSC pool and reduce the proliferation of type A spermatogonia [48,49]. Indeed, this treatment used as a first-line treatment of chronic myeloid leukaemia and gastrointestinal stromal tumors inhibits platelet-derived growth factor receptor β subtype activity, which plays a major role in the proliferation and migration of gonocytes, a significant step to maintain their survival and to generate the SSC pool [48,50,51]. Imatinib affects neither SSC self-renewal nor their capacity to colonize seminiferous tubules and initiate spermatogenesis, which might explain the normal sperm count found in the epididymis of exposed animals after an 11-week recovery period [49,52]. In addition, the Comet assay highlights an increase in DNA breaks in a cell line with SSC characteristics following exposure to doxorubicin, considered to have a moderate risk on fertility [53]. Likewise, a short-term exposure to chemotherapeutic drugs such as bleomycin, etoposide, doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide results in DNA damages (increased in γ H2AX expression) in a C18–4 mouse spermatogonial cell line and in culture of mouse prepubertal testicular tissue after 48 h and 16 h, respectively [24,54]. In fact, telomere DNA damage, associated with an inhibition of telomerase activity, has been evidenced in C18–4 cell line exposed to cisplatin or cyclophosphamide [54]. Because these structures are critical for genetic stability, their dysfunction might affect the most differentiated germ cell types and contribute to infertility [55]. Moreover, the accumulation of DNA damages, following *in vivo* administration of a low dose of etoposide in prepubertal rats, might lead to the activation of the apoptotic pathway and the reduction in the number of primary differentiated spermatogonia and spermatoocytes [56]. In addition, it has been hypothesized that unrepaired DNA damage in SSCs, occurring after exposure to chemotherapy during the prepubertal period (i.e., 30-day-old in rats), might be maintained in spermatogonia throughout spermatogenesis cycles, and consequently might impact sperm quality [57].

2.2. Effects of Chemotherapy on Spermatozoa and Offspring

2.2.1. Sperm Production and Recovery Period

Paediatric cancer treatments commonly contain alkylating agents. The use of the cyclophosphamide equivalent dose (CED) is recommended to quantify the exposure to alkylating agents and a negative correlation has been reported between the CED and sperm concentration in a cohort of adult male survivors of childhood cancer [10,58]. A study, based on a large cohort of 214 patients treated for cancer between 1970 and 2002, reports that 25% of adults who received alkylating agents during childhood display an azoospermia. Moreover, normozoospermic patients (48%) display impairment of sperm

motility and morphology [10]. Another study including patients treated during the same period as the previous one (1970–2002) has shown that the percentage of azoospermic patients reached 50% in men diagnosed for Hodgkin's lymphoma before 10 years of age, 17% for non-Hodgkin's lymphoma, and 12% for leukemia. Moreover, 67% of patients treated with a sterilizing dose of alkylating agents (i.e., doses higher than values given in Table 1) display azoospermia, but none are observed in cancer survivors receiving lower doses of alkylating agents [59]. Impairment of fertility depends not only on the type of cancer and disease stage, but mostly on the therapy regimen.

2.2.2. Sperm Nuclear Abnormalities

Very few studies focus on sperm nuclear abnormalities. Three studies have explored sperm DNA integrity in childhood cancer survivors. In adult survivors of childhood cancer, sperm DNA and chromatin integrity seem to be unaffected by chemotherapy treatment [60,61]. However, chemotherapy exposure during adolescence seems to promote epimutations and to alter DNA methylation in spermatozoa [62].

DNA damages have been highlighted in animal models. Head abnormalities in almost 50% of spermatozoa, associated with disruption of chromatin compaction, have been observed in adult mice who received cyclophosphamide treatment at 14 days old [63]. Moreover, DNA strand breaks are also found in spermatozoa following doxorubicin treatment of 30-day-old rats [57]. Data on nuclear sperm quality, after exposure to chemotherapy during childhood, remain limited in humans as well as in animal models.

2.2.3. Effects of Chemotherapy on Cancer Survivors' Offspring

Male survivors who received high doses of alkylating drugs during childhood are especially less likely to father a child [64,65]. Offspring of survivors diagnosed in childhood do not appear to have a higher risk of congenital abnormalities, genetic diseases, and abnormal karyotypes compared with their siblings [66–69]. Moreover, no significant difference has been observed in the risk of hospitalization between children of paediatric cancer survivors and the overall population [69].

In animal models, there is also a notable lack of data on intergenerational and transgenerational effects of paternal exposure during childhood on the progeny [70]. Etoposide administration during the prepubertal period (25-day-old rats) reduces the number of offspring obtained from the mating of treated adult rats with fertile females [56]. Moreover, the *in vitro* treatment of spermatogonial cells (C18–4 mouse spermatogonial cells) with cisplatin and preactivated analog of cyclophosphamide lead to a reduction of telomere length and inhibition of telomerase activity [54]. Disruption of germ cell telomeres leads to aberrant fertilization and abnormal cleavage of embryos, which might cause an increase of embryo losses or developmental abnormalities [71]. In this context, it would be necessary to examine the health and reproductive functions of the descendants of paediatric cancer survivors.

3. Consequences of Chemotherapy Exposure During Adulthood on Male Fertility

3.1. Effects of Chemotherapy on Somatic Cells and Spermatogenesis Recovery

3.1.1. Effects of Chemotherapy on Somatic Cells

The successful completion of spermatogenesis depends, among others, on a normal endocrine balance. In men with cancer history, assessment of testicular function is achieved by measuring hormone levels of FSH, LH, and testosterone in blood sample [72,73]. These biomarkers have been measured to estimate testicular damage due to cancer treatment particularly in the case where semen analysis was not possible. In clinical practice, the measurement of serum testosterone and LH has been used to evaluate Leydig cell impairment [74]. It is more difficult to assess Sertoli cell function owing to the lack of reliable measurable biomarkers. Most of the time, Sertoli cell dysfunction is deduced from a rise in the FSH level associated with spermatogenic failure [75]. Some studies suggest

to assess the inhibin/FSH ratio because Sertoli cells are the main source of inhibin in the testis and it could be a circulating marker for Sertoli cell function [76,77]. Following chemotherapy, adult men with haematological malignancies show a decrease of inhibin B associated with a rise in the FSH level, suggesting Sertoli cell damage and the loss of negative feedback control of FSH [77]. However, it appears to be difficult to evaluate Sertoli cell damage using only the inhibin/FSH index, because of the close interactions between the gonadotropic axis and Sertoli and Leydig cells. Therefore, it would be better to assess the pattern of serum inhibin/FSH, in combination with other hormonal factors such as testosterone and LH [76].

The administration of cyclophosphamide to adult mice leads to a disturbance of protein expression in Sertoli cells [78]. This alkylating agent notably causes a reduction in the production of glial cell-derived neurotrophic factor, involved in SSCs self-renewal and spermatogonia differentiation. Moreover, the expression of occludin, a main component of tight junctions essential for the blood–testis barrier functionality, is diminished, whereas the expression of transforming growth factor β 3, a down-regulator of tight junctions, is increased [78]. The disruption of protein expression of Sertoli cells as a result of chemotherapy exposure might impair spermatogenesis.

Leydig cells, which secrete testosterone, have often been considered more resistant to chemotherapy than germ cells and Sertoli cells. However, it has been shown that Leydig cell function can be impaired in long-term cancer survivors associated with a raise of LH blood level and a low or normal testosterone concentration [32,79]. Moreover, it has been hypothesized that the alteration of the seminiferous epithelium might lead to a decrease of testicular volume and blood flow and, consequently, limited the testosterone level leaving the testis [80]. This reduction of blood flow may be compensated by Leydig cells by increasing intratesticular testosterone concentration. In addition, reduced arterial flow leads to a disruption of paracrine control of Leydig cells and to a reduction of the stimulatory response to LH [81]. In the adult rat testis, it has been observed that bleomycin, etoposide, and cisplatin (BEP) chemotherapy induces an oxidative stress status, Leydig cell hyperplasia, and inhibition of the transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. A decline in *CYP19A1* gene expression (enzyme involved in the conversion of testosterone into estrone and estradiol) associated with an increase in the Leydig cell population could explain the low/normal testosterone levels [82].

As in prepubertal testis, data on the impact of chemotherapy on somatic cell are mainly limited to Sertoli and Leydig cells. No study investigated the impact of anticancer treatment on macrophages, despite their role as “guardians of fertility” [83]. To the best of our knowledge, only Sasso-Cerri *et al.* have shown a nuclear fragmentation and a depletion of peritubular myoid cells in adult rat testes after alkylating agent exposure [84].

3.1.2. Effects of Chemotherapy on Spermatogonia and Spermatoocytes

The toxicity of chemotherapy on spermatogonial and spermatoocytes is difficult to investigate in adult male without testicular biopsy and few data are available on biomarkers of spermatogonial or spermatoocyte damage. Anti-Müllerian hormone (AMH) has been proposed as a marker for chemotherapy-induced testicular toxicity in combination with FSH, testosterone, and inhibin B [85]. Thus, an increase of serum AMH has been observed in patients (average age was 38 years) six months after treatment with alkylating agents, while this hormone generally decreased with the onset of testicular maturation. In adults, inhibin B would consist of α -subunit produced by Sertoli cells and β -subunit provided by spermatoocytes and spermatids, and decreases AMH production by inhibiting the effect of FSH on Sertoli cells [86,87]. The reduction of spermatoocytes and spermatids caused by chemotherapy decreases the production of inhibin B. The negative feedback control of FSH is disrupted and consequently causes an increase in the level of AMH [85]. Studies on larger cohorts are necessary to define the role of AMH and its use as a biomarker of testicular toxicity, as it has been proposed for assessing ovarian toxicity after chemotherapy exposure [88].

In cancer survivors, poor sperm quality (reduced sperm count and motility, increased abnormal forms) can persist several years after the completion of the cancer treatment, suggesting that the effects

of cancer drugs on SSCs have a long-term impact [89]. It is reasonable to assume that SSC injuries could persist throughout spermatogenic cycles. Because of their scarcity and their difficulty to be purified, very few studies have investigated SSC damages after chemotherapy exposure. Cancer treatment leads to a reduction in the number and proliferative activity of rat SSCs [90]. Moreover, in a rat spermatogonial cell line with SSC characteristics (GC-6spg), an increased expression of CDKN1a, a protein involved in cell cycle arrest and gene expression involved in DNA repair has been evidenced after doxorubicin exposure [53,91]. The cytotoxic effects of chemotherapeutic compounds have been also evaluated in undifferentiated spermatogonia in rats. Thus, undifferentiated A_{aligned} spermatogonia are severely depleted after in vivo BEP administration compared with undifferentiated A_{single} and A_{paired} [90].

Spermatocytes are also sensitive to the cytogenotoxic effect (i.e., oxidative stress, DNA damage, apoptosis) of chemotherapeutic compounds. The exposure to cancer drugs during adulthood leads to an increase in the number of seminiferous tubules devoid of germ cells associated with a reduction of seminiferous tubule diameter, and epithelial vacuolization involves a decreased testis weight in rodents [92,93]. Numerous chemotherapeutic compounds induce an increased oxidative stress in testicular tissues associated with a downregulation of anti-oxidant enzymes, which are necessary to prevent the excess formation of reactive oxygen species (ROS) [94–96]. This rise of oxidative stress might result in DNA damage in germ cells and accumulation of DNA injuries leads to germ cell death. Cyclophosphamide induces, for instance, apoptosis in spermatogonia and spermatocytes [97]. Germ cell apoptosis might be responsible for oligozoospermia or azoospermia, but also prevents the production of spermatozoa with DNA damages and their potential transmission to the offspring [97]. However, it has been shown in animals treated by chemotherapy that damaged germ cells could escape from apoptosis and lead to abnormal sperm production [98]. It has been hypothesized that the increased expression of the protooncogene *Jun* and a disruption in cell cycle checkpoints could explain the survival of abnormal germ cells after the administration of the BEP cocktail [98]. Besides altering gene expression, some chemotherapeutic agents could also interfere with the DNA replication process or chromosome segregation. This is the case of etoposide, a topoisomerase II inhibitor, which prevents the religation of DNA double strands after replication, leading to chromosomal fragmentation, and inhibits the normal segregation of homologous chromosomes, resulting in aneuploidy in mouse post-meiotic cells [99].

3.2. Effects of Chemotherapy on Spermatozoa and Offspring

3.2.1. Sperm Production and Recovery Period

In a study assessing the semen quality of cancer patients before and after chemotherapy, a decrease in sperm concentration, motility, and semen volume and an increase in sperm abnormal forms have been described [100]. The patients treated for leukaemia, lymphoma, or a testicular cancer presented different degrees of azoospermia or oligozoospermia, and approximately 63% of them developed irreversible azoospermia [100]. Despite major impairments of fertility after treatment, several studies have reported a recovery period that might vary between individuals and depending on the stage of disease development and the therapy regimen [101]. In fact, one year after treatment, patients who have been treated by more than two BEP cycles displayed a lower total sperm count, whereas men treated by one or two BEP cycles had a normal sperm recovery ($\leq 39 \times 10^6$ /ejaculate) after testicular cancer treatment [102]. The recovery period also depended on the dose received by the patient, mainly for doses of alkylating agent. For instance, a return to normozoospermic levels was observed in 70% of men who received cumulative doses of cyclophosphamide under 7.5 g/m^2 , whereas only 10% recovered with higher doses after five years or even more [103]. It has been shown that 100% of the patients of reproductive age treated for Hodgkin's lymphoma with MOPP chemotherapy were azoospermic 14 months after the treatment [104,105]. The earliest sperm recovery has occurred 15 months after completion of the treatment, whereas some patients still presented an azoospermia

20 years after. Although the patients recover spermatogenesis, most of them display low sperm counts [105]. Another treatment, the ABVD regimen, which is less gonadotoxic, is proposed to treat Hodgkin's lymphoma. No change has been observed in sperm concentration after one year in 90% of men treated with ABVD [106]. These studies highlight that it would be necessary to wait for several cycles of spermatogenesis before recovery of pre-treatment sperm counts, at least one year or more than four cycles of spermatogenesis after the end of the cancer treatment.

In addition to disrupting sperm production, chemotherapeutic agents might also affect semen quality. An *in vitro* study performed on freshly ejaculated human sperm has shown that doxorubicin and vincristine, regarded as molecules with intermediate and low risk of gonadotoxicity, respectively, had a sperm-immobilizing activity [107]. An increase in fructose and citric acid concentrations in the seminal fluid has also been reported during and after the treatment with chlorambucil for chronic lymphocytic leukaemia, Hodgkin's, and non-Hodgkin's lymphoma. One year after treatment, the patients recovered a normal sperm count, as well as fructose and citric acid concentrations within normal range [108].

Experimental data have also reported a decrease in semen quality (sperm concentration and motility) in adult rats exposed to adriamycin, CHOP, and BEP treatment [109–111]. In rats, the administration of CHOP leads to a reduction in sperm count and sperm recovery has been observed nine weeks after treatment or the equivalent of more than one spermatogenesis cycle [112]. However, the recovery of a normal sperm count does not guarantee an intact sperm nuclear quality [113].

3.2.2. Sperm Nuclear Abnormalities

While spermatogenesis might recover after completion of chemotherapy, persistent nuclear damages are found in spermatozoa of a majority of cancer survivors [89,114,115]. Indeed, a significant level of sperm DNA and chromatin damages has been observed in the semen samples of cancer patients, even after a 24-month recovery period [89,116]. Nuclear abnormalities observed in ejaculated sperm appeared to vary according to the stage of differentiation (spermatogonia, spermatocytes, or spermatids) at the time of chemotherapy exposure and the anticancer agent used [117].

Cancer treatments induced aberrant chromosome segregation, leading to the production of sperm with numerical chromosome abnormalities. In patients treated for testicular cancer with BEP regimen, total sperm aneuploidy rate, evaluated using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for chromosomes 8, 12, 18, X, and Y, significantly increased six months after the treatment [118]. Likewise, another study including five patients treated by BEP has shown an increase of the frequencies of disomy and diploidy for chromosome 16 and 18 during a recovery period from 6 to 18 months [119]. In addition, a raised frequency of chromosome 13 and 21 nullisomy has been observed in testicular cancer patients and Hodgkin's lymphoma patients 18 to 24 months after the chemotherapy initiation [120]. Most of studies using FISH analysis report a sexual chromosome disomy in patients after CHOP/MOPP-ABV, ABVD, or BEP regimen [115,120,121]. Close to 40% of testicular cancer patients did not recover normal sperm aneuploidy rates after treatment, and it would be advisable to postpone the parental project up to 24 months after more than two BEP chemotherapy cycles to prevent a potential risk of aneuploid conceptus [115]. Chemotherapeutic treatments have deleterious impacts on sperm chromosome constitution depending on the therapy received and the delay after the end of treatment. Thus, a multicenter prospective study assessing sperm aneuploidy in lymphoma patients demonstrated that ABVD and CHOP/MOPP-ABV (mechlorethamine, vincristine, procarbazine, prednisone-doxorubicin, bleomycin, vinblastine) treatments resulted in increased aneuploidy frequencies three months after the completion of the treatment. In patients treated with ABVD, aneuploidy rates returned to lower values than before treatment one or two years following the chemotherapy, whereas these rates were still relatively high until two years after in patients who received CHOP/MOPP-ABV [121].

The epidemiological data on sperm aneuploidy match with the experimental results obtained in rodent models. Indeed, it has been reported that etoposide treatment in mice led to an increased frequency of sperm aneuploidy 49 days after the end of chemotherapy [99,122]. It would appear that

exposure of pachytene spermatocytes to etoposide led to the increased frequencies of chromosome numerical and structural abnormalities (duplications and deletions) in mice spermatozoa, whereas SSCs exposure only lead to sperm chromosome structural abnormalities [122].

After oncological treatment, some studies show no change in sperm DNA fragmentation index in patients treated for testicular germ cell tumours, as well as Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas [123]. However, a rise of sperm DNA fragmentation assessment by COMET and TUNEL assay is observed in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma individuals after a recovery period of more than 24 months [73,89]. DNA fragmentation might be responsible for the abnormal chromatin compaction detected with sperm chromatin structure assay in testicular cancer patients [116]. Chemotherapeutic molecules such as alkylating agents modified DNA base and induced DNA cross-links that have been highlighted in many tissues in cancer patients [124,125]. In rat testis, DNA adducts have been observed after cisplatin exposure and could explain DNA strand breaks in spermatozoa [126]. In fact, a higher proportion of sperm with DNA single strand breaks and cross-links has been reported in adult rats exposed to a chronic alkylating agent treatment [111,127]. The presence of sperm DNA damages has been correlated with abnormal chromatin compaction [128,129]. The administration of BEP to rats induced defective sperm chromatin compaction, with the presence of low levels of protamine 1 and high levels of histones within the sperm nuclei [130]. BEP treatment disturbs histone H4 hyperacetylation, which was essential for the recruitment of a testis-specific bromodomain-protein BRDT necessary for histone removal and binding of transition proteins and protamines [131]. Moreover, the higher proportion of histone H3 monomethylated on lysine 9 (H3K9me) and the decreased proportion of the testis-specific histone H2B observed after BEP treatment might prevent chromatin decondensation in pachytene spermatocytes [132]. The high degree of chromatin packaging improves sperm motility and plays a key role in DNA protection because mature spermatozoa are deprived of repair mechanisms [133].

DNA methylation profiles has been impaired in 46% of oligozoospermic patients [134]. Hypomethylation of *H19*, a paternally imprinted gene, has been observed almost a year after the first day of initial treatment in one patient diagnosed for anaplastic oligodendroglioma [135]. Following the administration of cancer drugs, a reduced expression of DNA methyltransferases and disrupted DNA methylation patterns has been reported in rodent spermatozoa [136,137]. Hypomethylation on cytosine-guanine dinucleotide regions is the most frequent change observed after doxorubicin treatment. Therefore, the DNA methylation status of these regions could be used for the early diagnosis of testicular toxicity [137]. Several studies have shown that maintenance of DNA methylation is required to ensure the successful development of male germ cells and embryos in rodent models [138–140]. Despite erasure of epigenetic signatures during developmental reprogramming, some paternal epigenetic aberrations induced by anticancer treatments persist and could affect the offspring's development [141].

3.2.3. Effects of Chemotherapy on Cancer Survivors' Offspring

The epidemiological data concerning the impact of paternal exposure to chemotherapy on the progeny are limited. A recent study performed on a large number of treated patients has shown a decreased likelihood of becoming a father, which depended on the location of the tumour, age, and the delay since diagnosis, compared with the background population [65]. In this study, it appears that chemotherapeutic treatments influence the birth rates (i.e., number of live child births), but not the mortality rates (i.e., offspring death after birth) [65]. The transmission of genetic damages to the children of cancer survivors was mainly studied by investigating congenital anomalies. It seemed that no increased risk of congenital anomalies has been observed among children parented by male cancer survivors in comparison with the offspring born from parents with no history of cancer [142]. Moreover, whole genome sequencing of germline, used to identify *de novo* alterations, reported no increase in *de novo* genetic events in children born after or before paternal exposure to chemotherapy [143]. However, this study is limited to two families, and thus needs to be confirmed on a larger cohort of patients.

Numerous data concerning the effects of paternal exposure to chemotherapy on the progeny are available in rodent models [70]. The experimental data report that anticancer drugs used separately or in

combination result in increased preimplantation and postimplantation losses [110–112,144]. Disruption of zygotic gene activation has been found in embryo sired by a father treated by cyclophosphamide. This disruption of zygotic gene expression disturbs the kinetics of embryonic development and could explain the losses of early embryos fathered by males treated by alkylating agents [145]. In addition to embryo losses, studies performed in rats have shown a rise in postnatal mortality in litters descended from cyclophosphamide-treated fathers and grandfathers [146,147]. Moreover, one- to two-week cisplatin treatment was sufficient to induce growth retardations in the offspring sired by treated males. Although the risk of congenital anomalies was low, external malformations, such as omphalocele and micrognathia, were observed seven to nine weeks after paternal exposure [147]. In addition, cisplatin has long-term adverse effects on rat male and female reproductive development. The female offspring displayed a decrease in the number of germ cells in foetal ovaries, a decline of serum concentration of FSH, and dysregulation in the estrous cyclicity at adulthood. However, puberty onset, sexual behaviour, and fertility were not affected by paternal exposure to cisplatin [148]. Moreover, paternal exposure to cisplatin during peri-puberty influenced the timing of testicular descent, epididymal sperm counts, and testicular histology in the rat male offspring. It is important to point out that testicular histological alterations (Sertoli cell vacuolization, germ cell loss and multinucleate giant cell formation) observed in the adult offspring sired by treated males were similar to those seen in male rats treated directly with cisplatin [149].

Very few studies have investigated the F2 offspring sired by a grandfather treated by anticancer drugs. As observed for F1 offspring, pioneering studies have demonstrated that the increases in postimplantation losses, postnatal mortality rates, and number of malformed foetuses were also observed in the second generation [146,150]. A diminished learning capacity and spontaneous activity were evidenced in the F2 generation [151]. Because the males and females fathered by the alkylating agent-treated male were mated together in these studies, it cannot be concluded whether the mother, the father, or both transmitted chemotherapy effects. A more recent study demonstrated that anticancer drugs, other than alkylating agents, have affected reproductive parameters such as testis weight and seminiferous epithelium (vorinostat) in F2 and sperm vitality in F3 (vorinostat and decitabine), but did not affect the fertility of the F2 and F3 progeny. Sperm DNA methylation patterns of a few genes were affected in the F2 and F3 offspring after father's treatment [152].

Although few studies are available, experimental data have reported a possible transgenerational transmission of the effects of paternal chemotherapy exposure on offspring, which needs to be investigated.

4. Conclusions

Infertility is one of the potential adverse side effects of cancer treatments. Epidemiological and experimental studies are numerous and clearly describe the risk of infertility after anticancer treatment, especially in men who have been diagnosed in adulthood. Recent studies have raised awareness of the sensitivity of the immature testicular tissue to chemotherapy exposure and an increased risk of infertility in adult men treated during childhood compared with the overall population. This review highlighted the limited data available on the impact of chemotherapy exposure before puberty, especially with regard to the impact on somatic cells, interstitial tissue, and sperm quality in both human (Figure 1 [8,10,11,22,23,31–34,40,42,58,61,64–68,71,72,75,78,88,99–106,114,115,117–120,123,124,133,134,141]) and animal models (Figure 2 [24–30,43,46–48,52,53,55,56,62,77,81,83,89,96–98,108–111,121,125,126,129–131,135,136,143–149,151]).

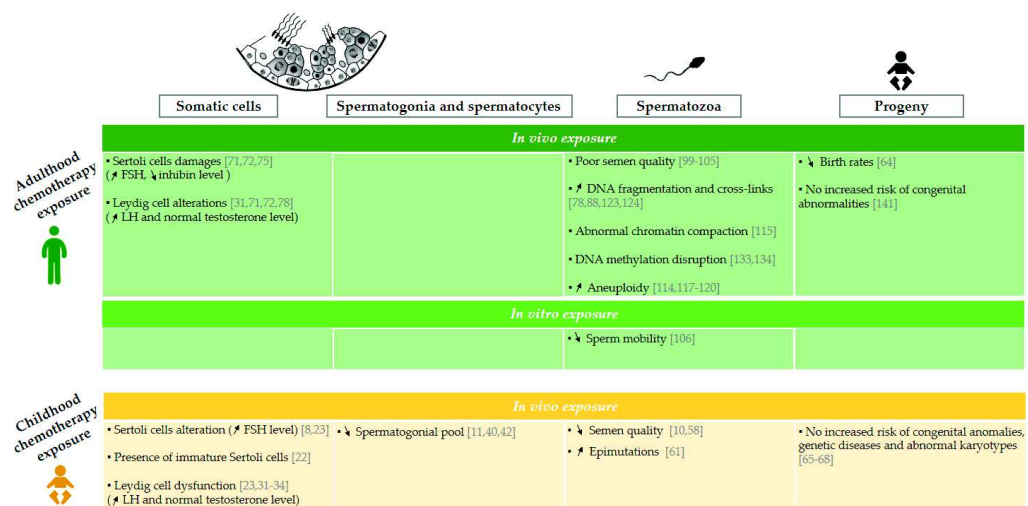


Figure 1. Effects of chemotherapy exposure during adulthood and childhood on men fertility. Schematic representation of epidemiological data available on the impact of the administration of chemotherapy on somatic cells [8,22,23,31–34,71,72,75,78], spermatogonia and spermatocytes [10,40,42], spermatozoa [10,58,61,78,88,99–106,114,115,117–120,123,124,133,134], and progeny [64–68,141] following chemotherapy administration during childhood and adulthood. “Childhood chemotherapy exposure” is defined as the administration of cancer treatment during infancy and adolescence period too. The arrows ↗ and ↘ indicate an increase and a decrease respectively. FSH: follicle stimulating hormone, LH: luteinizing hormone, SSC: spermatogonial stem cell.

	Somatic cells	Spermatogonia and spermatocytes	Spermatozoa	Progeny
Adulthood chemotherapy exposure	In vivo exposure			
	<ul style="list-style-type: none"> • Disruption of protein expression in Sertoli cells (mice) [77] • ↗ Oxidative stress in Leydig cells (rat) [81] • Inhibition of the transcription of genes encoding steroidogenic enzymes (rat) [81] • Nuclear fragmentation and ↘ myoid cells number [53] 	<ul style="list-style-type: none"> • ↘ SSCs number and activity (rat) [89] • ↗ Apoptosis in spermatogonia and spermatocytes (rat) [96] • ↗ DNA damages and aneuploidy in spermatocytes (mice, rat) [96] • ↗ Oxidative stress in round spermatids (mice) [97] 	<ul style="list-style-type: none"> • Poor semen quality (mice, rat) [108-111] • ↗ DNA damages (strand breaks, cross-links) (rat) [110,125,126] • Abnormal chromatin compaction (rat) [129-131] • DNA methylation disruption (mice, rat) [135,136] • ↗ Aneuploidy (mice) [98,121] 	<ul style="list-style-type: none"> • ↗ Postnatal mortality (rat) [145,146] • ↗ Pre and post implantation losses (mice, rat) [109-111,143,144,149] • Growth retardations and congenital abnormalities (rat) [146,149] • Sperm DNA methylation disruption (mice) [151] • Adverse effects on male and female reproductive development (rat) [147,148]
	In vitro exposure			
			<ul style="list-style-type: none"> • ↗ DNA strand breaks (rat) [52] 	
Childhood chemotherapy exposure	In vivo exposure			
	<ul style="list-style-type: none"> • Morphological, functional and nuclear alterations of Sertoli cells [36,27] (rat: 15 dpp, 22 dpp, 25 to 32 dpp) • ↘ ABP and transferrin production [28,29] (rat: 10 and 25 dpp) 	<ul style="list-style-type: none"> • ↘ Spermatogonial pool [43,47,48] (newborn mice, rat: 5 dpp, 30 to 60 dpp) • ↘ Spermatocytes (rat: 25 dpp) [55] 	<ul style="list-style-type: none"> • ↘ Semen quality (mice: 14 dpp) [62] • Chromatin compaction disruption (mice: 14 dpp) [62] • ↗ DNA strand breaks (rat: 30 dpp) [56] 	<ul style="list-style-type: none"> • ↘ Litter size (rat: 25 dpp) [55]
	In vitro exposure			
	<ul style="list-style-type: none"> • No change in Sertoli cell number (rat) [24,25] • ↗ Oxidative stress in Sertoli cells (rat) [26] • No Leydig and myoid cell damages (rat, mice) [24,30] 	<ul style="list-style-type: none"> • ↘ Spermatogonial pool (rat, mice) [24,46] • ↗ DNA breaks in SSCs and spermatogonia (rat, mice) [24,53] • ↗ Telomeric DNA damages in spermatogonia (mice) [53] 		

Figure 2. Effects of chemotherapy exposure during adulthood and childhood on male fertility in an animal model. Schematic representation of experimental data available on the impact of the administration of chemotherapy on somatic cells [24–30,77,81,83], spermatogonia and spermatocytes [24,43,46–48,52,53,55,89,96–98], spermatozoa [56,62,98,108–111,125,126,129–131,135,136] and progeny [55,109–111,143–149,151] following chemotherapy administration during childhood and adulthood. Animal species and the age at which the chemotherapy treatments achieved are specified in parentheses. The arrows ↗ and ↘ indicate an increase and a decrease respectively. ABP: androgen binding protein, SSC: spermatogonial stem cell, dpp: day post-partum.

Most of the studies defined “childhood chemotherapy exposure” as the administration of cancer treatment during infancy and adolescence, and only four studies investigated the consequences of exposure before the first wave of spermatogenesis in rodents. The classification of chemotherapy molecules according to their low, moderate, or high risk on fertility remained questionable because it appeared difficult to identify the risk of each molecule, as they are often administered in combination. Moreover, most of these data are deduced from adult studies and may not be applicable to prepubertal testis. In this way, it is necessary to conduct further *in vivo* and *in vitro* studies on humans and animal models. Studies on animal models are a good way to investigate the mechanism of action of chemotherapy molecules as well as they are administered alone or in combination. In rodents, the most frequently studied treatments are MOPP for treatment of Hodgkin’s disease, CHOP for non-Hodgkin’s lymphoma, and BEP for testicular cancer, but to the best of our knowledge, no studies have examined combined treatment used for leukemias yet—the most common childhood cancer.

Although cancer treatments are improving to reduce side effects, fertility preservation procedures are still needed in males of all ages [153]. For postpubertal males producing sperm, sperm cryopreservation represents an easy and efficient fertility preservation method. However, for prepubertal boys, sperm collection is impossible and fertility preservation can be considered using testicular tissue freezing. Several experimental methods could be envisaged to use frozen-thawed immature testicular tissue in order to produce spermatozoa that can be used in assisted reproductive techniques: (i) *in vitro* maturation of SSCs (*in vitro* spermatogenesis); (ii) *in vivo* maturation of SSCs in the patient after autologous SSC transplantation or testicular tissue grafting; and possibly (iii) *in vivo* maturation of SSCs in animals after xeno-transplantation or testicular tissue grafting [154,155]. Although some methods, such as testicular tissue grafting, are encouraging, they will remain limited to certain types of cancer patients, with a low risk of locating tumour cells at the testicular level. Thus, *in vitro* spermatogenesis appears to be the most appropriate approach to avoid the potential risk of reintroducing tumour cells in the cured patient. The three-dimensional cell culture and the organotypic culture have been shown to support the differentiation of spermatogonia into spermatozoa in the rat and mouse model [156–159]. Moreover, the generation of sperm-like cells has been reported in 3D cell culture from spermatogonial cells of busulfan-treated mice [160]. Today, only the organotypic culture allows to produce mature spermatozoa and generate a healthy offspring by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in mice [158,161]. In humans, studies are still limited and demonstrated a maturation arrest at the post-meiotic stage after 3D culture and organotypic culture from prepubertal and pubertal testicular tissue of cancer patient who has or has not received gonadotoxic treatment [162–165]. These data may pave the way for future studies aimed to optimise the conditions for *in vitro* maturation of frozen-thawed testicular tissue for future use in fertility preservation strategies. Alternatively, less invasive methods are also in the experimental phase of development such as the administration of cytoprotective agent concomitantly to cancer treatment regimen or the miRNA replacement approaches to prevent chemotherapeutic damages [57,92,166–169].

Therefore, further research on the impact of chemotherapy on long-term spermatogenesis progression and maintenance, gamete quality, fertility, and progeny is urgently required. These data will help to better inform the paediatric cancer patients about the risks of chemotherapy for their future fertility and to propose fertility preservation options.

Author Contributions: Conceptualization, M.D. and C.R.; methodology, M.D. and N.R.; writing—original draft preparation, M.D.; writing—review and editing, M.D., J.S., A.R., L.D., C.R., and N.R.; supervision, N.R.; project administration, N.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by PhD grant from Région Normandie and Ligue Nationale Contre le Cancer (to M.D.).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

MOPP	Mechlorethamine, Vincristine, Procarbazine, and Prednisone
ABVD	Adriamycin, Bleomycin, Vinblastine, and Dacarbazine
CHOP	Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisolone
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
SSCs	Spermatogonial Stem Cells
FSH	Follicle Stimulating Hormone
ABP	Androgen Binding Protein
LH	Luteinizing Hormone
γH2AX	γ Histone 2AX
dpp	day post-partum
CED	Cyclophosphamide Equivalent Dose
BEP	Bleomycin, Etoposide, and cisPlatin
CYP19A1	Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1
AMH	Anti-Müllerian Hormone
CDKN1a	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1a
ROS	Reactive Oxygen Species
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
ABV	Adriamycin, Bleomycin, and Vinblastine
MOPP-ABV	Mechlorethamine, Vincristine, Procarbazine, Prednisone-Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastine
TUNEL	TdT-Mediated dUTP Nickend Labelling Assay
BRDT	Testis-Specific Bromodomain-Protein
H3K9me	Histone H3 Monomethylated On Lysine 9
H2B	Histone 2B
H3	Histone 3
H4	Histone 4
H19D	Histone 19
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection

References

- DeSantis, C.E.; Lin, C.C.; Mariotto, A.B.; Siegel, R.L.; Stein, K.D.; Kramer, J.L.; Alteri, R.; Robbins, A.S.; Jemal, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* **2014**, *64*, 252–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Steliarova-Foucher, E.; Colombet, M.; Ries, L.A.G.; Moreno, F.; Dolya, A.; Bray, F.; Hesselting, P.; Shin, H.Y.; Stiller, C.A. IICC-3 contributors International incidence of childhood cancer, 2001–2010: A population-based registry study. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 719–731. [[CrossRef](#)]
- Desandes, E.; Lacour, B.; Clavel, J. Les cancers des adolescents et des jeunes patients: Vision épidémiologique et organisations des soins en France. *Bull. Du Cancer* **2016**, *103*, 957–965. [[CrossRef](#)]
- Lacour, B.; Guyot-Goubin, A.; Guissou, S.; Bellec, S.; Désandes, E.; Clavel, J. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000–2004. *Eur. J. Cancer Prev.* **2010**, *19*, 173–181. [[CrossRef](#)]
- Benedict, C.; Shuk, E.; Ford, J. Fertility Issues in Adolescent and Young Adult Cancer Survivors. *J. Adolesc. Young Adult Oncol.* **2016**, *5*, 48–57. [[CrossRef](#)]
- Brougham, M.F.H.; Wallace, W.H.B. Subfertility in children and young people treated for solid and haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* **2005**, *131*, 143–155. [[CrossRef](#)]
- Wasilewski-Masker, K.; Seidel, K.D.; Leisenring, W.; Mertens, A.C.; Shnorhavorian, M.; Ritenour, C.W.; Stovall, M.; Green, D.M.; Sklar, C.A.; Armstrong, G.T.; et al. Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: A report from the childhood cancer survivor study. *J. Cancer Surviv.* **2014**, *8*, 437–447. [[CrossRef](#)]
- van Casteren, N.J.; van der Linden, G.H.M.; Hakvoort-Cammel, F.G.A.J.; Hählen, K.; Dohle, G.R.; van den Heuvel-Eibrink, M.M. Effect of childhood cancer treatment on fertility markers in adult male long-term survivors. *Pediatr. Blood Cancer* **2009**, *52*, 108–112. [[CrossRef](#)]

9. Kenney, L.B.; Laufer, M.R.; Grant, F.D.; Grier, H.; Diller, L. High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer* **2001**, *91*, 613–621. [[CrossRef](#)]
10. Green, D.M.; Liu, W.; Kutteh, W.H.; Ke, R.W.; Shelton, K.C.; Sklar, C.A.; Chemaitilly, W.; Pui, C.-H.; Klosky, J.L.; Spunt, S.L.; et al. Cumulative alkylating agent exposure and semen parameters in adult survivors of childhood cancer: A report from the St Jude Lifetime Cohort Study. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1215–1223. [[CrossRef](#)]
11. Poganitsch-Korhonen, M.; Masliukaite, I.; Nurmio, M.; Lähteenmäki, P.; van Wely, M.; van Pelt, A.M.M.; Jahnukainen, K.; Stukenborg, J.-B. Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. *Leukemia* **2017**, *31*, 1460–1463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lee, S.J.; Schover, L.R.; Partridge, A.H.; Patrizio, P.; Wallace, W.H.; Hagerty, K.; Beck, L.N.; Brennan, L.V.; Oktay, K. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients. *JCO* **2006**, *24*, 2917–2931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wyns, C.; Curaba, M.; Vanabelle, B.; Van Langendonck, A.; Donnez, J. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum. Reprod. Updat.* **2010**, *16*, 312–328. [[CrossRef](#)]
14. Allen, M.; Lopes, F.; Mitchell, R.T.; Spears, N. How does chemotherapy treatment damage the prepubertal testis? *Reproduction* **2018**, *156*, R209–R233. [[CrossRef](#)]
15. Jahnukainen, K.; Ehmcke, J.; Hou, M.; Schlatt, S. Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *25*, 287–302. [[CrossRef](#)]
16. Heinrich, A.; DeFalco, T. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrologia* **2019**. [[CrossRef](#)]
17. Clermont, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* **1972**, *52*, 198–236. [[CrossRef](#)]
18. Clermont, Y. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Am. J. Anat.* **1969**, *126*, 57–71. [[CrossRef](#)]
19. Kanatsu-Shinohara, M.; Shinohara, T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2013**, *29*, 163–187. [[CrossRef](#)]
20. Chemes, H.E. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int. J. Androl.* **2001**, *24*, 2–7. [[CrossRef](#)]
21. Stukenborg, J.-B.; Jahnukainen, K.; Hutka, M.; Mitchell, R.T. Cancer treatment in childhood and testicular function: The importance of the somatic environment. *Endocr. Connect.* **2018**, *7*, R69–R87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Maymon, B.B.-S.; Yogev, L.; Marks, A.; Hauser, R.; Botchan, A.; Yavetz, H. Sertoli cell inactivation by cytotoxic damage to the human testis after cancer chemotherapy. *Fertil. Steril.* **2004**, *81*, 1391–1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Brämwig, J.H.; Heimes, U.; Heiermann, E.; Schlegel, W.; Nieschlag, E.; Schellong, G. The effects of different cumulative doses of chemotherapy on testicular function. Results in 75 patients treated for Hodgkin's disease during childhood or adolescence. *Cancer* **1990**, *65*, 1298–1302. [[CrossRef](#)]
24. Smart, E.; Lopes, F.; Rice, S.; Nagy, B.; Anderson, R.; Mitchell, R.; Spears, N. Chemotherapy drugs cyclophosphamide, cisplatin and doxorubicin induce germ cell loss in an in vitro model of the prepubertal testis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1773. [[CrossRef](#)]
25. Aslani, F.; Sebastian, T.; Keidel, M.; Fröhlich, S.; Elsässer, H.-P.; Schuppe, H.-C.; Klug, J.; Mahavadi, P.; Fijak, M.; Bergmann, M.; et al. Resistance to apoptosis and autophagy leads to enhanced survival in Sertoli cells. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* **2017**, *23*, 370–380. [[CrossRef](#)]
26. Tremblay, A.R.; Delbes, G. In vitro study of doxorubicin-induced oxidative stress in spermatogonia and immature sertoli cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *348*, 32–42. [[CrossRef](#)]
27. Brillhante, O.; Okada, F.K.; Sasso-Cerri, E.; Stumpp, T.; Miraglia, S.M. Late morphofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2012**, *10*, 79. [[CrossRef](#)]
28. Stumpp, T.; Freymuller, E.; Miraglia, S.M. Sertoli cell morphological alterations in albino rats treated with etoposide during prepubertal phase. *Microsc. Microanal.* **2008**, *14*, 225–235. [[CrossRef](#)]
29. Velez de la Calle, J.F.; Soufir, J.C.; Chodorge, F.; Boisseau, C.; Kercret, H.; Jegou, B. Reproductive effects of the anti-cancer drug procarbazine in male rats at different ages. *J. Reprod. Fertil.* **1988**, *84*, 51–61. [[CrossRef](#)]

30. Stumpp, T.; Freymüller, E.; Miraglia, S.M. Sertoli cell function in albino rats treated with etoposide during prepubertal phase. *Histochem. Cell. Biol.* **2006**, *126*, 353–361. [[CrossRef](#)]
31. Nurmio, M.; Toppari, J.; Kallio, J.; Hou, M.; Söder, O.; Jahnukainen, K. Functional in vitro model to examine cancer therapy cytotoxicity in maturing rat testis. *Reprod. Toxicol.* **2009**, *27*, 28–34. [[CrossRef](#)]
32. Gerl, A.; Mühlbayer, D.; Hansmann, G.; Mraz, W.; Hiddemann, W. The impact of chemotherapy on Leydig cell function in long term survivors of germ cell tumors. *Cancer* **2001**, *91*, 1297–1303. [[CrossRef](#)]
33. Heikens, J.; Behrendt, H.; Adriaanse, R.; Berghout, A. Irreversible gonadal damage in male survivors of pediatric Hodgkin's disease. *Cancer* **1996**, *78*, 2020–2024. [[CrossRef](#)]
34. Gerres, L.; Brämswig, J.H.; Schlegel, W.; Jürgens, H.; Schellong, G. The effects of etoposide on testicular function in boys treated for Hodgkin's disease. *Cancer* **1998**, *83*, 2217–2222. [[CrossRef](#)]
35. Talbot, J.A.; Shalet, S.M.; Tsatsoulis, A.; Grabinski, M.; Robertson, W.R. Luteinizing hormone pulsatility in men with damage to the germinal epithelium. *Int. J. Androl.* **1990**, *13*, 223–231. [[CrossRef](#)]
36. Isaksson, S.; Bogefors, K.; Ståhl, O.; Eberhard, J.; Giwercman, Y.L.; Leijonhufvud, I.; Link, K.; Øra, I.; Romerius, P.; Bobjer, J.; et al. High risk of hypogonadism in young male cancer survivors. *Clin. Endocrinol.* **2018**, *88*, 432–441. [[CrossRef](#)]
37. Pietila, S.; Mäkipernaa, A.; Koivisto, A.; Lenko, H. Growth impairment and gonadal axis abnormalities are common in survivors of paediatric brain tumours. *Acta Paediatr.* **2017**, *106*, 1684–1693. [[CrossRef](#)]
38. Rafsanjani, K.A.; Faranoush, M.; Hedayatiasl, A.A.; Vossough, P. Gonadal function and fertility in male survivors treated for Hodgkin's disease in Iran. *Saudi Med. J.* **2007**, *28*, 1690–1693.
39. Hensle, T.; Burbige, K.; Shepard, B.; Marboe, C.; Blanc, W.; Wigger, J. Chemotherapy and its effect on testicular morphology in children. *J. Urol.* **1984**, *131*, 1142–1144. [[CrossRef](#)]
40. Hyman, L.; Gilbert, E. Testicular atrophy in a prepubescent male after cyclophosphamide therapy. *Lancet* **1972**, *2*, 426–427. [[CrossRef](#)]
41. Stukenborg, J.; Alves-Lopes, J.; Kurek, M.; Albalushi, H.; Reda, A.; Keros, V.; Töhönen, V.; Bjarnason, R.; Romerius, P.; Sundin, M.; et al. Spermatogonial quantity in human prepubertal testicular tissue collected for fertility preservation prior to potentially sterilizing therapy. *Hum. Reprod.* **2018**, *33*, 1677–1683. [[CrossRef](#)]
42. Meistrich, M.L. Relationship between spermatogonial stem cell survival and testis function after cytotoxic therapy. *Br. J. Cancer Suppl.* **1986**, *7*, 89–101.
43. Nurmio, M.; Keros, V.; Lähtenmäki, P.; Salmi, T.; Kallajoki, M.; Jahnukainen, K. Effect of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy on Spermatogonia Populations and Future Fertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 2119–2122. [[CrossRef](#)]
44. Freitas, F.E.L.; Cordeiro-mori, F.; Sasso-Cerri, E.; Lucas, S.R.R.; Miraglia, S.M. Alterations of spermatogenesis in etoposide-treated rats: A stereological study. *Interciencia* **2002**, *27*, 227–235.
45. Clermont, Y.; Perey, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* **1957**, *100*, 241–267. [[CrossRef](#)]
46. Drumond, A.L.; Meistrich, M.L.; Chiarini-Garcia, H. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: A high-resolution light microscopy approach. *Reproduction* **2011**, *142*, 145–155. [[CrossRef](#)]
47. Lopes, F.; Smith, R.; Nash, S.; Mitchell, R.T.; Spears, N. Irinotecan metabolite SN38 results in germ cell loss in the testis but not in the ovary of prepubertal mice. *Mol. Hum. Reprod.* **2016**, *22*, 745–755. [[CrossRef](#)]
48. Basciani, S.; De Luca, G.; Dolci, S.; Brama, M.; Arizzi, M.; Mariani, S.; Rosano, G.; Spera, G.; Gnassi, L. Platelet-Derived Growth Factor Receptor β -Subtype Regulates Proliferation and Migration of Gonocytes. *Endocrinology* **2008**, *149*, 6226–6235. [[CrossRef](#)]
49. Nurmio, M.; Toppari, J.; Zaman, F.; Andersson, A.-M.; Paranko, J.; Söder, O.; Jahnukainen, K. Inhibition of tyrosine kinases PDGFR and C-Kit by imatinib mesylate interferes with postnatal testicular development in the rat. *Int. J. Androl.* **2007**, *30*, 366–376. [[CrossRef](#)]
50. Culty, M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **2009**, *87*, 1–26. [[CrossRef](#)]
51. Huckins, C.; Clermont, Y. Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and early post-natal life. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* **1968**, *51*, 341–354. [[PubMed](#)]
52. Heim, C.; Minniear, K.; Dann, C.T. Imatinib has deleterious effects on differentiating spermatogonia while sparing spermatogonial stem cell self renewal. *Reprod. Toxicol.* **2011**, *31*, 454–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Beaud, H.; van Pelt, A.; Delbes, G. Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia. *Reproduction* **2017**, *153*, 725–735. [[CrossRef](#)]
54. Liu, M.; Hales, B.F.; Robaire, B. Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line. *Biol. Reprod.* **2014**, *90*, 72. [[CrossRef](#)]
55. de Lange, T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **2002**, *21*, 532–540. [[CrossRef](#)]
56. Stumpp, T.; Sasso-Cerri, E.; Freymuller, E.; Miraglia, S. Apoptosis and testicular alterations in albino rats treated with etoposide during the prepubertal phase. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **2004**, *279*, 611–622. [[CrossRef](#)]
57. Vendramini, V.; Robaire, B.; Miraglia, S.M. Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 2457–2466. [[CrossRef](#)]
58. Green, D.M.; Nolan, V.G.; Goodman, P.J.; Whitton, J.A.; Srivastava, D.; Leisenring, W.M.; Neglia, J.P.; Sklar, C.A.; Kaste, S.C.; Hudson, M.M.; et al. The cyclophosphamide equivalent dose as an approach for quantifying alkylating agent exposure: A report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Pediatr. Blood Cancer* **2014**, *61*, 53–67. [[CrossRef](#)]
59. Romerius, P.; Ståhl, O.; Moëll, C.; Relander, T.; Cavallin Ståhl, E.; Wiebe, T.; Giwercman, Y.L.; Giwercman, A. High risk of azoospermia in men treated for childhood cancer. *Int. J. Androl.* **2011**, *34*, 69–76. [[CrossRef](#)]
60. Romerius, P.; Stahl, O.; Moell, C.; Relander, T.; Cavallin-Stahl, E.; Gustafsson, H.; Lofvander Thapper, K.; Jepsen, K.; Spano, M.; Wiebe, T.; et al. Sperm DNA Integrity in Men Treated for Childhood Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 3843–3850. [[CrossRef](#)]
61. Thomson, A.; Campbell, A.; Irvine, D.; Anderson, R.; Kelnar, C.J.; Wallace, W.H. Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: A case-control study. *Lancet* **2002**, *360*, 361–367. [[CrossRef](#)]
62. Shnorhavorian, M.; Schwartz, S.M.; Stansfeld, B.; Sadler-Riggelman, I.; Beck, D.; Skinner, M.K. Differential DNA Methylation Regions in Adult Human Sperm following Adolescent Chemotherapy: Potential for Epigenetic Inheritance. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Nayak, G.; Vadinkar, A.; Nair, S.; Kalthur, S.; D'Souza, A.; Shetty, P.; Mutalik, S.; Shetty, M.; Kalthur, G.; Adiga, S. Sperm abnormalities induced by pre-pubertal exposure to cyclophosphamide are effectively mitigated by Moringa oleifera leaf extract. *Andrologia* **2016**, *48*, 125–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Chow, E.J.; Stratton, K.L.; Leisenring, W.M.; Oeffinger, K.C.; Sklar, C.A.; Donaldson, S.S.; Ginsberg, J.P.; Kenney, L.B.; Levine, J.M.; Robison, L.L.; et al. Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: A report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 567–576. [[CrossRef](#)]
65. Tang, S.-W.; Liu, J.; Juay, L.; Czene, K.; Miao, H.; Salim, A.; Verkooijen, H.M.; Hartman, M. Birth rates among male cancer survivors and mortality rates among their offspring: A population-based study from Sweden. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 196. [[CrossRef](#)]
66. Meistrich, M.L.; Byrne, J. Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer treated with potentially mutagenic therapies. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *70*, 1069–1071. [[CrossRef](#)]
67. Seppänen, V.; Artama, M.; Malila, N.; Pitkaniemi, J.; Rantanen, M.; Ritvanen, A.; Madanat-Harjuoja, L. Risk for congenital anomalies in offspring of childhood, adolescent and young adult cancer survivors. *Int. J. Cancer* **2016**, *139*, 1721–1730. [[CrossRef](#)]
68. Signorello, L.B.; Mulvihill, J.J.; Green, D.M.; Munro, H.M.; Stovall, M.; Weathers, R.E.; Mertens, A.C.; Whitton, J.A.; Robison, L.L.; Boice, J.D. Congenital anomalies in the children of cancer survivors: A report from the childhood cancer survivor study. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 239–245. [[CrossRef](#)]
69. Winther, J.; Boice, J.J.; Christensen, J.; Frederiksen, K.; Mulvihill, J.J.; Stovall, M.; Olsen, J. Hospitalizations among children of survivors of childhood and adolescent cancer: A population-based cohort study. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 2879–2887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Tremblay, A.; Beaud, H.; Delbès, G. Effets transgénérationnels des chimiothérapies: l'exposition du père influence-t-elle la santé des générations futures ? *Gynécologie Obstétrique Fertilité Sénologie* **2017**, *45*, 609–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Liu, L.; Blasco, M.; Trimarchi, J.; Keefe, D. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev. Biol.* **2002**, *249*, 74–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

72. Remená, E.; Számel, I.; Budai, B.; Vincze, B.; Gaudi, I.; Gundy, S.; Kásler, M. Increase of hypophyseal hormone levels in male head and neck cancer patients. *Pathol. Oncol. Res.* **2007**, *13*, 341–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Spermon, J.; Ramos, L.; Wetzels, A.; Sweep, C.; Braat, D.; Kiemeney, L.; Witjes, J. Sperm integrity pre- and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Hum. Reprod.* **2006**, *21*, 1781–1786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Giagulli, V.A.; Vermeulen, A. Leydig cell function in infertile men with idiopathic oligospermic infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1988**, *66*, 62–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Franchimont, P.; Millet, D.; Vendrely, E.; Letawe, J.; Legros, J.J.; Netter, A. Relationship between Spermatogenesis and Serum Gonadotropin Levels in Azoospermia and Oligospermia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1972**, *34*, 1003–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Tsatsoulis, A.; Shalet, S.M.; Morris, I.D.; de Kretser, D.M. Immunoactive Inhibin as a Marker of Sertoli Cell Function following Cytotoxic Damage to the Human Testis. *HRP* **1990**, *34*, 254–259. [[CrossRef](#)]
77. Wallace, E.M.; Groome, N.P.; Riley, S.C.; Parker, A.C.; Wu, F.C.W. Effects of Chemotherapy-Induced Testicular Damage on Inhibin, Gonadotropin, and Testosterone Secretion: A Prospective Longitudinal Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 3111–3115. [[CrossRef](#)]
78. Cao, Y.; Wang, X.; Li, S.; Wang, H.; Yu, L.; Wang, P. The Effects of L-Carnitine Against Cyclophosphamide-Induced Injuries in Mouse Testis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *120*, 152–158. [[CrossRef](#)]
79. Howell, S.J.; Radford, J.A.; Ryder, W.D.J.; Shalet, S.M. Testicular Function After Cytotoxic Chemotherapy: Evidence of Leydig Cell Insufficiency. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 1493–1498. [[CrossRef](#)]
80. Setchell, B.; Galil, K. Limitations imposed by testicular blood flow on the function of Leydig cells in rats in vivo. *Aust. J. Biol. Sci.* **1983**, *36*, 285–293. [[CrossRef](#)]
81. Howell, S.J.; Shalet, S.M. Testicular function following chemotherapy. *Hum. Reprod. Updat.* **2001**, *7*, 363–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Al-Bader, M.; Kilarkaje, N. Effects of bleomycin, etoposide and cisplatin treatment on Leydig cell structure and transcription of steroidogenic enzymes in rat testis. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *747*, 150–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Mossadegh-Keller, N.; Sieweke, M.H. Testicular macrophages: Guardians of fertility. *Cell Immunol.* **2018**, *330*, 120–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Sasso-Cerri, E.; Oliveira, B.; de Santi, F.; Beltrame, F.L.; Caneguim, B.H.; Cerri, P.S. The antineoplastic busulphan impairs peritubular and Leydig cells, and vitamin B 12 stimulates spermatogonia proliferation and prevents busulphan-induced germ cell death. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *95*, 1619–1630. [[CrossRef](#)]
85. Levi, M.; Hasky, N.; Stemmer, S.M.; Shalgi, R.; Ben-Aharon, I. Anti-Müllerian Hormone Is a Marker for Chemotherapy-Induced Testicular Toxicity. *Endocrinology* **2015**, *156*, 3818–3827. [[CrossRef](#)]
86. Marchetti, C.; Hamdane, M.; Mitchell, V.; Mayo, K.; Devisme, L.; Rigot, J.M.; Beauvillain, J.C.; Hermand, E.; Defossez, A. Immunolocalization of Inhibin and Activin α and β Subunits and Expression of Corresponding Messenger RNAs in the Human Adult Testis. *Biol. Reprod.* **2003**, *68*, 230–235. [[CrossRef](#)]
87. Steger, K.; Rey, R.; Kliesch, S.; Louis, F.; Schleicher, G.; Bergmann, M. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: A preliminary study. *Int. J. Androl.* **1996**, *19*, 122–128. [[CrossRef](#)]
88. Peigné, M.; Decanter, C. Serum AMH level as a marker of acute and long-term effects of chemotherapy on the ovarian follicular content: A systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2014**, *12*, 26. [[CrossRef](#)]
89. O’Flaherty, C.; Hales, B.F.; Chan, P.; Robaire, B. Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or Hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil. Steril.* **2010**, *94*, 1374–1379. [[CrossRef](#)]
90. Marcon, L.; Zhang, X.; Hales, B.F.; Robaire, B.; Nagano, M.C. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem/progenitor cells. *J. Androl.* **2011**, *32*, 432–443. [[CrossRef](#)]
91. van Pelt, A.; Roepers-Gajadien, H.; Gademan, I.; Creemers, L.; de Rooij, D.; van Dissel-Emiliani, F. Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology* **2002**, *143*, 1845–1850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Kotzur, T.; Benavides-Garcia, R.; Mecklenburg, J.; Sanchez, J.R.; Reilly, M.; Hermann, B.P. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) promotes spermatogenic regeneration from surviving spermatogonia after high-dose alkylating chemotherapy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2017**, *15*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

93. Mohammadnejad, D.; Abedelahi, A.; Soleimani-rad, J.; Mohammadi-roshandeh, A.; Rashtbar, M.; Azami, A. Degenerative Effect of Cisplatin on Testicular Germinal Epithelium. *Adv. Pharm. Bull.* **2012**, *2*, 173–177. [[PubMed](#)]
94. Azab, S.S.; kamel, I.; Ismail, N.N.; El Din Hosni, H.; El Fatah, M.A. The defensive role of taurine against gonadotoxicity and testicular apoptosis effects induced by cisplatin in rats. *J. Infect. Chemother.* **2020**, *26*, 51–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Fouad, A.A.; Refaie, M.M.M.; Abdelghany, M.I. Naringenin palliates cisplatin and doxorubicin gonadal toxicity in male rats. *Toxicol. Mech. Methods* **2019**, *29*, 67–73. [[CrossRef](#)]
96. Yeh, Y.-C.; Lai, H.-C.; Ting, C.-T.; Lee, W.-L.; Wang, L.-C.; Wang, K.-Y.; Lai, H.-C.; Liu, T.-J. Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 969–980. [[CrossRef](#)]
97. Cai, L.; Hales, B.F.; Robaire, B. Induction of Apoptosis in the Germ Cells of Adult Male Rats after Exposure to Cyclophosphamide. *Biol. Reprod.* **1997**, *56*, 1490–1497. [[CrossRef](#)]
98. Delbès, G.; Chan, D.; Pakarinen, P.; Trasler, J.M.; Hales, B.F.; Robaire, B. Impact of the Chemotherapy Cocktail Used to Treat Testicular Cancer on the Gene Expression Profile of Germ Cells from Male Brown-Norway Rats. *Biol. Reprod.* **2009**, *80*, 320–327. [[CrossRef](#)]
99. Marchetti, F.; Bishop, J.B.; Lowe, X.; Generoso, W.M.; Hozier, J.; Wyrobek, A.J. Etoposide induces heritable chromosomal aberrations and aneuploidy during male meiosis in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3952–3957. [[CrossRef](#)]
100. Bahadur, G.; Ozturk, O.; Muneer, A.; Wafa, R.; Ashraf, A.; Jaman, N.; Patel, S.; Oyede, A.W.; Ralph, D.J. Semen quality before and after gonadotoxic treatment. *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 774–781. [[CrossRef](#)]
101. Paoli, D.; Rizzo, F.; Fiore, G.; Pallotti, F.; Pulsoni, A.; Annechini, G.; Lombardo, F.; Lenzi, A.; Gandini, L. Spermatogenesis in Hodgkin's lymphoma patients: A retrospective study of semen quality before and after different chemotherapy regimens. *Hum. Reprod.* **2016**, *31*, 263–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Bujan, L.; Walschaerts, M.; Moinard, N.; Hennebicq, S.; Saias, J.; Brugnon, F.; Auger, J.; Berthaut, I.; Szyman, E.; Daudin, M.; et al. Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA: A multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil. Steril.* **2013**, *100*, 673–680.e2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Meistrich, M.L.; Wilson, G.; Brown, B.W.; da Cunha, M.F.; Lipshultz, L.I. Impact of cyclophosphamide on long-term reduction in sperm count in men treated with combination chemotherapy for Ewing and soft tissue sarcomas. *Cancer* **1992**, *70*, 2703–2712. [[CrossRef](#)]
104. Chapman, R.M.; Sutcliffe, S.B.; Rees, L.H.; Edwards, C.R.; Malpas, J.S. Cyclical combination chemotherapy and gonadal function. Retrospective study in males. *Lancet* **1979**, *1*, 285–289. [[CrossRef](#)]
105. Marmor, D.; Duyck, F. Male reproductive potential after MOPP therapy for Hodgkin's disease: A long-term survey. *Andrologia* **1994**, *27*, 99–106. [[CrossRef](#)]
106. Tal, R.; Botchan, A.; Hauser, R.; Yogev, L.; Paz, G.; Yavetz, H. Follow-up of sperm concentration and motility in patients with lymphoma. *Hum. Reprod.* **2000**, *15*, 1985–1988. [[CrossRef](#)]
107. Hong, C.Y.; Chiang, B.N.; Ku, J.; Wu, P. Screening the in vitro Sperm-immobilizing Effect of some Anticancer Drugs. *Hum. Toxicol.* **1985**, *4*, 461–464. [[CrossRef](#)]
108. Calamera, J.C.; Morgenfeld, M.C.; Mancini, R.E.; Vilar, O. Biochemical Changes of the Human Semen Produced by Chlorambucil, Testosterone Propionate and Human Chorionic Gonadotropin Administration. *Andrologia* **1979**, *11*, 43–50. [[CrossRef](#)]
109. Bieber, A.M.; Marcon, L.; Hales, B.F.; Robaire, B. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *J. Androl.* **2006**, *27*, 189–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Kato, M.; Makino, S.; Kimura, H.; Ota, T.; Furuhashi, T.; Nagamura, Y. Sperm motion analysis in rats treated with adriamycin and its applicability to male reproductive toxicity studies. *J. Toxicol. Sci.* **2001**, *26*, 51–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Vaisheva, F.; Delbes, G.; Hales, B.F.; Robaire, B. Effects of the chemotherapeutic agents for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP), on the male rat reproductive system and progeny outcome. *J. Androl.* **2007**, *28*, 578–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Delbès, G.; Vaisheva, F.; Luu, T.; Marcon, L.; Hales, B.F.; Robaire, B. Reversibility of the effects of the chemotherapeutic regimen for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Reprod. Toxicol.* **2010**, *29*, 332–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

113. Beaud, H.; Tremblay, A.R.; Chan, P.T.K.; Delbes, G. Sperm DNA Damage in Cancer Patients. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1166*, 189–203.
114. Bujan, L.; Walschaerts, M.; Brugnon, F.; Daudin, M.; Berthaut, I.; Auger, J.; Saias, J.; Szerman, E.; Moinard, N.; Rives, N.; et al. Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: A multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 667–674. [[CrossRef](#)]
115. Rives, N.; Walschaerts, M.; Setif, V.; Hennebicq, S.; Saias, J.; Brugnon, F.; Auger, J.; Berthaut, I.; Szerman, E.; Daudin, M.; et al. Sperm aneuploidy after testicular cancer treatment: Data from a prospective multicenter study performed within the French Centre d'Étude et de Conservation des Oeufs et du Sperme network. *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 580–588. [[CrossRef](#)]
116. O'Flaherty, C.M.; Chan, P.T.; Hales, B.F.; Robaire, B. Sperm chromatin structure components are differentially repaired in cancer survivors. *J. Androl.* **2012**, *33*, 629–636. [[CrossRef](#)]
117. Meistrich, M.L. Risks of Genetic Damage in Offspring Conceived Using Sperm Produced during Chemotherapy or Radiotherapy. *Andrology* **2019**. [[CrossRef](#)]
118. Burrello, N.; Vicari, E.; Vignera, S.L.; Romeo, G.; Campagna, C.; Magro, E.; Giuffrida, D.; D'Agata, R.; Calogero, A.E. Effects of anti-neoplastic treatment on sperm aneuploidy rate in patients with testicular tumor: A longitudinal study. *J. Endocrinol. Investig.* **2011**, *34*, 121–125. [[CrossRef](#)]
119. De Mas, P.; Daudin, M.; Vincent, M.-C.; Bourrouillou, G.; Calvas, P.; Mieusset, R.; Bujan, L. Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumour patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. *Hum. Reprod.* **2001**, *16*, 1204–1208. [[CrossRef](#)]
120. Tempest, H.G.; Ko, E.; Chan, P.; Robaire, B.; Rademaker, A.; Martin, R.H. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum. Reprod.* **2008**, *23*, 251–258. [[CrossRef](#)]
121. Martinez, G.; Walschaerts, M.; Le Mitouard, M.; Borye, R.; Thomas, C.; Auger, J.; Berthaut, I.; Brugnon, F.; Daudin, M.; Moinard, N.; et al. Impact of Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma and their treatments on sperm aneuploidy: A prospective study by the French CECOS network. *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 341–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Marchetti, F.; Pearson, F.S.; Bishop, J.B.; Wyrobek, A.J. Etoposide induces chromosomal abnormalities in mouse spermatocytes and stem cell spermatogonia. *Hum. Reprod.* **2006**, *21*, 888–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Smit, M.; van Casteren, N.; Wildhagen, M.; Romijn, J.; Dohle, G. Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 1877–1883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. van Delft, J.H.M.; van den Ende, A.M.C.; Keizer, H.J.; Ouwkerk, J.; Baan, R.A. Determination of N7-methylguanine in DNA of white blood cells from cancer patients treated with dacarbazine. *Carcinogenesis* **1992**, *13*, 1257–1259. [[CrossRef](#)]
125. Stornetta, A.; Zimmermann, M.; Cimino, G.; Henderson, P.; Sturla, S. DNA Adducts from Anticancer Drugs as Candidate Predictive Markers for Precision Medicine. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30*, 388–409. [[CrossRef](#)]
126. Poirier, M.C.; Reed, E.; Litterst, C.L.; Katz, D.; Gupta-Burt, S. Persistence of platinum-amine-DNA adducts in gonads and kidneys of rats and multiple tissues from cancer patients. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 149–153.
127. Codrington, A.M.; Hales, B.F.; Robaire, B. Spermiogenic Germ Cell Phase—Specific DNA Damage Following Cyclophosphamide Exposure. *J. Androl.* **2014**, *25*, 354–362. [[CrossRef](#)]
128. Manicardi, G.C.; Tombacco, A.; Bizzaro, D.; Bianchi, U.; Bianchi, P.G.; Sakkas, D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: Comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem. J.* **1998**, *30*, 33–39. [[CrossRef](#)]
129. Sailer, B.L.; Jost, L.K.; Evenson, D.P. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J. Androl.* **1995**, *16*, 80–87.
130. Maselli, J.; Hales, B.F.; Chan, P.; Robaire, B. Exposure to Bleomycin, Etoposide, and Cis-Platinum Alters Rat Sperm Chromatin Integrity and Sperm Head Protein Profile. *Biol. Reprod.* **2012**, *86*, 1–10. [[CrossRef](#)]
131. Maselli, J.; Hales, B.F.; Robaire, B. The Effects of Chemotherapy with Bleomycin, Etoposide, and Cis-Platinum (BEP) on Rat Sperm Chromatin Remodeling, Fecundity and Testicular Gene Expression in the Progeny. *Biol. Reprod.* **2013**, *89*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Bagheri-Sereshti, N.; Hales, B.F.; Robaire, B. The Effects of Chemotherapeutic Agents, Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin, on Chromatin Remodeling in Male Rat Germ Cells. *Biol. Reprod.* **2016**, *94*, 81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

133. González-Marín, C.; Gosálvez, J.; Roy, R.; Types, C. Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 14026–14052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Marques, C.J.; Costa, P.; Vaz, B.; Carvalho, F.; Fernandes, S.; Barros, A.; Sousa, M. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.* **2008**, *14*, 67–74. [[CrossRef](#)]
135. Berthaut, I.; Montjean, D.; Dessolle, L.; Morcel, K.; Deluen, F.; Poirot, C.; Bashamboo, A.; Mcelreavey, K.; Ravel, C. Effect of temozolomide on male gametes: An epigenetic risk to the offspring? *J. Assist. Reprod. Genet.* **2013**, *30*, 827–833. [[CrossRef](#)]
136. Chan, D.; Delbès, G.; Landry, M.; Robaire, B.; Trasler, J.M. Epigenetic Alterations in Sperm DNA Associated with Testicular Cancer Treatment. *Toxicol. Sci.* **2012**, *125*, 532–543. [[CrossRef](#)]
137. Sakai, K.; Ideta-Otsuka, M.; Saito, H.; Hiradate, Y.; Hara, K.; Igarashi, K.; Tanemura, K. Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *498*, 674–679. [[CrossRef](#)]
138. Barton, T.S.; Robaire, B.; Hales, B.F. Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7865–7870. [[CrossRef](#)]
139. Kelly, T.L.J.; Li, E.; Trasler, J.M. 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Alterations in Murine Spermatogenesis and Pregnancy Outcome. *J. Androl.* **2003**, *24*, 822–830. [[CrossRef](#)]
140. La Salle, S.; Oakes, C.C.; Neaga, O.R.; Bourc'his, D.; Bestor, T.H.; Trasler, J.M. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Dev. Biol.* **2007**, *7*, 104. [[CrossRef](#)]
141. van Otterdijk, S.; Michels, K. Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: How good is the evidence? *FASEB J.* **2016**, *30*, 2457–2465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Stensheim, H.; Klungsoyr, K.; Skjaerven, R.; Grotmol, T.; Fosså, S. Birth outcomes among offspring of adult cancer survivors: A population-based study. *Int. J. Cancer* **2013**, *33*, 2696–2705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Kryukov, G.V.; Bielski, C.M.; Samocho, K.; Fromer, M.; Seepo, S.; Gentry, C.; Neale, B.; Garraway, L.A.; Sweeney, C.J.; Taplin, M.-E.; et al. Genetic Effect of Chemotherapy Exposure in Children of Testicular Cancer Survivors. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 2183–2189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Marcon, L.; Hales, B.F.; Robaire, B. Reversibility of the effects of subchronic exposure to the cancer chemotherapeutics bleomycin, etoposide, and cisplatin on spermatogenesis, fertility, and progeny outcome in the male rat. *J. Androl.* **2008**, *29*, 408–417. [[CrossRef](#)]
145. Harrouk, W.; Khatabaksh, S.; Robaire, B.; Hales, B.F. Paternal exposure to cyclophosphamide dysregulates the gene activation program in rat preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **2000**, *57*, 214–223. [[CrossRef](#)]
146. Auroux, M.R.; Dulioust, E.J.B.; Nawar, N.N.; Yacoub, S.G.; Mayaux, M.J.; Schwartz, D.; David, G. Antimitotic drugs in the male rat. Behavioral abnormalities in the second generation. *J. Androl.* **1988**, *9*, 153–159. [[CrossRef](#)]
147. Seethalakshmi, L.; Flores, C.; Kinkead, T.; Carboni, A.A.; Malhotra, R.K.; Menon, M. Effects of subchronic treatment with cis-platinum on testicular function, fertility, pregnancy outcome, and progeny. *J. Androl.* **1992**, *13*, 65–74.
148. e Silva, P.V.; da Silva, R.F.; Borges, C.D.S.; Cavariani, M.M.; de Almeida Francia, C.C.D.; Júnior, F.B.; De Grava Kempinas, W. Sexual differentiation and reproductive development of female rat offspring after paternal exposure to the anti-tumor pharmaceutical cisplatin. *Reprod. Toxicol.* **2016**, *60*, 112–122. [[CrossRef](#)]
149. Favareto, A.P.A.; de Toledo, F.C.; Kempinas, W.D.G. Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of adult male offspring in rats. *Reprod. Toxicol.* **2011**, *32*, 425–433. [[CrossRef](#)]
150. Hales, B.; Crosman, K.; Robaire, B. Increased postimplantation loss and malformations among the F2 progeny of male rats chronically treated with cyclophosphamide. *Teratology* **1992**, *45*, 671–678. [[CrossRef](#)]
151. Auroux, M.R.; Dulioust, E.M.; Nawar, N.Y.; Yacoub, S.G.; Kempf, E.H.; Ebel, A.B. Cyclophosphamide in the male rat: Cerebral biochemical changes in progeny. *Biomed. Pharmacother.* **1990**, *44*, 519–523. [[CrossRef](#)]
152. Kläver, R.; Sánchez, V.; Damm, O.; Redmann, K.; Lahrmann, E.; Sandhowe-Klaverkamp, R.; Rohde, C.; Wistuba, J.; Ehmcke, J.; Schlatt, S.; et al. Direct but no transgenerational effects of decitabine and vorinostat on male fertility. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Ntemou, E.; Alexandri, C.; Lybaert, P.; Goossens, E.; Demeestere, I. Oncofertility: Pharmacological Protection and Immature Testicular Tissue (ITT)-Based Strategies for Prepubertal and Adolescent Male Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

154. de Michele, F.; Vermeulen, M.; Wyns, C. Fertility restoration with spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2017**, *24*, 424–431. [CrossRef]
155. Zarandi, N.P.; Galdon, G.; Kogan, S.; Atala, A.; Sadri-Ardekani, H. Cryostorage of immature and mature human testis tissue to preserve spermatogonial stem cells (SSCs): A systematic review of current experiences toward clinical applications. *Stem Cells Cloning* **2018**, *11*, 23–38. [CrossRef]
156. Perrard, M.-H.; Sereni, N.; Schluth-Bolard, C.; Blondet, A.; d’Estaing, S.G.; Plotton, I.; Morel-Journel, N.; Lejeune, H.; David, L.; Durand, P. Complete Human and Rat Ex Vivo Spermatogenesis from Fresh or Frozen Testicular Tissue. *Biol. Reprod.* **2016**, *95*, 89. [CrossRef]
157. Abu Elhija, M.; Lunenfeld, E.; Schlatt, S.; Huleihel, M. Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in a soft agar culture system. *Asian J. Androl.* **2012**, *14*, 285–293. [CrossRef]
158. Sato, T.; Katagiri, K.; Gohbara, A.; Inoue, K.; Ogonuki, N.; Ogura, A.; Kubota, Y.; Ogawa, T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* **2011**, *471*, 504–507. [CrossRef]
159. Oblette, A.; Rives, N.; Dumont, L.; Rives, A.; Verhaeghe, F.; Jumeau, F.; Rondanino, C. Assessment of sperm nuclear quality after in vitro maturation of fresh or frozen/thawed mouse pre-pubertal testes. *Mol. Hum. Reprod.* **2017**, *23*, 674–684. [CrossRef]
160. AbuMadighem, A.; Solomon, R.; Stepanovsky, A.; Kapelushnik, J.; Shi, Q.; Meese, E.; Lunenfeld, E.; Huleihel, M. Development of Spermatogenesis In Vitro in Three-Dimensional Culture from Spermatogonial Cells of Busulfan-Treated Immature Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3804. [CrossRef]
161. Yokonishi, T.; Sato, T.; Komeya, M.; Katagiri, K.; Kubota, Y.; Nakabayashi, K.; Hata, K.; Inoue, K.; Ogonuki, N.; Ogura, A.; et al. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4320. [CrossRef] [PubMed]
162. Abofoul-Azab, M.; AbuMadighem, A.; Lunenfeld, E.; Kapelushnik, J.; Shi, Q.; Pinkas, H.; Huleihel, M. Development of Postmeiotic Cells In Vitro from Spermatogonial Cells of Prepubertal Cancer Patients. *Stem Cells Dev.* **2018**, *27*, 1007–1020. [CrossRef] [PubMed]
163. de Michele, F.; Poels, J.; Vermeulen, M.; Ambroise, J.; Gruson, D.; Guiot, Y.; Wyns, C. Haploid Germ Cells Generated in Organotypic Culture of Testicular Tissue From Prepubertal Boys. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1413. [CrossRef] [PubMed]
164. Medrano, J.V.; Vilanova-Pérez, T.; Fornés-Ferrer, V.; Navarro-Gomezlechón, A.; Martínez-Triguero, M.L.; García, S.; Gómez-Chacón, J.; Povo, I.; Pellicer, A.; Andrés, M.M.; et al. Influence of temperature, serum, and gonadotropin supplementation in short- and long-term organotypic culture of human immature testicular tissue. *Fertil. Steril.* **2018**, *110*, 1045–1057.e3. [CrossRef]
165. Portela, J.M.D.; de Winter-Korver, C.M.; van Daalen, S.K.M.; Meißner, A.; de Melker, A.A.; Repping, S.; van Pelt, A.M.M. Assessment of fresh and cryopreserved testicular tissues from (pre)pubertal boys during organ culture as a strategy for in vitro spermatogenesis. *Hum. Reprod.* **2019**, *34*, 2443–2455. [CrossRef]
166. Alexandri, C.; Stamatoopoulos, B.; Rothé, F.; Bareche, Y.; Devos, M.; Demeestere, I. MicroRNA profiling and identification of let-7a as a target to prevent chemotherapy-induced primordial follicles apoptosis in mouse ovaries. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9636. [CrossRef]
167. Carmely, A.; Meirou, D.; Peretz, A.; Albeck, M.; Bartoov, B.; Sredni, B. Protective effect of the immunomodulator AS101 against cyclophosphamide-induced testicular damage in mice. *Hum. Reprod.* **2009**, *24*, 1322–1329. [CrossRef]
168. Ilbey, Y.O.; Ozbek, E.; Simsek, A.; Otunctemur, A.; Cekmen, M.; Somay, A. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. *Fertil. Steril.* **2009**, *92*, 1124–1132. [CrossRef]
169. Benavides-García, R.; Joachim, R.; Pina, N.A.; Mutoji, K.N.; Reilly, M.A.; Hermann, B.P. Granulocyte colony-stimulating factor prevents loss of spermatogenesis after sterilizing busulfan chemotherapy. *Fertil. Steril.* **2015**, *103*, 270–280. [CrossRef]





OPEN

Paradoxical risk of reduced fertility after exposure of prepubertal mice to vincristine or cyclophosphamide at low gonadotoxic doses in humans

Marion Delessard, Justine Saulnier, Ludovic Dumont, Aurélie Rives-Feraille, Nathalie Rives & Christine Rondanino

Cancer treatment can have long-term side effects in cured patients and infertility is one of them. Given the urgency of diagnosis in children with cancer, the toxicity of treatments on the gonad was overshadowed for a long time. In the present study, prepubertal mice were treated by vincristine or cyclophosphamide commonly used in acute leukaemia treatment. The prepubertal exposure to cyclophosphamide, at a low gonadotoxic dose in humans ($<3.5 \text{ g/m}^2$), led to morphological alterations of prepubertal testicular tissue. An increased proportion of spermatozoa with hypocondensed chromatin and oxidized DNA associated with decreased fertility were uncovered at adulthood. Short- and long-term morphological alterations of the testicular tissue, disturbed progression of spermatogenesis along with increased proportions of isolated flagella and spermatozoa with fragmented DNA were evidenced in vincristine-treated mice. Moreover, the fertility of mice exposed to vincristine was severely affected despite being considered low-risk for fertility in humans. Paternal exposure to vincristine or cyclophosphamide before puberty had no impact on offspring development. Contrary to the current gonadotoxic risk classification, our results using a mouse model show that vincristine and cyclophosphamide ($<3.5 \text{ g/m}^2$) present a high gonadotoxic risk when administered before the initiation of spermatogenesis.

Over the last decades, the long-term survival rate of children with cancer has improved significantly thanks to earlier detection of cancer and progress in treatments¹. However, cancers remain the second most frequent cause of death for children under 15 years of age. Among childhood cancers, leukaemia (mainly acute lymphoblastic leukaemia) is the most common². The chemotherapy treatment of acute leukaemia includes three main phases: (1) an induction phase, (2) a consolidation phase whose aim is to destroy all tumour cells in the blood and bone marrow and (3) a maintenance chemotherapy to prolong remission in patients³. According to several clinical studies, the conventional chemotherapy is presumed with low risk for fertility^{4–6}. If the treatment is not efficient, the patients receive hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) which first requires an intensive chemotherapy known for its high gonadotoxicity. To prevent side-effects on gonads, procedures of fertility preservation are proposed. In prepubertal boys unable to produce sperm, fertility preservation can be considered using testicular tissue freezing, which remains an experimental procedure⁷. Currently, this procedure is proposed to children with leukaemia exclusively before the high-dose conditioning chemotherapy regimens that precede HSCT. However, it is reasonable to assume that chemotherapy received during the induction and consolidation phases could have adverse effects on the prepubertal testis. Paediatric leukaemia survivors who have not benefited from fertility preservation procedures could present long-term reproductive sequelae, especially if alkylating agents were included in their regimen^{5,6,8}. Indeed, a growing number of studies have reported fertility impairment at adulthood after prepubertal exposure to chemotherapy, with a prevalence of male infertility reaching 46% in childhood cancer survivors compared to 17.5% in siblings^{9,10}. A classification of the chemotherapeutic agents according to the risks of infertility after exposure in childhood or adulthood has been defined to help clinicians to better refer patients for fertility preservation^{11,12}. Since chemotherapy drugs are usually administered in combination,

Department of Reproductive Biology–CECOS, EA 4308 “Gametogenesis and Gamete Quality”, Rouen University Hospital, Normandie Univ, UNIROUEN, 76000 Rouen, France. email: christine.rondanino@univ-rouen.fr

this classification remains questionable as it appears to be difficult to identify the risk of each agent. Moreover, very few data are still available on how these chemotherapeutic agents affect the prepubertal testis and most of the current data are deduced from adult studies¹³. Since the hormonal environment and the germ and somatic cell contents are different between the prepubertal and the adult testis, further studies investigating the impact of chemotherapy exposure before puberty on male fertility are needed¹⁴.

Cyclophosphamide (CYP) and vincristine (VCR) are classically used in the treatment of acute leukaemia during the induction and consolidation phases. The alkylating metabolite of CYP, phosphoramidate mustard, forms DNA adducts and inhibits DNA transcription and replication¹⁵. It is widely believed that alkylating agents such as CYP present a high risk for fertility, which increases in a dose-dependent manner^{11,16}. Human studies have shown that the administration of alkylating agents before puberty results in a depletion of the spermatogonial pool at adulthood compared to therapy without alkylating agents^{17,18}. Similarly, a loss of spermatogonial stem cells (SSC) with a significant increase of DNA damage (DNA double-strand breaks) has been found after 24 h and 48 h of *in vitro* exposure of prepubertal mouse testes to CYP^{19,20}. VCR is a vinca-alkaloid that blocks cell division by inhibiting microtubule polymerization²¹. This chemotherapeutic agent is considered to have a low gonadotoxic potential, although studies in the rodent model have shown that an *in vitro* exposure of spermatogonial cell lines with SSC characteristics to VCR for 48 h resulted in increased apoptosis^{11,22}.

In the present study, we assessed for the first time the impact of *in vivo* exposure of prepubertal mice to VCR or CYP before the initiation of the first wave of spermatogenesis on the testicular tissue, sperm production and quality, fertility and offspring development. VCR (200 µg/kg) and CYP (90 mg/kg) were administered individually to 3-day *postpartum* (*dpp*) mice, age at which the only germ cells present in the testis are gonocytes and spermatogonia²³. These doses are similar to the low concentrations used in induction and consolidation chemotherapy in the clinics and therefore considered to be at low risk for fertility. The effects of each drug were analysed in the short-term (before entry into meiosis, i.e. 3 days after treatment) and the long-term (after a few cycles of spermatogenesis).

Results

Short- and long-term testicular tissue alteration after VCR but not CYP prepubertal exposure. Prepubertal 3-day-old mice received either an intraperitoneal injection of saline solution (NaCl 0.9% group), cyclophosphamide (CYP group) or vincristine (VCR group). Mice in the untreated group did not receive any injection. VCR and CYP groups were compared to the control NaCl 0.9% group throughout this study. Our data revealed no significant difference between the NaCl 0.9% group and the untreated group (Fig. S1).

Three days post-treatment (at D6), similar body weights, testis weights and ratios of testis weight to body weight were observed in the different groups (Fig. 1a–c). However, the structural integrity of testicular tissues from VCR (0.63 vs 0.19; $P < 0.0001$) and CYP-treated mice (0.33 vs 0.19; $P = 0.019$) was affected, with a higher global lesional score relative to NaCl 0.9% group (Fig. 1d). The global lesional score (0–10) allowed a semi-quantitative evaluation of the integrity and structural modifications of the testicular tissue including a score between 0 and 5 for nuclear and from 0 to 5 for epithelial alterations (0 representing the complete absence of alteration and 5 representing the most severe alterations). At D6, epithelial and nuclear alterations were noticed, including the presence of vacuoles and pyknotic nuclei in the seminiferous tubules in VCR and CYP groups (Fig. 1e).

A long-term impact on body weight was observed in mice treated with chemotherapy: a decreased body weight was observed in CYP-treated-mice at D66 (31.86 vs 47.55; $P = 0.0044$) and D140 (33.53 vs 52.28; $P = 0.0038$) and in VCR-treated mice at D140 (40.50 vs 52.28; $P = 0.0112$) compared to the NaCl 0.9% group (Fig. 2a). Moreover, males treated by VCR displayed a decreased testis weight at D66 (38.23 vs 126.95; $P = 0.0058$) and D140 (42.96 vs 134.25; $P = 0.0013$) relative to NaCl 0.9% group (Fig. 2b). However, similar ratios of testis weight to body weight were observed in the different groups (Fig. 2c). Despite a 2.7 and 2.4-fold decrease in the ratios of testis weight to body weight respectively, at D66 (0.11 vs 0.30; $P = 0.0915$) and D140 (0.11 vs 0.26; $P = 0.112$) in mice exposed to VCR compared to the NaCl 0.9% group, no significant difference was found (Fig. 2c). No evolution of this ratio was observed in VCR-treated mice between D6 (0.09), D66 (0.11) and D140 (0.11) whereas an increase of at least twofold was observed between D6 and adult age (D66 or D140) in the NaCl 0.9% group (0.12, 0.30 and 0.26, respectively) and CYP group (0.10, 0.39 and 0.38, respectively) (Figs. 1c, 2c). The alterations of testicular tissues observed at D6 in mice treated with VCR seemed to persist over time, with a 2.1-fold higher global lesional score in VCR group (0.46 vs 0.22; $P = 0.0017$) than in the NaCl 0.9% group at D140 (Fig. 2d), resulting in the presence of vacuoles and pyknotic nuclei in seminiferous tubules (Fig. 2e). Vacuoles were also observed in testicular tissues of mice exposed to CYP (Fig. 2e) but the global lesional scores were not significantly different between CYP-treated mice and the NaCl 0.9% group at D66 and D140 (Fig. 2d). Moreover, less morphological alterations were detected between the age of D66 and D140 in CYP-treated mice (0.38 vs 0.17; $P = 0.0022$) (Fig. 2d).

Disturbed progression of spermatogenesis after VCR exposure during the prepubertal period.

The progression of spermatogenesis was assessed by determining the proportion of seminiferous tubules containing germ cells at the most advanced differentiation stage (Table 1). In all groups, the most advanced stage observed in tubules was elongated spermatids (Table 1) and spermatozoa were found in cauda epididymis, thereby showing the achievement of complete spermatogenesis (Fig. 3a). One VCR-treated male was considered azoospermic since no sperm was found in the epididymis at D66 (Fig. 3a) and therefore, could not be included in the analyses of sperm morphology and nuclear quality. This male was the only one to present Sertoli cell-only tubules at D66 (0.3 ± 0.3%). Tubules with no germ cells were also found in VCR-treated mice at D140, but no significant difference could be found relative to the NaCl 0.9% group, probably due to inter-individual variability in response to drugs (Table 1). At D66, a similar proportion of tubules at the most advanced stage was

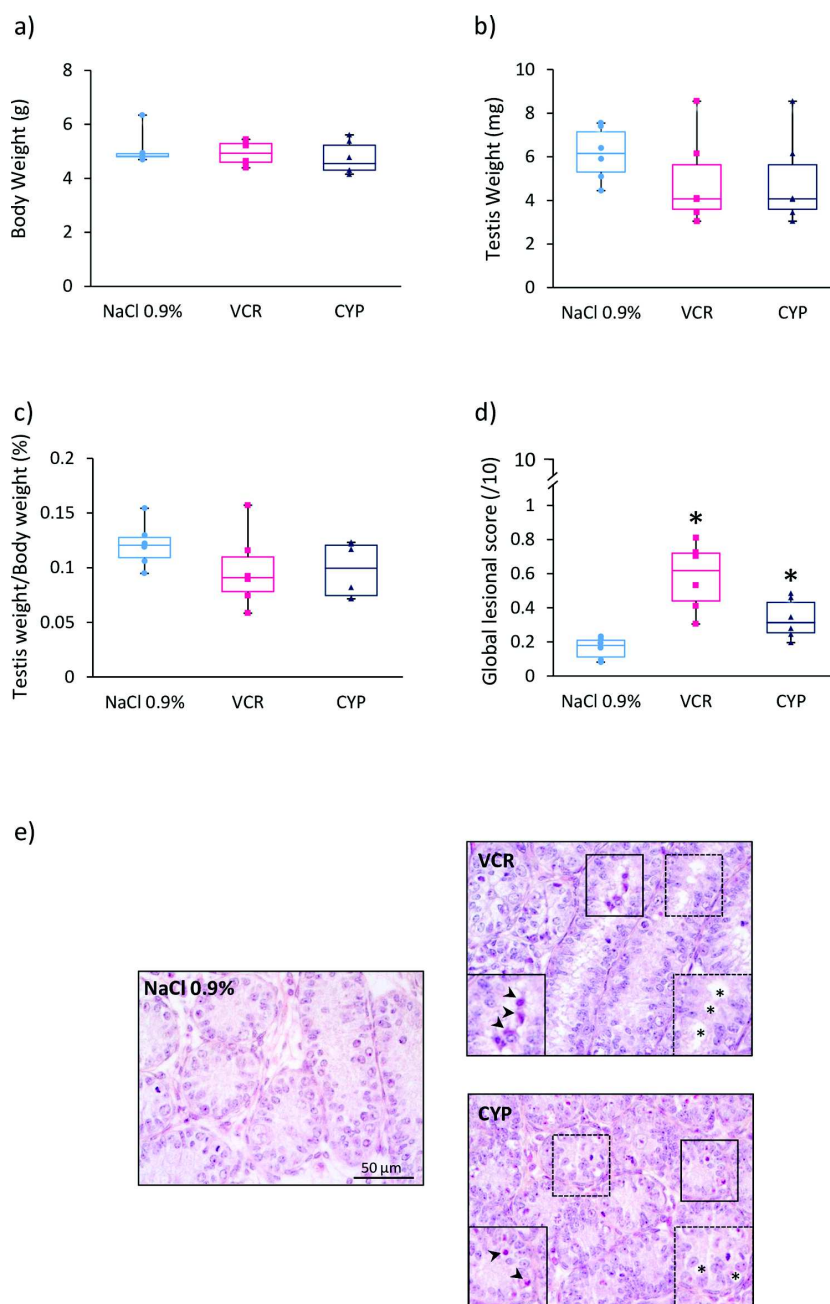


Figure 1. Short-term impact of CYP or VCR exposure on prepubertal testes. Box plots representing (a) median body weight, (b) median testis weight and (c) median ratio of testicular weight to body weight of 6-day-old (D6) mice treated with NaCl 0.9%, VCR or CYP at 3 days of age. Morphological alterations of the seminiferous tubules were assessed semi-quantitatively by calculating a global lesional score (d). Representative microscopy images of HES-stained D6 mouse testicular tissues are shown at a $\times 400$ magnification (e). Panels on the lower left corner and lower right corner represent enlarged views of pyknotic nuclei (black arrows) and vacuoles (asterisks). Median is indicated by an horizontal line and points represent individual data with $n=6$ mice for NaCl 0.9%, VCR and CYP groups. $*P < 0.05$ compared to NaCl 0.9% group at the same age.

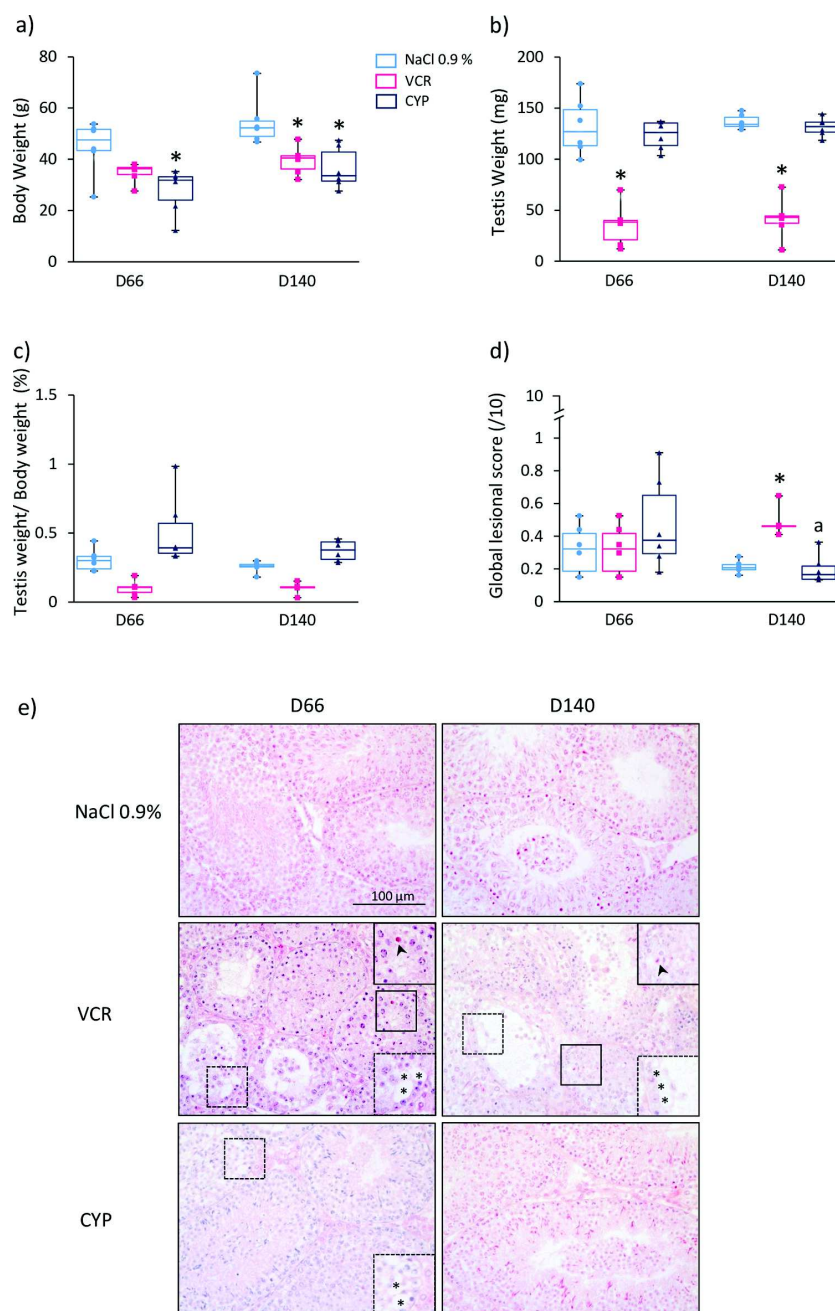


Figure 2. Long-term impact of CYP or VCR prepubertal exposure on D66 and D140 mouse testes. Box plots representing (a) median body weight, (b) median testis weight and (c) median ratio of testicular weight to body weight of D66 and D140 mice treated by NaCl 0.9%, VCR or CYP at 3 days of age. Morphological alterations of the seminiferous tubules were assessed semi-quantitatively by calculating a global lesional score (d). Microscopy images of HES-stained testicular tissues from D66 and D140 mice are shown at a $\times 200$ magnification (e). Vacuoles are represented by asterisks (*) (enlarged view in the lower right corner) and the presence of pyknotic nuclei is indicated by black arrows (enlarged view in the upper right corner). Median is indicated by a horizontal line and points represent individual data with $n = 6$ mice for NaCl 0.9%, VCR and CYP groups. * $P < 0.05$ compared to NaCl 0.9% group at the same age. ^a $P < 0.05$ compared to CYP group at D66.

	% of seminiferous tubules at the most advanced stage					
	D66			D140		
	NaCl 0.9%	VCR	CYP	NaCl 0.9%	VCR	CYP
No germ cell (Sertoli cell-only)	0.0	0.3 ± 0.3	0.0	0.0	0.6 ± 0.4	0.0
Spermatogonia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6 ± 0.4	0.0
Leptotene/zygotene spermatocytes	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4 ± 0.6*	0.0
Pachytene spermatocytes	0.6 ± 0.4	3.3 ± 1.0*	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.3	2.8 ± 0.7*	0.6 ± 0.4
Round spermatids	3.6 ± 1.0	7.5 ± 2.5	3.9 ± 1.1	3.3 ± 0.8	15.0 ± 2.0**	4.7 ± 0.8
Elongating spermatids	3.9 ± 1.0	3.6 ± 0.5	4.7 ± 1.2	5.3 ± 0.8	7.5 ± 1.4 ^a	7.2 ± 1.1
Elongated spermatids	92.2 ± 1.1	85.8 ± 3.1	91.1 ± 1.5	91.1 ± 1.1	72.2 ± 2.1**	87.8 ± 1.5

Table 1. Percentage of seminiferous tubules at the most advanced differentiation stage of spermatogenesis in D66 and D140 mice exposed to chemotherapy (VCR or CYP) or unexposed (NaCl 0.9%) during the prepubertal period. Data are presented as mean ± SEM with $n=6$ mice for NaCl 0.9%, VCR and CYP groups. * $P<0.05$ compared to NaCl 0.9% group at the same age. ^a $P<0.05$ compared to VCR group at D66.

observed in all conditions, except in D66 VCR-treated mice where a significantly higher percentage of tubules containing pachytene spermatocytes ($P=0.0325$) was found relative to the NaCl 0.9% group. In D140 VCR-treated mice, the progression of spermatogenesis was disturbed with a significantly raised percentage of tubules containing leptotene/zygotene spermatocytes ($P=0.0105$), pachytene spermatocytes ($P=0.0025$) and round spermatids ($P<0.0001$) at the most advanced stage compared to the NaCl 0.9% group. Moreover, the proportion of tubules containing elongated spermatids was lower in VCR-treated males at D140 than in the NaCl 0.9% group (72.2 vs 91.1; $P<0.0001$). The proportion of tubules in which round spermatids and elongating spermatids are the most advanced types of germ cells significantly increased between D66 and D140 in VCR-treated mice, whereas the proportion of tubules at the elongated spermatid stage significantly decreased (Table 1), thereby suggesting that the impact on spermatogenesis persisted after several cycles. In line with this, a decreased sperm count was observed at D66 (2.98×10^6 vs 21.80×10^6 ; $P=0.0013$) and D140 (11.81×10^6 vs 23.31×10^6 ; $P=0.0199$) in males exposed to VCR compared to the NaCl 0.9% group (Fig. 3a). A rise in sperm count was noticed in VCR-treated males between D66 and D140 (2.98×10^6 vs 11.81×10^6 ; $P=0.026$). In contrast, sperm counts were not significantly different between CYP- and NaCl 0.9%-treated males (Fig. 3a).

Sperm morphological and nuclear abnormalities following CYP or VCR prepubertal exposure. Sperm head morphology was not affected by VCR and CYP exposure, with a similar proportion of spermatozoa with normal head compared to the NaCl 0.9% group at D66 and D140 (Fig. 3b,c). However, an increased percentage of isolated flagella was found in D140 VCR-treated mice (18.93 vs 2.27; $P=0.0154$) in comparison with the NaCl 0.9% group (Fig. 3d,e).

After VCR and CYP exposure, an increased proportion of spermatozoa with nuclear abnormalities was observed. Indeed, aniline blue staining showed a higher percentage of spermatozoa with hypocondensed chromatin in D66 CYP-treated mice relative to the NaCl 0.9% group (0.90 vs 0.20; $P=0.0413$) (Fig. 4a). In contrast, the percentage of spermatozoa with abnormal chromatin condensation was not different between males treated by VCR and NaCl 0.9% at D66 and D140. The proportion of spermatozoa with hypocondensed chromatin significantly increased between D66 and D140 in the VCR and NaCl 0.9% groups (Fig. 4a). TUNEL analyses also show a 18.6-fold increase in the proportion of spermatozoa containing fragmented DNA in D140 VCR-treated mice (5.6 vs 0.30; $P=0.0079$) compared to the NaCl 0.9% group, but no significant difference was found for CYP-treated mice (Fig. 4b). Finally, more spermatozoa with DNA oxidation were found in CYP-treated mice at D66 compared to NaCl 0.9%-treated mice (39.90 vs 21.30; $P=0.0013$) (Fig. 4c) whereas a similar proportion of spermatozoa with oxidized DNA was found in males treated by VCR and NaCl 0.9% (Fig. 4c).

VCR or CYP treatment before puberty resulted in decreased fertility but had no impact on progeny development. Among the females mated with CYP-treated males at the age of D66 and D140, a significant reduction of pregnancy rate (number of pregnant females/total number of mated females $\times 100$) was observed: 100% of the females became pregnant after mating with D66 and D140 NaCl 0.9%-treated mice versus 41.6% of pregnant females after mating with CYP-treated males at D66 ($P=0.002$) and 50% at D140 ($P=0.005$) (Table 2). No significant difference in post-implantation loss was found between the different groups at D66 and D140. Paternal CYP treatment had no impact on litter size, post-natal mortality and sex ratio. One litter was obtained with a D140 VCR-treated male (8.3% of pregnancy rate for the VCR group vs 100% for the NaCl 0.9% group, $P<0.0001$). An important loss of post-implantation embryos was noticed after mating with VCR-treated males. The single litter fathered by the VCR-treated male only contained 7 pups, with a 2.5:1 male-to-female sex ratio (Table 2). No post-natal mortality was observed in this litter (Table 2). Moreover, external malformations were searched in all litters by investigating limb defects, body shape alterations or congenital anomalies (spina bifida, microcephaly and orofacial clefting) and no pups showed grossly visible anomalies. Pups were subjected to a set of behavioural tests and morphological screenings. Pups fathered by D66 and D140 males showed similar morphological (hair growth, ears elevation, eyes opening) and behavioural (bar holding ability, vibrissa placing, walking, forelimb stick grasp reflex, cliff drop aversion and righting reflex) developments in all groups

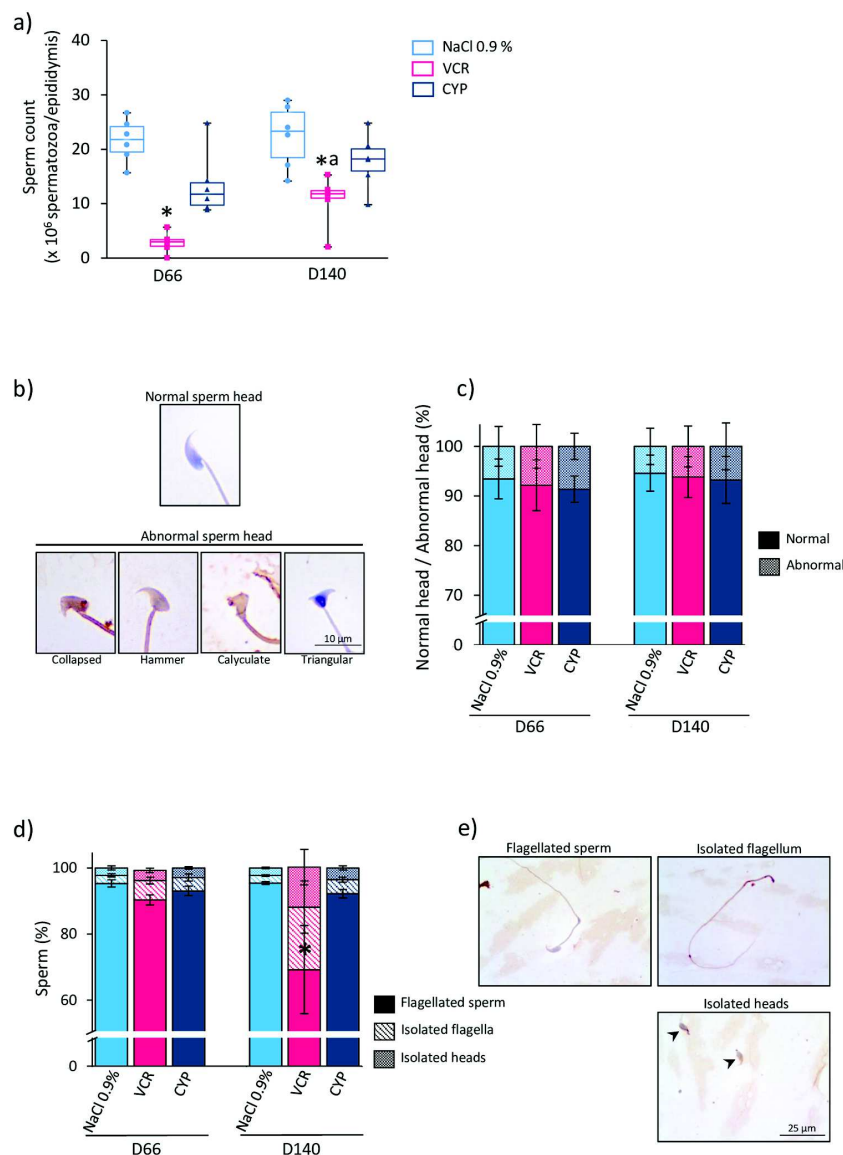


Figure 3. Sperm count and morphology in D66 and D140 mice treated by VCR or CYP during the prepubertal period. **(a)** Median sperm counts of D66 and D140 mice treated by NaCl 0.9%, VCR or CYP at 3 days of age are represented. **(b)** Epididymal sperm head morphology was classified into two groups: normal or abnormal (collapsed, hammer, calyculate or triangular). **(c)** Proportions of spermatozoa with normal or abnormal sperm head morphology in D66 and D140 mice exposed to chemotherapy (VCR or CYP) or unexposed (NaCl 0.9%). The percentages of flagellated spermatozoa, isolated flagella and isolated heads are represented for each condition **(d)**. Representative photomicrographs of spermatozoa stained with haematoxylin are shown **(e)**. Magnification: $\times 1000$. Median is indicated by an horizontal line and points represent individual data with $n = 6$ mice for NaCl 0.9%, VCR and CYP groups for sperm count analyses. Data are presented as mean \pm SEM with $n = 6$ mice (except for VCR at D66 where $n = 5$) for sperm morphology analyses. * $P < 0.05$ compared to NaCl 0.9% group at the same age. * $P < 0.05$ compared to VCR group at D66.

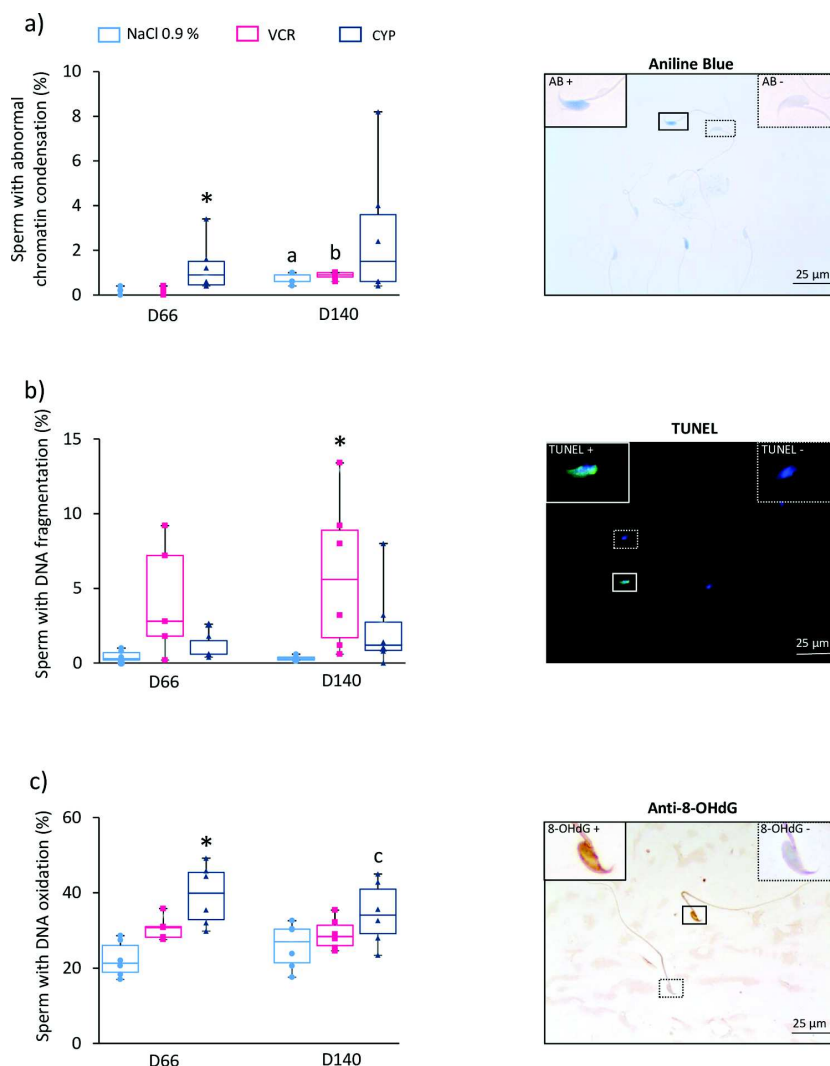


Figure 4. Impact of CYP or VCR prepubertal exposure on mouse sperm nuclear quality at D66 and D140. (a) Chromatin condensation in epididymal spermatozoa was assessed by aniline blue staining. Shown are representative images of spermatozoa with condensed (AB-, upper right corner) or abnormally condensed chromatin (AB+, upper left corner). Spermatozoa were counterstained with haematoxylin. The percentages of spermatozoa with abnormal chromatin condensation in D66 and D140 mice exposed to chemotherapy (VCR or CYP) or unexposed (NaCl 0.9%) are represented in box plots. (b) DNA fragmentation was investigated by TUNEL assay. Representative photomicrographs of spermatozoa with unfragmented DNA (TUNEL-, upper right corner) or fragmented DNA (TUNEL+ in green, upper left corner) are shown. Sperm nuclei were counterstained with DAPI (blue). Box plots show the proportions of spermatozoa with DNA fragmentation for NaCl 0.9%, VCR and CYP groups. (c) DNA oxidation was evaluated by 8-OHdG immunostaining. Representative images of spermatozoa with unoxidized DNA (8-OHdG-, upper right corner) and oxidized DNA (8-OHdG+, upper left corner) are shown. Spermatozoa were counterstained with haematoxylin. The percentages of 8-OHdG+ spermatozoa are represented for each condition. Magnification: $\times 500$ (Aniline blue staining and 8-OHdG immunostaining) or $\times 400$ (TUNEL assay). Median is indicated by an horizontal line and points represent individual data with $n=6$ mice for all conditions, except for VCR at D66 where $n=5$. * $P < 0.05$ compared to NaCl 0.9% group at the same age. ^a $P < 0.05$ compared to NaCl 0.9% group at D66. ^b $P < 0.05$ compared to VCR group at D66. ^c $P < 0.05$ compared to CYP group at D66.

	D66			D140		
	NaCl 0.9%	VCR	CYP	NaCl 0.9%	VCR	CYP
Pregnancy rate (%)	100.0	0.0*	41.6*	100.0	8.3*	50.0*
Litter size (mean ± SEM)	14.1 ± 0.7	–	14.0 ± 0.6	13.6 ± 0.6	7.0 ± 0.0	14.2 ± 0.5
Post-implantation loss (%)	0.8	0.0	1.3	0.3	46.2	0.3
Post-natal mortality (%)	0.7	–	2.4	0.0	0.0	0.0
Sex ratio (m/f)	1.2	–	1.0	1.1	2.5	0.7

Table 2. The effects of paternal VCR or CYP exposure before puberty on progeny outcome. For each condition, six D66 or D140 male was mated with 12 virgin females. At the end of the gestation, pregnancy rate, litter size, post-natal mortality and sex ratio were determined. At the end of the weaning period, females were euthanized and post-implantation loss was assessed. For pregnancy rate and post-implantation loss, data were obtained with $n = 12$ females for each condition. For litter size, post-natal mortality and sex ratio, data were collected according to the number of litters obtained for each condition, i.e. $n = 12$ litters for NaCl 0.9% groups at the age of D66 and D140; $n = 5$ litters for CYP group at D66; $n = 6$ litters for CYP group at D140 and $n = 1$ litter for VCR group at D140. No litter was obtained after mating of VCR-treated D66 males. * $P < 0.05$ compared to NaCl 0.9% group at the same age.

(Fig. 5a,b). Paternal treatments did not impact the weight (Fig. 5c,d) and growth (Fig. 5e,f) of the offspring. At the age of sexual maturity, male descendants did not show any decrease in their testis weight (Fig. 6a) and any alteration in their sperm count (Fig. 6b) and sperm vitality (Fig. 6c).

Discussion

In the present study, the effects of VCR and CYP, two drugs commonly used during induction and consolidation chemotherapy at doses presumed with low gonadotoxicity, were investigated after prepubertal exposure in the mouse model. The doses of VCR and CYP used in the present study correspond to the highest doses that could be administered to 3 *dpp* pups while respecting the limit points. Higher doses of chemotherapy resulted in the death of prepubertal mice and lower doses were not clinically relevant.

Only 3 days after VCR or CYP treatment, major alterations of the seminiferous epithelium (presence of vacuoles, pyknotic nuclei) were detected. The global lesional score was respectively 3.3- and 1.7-fold higher in VCR- and CYP-exposed mice than in NaCl 0.9%-treated mice. Testicular weight represented at least 0.10% of body weight at D6 and 0.25% at adulthood in CYP- and NaCl 0.9%-treated mice. However, in male exposed to VCR, the ratio of testis weight to body weight was 0.09% at D6 and only 0.11% at adulthood, which may reflect a disruption in testicular development, probably occurring during puberty.

The morphological alterations of the testicular tissue observed at D6 persisted at the adult age (D140) and were associated with reduced epididymal sperm count in males exposed to VCR. An *in vitro* study previously indicated that VCR exposure leads to mitotic arrest and increased cell death in a rat spermatogonial cell line with SSC characteristics²². Here, the reduced sperm production in VCR-treated mice could therefore be a consequence of VCR toxicity on SSC. In addition, we observed Sertoli cell-only tubules in the testicular tissues of VCR-treated mice at D66 and D140, with one male showing azoospermia. These observations are in line with a possible SSC depletion in some tubules after prepubertal exposure to VCR. So far, only the impact of an adulthood exposure to VCR had been studied: in this case, a significant alteration of the germinal epithelium and decreased sperm count were observed 35 days after the administration of a single dose of VCR in mice^{24,25}. Although VCR-treated mice showed a complete spermatogenesis at D140 in our study, the progression of spermatogenesis was disturbed: indeed, more tubules were at the leptotene/zygotene or pachytene spermatocyte stage and at the round spermatid stage whereas less tubules were at the elongated spermatid stage in comparison with NaCl 0.9%-treated mice. During prophase I of meiosis, major mechanisms such as homologous recombination of chromosomes and meiotic sex chromosome inactivation are critical to the pursuit of spermatogenesis. Exposure to VCR may lead to failures in these processes, which may activate the pachytene checkpoint and cause pachytene arrest in some seminiferous tubules²⁶. Post-meiotic arrest before the elongation process could be the consequence of defects in chromatin packaging, cytoplasmic extrusion, flagellum and acrosome formation^{27,28}.

In contrast, we found that prepubertal exposure to CYP did not affect testicular tissue integrity, progression of spermatogenesis and sperm production at adulthood (D66 and D140). The alterations of the germinal epithelium observed only 3 days after CYP treatment were no longer apparent at adulthood. So far, only one study had investigated the impact of prepubertal CYP *in vivo* exposure in rats: no histological damage and spermatogenesis disruption were observed in the testicular tissue 2 weeks after treatment (40, 200 and 280 mg/kg for 2 weeks)²⁹. These results may indicate a rapid recovery of the seminiferous epithelium after prepubertal CYP exposure when administered at low gonadotoxic doses. The similar sperm count uncovered in CYP-treated mice relative to NaCl 0.9% group suggests the absence of major impact on the spermatogonial pool. However, the genotoxicity of alkylating agents, such as CYP, is well-known. A loss of germ cells including spermatogonial stem cells has been found after 24 h of *in vitro* exposure of 5 *dpp* mouse testis to a mid-concentration of CYP (0.2 µg/mL)²⁰. Moreover, studies have shown a depletion of the spermatogonial pool in prepubertal patients who received alkylating agents at Cyclophosphamide Equivalent Doses (CED) of 5.5 and 7.0 g/m² (presenting moderate risk for fertility) as well as others drugs, such as high doses of anthracycline^{17,18,30}. Spermatogonial number but also sperm concentration are negatively correlated to CED^{6,16}. Indeed, a proportion of azoospermic

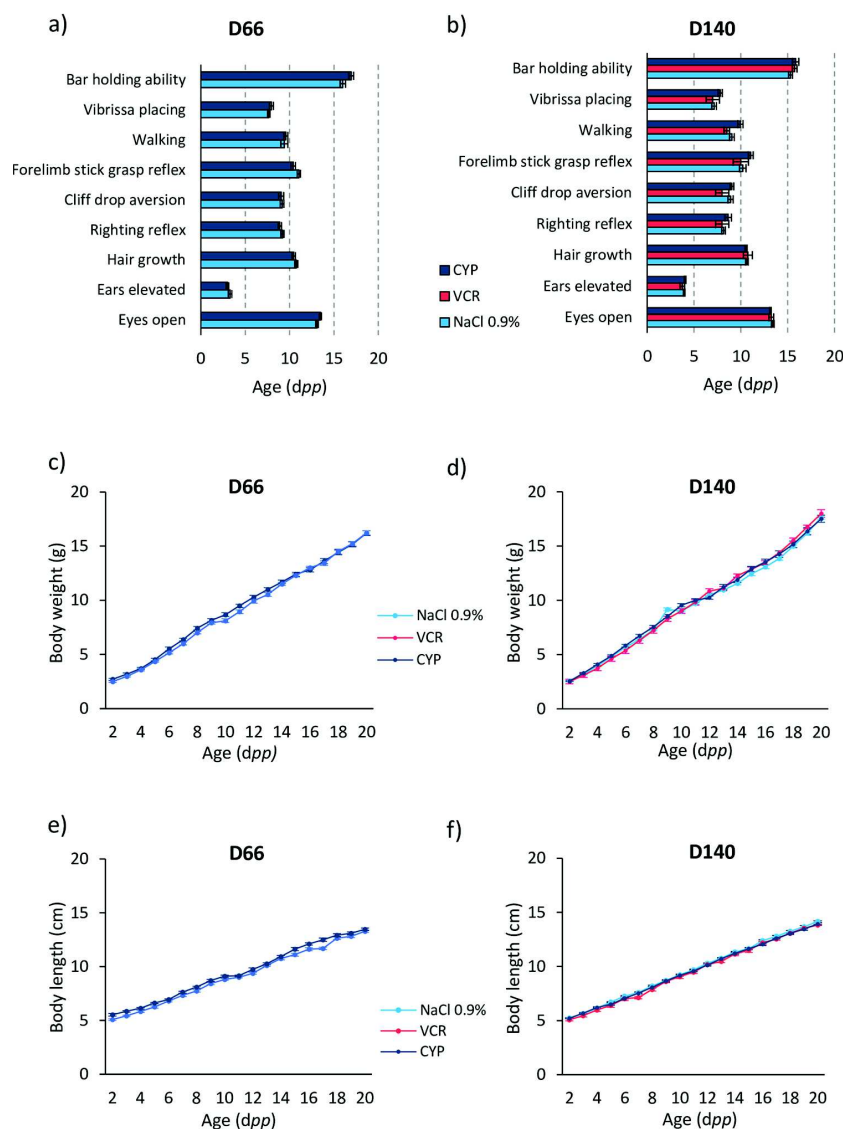


Figure 5. Impact of paternal exposure to chemotherapy (VCR or CYP) during the prepubertal period on the development of progeny. For each group, the pups obtained after mating D66 males (a) or D140 males (b) with untreated females were observed daily from 2 to 20 dpp. Their morphological (hair growth, ears elevation, eyes opening) and behavioural development (bar holding ability, vibrissa placing, walking, forelimb stick grasp reflex, cliff drop aversion, righting reflex) was assessed. The bar graphs show the mean age at which the pups are able to develop a mature and full response (level 3). The mean body weight of pups fathered by D66 males (c) or D140 males (d) was recorded during the pre-weaning period (from 2 to 20 dpp). The mean body length of pups fathered by D66 males (e) or D140 males (f) was measured from the age of 2 dpp to 20 dpp. Data are presented as mean \pm SEM. For pups fathered by D66 males, $n = 20$ animals were observed in NaCl 0.9% group and $n = 19$ in CYP group. For pups fathered by D140 males, $n = 20$ animals were observed in all groups except for VCR group where $n = 4$.

men reaching 80% has been found among childhood cancer survivors treated with high doses ($> 19 \text{ g/m}^2$) of alkylating agent versus 33% using non-sterilizing doses ($< 19 \text{ g/m}^2$)³¹. In addition, it has been estimated that 89% of childhood cancer survivors who received a CED $< 4000 \text{ mg/m}^2$ were normozoospermic¹⁶. No change

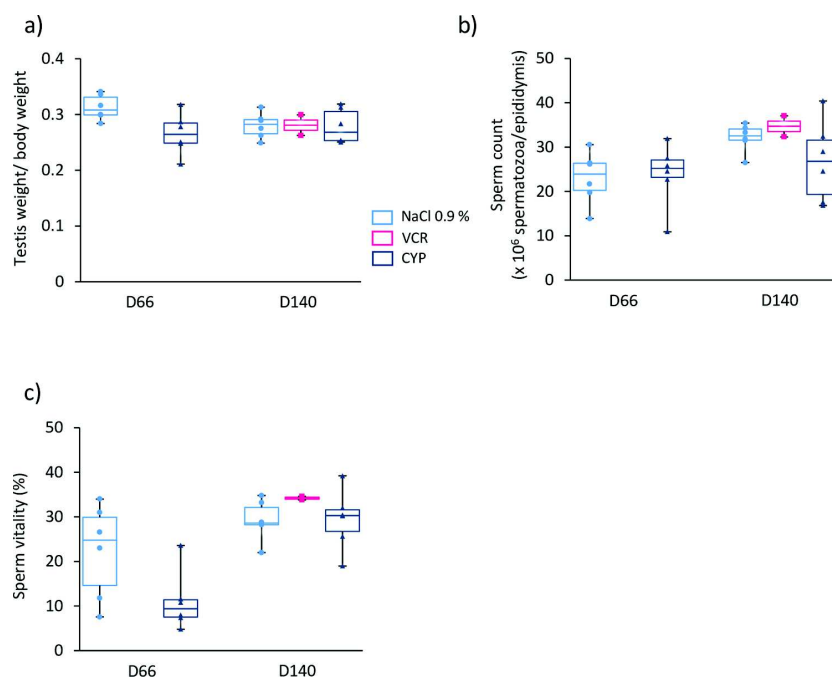


Figure 6. Impact of paternal exposure to VCR or CYP during the prepubertal period on the testes and sperm parameters of the male progeny. (a) Median ratio of testicular weight to body weight of mice fathered by D66 males and D140 males exposed to chemotherapy (VCR or CYP) or unexposed (NaCl 0.9%). (b) Median sperm counts were assessed at the age of sexual maturity in the offspring of D66 and D140 males. (c) Proportion of live sperm for each condition. Sperm vitality was evaluated by eosin-nigrosin staining at the time of collection. Median is indicated by an horizontal line and points represent individual data. For the male progeny fathered by D66 males, $n = 6$ animals were analysed in all groups. For the male progeny fathered by D140 males, $n = 6$ animals were analysed in all groups except for VCR group where $n = 2$.

in spermatogonial number has been observed in prepubertal boys who did not receive alkylating agent¹⁸. The present study reports no case of azoospermia in mice treated with CYP at a low gonadotoxic dose and one male displayed azoospermia in VCR group. The decreased sperm count uncovered in VCR-treated mice indicated a VCR toxicity on germ cells, as previously reported in other studies^{24,32,33}. The rise in sperm counts observed between D66 and D140 in the VCR group suggests a possible sperm recovery. However, it must be considered that the presence of an azoospermic VCR-treated male at D66 drastically decreased the median sperm count and sperm recovery therefore remains questionable.

Very few studies have focused on sperm nuclear abnormalities in adult survivors of childhood cancer^{34,35}. Indeed, sperm DNA damage have mainly been highlighted in rodent models^{36,37}. Here, we report sperm morphological abnormalities and DNA damage in adult mice after VCR or CYP prepubertal exposure. In CYP-treated mice, an elevated proportion of spermatozoa with hypocondensed chromatin and oxidized DNA was found at D66. As an alkylating agent, CYP directly induces DNA adducts but also in an indirect manner via oxidative stress^{38,39}. The oxidative stress induced by CYP at the time of exposure could lead to the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) residues in the germline that could persist in spermatozoa and throughout spermatogenesis cycles^{36,40}. Moreover, the accumulation of DNA damage alters sperm chromatin remodeling during spermiogenesis and affect chromatin structure^{41,42}. The extreme compaction of chromatin is essential to protect paternal genome and plays a major role in the epigenetic reprogramming of paternal DNA after fertilization^{43,44}. Defects in sperm chromatin condensation could therefore affect fertilization and embryo development. In our study, TUNEL assays showed a higher percentage of spermatozoa with DNA fragmentation in VCR-treated mice at D66, suggesting a long-term genotoxicity of VCR. A rise in DNA damage had previously been reported using COMET assay in mice exposed to VCR at adulthood²⁴. Sperm morphological abnormalities were also observed in VCR-treated males, with a higher proportion of decapitated sperm. In human, sperm DNA damage and decapitated spermatozoa are frequently associated with male infertility^{45–47}. Here, we show that prepubertal exposure to CYP or VCR at a low gonadotoxic dose impaired male fertility. Only 41.6% and 50% of females were pregnant after mating with CYP-treated D66 and D140 males, respectively. Moreover, a pregnancy rate of 8.3% was found in female mated with D140 VCR-treated male. These results contradict the current gonadotoxic risk classification in human. However, the relevance of our findings in humans should be

interpreted with caution since the sensitivity of the prepubertal testis to chemotherapy is likely to be different between humans and rodents. In our study, 3 *dpp* mouse testes contain gonocytes and spermatogonia whereas human prepubertal testes exclusively contain spermatogonia⁴⁸. Gonocytes and spermatogonia are the targets of chemotherapeutic drugs since they are mitotically active from 3 to 5 *dpp* in mouse testes²³. Moreover, the regimen used might also explain the differences in testicular damage observed between the two species. Whilst human chemotherapy regimen is generally administered intravenously with cumulative doses for long periods of time, prepubertal mice only received one intraperitoneal injection of chemotherapy because of their small sizes. At the time of injection, intra-abdominally located testes may have direct contact with drugs, which may increase gonadotoxicity compared to intravenous injections.

Paternal CYP exposure did not affect litter size, post-implantation loss, post-natal mortality and sex ratio. Moreover, no significant difference in the morphological and behavioural development of the offspring has been evidenced and males fathered by CYP-treated mice had normal sperm parameters. In human, studies on the offspring of childhood cancer survivors remain limited but they have suggested that paternal treatment did not increase the risk of congenital abnormalities, genetic diseases and abnormal karyotypes in the offspring^{49–51}. In our study, only one female became pregnant after mating with a D140 VCR-exposed male. Etoposide, like VCR, is considered to have a low gonadotoxic potential, although an exposure to this drug during the prepubertal period leads to a reduced number of offspring in the rat model⁵². Similarly, we found that the size of the litter fathered by the D140 VCR-treated mouse was reduced, probably because of 46.2% of embryo loss. A decreased number of total and live implantations has been reported after an adult exposure of spermatogonia to VCR²⁴. Paternal DNA damage could be at the origin of arrests of embryo development and post-implantation losses^{42,53}. In this litter, the sex ratio was in favour of males. No post-natal mortality, external malformation and alteration in the post-natal development was detected. However, since only one litter was obtained in this study, no conclusion on the effect of prepubertal VCR exposure on pregnancy outcome can be drawn.

In conclusion, persistent sperm DNA damage and decreased fertility were uncovered in adult mice following prepubertal CYP exposure at a low gonadotoxic dose. Short- and long-term alterations of the testicular tissue, disturbed progression of spermatogenesis associated with altered sperm morphology and nuclear quality were evidenced after prepubertal VCR treatment. Contrary to the current gonadotoxic risk classification in human, our data using a mouse model show a decreased fertility of more than 50% and 90% in males treated with a 'low gonadotoxic' dose of CYP and VCR, respectively. The administration of these drugs during induction and consolidation chemotherapy could therefore have long-term adverse effects on fertility in paediatric cancer survivors who have not benefited from a fertility preservation procedure. Moreover, the unrepaired DNA damage following prepubertal chemotherapy exposure might persist and could decrease the chances of fertility restoration for patients who have benefited from the experimental procedure of testicular tissue cryopreservation.

While further research on the impact of chemotherapy on the prepubertal testis is urgently required, human samples remain scarce. Data on animal models could guideline future studies in human and be valuable to investigate the mechanism of action of chemotherapy agents, either administered alone or in combination. These data will help to better inform the paediatric cancer patients about the risks of chemotherapy for their future fertility and to propose fertility preservation options.

Methods

Animals, treatments and samples collection. All the animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Rouen Normandy University (under the protocol number APAFiS #18208) and carried out in accordance with French Ministry of Higher Education, Research and Innovation regulation. CD-1 mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed on a 12 h light:12 h dark cycle, with food and water *ad libitum*. In order to respect the 3Rs principle, we have reduced our groups to $n = 6$ mice per group.

Animals were divided randomly into 4 different groups: Untreated, NaCl 0.9%, VCR and CYP groups (Fig. S2a). Mice in the untreated group did not receive any injection. Prepubertal 3-day-old mice either received saline solution (NaCl 0.9% group), cyclophosphamide (CYP group) or vincristine (VCR group). The treatments were administered intraperitoneally in a single dose of 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for vincristine (ONCOVIN, Teva Santé, Paris, France) or 90 mg/kg for cyclophosphamide (ENDOXAN, Baxter, Guyancourt, France). The drugs used in our study are the same as those employed in cancer treatment in humans, as well as the composition of the excipients. The doses chosen are similar to the low concentrations used in induction and consolidation chemotherapy in the clinics and are equivalent to 6 mg/m^2 for VCR and 270 mg/m^2 for CYP. They have been adapted to the murine model with a standard factor to interspecies doses conversion, as recommended by the Food and Drug Administration.

To analyse testicular tissue integrity and the progression of spermatogenesis, testes from 6 *dpp* (D6), 66 *dpp* (D66) and 140 *dpp* (D140) mice were obtained after euthanasia (by decapitation for D6 mice and by CO_2 asphyxiation for D66 and D140 mice). The tunica albuginea was removed with two needles under a binocular magnifier (S8AP0, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) before the fixation of mouse testes in Bouin's solution (2 h for D6 and 7 h for D66 and D140). Testes were dehydrated in graded series of ethanol and xylene washes and embedded in paraffin. Tissue sections (3 μm thick) were cut using a microtome (JungRM 2035; Leica Microsystems GmbH) and mounted on Polysine slides (Thermo Fischer Scientific, Saint-Aubin, France). The left cauda epididymis of sexually mature D66 and D140 mice was used for sperm collection. Spermatozoa were extracted from the cauda epididymis by gentle pressure with needles in M16 medium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Twenty microliters of the suspensions were used to determine sperm counts using a Thoma cell counting chamber under a light microscope (DM4000B, Leica Microsystems GmbH). Sperm count was performed by counting all spermatozoa in 12 medium squares of 0.04 mm^2 area in the hemocytometer.

counting chamber. The rest of the suspensions was centrifuged for 10 min at 300×g. Pellets containing spermatozoa were recovered and either fixed with methanol (1 h, 4 °C) for Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) assays or with 4% (w/v) paraformaldehyde (30 min, 4 °C) for the immunocytochemical detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Spermatozoa were then spread onto glass slides. For aniline blue staining, spermatozoa were resuspended in PBS solution before spreading onto slides and fixed with 3% (v/v) glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) (30 min, RT).

Histological analyses. Testicular tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated with decreasing concentrations of ethanol. Hemalun eosin saffron (HES) staining was performed to visualize seminiferous tubule architecture, as previously described⁵⁴ and periodic acid Schiff reaction (RAL diagnostic, Martillac, France) was used to detect the pink-labelled acrosome of spermatids and visualize the progression of spermatogenesis. Tissue structural integrity was assessed in each HES-stained testicular tissue section by calculating a global lesional score on a scale from 0 to 10 (0–5 for epithelial integrity and 0–5 for nuclear alteration, with 0 representing the complete absence of alteration and 5 representing the most important damage)⁵⁴.

Analyses were conducted with a light microscope (DM4000B, Leica Microsystems GmbH) equipped with a Leica Application Suite software. For each animal, the global lesional score was obtained from 60 cross-sectioned tubules in 2 sections separated by an interval of at least 35 µm.

Sperm analyses. Spermatozoa fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde were stained with haematoxylin (Dako, Les Ulis, France). A modified version of the sperm head morphology classification developed by Burrue et al.⁵⁵ was used to screen sperm head abnormalities. Spermatozoa were assigned to two categories: normal head and abnormal head. Abnormal heads included collapsed, triangular, calyculate and hammer heads. The percentages of isolated flagella, isolated heads and flagellated spermatozoa were also determined.

Sperm chromatin condensation was assessed following aniline blue staining. After a 15-min staining with 5% (w/v) aniline blue (Sigma-Aldrich) at pH 3.5, spermatozoa were counterstained with haematoxylin for 15 s. Slides were then mounted with Eukitt (CML, Nemours, France).

Sperm DNA oxidation was assessed by the immunodetection of 8-OHdG. After fixation with 4% (w/v) paraformaldehyde, sperm DNA was decondensed with 1 M NaOH for 5 min. Spermatozoa were incubated in 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in PBS for 30 min and in HP Block (Dako) for 5 min at RT to block non-specific binding sites and endogenous peroxidases, respectively. Incubation with mouse monoclonal anti-8-OHdG IgGs (2 µg/mL in PBS + 5% (w/v) BSA, clone 15A3, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) was conducted overnight at 4 °C. Then, spermatozoa were incubated with biotinylated goat polyclonal anti-mouse IgGs (TP-060-BN, Thermo Fisher Scientific) for 5 min at RT and with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (TS-060-QPH, Thermo Fisher Scientific) for 5 min. Immunological labelling was revealed after incubation with 3,3'-diaminobenzidine (1:50, Thermo Fischer Scientific) for 1 min. Slides were counterstained with haematoxylin for 15 s and mounted. Negative controls were performed with pre-immune mouse IgGs (SC-2025, SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Positive controls were performed by incubating spermatozoa with 30% (w/v) H₂O₂ for 30 min at RT prior to fixation and 8-OHdG immunostaining.

TUNEL assays were carried out to detect spermatozoa with fragmented DNA. After a 2-min permeabilization in acetone, TUNEL assays were performed using the In Situ Cell Death Detection kit POD (Roche, Mannheim, Germany) for 1 h at 37 °C, following manufacturer's instructions. Slides were mounted in Vectashield with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Positive controls were performed by incubating spermatozoa with DNase I for 15 min at 37 °C before TUNEL assays and negative controls were carried out by omitting the enzyme solution.

For sperm morphology analyses, aniline blue staining and 8-OHdG immunostaining, slides were examined under a DM4000B light microscope (Leica Microsystems GmbH) at a 1000× magnification. Sperm DNA fragmentation was analysed with an Axioskop fluorescence microscope equipped with an AxioCam 503 camera (Carl Zeiss SAS, Marly-le-Roi, France) at a 400× magnification. For each analysis, 500 spermatozoa were counted per animal with n = 6 mice for all groups except for VCR at D66 where n = 5.

Analysis of pregnancy outcome and behavioural testing of offspring. Each male was mated with 2 females; i.e. six males at the age of D66 or D140 were mated with 12 virgin females for each group (Fig. S2b). The mated females were then individually housed. On the day of birth, the number of pups per litter (litter size), sex of pups (sex ratio) and pregnancy rate (number of pregnant females/total number of mated females × 100) were determined in all the litters obtained (58 litters in total). Pups were inspected for any malformation and the number of dead mice was recorded. Five litters per condition were saved except for VCR group where only one litter was obtained. To ensure equality in nutrition and growth rates, the litter size was reduced to 2 females and 2 males from the second day after birth. Pups were weighed daily (from day 2 to 20) and were inspected to evaluate their behavioural and morphological development until the end of the weaning period. This evaluation was carried out according to Van der Meer *et al.*⁵⁶, i.e. each behaviour test was associated with four levels of response: 0 (no response), 1 (low response), 2 (a clear but not yet mature response) or 3 (a mature and full response). The development of locomotion (walking), labyrinth response (righting reflex), somato-sensory response (cliff drop aversion), freeing response (forelimb stick grasp reflex) and muscular strength (bar holding ability) were assessed. Morphological development was also monitored through hair growth, ears elevation and eyes opening. At the end of the weaning period, mothers were euthanised by CO₂ asphyxiation and uteri were removed. Incubation of uteri in 2% (v/v) ammonium sulfide solution (Sigma-Aldrich) for 2 min revealed implantation sites. Post-implantation loss (number of implantation sites – number of live fetuses/total number of implantations) was calculated for 96 females in total (n = 12 for each group).

Analysis of the reproductive organs of the male progeny. Among the pups of each condition, six sexually mature males were randomly selected and euthanized (Fig. S2b). Only two males fathered by the D140 VCR-treated mice have been investigated. Testes were weighed and the left cauda epididymis were removed for sperm counts, as described above. Sperm vitality was assessed following eosin-nigrosin staining. Sperm suspensions were mixed with 1 volume of 1% (w/v) eosin for 30 s and with 2 volumes of 10% (w/v) nigrosin for 40 s. Suspensions were smeared onto slides in order to determine the percentages of live and dead spermatozoa. For sperm vitality analyses, 500 spermatozoa were examined per animal under a DM4000B light microscope (Leica Microsystems GmbH) at a 1000× magnification.

Statistical analyses. Statistical analyses were carried out with the GraphPad Prism v6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Non-parametric Kruskal–Wallis tests followed by Dunn's post hoc tests were performed to assess statistical differences between untreated, NaCl 0.9%, VCR and CYP groups. The non-parametric Mann–Whitney test was used to determine statistical significances between D66 and D140 within a group. The Chi² test was performed to assess statistical differences for pregnancy rate between all the groups. Results are expressed as median (min–max) or mean ± SEM. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Received: 15 June 2020; Accepted: 10 September 2020

Published online: 20 October 2020

References

1. Ward, E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B. & Jemal, A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* **64**, 83–103 (2014).
2. Lacour, B. *et al.* Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000–2004. *Eur. J. Cancer Prev.* **19**, 173–181 (2010).
3. Kaplan, J. A. Leukemia in children. *Pediatr. Rev.* **40**, 319–331 (2019).
4. Jahnukainen, K., Mitchell, R. T. & Stukenborg, J.-B. Testicular function and fertility preservation after treatment for haematological cancer. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **22**, 217–223 (2015).
5. Wallace, W. H. B., Shalet, S. M., Lendon, M. & Morris-Jones, P. H. Male fertility in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Int. J. Androl.* **14**, 312–319 (1991).
6. Nurmio, M. *et al.* Effect of childhood acute lymphoblastic leukemia therapy on spermatogonia populations and future fertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 2119–2122 (2009).
7. Ntemou, E., Alexandri, C., Lybaert, P., Goossens, E. & Demeestere, I. Oncofertility: pharmacological protection and immature testicular tissue (ITT)-based strategies for prepubertal and adolescent male cancer patients. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5223 (2019).
8. Lendon, M., Hann, I. M., Palmer, M. K., Shalet, S. M. & Morris Jones, P. H. Testicular histology after combination chemotherapy in childhood for acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **312**, 439–441 (1978).
9. Chow, E. J. *et al.* Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol.* **17**, 567–576 (2016).
10. Wasilewski-Masker, K. *et al.* Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J. Cancer Surviv.* **8**, 437–447 (2014).
11. Wynn, C., Curaba, M., Vanabelle, B., Van Langendonck, A. & Donnez, J. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum. Reprod. Update* **16**, 312–328 (2010).
12. Lee, S. J. *et al.* American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2917–2931 (2006).
13. Delessard, M. *et al.* Exposure to chemotherapy during childhood or adulthood and consequences on spermatogenesis and male fertility. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1454 (2020).
14. Chemes, H. E. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int. J. Androl.* **24**, 2–7 (2001).
15. Johnson, L. A. *et al.* Formation of cyclophosphamide specific DNA adducts in hematological diseases. *Pediatr. Blood Cancer* **58**, 708–714 (2012).
16. Green, D. M. *et al.* Cumulative alkylating agent exposure and semen parameters in adult survivors of childhood cancer: a report from the St Jude Lifetime Cohort Study. *Lancet Oncol.* **15**, 1215–1223 (2014).
17. Poganitsch-Korhonen, M. *et al.* Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. *Leukemia* **31**, 1460–1463 (2017).
18. Stukenborg, J. B. *et al.* Spermatogonial quantity in human prepubertal testicular tissue collected for fertility preservation prior to potentially sterilizing therapy. *Hum. Reprod.* **33**, 1677–1683 (2018).
19. Liu, M., Hales, B. F. & Robaire, B. Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line. *Biol. Reprod.* **90**, 72 (2014).
20. Smart, E. *et al.* Chemotherapy drugs cyclophosphamide, cisplatin and doxorubicin induce germ cell loss in an in vitro model of the prepubertal testis. *Sci. Rep.* **8**, 1773 (2018).
21. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253–265 (2004).
22. Beaud, H., van Pelt, A. & Delbes, G. Doxorubicin and vincristine affect undifferentiated rat spermatogonia. *Reproduction* **153**, 725–735 (2017).
23. Drumond, A. L., Meistrich, M. L. & Chiarini-Garcia, H. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction* **142**, 145–155 (2011).
24. Dobrzyńska, M. M., Czajka, U. & Słowikowska, M. G. Reproductive effects after exposure of male mice to vincristine and to a combination of X-rays and vincristine. *Reprod. Fertil. Dev.* **17**, 759 (2005).
25. Nikpour, F., Tayefi, H., Mohammadnejad, D. & Akbarzadeh, A. Adverse effects of vincristine chemotherapy on cell changes in seminiferous tubules and cetrorelix GnRH antagonist inhibitory effects in mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **19**, 683–687 (2018).
26. Turner, J. M. A. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* **134**, 1823–1831 (2007).
27. Steilmann, C. *et al.* Aberrant mRNA expression of chromatin remodelling factors in round spermatid maturation arrest compared with normal human spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* **16**, 726–733 (2010).
28. Feng, C.-W.A. *et al.* SOX30 is required for male fertility in mice. *Sci. Rep.* **7**, 17619 (2017).
29. Velez de la Calle, J. F. *et al.* Reproductive effects of the anticancer drug cyclophosphamide in male rats at different ages. *Arch. Androl.* **22**, 251–263 (1989).
30. Sudour-Bonnange, H. *et al.* Fertility preservation in children and teenagers with cancer. *Bull. Cancer* **100**, 727–735 (2013).

31. Romerius, P. *et al.* High risk of azoospermia in men treated for childhood cancer. *Int. J. Androl.* **34**, 69–76 (2011).
32. Subramanyam, S., Laxminarayana, D. & Beaula Helen, K. D. Evaluation of genotoxic potential of vincristine from multiple parameters. *Mutat. Res.* **138**, 55–62 (1984).
33. Choudhury, R. C., Das, B., Misra, S. & Jagdale, M. B. Spermatogonial cytogenetic toxicity of vincristine and its transmission in the germline cells of Swiss mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **21**, 249–257 (2002).
34. Romerius, P. *et al.* Sperm DNA integrity in men treated for childhood cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 3843–3850 (2010).
35. Thomson, A. B. *et al.* Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *Lancet* **360**, 361–367 (2002).
36. Vendramini, V., Robaire, B. & Miraglia, S. M. Amifostine–doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Hum. Reprod.* **27**, 2457–2466 (2012).
37. Nayak, G. *et al.* Sperm abnormalities induced by pre-pubertal exposure to cyclophosphamide are effectively mitigated by *Moringa oleifera* leaf extract. *Andrologia* **48**, 125–136 (2016).
38. Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J. & Gharagozloo, P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **28**, 1 (2016).
39. Fonseca, T. G. *et al.* Environmental relevant levels of the cytotoxic drug cyclophosphamide produce harmful effects in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Sci. Total Environ.* **636**, 798–809 (2018).
40. Bui, A. D., Sharma, R., Henkel, R. & Agarwal, A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia* **50**, e13012 (2018).
41. Delbes, G., Hales, B. F. & Robaire, B. Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol. Hum. Reprod.* **16**, 14–22 (2010).
42. Codrington, A. M., Hales, B. F. & Robaire, B. Spermiogenic germ cell phase—specific DNA damage following cyclophosphamide exposure. *J. Androl.* **25**, 354–362 (2018).
43. Muratori, M. & De Geyter, C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 117–126 (2019).
44. Sakkas, D. *et al.* Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* **11**, 837–843 (1996).
45. Kamal, A. *et al.* Easily decapitated spermatozoa defect: a possible cause of unexplained infertility. *Hum. Reprod.* **14**, 2791–2795 (1999).
46. Saïas-Magnan, J. *et al.* Failure of pregnancy after intracytoplasmic sperm injection with decapitated spermatozoa: case report. *Hum. Reprod.* **14**, 1989–1992 (1999).
47. Morris, I. D., Ilott, S., Dixon, L. & Brison, D. R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum. Reprod.* **17**, 990–998 (2002).
48. Mitchell, R. T. *et al.* Germ cell differentiation in the marmoset (*Callithrix jacchus*) during fetal and neonatal life closely parallels that in the human. *Hum. Reprod.* **23**, 2755–2765 (2008).
49. Signorello, L. B. *et al.* Congenital anomalies in the children of cancer survivors: a report from the childhood cancer survivor study. *J. Clin. Oncol.* **30**, 239–245 (2012).
50. Seppänen, V. I. *et al.* Risk for congenital anomalies in offspring of childhood, adolescent and young adult cancer survivors: congenital anomalies. *Int. J. Cancer* **139**, 1721–1730 (2016).
51. Meistrich, M. L. & Byrne, J. Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer treated with potentially mutagenic therapies. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 1069–1071 (2002).
52. Stumpp, T., Freymüller, E. & Miraglia, S. M. Sertoli cell morphological alterations in albino rats treated with etoposide during prepubertal phase. *Microsc. Microanal.* **14**, 225–235 (2008).
53. Olsen, A., Lindeman, B., Wiger, R., Duale, N. & Brunborg, G. How do male germ cells handle DNA damage?. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **207**, 521–531 (2005).
54. Milazzo, J. P. *et al.* Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum. Reprod.* **23**, 17–28 (2008).
55. Burrell, V. R., Yanagimachi, R. & Whitten, W. K. Normal mice develop from oocytes injected with spermatozoa with grossly misshapen heads. *Biol. Reprod.* **55**, 709–714 (1996).
56. van der Meer, M., Baumans, V., Hofhuis, F. M. A., Olivier, B. & van Zutphen, B. F. M. Consequences of gene targeting procedures for behavioural responses and morphological development of newborn mice. *Transgenic Res.* **10**, 399–408 (2001).

Acknowledgements

The authors thank Antoine Obléte for his support in animal care, Amandine Bironneau for her technical advices on the analysis of tissue integrity, Véronique Sétif for her advices on the assessment of gamete quality. This work was supported by a Ph.D. Grant from Région Normandie and Ligue Nationale Contre le Cancer (awarded to Marion Delessard) and by a funding from Agence de la Biomédecine (#19AMP010, awarded to Christine Rondanino).

Author contributions

M.D. conceived the design of the study, led experiments, acquired, analysed and interpreted data, and drafted the manuscript. J.S. and A.R.F. provided advices during the experimental phase and discussion of the results. L.D. provided advices during the discussion of the results and revision of the manuscript. N.R. and C.R. designed the project and corrected the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74862-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

www.nature.com/scientificreports/



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020



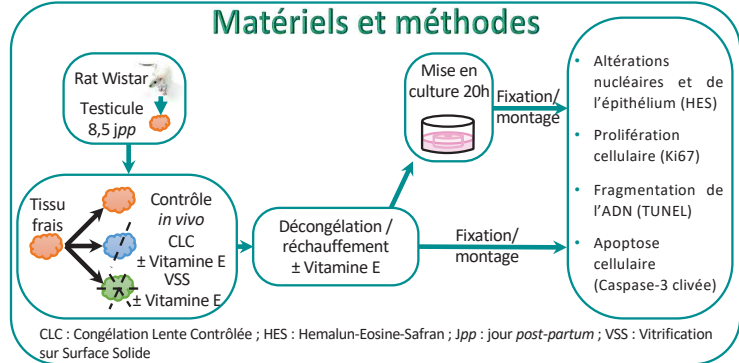
Impact des procédures de congélation sur l'intégrité structurale du tissu testiculaire de rats pré-pubères

Justine Saulnier*, Marion Delessard, Antoine Oblette, Ludovic Dumont, Nathalie Rives, Christine Rondanino
 EA 4308 Gamétogenèse et Qualité du Gamète, Université de Rouen Normandie – CHU-Hôpitaux de Rouen
 22, boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex 1 *e-mail : justine.saulnier1@univ-rouen.fr

Introduction

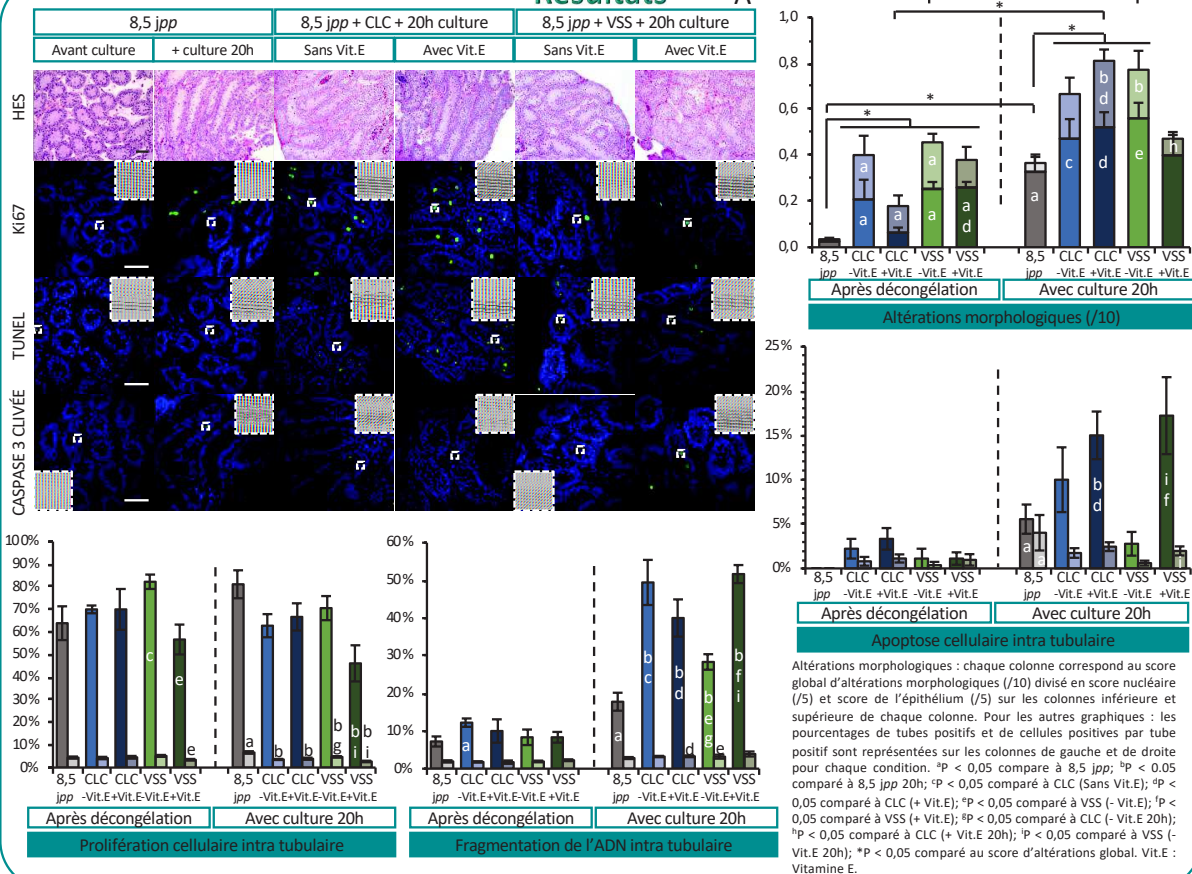
La préservation de la fertilité de garçons pré-pubères atteints de cancer et devant recevoir des traitements potentiellement stérilisants peut s'effectuer par congélation du tissu testiculaire. La restauration de la fertilité de ces patients par maturation *in vitro* du tissu testiculaire décongelé pourrait être envisagée. Des protocoles optimaux de congélation de tissu testiculaire pré-pubère de souris ont été mis au point. Les objectifs de ce travail ont été d'évaluer dans le modèle rat, dont la durée de spermatogenèse est proche de celle de l'homme : (i) l'impact des procédures de congélation sur l'architecture tissulaire, (ii) la balance prolifération/apoptose dans les tubes séminifères et (iii) l'effet de l'ajout d'un antioxydant, la vitamine E, dans le milieu de congélation.

Matériels et méthodes



CLC : Congélation Lente Contrôlée ; HES : Hemalun-Eosine-Safran ; Jpp : jour post-partum ; VSS : Vitrification sur Surface Solide

Résultats



Conclusions

- Peu d'altérations tissulaires sont observées après congélation lente contrôlée ou vitrification (Milazzo et al., 2008, Dumont et al. 2015). Ces deux procédures de congélation permettent donc de préserver le tissu testiculaire de rats pré-pubères.
- La proportion de tubes séminifères contenant des cellules dont l'ADN est fragmenté est plus élevée et la prolifération cellulaire intra-tubulaire est diminuée dans les tissus congelés/décongelés.
- Le pourcentage de tubes séminifères contenant des cellules en apoptose est plus élevé lorsque la congélation est réalisée en présence de vitamine E

Références

Dumont L, Arkoun B, Jumeau F, Milazzo J-P, Bironneau A, Liot D, Wils J, Rondanino C, Rives N. Assessment of the optimal vitrification protocol for pre-pubertal mice testes leading to successful *in vitro* production of flagellated spermatozoa. *Andrology* 2015;3:611–625.
 Milazzo JP, Vaudreuil L, Cauliez B, Gruel E, Massé L, Mousset-Siméon N, Macé B, Rives N. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum Reprod* 2008;23:17–28.

In vitro maturation of fresh and cryopreserved rat prepubertal testicular tissues: optimization of conditions and culture media

Justine Saulnier, Antoine Obléte, Marion Delessard, Aurélie Rives, Ludovic Dumont, Nathalie Rives, Christine Rondanino

EA 4308 Gametogenesis and Gamete Quality (GQG), Rouen Normandy University – CHU Rouen Hospital, 22, boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex 1

Introduction

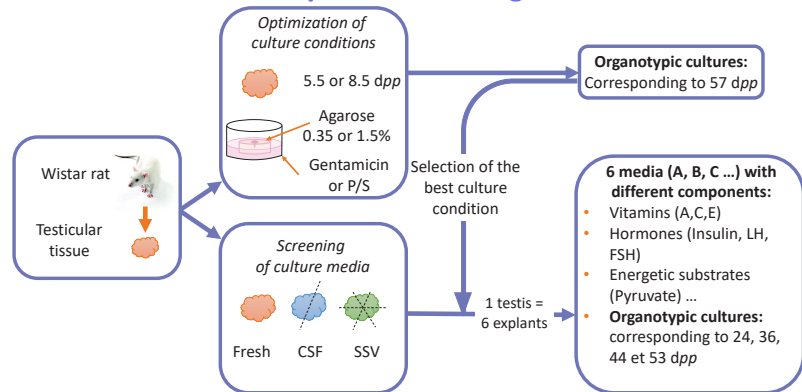
The fertility preservation of prepubertal boys with cancer who need to undergo chemotherapy and/or radiotherapy could be performed by testicular tissue cryopreservation. The *in vitro* maturation of the thawed tissue could be envisaged to restore the fertility of these patients.

The development of organotypic culture in animal models is essential before translation into the clinics.

The aim of this study was to determine:

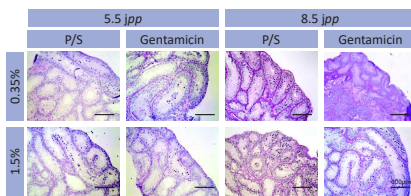
- the optimal culture conditions
- and culture media in order to obtain the best spermatogenic progression in *in vitro* matured rat prepubertal testicular tissues.

Experimental design



CSF: Controlled slow-freezing; dpp: days post-partum; FSH: Follicle Stimulating Hormone; LH: Luteinizing Hormone; P/S: Penicillin/Streptomycin; SSV: Solid surface vitrification

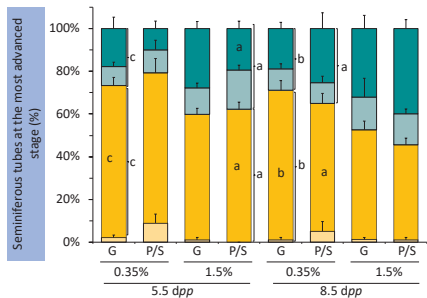
Assessment of the best culture conditions



Histological analyses of fresh prepubertal testicular tissues cultured corresponding to 57 dpp

The PAS (Periodic acid-Schiff) reaction shows the lack of post-meiotic cells (round or elongated spermatids). Post-meiotic cells are characterized by pink staining on their acrosomal cap.

Scale bar: 100 µm; Magnification: x200



■ Sertoli cell
 ■ Spermatogonia
 ■ Leptotene/zygotene spermatocyte
 ■ Pachytene spermatocyte

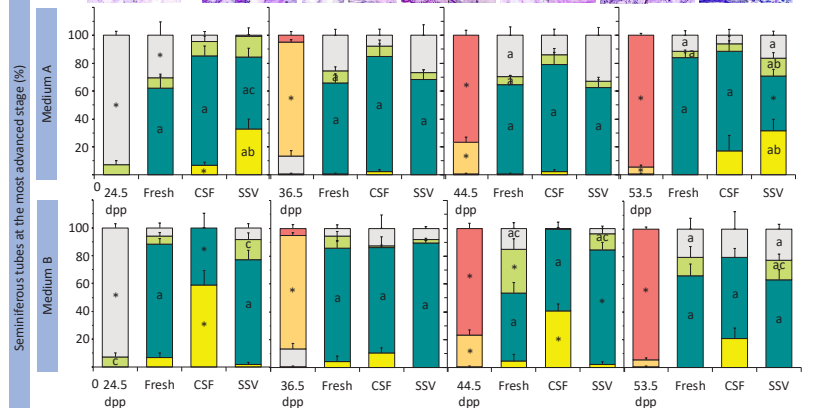
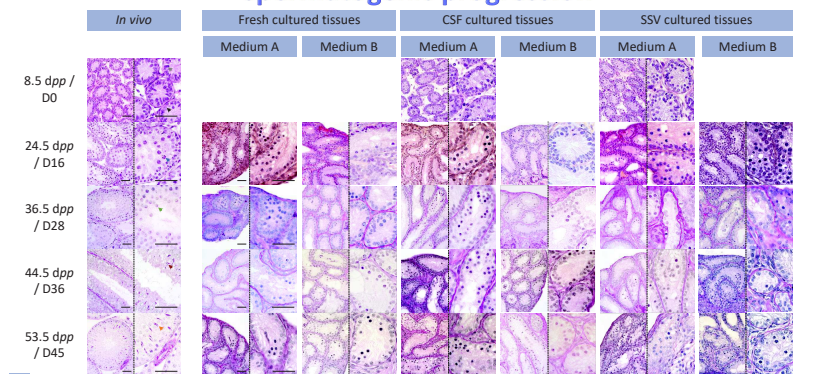
Without meiotic cells
With meiotic initiation

*P < 0.05 compared to 8.5 dpp cultured with penicillin/streptomycin on 1.5% agarose gels; *P < 0.05 compared to 8.5 dpp cultured with gentamicin on 1.5% agarose gels; *P < 0.05 compared to 5.5 dpp cultured with gentamicin on 1.5% agarose gels; for the same stage.

Few effects of the different culture conditions tested separately on spermatogenic progression.

Culture condition selected: 8.5 dpp testes cultured on 1.5% agarose gels. No impact of the antibiotics.

Screening of culture media: impact on spermatogenic progression



■ Sertoli cells ■ Spermatogonia ■ Leptotene/zygotene spermatocytes ■ Pachytene spermatocytes ■ Round spermatids ■ Elongated spermatids

*P < 0.05 compared to *in vivo* control; *P < 0.05 compared to fresh cultured tissue; *P < 0.05 compared to CSF cultured tissue; *P < 0.05 compared to all the other conditions; for the same stage. Scale bar: 50µm; Magnification: x200 (left) and x500 (right).

- All the media allowed the initiation of the meiosis process and the spermatogenic progression until the pachytene spermatocyte stage at D16 of culture (Data not shown for media C, D, E and F)
- Only A and B media maintain the germ cell differentiation until D45
- No effect of the cryopreservation processes on the percentage of differentiated germ cells until D45

Conclusions

An incomplete spermatogenesis was obtained after *in vitro* maturation of rat prepubertal testicular tissues. At D45 of culture, only media A and B allowed a spermatogenic progression until the pachytene spermatocyte stage. The cryopreservation processes did not alter the germ cell differentiation potential. The culture media used in this study must be further optimized to obtain haploid cells before envisioning a transition from bench to bedside.

This work was supported by Fondation de l'Avenir, Paris, France. 2019 (AP-RM-18-031)

Évaluation histologique et moléculaire de tissus testiculaires de rats pré-pubères maturés *in vitro*

Saulnier Justine¹, Chalmel Frédéric², Delessard Marion¹, Dumont Ludovic¹, Rives Aurélie¹, Rives Nathalie¹ et Rondanino Christine¹

¹EA 4308 Gamétogenèse et Qualité du Gamète, Université de Rouen Normandie – Service de Biologie de la Reproduction, CECOS, CHU-Hôpitaux de Rouen; ²Inserm U1085-IRSET, Université de Rennes

Contexte

Les traitements par chimio- ou radiothérapie sont considérés comme étant toxiques pour le tissu testiculaire pré-pubère et peuvent conduire à une infertilité à l'âge adulte. Pour préserver la fertilité des jeunes garçons atteints de cancer, des biopsies testiculaires sont congelées et stockées.

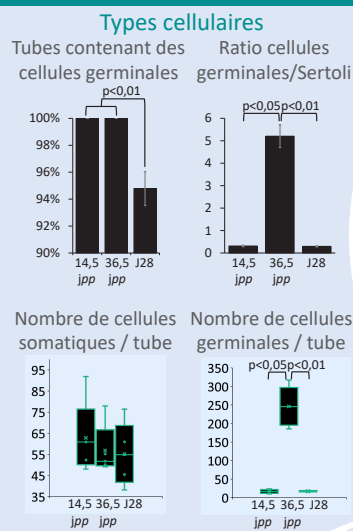
Dans le but de restaurer la fertilité de ces patients, la technique de culture organotypique sur gel d'agarose a été développée mais doit cependant être optimisée avant d'envisager une transposition chez l'homme.

Objectif

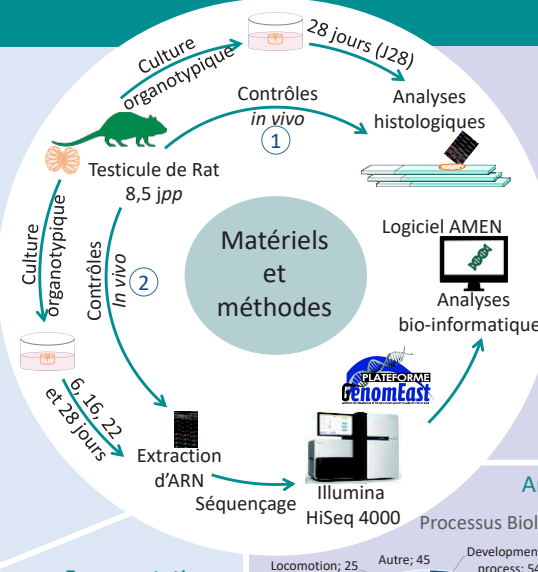
Un arrêt de maturation au stade spermatocyte pachytène est observé lorsque du tissu de rat pré-pubère est cultivé *in vitro*.

L'objectif de cette étude est d'identifier l'origine de l'arrêt de maturation des cellules germinales par une approche histologique et une analyse du transcriptome tissulaire global.

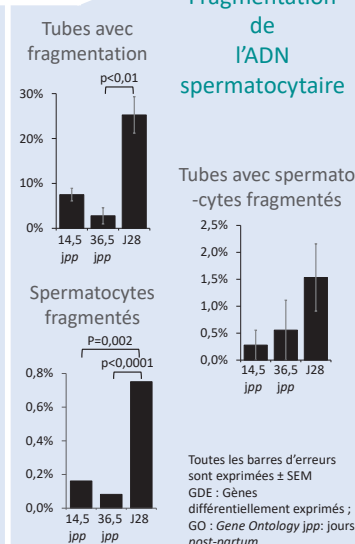
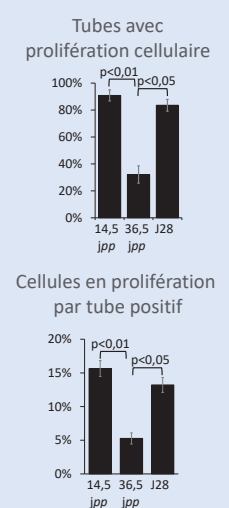
1 Analyses histologiques



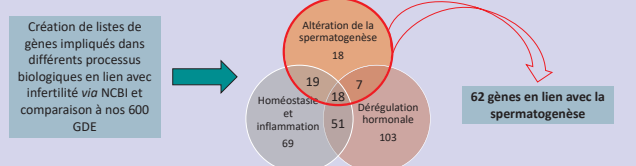
2 Analyses du transcriptome



Prolifération cellulaire



Analyse ciblée des gènes d'intérêt



Conclusion

Les analyses histologiques réalisées ont montré un maintien du tissu de culture à un stade pré-pubère, correspondant à notre 14 jpp. Les analyses du transcriptome tissulaire ont permis de mettre en évidence 600 gènes candidats, pouvant être à l'origine de notre arrêt de maturation. Soixante-deux gènes en lien avec la spermatogenèse ont été identifiés et sont en cours d'analyse. Les données ainsi obtenues vont permettre d'améliorer notre modèle pour obtenir une spermatogenèse complète *in vitro*.

Financement

Projet réalisé avec le soutien de la Fondation de l'Avenir, Paris, France 2020 (AP-RM-18-031)

Résumé : Congélation et maturation *in vitro* de tissus testiculaires de rats prépubères

La préservation de la fertilité des enfants présentant un cancer est depuis plusieurs années devenue une étape importante dans la prise en charge de la qualité de vie après le cancer. La chimiothérapie et la radiothérapie utilisées dans le traitement du cancer peuvent entraîner une infertilité à l'âge adulte. Un protocole de congélation lente contrôlée mis au point au sein du laboratoire permet actuellement de préserver la structure et la fonctionnalité du tissu testiculaire de ces enfants. Afin de restaurer la fertilité de ces patients, différentes méthodes de maturation *in vitro* du tissu testiculaire prépubère ont vu le jour. La culture organotypique sur gel d'agarose permet d'obtenir une spermatogenèse complète à partir de tissus testiculaires prépubères de souris. Cependant, un blocage de la spermatogenèse est observé lorsque ce même protocole est utilisé chez le rat ou chez l'homme. Le rat, dont la durée de la spermatogenèse est intermédiaire entre la souris et l'homme, représente un modèle adéquat pour étudier ce blocage méiotique.

Après validation d'une procédure de congélation chez le rat prépubère, nous avons comparé l'effet de milieux de culture de composition différente sur la progression de la spermatogenèse *in vitro*. Nos résultats montrent une incapacité des milieux testés à soutenir une première vague complète de la spermatogenèse. Des analyses histologiques ont montré un maintien de la fonctionnalité des tissus testiculaires de rats prépubères en culture. Nos résultats suggèrent plutôt une incapacité des milieux de culture à soutenir la différenciation des cellules ayant initié leur méiose. Les analyses RNA-seq réalisées sur ces tissus mettent en évidence une dérégulation importante de l'expression des gènes en lien avec la spermatogenèse, la stéroïdogénèse ainsi que le processus inflammatoire.

Afin de pouvoir envisager une application chez l'homme, il est indispensable de continuer ces travaux par la réalisation de cultures séquentielles, permettant de mimer au mieux les conditions physiologiques, et par l'ajout de molécules anti-inflammatoires dans les milieux de culture. Par ailleurs, l'aplatissement des tissus entre une matrice de PDMS et un gel d'agarose pourrait être envisagé afin d'assurer une meilleure oxygénation et diffusion des nutriments au sein des explants tissulaires.

Mots clés : culture organotypique, spermatogenèse *in vitro*, arrêt de maturation, testicule prépubère, RNA-Seq

Abstract: Freezing and *in vitro* maturation of prepubertal rat testicular tissues

Fertility preservation in children treated for cancer has become an important criterion in the management of quality of life after cancer. Chemo- or radiotherapy treatments used in pediatric cancers can lead to infertility at adulthood. Protocols implemented in our laboratory currently allow the preservation of the structure and functionality of testicular tissue in these children by controlled slow freezing. In order to restore fertility in these patients, methods of *in vitro* maturation of prepubertal testicular tissue have emerged. The organotypic culture on agarose gel allows the completion of *in vitro* spermatogenesis from prepubertal mouse testicular tissues. However, a spermatogenic arrest is observed when the same protocol is used in rats or in humans. The rat, whose duration of spermatogenesis is intermediate between mouse and human, represents a suitable model to study this meiotic arrest.

After validation of the freezing procedures in prepubertal rats, we compared the effect of culture media of different composition on the progression of *in vitro* spermatogenesis. Our results show the inability of the tested media to support a complete spermatogenesis. Tissue analyses showed a maintenance of the functionality of prepubertal rat testicular tissues in culture. Our results rather suggest the inability of culture media to support the differentiation of cells that have initiated meiosis. RNA-seq analyses performed on these tissues revealed a significant deregulation of the expression of genes related to spermatogenesis, steroidogenesis and inflammatory process.

In order to consider a human application, it is essential to continue this work by performing sequential cultures to mimic the physiological conditions as closely as possible, and by adding anti-inflammatory molecules in culture media. Moreover, the flattening of tissues between a PDMS matrix and an agarose gel could be envisaged to allow a better oxygenation and diffusion of nutrients within the tissue explants.

Keywords: organotypic culture, *in vitro* spermatogenesis, maturation arrest, prepubertal testis, RNA-Seq