UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE **Année 2021**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Biologie Santé

Présentée et soutenue publiquement
par

Laura THIROUARD

le 17 décembre 2021

Etude des rôles du récepteur membranaire des acides biliaires (TGR5) dans la physiologie et la physiopathologie testiculaires

---

Rapporteurs : **Pr. Virginie ROUILLER-FABRE**, UMR E-008 / CEA / Université de Paris / Université Paris Saclay
Dr. Thierry TORDJMANN, UMR INSERM U1193 / Université Paris Saclay
Dr. Marie CASTETS, CRCL Lyon / UMR INSERM 1052 / CNRS 5286 / Centre Léon Bérard

Examinateurs : **Pr. Nathalie RIVES**, EA 4308 / Hôpital Charles Nicolle / CHU-Hôpitaux de Rouen

Président du jury : **Pr. Patrick VERNET**, LPC / CNRS UMR6533 / UCA

Directeur de thèse : **Dr. David VOLLE**, iGReD / INSERM U1103 / CNRS UMR 6293 / UCA

Institut GReD – Inserm U1103 – CNRS UMR6293 – Université Clermont Auvergne

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres ayant accepté de participer à mon jury de thèse. Merci à la professeure Virginie ROUILLER-FABRE et aux docteurs Thierry TORDJMANN et Marie CASTETS d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci aux professeurs Nathalie RIVES et Patrick VERNET, tous deux examinateurs, pour l'évaluation de ce travail. Merci à chacun d'entre vous d'accorder de votre temps à la lecture de ce manuscrit et à l'évaluation de mes travaux lors de la soutenance.

Je souhaite remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le docteur David VOLLE, sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir toujours poussée vers le haut, depuis mon stage de Master 2 et encore aujourd'hui. Merci pour le temps que tu as pu m'accorder, qu'il s'agisse de discuter des prochaines manips, d'échanger sur les résultats ou encore de faire de nombreuses répétitions pour préparer les réunions, congrès etc. Merci pour ta rapidité à chaque correction. Quel confort de savoir que je retrouverai mes fichiers corrigés moins de 48h après te les avoir envoyés à chaque fois ! Merci de ne jamais m'avoir refusé de prendre un vendredi après-midi ou un lundi lorsque je souhaitais rentrer dans ma famille, tu as su comprendre que ces week-ends étaient nécessaires à mon efficacité au labo. Merci pour les M&M's et Haribo qui nous apportent beaucoup de réconfort dans les périodes de galère de manips et les semaines denses. Enfin, merci pour tout ce que tu m'as apporté professionnellement, pour ta passion pour la recherche, pour nos longues discussions sur mon projet et ceux de l'équipe, et pour avoir su me guider.

Aux Vollinettes, qui sont devenues des amies plus que des collègues,

Hélène, que serais-je sans toi ? Tu es l'âme de la Team Volle, un peu notre deuxième maman à toutes. Je tiens tout d'abord à te remercier pour toutes les techniques que tu as pu m'apprendre, pour ta patience à chaque fois que j'ai pu te demander « c'est bien comme ça ? » alors que j'avais déjà la réponse. Merci pour tes nombreux conseils, qu'ils soient professionnels ou personnels. Merci pour ta présence infaillible, tu as toujours su m'encourager quand j'en avais besoin et me pousser quand cela devenait nécessaire, avec ton honnêteté et ta franchise légendaires ! Merci d'avoir su me rassurer avant (et après !) chaque réunion, demande de 4ème année, manips qui ne marchaient pas, et j'en passe. Ton soutien m'a été très précieux. Je n'oublie pas nos nombreux débats, musicaux, et sur d'autres sujets. Je crois qu'il y a des choses sur lesquelles on ne se comprendra jamais mais ça fait partie du jeu ! Encore désolée, mes week-ends clermontois étaient remplis de cuisine, de livres et de séries, je te laisse continuer à rêver

de ma « vie secrète », je sens que ça te rassure ! Merci d'avoir proposé, dès la première soirée qu'on a organisée, de nous rejoindre. Ta présence aux barbecues, apéros et autres soirées était un vrai plaisir. De gros bisous à Camille, Clémence et Paille, qui ont rythmé certaines de ces soirées avec beaucoup de joie ! Je garde en mémoire (et sur mon téléphone) les nombreuses prouesses sportives dont vous avez su faire preuve. Encore merci pour tout !

Mélusine, ma collègue de bureau préférée (bon ok tu es la seule mais ça compte quand même !). Je t'ai vu arriver dans l'équipe en Master 2 toute timide et discrète, je ne te qualifierai pas comme cela aujourd'hui, tu t'es intégrée bien vite dans la Team Volle !!! Nos fous rires de désespoir lors des nombreux TUNEL qui ne marchaient pas restent un joli souvenir de nos manips en duo, tout comme la culture cellulaire du lundi matin. Tes coups de gueule contre le monde entier vont sûrement me manquer autant que tes histoires si mouvementées qui nous ont beaucoup fait parler et rire. Merci d'avoir si bien animé nos nombreuses soirées, tout en sobriété (ou pas !). Je garde de précieux souvenirs des apéros, raquettes et couchers de soleil. Merci pour tes nombreux conseils tout au long de ces années, pour tes très nombreuses mises au point de manips et pour avoir souvent été mon dictionnaire des synonymes. Merci d'avoir partagé cette folle aventure qu'est la thèse pendant plus de trois ans avec moi ! Et n'oublie pas de prendre soin de tes microbes !

Manon, mon acolyte des premiers instants. Quelle surprise de te voir arriver dès le premier jour en hurlant un « SALUT !!! » comme si tu connaissais tout le monde depuis des années, j'avoue que j'ai pris un peu peur ! Mais quel plaisir d'avoir partagé ces quatre années de thèse (en plus du stage de Master 2) avec toi. Merci pour ta présence à chaque instant, et merci d'avoir su comprendre les stress pré-réunions que nous connaissons toutes. Merci pour ton côté « un peu plus médical » qui a apporté de nombreux débats dans les réponses aux questions ! Merci d'avoir été notre conseillère en pharmacie dès qu'on avait une interrogation (même si cela te faisait râler). Je n'oublie pas les heures passées, tardivement, à râler l'une et l'autre contre les manips qui ne marchent pas et toutes les autres galères qu'on a pu avoir. Ton caractère quelque peu impulsif et les nombreux débats souvent tendus avec Hélène me manquent déjà ! Nos soirées, apéros et randos restent dans mes meilleurs souvenirs de ces quatre années partagées, sans oublier ton talent au catch et ta résistance (assez faible avouons-le) au vin blanc ! N'oublie pas de bâiller discrètement maintenant que je ne suis plus là pour te le rappeler, et pense bien à dormir 12h par nuit, tu risquerais d'être fatiguée !!! Encore merci pour ta présence ces 4 dernières années.

Manue, j'ai très longtemps entendu parler de toi, avant d'enfin te rencontrer ! Ton arrivée, en pleine période de confinement, a été quelque peu mouvementée mais tu as eu la chance de partager une première « visio-raclette » avec nous qui t'a permis tout de suite de t'intégrer dans la Team Volle. Je tiens à te remercier pour ta présence durant cette année, pour tes conseils avisés et pour nos repas du midi partagés. C'est un plaisir d'avoir pu partager les dernières soirées (un peu trop rares à cause d'un certain virus, malheureusement) avec toi. Je compte sur toi pour le sport, tu as clairement plus de talent que moi, c'est indéniable ! Encore merci pour tes relectures et pour ta présence, c'était agréable de partager cette dernière année avec toi dans l'équipe !

A Tic et Tac, sans vous ma thèse aurait été bien moins animée,

Angélique, je garde en mémoire la folle furieuse qui hurlait pour qu'on lui rende sa roue pendant mon Master 1. Heureusement, j'ai appris à te connaître depuis et j'ai compris qu'il suffisait de ne pas te contrarier pour que tout se passe bien (même si j'aime bien t'embêter de temps en temps quand même !). Merci pour les nombreux génotypages qui m'ont fait gagner beaucoup de temps ! Merci pour les stocks du magasin et les stocks de Tic et Tac, qui restent à jamais bien gardés. J'ai adoré pouvoir échanger avec toi sur toutes les séries qu'on regardait en commun même si d'après Hélène « c'est de la merde ». Nos nombreuses discussions me manqueront, tu m'as beaucoup fait rire pendant ces années ! Pense à te détendre sur les PCR qui ne fonctionnent pas, ça ne sert à rien de ne pas en dormir de la nuit tu sais. Et n'oublie pas de vérifier une dernière fois si tu n'as pas oublié d'éteindre ta lumière ou de ranger tes pipettes bien sûr ! (Bon ok, je me moque, mais il fallait bien non ?). Désolée pour les quelques (nombreuses) fois où j'ai oublié d'aller voir si tes cuves allaient bien, apparemment, ça ne les a pas empêchés de bien migrer, ouf !! Encore merci pour tes nombreux conseils, pour nos discussions et pour ta présence si lumineuse, ça me manquera !

Jean-Paul, merci pour nos nombreuses discussions pendant les manips qui ne me demandaient pas de réflexion (pour les autres, tu savais qu'il fallait fuir !). Et merci d'avoir été le pro des Western Blot, ça m'a sauvée de nombreuses fois, soyons réalistes ! Merci pour les sourires que tu m'as apportés avec tes « jour/nuit » (les interrupteurs sont tes meilleurs amis) et les « Miaou » dans les couloirs. Sans oublier les appels d'un bout du couloir pour finir par entendre un « Merci pour le déplacement ». Ta présence apporte un peu de joie au milieu du labo, merci pour ça !

Aux autres membres de la Team Volle,

Claude, tes blagues très humoristiques me manqueront. Merci pour tes discussions scientifiques et pour tes nombreuses questions. Je n'oublie pas la niche qui a tant plu à Manon et les quelques discussions animées avec Hélène. Merci pour tes conseils en réunion comme sur les manips.

Lucie, quel plaisir de t'avoir dans l'équipe même si on ne croise pas souvent. Merci pour les quelques échanges que l'on a pu avoir. Je suis heureuse que tu continues au sein de l'équipe !

Guerric, Alexis, Elise, Canelle, à chacun de vous qui a fait partie de l'équipe pour quelques semaines ou quelques mois, je garde un joli souvenir de vos passages.

Au GReD,

A mes collègues de repas, à un moment ou à un autre, Adrien, Damien, Erwan, Manon, Julie, Florence, merci pour nos discussions diverses et variées, pour les mots fléchés quand le journal était encore des nôtres. A nos commentaires culinaires, aux uns et aux autres. J'ai apprécié de partager mes midis en votre compagnie !

A toutes les personnes du 3ème étage, que j'ai croisées, pour la plupart, chaque jour, merci pour vos commentaires avisés après chaque réunion. Ça a été un plaisir de partager ces années avec vous, même de loin pour certains.

A Christelle, pour son aide en histo et pour les heures passées entre Scanner et Observer. Merci pour tes très nombreux conseils et pour ta disponibilité à chaque instant.

Yoan, merci de m'avoir ouvert la voie de la bio-informatique, je suis très loin de tout maîtriser mais j'ai beaucoup appris lors de nos réunions RNAseq.

Pierre, merci pour tes macros Fiji qui m'ont sauvé des heures de comptage.

Sandrine, Philippe, Khirredine, merci pour votre précieuse aide à l'animalerie.

Aux GReDuates, pour toutes vos folies. Merci pour les nombreuses soirées que nous avons partagées, c'était un bonheur de vous retrouver à chaque fois. Merci d'avoir participé à l'organisation de tous les événements, avec réussite, incontestablement. Je compte sur vous pour les prochains Teasers du GReD et pour animer toutes les prochaines soirées.

Enfin, à l'ensemble du GReD de m'avoir accueillie ces quatre années, pour les quelques mots échangés dans les ascenseurs le matin, dans les couloirs ou le midi. Merci à tous.

A ma famille, qui m'a toujours soutenue sans relâche,

Papa, Maman, merci de m'avoir toujours poussée vers le haut même quand je pensais ne pas pouvoir aller si loin. Merci d'avoir cru en moi la première fois, en terminale, lorsqu'un de mes profs a évoqué un doctorat qui me paraissait complètement impensable ! Merci de m'avoir soutenue dès le premier jour de mes études, autant financièrement que moralement. Merci de m'avoir encouragée tout au long de mon parcours pour me permettre d'arriver jusqu'ici. Merci d'avoir toujours essayé de comprendre de quoi je parlais et de vous être intéressés à des choses qui peuvent paraître bien obscures quand on n'y connaît rien ! Merci d'être fiers de moi, sans jamais en faire trop. Merci pour tout ce que vous faites depuis 27 ans.

Evan, merci pour ton soutien discret pendant toutes ces années. Je ne désespère pas de te voir répondre aux messages en moins de trois jours, un jour peut-être ! N'oublie jamais que ce n'est pas le nombre d'années d'étude qui fait l'intelligence. Tu as dix fois plus de culture générale que moi, tu es capable d'aller très loin (avec un peu de volonté, sûrement !). Merci pour tes blagues à la Thirouard avec Papa, on ira loin dans l'humour dans la famille (ou pas !).

A mes grands-parents,

Papy Claude, Mamie Jacqueline, Papy Roland, Mamie Denise, merci pour votre soutien et votre présence depuis toujours. Merci de demander des nouvelles de mes souris (elles vont bien, ne vous en faites pas !). Merci de l'intérêt que vous portez à mes études depuis le début. Merci pour les légumes, les bonbons, les gaufres et autres tupperwares que j'ai pu ramener après chaque week-end.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines,

Boulet, Tonton Didier, merci pour ton soutien. Merci de t'être intéressé à ce que je faisais depuis le début de ma thèse, et même avant. N'oublie pas que même avec un « Bac + 8 » (comme tu dirais), on peut dire et faire des conneries, sinon ça ne serait pas drôle !

Thierry, Marie-Claude, Philippe, Evelyne, merci pour votre présence et votre intérêt.

Thomas, Maria, Virginie, Tony, Anne, Victor, Nicolas, Manon, merci de vous être intéressés de près ou de loin à ce que je faisais. Merci pour les soirées familiales (ou les Zoom, confinement oblige) que nous avons partagées.

Noé, Matéo, mes modèles photos préférés. Merci pour vos sourires et merci de prendre aussi bien la pose quand vous me voyez arriver avec mon appareil photo à la main.

A mes ami(e)s, parce que… « On n'est riche que de ses amis, c'est dit »,

Auré, ma meilleure amie, mon inséparable. Qui aurait imaginé il y a bientôt treize ans (aïe, ça fait mal ça !) en échangeant quelques mots sur un forum que notre amitié en serait là aujourd'hui ? A nos deux cents messages échangés par jour (minimum ?! J'ai préféré ne pas compter, ça me faisait un peu peur !). A tes nombreux, et parfois très longs (mais toujours très appréciés) vocaux (je finirai par m'y mettre moi aussi, un jour, peut-être !). A nos skypes et à nos heures au téléphone (c'est comme cela qu'on découvre qu'au bout de 3h un appel est automatiquement coupé, oups ! Bon, il suffit de se rappeler hein, ça n'empêche rien) qui nous permettent de décompresser de journées ou semaines parfois trop longues autant que de discuter de la pluie et du beau temps. Merci pour ta présence de chaque minute, puisque tu sais toujours tout en temps réel. Cette thèse, tu y as participé aussi, de manière complètement différente évidemment, mais par ton soutien indéfectible pendant toutes ces années. Merci d'être celle à qui je dis tout, sans jamais hésiter, tout en sachant que je ne serai jamais jugée. Merci de me comprendre systématiquement entre les lignes et de me connaître aussi bien. Merci de m'accorder ta confiance, les « Il faut absolument que je te raconte », complètement réciproques, me font chaud au cœur. Merci de m'avoir poussée à redécouvrir le bonheur de la lecture (on ne m'arrête plus maintenant). Pour nos goûts musicaux, sur la même longueur d'onde, depuis le premier jour de notre amitié, et pour tous les concerts partagés, moments si précieux et chers à mon cœur. Pour les week-ends et vacances, beaucoup trop rares à notre goût, mais qui sont de vraies parenthèses. Merci pour les « questions » et les méditations, tu sais me pousser vers le haut, merci pour ton influence si positive. La véritable amitié est d'être là, dans les joies, comme dans les peines, ça résume incontestablement la nôtre. Comme le dit le proverbe, « je ne peux pas te promettre de régler tous tes problèmes, mais je peux te promettre que tu ne les affronteras jamais seul », ça nous représente parfaitement bien. Merci pour ta bienveillance, ton soutien et ta présence qui m'ont été plus que nécessaires pendant ces quatre années de thèse. Et comme on dit, *« plus jamais des adieux, rien que des au revoir »*.

A mes coupines, que la vie a mises sur ma route comme par magie. J'en ai entendu des gens me dire que les amis du lycée c'était passager et que ça s'effilerait au fil du temps. Et pourtant, onze années d'amitié, déjà. Les études, le boulot, et la distance n'ont pas eu raison de notre amitié. Merci pour votre présence incontestable depuis toutes ces années et pour votre soutien. Merci pour ces nombreux (quoiqu'on n'en ait jamais assez !) week-ends ou vacances partagés entre fous rires, découvertes et confidences. *« Les années passent, les amis restent, la vie défile »*.

Amélie, merci pour toutes les confidences sur l'oreiller lors de nos nombreuses, et très courtes, nuits. Merci pour tes questions « scientifiques » et tes théories quelque peu étranges mais qui ont le mérite de beaucoup nous faire rire ! Les cours de Première et Terminale en duo me manqueront toujours, surtout les TP de Physique-Chimie et la Philo. Merci pour les fous rires de nuits blanches, et tous les autres.

Charlotte, merci pour ta joie de vivre, si communicative. Merci pour l'organisation de toutes les sorties, on forme une belle équipe ensemble ! Merci de me pousser à faire des choses dont je ne me serais jamais cru capable. Merci de me comprendre dans un regard, sans même une parole, et réciproquement, ces moments me sont précieux. Merci pour ton soutien et ta présence depuis toutes ces années.

Caro, pour nos presque 27 ans d'amitié (bon d'accord il y a eu une longue pause, mais j'adore l'idée qu'on se connaisse depuis que nous sommes bébés !). Merci d'avoir partagé avec moi les méandres administratifs de la thèse. Merci de nous apprendre de nouvelles choses et merci pour ta relecture si précise. Désolée, malgré toutes tes tentatives d'explications, je crois que je n'accrocherai jamais aux films et séries de science-fiction ou de fantaisy. Heureusement, il nous reste la variété française !

Audrey, je garde de si jolis souvenirs de nos soirées et samedis au Mans qui nous ont tant rapprochées. Merci pour ta présence, et pour tes appels à chaque fois que tu sentais que c'était nécessaire, ça m'a beaucoup touchée. Merci d'autant t'intéresser à ce que je fais, malgré nos domaines totalement opposés.

Loïc, merci de t'être si bien intégré au groupe et de participer à nos folies (même si tu prends peur parfois !). Les week-ends et vacances partagés en ta compagnie sont un plaisir !

Jerem, Flo, merci de faire partie du groupe et de vous intéresser à ce que je fais !

Laura, ma chère (ex)-coloc, quel plaisir d'avoir partagé ces deux années de Master avec toi ! Les quiz musicaux en préparant les repas m'ont bien manqué pendant la thèse. Je suis contente d'avoir pu commencer cette aventure avec toi, entre le stage de Master 2 et le concours de l'école doctorale. Nos week-ends se sont faits trop rares mais ont été un grand plaisir partagé à chaque fois ! Merci d'avoir été présente durant ces quatre années de thèse.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications orales et affichées :

Avril 2019 – Congrès GDR Reprosciences – Toulouse

Présentation affichée

Présentation orale flash de 3 minutes

Mai 2019 – Journées de l'école doctorale – Clermont-Ferrand

Présentation affichée

Présentation orale flash de 3 minutes

Lauréate du prix du meilleur poster

Mars 2021 – Journées du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA) – Visioconférence

Vidéo pré-enregistrée de 5 minutes

Présentation en direct de 3 minutes

Avril 2021 – Congrès GDR Reprosciences – Visioconférence

Vidéo pré-enregistrée de 3 minutes

Présentation en direct de 10 minutes

Publications :

Article 1 :

• **TGR5 signaling controls undifferentiated germ cell homeostasis through the GLIS2-TP53 pathway in response to chemotherapy**. En révision.
Laura Thirouard, Hélène Holota, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Angélique De Haze, Christelle Damon-Soubeyrand, Yoan Renaud, Jean-Paul Saru, Claude Beaudoin, David H Volle.

Article 2 :

• **TGR5 is a potential actor of tumoral process in testicular germ cell cancers**. En préparation.
Laura Thirouard, Hélène Holota, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Emanuelle Martinot, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H Volle.

Annexe 1 :

• **Analysis of the Reversible Impact of the Chemodrug Busulfan on Mouse Testes**. Cells (2021).
Laura Thirouard, Hélène Holota, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H Volle.

Annexe 2 :

• **Multigenerational impacts of bile acid exposure are mediated by TGR5 signaling pathways**. Scientific Report (2018).

Marine Baptissart, Lauriane Sedès, Hélène Holota, Laura Thirouard, Emmanuelle Martinot, Angélique de Haze, Betty Rouaisnel, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H. Volle.

Revues (non présentées ici) :

• **New perspectives on PPAR, VDR and FXRα as new actors in testicular pathophysiology**. Molecular aspects of medicine (2021). Review.
Mélusine Monrose, Laura Thirouard, Manon Garcia, Hélène Holota, Angélique De Haze, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H Volle.

• **FXRα modulates leydig cell endocrine function in mouse**. Molecular and cellular endocrinology (2020). Review.
Hélène Holota, Laura Thirouard, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H Volle.

• **Farnesoid X receptor alpha (FXRα) is a critical actor of the development and pathologies of the male reproductive system**. Cellular and molecular life sciences (2019). Review.
Manon Garcia*, Laura Thirouard*, Mélusine Monrose, Hélène Holota, Angélique de Haze, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H. Volle.

• **Nuclear receptor metabolism of bile acids and xenobiotics : a coordinated detoxification system with impact on health and diseases**. International Journal of Molecular Sciences (2018). Review.
Manon Garcia, Laura Thirouard, Lauriane Sedès, Mélusine Monrose, Hélène Holota, Françoise Caira, David H. Volle, Claude Beaudoin.

• **Cholesterol : a gatekeeper of male fertility ?** Frontiers in endocrinology (2018). Review.
Lauriane Sedès, Laura Thirouard, Salwan Maqdasy, Manon Garcia, Françoise Caira, Jean-Marc A. Lobaccaro, Claude Beaudoin, David H. Volle.

Articles supplémentaires (non présentés ici) :

• **FXRalpha gene is a target gene of hCG signaling pathway and represses hCG induced steroidogenesis. Journal of steroid biochemistry and molecular biology** (2019).

Hélène Holota, Laura Thirouard, Manon Garcia, Mélusine Monrose, Angélique de Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H. Volle.

• **Crosstalk between BPA and FXRα signaling pathway lead to alterations of undifferentiated germ cell homeostasis and male fertility disorders**. Stem Cell Reports (2018).
Lauriane Sedès, Christèle Desdoits-Lethimonier, Betty Rouaisnel, Hélène Holota, Laura Thirouard, Laurianne Lesne, Christelle Damon-Soubeyrand, Emmanuelle Martinot, Jean-Paul

Saru, Séverine Mazaud-Guittot, Françoise Caira, Claude Beaudoin, Bernard Jégou, David H. Volle.

Autres :

• **Intestinal microbiota defines the GUT-TESTIS axis**. Gut (2021). Letter to the editor. Emmanuelle Martinot, Laura Thirouard, Hélène Holota, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Claude Beaudoin, David H Volle

RÉSUMÉ

Résumé

L'incidence des troubles de la fertilité augmente depuis de nombreuses années et concerne actuellement 10 à 15 % des couples dans le monde. Dans 30 % des cas d'infertilité d'origine masculine, les causes restent inexpliquées. Dans le cadre de la recherche de nouvelles causes mises en jeu, une association entre les troubles hépatiques (corrélés à une augmentation des taux plasmatiques d'acides biliaires) et les troubles de la fertilité a été observée. Un impact délétère des acides biliaires, dépendant du récepteur membranaire TGR5, sur la physiologie testiculaire et, à terme, sur la fertilité a été démontré. L'ensemble de ces données a mené à l'étude des rôles du récepteur TGR5 dans la physiologie et la physiopathologie testiculaires.

Le rôle de TGR5 a été étudié dans la spermatogenèse en réponse à un traitement de chimiothérapie (le busulfan) sur un modèle murin. Le busulfan est une molécule couramment utilisée dans l'étude de la spermatogenèse. Nos résultats montrent que l'invalidation du gène codant pour TGR5 chez la souris permet de minimiser les effets délétères à long terme de la chimiothérapie. A l'inverse, l'activation de TGR5, induite par un régime supplémenté en acide cholique, en parallèle du traitement au busulfan, conduit à un retard dans le redémarrage de la spermatogenèse. Des analyses transcriptomiques ont mis en évidence que la protection induite par l'invalidation du gène codant pour TGR5 est associée à la surexpression de *Glis2*. Cette surexpression permet de contrecarrer les effets du busulfan sur l'activation de la voie de signalisation TP53, associée à l'apoptose des cellules germinales.

Par ailleurs, l'implication de TGR5 dans les cancers germino-testiculaires a été évaluée *in silico* et *in vitro*. Une dérégulation des gènes de pluripotence, impliqués dans le développement des cancers germino-testiculaires, et une diminution de la prolifération cellulaire ont été observées en l'absence de TGR5. Ces résultats suggèrent que TGR5 pourrait être impliqué dans le développement des cancers germino-testiculaires.

L'ensemble des travaux réalisés suggère que (1) TGR5 est un acteur majeur dans la spermatogenèse après un dommage testiculaire induit par un traitement anti-cancéreux, (2) TGR5 joue un rôle clé dans l'homéostasie des cellules germinales souches testiculaires, (3) TGR5 pourrait être impliqué dans le développement du cancer testiculaire.

Mots clés : Spermatogenèse, TGR5, Acides biliaires, Cancer testiculaire, Chimiothérapie.

Abstract

The incidence of fertility disorders has been increasing for many years and currently affects 10 to 15 % of couples worldwide. In 30 % of male infertility cases, the causes remain unexplained. In the search for new causes, an association between liver disorders (correlated with an increase in plasma bile acid levels) and fertility disorders has been observed. A deleterious impact of bile acids, through their G-protein coupled receptor TGR5, on testicular physiology and, ultimately on fertility has been demonstrated. All these data led to the study of the roles of TGR5 on testicular physiology and pathophysiology.

The role of TGR5 on germ cell lineage was studied in mouse model in response to chemotherapy treatment using busulfan, which is commonly used in the study of spermatogenesis. Our results show that the invalidation of the gene coding for TGR5 in mice minimizes the long-term deleterious effects of chemotherapy. Conversely, the activation of TGR5, induced by a cholic acid supplemented diet, in parallel with busulfan treatment, leads to a delay in the reappearance of spermatogenesis. Transcriptomic analyses have shown that the protection induced by the invalidation of the gene coding for TGR5 is associated with the overexpression of *Glis2*. This overexpression counteracts the effects of busulfan on the activation of the TP53 signaling pathway, associated with germ cell apoptosis.

Furthermore, the involvement of TGR5 in germ cell cancers was evaluated *in silico* and *in vitro.* A deregulation of the expression profile of pluripotency genes, known to be involved in the development of testicular germ cell cancer, and a decrease in cell proliferation were observed in the absence of TGR5. These results suggest that TGR5 may be involved in the development of testicular germ cell cancer.

Taken together, these findings suggest that (1) TGR5 is a major player in spermatogenesis after chemotherapy-induced testicular damage, (2) TGR5 plays a key role in testicular spermatogonial stem cell homeostasis, (3) TGR5 might be involved in testicular germ cell cancer.

Key words: Spermatogenesis, TGR5, Bile acids, Testicular cancer, Chemotherapy.

ABRÉVIATIONS

Abréviations

3βhsd	*3β-HydroxySteroid Dehydrogenase*
ABP	*Androgen Binding Protein*
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFP	Alpha FétoProtéine
AKT	*AKT Serine/Threonine Kinase*
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPc	AMP Cyclique
AR	*Androgen Receptor*
ARNm	Acide RiboNucléique Messager
ASBT	*Apical Sodium-dependent Bile acid coTransporter*
ASK	*Activator of S-phase Kinase*
ATP	Adénosine TriPhosphate
B-hcg	*β-Human Chorionic Gonadotropin*
BAAT	*Bile Acid Amino acid Transferase*
BACS	*Bile Acid CoA Synthase*
BAK1	*Bcl-2 Antagonist/Killer 1*
BAX	*Bcl-2 Associated X*
BCL-2	*B-Cell cll/Lymphoma 2*
BEP	Bléomycine, Etoposide, Cisplatine
BHT	Barrière Hémato-Testiculaire
BID	*Bh3 Interacting Domain death agonist*
Blimp1	*B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1*
BPA	BisPhénol A
BRDT	*BRomoDomain Testis-specific*
BRDU	BRomoDésoxyUridine
BSH	*Bile Salt Hydrolases*
CA	*Cholic Acid*
CAR	*Constitutive Androstane Receptor*
CAT	*CATalase*

CCK	*CholeCystoKinin*
CCND1	*CyCliN D1*
CCND2	*CyCliN D2*
CCSS	*Childhood Cancer Survivor Study*
CDCA	*ChenoDeoxyCholic Acid*
CDH1	*CaDHerin 1*
CECOS	Centres d'Etudes et de Conservation des Œufs et du Sperme
CFTR	*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*
CHK1	*CHeckpoint Kinase 1*
CLDN3	*CLauDiN3*
CLPTM1L	*Cleft Lip and Palate TransMembrane protein 1-Like protein*
CNX43	*CoNneXin 43*
CP-2	*Cyclic Protein-2*
CRE	*cAMP Response Element*
CREB	*cAMP Response Element-Binding protein*
CSF1	*Colony-Stimulating Factor 1*
CXCR4	*C-X-C motif chemokine Receptor 4*
CYP26B1	*CYtochrome P450 family 26 subfamily B member 1*
CYP27A1	*CYtochrome P450 family 27 subfamily A member 1*
CYP7A1	*CYtochrome P450 family 7 subfamily A member 1*
CYP7B1	*CYtochrome P450 family 7 subfamily B member 1*
CYP8B1	*CYtochrome P450 family 8 subfamily B member 1*
DAZL	*Deleted in AZoospermia Like*
DCA	*DeoxyCholic Acid*
DDT	*DichloroDiphenylTrichloroethane*
DDX4	*DeaD-boX helicase 4*
DIO2	*Deiodinase IOdothyronine type 2*
DMRT1	*Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1*
DNMT3B	*DNA MethylTransferase 3 Beta*
DPPA3	*Developmental PluriPotency Associated 3*
E2F1	*E2F transcription factor 1*
EBV	*Epstein-Barr Virus*

EC	*Embryonal Carcinoma*
EC50	*half maximal Effective Concentration*
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor*
EMT	*Epithelial-Mesenchymal Transition*
ERCC1	*Excision Repair Cross-Complementation group 1*
ERK	*Extracellular signal-Regulated Kinases*
ERβ	*Estrogen Receptor Beta*
EZH2	*Enhancer of Zeste Homolog 2*
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorting*
FGF	*Fibroblast Growth Factor*
FIV	Fécondation *In Vitro*
FKBP6	*FK506 Binding Protein 6*
FOXD3	*FOrkhead boX D3*
FSH	*Follicle-Stimulating Hormone*
FSHR	*Follicle Stimulating Hormone Receptor*
FXRα	*Farnesoid-X Receptor Alpha*
GCNIS	*Germ Cell Neoplasia In Situ*
GDF3	*Growth Differentiation Factor 3*
GDNF	*Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor*
GDP	*Guanosine DiPhosphate*
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GFRA1	*Gdnf Family Receptor Alpha-1*
GLIS2	*GLI-Similar 2*
GLP-1	*Glucagon-Like Peptide 1*
GLUT	*GLUcose Transporter*
GnRH	*GoNadotropin Releasing Hormone*
GPBAR1	*G Protein-coupled Bile Acid Receptor 1*
GPCR	*G Protein-Coupled Receptor*
GPER	*G Protein-coupled Estrogen Receptor*
GST	*Glutathione S-Transferase*
GTP	*Guanosine TriPhosphate*

HNF4A	*Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha*
IBABP	*Ileal Bile Acid Binding Protein*
ID4	*Inhibitor of Dna binding 4*
IGF-1	*Insulin-like Growth Factor-1*
IGF-2	*Insulin-like Growth Factor 2*
IL-12	*Interleukine 12*
IRSET	Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail
JAK2	*JAnus Kinase 2*
kDa	Kilo DAlton
KIT	*kit proto-oncogene, receptor Tyrosine KInase*
KRAS	*Kirsten RAt Sarcoma viral proto-oncogene*
LCA	*LithoCholic Acid*
LD	*Linkage Disequilibrium*
LDH	*Lactate DesHydrogenase*
LH	*Luteinizing Hormone*
LIF	*Leukemia Inhibitory Factor*
LPS	*LipoPolySaccharide*
MAEL	*MAELstrom spermatogenic transposon silencer*
MAPK	*Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCT	*MonoCarboxylate Transporters*
MDM2	*Mouse Double Minute 2 homolog*
MnSOD	*MaNganese SuperOxide Dismutase*
mTOR	*Mammalian Target Of Rapamycin*
MYOD	*MYOblast Determination protein* 1
NANOG	*Nanog homeobox*
NF-κB	*Nuclear Factor Kappa B*
NGN3	*NeuroGeNin 3*
NRG1	*NeuReGulin 1*
NRG3	*NeuReGulin 3*
NSE	*Neuron Specific Enolase*
NTCP	*Na^+ dependent Taurocholate Cotransport Peptide*
NXF2	*Nuclear rna eXport Factor 2*

OATP1B1	*Organic Anion TransPorter 1B1*
OCT3/4	*OCTamer-binding protein 3/4 (pou5f1)*
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPR-1	*12-OxoPhytodienoate Reductase 1*
OSTα/β	*Organic Solute Transporter α/β*
p,p'-DDE	*p,p'-DichloroDiphenyldichloroEthylene*
PA	*Plasminogen Activator*
PAX7	*PAired boX 7*
PCB	PolyChloroBiphényles
PDE11A	*PhosphoDiEsterase 11A*
PDGF	*Platelet Derived Growth Factor*
PGC	*Primordial Germ Cells*
PI3K	*PhosphatidylInositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase*
PKA	*Protein Kinase A*
PKB	*Protein Kinase B*
PLAP	*Placental-Like Alkaline Phosphotase*
PLZF	*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger protein*
PRC2	*Polycomb Repressive Complex 2*
PRDM14	*PR DoMain-containing protein-14*
PRM1	*PRotaMine 1*
PRM2	*PRotaMine 2*
PTEN	*Phosphatase and TENsin homolog*
PXR	*Pregnane X Receptor*
RA	*Retinoic Acid*
RARα	*Retinoic Acid Receptor alpha*
RET	*REarranged during Transfection*
ROS	*Reactive Oxygen Species*
SALL4	*SAL-Like protein 4*
SAT2	*Spermidine/Spermine n1-AcetylTransferase 2*
SCF	*Stem Cell Factor*
SF-1	*Steroidogenic Factor-1*
SIK1	*Salt Inducible Kinase 1*

SNP	*Single Nucleotide Polymorphism*
SOD	*SuperOxide Dismutase*
SOHLH1	*Spermatogenesis and Oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix 1*
SOHLH2	*Spermatogenesis and Oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix 2*
SOX2	*Sex determining Region Y-bOX 2*
SOX3	*Sex determining Region Y-bOX 3*
SPRY4	*SPRoutY rtk signaling antagonist 4*
SSC	*Spermatogonial Stem Cell*
STAT3	*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
STRA8	*STimulated by Retinoic Acid gene 8*
T3	Hormone Tri-Iodothyronine
T4	Thyroxine
TCGA	*The Cancer Genome Atlas*
TDRG1	*Testis Developmental Related Gene 1*
TDS	*Testicular Dysgenesis Syndrome*
TERT	*TElomerase Reverse Transcriptase*
TGCT1	*Testicular Germ Cell Tumor susceptibility 1*
TGFα	*Transforming Growth Factor alpha*
TGFβ	*Transforming Growth Factor Beta*
TGR5	*Takeda G protein-coupled Receptor 5*
TGT	Tumeur Germino-Testiculaire
TLR4	*Toll Like Receptor 4*
TNFα	*Tumor Necrosis Factor alpha*
TNP1	*TraNsition Protein 1*
TNP2	*TraNsition Protein 2*
TP53	*Tumor Protein 53*
TRIM71	*TRIpartite Motif containing 71*
TUNEL	*Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUtp Nick End Labeling*
UDCA	*UrsoDeoxyCholic Acid*
VDR	*Vitamin D Receptor*
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
WES	*Whole Exome Sequencing*

WNT	*Wingless iNTegration site*
YAP	*Yes-Associated Protein*
YST	*Yolk Sac Tumor*

TABLES DES MATIÈRES

Table des matières

INTRODUCTION 1

Avant-propos 2

Partie 1. Le récepteur membranaire des acides biliaires : TGR5 (GPBAR1) 4

A. Le récepteur TGR5 4

1. Identification et expression 4

2. Structure et isoformes 4

3. Ligands 5

a) Rôles des acides biliaires 6

b) Synthèse des acides biliaires 7

i. Initiation 7

ii. Production des acides biliaires 8

c) Conjugaison 8

d) Biotransformation intestinale 9

e) Cycle entéro-hépatique 9

B. Les rôles de TGR5 10

1. TGR5 participe au contrôle du métabolisme des acides biliaires 11

2. TGR5 est impliqué dans la dépense énergétique 12

3. L'activation de TGR5 favorise la régulation de la glycémie 13

4. TGR5 présente une activité anti-inflammatoire 14

5. TGR5 est impliqué dans de nombreux cancers 15

a) Rôle pro-tumoral de TGR5 15

b) Rôle anti-tumoral de TGR5 17

6. Les acides biliaires conduisent à une altération de la fertilité *via* TGR5 18

Partie 2. Physiologie testiculaire 20

A. Développement embryonnaire et néonatal 23

1. *Primordial Germ Cells* - Gonocytes 23

2. Transition gonocytes - spermatogonies 24
B. Mise en place de la niche des cellules germinales souches 25
1. Les cellules germinales 26
2. Les cellules de Sertoli 26
3. Les autres types cellulaires 27
C. La spermatogenèse 27
1. Maintien de la niche des cellules germinales souches 27
2. Le devenir des spermatogonies : prolifération et différenciation 29
a) Phase proliférative 29
b) Les différents marqueurs de spermatogonies 30
c) Différenciation des spermatogonies indifférenciées 33
3. Méiose 35
4. Spermiogenèse 37
5. Spermiation 40
Partie 3. Cancer et fertilité 42
A. Le cancer testiculaire 42
1. Epidémiologie 42
2. Tumeurs germinales du testicule 42
a) Les différents sous types de tumeurs germino-testiculaires 42
i. Séminomes 43
ii. Non-séminomes 43
b) Principaux facteurs de risques 44
c) Etiologie des tumeurs germino-testiculaires 46
i. Lésions précurseures 46
ii. Gènes et voies de signalisation impliqués 47
3. Marqueurs tumoraux et traitements des tumeurs germino-testiculaires 51
a) Marqueurs tumoraux 51

b) Traitements 52
c) Résistance aux traitements 53
B. Impact des traitements de chimiothérapie sur la fertilité masculine 55
1. Epidémiologie 56
a) Traitements chez l'adulte 56
b) Cancers pédiatriques 56
2. Impact des traitements de chimiothérapie sur la lignée germinale mâle 57
a) Le cisplatine 57
b) Le busulfan 58
3. Préservation de la fertilité 60
Objectif du travail de thèse 62
RÉSULTATS 64
Article 1 65
A. Introduction 65
B. Discussion 67
1. Quel est le rôle de TGR5 dans l'homéostasie des cellules progénitrices et des spermatogonies indifférenciées ? 67
2. Comment TGR5 module-t-il l'apoptose des cellules germinales ? 70
3. Comment l'activation de TGR5 permet de sensibiliser au busulfan ? 72
4. TGR5 est-il impliqué dans la qualité spermatique ? 73
5. Quel est l'impact du busulfan et le rôle de TGR5 sur les liens entre le foie, l'intestin et le testicule ? 74
6. La modulation de TGR5 pourrait-elle être utilisée en thérapeutique ? 76
Article 2 79
A. Introduction 79
B. Discussion 82
1. Quel est le rôle de TGR5 dans la physiologie des cellules souches ? 82
2. TGR5 est-il impliqué dans les caractéristiques tumorales des cellules ? 83

3. Quel est le lien entre TGR5 et TP53 dans la chimiorésistance ? 84
4. Existe-t-il un lien entre TGR5, cancer germino-testiculaire et épigénétique ? 85
5. TGR5 module-t-il la différenciation cellulaire ? 86
6. Quel pourrait être le rôle de TGR5 en thérapeutique ? 89
DISCUSSION GÉNÉRALE 91
Discussion générale 92
A. TGR5 contrôle-t-il l'homéostasie des cellules souches ? 92
1. TGR5 régule l'expression de gènes de pluripotence 92
2. Régénération tissulaire après un dommage 93
3. Implication de TGR5 dans la mise en place de la spermatogenèse 95
4. Rôle de TGR5 dans la différenciation des cellules germinales 96
a) Spermatogenèse 96
b) Cancer testiculaire 97
i. Initiation du cancer testiculaire 97
ii. Différenciation des cellules germinales tumorales 98
B. La modulation de TGR5 peut-elle être utilisée dans un cadre clinique ? 99
1. Utilisation de TGR5 en clinique 99
a) Repro-toxicité 99
b) Chimiosensibilisation des cellules tumorales 100
2. Etude de cohortes 101
C. Comment TGR5 est-il modulé dans le testicule ? 102
1. Régulation de l'expression de TGR5 102
2. Modulation de l'activité de TGR5 104
ANNEXES 107
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 110

INTRODUCTION

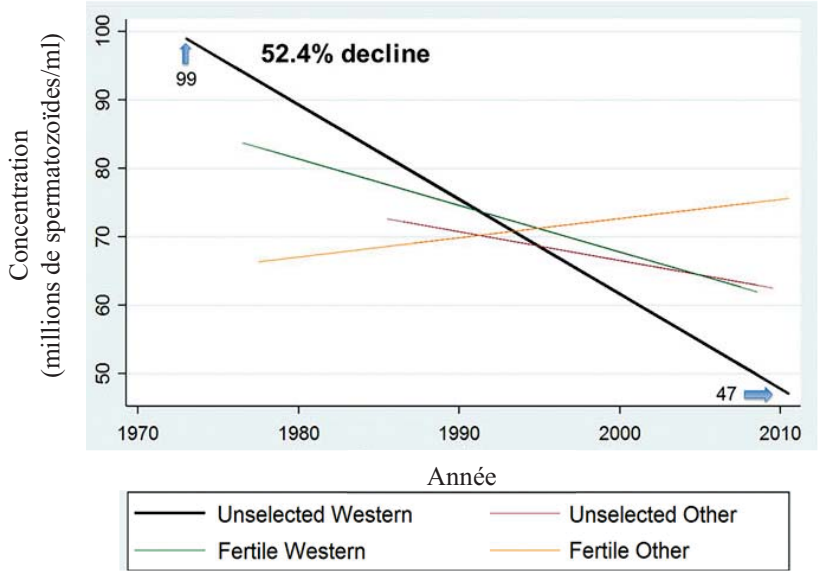


Figure 1 : Méta-analyse de la concentration en spermatozoïdes selon la fertilité et la localisation géographique. Unselected : non sélectionné selon la fertilité ; Fertile : uniquement les patients fertiles ; Western : Amérique du Nord, Europe, Australie et Nouvelle-Zélande ; Other : Amérique du Sud, Asie et Afrique.
D'après Levine et al., 2017

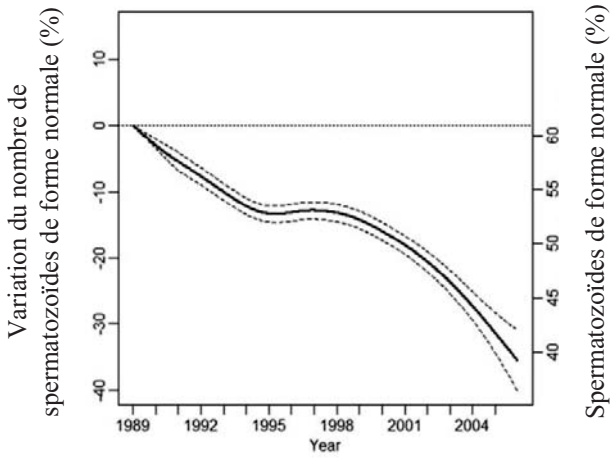


Figure 2 : Variation du nombre de spermatozoïdes présentant une forme morphologique normale.
D'après Rolland et al., 2013

Avant-propos

Depuis de nombreuses années, l'incidence des troubles de la fertilité augmente, touchant actuellement 10 à 15 % des couples dans le monde (Boivin et al., 2007; Datta et al., 2016). D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), un couple est considéré comme stérile s'il présente l'incapacité d'obtenir une grossesse après douze mois de rapports non protégés en l'absence de contraception (Zegers-Hochschild et al., 2009).

Plusieurs études ont démontré que, chez 50 % des couples présentant des troubles de la fertilité, le facteur masculin entre en jeu et que dans 20 % des cas il en est la seule cause. Chez 40 % des patients atteints de stérilité masculine, un défaut d'acheminement des spermatozoïdes dans les voies génitales est observé : il s'agit d'anomalies excrétoires. Pour 60 % des hommes atteints de défaut de fertilité, il s'agit de troubles sécrétoires c'est-à-dire d'une altération de la production de spermatozoïdes par le testicule (Slama et al., 2012). L'ensemble de ces troubles est de plus en plus fréquent : la qualité et la quantité de spermatozoïdes dans l'éjaculat sont en constante diminution depuis les années 1990 (Levine et al., 2017; Rolland et al., 2013; Virtanen et al., 2017) (**Figures 1 et 2**).

Il existe de nombreuses causes de stérilité : l'une des principales concerne les altérations génétiques (Ferlin et al., 2006). Des anomalies chromosomiques, telles que celles retrouvées dans le syndrome de Klinefelter (présence d'un chromosome X surnuméraire), peuvent être mises en cause tout comme les mutations et les polymorphismes retrouvés sur de nombreux gènes tels que ceux codant les protéines CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), AR (*Androgen Receptor* ; NR3C4) ou SF-1 (*Steroidogenic Factor-1* ; NR5A1) (Ferlin et al., 2019). Plus récemment, il a été largement décrit que les facteurs environnementaux étaient également impliqués (Bendayan et al., 2018). L'exposition à des xénobiotiques tels que le bisphénol-A (BPA) ou encore les pesticides a un impact délétère majeur sur la fertilité. En effet, des données épidémiologiques ont mis en évidence une association entre une exposition au BPA et une diminution de la concentration (Ji et al., 2018) et de la qualité des spermatozoïdes (Radwan et al., 2018).

Cependant, dans environ 30 % des cas d'infertilité masculine, les causes restent inexpliquées (Cavallini, 2006; Fainberg and Kashanian, 2019). Il apparaît donc essentiel d'appréhender la physiologie testiculaire afin de mieux comprendre les causes encore inconnues des troubles de la fertilité.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles causes associées aux troubles de la fertilité, une association entre les troubles hépatiques (correlés à des modulations des taux plasmatiques d'acides biliaires) et les troubles de la fertilité a été observée (Mooradian et al., 1985). Dans des modèles animaux, ces troubles hépatiques conduisent à des troubles de la fertilité *via* une atteinte testiculaire (Van Thiel et al., 1985). Des études récentes ont mis en évidence l'impact délétère des acides biliaires sur la fertilité impliquant les récepteurs principaux des acides biliaires TGR5 (*Takeda G protein-coupled Receptor 5*) et FXRα (*Farnesoid-X Receptor Alpha*, Nr1h4) (Baptissart et al., 2014; Martinot et al., 2017).

De plus, l'infertilité est un facteur de risque associé au développement des cancers testiculaires. En effet, le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS, *Testicular Dysgenesis Syndrome*), qui est associé à une qualité de spermatozoïdes amoindrie, à l'hypospadia et à des défauts de descente testiculaire, est également associé au risque de développement de cancer testiculaire (Selvi et al., 2020; Skakkebaek et al., 2001).

L'ensemble de ces données nous a donc conduit à l'étude des rôles du récepteur TGR5 dans la physiologie et la physiopathologie testiculaires afin de mieux comprendre les causes d'infertilité, mais également d'appréhender l'étiologie des cancers germino-testiculaires qui reste très mal connue à l'heure actuelle.

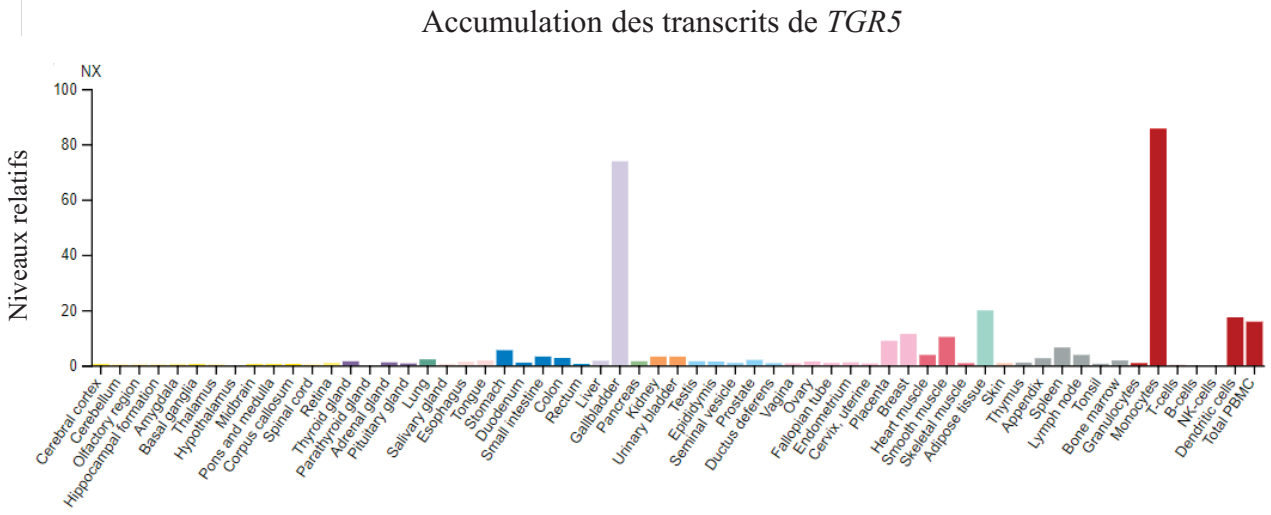


Figure 3 : Accumulation des transcrits de *TGR5* dans les différents tissus chez l'Homme.
D'après The Human Protein Atlas.

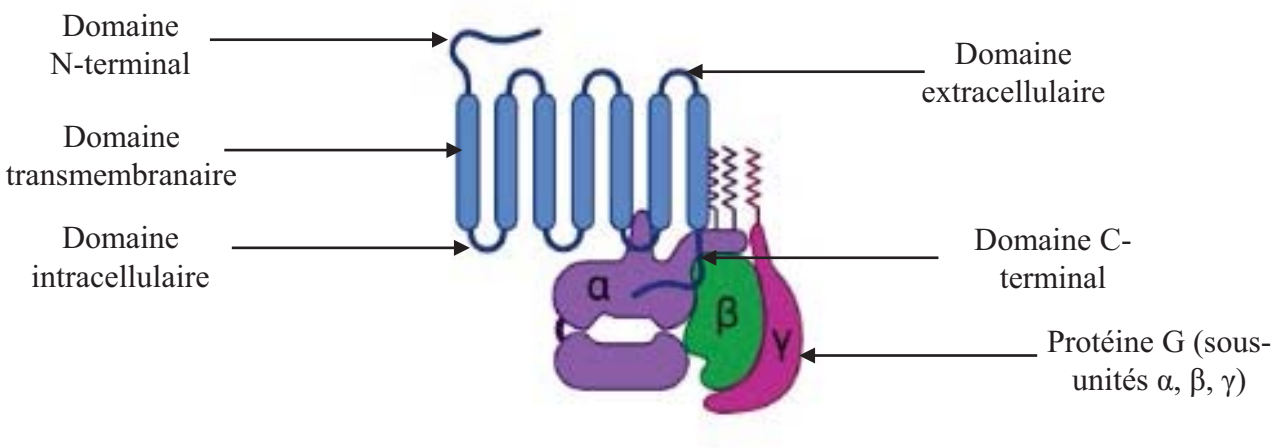


Figure 4 : Structure des récepteurs couplés aux protéines G.
Les récepteurs couplés aux protéines G présentent un domaine N-terminal et un domaine C-terminal, ils possèdent 3 domaines extracellulaires et 3 domaines intracellulaires ainsi que 7 domaines transmembranaires. Ils sont couplés aux protéines G qui présentent 3 sous unités (α, β, γ).
D'après http://biorender.com

Partie 1. Le récepteur membranaire des acides biliaires : TGR5 (GPBAR1)

A. Le récepteur TGR5

Le récepteur TGR5 (*Takeda G protein-coupled Receptor 5*) est un membre de la classe 1 des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPCR : *G Protein-Coupled Receptor*), également connu sous le nom GPBAR1 (*G Protein-coupled Bile Acid Receptor 1*).

1. Identification et expression

Le récepteur TGR5 a été identifié *in silico* dans le cadre de la recherche de nouveaux GPCR sur la base de leur homologie de séquence en acides aminés, ce qui a permis d'isoler le gène codant pour TGR5 (*TGR5*) en 2002 et 2003 (Kawamata, 2003; Maruyama et al., 2002). Ce récepteur a ensuite été classé comme le membre fondateur des récepteurs aux acides biliaires couplés aux protéines G (Foord et al., 2005).

L'expression protéique de TGR5 est ubiquiste mais ce dernier est retrouvé à des taux plus importants dans l'épithélium de la vésicule biliaire, de l'intestin (iléon et colon majoritairement), du muscle squelettique ainsi que du tissu adipeux brun. Il est exprimé également au sein de différents types cellulaires hépatiques à l'exception des hépatocytes (Keitel et al., 2007, 2008) bien que l'expression de *TGR5* ait été démontrée dans une lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire (Yang et al., 2007). Chez l'humain, TGR5 est retrouvé dans les cellules immunitaires, particulièrement dans les monocytes (Kawamata, 2003). Des taux d'ARNm (Acide Ribonucléique Messager) de *TGR5* ont également été détectés dans de nombreux organes tels que le petit intestin, l'estomac, le foie, les poumons, le placenta et la rate (Keitel et al., 2007; Tiwari and Maiti, 2009). Par ailleurs, la présence de transcrits de *Tgr5* a été mise en évidence également dans les testicules murins (Baptissart et al., 2014; Vassileva et al., 2006) et humains (Kawamata, 2003) (**Figure 3**).

2. Structure et isoformes

TGR5 est une protéine de 35kDa (Kilo DAlton) qui fait partie des récepteurs couplés aux protéines G, constitués de 7 domaines transmembranaires (possédant chacun une sous-unité α, deux sous-unités β et deux sous unités γ) ainsi que de trois domaines extracellulaires, trois domaines intracellulaires et d'un domaine N-terminal et C-terminal (**Figure 4**).

Les protéines G couplées à ces récepteurs sont divisées en plusieurs sous-unités également. La sous-unité γ est hydrophobe et permet l'ancrage du complexe de protéines G à

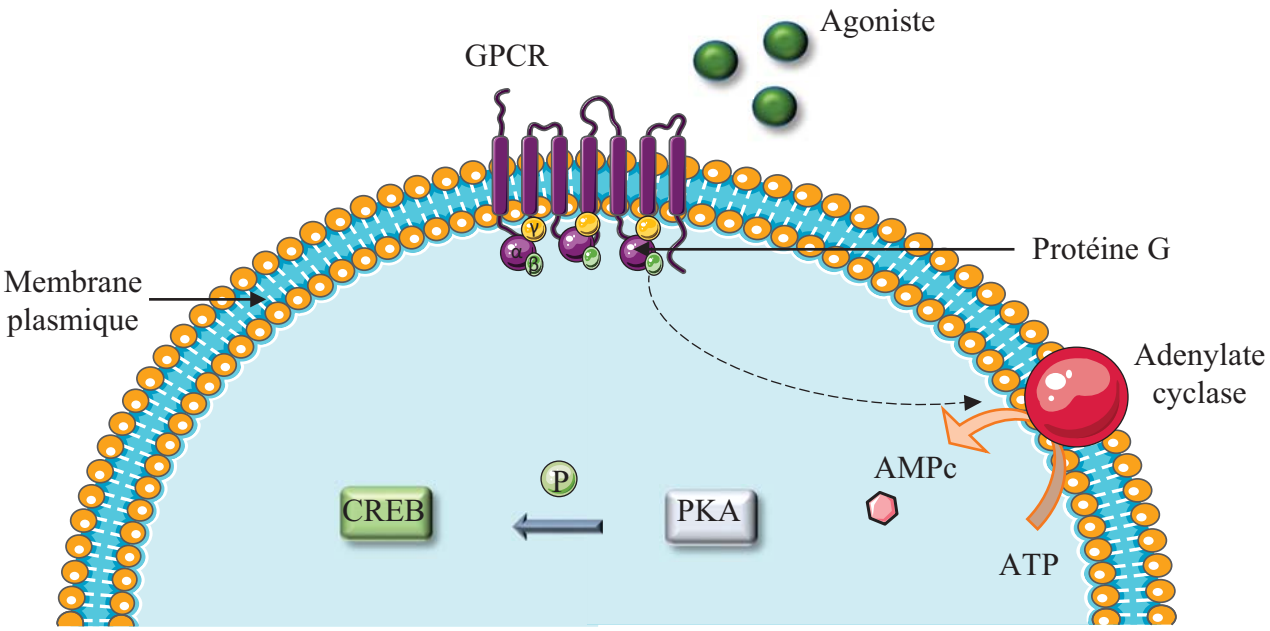


Figure 5 : Signalisation des GPCRs *via* la cascade de signalisation AMPc, PKA et CREB.
L'activation d'un GPCR par son agoniste va entraîner l'activation des protéines G. Les protéines G sont divisées en 3 sous-unités : α, β, γ. La sous-unité γ permet l'ancrage du complexe à la membrane. La sous-unité α est liée au GDP et au récepteur, après fixation d'un ligand le changement de conformation du récepteur va conduire à l'activation de la protéine G-α conduisant à la transformation de la GDP en GTP. Ces protéines G vont activer l'adénylate cyclase permettant le formation de l'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc conduit à l'activation de la PKA qui va phosphoryler le facteur de transcription CREB conduisant à l'activation de gènes cibles.
GPCR : *G Protein-Coupled Receptor* ; AMPc : Adénosine MonoPhosphate Cyclique ; PKA : *Protein Kinase A* ; CREB : *cAMP Response Element-Binding protein* ; GDP : *Guanosine DiPhosphate* ; GTP : *Guanosine TriPhosphate* ; ATP : Adénosine TriPhosphate.

la membrane, alors que les sous-unités α et β sont hydrophiles (Birnbaumer, 1990). La sous-unité α est associée à la GDP (*Guanosine DiPhosphate*) ; en l'absence de signal ce complexe est lié au récepteur. Après fixation d'un ligand, le récepteur change de conformation et est internalisé dans le cytoplasme, ce qui entraîne l'activation de la protéine G-α, conduisant à la transformation de la GDP en GTP (*Guanosine TriPhosphate*) et à la dissociation de la protéine G-α (qui est liée à la GTP) des protéines G-β et G-γ (Masters et al., 1986). Les complexes GTP-α et β-γ se trouvent ancrés à la membrane plasmique et, finalement, l'activité de la sous-unité α se termine par l'hydrolyse du GTP-α qui devient du GDP-α et se ré-associe avec les sous-unités β et γ et avec le récepteur inactif.

L'activation d'une protéine G peut conduire à la production de nombreux messagers secondaires. L'une des cibles majeures des protéines G est l'adénylate cyclase, une enzyme associée à la membrane qui est activée par la fixation de la GTP-α. L'adénylate cyclase catalyse la synthèse de l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate Cyclique) à partir d'une molécule d'ATP (Adénosine Triphosphate). L'AMPc conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui entraîne l'activation du facteur de transcription CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*) (**Figure 5**). Les protéines G peuvent également activer les voies MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et PI3K (*PhosphatidylInositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase*), conduisant respectivement à la phosphorylation des ERKs (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) et de la protéine kinase B (PKB).

Chez l'Homme, TGR5 est codé par un gène constitué de deux exons. L'homologue murin n'en présente qu'un. Il existe peu de polymorphismes décrits. On retrouve le variant SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) annoté rs11554825 qui conduit à la perte de fonction de signalisation du récepteur, associé au développement pathologique d'inflammation des voies biliaires (Hov et al., 2010). En effet, ce variant de TGR5 a été associé à des cas de cholangite sclérosante primitive et de colite ulcéreuse, suggérant qu'il pourrait entraîner une susceptibilité au développement de ces pathologies, et ce, bien que cet effet n'ait pas été démontré génétiquement (Hov et al., 2011). De plus, une étude plus récente a mis en évidence que ce SNP pouvait prédisposer à des modifications du transit au sein du colon et à l'excrétion d'acides biliaires (Camilleri et al., 2014).

3. Ligands

TGR5 a tout d'abord été décrit comme un récepteur orphelin. Afin d'identifier ses ligands, une co-transfection d'un gène rapporteur AMPc couplé à la luciférase avec un vecteur

Classification		Ligands	EC50 (µM)
Acides biliaires	Primaires	CDCA	4,43
		CA	7,72
	Secondaires	DCA	1
		LCA	0,53
	Conjugués	Tauro-LCA	0,29
Autres composés		Acide linolénique	ND
		Acide oléanolique	1,42
Analogues synthétiques		INT-777	1,42
		RO5527239	1,59

Tableau 1 : Différents ligands de TGR5, classification de ces ligands et leurs EC50 en µM.
Le ligand naturel préférentiel de TGR5 est l'acide lithocholique (LCA) tauro-conjugué qui présente un EC50 de 0,29µM. Les acides biliaires secondaires sont les ligands principaux de TGR5 mais il peut également être activé par les acides biliaires primaires. Il existe d'autres composés capables d'activer TGR5 tels que l'acide linolénique et l'acide oléanolique. Des analogues synthétiques : l'INT-777 et le RO5527239 sont également disponibles.
CDCA : *ChenoDeoxyCholic Acid*, CA : *Cholic Acid*, DCA : *DeoxyCholic Acid*, LCA : *LithoCholic Acid*, ND : non déterminé.

d'expression de *TGR5* a été réalisée dans des lignées cellulaires (humaine, HEK295 ou de rongeur, CHO) (Kawamata, 2003; Zhong, 2010). L'activité luciférase a été étudiée en réponse à de nombreux composés afin d'étudier la production d'AMPc correspondant à l'activation de TGR5 (Kawamata, 2003). Les acides biliaires sont alors apparus comme les ligands préférentiels de TGR5, bien que des ligands secondaires soient également décrits.

Les acides biliaires secondaires LCA (*LithoCholic Acid*) et DCA (*DeoxyCholic Acid*) sont les agonistes de TGR5 les plus efficaces, leur EC50 (*half maximal Effective Concentration*) est respectivement de 0,53 et 1µM. Les acides biliaires primaires CDCA (*ChenoDeoxyCholic Acid*) et CA (*Cholic Acid*) présentent un EC50 de 4,43 et 7,72µM (Kawamata, 2003). Par ailleurs, les dérivés tauro-conjugués présentent une affinité plus importante pour TGR5. Le ligand ayant le plus fort pouvoir activateur est le tauro-LCA, dont l'EC50 est de 0,29µM (**Tableau 1**).

Il existe cependant d'autres composés, tels que l'acide linolénique (EC_{50} : ND) et l'acide oléanolique (EC_{50} : 1,42µM), qui ont été identifiés comme des ligands de TGR5 bien que leurs affinités soient plus faibles (Sato et al., 2007). De plus, certains intermédiaires métaboliques stéroïdiens tels que la progestérone ou la pregnandione sont également capables d'induire dans une moindre mesure l'activité de TGR5. L'acide oléanolique est utilisé dans le cadre d'approches pharmacologiques (Sato et al., 2007) et un analogue semi-synthétique, l'INT-777 (EC_{50} : 1,42µM), est également largement utilisé (Pellicciari et al., 2009; Rizzo et al., 2010). Un autre agoniste sélectif de TGR5, le RO5527239 synthétisé par analogie aux acides biliaires, est utilisé (EC_{50} : 1,59µM) et peut être administré oralement (Dehmlow et al., 2013; Ullmer et al., 2013).

a) Rôles des acides biliaires

Les acides biliaires sont les molécules qui constituent majoritairement la bile (70 %), ils représentent la principale source d'élimination du cholestérol. Lors d'un repas, leur libération au sein du tractus digestif permet la solubilisation et l'émulsion des graisses, conduisant ainsi à la digestion (Hofmann, 1999; Monte, 2009).

Au-delà de leur rôle physico-chimique, les acides biliaires sont également des molécules de signalisation qui agissent en activant différents récepteurs, dont les principaux sont le récepteur nucléaire FXRα (*Farnesoid X Receptor Alpha*) et le récepteur membranaire TGR5 (GPBAR1). Ces récepteurs assurent de nombreuses fonctions, ils sont notamment à l'origine

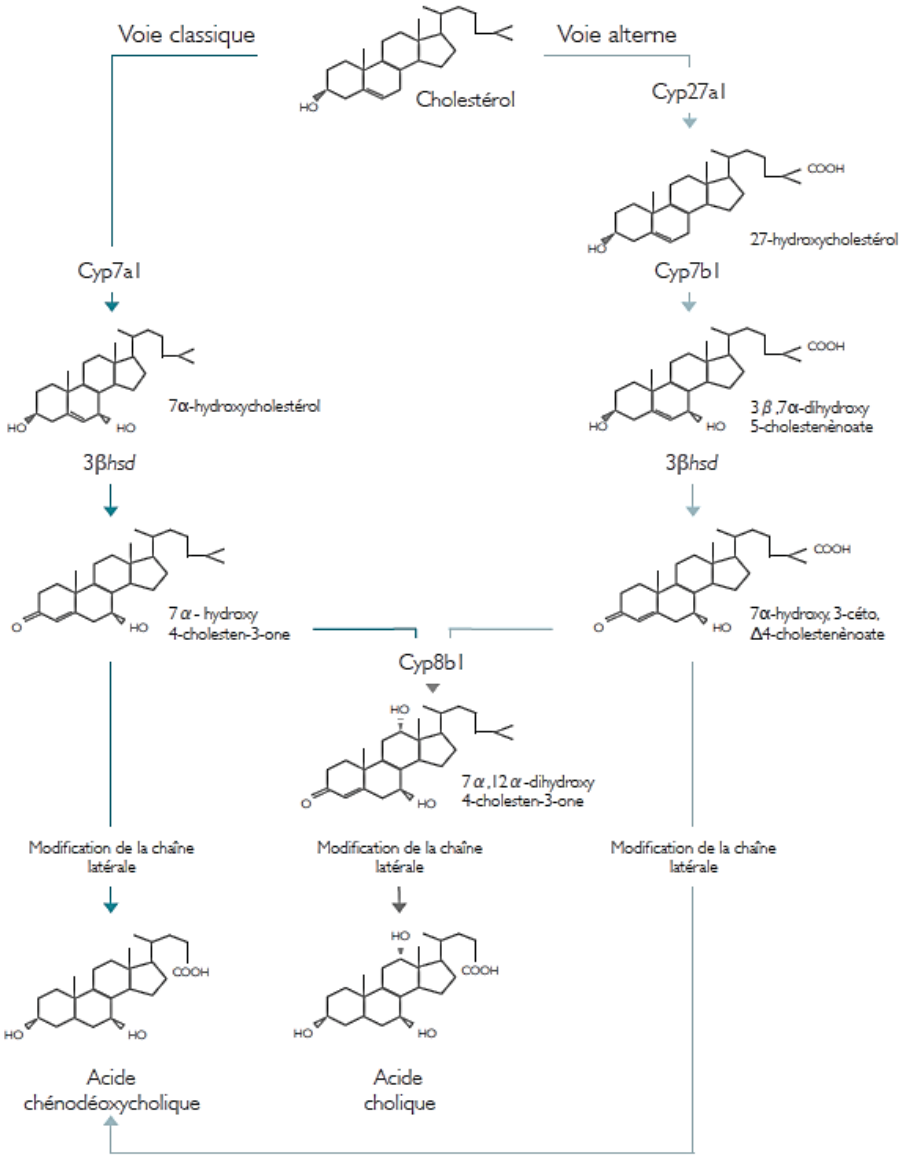


Figure 6 : Schéma de la synthèse des acides biliaires.
Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol. La voie de synthèse classique est initiée par le cytochrome CYP7A1 alors que la voie de synthèse alterne nécessite le cytochrome CYP27A1. Dans la voie alterne, le cholestérol est ainsi converti en dérivés oxystérols. L'étape d'initiation de la voie alterne est dépendante de l'enzyme CYP7B1. Les composés oxydés sont ensuite convertis par la 3βHSD avant d'être pris en charge par CYP8B1 qui conduira à la production d'acide cholique (CA). En l'absence de CYP8B1, il y aura production d'acide chénodésoxycholique (CDCA).
D'après Baptissart Marine, thèse, 2014
CYP7A1 : *CYtochrome P450 family 7 subfamily A member 1* ; CYP27A1 : *CYtochrome P450 family 27 subfamily A member 1* ; CYP7B1 : *CYtochrome P450 family 7 subfamily B member 1* ; 3βHSD : *3β-Hydroxy-Δ5-c27-Steroid-oxidoreDuctase* ; CYP8B1 : *CYtochrome P450 family 8 subfamily B member 1*

de la régulation des métabolismes glucidiques, lipidiques et énergétiques. Ils jouent également un rôle clé dans la modulation des processus liés à l'inflammation et à l'immunité.

En plus de leurs actions par ces deux récepteurs principaux, les acides biliaires sont également capables d'activer les récepteurs PXR (*Pregnane X Receptor*) (Staudinger et al., 2001), CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) ou VDR (*Vitamin D Receptor*) (Makishima, 2002), qui sont impliqués dans les mécanismes de détoxication des acides biliaires et dans l'élimination de polluants ou de xénobiotiques (Sonoda et al., 2002; Staudinger et al., 2001; Xie et al., 2001).

b) Synthèse des acides biliaires

Le foie exprime les 17 enzymes nécessaires à la synthèse des acides biliaires primaires (CA, acide cholique et CDCA, acide chénodésoxycholique). La synthèse des acides biliaires primaires résulte d'une succession de modifications enzymatiques du noyau et de la chaîne carbonée du cholestérol, (Russell, 2003) catalysées dans différents compartiments des hépatocytes (microsomes, mitochondries, cytosol, peroxysomes). Deux voies de synthèse (la voie classique et la voie alternative) associées à différents intermédiaires métaboliques et enzymatiques sont mises en jeu (**Figure 6**).

i. Initiation

La voie classique est initiée par la cholestérol-7α-hydroxylase (CYP7A1, *CYtochrome P450 family 7 subfamily A member 1*) qui convertit le cholestérol en dérivé 7α-hydroxy-cholestérol (Russell, 2003). *Cyp7a1* est présent essentiellement dans le foie et est l'une des enzymes majeures de la synthèse des acides biliaires (Schwarz et al., 1996). Son expression permet de maintenir l'homéostasie des acides biliaires et du cholestérol. Les modèles murins invalidés pour *Cyp7a1* présentent une mortalité importante au cours des 3 premières semaines de vie où 85 % des souriceaux meurent d'une insuffisance hépatique et d'un défaut d'absorption intestinale des lipides et des vitamines (Ishibashi et al., 1996). Cette étude a permis de mettre en évidence que la voie classique conduit à la production de 75% des acides biliaires chez la souris et à plus de 90 % chez l'Homme (Schwarz et al., 1996).

La voie alternative nécessite la production de dérivés oxystérols tels que le 27-hydroxycholestérol, qui est converti à partir du cholestérol par l'enzyme mitochondriale stérol 27-hydroxylase (CYP27A1, *CYtochrome P450 family 27 subfamily A member 1*) (Russell, 2003). Le 27-hydroxycholestérol subit une hydroxylation supplémentaire catalysée par le

cytochrome CYP7B1 (*CYtochrome P450 family 7 subfamily B member 1*) conduisant à la formation du 7α,27-dihydroxycholestérol (Norlin et al., 2000; Rose et al., 1997).

ii. Production des acides biliaires

A l'issue de l'étape d'initiation, les deux voies conduisent à la production de dérivés stérols oxydés en position C7 qui seront tous convertis en forme 3-oxo,4Δ par la 3β-hydroxy-Δ5-C27-steroid-oxidoreductase (3βHSD7, *3β-hydroxy-Δ5-C27-steroid-oxidoreductase*) (Russell, 2003). L'enzyme 12-α-hydroxylase (CYP8B1, *CYtochrome P450 family 8 subfamily B member 1*) conduira à la synthèse de CA (Chiang, 2009). En son absence, la synthèse aboutira à la production de CDCA. CYP8B1 déterminera de cette manière la composition finale du pool d'acides biliaires. Les dernières étapes conduisant à la synthèse des acides biliaires primaires sont l'oxydation et le raccourcissement progressifs de la chaîne latérale du cholestérol (Russell, 2003).

c) Conjugaison

Avant leur excrétion par les hépatocytes, les acides biliaires sont conjugués à des résidus aminés (taurine ou glycine) permettant la production respectivement des sels biliaires tauro ou glyco-conjugués (Russell, 2003). Ceux-ci acquièrent ainsi une structure physico-chimique de type amphipatique étant donné qu'ils possèdent à la fois un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe, ce qui leur confère une propriété émulsifiante. Cette réaction de conjugaison est catalysée par les enzymes *Bile Acid:Coa Synthase* (BACS) et *Bile Acid:Amino acid Transferase* (BAAT) exprimées dans les hépatocytes (Falany et al., 1994). La proportion entre les acides biliaires glyco et tauro-conjugués dépend de la disponibilité de chacun de ces acides aminés, mais la conjugaison aux résidus glycine est majoritaire en condition physiologique, représentant environ 75 % du pool d'acides biliaires conjugués chez l'Homme (Humbert et al., 2012). La conjugaison des acides biliaires permet de diminuer leur toxicité, il s'agit d'une étape nécessaire à leur solubilisation dans la bile. Au pH physiologique, les acides biliaires sont complexés avec des ions sodium, ils portent alors le nom de « sels biliaires ».

L'excrétion des acides biliaires primaires par les hépatocytes est associée à celle des autres constituants de la bile : cholestérol et phospholipides. Stockés dans la vésicule biliaire, les acides biliaires primaires sont déversés au sein du duodénum au cours d'un repas. La contraction de la vésicule biliaire est sous la dépendance de l'action de la cholécystokinine (CCK, *CholeCystoKinin*), hormone libérée au niveau de l'intestin en présence de graisses et de

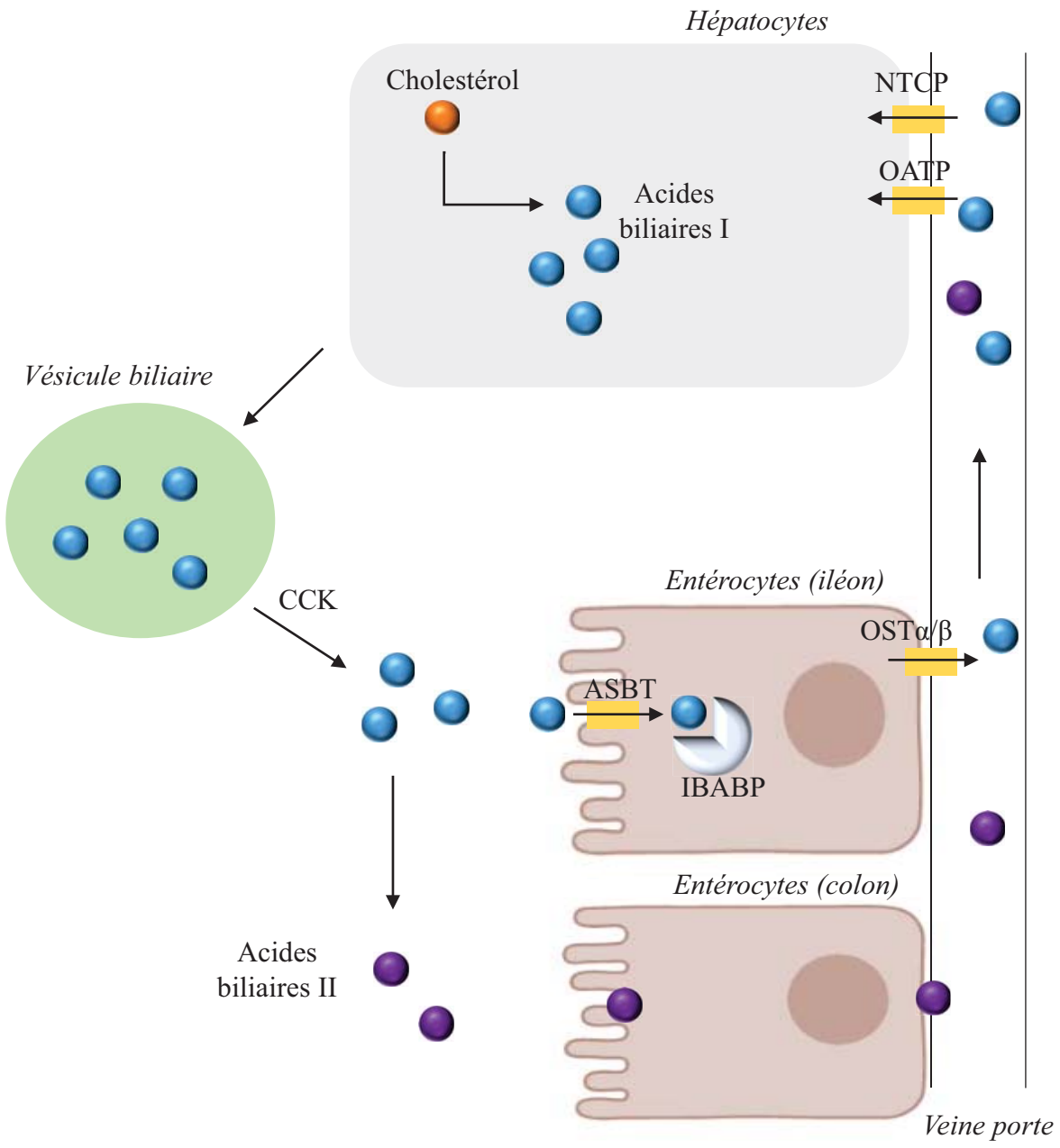


Figure 7 : Schéma du cycle entéro-hépatique.
Les acides biliaires primaires sont synthétisés au niveau du foie dans les hépatocytes à partir du cholestérol. Ces acides biliaires sont conjugués pour être stockés dans la vésicule biliaire. Au cours d'un repas, sous l'action de la CCK, les acides biliaires primaires sont libérés au sein du duodénum. Une partie des acides biliaires primaires sont réabsorbés dans les entérocytes au niveau de l'iléon par le transporteur ASBT, ils seront ensuite pris en charge par la protéine IBABP afin de les conduire jusqu'à la membrane baso-latérale des entérocytes où le transporteur OSTα/β permettra leur excrétion par la veine porte. Les autres acides biliaires seront convertis en acides biliaires secondaires par le microbiote intestinal et ils traverseront la barrière entérocytaire par diffusion passive avant d'être réabsorbés dans la veine porte. Dans le foie, les hépatocytes expriment les transporteurs NTCP et OATP qui permettront aux acides biliaires d'être réabsorbés, constituant ainsi le cycle entéro-hépatique qui se déroule entre 4 et 12 fois par jour.
CCK : *CholeCystoKinin* ; ASBT : *Apical Sodium-dependent Bile acid coTransporter* ; IBABP : *Ileal Bile Acid Binding Protein* ; OSTα/β : *Organic Solute Transporter α/β* ; NTCP : *Na+ dependent Taurocholate Cotransport Peptide*; OATP : *Orgnic Anion TransPorter*.

protéines alimentaires (Marciani et al., 2013). En présence de lipides, les sels biliaires s'organisent sous forme de micelles qui facilitent l'action des lipases et le passage de composés lipidiques simples (triglycérides, vitamines liposolubles, cholestérol) à travers la barrière intestinale.

d) Biotransformation intestinale

Au cours de leur transit intestinal, les acides biliaires primaires vont subir des modifications structurales réalisées par la flore bactérienne. Les modifications majeures seront la déconjugaison et la 7α-déhydroxylation (Ridlon et al., 2006). Ces réactions sont catalysées par des *Bile Salt Hydrolases* (BSH) exprimées par différentes espèces de bactéries anaérobies intestinales. Une partie des acides biliaires déconjugués sera absorbée par les entérocytes et redirigée vers le foie où ces acides biliaires seront reconjugués. La déconjugaison est un pré-requis pour la 7α-déhydroxylation restreinte aux acides biliaires libres (Batta et al., 1990; Stellwag and Hylemon, 1979). Cette étape enzymatique réalisée par l'action d'enzymes de la flore intestinale (Ridlon et al., 2006) donnera naissance aux acides biliaires secondaires désoxycholique (3α,12α-dihydroxy-cholanic acid) et litocholique (3α-hydroxy-cholanic acid), respectivement à partir des acides biliaires primaires cholique (3α,7α,12α-trihydroxy-cholanic acid) et chénodésoxycholique (3α,7α-dihydroxy-cholanic acid). La déconjugaison et la 7α-déhydroxylation des acides biliaires augmentent leur hydrophobicité, ce qui permet leur absorption passive au travers de l'épithélium intestinal, bien que cela soit également associé à une augmentation de leur toxicité (Monte, 2009). Des concentrations excessives en acides biliaires secondaires dans les fèces, le sang et la bile seraient ainsi impliquées dans l'apparition de calculs biliaires et du cancer du côlon (McGarr et al., 2005).

e) Cycle entéro-hépatique

Dans l'intestin, 95 % des acides biliaires sont réabsorbés pour être reconduits au niveau hépatique par la circulation portale, les 5 % éliminés dans les fèces seront compensés par la synthèse *de novo* afin de maintenir un pool d'acides biliaires constant (Hofmann, 1999).

Au niveau de l'iléon terminal, les acides biliaires primaires sont réabsorbés de manière active dans les entérocytes par le transporteur ASBT/SLC10A2 (*Apical Sodium-dependent Bile Acid coTransporter*) (Craddock et al., 1998) (**Figure 7**). La protéine de liaison cytosolique IBABP (*Ileal Bile Acid Binding Protein*) va ensuite les prendre en charge et les conduire jusqu'à la membrane baso-latérale des entérocytes. Enfin, le transporteur hétéromérique OSTα/β

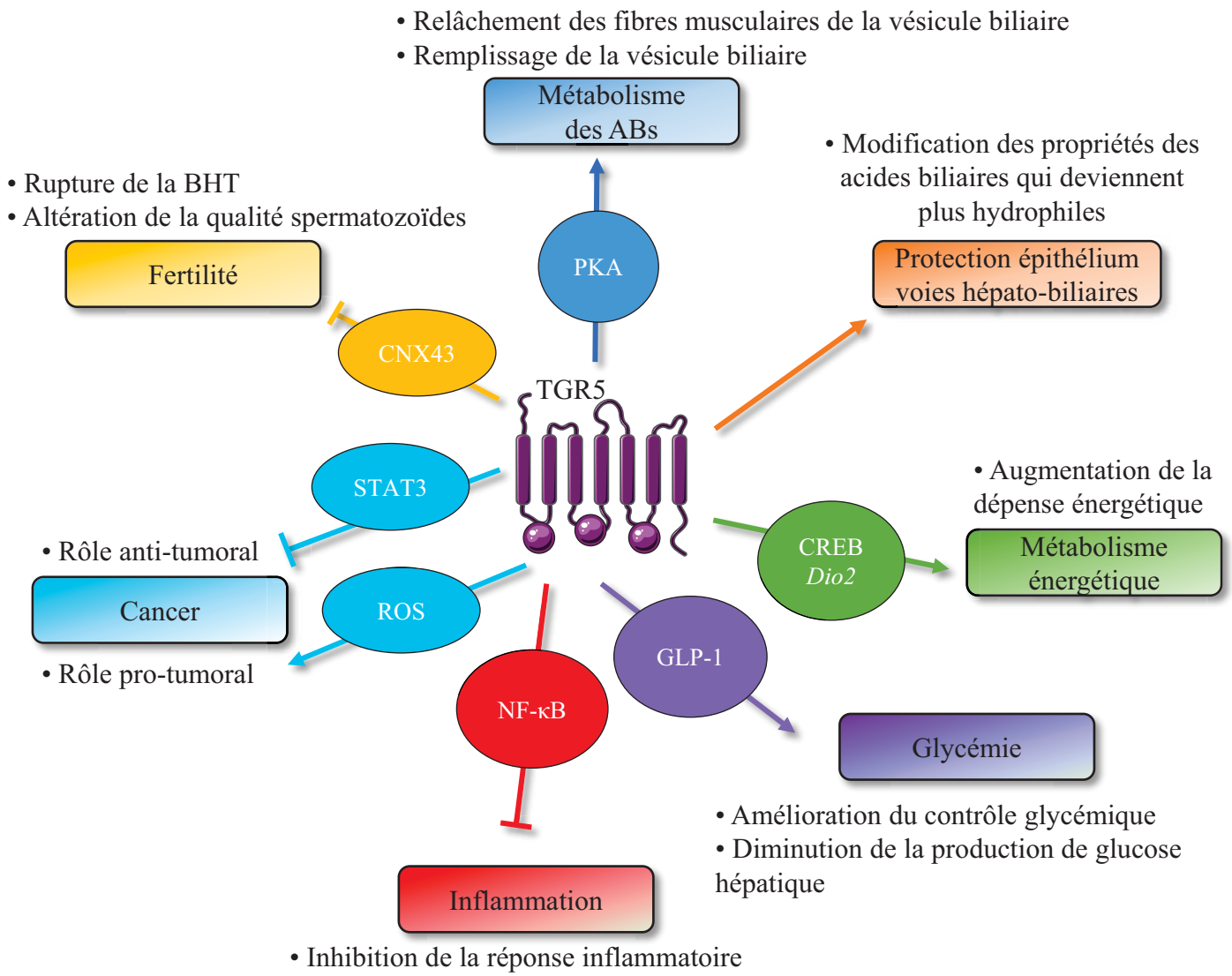


Figure 8 : Schéma récapitulatif des différents rôles de TGR5 et voies de signalisation majeures associées.
PKA : *Protein Kinase A* ; CNX43 : *CoNneXin 43* ; STAT3 : *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* ; ROS : *Reactive Oxygen Species* ; NF-κB : *Nuclear Factor Kappa B* ; GLP-1 : *Glucagon-Like Peptide 1* ; CREB : *cAMP Response Element-Binding protein* ; Dio2 : *Deiodinase IOdothyronine type 2*.

(*Organic Solute Transporter α/β*) permettra leur excrétion dans la veine porte (Seward et al., 2003). Les acides biliaires non absorbés seront pour la majorité convertis en dérivés secondaires qui, grâce à leur propriété plus hydrophobe, vont traverser la barrière entérocytaire par diffusion passive, principalement au niveau du colon.

Dans le foie, les acides biliaires vont regagner les hépatocytes *via* les transporteurs NTCP/SLC10A1 (*Na^+ dependent Taurocholate Cotransport Peptide*), OATP1B1 et OATPB3 (*Organic Anion TransPorter*) présents au pôle sinusoïdal (Dawson et al., 2009; Hagenbuch and Meier, 1994). Le pool d'acides biliaires subit ainsi 4 à 12 cycles entéro-hépatiques par jour.

Le cycle entéro-hépatique dépend de multiples régulations visant à assurer le maintien de l'homéostasie des acides biliaires mais également du cholestérol dont ils sont issus. Cela implique une régulation coordonnée de la synthèse, du transport et de l'élimination des acides biliaires, en partie conduite par les acides biliaires eux-mêmes.

B. Les rôles de TGR5

Selon les types cellulaires, l'activation de TGR5 peut conduire à la modulation de différentes voies de signalisation. Il a été initialement décrit que la fixation des ligands de TGR5 entraîne l'internalisation du récepteur dans le cytoplasme et conduit à l'activation de l'adénylate cyclase par les protéines G, entraînant une augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc (Kawamata, 2003; Zhong, 2010).

La génération de modèles murins invalidés pour le gène codant TGR5 (*$Tgr5^{-/-}$*) a permis d'identifier plusieurs voies métaboliques sous l'influence de son activité (Maruyama et al., 2006; Vassileva et al., 2006) (**Figure 8**). De manière basale, les souris *$Tgr5^{-/-}$* ne présentent aucun phénotype apparent, il n'est observé aucune altération du développement ou atteinte de la fertilité. Par ailleurs, les analyses biochimiques ne montrent pas de modulation de la concentration plasmatique de bilirubine, de triglycérides ou de glucose (Maruyama et al., 2006). Certaines études ont mis en évidence une diminution des concentrations plasmatiques d'acides biliaires chez les animaux invalidés pour le gène codant TGR5 (Li et al., 2011; Maruyama et al., 2006) alors que d'autres montrent qu'elles sont identiques à celles retrouvées chez les souris sauvages (Vassileva et al., 2006).

De nombreuses études utilisant des modèles *in vivo* ou *in vitro*, combinées à des approches pharmacologiques et génétiques, ont permis de décrire les différents rôles du récepteur TGR5 ainsi que les voies de signalisation impliquées.

1. TGR5 participe au contrôle du métabolisme des acides biliaires

L'expression de TGR5 n'a jamais été démontrée dans les hépatocytes mais il est connu que TGR5 contribue au contrôle du métabolisme des acides biliaires du fait de son action dans les voies biliaires (Keitel and Häussinger, 2011).

Chez la souris, l'activation de TGR5 par le LCA ou l'INT-777 entraîne un relâchement des fibres musculaires lisses de la vésicule biliaire (Li et al., 2011). L'activation de TGR5 réduit les concentrations intracellulaires de Ca^{2+}, conduisant à un défaut de contractilité cellulaire (Lavoie et al., 2010). Cet effet est dépendant de la PKA, l'ajout d'un inhibiteur de PKA permettant de contrecarrer l'impact de l'activation de TGR5 sur les taux de calcium. De plus, l'activation de TGR5 dans les cellules musculaires de la vésicule biliaire conduit à l'ouverture des canaux potassiques, ce qui permet le relâchement des muscles entraînant le remplissage de la vésicule biliaire (Li et al., 2011). En conditions pathologiques d'activation importante de TGR5, cela implique un défaut de vidange biliaire et participe à la mise en place d'inflammations des voies biliaires associées au développement de cholestases (Jazrawi et al., 1995). Chez l'Homme, l'augmentation de l'expression de TGR5 dans la vésicule biliaire est associée au développement de pathologies lithiasiques (Portincasa et al., 2008). De plus, l'invalidation de *Tgr5* chez des souris permet une protection vis-à-vis de cette pathologie lorsqu'elle est induite par un régime riche en cholestérol (Vassileva et al., 2006).

Par ailleurs, TGR5 pourrait protéger les épithéliums des voies hépato-biliaires vis-à-vis des effets détergents des acides biliaires (Keitel et al., 2015). Dans les cellules épithéliales biliaires, l'activation de TGR5 conduit à la phosphorylation de ERK1/2 conduisant à la prolifération de ces cellules (Keitel et al., 2019). *Tgr5* est exprimé dans les cholangiocytes et au niveau de l'épithélium de la vésicule biliaire où il stimule la libération de bicarbonate et augmente le pH de la bile (Keitel et al., 2010a). Ces propriétés permettent aux acides biliaires d'acquérir une nature physico-chimique plus hydrophile, ce qui réduit leur toxicité ; TGR5 joue donc un rôle protecteur vis-à-vis de l'inflammation des voies biliaires. Dans un modèle de cholestase induite par une hépatectomie chez la souris, il est observé que l'induction des concentrations plasmatiques et hépatiques d'acides biliaires est compensée dès le jour suivant l'intervention chez des souris sauvages, alors qu'elles ne sont restaurées que deux semaines plus tard chez les souris invalidées pour *Tgr5* (Péan et al., 2013). L'hypersensibilité des souris *Tgr5*$^{-/-}$ à la cholestase se traduit également par une augmentation plus importante des concentrations d'acides biliaires plasmatiques associées à un défaut d'écoulement de la bile et

à une diminution de leur excrétion urinaire. Par ailleurs, la nature des acides biliaires est modifiée au profit des acides biliaires hydrophobes qui sont plus toxiques et qui favorisent le développement de phénomènes inflammatoires au niveau des voies biliaires extra et intra-hépatiques. En effet, TGR5 contrôle la composition du pool d'acides biliaires afin de protéger le foie d'une surcharge en acides biliaires après une hépatectomie *via* la dilatation de la vésicule biliaire (Bidault-Jourdainne et al., 2020).

Par ailleurs, une étude récente a permis de mettre en évidence que l'invalidation de *Tgr5* chez des souris présentant des cholestases conduisait à une aggravation des altérations hépatiques et de la réponse inflammatoire. En effet, l'activation de TGR5 permet d'inhiber la réponse pro-inflammatoire *via* l'activité de la β-caténine (Rao et al., 2020).

2. TGR5 est impliqué dans la dépense énergétique

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de TGR5 dans le contrôle du métabolisme énergétique. Il a été observé que les souris *Tgr5*$^{-/-}$ étaient prédisposées au développement d'obésité en réponse à un régime riche en graisses, principalement chez les femelles (Maruyama et al., 2006). En parallèle, l'administration d'acides biliaires à des souris conduit à une augmentation de la dépense énergétique dans le tissu adipeux brun, et permet de prévenir le développement d'obésité ainsi que la résistance à l'insuline (Watanabe et al., 2006). Le mécanisme moléculaire mis en jeu est dépendant de l'AMPc, induite par TGR5, responsable de l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle le facteur de transcription CREB, engendrant ainsi l'expression de gènes cibles. L'activation de CREB, *via* sa phosphorylation, va entraîner le recrutement de coactivateurs transcriptionnels qui vont faciliter sa fixation à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) sur des éléments de réponses CRE (*cAMP Response Element*). Cela va conduire à la transcription de gènes cibles tels que celui codant pour l'enzyme DIO2 (*Deiodinase IOdothyronine type 2*) qui convertit l'hormone thyroïdienne inactive T4 (Thyroxine) en hormone thyroïdienne active T3 (Hormone Tri-Iodothyronine). Les souris invalidées pour le gène codant DIO2, nourries avec un régime riche en acides biliaires, ne présentent pas d'augmentation de la dépense énergétique et sont sensibles au développement d'obésité. L'enzyme DIO2 permet notamment d'augmenter les réactions de β-oxydation des acides gras au niveau du tissu adipeux brun chez la souris ou du muscle squelettique chez l'Homme, ce qui permet la conversion des graisses en énergie.

Par ailleurs, des souris nourries avec un régime riche en graisses présentent une sensibilité accrue à l'insuline. Cette sensibilité est améliorée chez les souris invalidées pour

Tgr5 nourries avec un régime similaire. Cet effet est associé à des taux diminués de cholestérol et de triglycérides dans le plasma (Vassileva et al., 2010). De plus, il a été observé que l'expression de *TGR5* dans le tissu adipeux chez l'Homme est réduite lors d'une perte de poids alors qu'elle est positivement corrélée avec l'obésité (Svensson et al., 2013). Par ailleurs, la présence d'un SNP de TGR5 (rs11554825) semble être impliqué dans l'obésité chez les jeunes (Bensalem et al., 2020).

3. L'activation de TGR5 favorise la régulation de la glycémie

Le rôle de TGR5 dans le métabolisme glucidique a été évalué. De manière basale, aucune différence de glycémie n'est observable entre les souris sauvages et invalidées pour le gène codant TGR5 (Vassileva et al., 2010). Le premier lien entre TGR5 et la régulation de l'homéostasie glucidique a été décrit dans une lignée cellulaire d'entérocytes murins (Stc-1) où l'activation de TGR5 induite par un traitement aux acides biliaires entraîne la sécrétion de l'hormone GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide 1*) (Katsuma et al., 2005). GLP-1 est une incrétine qui stimule la sécrétion d'insuline selon la quantité de glucose. La sécrétion de GLP-1 en réponse à l'activation de TGR5 est associée à une amélioration des fonctions hépatiques et pancréatiques chez des individus obèses mais également à une amélioration de la tolérance au glucose de ces souris (Thomas et al., 2009). Dans les cellules pancréatiques, l'activation de TGR5 par un agoniste entraîne une augmentation de la libération d'insuline *via* GLP-1 et favorise donc la régulation de la glycémie, qui est affectée dans des pathologies telles que le diabète de type 2 (Kumar et al., 2012). Il a également été observé que des traitements avec un séquestrant des acides biliaires (une résine échangeuse d'anions qui va se lier aux acides biliaires dans la lumière intestinale, empêchant leur réabsorption et accélérant leur excrétion dans les fèces) conduisaient à une augmentation des taux d'acides biliaires dans le côlon. Cette augmentation entraîne la sécrétion de GLP-1 conduisant à une amélioration du contrôle glycémique dans des modèles animaux diabétiques *via* TGR5 (Harach et al., 2012). Cet effet est associé à une diminution de la production de glucose hépatique *via* la suppression de la glycogénolyse chez des souris obèses, permettant ainsi une amélioration de l'hyperglycémie ainsi que de l'hyperinsulinémie (Potthoff et al., 2013). Il a été observé en outre que l'activation de TGR5 conduit à un arrêt de la production de glucagon au bénéfice de la production de GLP-1 dans les cellules pancréatiques (Kumar et al., 2016), ce qui favorise donc la régulation de la glycémie qui est notamment dérégulée dans le syndrome métabolique.

L'un des traitements majeurs du syndrome métabolique est la chirurgie bariatrique, notamment la gastrectomie partielle. Cette chirurgie permet une amélioration du contrôle de la glycémie *via* l'activation de la voie de signalisation TGR5 : la sensibilité à l'insuline est améliorée *via* la suppression de la production de glucose *de novo* associée à l'augmentation de l'utilisation du glucose périphérique (Ding et al., 2016). L'activation de la voie de signalisation TGR5 lors de chirurgie bariatrique semble être corrélée aux taux d'acides biliaires. En effet, après une chirurgie bariatrique, une augmentation des taux plasmatiques d'acides biliaires est observée, conduisant logiquement à l'activation de TGR5 (Sweeney and Morton, 2014).

Par ailleurs, la gastrectomie partielle participe à la rémission des diabètes de type 2 *via* une amélioration de la glycémie, de la tolérance au glucose et une production d'insuline hépatique. Ces effets sont atténués chez les souris invalidées pour le gène codant TGR5 (McGavigan et al., 2017), suggérant que TGR5 est également impliqué dans ces mécanismes.

4. TGR5 présente une activité anti-inflammatoire

L'une des premières fonctions de TGR5 décrite concerne le contrôle de l'immunité et de l'inflammation (Kawamata, 2003). TGR5 est fortement exprimé dans les cellules immunitaires, notamment dans les macrophages et les monocytes $CD14^+$ chez l'Homme. Il a été démontré qu'un traitement aux acides biliaires conduit à une suppression de la fonction des macrophages incluant la phagocytose et la production de cytokines. Ce dernier effet, observé dans des cellules de Kupffer (macrophages présents dans le foie), est dépendant de la voie TGR5-AMPc (Keitel et al., 2008). De plus, deux agonistes de TGR5, l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide litocholique (LCA), conduisent à l'inhibition de la production de TNF-α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) dans des macrophages (Yoneno et al., 2013). Cet effet résulte de la phosphorylation du facteur c-FOS pour réguler l'activation d'un membre de la voie NF-κB (*Nuclear Factor Kappa B*) : P65. Une autre étude a mis en évidence que l'activation de TGR5 entraîne une diminution de la translocation nucléaire de P65 dans les macrophages (Pols et al., 2011). NF-κB est un facteur de transcription associé aux phénomènes de prolifération, d'apoptose, de développement et d'inflammation. D'après les différentes études réalisées, l'activité anti-inflammatoire de TGR5 semble donc être dépendante de la voie de signalisation NF-κB. Après une injection de LPS (LipoPolySaccharide), les souris invalidées pour *Tgr5* sont sensibles à l'inflammation et à la nécrose hépatique (Wang et al., 2011). Cet effet est dépendant du facteur NF-κB : il a été observé que l'activation de TGR5 permet une amélioration de la réponse inflammatoire induite par le LPS en inhibant la voie NF-κB (Mobraten et al., 2015).

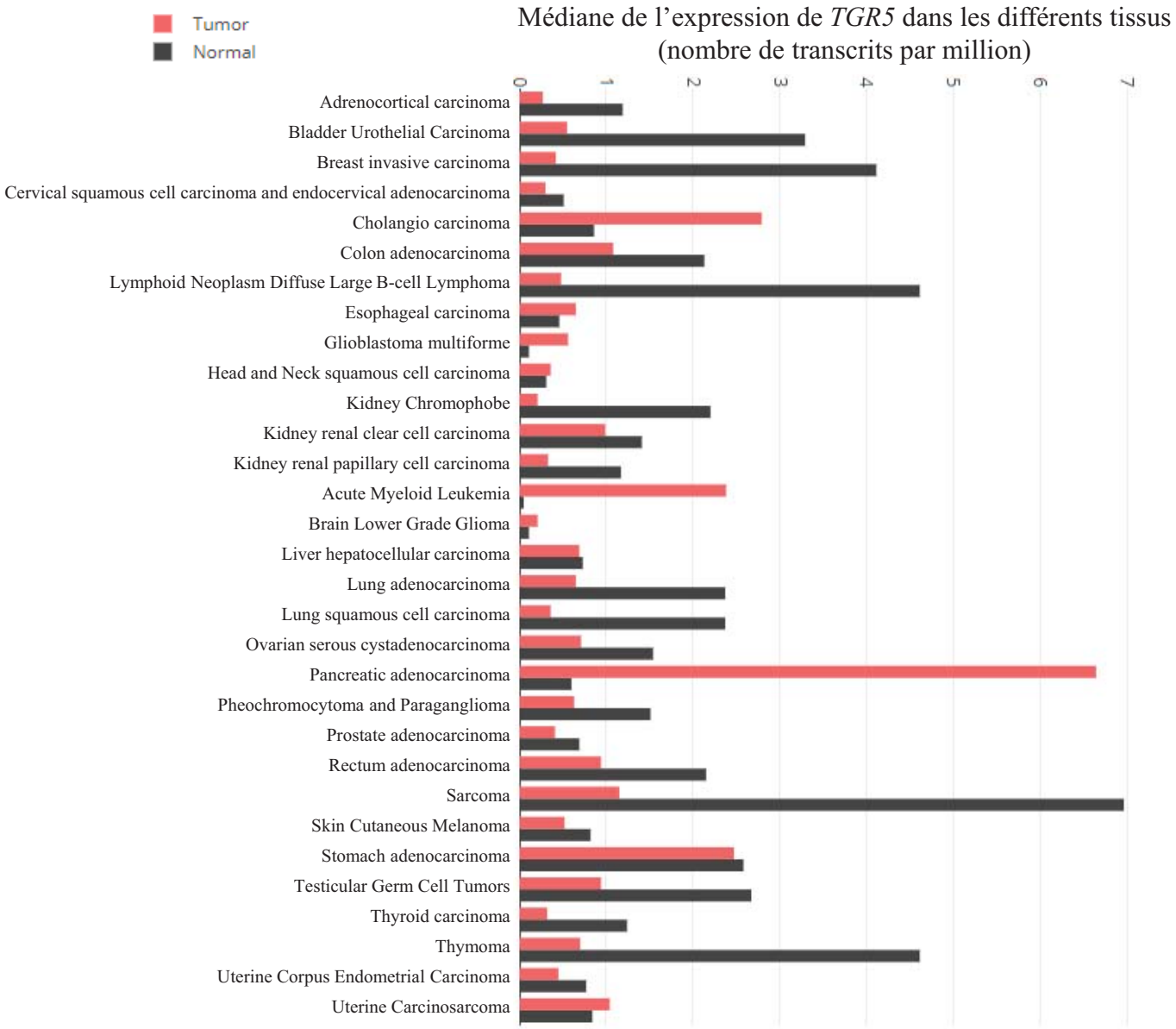


Figure 9 : Médiane de l'expression (ARNm) de *TGR5* dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains en nombre de transcrits par million.
Selon les tissus *TGR5* est plus ou moins exprimé dans les tissus sains par rapport aux tissus tumoraux
Issu de http://gepia2.cancer-pku.cn

De plus, dans des cellules immunitaires présentes dans le foie (de type macrophages) ayant subi un phénomène d'ischémie/reperfusion, l'activation de TGR5 conduit à l'inhibition de la réponse inflammatoire *via* la régulation négative de la voie de signalisation TLR4 (*Toll Like Receptor 4*) associée à NF-κB (Yang et al., 2017).

Les propriétés anti-inflammatoires de TGR5 ont également été mises en évidence dans d'autres tissus. Au niveau intestinal, les souris invalidées pour *Tgr5* présentent des défauts histologiques au niveau du colon, caractérisés par une perte d'intégrité de la barrière intestinale (Cipriani et al., 2011). A l'inverse, l'activation de TGR5 conduit à la diminution de signes locaux d'inflammation et entraîne une diminution de la production de TNFα (Yoneno et al., 2013). Par ailleurs, il a également été montré que l'activation de TGR5 réduit la neuro-inflammation et améliore le devenir de souris présentant une complication neurologique due à une défaillance hépatique (McMillin et al., 2015). Il a aussi été démontré que l'activation de TGR5 permet une protection vis-à-vis de l'inflammation rénale *via* l'inhibition de la signalisation NF-κB et STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) (Su et al., 2017). Enfin, dans les cellules stromales de l'endomètre, l'activation de TGR5 par son agoniste spécifique (INT-777) protège les cellules de l'inflammation et du stress oxydatif induits par TNF-α ; cet effet est associé à l'inhibition de la voie NF-κB induite par l'INT-777 (Lyu et al., 2019).

TGR5 présente donc des propriétés anti-inflammatoires majeures dans de nombreux tissus et cet effet semble être associé principalement à la voie de signalisation NF- κB.

5. TGR5 est impliqué dans de nombreux cancers

L'implication de TGR5 dans les cancers a été évaluée dans de nombreuses études, les données de TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) disponibles montrent que TGR5 est modulé (surexprimé ou sous-exprimé) dans de nombreux tissus tumoraux par rapport aux tissus sains (**Figure 9**).

a) Rôle pro-tumoral de TGR5

Depuis de nombreuses années, une association entre les taux d'acides biliaires et le développement de cancers colorectaux a été observée (Weisburger et al., 1983). Il a plus récemment été démontré que les acides biliaires (DCA/LCA) pouvaient causer le cancer colorectal (Farhana et al., 2016) et augmenter sa croissance et sa capacité d'invasion (Pai et al., 2004). Il a notamment été mis en évidence que les acides biliaires induisent du stress oxydatif

via la production d'espèces oxygénées réactives (ROS*, Reactive Oxygen Species*) (Craven et al., 1986), qui sont connues pour entraîner des dommages à l'ADN. Ces dommages sont impliqués dans le développement de cancers associés à l'activation d'oncogènes (Jackson, 1994). Dans des cultures cellulaires neuronales, TGR5 conduit à la production de ROS *via* l'augmentation des concentrations de calcium (Keitel et al., 2010b). En effet, des neuro-stéroïdes (tels que le 5b-pregnan-3a-ol-20-one, 5b-pregnan-3a-17a-21-triol-20-one ou encore l'allopregnanolone) conduisent à une augmentation des taux cellulaires de calcium en activant TGR5, et une augmentation des taux de calcium est essentielle à la génération de ROS (Schliess et al., 2004).

Il a également été observé que le traitement de cellules issues d'adénocarcinomes de l'œsophage avec de l'acide désoxycholique conjugué à la taurine entraînait une augmentation de la prolifération cellulaire *via* TGR5 (Hong et al., 2010). L'impact pro-tumoral des acides biliaires dans ce type de cancer semble être lié à une augmentation des dommages à l'ADN *via* la production de ROS induite par l'activation de TGR5 (Li and Cao, 2016). Par ailleurs, il a été observé que l'expression de *TGR5* était plus importante dans les cas de dysplasie de haut grade de l'œsophage et dans les cancers de l'œsophage, suggérant que TGR5 pourrait être un marqueur de la progression tumorale (Marketkar et al., 2017). En parallèle, l'augmentation de l'expression de TGR5 dans les adénocarcinomes de l'œsophage est associée à un mauvais pronostic de survie (Pang et al., 2017).

Une récente étude a mis en évidence qu'un agoniste de TGR5 conduit à la prolifération des cholangiocytes *via* l'augmentation des ROS, entraînant ainsi l'activation d'un proto-oncogène (cSRC) conduisant à la phosphorylation d'ERK1/2, impliquées dans la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire (Reich et al., 2016). De plus, l'expression de *TGR5* est augmentée dans les tissus de cholangiocarcinome par rapport aux tissus sains, et son activation participe à la progression du cholangiocarcinome en régulant la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (Erice et al., 2018).

Dans les cellules d'adénocarcinome du canal pancréatique, l'exposition au DCA conduit à l'invasion et la prolifération des cellules. L'absence de TGR5 atténue ces effets notamment *via* la voie de signalisation STAT3 (Nagathihalli et al., 2014). Dans le cancer pancréatique, une expression élevée de TGR5 prédit un mauvais pronostic. En effet, l'expression de TGR5 est positivement corrélée avec un stade avancé et avec la présence de métastases (Zhao et al., 2018).

Dans les carcinomes gastriques, il a tout d'abord été observé qu'un traitement aux acides biliaires entraîne une activation des voies de signalisation du récepteur EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et de ERK1/2, ce qui conduit à une stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses associée à une inhibition de l'apoptose de celles-ci (Yasuda et al., 2007). L'inhibition de TGR5 permet de contrecarrer ces effets, ce qui suggère que l'absence de TGR5 pourrait prévenir le cancer gastro-intestinal. En parallèle, TGR5 est surexprimé dans la plupart des adénocarcinomes gastriques et cette surexpression est corrélée à une diminution de la survie des patients (Cao et al., 2013). Une étude récente a pu mettre en évidence que l'activation de TGR5 entraîne une augmentation de l'expression de plusieurs gènes associés à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (Carino et al., 2016). En effet, l'expression de *TGR5* est positivement corrélée avec l'expression de la *N-CADHERINE* qui est un marqueur de l'EMT.

Par ailleurs, le *knockdown* de *TGR5* dans des cellules cancéreuses pulmonaires permettait de prévenir la phosphorylation de JAK2 (*JAnus Kinase 2*) et de STAT3 et de réprimer l'expression de gènes cibles de STAT3, conduisant à une inhibition des capacités tumorales des cellules : prolifération, migration et invasion (Liu et al., 2018). De plus, dans le cancer pulmonaire de type « non à petites cellules », l'expression de TGR5 corrèle positivement avec un stade avancé du cancer.

L'impact des acides biliaires sur la progression tumorale *via* TGR5 a également été observé dans le cancer de l'endomètre. *In vitro*, un traitement aux acides biliaires stimule la prolifération cellulaire en induisant une augmentation de l'expression de la *CYCLINE D1 via* l'activation du facteur de transcription CREB (Casaburi et al., 2012).

b) <u>Rôle anti-tumoral de TGR5</u>

A l'inverse de ce qui a été décrit précédemment, l'activation de TGR5 inhibe la prolifération et la migration de cellules cancéreuses gastriques et induit leur apoptose en inhibant la voie de signalisation STAT3, suggérant que TGR5 peut être un suppresseur de tumeur dans les cancers gastriques (Guo et al., 2015). Ces résultats suggèrent que TGR5 peut être une cible thérapeutique dans le traitement de certains cancers gastriques, bien que son impact puisse être pro-tumoral ou anti-tumoral selon les études réalisées.

Plusieurs études ont démontré que les acides biliaires entraînent l'apoptose de cellules pancréatiques ou d'hépatocarcinomes *via* la génération de ROS (Booth et al., 2011; Li et al., 2013) bien qu'aucun lien n'ait été mis en évidence entre TGR5 et le cancer du foie.

De plus, TGR5 protège de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses rénales *via* l'inhibition des signalisations NF-KB et STAT3 (Su et al., 2017). STAT3 est un facteur de transcription qui contrôle le développement, la différenciation, l'immunité, l'invasion et le métabolisme.

Des analyses de corrélation ont permis de mettre en évidence qu'une expression élevée de TGR5 dans le cancer du sein est associée à un mauvais pronostic, alors qu'une expression importante de TGR5 dans les cas de cancers de l'ovaire semble être associée à un meilleur pronostic de survie (Chen et al., 2016b).

TGR5 semble donc jouer un rôle dans l'étiologie de différents cancers, mais son impact est dépendant du tissu. En effet, TGR5 semble agir comme un proto-oncogène dans les cancers du côlon, de l'œsophage, des voies biliaires, du pancréas, du poumon et de l'endomètre ; alors que son activation permet une protection vis-à-vis des cancers hépatiques et rénaux. Il présente également un rôle ambigu dans le cancer gastrique où il semble être à la fois pro et anti-tumoral.

6. Les acides biliaires conduisent à une altération de la fertilité *via* TGR5

Plusieurs études ont mis en évidence des liens entre des troubles hépatiques, tels que des cholestases et des troubles de la fertilité dans des modèles murins, mais également chez l'homme (Durazzo, 2006; Mooradian et al., 1985). Les troubles hépatiques étant associés à une augmentation des taux plasmatiques d'acides biliaires, le lien entre les acides biliaires et la fertilité a été évalué.

Dans un contexte de syndrome métabolique, les acides biliaires altèrent la fertilité chez les mâles. En effet, des souris nourries avec un régime riche en graisses, exposées aux acides biliaires, présentent un taux de stérilité plus élevé qu'en l'absence d'exposition aux acides biliaires. Cet effet est associé à un défaut de prolifération des cellules germinales, à une dérégulation de la fonction endocrinienne du testicule ainsi qu'à des défauts d'interactions cellule – cellule au sein de l'épithélium séminifère (Vega et al., 2015).

Il a été démontré chez des animaux qu'un régime enrichi en acides biliaires au moment de la puberté entraîne une augmentation de l'incidence de l'infertilité. Ces effets sont associés à une diminution des taux de testostérone, conduisant à une altération de la différenciation et

une augmentation de l'apoptose des cellules germinales. En parallèle, un régime enrichi en acides biliaires chez l'adulte entraîne une diminution de la fertilité associée à des défauts testiculaires sans impact sur les taux de testostérone, suggérant un impact différent des acides biliaires sur le testicule selon l'état de maturation sexuelle. Initialement, chez l'adulte, des agrégats de cellules germinales au centre des tubes séminifères sont observés, associés à une rupture de la barrière hémato-testiculaire. Il a été démontré que les acides biliaires altèrent l'expression de gènes impliqués dans les interactions cellule – cellule tel que *Cnx43* (*CoNne*Xin 43). Ces effets ne sont pas observés chez les souris invalidées pour *Tgr5*. En effet, l'absence de TGR5 protège des effets délétères des acides biliaires sur le testicule et à terme sur la fertilité (Baptissart et al., 2014).

Il a également été démontré que les acides biliaires avaient un impact néfaste sur la qualité des spermatozoïdes. En effet, les descendants d'individus mâles exposés à un régime riche en acides biliaires présentent une létalité périnatale importante, associée à un défaut de l'homéostasie des acides biliaires, une croissance post-natale réduite et un métabolisme glucidique altéré à l'âge adulte (Baptissart et al., 2018). Ces phénotypes sont maintenus jusqu'à deux générations d'individus et semblent être associés à des différences de méthylation d'ADN dans les spermatozoïdes des individus exposés aux acides biliaires. L'ensemble de ces altérations n'est pas retrouvé chez les individus invalidés pour le gène codant TGR5, ce qui permet de placer ce dernier comme un acteur clé dans la régulation des impacts multigénérationnels d'une exposition aux acides biliaires.

L'ensemble de ces derniers éléments suggère un rôle majeur de TGR5 dans la physiologie et la physiopathologie testiculaires. La physiologie testiculaire sera abordée ci-après afin de mieux appréhender les mécanismes pouvant être mis en jeu.

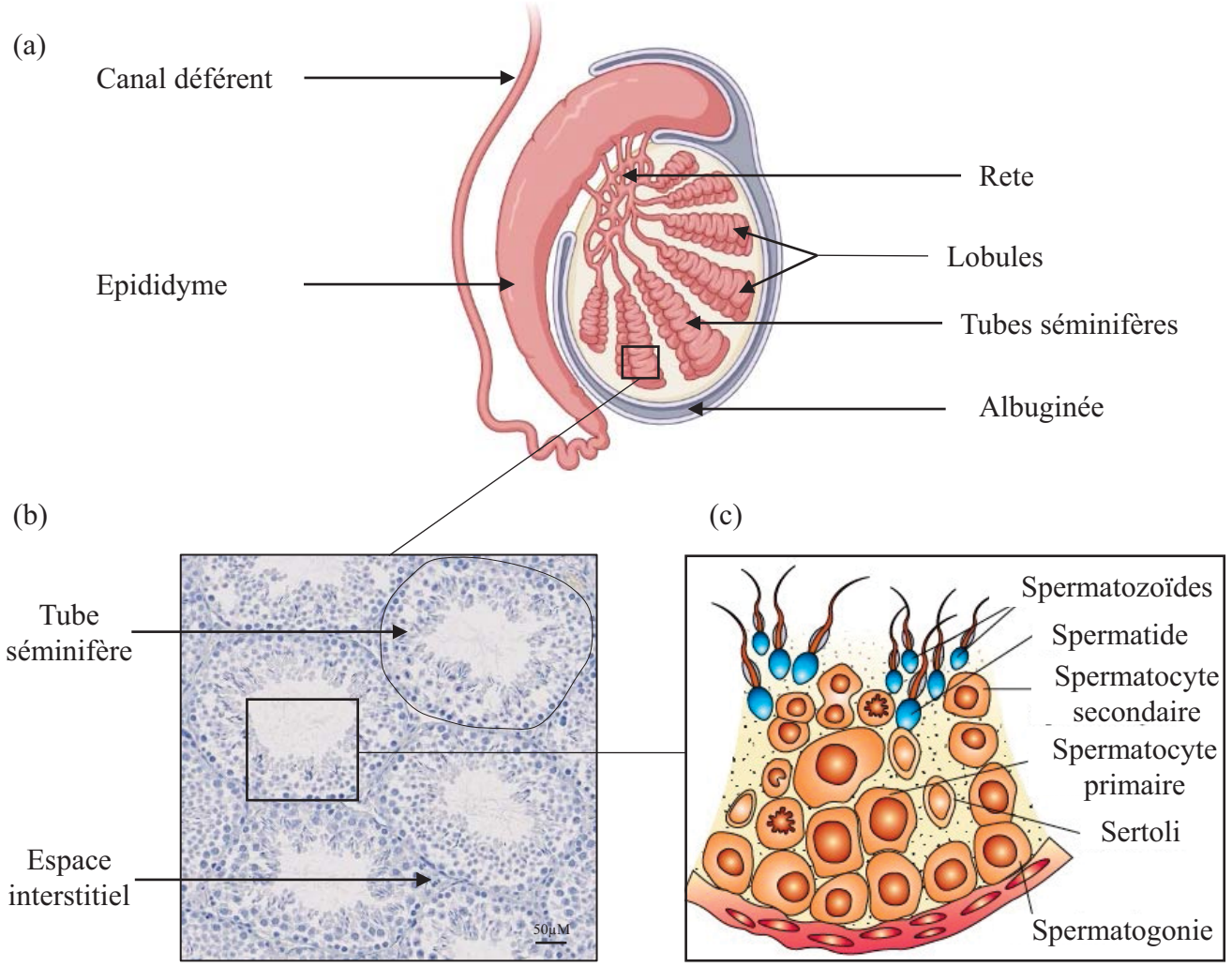


Figure 10 : Le testicule.
(a) Représentation schématique du testicule (http://biorender.com).
(b) Coloration Hématoxyline/Eosine d'une coupe transversale de testicule murin.
(c) Schéma d'un tube séminifère (https://learn.careers360.com).

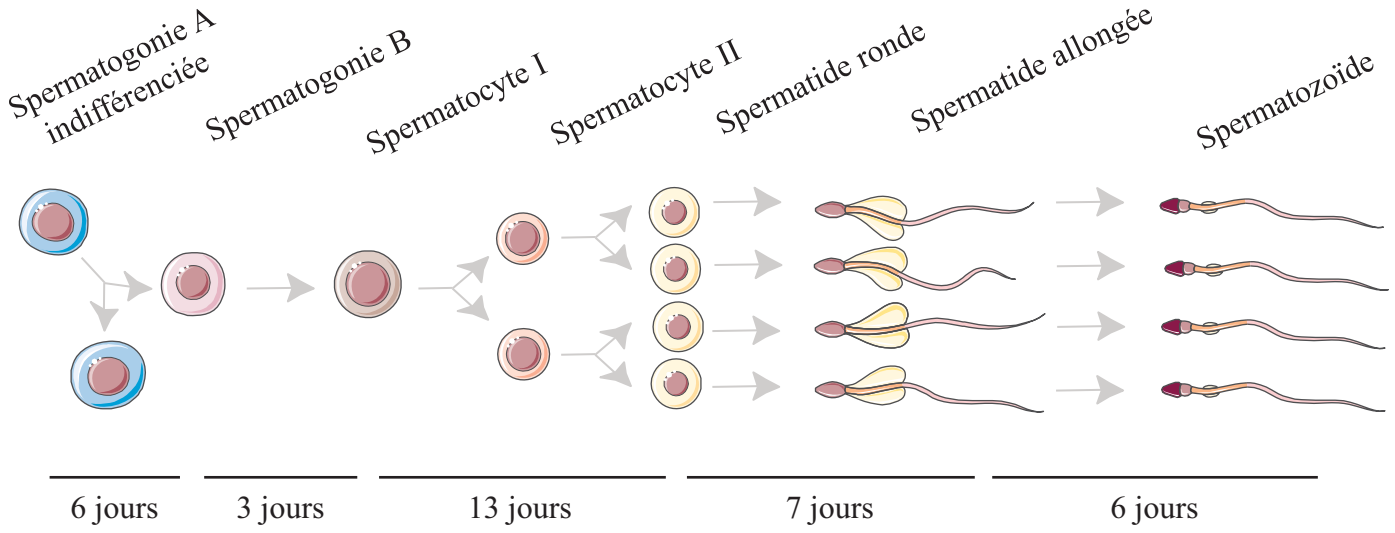


Figure 11 : La spermatogenèse chez la souris.
Les différentes étapes de la spermatogenèse et les durées de chaque étape chez la souris.

Partie 2. Physiologie testiculaire

Le testicule est la gonade mâle, il s'agit d'une glande endocrine paire et symétrique de l'appareil génital mâle qui est entourée d'une capsule conjonctive : l'albuginée. Les testicules sont suspendus par les cordons spermatiques dans une poche cutanée protectrice : le scrotum, qui est une structure extra-abdominale. Cette localisation permet leur maintien à une température favorable à la spermatogenèse, qui est d'environ 4 à 7°C inférieure à celle du corps, paramètre indispensable à la production de spermatozoïdes viables (Zorgniotti and Sealfon, 1988). Chaque testicule est constitué d'environ 300 lobules testiculaires, et chacun d'eux est composé de 15 à 40 tubes séminifères séparés les uns des autres par l'espace interstitiel (**Figure 10**).

Au sein de l'espace interstitiel, de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques sont retrouvés, ils permettent le passage de nutriments (fer, vitamines A et E), d'hormones (LH (*Luteinizing Hormone*), FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*), insuline) et de facteurs de croissance (EGF, *Epidermal Growth Factor*) nécessaires à la spermatogenèse (Shiraishi and Matsuyama, 2012). Des cellules immunitaires, principalement des macrophages, ainsi que des cellules de Leydig sont également retrouvées au sein de l'espace interstitiel. Ces dernières assurent une partie de la fonction endocrine du testicule conduisant à la production des stéroïdes sexuels, essentiellement sous la forme de testostérone. Celle-ci est produite en réponse à la LH sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Le tube séminifère est le siège de la fonction exocrine du testicule, la spermatogenèse, qui est le processus de différenciation des spermatogonies (cellules germinales diploïdes) en spermatozoïdes (cellules haploïdes spécialisées) qui sont les gamètes mâles (**Figure 11**). Les cellules germinales, qui vont progresser au sein du tube séminifère au cours de la spermatogenèse, ainsi que les cellules de Sertoli qui sont nécessaires au soutien de la gamétogenèse sont retrouvées dans les tubes séminifères.

Chez les mammifères, la spermatogenèse débute au moment de la puberté et est maintenue constante durant toute la vie de l'individu. La durée de la spermatogenèse est de 35 jours chez la souris et de 74 jours chez l'homme, elle est subdivisée en plusieurs étapes, chacune d'une durée définie.

Chez la souris, la spermatogenèse est initiée dès l'âge de 8 à 10 jours après la naissance. Lors de cette première vague une apoptose importante des cellules germinales est observée, ce

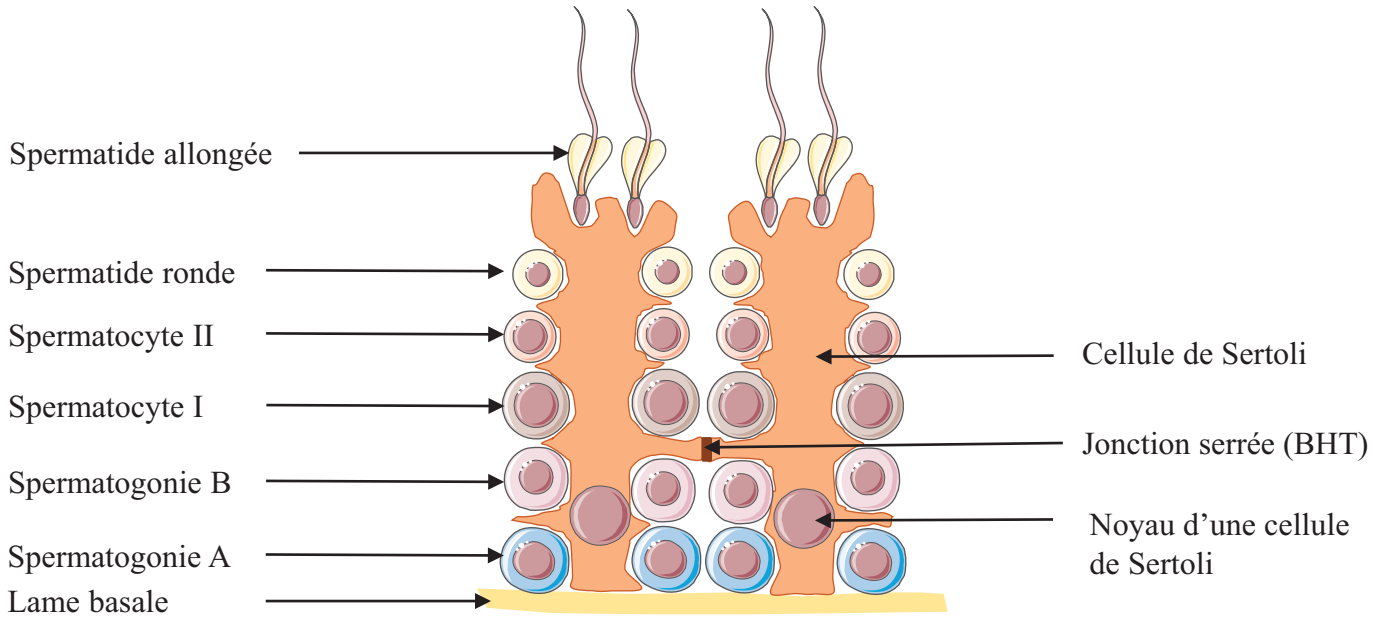


Figure 12 : Morphologie des cellules de Sertoli et formation de la barrière hémato-testiculaire (BHT).
L'association entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli forme un épithélium stratifié soutenu par une lame basale. Le contact étroit entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales permet leur déplacement au sein de l'épithélium au cours de leur différenciation. Les cellules de Sertoli sont également en contact avec environ 5 autres cellules de Sertoli permettant la formation de la BHT au niveau du tiers inférieur du tube séminifère.

qui est nécessaire au bon déroulement des différents cycles de spermatogenèse qui seront réalisés ensuite (Rodriguez et al., 1997). Les premiers spermatozoïdes vont être observés 40 à 45 jours après la naissance chez la souris (de Rooij, 1998), le testicule est alors fonctionnel et les vagues de spermatogenèse vont s'enchaîner.

La spermatogenèse se déroule en plusieurs phases ; elle nécessite tout d'abord des cellules germinales souches qui vont s'auto-renouveler tout au long de la vie de l'individu. Ces SSCs (*Spermatogonial Stem Cells*) vont ensuite entrer dans un processus de prolifération et de différenciation avant d'entrer en méiose puis de devenir des spermatozoïdes qui seront ensuite relargués dans la lumière des tubes séminifères.

L'association entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli permet la formation d'un épithélium stratifié soutenu par une lame basale. Tout au long de la différenciation des cellules germinales, un contact étroit est observé avec les cellules de Sertoli permettant le déplacement des cellules germinales au sein de l'épithélium. Il est important de noter qu'une cellule de Sertoli peut, en moyenne, assurer le soutien de 40 cellules germinales à différents stades de différenciation (Weber et al., 1983). Les cellules de Sertoli présentent un cytosquelette très développé permettant la formation de nombreuses jonctions intercellulaires qui vont assurer la cohésion de l'épithélium séminifère et la progression des cellules germinales (Mruk and Cheng, 2004). Les cellules de Sertoli assurent également leur soutien architectural et nutritif (Griswold, 1998) en supportant une activité endocrine ainsi qu'en formant la barrière hémato-testiculaire (BHT).

Chacune des cellules de Sertoli est en contact avec environ 5 autres cellules de Sertoli, permettant la formation de la BHT au niveau du tiers inférieur du tube séminifère (**Figure 12**). La BHT, est une barrière perméable à certaines molécules, elle supporte 3 fonctions majeures : la régulation du passage de différentes molécules entre les compartiments basal et apical du tube séminifère, un rôle immunitaire et la création d'un microenvironnement nécessaire aux cellules germinales. La BHT s'établit au moment de la puberté grâce aux androgènes, aux rétinoïdes et aux hormones thyroïdiennes (De Gendt and Verhoeven, 2012; Sharpe et al., 2003; Tarulli et al., 2012). Elle permet de séparer physiquement et fonctionnellement l'épithélium séminifère en deux compartiments. Les phases de prolifération des spermatogonies et les spermatocytes primaires pré-leptotènes se trouveront dans le compartiment basal, et les cellules germinales à un stade de différenciation plus avancé (méiose, spermiogenèse, spermiation) se trouveront dans le compartiment apical (Dym and Cavicchia, 1978). Les tubes séminifères

n'étant pas traversés par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, le rôle majeur de la BHT est de réguler le passage de nombreuses molécules au sein du compartiment apical. La BHT assure en effet le passage de substances nutritionnelles (sucres, acides aminés), de molécules vitales (hormones, électrolytes) et restreint le passage de composés toxiques (médicaments, produits chimiques). La BHT permet notamment de faciliter la diffusion de la testostérone et protège les cellules germinales de l'exposition aux xénobiotiques (Miller and Cherrington, 2020; Okumura et al., 1975).

De plus, les cellules de Sertoli produisent de nombreux éléments essentiels à la spermatogenèse tels que des métabolites (lactate et pyruvate), des protéines (transferrine, céruloplasmine), des hormones (inhibine et activine) et des facteurs de croissances (TGF-β, *Transforming Growth Factor Beta* et IGF-1, *Insulin-Like Growth Factor-1*) (Jégou, 1995). L'activité endocrine assurée par les cellules de Sertoli conduit à la synthèse d'inhibine et d'activine qui sont des hormones appartenant à la famille du TGFβ. L'inhibine réprime la synthèse de FSH hypophysaire. L'inhibine est impliquée dans le rétrocontrôle de la sécrétion de FSH lors du développement post-natal et potentialise l'effet de la LH sur la production d'androgènes. L'activine présente un effet inverse, elle augmente la sécrétion basale de FSH par l'hypophyse et supprime la biosynthèse d'androgènes par les cellules de Leydig *via* la modulation de la LH (Hsueh et al., 1987; Lin et al., 1989; Ying, 1988). Les cellules de Sertoli produisent également le fluide séminifère qui est un milieu physico-chimique nécessaire à la spermatogenèse. Le fluide séminifère permet également le transport des spermatozoïdes testiculaires afin qu'ils progressent dans la lumière des tubes séminifères (Rato et al., 2010; Russell et al., 1989).

Les cellules myoïdes sont retrouvées dans l'épithélium séminifère. Il s'agit de cellules contractiles qui vont participer à la progression des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Par ailleurs, les cellules de Sertoli en coopération avec les cellules myoïdes péritubulaires sécrètent du collagène ainsi que de la laminine, qui sont des composants de la matrice extracellulaire, nécessaires à l'évolution des cellules germinales (Skinner et al., 1985).

Les différents types cellulaires retrouvés au sein du testicule sont étroitement liés sur le plan fonctionnel : de multiples acteurs endocriniens, paracrines et juxtacrines interviennent (tels que la testostérone, IGF-1, FGFs (*Fibroblast Growth Factor*) etc.), ce qui permet un dialogue important entre les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli, les cellules péritubulaires, les

macrophages et les cellules germinales. Ces dernières étant au cœur des travaux de thèse réalisés, cette partie introductive se focalisera sur la lignée germinale.

A. Développement embryonnaire et néonatal

1. *Primordial Germ Cells* - Gonocytes

Chez la souris, la mise en place de la lignée germinale débute au stade embryonnaire. Les cellules somatiques de la gonade mâle vont se différencier à partir de la crête génitale (McLaren, 2003) afin de constituer la structure de soutien des cellules germinales primordiales PGCs (*Primordial Germ Cells*) qui proviennent des tissus extra-embryonnaires. Les PGCs, précurseurs de la lignée germinale, proviennent de la différenciation de cellules progénitrices issues de l'épiblaste. Les cellules progénitrices des PGCs sont caractérisées par l'expression de différents facteurs de transcription tels que BLIMP1 (*B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1*) et PRDM14 (*PR DoMain-containing protein-14*). Le facteur BLIMP1 est un régulateur clé de la spécification des PGCs chez la souris, il est nécessaire à la répression du programme somatique. En effet, les cellules BLIMP1^{+} sont destinées à devenir des cellules germinales alors que les cellules BLIMP1^{-} deviennent des cellules somatiques (Ohinata et al., 2005). Des modèles invalidés pour le gène *Prdm1* codant BLIMP1 conduisent à une diminution importante du nombre de PGCs spécifiées qui présentent une prolifération et une migration aberrantes ainsi qu'un profil transcriptionnel altéré. L'invalidation de *Prdm14* conduit de son côté à un défaut de spécification des PGCs, ce phénotype est associé à une perte rapide de celles-ci, conduisant à la stérilité des souris (Yamaji et al., 2008).

Ces facteurs de transcription sont impliqués dans la stimulation de l'expression de gènes de pluripotence (tel que *Sox2*, *Sex determining region Y-bOX 2*) et permettent la reprogrammation du profil transcriptionnel des cellules progénitrices qui conduira à leur entrée dans le processus de différenciation afin d'acquérir des caractéristiques propres aux PGCs (Yamaji et al., 2008). A 7,5 jours de développement embryonnaire (E7,5), les PGCs sont retrouvées dans les tissus extra-embryonnaires, elles sont ensuite intégrées à l'endoderme de la paroi intestinale entre les jours embryonnaires 8 et 9. Les PGCs vont ensuite migrer afin de rejoindre les ébauches gonadiques et former, en lien avec les cellules de Sertoli, l'épithélium des tubes séminifères. A ce stade, l'apoptose des PGCs est importante mais elle peut être réduite en présence de SCF (*Stem Cell Factor*) ou de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) (Pesce et al., 1993), ces deux cytokines (SCF et LIF) étant connues pour améliorer la survie et/ou la prolifération des PGCs (De Felici and Dolci, 1991; Godin et al., 1991; Matsui et al., 1991).

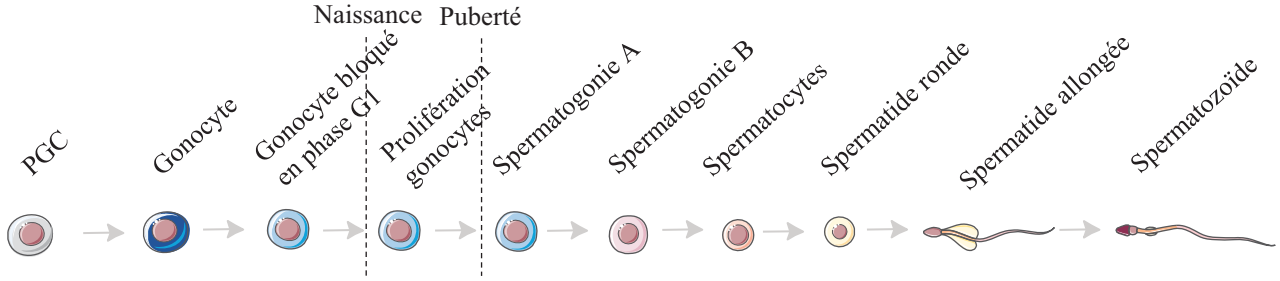


Figure 13 : Développement des cellules germinales mâles chez la souris.
Au cours des stades embryonnaires, les PGCs se multiplient puis vont se différencier en gonocytes. Ceux-ci vont s'amplifier par mitoses avant d'entrer dans une phase de quiescence où ils resteront bloqués en phase G1. Entre 2 et 3 jours après la naissance, les gonocytes reprennent leur activité mitotique. Les gonocytes vont ensuite se différencier en cellules germinales souches : les spermatogonies A. Celles-ci donneront ensuite les spermatogonies B, les spermatocytes et les spermatides qui conduiront aux spermatozoïdes.

Au cours des stades embryonnaires, les PGCs se multiplient puis vont se différencier en gonocytes (Vergouwen et al., 1991) autour du jour embryonnaire E13,5 (Western et al., 2008; Yoshioka et al., 2009) (**Figure 13**). Les gonocytes vont alors s'amplifier par mitoses puis entrer en quiescence et rester bloqués en phase G1. La prolifération des gonocytes est sous le contrôle de l'acide rétinoïque (RA) qui est un métabolite de la vitamine A. Le RAs stimule à la fois la prolifération et l'apoptose des gonocytes, suggérant qu'ils participent à un processus physiologique visant à éliminer les cellules qui ne se différencient pas correctement (Trautmann et al., 2008). La phase de quiescence des gonocytes dépend de la signalisation NOTCH puisqu'une activation constitutive de NOTCH dans les cellules de Sertoli conduit à une sortie de quiescence des gonocytes et à une différenciation précoce (Garcia and Hofmann, 2013).

Entre 2 et 3 jours après la naissance, les gonocytes reprennent leur activité de mitoses et vont migrer au niveau de la membrane basale des tubes séminifères, permettant la naissance de la lumière des tubes séminifères (Yoshida et al., 2007). A ce stade, la prolifération des gonocytes dépend de plusieurs facteurs tels que le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), le 17β-estradiol (E2), le LIF et les RAs (De Miguel et al., 1996; Li et al., 1997; Zhou et al., 2008). Les souris invalidées pour l'un des RARs (*Retinoic Acid Receptor*, RARα, RARγ ou RARβ) présentent une différenciation testiculaire normale jusqu'au début de la puberté, l'invalidation de deux des *Rar* est cependant létale *in utéro* ou à la naissance (Mark et al., 2006). L'invalidation de *Rarα* spécifiquement dans la lignée germinale conduit à une diminution du nombre de spermatozoïdes et à une désorganisation des différentes couches cellulaires au sein de l'épithélium séminifère. L'intégrité du génome méiotique est également altérée dans ces modèles, permettant de mettre en évidence que RARα est nécessaire au maintien de l'organisation des tubes séminifères et du génome méiotique ainsi qu'à la prolifération et à la différenciation des spermatogonies (Peer et al., 2018). Par ailleurs, les souris invalidées pour le récepteur des œstrogènes *Erβ* (*Estrogen Receptor Beta*) présentent un nombre de gonocytes plus importants que les individus sauvages, suggérant que la présence d'œstrogènes endogènes inhibe la prolifération des gonocytes (Delbès et al., 2004).

2. Transition gonocytes - spermatogonies

Les gonocytes vont ensuite se différencier en cellules germinales souches (SSCs, Spermatogonial stem cells) (spermatogonies adultes A_{single}). La transition des gonocytes en SSCs nécessite un remodelage physique des cellules : les gonocytes sont de grandes cellules sphériques avec un noyau important et sont localisés au centre des cordons spermatiques alors

que les spermatogonies sont des cellules semi-circulaires situées à la périphérie des tubes séminifères. Lors de la transition, en parallèle de la relocalisation des cellules du centre à la périphérie des tubes, les cellules commencent à exprimer différents marqueurs propres aux cellules souches tels que GFRA1 (*Gdnf Family Receptor Alpha-1*) ou PLZF (*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger protein*). La transition des gonocytes en spermatogonies est cruciale pour la différenciation des cellules germinales et les gonocytes qui n'auront pas migré à la périphérie des tubes séminifères seront éliminés par apoptose (Basciani et al., 2008; Roosen-Runge and Leik, 1968). La différenciation des gonocytes en SSCs est également dépendante des RAs qui stimulent la réplication de l'ADN des gonocytes et permet leur différenciation en spermatogonies (Zhou et al., 2008). Par ailleurs, le facteur NANOS2, qui est négativement corrélé à l'expression de *Stra8* (*STimulated by Retinoic Acid 8*) et *Gfra1* avant la transition des gonocytes en spermatogonies, est un acteur clé de cette transition. En effet, la surexpression de *Nanos2* réprime l'expression de *Gfra1* et *Plzf*, conduisant à un retard de la transition des gonocytes en spermatogonies. A l'inverse, l'invalidation de *Nanos2* entraîne la surexpression de *Gfra1* et *Plzf* et entraîne une transition précoce des gonocytes en spermatogonies (Pui and Saga, 2018).

Les SSCs initieront alors la première vague de spermatogenèse qui sera supportée par les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli notamment. Ces SSCs, issues des gonocytes, supporteront la production de spermatozoïdes pendant toute la vie de l'individu *via* la spermatogenèse. Afin de conserver leur potentiel de cellule souche, les SSCs sont dépendantes de leur micro-environnement appelé « niche ».

B. Mise en place de la niche des cellules germinales souches

Le concept de « niche » a été proposé pour la première fois en 1978 par Schofield indiquant qu'elle réfère à la localisation micro-anatomique où les cellules souches résident (Schofield, 1978). Des niches sont présentes au sein du testicule, elles constituent un micro-environnement hautement spécialisé nécessaire au maintien des SSCs. La niche est caractérisée par différents critères qui conduisent à l'auto-renouvellement des SSCs au détriment de leur différentiation. La niche des SSCs est constituée de nombreuses cellules, principalement de cellules de Sertoli, mais également d'autres cellules somatiques (cellules myoïdes péritubulaires, macrophages péritubulaires, cellules endothéliales testiculaires, cellules de Leydig ou encore cellules endothéliales lymphatiques) (Mäkelä and Toppari, 2018; Potter and

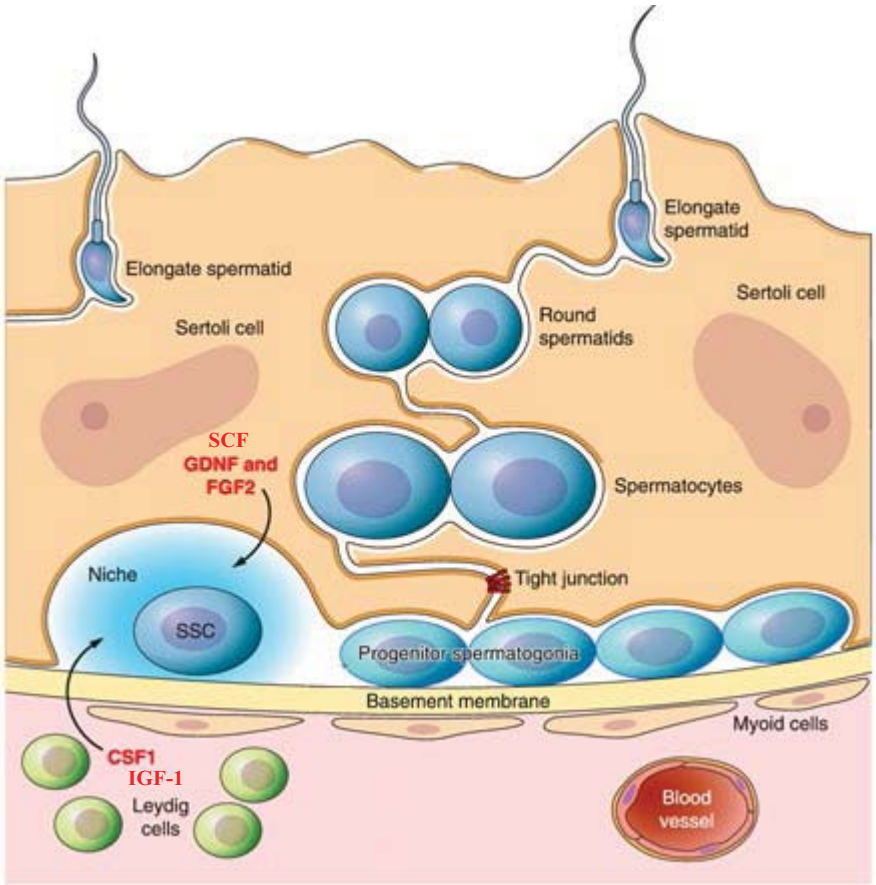


Figure 14 : La niche des SSCs.
Les SSCs sont situées dans des niches où elles reçoivent des facteurs nécessaires à leur auto-renouvellement. Les cellules de Leydig synthétisent les facteurs IGF-1 et CSF1 et les cellules de Sertoli les facteurs SCF, GDNF et FGF2.
IGF-1 : Insulin Growth Factor 1 ; CSF1 : Colony-Stimulating Factor 1 ; SCF : *Stem Cell Factor* ; GDNF : *Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor* ; FGF2 : *Fibroblast Growth Factor 2*
D'après Oatley and Brinster, 2012

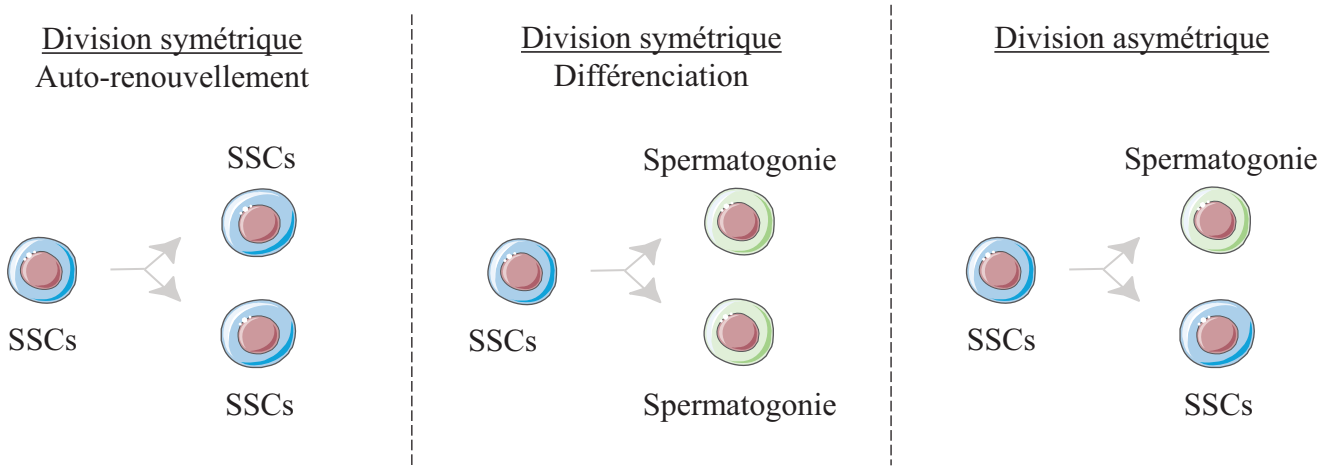


Figure 15 : Différents devenirs des SSCs : divisions symétriques ou asymétriques.

DeFalco, 2017) (**Figure 14**). Des vaisseaux sanguins sont également retrouvés au sein de niches ainsi que différents facteurs de croissance et des cytokines (Hofmann, 2008).

Les SSCs se localisent donc préférentiellement dans les niches, elles sont situées dans des régions où le tube séminifère borde l'espace interstitiel et les vaisseaux au détriment des régions où deux tubes séminifères sont en contact (Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003; Hara et al., 2014; Yoshida et al., 2007).

1. Les cellules germinales

La mise en place de la niche est dépendante de facteurs propres aux SSCs ; en effet, ces cellules expriment des molécules d'adhésion qui jouent un rôle majeur (observé notamment lors de transplantation de SSCs dans des testicules receveurs) en permettant la migration des SSCs dans les niches. Les intégrines α6 et β1 sont exprimées dans les SSCs et ces molécules d'adhésion sont connues pour se lier à la laminine (Shinohara et al., 1999), suggérant leur impact dans la migration des SSCs. Cependant une autre étude a mis en évidence que la modulation de l'expression de l'intégrine β1 n'affecte pas la translocation des SSCs à la membrane basale bien qu'elle soit nécessaire au redémarrage de la spermatogenèse lors d'une transplantation (Kanatsu-Shinohara et al., 2008). La migration des SSCs dans les niches implique donc d'autres facteurs qui ne sont pas décrits à ce jour.

Au sein de la niche, les cellules germinales souches vont, au cours du développement, favoriser une division symétrique afin d'établir un pool de cellules souches important avant de s'orienter vers une division asymétrique permettant le maintien du pool de cellules souches en parallèle d'une différenciation assurant la spermatogenèse (Oatley and Brinster, 2012) (**Figure 15**). Ces données indiquent que la régulation des SSCs par la niche n'est pas la même entre le développement néonatal et l'adulte. En néonatal, la niche des SSCs permet un support plus important pour l'auto-renouvellement des cellules alors que chez l'adulte elle permet une balance entre auto-renouvellement et différenciation. Cette balance semble être dépendante du GDNF (*Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor*), facteur produit par les cellules de Sertoli.

2. Les cellules de Sertoli

L'action des cellules de Sertoli est soutenue par la FSH qui est essentielle à la mise en place et au maintien de la physiologie testiculaire en contribuant à la prolifération et la différentiation des cellules de Sertoli immatures (par le biais des voies pro-prolifératives

PI3K/MAPKs). Elle permet ainsi durant la période périnatale de déterminer le nombre de cellules de Sertoli présentes à l'âge adulte et les cellules germinales qu'elles seront en mesure de soutenir (Sharpe et al., 2003). En effet, les souris mâles invalidées pour le gène codant *Fsh* ou *Fshr* (*Follicle Stimulating Hormone Receptor*) présentent une diminution du nombre de cellules germinales bien qu'il n'y ait pas d'impact sur la fertilité (Dierich et al., 1998; Krishnamurthy et al., 2000). La FSH, en raison de son impact sur les cellules de Sertoli, joue donc un rôle majeur dans l'établissement du pool de cellules germinales indifférenciées.

Les cellules de Sertoli sont les constituants principaux des niches, elles sont en contact étroit avec les SSCs et sécrètent de nombreux facteurs paracrines nécessaires à l'homéostasie des cellules germinales souches. Dans le compartiment basal, les cellules de Sertoli vont sécréter des facteurs paracrines tels que SCF (Rossi et al., 2000) et GDNF (Lamberti and Vicini, 2014). Ces facteurs favorisent la prolifération et la survie des spermatogonies et participent au maintien de leur état indifférencié. De plus, les cellules de Sertoli produisent du lactate qui est un substrat énergétique majeur utilisé par les cellules germinales indifférenciées qui sera converti en pyruvate (Grootegoed et al., 1984).

3. Les autres types cellulaires

Les cellules de Leydig sécrètent le facteur de croissance associé à l'insuline (IGF-1) qui est un facteur clé impliqué dans le maintien de la pluripotence des cellules souches (Huang et al., 2009). Elles expriment également CSF1 (*Colony-Stimulating Factor 1*) (Oatley et al., 2009) qui est un facteur associé à l'auto-renouvellement des SSCs.

Les cellules myoïdes péritubulaires coopèrent avec les cellules de Sertoli afin de produire la membrane basale et donner une niche pour les SSCs (Chen et al., 2014). Elles expriment le récepteur aux androgènes (AR) (Boukari et al., 2009; Shapiro et al., 2005) et produisent également du GDNF en réponse à la testostérone, mais aussi le facteur CSF1, qui participent à la régulation du devenir des SSCs (Chen et al., 2016a). Les cellules myoïdes péritubulaires permettent donc un support important aux SSCs en réponse à la testostérone.

C. La spermatogenèse

1. Maintien de la niche des cellules germinales souches

Le renouvellement des spermatogonies indifférenciées est essentiel au maintien de la spermatogenèse durant toute la vie de l'individu car ces cellules constituent une réserve

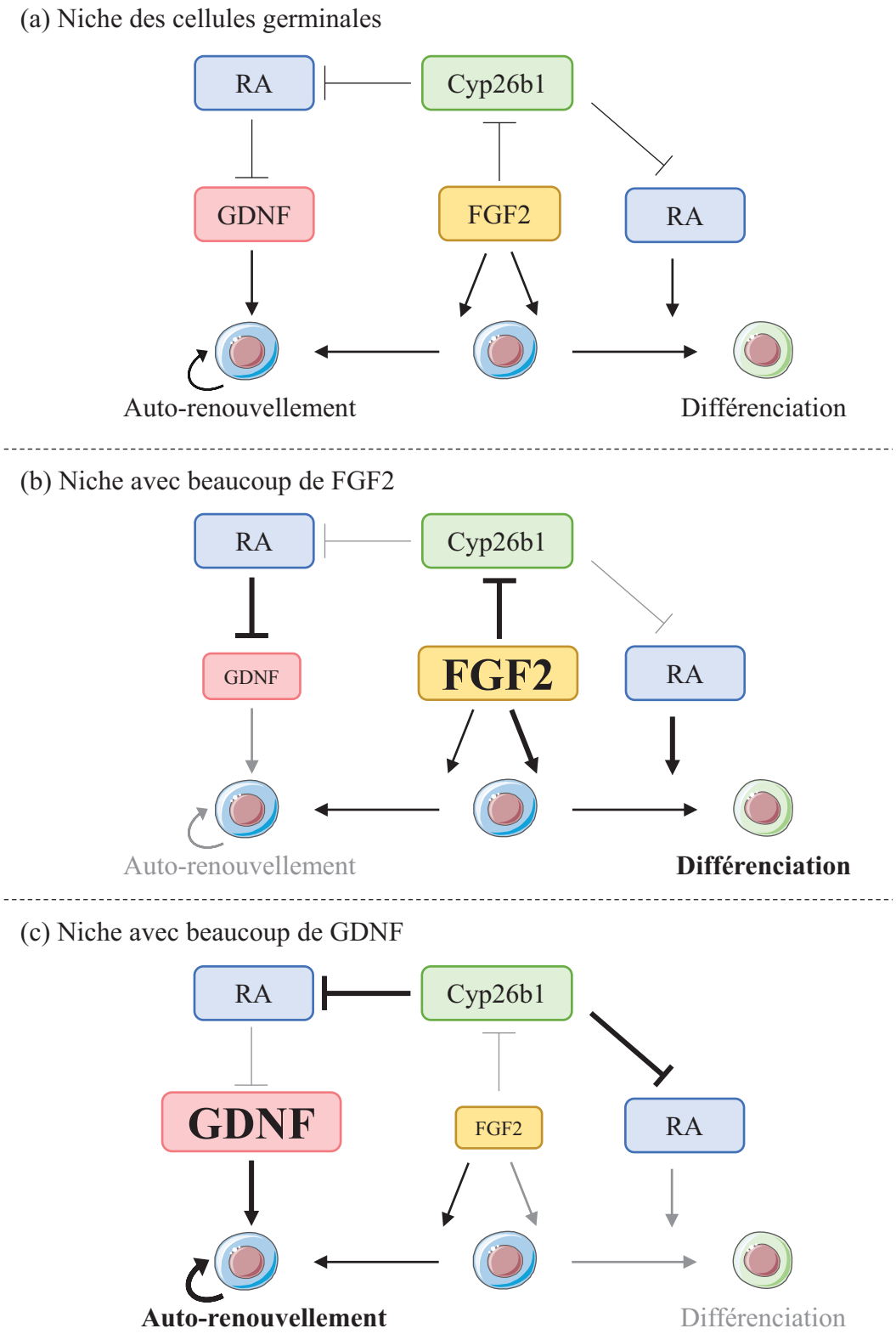


Figure 16 : Rôles de FGF2 et GDNF dans la niche des cellules germinales : un équilibre complexe entre ces deux facteurs est nécessaire au sein de la niche.
(a) Il existe au sein de la niche de cellules souches un équilibre entre FGF2 et GDNF permettant d'assurer à la fois l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules germinales souches.
(b) Dans le cas d'une concentration trop importante de FGF2, une diminution de la production de GDNF est observée, conduisant préférentiellement à la différenciation des cellules souches plutôt qu'à leur auto-renouvellement.
(c) A l'inverse, en présence de quantités importantes de GDNF, une diminution de la production de FGF2 est observée et entraîne l'auto-renouvellement des cellules souches au lieu de leur différenciation.
D'après Masaki et al., 2018

permanente de cellules germinales (De Rooij and Russell, 2000; Oatley and Brinster, 2008). Les SSCs peuvent se multiplier pour renouveler la population de SSCs et ainsi donner naissance à de nouvelles spermatogonies A_{single}. Dans ce contexte, les spermatogonies A_{single} sont définies comme SSCs puisqu'elles possèdent la capacité de renouveler la population de cellules germinales indifférenciées. D'après l'étude de Nagano (2003), les SSCs représenteraient environ 10 % des spermatogonies A_{single}, soit environ 3000 cellules chez un rongeur adulte (Nagano, 2003). Ces cellules transplantées dans un testicule receveur (vidé de son contenu germinal) permettent à elles seules de régénérer l'épithélium séminifère et d'assurer la continuité de la spermatogenèse (Brinster and Avarbock, 1994; Brinster and Zimmermann, 1994). Cet auto-renouvellement, indispensable au maintien de la spermatogenèse, est sous la dépendance de nombreux facteurs retrouvés dans la niche des SSCs.

Les cellules endothéliales lymphatiques sont la source de facteurs supportant les SSCs. Ces cellules produisent et sécrètent des FGFs (tels que le FGF5) qui seront utilisés par les cellules indifférenciées. En présence de concentrations importantes de FGF5, les cellules indifférenciées exprimant le marqueur GFRA1 vont s'auto-renouveler alors qu'en présence de faibles concentrations elles vont se différencier (Kitadate et al., 2019). En effet, FGF5 conduit à l'activation de gènes associés à la maintenance d'un état indifférencié tels que *Gfra1*, *Id4* (*Inhibitor of DNA binding 4*), et à la diminution de l'activité de gènes associés à la différenciation tels que *Ngn3* (*NeuroGeNin 3*) et *Stra8*.

Les cellules endothéliales testiculaires sont également source de facteurs supportant les SSCs. En présence de FGF2, les cellules endothéliales testiculaires produisent du GDNF (Bhang et al., 2018). La transplantation de ces cellules après une perte des cellules germinales induite par une chimiothérapie permet la restauration de la spermatogenèse, suggérant que les cellules endothéliales du testicule sont une population de la niche nécessaire pour l'auto-renouvellement des SSCs (Bhang et al., 2018). Cependant, un équilibre complexe entre les quantités de FGF2 et de GDNF est présent : en présence de concentrations trop importantes de FGF2, une diminution de la production de GDNF peut être observée, conduisant à la différenciation des cellules germinales plutôt qu'à leur auto-renouvellement (Masaki et al., 2018) (**Figure 16**).

De plus, il a été observé qu'un *knock-down* de *Fgfr2* conduit à une augmentation de l'expression du *Gdnf* (Takashima et al., 2015). De manière cohérente, FGF2 va agir dans la niche des SSCs afin de supprimer le GDNF ainsi que l'expression de *Cyp26b1* (*CYtochrome*

P450 family 26 subfamily B member 1), conduisant à la différenciation des spermatogonies *via* l'activité des acides rétinoïques (RA) nécessaires à la différenciation des spermatogonies (Masaki et al., 2018).

Les cellules de Sertoli sécrètent du GDNF, facteur indispensable pour le maintien des SSCs (Kubota et al., 2004; Meng, 2000). Le GDNF régule l'expression de gènes tels que *Nanos2* et *Id4* et exerce un rétrocontrôle négatif sur *Ngn3*, permettant ainsi l'auto-renouvellement des SSCs (Kaucher et al., 2012). Une concentration importante en GDNF conduit à la prolifération des cellules indifférenciées alors qu'une faible concentration conduit à la différenciation des cellules germinales (Kanatsu-Shinohara et al., 2005; Kubota et al., 2004; Meng, 2000; Yomogida et al., 2003). Le facteur GDNF va agir *via* GFRA1, l'expression de ce récepteur est associée à un stade plus indifférencié de spermatogonies. Au-delà de la production de GDNF, les cellules de Sertoli produisent également du FGF, dont le FGF2 qui est nécessaire à l'auto-renouvellement des SSCs (Kubota et al., 2004). Il a été mis en évidence que les cellules GFRA1$^-$ ne répondent pas au FGF contrairement aux cellules GFRA1$^+$ (Garbuzov et al., 2018).

2. Le devenir des spermatogonies : prolifération et différenciation

a) Phase proliférative

La première phase de la spermatogenèse est la phase proliférative au cours de laquelle les SSCs, localisées au niveau de la membrane basale des tubes séminifères, vont subir une série de divisions mitotiques afin de s'amplifier pour ensuite se différencier en spermatocytes primaires. Grâce à l'amélioration des méthodes d'isolement cellulaire, l'étude de la population de spermatogonies indifférenciées s'est précisée et différents sous-types de spermatogonies A ont été décrits (Chan et al., 2014; Oatley and Brinster, 2012).

Chez la souris, au cours de la phase proliférative, les SSCs vont se multiplier et générer une population de cellules progénitrices (spermatogonies A_{single}) qui se différencieront ensuite pour débuter le processus de spermatogenèse : elles subiront 4 divisions mitotiques successives permettant la production de 2 spermatogonies de type A_{paired} puis une chaîne de 4, 8 et 16 spermatogonies de type $A_{aligned}$. (de Rooij, 2001) (**Figure 17**). L'ensemble de ces cellules issues d'une même SSC seront connectées les unes aux autres durant toute la phase proliférative par le biais de ponts intercellulaires permettant le transfert de substances (ARN messagers, protéines) assurant la coordination des cellules germinales (Guo and Zheng, 2004).

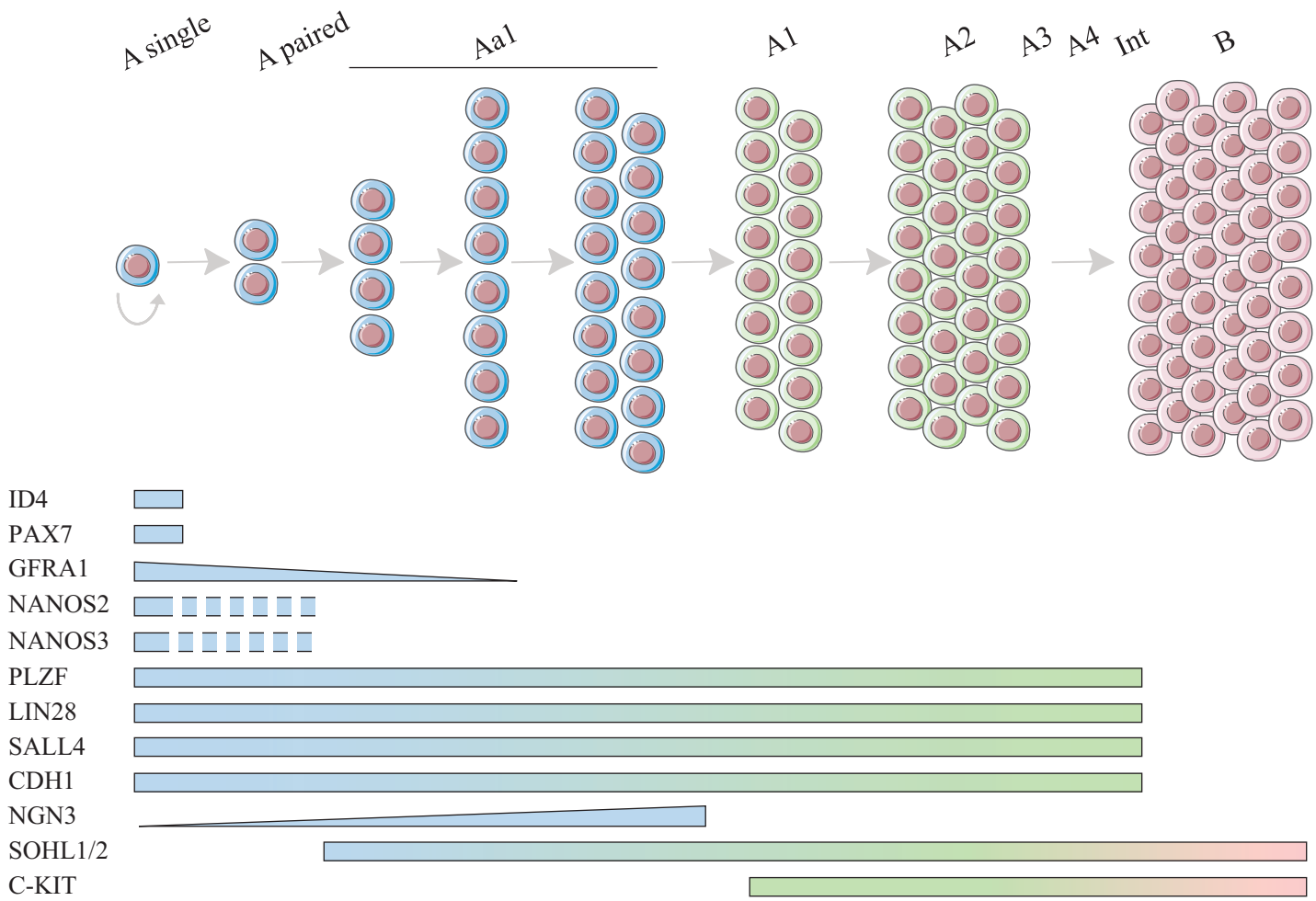


Figure 17 : Phase de prolifération des spermatogonies et différents marqueurs de ces cellules chez la souris.
Les spermatogonies souches (SSCs) vont se multiplier et générer une population de cellules progénitrices (Asingle). Ces cellules se différencient ensuite pour débuter le processus de la spermatogenèse, elles subiront 4 divisions mitotiques successives permettant la production de 2 spermatogonies de type Apaired puis une chaîne de 4, 8 et 16 spermatogonies de type Aaligned. Différents marqueurs sont exprimés selon les stades cellulaires, les marqueurs ID4 et PAX7 sont exprimés uniquement dans les cellules de type Asingle. Les cellules indifférenciées expriment les marqueurs GFRA1, NANOS2, NANOS3. L'ensemble des spermatogonies A expriment PLZF, LIN28, SALL4, CDH1. Le marqueur NGN3 est exprimé faiblement dans les spermatogonies Asingle, son expression augmente au cours de la différenciation et est majoritaire dans les spermatogonies Aaligned. Enfin, les marqueurs SOHL1/2 et C-KIT sont exprimés à des stades plus tardifs et jusqu'au stade spermatogonie B.

	Indifférenciées			**Différenciées**						
Souris	A single	A paired	Aaligned	A1	A2	A3	A4	Int	B	Cytes I
Homme	A dark		Apale	B						Cytes I

Figure 18 : Différence entre les souris et les hommes.
Chez l'homme, il existe deux sous-types de spermatogonies indifférenciées : A_{dark} et A_{pale}. Les spermatogonies souches sont représentées par les spermatogonies A_{dark} qui s'auto-renouvellent et se différencient en spermatogonies A_{pale} qui donneront ensuite les spermatogonies B.

Les trois types de spermatogonies indifférenciées (A_{single}, A_{paired} et $A_{aligned}$) se distinguent les uns des autres par leur localisation le long de la membrane basale ainsi que par leur profil d'expression (**Figure 17**). Les spermatogonies indifférenciées représentent environ 330000 cellules dans un testicule murin adulte (Tegelenbosch and de Rooij, 1993).

Chez l'homme, il existe deux types de spermatogonies indifférenciées, les spermatogonies A_{dark} et A_{pale}. Les spermatogonies A_{dark} sont les cellules souches qui vont s'auto-renouveler, afin de maintenir le pool de cellules souches, ou donner naissance aux spermatogonies A_{pale} qui se diviseront pour donner les spermatogonies B (Clermont and Leblond, 1959). (**Figure 18**)

b) Les différents marqueurs de spermatogonies

Récemment des analyses transcriptomiques de *single-cell* ont mis en évidence une hétérogénéité importante entre les différentes spermatogonies incluant les SSCs, les progéniteurs et les spermatogonies en différenciation. Plusieurs signatures d'expression de gènes ont été identifiées, permettant de définir la présence ou l'absence de chacun des 11 types de cellules spermatogéniques dans un échantillon testiculaire ou dans des cellules isolées (Suzuki et al., 2019). Les résultats de cette étude ont en effet permis de mettre en évidence des profils d'expression différentiels entre les SSCs qui s'auto-renouvellent et les spermatogonies progénitrices qui vont se différencier. Par ailleurs, une autre étude suggère, en lien avec des données déjà publiées, que les gènes *Dazl* (*Deleted in AZoospermia Like*), *Ddx4* (*DeaD-boX helicase 4*), *Nxf2* (*Nuclear rna eXport Factor 2*), *Sall4* (*SAL-Like protein 4*), *Fkbp6* (*FK506 Binding Protein 6*), *Trim71* (*TRIpartite Motif containing 71*) et *Mael* (*MAELstrom spermatogenic transposon silencer*) sont parmi les facteurs les plus importants pour le devenir et la fonction des SSCs (Sisakhtnezhad and Heshmati, 2018).

Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence des marqueurs exprimés à différents stades. Certains marqueurs tels que PLZF, LIN28A, SALL4 et CDH1 (*CaDHerin 1*) sont exprimés dans tous les types de spermatogonies A indifférenciées. La protéine PLZF est un répresseur transcriptionnel codé par le gène *Zbtb16*, son expression est restreinte aux gonocytes et aux spermatogonies indifférenciées. L'inactivation de PLZF conduit à un défaut de spermatogenèse associé à une perte des spermatogonies (Costoya et al., 2004). LIN28 est un facteur impliqué dans la pluripotence des cellules, spécifiquement exprimé par les spermatogonies indifférenciées (Zheng et al., 2009), il est impliqué dans la régulation du nombre de cellules germinales (West et al., 2009). SALL4 co-localise avec PLZF ainsi que

LIN28 (Gassei and Orwig, 2013). Il a été démontré que SALL4 séquestre PLZF, empêchant son activité et entraînant donc l'expression de *Kit* (*kit proto-oncogene, receptor Tyrosine KInase*) (normalement réprimé par PLZF), conduisant à la différenciation des cellules (Hobbs et al., 2012). L'invalidation de *Sall4* conduit à un déclin des spermatogonies indifférenciées et altère la régénération des cellules souches à long-terme (Chan et al., 2017). Ces différentes études mettent en évidence que SALL4 est nécessaire à la prolifération mais également à la différenciation des cellules germinales indifférenciées. De plus, l'ensemble des cellules positives pour CDH1 (E-cadhérine) présente des caractéristiques de spermatogonies A indifférenciées, ce qui a permis de mettre en évidence la spécificité de ce marqueur (Tokuda et al., 2007).

Il existe d'autres protéines exprimées de manière différentielle selon le degré de différenciation des spermatogonies A. Le répresseur transcriptionnel ID4 est exprimé par une sous-population de spermatogonies indifférenciées : il est exprimé spécifiquement dans les spermatogonies A_{single}. ID4 représente donc l'un des seuls marqueurs de SSCs. Chez les souris invalidées pour le gène codant ID4, la spermatogenèse est altérée à long terme en raison d'une perte progressive des spermatogonies indifférenciées à l'âge adulte (Oatley et al., 2011). Le facteur de transcription PAX7 (*PAired boX 7*) est lui aussi un marqueur spécifique des spermatogonies A_{single}. Les cellules positives pour PAX7 sont nécessaires au maintien de la fertilité et elles sont suffisantes pour entraîner un redémarrage de la spermatogenèse après une altération de la lignée germinale avec des agents de chimiothérapie ou de radiothérapie (Aloisio et al., 2014).

La protéine GFRA1 est également exprimée de manière hétérogène dans les différents types de spermatogonies ; environ 30 à 40 % des cellules indifférenciées seraient $GFRA1^+$ (Nakagawa et al., 2010). GFRA1 est, avec RET *(REarranged during Transfection*), le co-récepteur du GDNF (Meng, 2000). L'expression de GFRA1 est importante dans les spermatogonies A_{single} et diminue au fur et à mesure de la progression de la spermatogenèse. GFRA1 n'est plus exprimé à partir du stade spermatogonies $A_{aligned}$ au stade 16 cellules (Grasso et al., 2012; Nakagawa et al., 2010). Il a été démontré que le pool de SSCs est cependant composé de cellules $GFRA1^+$ et $GFRA1^-$ (Garbuzov et al., 2018). Les cellules $GFRA1^+$ sont définies par une signalisation active des gènes régulés par le GDNF et les FGFs associée à l'auto-renouvellement et à la prolifération des cellules. La sous-régulation de ces voies de signalisation conduit à une transition des cellules $GFRA1^+$ vers les cellules $GFRA1^-$.

Trois *clusters* de cellules GFRA1$^+$ ont été mis en évidence à partir des spermatogonies A_{single} jusqu'aux spermatogonies A_{paired} : les cellules exprimant uniquement *Nanos2*, celles exprimant uniquement *Nanos3* et celles co-exprimant les deux marqueurs (Suzuki et al., 2009). Les gènes *Nanos* codent pour des protéines conservées au cours de l'évolution et sont impliqués dans le développement des cellules germinales (Seydoux and Braun, 2006). NANOS2 et NANOS3 sont exprimés dans les spermatogonies souches qui s'auto-renouvellent, ils sont nécessaires au maintien de leur état souche lors de la spermatogenèse. L'invalidation conditionnelle de *Nanos2* entraîne une déplétion du pool de cellules souches alors que sa surexpression conduit à une augmentation du nombre de spermatogonies indifférenciées ayant des caractéristiques de cellules souches (Sada et al., 2009). En parallèle, une accumulation du nombre de cellules en phase G1 est observée lors de la surexpression de *Nanos3* indiquant un rôle majeur de NANOS3 dans la progression du cycle cellulaire des cellules indifférenciées. Par ailleurs, un traitement aux acides rétinoïques conduisant à la différenciation des cellules germinales entraîne une diminution importante de l'expression de *Nanos3* (Lolicato et al., 2008) confirmant que NANOS3 est nécessaire au maintien de l'état indifférencié des spermatogonies *via* la régulation de leur cycle cellulaire.

Le facteur de transcription NEUROGENIN3 (NGN3) est exprimé dans les spermatogonies indifférenciées, principalement les spermatogonies progénitrices (Yoshida et al., 2004) ; il est nécessaire à l'entrée en différenciation des SSCs (Kaucher et al., 2012). Il existe deux sous-populations de spermatogonies indifférenciées, les cellules NGN3$^-$ qui présentent un potentiel cellule souche important et les cellules NGN3$^+$ qui présentent un potentiel de différentiation élevé (Zheng et al., 2009). Les spermatogonies indifférenciées exprimant NGN3 ne contribuent donc pas aux SSCs ; cependant, après une déplétion des spermatogonies (induite par un traitement au busulfan), ces cellules sont capables de restaurer le pool de cellules souches, suggérant ainsi une « reprogrammation » des cellules progénitrices NGN3$^+$ en SSCs (Zhang et al., 2016a).

Les régulateurs transcriptionnels SOHLH1 (*Spermatogenesis and Oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix 1*) et SOHLH2 (*Spermatogenesis and Oogenesis specific basic Helix-Loop-Helix 2*) sont co-exprimés dans l'ensemble de la population des spermatogonies à l'exception des spermatogonies GFRA1$^+$ qui incluent les SSCs. L'invalidation de l'un de ces gènes ou de ces deux gènes conduit à un défaut de différenciation des spermatogonies alors que la prolifération n'est pas impactée. SOHLH1 et SOHLH2 induisent des gènes nécessaires à la différenciation des cellules indifférenciées tels que *Sox3* (*Sex determining region Y-bOX 3*) et

régulent les gènes *Gfra1* et *Kit* impliqués dans le maintien de la pluripotence des SSCs (Suzuki et al., 2012).

Le gène *c-kit* est un proto-oncogène qui code pour un récepteur tyrosine kinase. Il est spécifiquement requis pour la mitose des spermatogonies A matures ($A_{aligned}$) et pour leur différenciation, mais la mitose des spermatogonies indifférenciées est indépendante de son expression (Yoshinaga et al., 1991).

c) Différenciation des spermatogonies indifférenciées

A l'issue de cette étape de prolifération où les spermatogonies se sont amplifiées, les spermatogonies $A_{aligned}$ vont entrer en différenciation afin de devenir des spermatogonies différenciées. Dans un premier temps, il s'agira de spermatogonies A1 qui subiront 6 divisions mitotiques et se différencieront en spermatogonies A2, A3 et A4, puis en spermatogonies intermédiaires avant de devenir des spermatogonies B. Ces dernières vont subir une division mitotique permettant la production de deux spermatocytes primaires pré-leptotènes qui subiront la méiose (de Rooij, 2001).

Cette étape nécessite un soutien important des cellules somatiques. Les macrophages péritubulaires ainsi que les cellules de Leydig produisent le facteur CSF1 nécessaire aux spermatogonies. Les macrophages produisent également avec les cellules de Sertoli les enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides rétinoïques, essentiels à la régulation de la différenciation (Chen et al., 2014, 2016a; DeFalco et al., 2015; Kokkinaki et al., 2009; Meistrich and Shetty, 2015; Oatley et al., 2009; Potter and DeFalco, 2017). L'ablation des macrophages dans le testicule adulte entraîne une diminution du nombre de cellules germinales associée à une modification de la prolifération des cellules ou un défaut de différenciation mais sans que cela ait impact sur les SSCs (DeFalco et al., 2015).

Au sein du compartiment apical, les cellules de Sertoli sécrètent des protéines de transport qui vont permettre le transfert d'ions métalliques tels que la transferrine ou la céruloplasmine (Sylvester and Griswold, 1994), mais également de lipides tels que la clusterine ou la saposine (Law and Griswold, 1994), ou encore des hormones qui seront nécessaires à la différenciation des cellules germinales post-méiotiques. Pour leur métabolisme, les cellules germinales indifférenciées nécessitent par ailleurs la présence de lactate (Jutte et al., 1981; Mita et al., 1982; Nakamura et al., 1984) dont l'approvisionnement dans le compartiment apical est pris en charge par les cellules de Sertoli (Robinson and Fritz, 1981). En effet, les cellules de

Sertoli par le biais de transporteurs spécifiques de type GLUT (*GLUcose Transporter*) captent le glucose circulant, qui est ensuite converti en pyruvate après glycolyse (Angulo et al., 1998). Le pyruvate est enfin transformé en lactate sous l'action de la lactate déshydrogénase (LDH) (Rato et al., 2012), il sera ensuite pris en charge par les transporteurs MCT (*MonoCarboxylate Transporters*) pour être acheminé jusqu'aux cellules germinales (Oliveira et al., 2011; Rato et al., 2012). Par ailleurs les facteurs IGF-1 et IGF-2 (*Insulin-like Growth Factor 1 et 2*) et TGF-α (*Transforming Growth Factor Alpha*) produits par les cellules de Sertoli favorisent *in vitro* la différenciation des spermatogonies en spermatocytes (Nakayama et al., 1999; Tajima et al., 1995). Il a été démontré qu'IGF-1 augmente le pourcentage de spermatides rondes et allongées *via* une diminution de l'apoptose des cellules germinales et une augmentation de la densité de celles-ci (Yao et al., 2017).

A l'âge adulte, la FSH est nécessaire au maintien de la spermatogenèse. Chez le rat, le défaut de production de la FSH (hypophysectomie), ou la perte de son activité (immunosuppression GnRH, *GoNadotropin Releasing Hormone*), conduisent à une diminution du nombre de cellules germinales différenciées et à une altération de la survie des spermatogonies. Cet effet peut être restauré par l'administration de FSH recombinante (Russell et al., 1993; Singh and Handelsman, 1996) bien qu'elle ne soit pas suffisante à la progression des cellules germinales au-delà des stades méiotiques.

La FSH contribue ainsi à la prolifération et à la survie des spermatogonies en partie car l'expression de nombreux gènes sertoliens (environ 300) sont sous la dépendance de la FSH (McLean et al., 2002; Sadate-Ngatchou et al., 2004). Parmi ceux-ci de nombreux sont identifiés comme nécessaires au maintien du métabolisme des cellules germinales tels que l'*Abp* (*Androgen Binding Protein*) (Morris et al., 1988) et la lactate déshydrogénase (Short et al., 1994). D'autres sont impliqués dans la prolifération et la différenciation des cellules germinales tels que les facteurs de croissance *Igf-1* (Suwanichkul et al., 1994), *Scf* (Taylor et al., 1996), *Vegf* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Tian et al., 2016) et *Gdnf* (Tadokoro et al., 2002).

Depuis le développement embryonnaire, l'expression du cytochrome CYP26B1 permet de maintenir des concentrations faibles d'acides rétinoïques jusqu'à la puberté (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006) où l'expression du gène *Cyp26b1* est réprimée. Les niveaux d'acides rétinoïques vont alors augmenter et induire l'expression du gène *Stra8* qui va permettre l'entrée en méiose des cellules germinales *via* l'activation du récepteur RARα (Oulad-Abdelghani et al., 1996). Il a récemment été mis en évidence que les acides rétinoïques ne sont

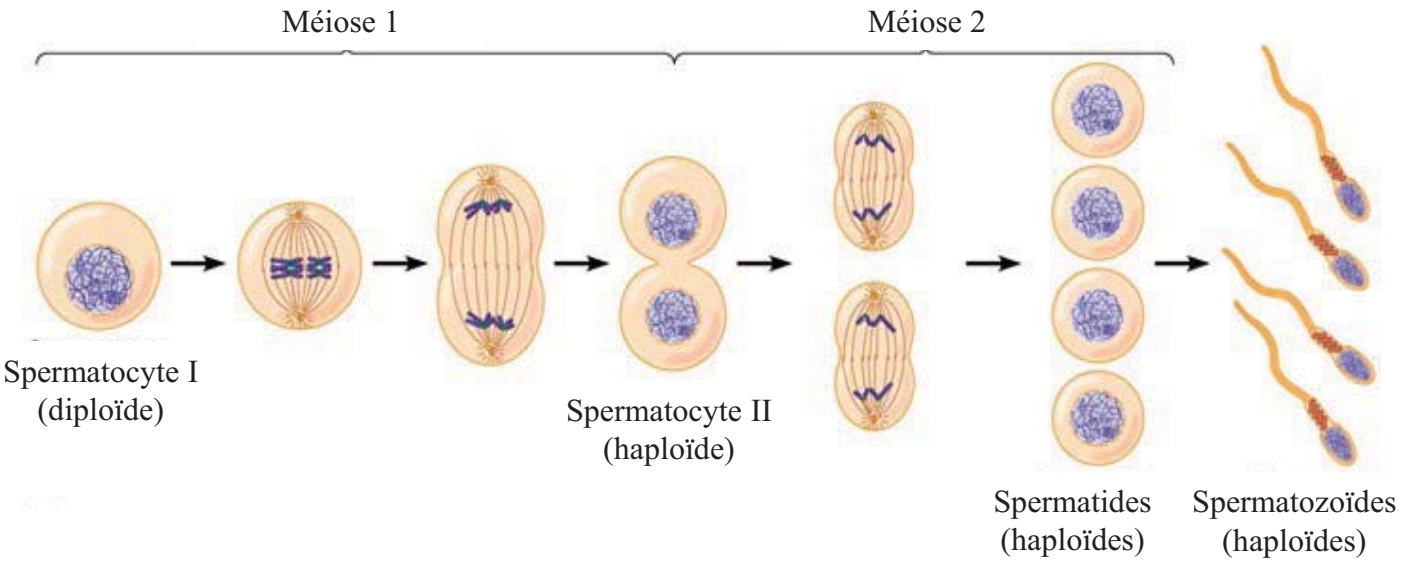


Figure 19 : La méiose des spermatocytes.
La première division méiotique est une division réductionnelle qui permet de passer d'un spermatocyte primaire diploïde à un spermatocyte secondaire haploïde. La seconde division méiotique est dite équationnelle, elle permet la formation de deux spermatides rondes à partir d'un spermatocyte secondaire.
https://lille2p1.wordpress.com/2015/08/08/ue2-la-meiose-2/

cependant probablement pas le seul signal de différenciation. En effet, il a été montré que la différenciation des cellules germinales peut se dérouler normalement en l'absence de signalisation RA (Teletin et al., 2019).

3. Méiose

La méiose est un processus de division cellulaire propre aux cellules germinales. Elle permet de réduire le matériel génétique afin de former des cellules sexuelles au cours de la gamétogenèse. La méiose est caractérisée par deux étapes de division successives précédées d'une unique phase de réplication (phase S) (**Figure 19**). Elle permet, à partir d'une cellule mère diploïde à 2n chromosomes homologues à deux chromatides (spermatocyte primaire) de former quatre cellules filles haploïdes à n chromosomes simples (spermatocytes secondaires).

Chacune des divisions méiotiques se déroule en 5 phases : prophase, métaphase, anaphase, télophase et cytodiérèse. La première division méiotique est dite division réductionnelle, puisque les deux cellules qui vont résulter de cette division sont haploïdes : leur nombre de chromosome est réduit de moitié.

La prophase de première division méiotique (prophase 1) est une étape longue (90 % de la durée totale de la méiose) se subdivisant en 5 parties correspondant à l'état caractéristique de la chromatine : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse. Elle est marquée par deux événements majeurs :

1/ Les spermatocytes leptotènes vont traverser la barrière hémato-testiculaire lorsque cette dernière s'ouvre de manière transitoire afin de permettre leur migration à partir du compartiment basal dans le compartiment apical de l'épithélium séminifère (Li et al., 2009). Ce processus implique une dissociation puis un réassemblage des jonctions intercellulaires entre deux cellules de Sertoli, permettant l'ouverture de la BHT, et entre une cellule de Sertoli et une cellule germinale, permettant la progression des cellules germinales dans le tube séminifère.

2/ Au cours du stade pachytène, un échange de matériel génétique entre deux chromatides de chromosomes appariés se déroule. Il s'agit d'une recombinaison homologue permettant le brassage de l'information génétique et conduisant à la production de cellules germinales portant une association d'allèles uniques.

La deuxième division méiotique est dite équationnelle, elle se déroule comme une mitose classique immédiatement après la première division méiotique. Les chromatides sœurs de chaque chromosome se répartissent entre les deux cellules filles, il n'y a pas de cycle de

réplication de l'ADN supplémentaire. Le stock génétique est donc conservé et deux spermatides rondes à n chromosomes sont produites à partir d'un spermatocyte secondaire.

Au cours de la méiose, les spermatocytes primaires vont subir une vague d'apoptose qui va conduire à la perte d'environ 22 % des spermatocytes primaires, principalement lors de la métaphase (Roosen-Runge, 1962). L'apoptose, qui est un processus physiologique indispensable au bon déroulement de la spermatogenèse (Xiong et al., 2009), permet de réguler le nombre de cellules germinales afin d'adapter le ratio cellules germinales / cellules de Sertoli (Billig et al., 1995; Print and Loveland, 2000) et d'éliminer les cellules germinales présentant des anomalies (Blanco-Rodríguez et al., 2003; Rodriguez et al., 1997). Les cellules de Sertoli présentent une activité de phagocytose qui va leur permettre d'assurer l'élimination des cellules germinales apoptotiques et des corps résiduels formés au cours de la spermiogenèse (cf 4. Spermiogenèse) (Yefimova et al., 2008). Cette fonction permet d'empêcher la libération de contenus toxiques et constitue une importante source d'énergie pour les cellules de Sertoli. En effet, les lipides membranaires fourniront l'énergie nécessaire au métabolisme de la cellule de Sertoli (Xiong et al., 2009).

Par ailleurs, les modèles murins invalidés pour le récepteur aux androgènes spécifiquement dans les cellules de Sertoli sont stériles, il n'est détecté aucun spermatozoïde dans l'épididyme. Un blocage de la spermatogenèse au stade de spermatocyte primaire est observé, conduisant à l'absence de formation de spermatides rondes (Chang et al., 2004). La diminution du nombre de cellules germinales est associée à une augmentation de l'apoptose et à un défaut des fonctions des cellules de Sertoli (Chang et al., 2004; De Gendt et al., 2004; Holdcraft and Braun, 2004). En effet, un défaut de développement morphologique des cellules de Sertoli et une augmentation de la perméabilité de la BHT sont observés. Ces effets sont associés à une diminution des niveaux d'expression de transcrits codant des protéines impliquées dans la composition du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire de la cellule de Sertoli telles que la CLAUDIN3 (CLDN3) (Meng et al., 2005). Ceci suggère un rôle majeur des androgènes sur les cellules de Sertoli, nécessaires à la méiose des cellules germinales. En effet, une diminution importante de la production d'androgènes (induite par hypophysectomie, par saturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire par la GNRH ou par la perte de fonction des récepteurs au gonadostimulines) ou la perte de fonction du récepteur AR sont associées à une apoptose massive des cellules germinales et à un arrêt de la spermatogenèse lors de la première division méiotique (Chang et al., 2013; Eacker et al., 2008; Huhtaniemi et al., 2012; Layman and McDonough, 2000). Ces observations mettent en avant un impact majeur de la production

de testostérone par les cellules de Leydig sur les fonctions des cellules de Sertoli afin de conduire à la méiose des cellules germinales.

A ce stade, le rôle immunitaire de la BHT est majeur. En isolant les cellules post-méiotiques de la circulation systémique, la BHT délimite un environnement de privilège immunitaire. Elle prévient ainsi l'entrée des lymphocytes dans le compartiment luminal de l'épithélium, ce qui évite l'apparition d'anticorps à l'origine de maladies auto-immunes conduisant à la stérilité (Fijak et al., 2011; Francavilla et al., 2007). Par ailleurs, la BHT sépare les cellules de Sertoli en deux pôles : basal et apical, ce qui leur confère une polarité structurale et fonctionnelle. Cela permet de créer un microenvironnement spécialisé qui sera nécessaire au développement des cellules germinales post-méiotiques. Plusieurs modèles animaux exposés à différentes substances entraînant une rupture de la BHT présentent un blocage de la spermatogenèse.

Par ailleurs, la méiose nécessite des voies de signalisation dépendantes des cellules de Sertoli. Il a notamment été montré que l'activation de ERK1/2 dans les cellules de Sertoli conduit à l'entrée en méiose des cellules germinales. En effet, en présence d'un inhibiteur de cette voie, une diminution du nombre de spermatocytes secondaires est observée (Godet et al., 2008). De plus, en présence d'une augmentation de la FSH, une surexpression de la nociceptine dans les cellules de Sertoli est observée (Eto et al., 2012). Le récepteur à la nociceptine, OPR-1 (*12-OxoPhytodienoate Reductase 1*), est exprimé exclusivement dans les spermatocytes (Eto et al., 2013). La nociceptine agit en induisant et en maintenant la phosphorylation de REC8, responsable de la dynamique des chromosomes durant la méiose dans les spermatocytes. La nociceptine est donc un facteur essentiel à la progression méiotique (Lee et al., 2003). De plus, les cellules de Sertoli sous l'action des RAs et de la FSH vont également exprimer NRG1 (*NeuReGulin 1*) et NRG3 (*NeuReGulin 3*). Ces deux facteurs participent à l'entrée en méiose, les souris invalidées pour NRG1 présentant une absence d'initiation de la méiose (Zhang et al., 2011).

4. Spermiogenèse

La troisième étape de la spermatogenèse concerne la maturation des spermatides permettant d'aboutir à la formation des spermatozoïdes testiculaires immatures. Il s'agit de la spermiogenèse qui est le processus de différenciation terminal de la spermatogenèse. Elle débute immédiatement après la division méiotique équationnelle.

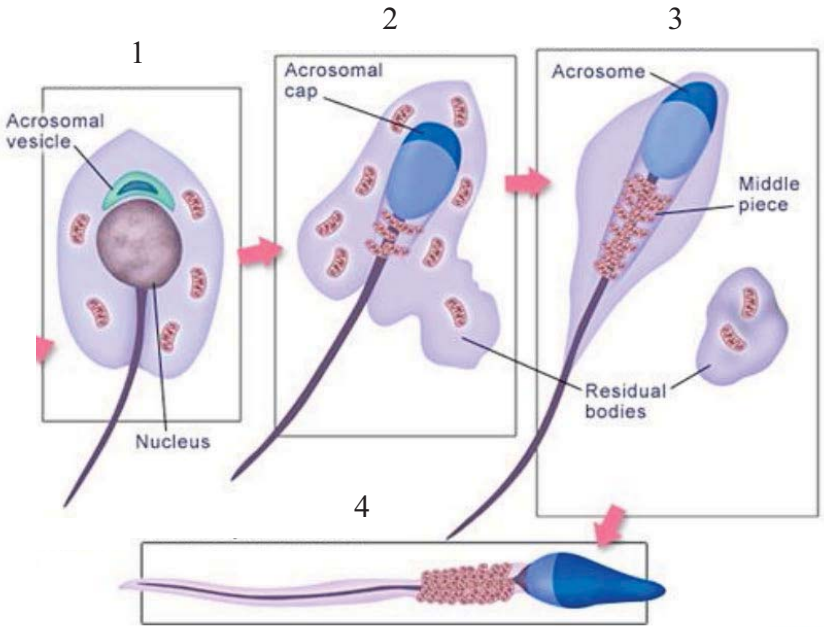


Figure 20 : La spermiogenèse.
1 : Condensation de la chromatine, début de développement du flagelle
2 : Développement de l'acrosome
3 : Formation du corps résiduel
4 : Spermatozoïde mature

Chez la souris, la spermiogenèse est divisée en 16 étapes associées à des changements morphologiques importants nécessaires à la formation de spermatozoïdes fonctionnels (Hess and Renato de Franca, 2008; Oakberg, 1956). Les spermatides rondes se distinguent par leur noyau arrondi (stades 1 à 8) qui possèdent une chromatine homogène associée à une activité transcriptionnelle réduite. En effet, il est principalement retrouvé des transcrits codant les protéines utiles à la poursuite de la différenciation, il s'agit essentiellement de protéines de transition (TNP1/TNP2 : *TraNsition Protein 1/2*) et de protamines (PRM1/PRM2 : *PRotaMin 1/2*) (Steger, 1999). Les spermatides s'allongent ensuite progressivement (stades 8 à 11) ; une fois matures elles présentent une chromatine inactive de forme compacte (stades 11 à 14). La majeure partie du cytoplasme est ensuite éliminée, le noyau est condensé de manière plus importante qu'à l'étape précédente et est transcriptionnellement inactif, et le flagelle et l'acrosome se développent (stades 14 à 16). (**Figure 20**)

i. Compaction de la chromatine

Lors de la spermiogenèse, un remaniement majeur de la structure de la chromatine s'effectue. Le noyau va subir une réorganisation morphologique et la chromatine va se condenser progressivement pour donner une apparence compacte. Un des premiers mécanismes qui entrent en jeu est l'acétylation de l'histone H4 qui est associée à une structure chromatinienne plus relâchée (Shirakata et al., 2014). Les histones H4 hyperacétylées sont reconnues par les protéines BRDT (*BRomoDomain Testis-specific*) qui vont participer au remodelage de la chromatine (Pivot-Pajot et al., 2003). La transition des histones en protamines est également associée aux cassures ADN, celles-ci sont causées par la topoisomerase II beta (Leduc et al., 2008), ce qui va permettre de faciliter l'élimination des variants d'histone et leur remplacement par des protéines de transitions (TNP1 et TNP2) qui semblent impliquées dans les processus de réparation de l'ADN (Caron et al., 2001). En effet, les protéines de transitions stimulent la réparation des cassures simples brins après un dommage à l'ADN induit par des UVs, bien que le mécanisme impliqué ne soit actuellement pas décrit. Les protéines de transitions seront ensuite remplacées par des protamines qui sont des protéines nucléaires spécifiques au testicule (PRM1 et PRM2) (Sassone-Corsi, 2002). Cette transition histone-protamine permet la formation des spermatides allongées *via* la condensation du génome des spermatides rondes. Les protamines sont riches en résidus cystéine et sont étroitement associées entre elles par des ponts disulfures permettant un état de compaction maximal de l'ADN. Le génome est alors moins perméable, donc protégé des agressions physiques et chimiques générées par les agents mutagènes. Cela permet un maintien de l'intégrité de l'information

génétique lors de la progression des spermatozoïdes dans les voies génitales mâles et femelles jusqu'à la fécondation. Cette structure permet d'assurer l'intégrité du bagage génétique transmis à la descendance (Rousseaux et al., 2008; Ward and Coffey, 1991). L'intégration des protamines permet par ailleurs la constitution d'un code épigénétique essentiel à l'établissement du programme transcriptionnel du zygote lors des premières étapes du développement (Braun, 2001; de Mateo et al., 2007). Le code épigénétique des spermatozoïdes est constitué de trois éléments structurels : les protamines, les histones et la matrice nucléaire. La matrice nucléaire représente une structure nucléaire squelettique impliquée dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN. Chez les hommes fertiles, 5 à 15 % de la chromatine des spermatozoïdes reste liée aux histones plutôt qu'aux protamines alors que chez la souris seul 1 % de l'ADN est retrouvé associé aux histones (van der Heijden et al., 2006). La modification des histones (méthylation, acétylation etc.) permet d'activer ou de réprimer l'expression des gènes alors que les protamines sont moins permissives et ne permettent quasiment pas d'expression génique (Gannon et al., 2014).

ii. Elimination du corps résiduel

Au cours de la spermiogenèse, la spermatide ronde va s'allonger de manière progressive et réduire son cytoplasme. Celui-ci, avec les organites cytoplasmiques, migre du pôle céphalique vers le pôle caudal du futur spermatozoïde le long du flagelle en croissance afin de former le corps résiduel qui sera éliminé par les cellules de Sertoli par phagocytose (Kerr and de Kretser, 1974). Leur membrane est digérée et une partie de leurs composants est recyclée afin d'initier et de soutenir un nouveau cycle de spermatogenèse.

iii. Développement de l'acrosome

L'acrosome est un organite présent dans la tête du spermatozoïde. Sa membrane enveloppe partiellement le noyau. Il est composé de multiples vésicules de l'appareil de Golgi qui ont migré et fusionné (Ramalho-Santos et al., 2001). L'acrosome est constitué d'enzymes hydrolytiques nécessaires à la dégradation de la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation afin de la dégrader et ainsi permettre d'atteindre la membrane plasmique du gamète femelle.

iv. Développement du flagelle

Dès les premiers stades de la spermiogenèse, le flagelle commence à se développer. Il permet la mobilité du spermatozoïde grâce à des mouvements ondulatoires. Son squelette

(l'axonème) est formé de microtubules issus du centriole distal qui se sont assemblés. L'axonème est associé à de nombreuses protéines et il est entouré de nombreuses mitochondries. Il s'agit de l'appareil moteur du spermatozoïde, assurant sa mobilité. La présence des mitochondries permet de générer l'énergie nécessaire aux mouvements du flagelle *via* la production d'ATP (Adénosine triphosphate).

5. Spermiation

La spermiation est la dernière étape de la spermatogenèse, il s'agit de la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère. Cette étape nécessite l'intervention des cellules de Sertoli qui vont se restructurer afin de faciliter la dissociation et le relargage des spermatozoïdes testiculaires (O'Donnell et al., 2011).

Les cellules de Sertoli produisent des protéases (métalloprotéases) et des anti-protéases qui permettent la progression des cellules germinales au sein de l'épithélium et le relargage des spermatozoïdes lors de la spermiation en participant à la dynamique des jonctions cellule – cellule (Mruk et al., 2003). En effet, une augmentation de l'activité de PA (*Plasminogen Activator*) et CP-2 (*Cyclic Protein-2*) est observée aux stades de la spermatogenèse où les cellules germinales vont se détacher de la membrane basale afin de rejoindre la lumière des tubes séminifères. Par ailleurs, une diminution de l'activité des inhibiteurs de protéases (cystastine et α2-macroglobuline) est également observée à ce stade. La présence de PA et CP-2 joue un rôle dans la dégradation des molécules d'adhésion qui lient les spermatides aux cellules de Sertoli, permettant ainsi leur relargage dans la lumière des tubes (Erickson-Lawrence et al., 1991; Vihko et al., 1984).

Lorsque les cellules germinales rejoignent la lumière des tubes séminifères, un peptide-F5 est produit à partir du clivage de la chaîne γ3 de la laminine, ce peptide perturbe l'intégrité de la BHT ce qui permet donc de synchroniser la spermiation avec l'ouverture de la BHT permettant une coordination importante de la spermatogenèse (Gao et al., 2016). En effet, les fragments de protéines de jonctions générés au cours de la spermiation contribuent à un mode de signalisation autocrine permettant l'ouverture de la BHT et le passage des spermatocytes en méiose (Cheng and Mruk, 2010). D'autre part, la phagocytose du corps résiduel stimule la production d'Interleukine-1 et d'Activine-A (Gérard et al., 1992; Okuma et al., 2006), facteurs paracrines nécessaires à la progression des spermatogonies en spermatocytes (Mather et al., 1992; Pöllänen et al., 1989).

En réponse à la testostérone, les récepteurs AR localisés à proximité de la membrane plasmique des cellules de Sertoli peuvent interagir avec la protéine kinase SRC et l'activer. Son activation déclenchera une cascade de phosphorylations impliquant le récepteur du facteur de croissance EGF et la voie des MAPK et aboutira à l'activation du facteur de transcription CREB (Fix et al., 2004). La protéine SRC permet notamment de moduler la phosphorylation des protéines cadhérines et caténines impliquées dans la formation des jonctions adhérentes (Roura et al., 1999; Zhang et al., 2005), notamment nécessaires au maintien et à l'adhésion des spermatides aux cellules de Sertoli, et au relargage des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères lors de la spermiation (Wong and Cheng, 2005).

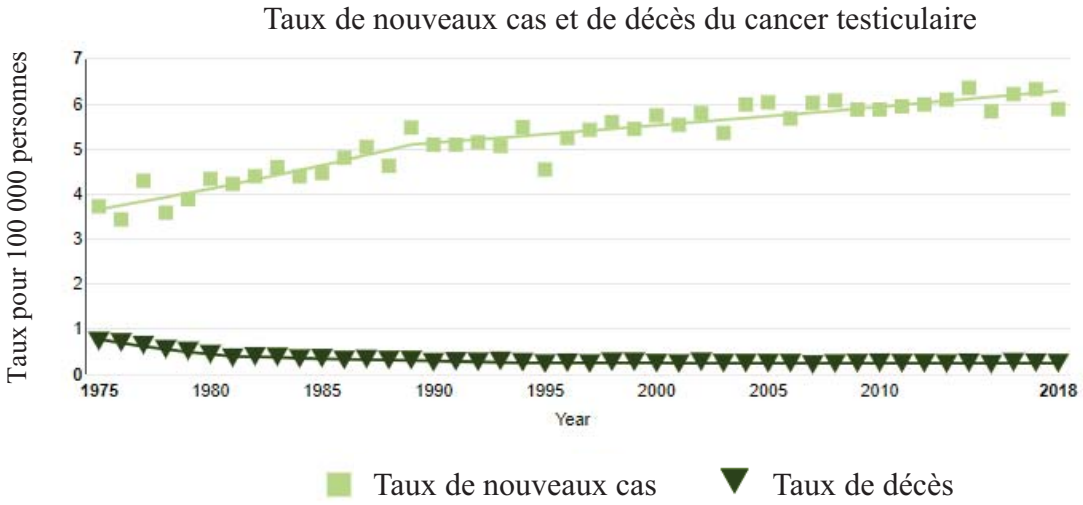
A ce stade, les spermatozoïdes produits par le testicule sont immobiles et incapables de féconder un ovocyte. Cependant, ils possèdent les structures nécessaires à la poursuite de leur maturation qui se fera dans l'épididyme. Par ailleurs, la chromatine continue à se condenser par le biais de la formation de ponts disulfures entre les protamines ; le génome du spermatozoïde est donc transcriptionnellement inactif à ce stade.

Au sein de l'épididyme, les cellules épithéliales sécrètent de nombreuses protéines, principalement des enzymes (phosphatases, protéases, inhibiteurs de protéases, glucosidases et glycosyltransférases). Celles-ci vont modifier le milieu environnant des spermatozoïdes mais également leur revêtement membranaire, ce qui permettra notamment l'apparition de récepteurs à la zone pellucide et à la membrane plasmique de l'ovocyte, nécessaires au processus de fécondation.

Dans les voies génitales femelles, le spermatozoïde subira également d'autres évènements de maturation, notamment l'événement de capacitation qui est nécessaire à l'obtention d'un gamète fécondant (Bedford, 1970). La capacitation est caractérisée par de nouvelles modifications de la membrane qui conduiront à l'hyperactivité des spermatozoïdes et qui sont requises pour la future réaction acrosomique et la fécondation.

Au-delà des troubles de la fertilité, associés aux atteintes testiculaires, une autre pathologie testiculaire voit son incidence augmenter ces dernières années : il s'agit des cancers germino-testiculaires dont les détails seront abordés dans la prochaine partie.

(a)



(b)

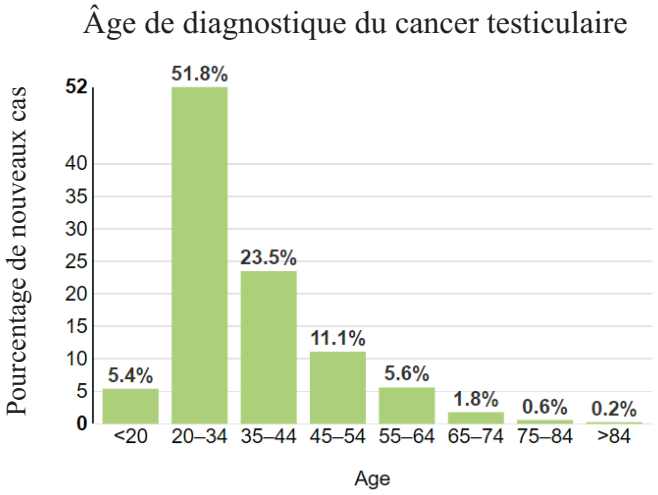


Figure 21 : (a) Taux de nouveaux cas et taux de décès du cancer testiculaire entre 1975 et 2018 aux Etats-Unis.
(b) Pourcentage de nouveaux cas du cancer testiculaire par âge. L'âge médian au moment du diagnostique est de 32 ans.
D'après https://seer.cancer.gov/statfacts/html/testis.html

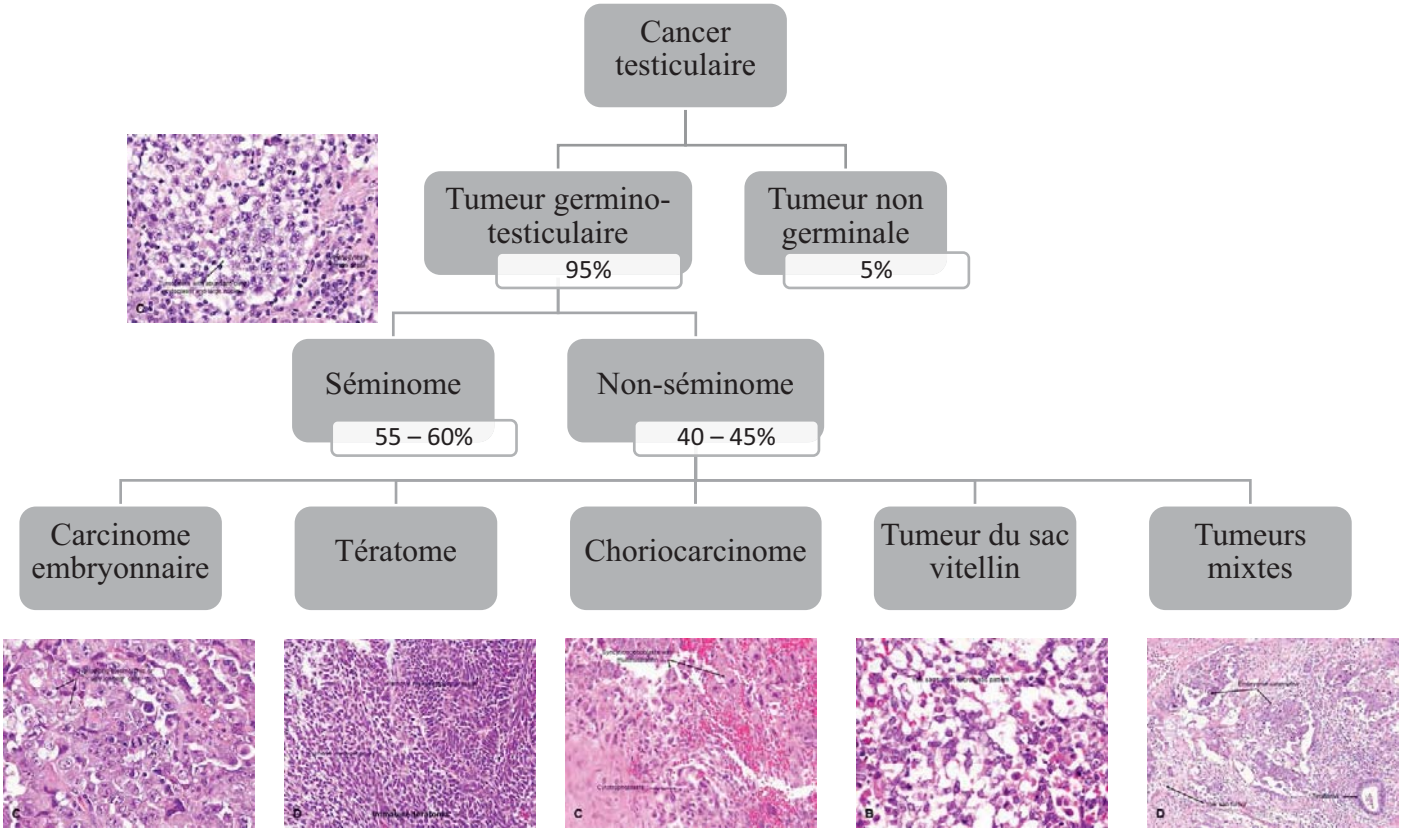


Figure 22 : Classification des différents types de cancers testiculaires.
Les tumeurs germino-testiculaires sont subdivisées en plusieurs catégories, les tumeurs de type séminome sont des tumeurs homogènes de bon pronostic. Les tumeurs de type non-séminomes sont des tumeurs hétérogènes et plus agressives, elles sont représentées par les carcinomes embryonnaires, les tératomes, les choriocarcinomes, les tumeurs du sac vitellin et les tumeurs mixtes.

Partie 3. Cancer et fertilité

A. Le cancer testiculaire

1. Epidémiologie

Le cancer testiculaire est un cancer rare bien qu'il s'agisse du cancer le plus commun chez l'adolescent et l'homme jeune (15 à 40 ans environ) (Adami et al., 1994). Depuis plusieurs décennies, une augmentation de l'incidence du cancer testiculaire est observée (**Figure 21**). Le nombre de cas en 2016 est en effet 1,8 fois plus important qu'en 1990. L'incidence des cancers testiculaires est accentuée dans les pays développés avec le nombre de cas maximum relevé en Europe et aux Etats-Unis (avec, respectivement, 5,6 et 5 cas pour 100 000 personnes) alors que l'incidence la plus faible est retrouvée en Afrique (0,4 cas pour 100 000 personnes) (Park et al., 2018). Une estimation de 9560 nouveaux cas a été réalisée aux Etats-Unis en 2019 avec un taux de survie à 5 ans de 95 % (Siegel et al., 2019). Un modèle de prédiction a par ailleurs suggéré que le nombre de cas de cancers testiculaires allait continuer à augmenter jusqu'en 2035 dans l'Europe du Nord, de l'Est et de l'Ouest avec un déclin en Europe du Sud (Znaor et al., 2020).

La mortalité associée au cancer testiculaire est relativement faible et grâce aux innovations thérapeutiques le taux de mortalité a diminué entre 1990 et 2016 passant de 0,18 pour 100 000 à 0,12 (Cai et al., 2020) (**Figure 21**). Cependant, chez environ 10 à 15 % des patients, une résistance aux traitements communément utilisés est observée conduisant au décès d'environ 4 % des patients (Adra and Einhorn, 2017).

Les cancers testiculaires peuvent provenir des cellules somatiques, il s'agit alors de tumeurs non germinales. Ces cancers sont très rares et représentent environ 5 % des cas de cancers testiculaires. Dans 95 % des cas, il s'agit de tumeurs germino-testiculaires (TGTs) dont il existe plusieurs sous-catégories qui seront détaillées ensuite (**Figure 22**).

2. Tumeurs germinales du testicule

a) Les différents sous types de tumeurs germino-testiculaires

Comme indiqué précédemment, il existe deux sous-types de TGTs. Les séminomes représentent 55 à 60 % des TGTs et les non-séminomes, qui sont des tumeurs mixtes, constituent 40 à 45 % de celles-ci (Bray et al., 2006) (**Figure 22**).

i. Séminomes

Les tumeurs séminomateuses sont des tumeurs de bon pronostic ; ce sont des tumeurs homogènes qui affectent les hommes âgés de 25 à 40 ans en moyenne. D'un point de vue histologique, les séminomes sont caractérisés par la présence de cellules uniformes avec un cytoplasme riche en glycogène et un noyau irrégulier. Dans tous les séminomes, un infiltrat lymphoïde est visible associé à la présence de lymphocytes T principalement (Bell et al., 1987).

ii. Non-séminomes

Les tumeurs non-séminomateuses sont plus agressives et présentent un moins bon pronostic que les séminomes (Møller, 1993). La moyenne d'âge de diagnostic de ces tumeurs est d'environ 25 ans. Les tumeurs non-séminomateuses sont subdivisées en plusieurs types : les carcinomes embryonnaires (EC, *Embryonal Carcinoma*) qui représentent les stades initiaux et qui peuvent se différencier en tissus embryonnaires : les tératomes, ou en tissus extra-embryonnaires : les tumeurs du sac vitellin (YST ; *Yolk Sac Tumor*) et les choriocarcinomes (Rajpert-De Meyts et al., 2003).

Les tumeurs mixtes sont parmi les plus communes : elles représentent environ 1/3 de toutes les TGTs (Jacobsen, 1986). Elles présentent une apparence hétérogène et sont majoritairement composées de tératomes et de YST.

Les carcinomes embryonnaires (ECs) sont relativement peu fréquents, ils représentent 2 à 3 % des cas de tumeurs testiculaires (Mostofi et al., 1990). Histologiquement, une double couche constituée de cellules d'ECs est observée parallèlement à une couche de cellules néoplasiques aplaties (Jacobsen, 1986). Les tératomes sont assez peu retrouvés en tant que tumeur pure mais ce sont des composants communs des TGTs mixtes. Les tératomes purs sont plutôt retrouvés chez les enfants (Brosman, 1979) ; quand ils sont observés après la puberté ils sont souvent associés à des métastases et sont dus à la différenciation des ECs. Les YST sont les plus communes, représentant environ 40 à 50 % des TGTs non-séminomateuses (Talerman, 1980) mais elles représentent majoritairement un composant des TGTs mixtes plutôt que des tumeurs pures. Ces tumeurs proviennent de l'endoderme et sont des tumeurs plus agressives. Les choriocarcinomes sont assez peu communs, qu'il s'agisse de tumeurs pures ou de composants de TGTs mixtes. Ils sont associés à un plus mauvais pronostic que les autres formes de TGTs car ce sont des tumeurs qui se disséminent de manière importante.

b) Principaux facteurs de risques

Plusieurs facteurs de risques ont été proposés pour l'étiologie des TGTs, dont seule la cryptorchidie a été démontré actuellement. Il s'agit de l'absence de testicules dans le scrotum à la naissance. La migration des testicules de l'abdomen vers le scrotum est incomplète ce qui entraîne une infertilité résultant d'une température inadéquate pour permettre la production de spermatozoïdes par le testicule. Une étude a mis en évidence que les hommes présentant une cryptorchidie avaient 7,5 fois plus de risques de développer un cancer germino-testiculaire (Swerdlow et al., 1997). De plus, l'infertilité semble également être un facteur de risque associé au développement de TGTs, notamment dans le cas de TDS. Le syndrome de dysgénésie testiculaire, notamment associé à une qualité de spermatozoïdes amoindrie, à l'hypospadia et à des défauts de descente testiculaire, est en effet associé au risque de développement de cancer testiculaire (Selvi et al., 2020; Skakkebaek et al., 2001).

De nombreuses études se sont intéressées aux facteurs susceptibles d'induire des TGTs. Une association entre un âge de puberté précoce et/ou un manque d'exercice avec le développement de TGTs a été observée (Forman and Møller, 1994). Depuis les années 1980, le rôle d'agents infectieux dans les tumeurs testiculaires est supposé. Une étude a mis en évidence que 80 % des patients présentant un historique de TGT de stade I possèdent des niveaux élevés d'anticorps anti-EBV (*Epstein-Barr Virus*), ce qui relie le risque de cancer à une exposition à un virus (Algood et al., 1988). En 2013 une méta-analyse a permis de mettre en évidence que le risque de développer des TGTs était augmenté de 0,7 à 3,1 après une infection virale (Hentrich and Pfister, 2017; Yousif et al., 2013).

L'implication de polluants chimiques décrits comme des perturbateurs endocriniens est suspectée d'être un facteur de risque des TGTs. Plusieurs études ont démontré une augmentation de l'incidence des TGTs dans les familles d'agriculteurs utilisant de grandes quantités d'engrais (Kristensen et al., 2008; Rodvall, 2003). Chez la souris, une étude récente a mis en évidence que la descendance mâle des femelles gestantes exposées au BPA présentait 75 % plus de risque de développement tumoral dans un modèle de cancer intratesticulaire par rapport à la descendance des femelles gestantes non exposées (Nava-Castro et al., 2019). Cependant, les résultats des différentes études à ce sujet sont relativement contradictoires et ne permettent donc pas de conclure sur le rôle des perturbateurs endocriniens dans la mise en place du cancer germino-testiculaire. En effet, les TGTs ont été associées à des taux plasmatiques élevés de p,p'-DichloroDiphenyldichloroEthylene (p,p'-DDE) qui est un dérivé du DDT

(*DichloroDiphenylTrichloroethane*), un insecticide classé dans les polluants organiques persistants (Giannandrea et al., 2011; McGlynn et al., 2008; Purdue et al., 2009). Il a également été observé une augmentation des concentrations de certains polluants organiques persistants dans le sang de mères dont les enfants ont été atteints de TGTs, ce qui suggère que l'exposition *in utero* à des perturbateurs endocriniens pourrait jouer un rôle dans l'étiologie des cancers germino-testiculaires (Cohn et al., 2010; Hardell et al., 2006). A l'inverse, d'autres études n'ont pas révélé de lien entre l'exposition aux PCBs (PolyChloroBiphényles) et le risque de TGTs (McGlynn et al., 2009).

Par ailleurs, des liens génétiques ont également été mis en cause, les frères des hommes ayant développé un cancer testiculaire ont 6 à 10 fois plus de risques d'en développer un également (Dearnaley, 2001). Ce lien familial semble être associé au gène *TGCT1* (*Testicular Germ Cell Tumor susceptibility 1*), localisé sur le chromosome Xq27 (Rapley et al., 2000). Ce gène est mis en cause dans environ un tiers des cas de TGTs familiaux. Il est également connu que ce gène prédispose à la cryptorchidie, ce qui expliquerait son lien avec les TGTs (Holzik et al., 2004).

Jusqu'à récemment aucun modèle animal de cancer germino-testiculaire ne présentait un développement de tumeur important, rendant les analyses complexes. L'étiologie des cancers germino-testiculaires reste donc peu comprise. Il est actuellement important de déterminer si les tumeurs sont initiées *in utero* ou si les facteurs environnementaux tels que l'activité physique ou l'alimentation peuvent être mis en jeu dans le développement de TGTs. En 2017, un modèle de souris mutantes présentant une surexpression du gène *Kras* (*Kristen RAt Sarcoma viral proto-oncogene*) et une invalidation du gène suppresseur de tumeur *Pten* (*Phosphatase and TENsion homolog*) spécifiquement dans la lignée germinale grâce à la présence de la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur de *Stra8* a été développé (Pierpont et al., 2017). Ce modèle conduit au développement de TGTs chez 75 % des souris et permet donc d'étudier plus précisement les cancers germino-testiculaires.

La cryptorchidie et l'infertilité sont donc les deux causes majoritaires des TGTs bien qu'il existe également un lien génétique familial important. Par ailleurs, les infections virales ainsi que les perturbateurs endocriniens sont également potentiellement des éléments clés pouvant conduire aux TGTs.

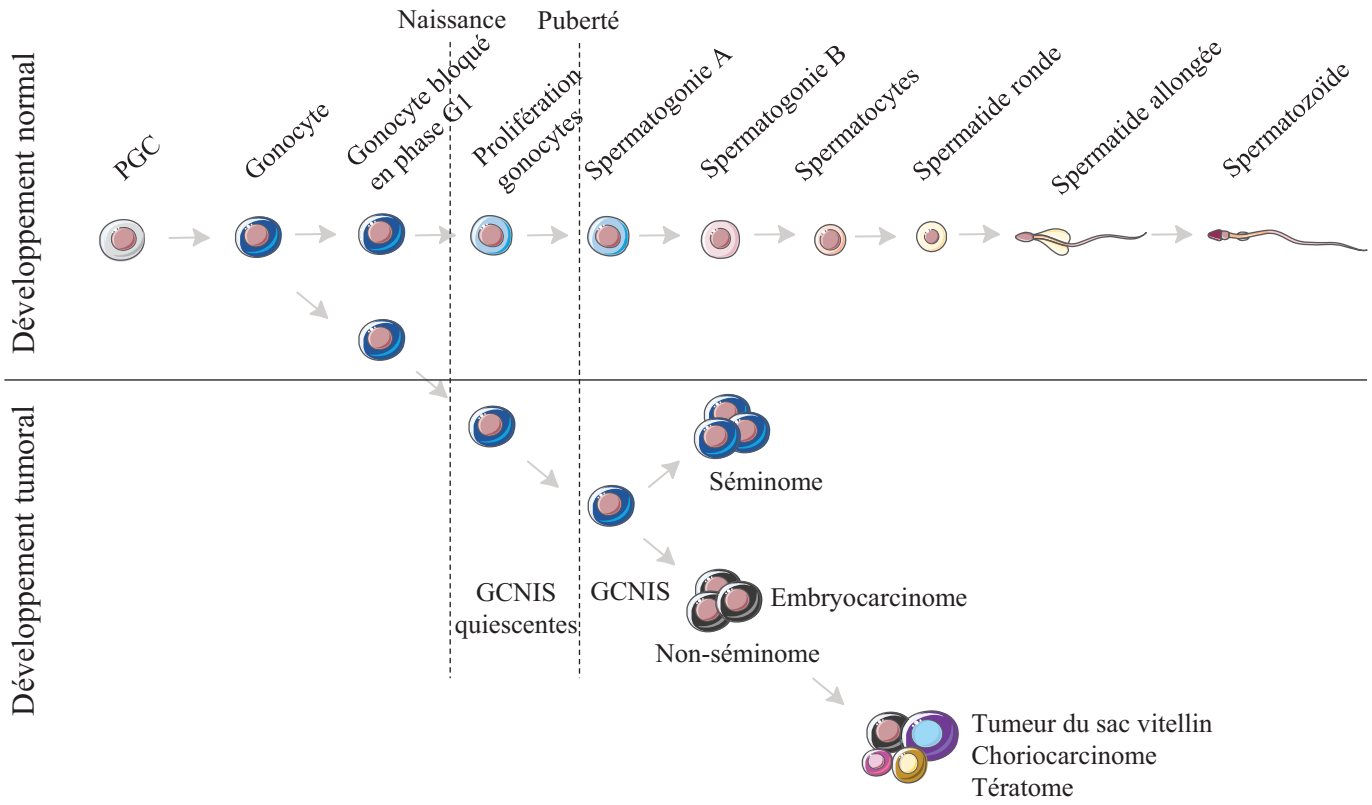


Figure 23 : Origine du cancer germino-testiculaire.
Lors du développement tumoral, les gonocytes bloqués en phase G1 vont acquérir des caractéristiques différentes et conduire à des néoplasies germinales *in situ* (GCNIS) qui conduiront à l'âge adulte au développement de séminomes ou de non-séminomes.

c) Etiologie des tumeurs germino-testiculaires

Les tumeurs germinales testiculaires surviennent principalement chez les hommes jeunes, il est donc supposé que l'étiologie de ces tumeurs résulte de facteurs apparaissant très tôt au cours de la vie plutôt qu'elle soit associée à une accumulation de mutations liées au vieillissement. Par ailleurs, les TGTs sont des tumeurs très hétérogènes associées à une expression importante de facteurs de pluripotence. Les lésions précurseures associées aux TGTs et les gènes et voies de signalisation impliqués dans l'étiologie des TGTs seront abordés ci-après.

i. Lésions précurseures

Les altérations impliquées dans le développement des TGTs semblent être associées à des troubles de prolifération et/ou de différenciation des gonocytes en spermatogonies lors du développement embryonnaire (**Figure 23**). En effet, la majorité des TGTs dérivent des cellules germinales, et ont plus particulièrement comme précurseur commun les néoplasies germinales *in situ* (GCNIS, *Germ Cell Neoplasia In Situ*) (Skakkebaek, 1972; Spiller and Bowles, 2017). Les GCNIS proviennent des PGCs ou des gonocytes qui, au lieu de se différencier normalement, vont se transformer en néoplasie au cours du développement embryonnaire. Les GCNIS présentent une morphologie proche des PGCs et des gonocytes et partagent l'expression de différents marqueurs tels que KIT, OCT3/4 (*OCTamer-binding protein 3/4 (POU5F1))* ou NANOG (*Nanog homeobox*) (Kristensen et al., 2008). Plus récemment, il a été suggéré que les GCNIS pouvaient également provenir de spermatogonies souches pluripotentes (Guan et al., 2006). Les cellules issues de GCNIS resteront quiescentes jusqu'à la puberté, où, en réponse à une stimulation potentiellement hormonale, elles vont reprendre leur prolifération et remplacer les spermatogonies dites « normales » (Almstrup et al., 2007). Le second élément conduisant au développement de tumeurs malignes sera la présence d'aberrations chromosomiques. Dans environ 80 à 100 % des TGTs, un gain du bras court du chromosome 12 est présent (Summersgill et al., 2001). Cette région chromosomique comprend de nombreux gènes, notamment les gènes *NANOG*, *STELLA* (*DPPA3*, *Developmental PluriPotency Associated 3*) et *GDF3* (*Growth Differentiation Factor 3*) qui sont associés à la pluripotence des cellules souches (Clark et al., 2004).

La plupart des tissus testiculaires contenant des GCNIS présentent des tubes séminifères ayant un diamètre réduit, une spermatogenèse altérée et une membrane basale plus fine que la normale. Par ailleurs, les cellules des GCNIS sont plus grandes que des spermatogonies

normales et présentent un noyau large ; ces cellules sont principalement retrouvées le long de la membrane basale des tubes séminifères (Rørth et al., 2000). Les cellules des GCNIS sont pluripotentes et peuvent avoir deux devenirs : un développement rapide en séminome qui est proche des cellules germinales ou bien un maintien de leur statut indifférencié et un développement plus agressif et hétérogène en non-séminome.

ii. Gènes et voies de signalisation impliqués

Plusieurs études s'intéressent aux gènes et aux voies de signalisation impliquées dans les TGTs. Comme décrit précédemment, un gain du bras court du chromosome 12 est observé dans 80 à 100 % des TGTs. Ainsi, de nombreux gènes localisés sur le chromosome 12 ont été décrits comme impliqués dans les TGTs.

Une sur-expression de *CCND2* (*CyCliN D2*), localisé sur le chromosome 12, est notamment observée dans l'ensemble des types de TGTs, suggérant qu'il s'agit d'un événement apparaissant tôt dans le développement tumoral (Bartkova et al., 2003; Schmidt et al., 2001). La CCND2 étant impliquée dans le cycle cellulaire, ces résultats supposent qu'une dérégulation du cycle cellulaire est un événement majeur dans le développement des TGTs. Par ailleurs, une sur-expression de *CD9* (membre de la famille des tetraspanines, glycoprotéines de surface), localisé sur le chromosome 12, est également observée dans les TGTs (Skotheim et al., 2006) mais son implication dans le développement des TGTs n'a pas été mise en évidence.

Il a également été démontré que l'accumulation des transcrits de *GDF3*, situé sur le chromosome 12, est élevée dans 90 % des séminomes (Ezeh et al., 2005). De plus, dans les ECs la transcription de *GDF3* est régulée par OCT3/4 (Han et al., 2016) et dans des cellules tumorales NCCIT issues de non-séminomes, GDF3 induit des gènes associés à la différenciation. En effet, la modulation de GDF3 conduit à la sortie des cellules du statut indifférencié et entraîne différents programmes de différenciation. Enfin, le *knock-down* de *GDF3* entraîne une diminution de l'expression de différents membres de la voie de signalisation *BMP*, tels que *BMP2*, *4* et *7*, ainsi que de la voie de signalisation *HOX* qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *HOXA9*, *HOXA10* et *HOXB13* (Tykwinska et al., 2013).

Une sur-expression de *DPPA3* (chromosome 12) dans les GCNIS et dans certains échantillons de séminomes est observée (Korkola et al., 2006). DPPA3 a été décrit comme un marqueur de pluripotence chez la souris, et son homologue humain est exprimé dans les TGTs (Bowles et al., 2003) bien qu'actuellement son rôle ne soit pas connu.

Dans le cadre d'une recherche de déséquilibre de liaison (LD, *Linkage Disequilibrium*) chez des patients atteints de TGTs, il a été mis en évidence deux SNP (rs995030 et rs1508595) localisés sur le chromosome 12 qui semblent être associés avec le risque de TGTs (Rapley et al., 2009). Au sein du bloc de LD sur ce chromosome, un seul gène codant une protéine est retrouvé : il s'agit du gène *SCF*, ligand du récepteur tyrosine kinase KIT. Il est connu que la voie de signalisation KIT régule la survie, la prolifération et la migration des cellules germinales (Boldajipour and Raz, 2007). Par ailleurs, une délétion hétérozygote de ce facteur dans un modèle de souris multiplie le risque de développement de TGTs par deux (Heaney et al., 2008). Enfin, la présence de mutations non-sens ou d'amplification de KIT sont présentes dans environ 25 % des séminomes.

Il a également été démontré que le gène *KRAS* est sujet à des mutations activatrices (Olie et al., 1995) et qu'il est présent dans le chromosome 12 (région amplifiée dans les TGTs). Il est important de noter que KRAS se situe en aval de la signalisation KIT et qu'il est connu pour augmenter la survie de cellules séminomateuses *in vitro* (Roelofs et al., 2000). En effet, l'activation de KRAS entraîne la signalisation PI3K/AKT (*AKT Serine/Threonine Kinase*) qui est présente dans la plupart des TGTs. Ces résultats suggèrent donc un rôle majeur de KRAS dans les TGTs. Par ailleurs, il est également retrouvé dans les TGTs une perte de *PTEN* (Di Vizio et al., 2005) qui est un inhibiteur de la voie de signalisation PI3K/AKT. La voie de signalisation PI3K/AKT semble donc être modulée et jouer un rôle majeur dans les TGTs. Ces données ont permis de développer un modèle de souris surexprimant KRAS et invalidé pour le gène codant PTEN spécifiquement dans la lignée germinale comme décrit précédemment conduisant au développement de TGTs chez 75 % des souris (Pierpont et al., 2017).

D'autres SNPs, qui ne sont pas associés au chromosome 12, sont impliqués dans les TGTs. Un SNP (rs4624820) localisé sur le chromosome 5 a été décrit, il est associé au gène *SPRY4* (*SPRoutY RTK signaling antagonist 4*) qui est un inhibiteur de la voie MAPK, elle-même activée par la voie KIT (Sasaki et al., 2003). Le SNP rs210138 sur le chromosome 6 a également été décrit, il est situé dans un intron du gène *BAK1* (*Bcl-2 Antagonist/Killer 1*). BAK1 va se fixer à BCL-2 (*B-Cell cll/Lymphoma 2*), conduisant au blocage de son activité et entraînant l'apoptose (Yan et al., 2000). Il a été démontré que l'expression de *BAK1* dans les cellules germinales testiculaires est réprimée par la voie KIT. Les différents SNP observés ici comme étant impliqués dans les TGTs semblent donc tous être reliés à la voie KIT largement décrite dans les TGTs.

Une autre étude a mis en évidence différents gènes pouvant être associés avec le développement de TGTs (Turnbull et al., 2010). Le gène *CLPTM1L* (*Cleft Lip and Palate TransMembrane protein 1-Like protein*) y est retrouvé, il est exprimé dans plusieurs tissus sains et tumoraux. Il a été décrit que la protéine CLPTM1L sensibilise les cellules cancéreuses de l'ovaire à l'apoptose induite par le cisplatine (Yamamoto et al., 2001). Des variants de *CLPTM1L* ont été décrits comme étant associés au risque de TGTs familiaux (Kratz et al., 2011). Par ailleurs, une expression élevée de *TERT* (*TElomerase Reverse Transcriptase*) codant pour une sous-unité catalytique de la télomérase a été observée dans les séminomes contrairement aux non-séminomes qui présentent une accumulation d'ARNm de *TERT* minimale (Schrader et al., 2002). Il est décrit que TERT est réactivée dans de nombreuses cellules cancéreuses (Fernandez-Garcia et al., 2008). A l'inverse, une autre étude a mis en évidence une expression importante de *TERT* dans les échantillons de non-séminome corrélée avec l'élongation des télomères (Sun et al., 2018a). Par ailleurs, parmi les anomalies impliquées dans les TGTs, il a été décrit un déséquilibre de liaison dans une région contenant le gène *DMRT1* (*Doublesex And Mab-3 Related Transcription factor 1*). L'invalidation de ce gène dans des modèles murins conduit à un développement de tératomes chez 90 % des souris, confirmant une association forte entre DMRT1 et les TGTs (Krentz et al., 2009).

Les carcinomes embryonnaires présentent un profil d'expression proche des cellules embryonnaires souches. Les gènes surexprimés comprennent notamment *OCT3/4*, la méthyl-transferase *de novo DNMT3B* (*DNA MethylTansferase 3 Beta*) et le facteur de transcription *FOXD3* (*FOrkhead BoX D3*). Par ailleurs, *NANOG* est exprimé dans les GCNIS, dans les séminomes mais également dans les carcinomes embryonnaires (Hoei-Hansen et al., 2005).

Lors d'une approche gène candidat, un lien entre des mutations du gène *PDE11A* (*PhosphoDiEsterase 11A*) et le risque de TGTs a été révélé. En effet, une fréquence élevée de modifications de ce gène est observée chez les patients atteints de TGTs par rapport à une population contrôle (Horvath et al., 2009). Le gène *PDE11A* est fortement exprimé dans les tissus endocriniens, spécifiquement dans le testicule, et son inactivation est associée à l'infertilité qui constitue un risque de développement de TGTs.

Il a également été observé qu'un récepteur couplé aux protéines G, CXCR4 (*C-X-C motif chemokine Receptor 4*), responsable du maintien de la niche de cellules souches chez l'adulte (Kortesidis, 2005), était également exprimé dans les TGTs. Le gène codant ce récepteur est impliqué dans la progression métastatique de nombreuses tumeurs et dans un modèle

cellulaire de TGTs CXCR4 médie Les processus de migration et d'invasion *via* la phosphorylation de ERK1/2 (Gilbert et al., 2009).

Des prédispositions génétiques aux TGTs peuvent également être associées à des polymorphismes du récepteur aux androgènes (AR). En effet, un SNP non codant de *AR* est retrouvé deux fois plus fréquemment dans une cohorte de patients atteints de TGTs par rapport à un groupe contrôle (Västermark et al., 2011).

L'impact des récepteurs aux œstrogènes a également été étudié dans les TGTs. Plusieurs équipes ont mis en évidence l'expression de deux de ces récepteurs dans les TGTs : *ERβ* et *GPER* (*G Protein-coupled Estrogen Receptor*) (Franco et al., 2011; Roger et al., 2005). En effet, *GPER* est sur-exprimé dans les séminomes, ce qui conduit à la prolifération de ces cellules tumorales (Chevalier et al., 2012). Par ailleurs, l'expression de *ERβ* est diminuée dans les séminomes et les ECs alors qu'elle est élevée dans les tératomes (Pais et al., 2003). Ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir une modification dans la réponse aux œstrogènes dans les TGTs (Boscia et al., 2015). Les perturbateurs endocriniens (substances exogènes qui altèrent la fonction endocrine, entraînant des problèmes de santé) sont connus pour causer des problèmes de fertilité. Leur implication dans le développement des TGTs n'est actuellement pas défini mais ils semblent être associés au risque de TGTs. Cette implication des perturbateurs endocriniens pourrait probablement être en lien avec les modulations des récepteurs aux oestrogènes et les mutations du récepteur aux androgènes dans les cas de TGTs.

Une étude récente a mis en évidence un lien entre E2F1 (*E2F Transcription Factor 1*) et les TGTs. E2F1 est un facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la réponse aux dommages à l'ADN. Les analyses réalisées ont permis de mettre en évidence une expression de *E2F1* plus importante dans les échantillons testiculaires de TGTs avec la présence de 3 copies du gène (Rocca et al., 2017). E2F1 conduit à l'activation de la voie AKT/mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) *via* la phosphorylation d'AKT, ce qui suggère par ailleurs l'importance de la voie AKT/mTOR dans les TGTs. Un modèle de souris présentant une activation de E2F1 présente une atrophie testiculaire ainsi qu'une dysplasie similaire à celle observée dans le développement des TGTs, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un modèle d'étude des TGTs (Agger et al., 2005).

De nombreux gènes semblent donc impliqués dans les TGTs. L'amplification du bras court du chromosome 12 entraîne la sur-expression de nombreux gènes, notamment associés

au récepteur KIT. Il existe cependant de nombreux autres gènes qui semblent être impliqués mais leurs rôles ne sont pas connus.

3. Marqueurs tumoraux et traitements des tumeurs germino-testiculaires

a) Marqueurs tumoraux

Dans la prise en charge des cancers, les marqueurs tumoraux constituent un élément majeur pour le dépistage, le diagnostic, la détermination du stade ainsi que du pronostic. Les marqueurs tumoraux sont des substances naturellement présentes ou non dans l'organisme et dont la concentration est modulé en cas de tumeurs.

Concernant le cancer testiculaire, les deux principaux marqueurs retrouvés dans le sang, connus depuis de nombreuses années, sont l'α-FetoProtéine (AFP) et la *B-Human Chorionic Gonadotropin* (β-HCG) (Vaitukaitis et al., 1972; Waldmann and McIntire, 1974). L'α-fetoprotéine est produite par le sac vitellin fœtal et le tractus gastrointestinal pendant le développement embryonnaire jusqu'à atteindre des niveaux indétectables à l'âge de 3 ans. Les niveaux d'AFP sont élevés dans le sérum de 70 % des patients atteints de tératocarcinomes ou de carcinomes embryonnaires (Nørgaard-Pedersen et al., 1984). La β-HCG est augmentée dans 40 à 60 % des patients présentant des néoplasmes testiculaires non-séminomateux et dans environ 10 % des cas de séminomes purs (Vaitukaitis and Ebersole, 1976). Environ 85 % des patients avec des tumeurs testiculaires non-séminomateuses présentent une augmentation des taux d'AFP ou de β-hcg (Lange et al., 1976), confirmant ainsi l'importance de déterminer les taux de ces deux marqueurs pour la détection des TGTs.

Par ailleurs, il a également été mis en évidence en 1983 que la LDH était un marqueur de TGTs. La LDH est augmentée dans le sang chez la moitié des patients ayant développé des séminomes et qui présentent le plus souvent des taux normaux d'AFP et de β-hcg (von Eyben et al., 1983).

Actuellement, l'AFP, la β-Hcg et la LDH sont les 3 marqueurs principaux du cancer testiculaire, cependant de nombreuses études mettent en évidence de nouveaux marqueurs. L'expression de la phosphatase alcaline de type placentaire (PLAP, *Placental-Like Alkaline Phosphatase*) a été démontrée dans les tissus de séminome (Wahren et al., 1979) ; cependant, c'est un marqueur difficile à étudier car retrouvé à des taux élevés dans le sérum des fumeurs en l'absence de cancer testiculaire. L'énolase spécifique des neurones (NSE, *Neuron Specific Enolase*) est également présente dans les cellules de séminomes et est retrouvée en

concentrations moins importantes dans les séminomes de stade 1, suggérant que la NSE peut être un marqueur de tumeur métastatique (Kuzmits et al., 1987). Une étude plus récente a permis de mettre en évidence que le nombre de cas faux-positifs avec l'utilisation de la NSE comme marqueur était d'environ 53 % indiquant que la NSE n'était potentiellement pas un marqueur d'intérêt dans le cadre des TGTs (Tandstad and Klepp, 2003). L'antigène de surface TRA-1-60 est exprimé dans les cellules de carcinomes embryonnaires et de GCNIS (Marrink et al., 1991). Une augmentation de ce marqueur est observée chez environ 80 % des patients présentant des TGTs non-séminomateux et la chimiothérapie conduit à une diminution des taux de TRA-1-60 ; cependant, les taux de faux-positifs pour ce marqueur sont également élevés (Lajer et al., 2002).

Plus récemment, un lien entre les processus inflammatoires et les tumeurs a été mis en évidence, révélant une association entre le ratio de neutrophiles par rapport aux lymphocytes et le stade tumoral. En effet, plus ce ratio est élevé plus le stade des TGTs est avancé (Arda et al., 2020).

Les marqueurs tumoraux des TGTs couramment utilisés sont donc l'AFP, la β-HCG et la LDH. De nouveaux marqueurs sont étudiés actuellement dont PLAP, NSE et l'antigène TRA-1-60 ainsi que les ratios neutrophiles/lymphocytes, bien qu'ils ne soient pas encore utilisés comme outils de diagnostic à l'heure actuelle.

b) Traitements

Les traitements des TGTs diffèrent selon leurs sous-types. Dans un premier temps une orchidectomie est réalisée : il s'agit d'une opération qui consiste en l'ablation du testicule porteur de la tumeur. Puis, dans le cas de TGTs de type séminome, la radiothérapie est majoritairement utilisée, 90 à 95 % de taux de guérison étant observé à la suite de ce traitement. Pour les autres types tumoraux, ce sont les chimiothérapies qui sont principalement utilisées.

Concernant les traitements par chimiothérapies, l'utilisation du cisplatine s'est révélée efficace dès 1977 (Einhorn and Donohue, 1977). Une combinaison de 3 molécules (cisplatine, vinblastine et bléomycine) conduisait à une rémission complète de 85 % des patients. Par la suite, de nombreuses études ont été réalisées afin d'optimiser les traitements et de réduire leur toxicité. En 1987, il a été établi que la combinaison bléomycine, étoposide et cisplatine (BEP) était un nouveau standard dans le traitement des cancers testiculaires disséminés (Williams et al., 1987). La combinaison BEP reste actuellement celle utilisée en première ligne dans le

traitement des TGTs non-séminomateuses. Une étude clinique de phase 3 a validé cette approche consistant à réaliser 3 cycles de BEP (de Wit et al., 2001).

c) Résistance aux traitements

Le cancer testiculaire est l'un des cancers présentant un potentiel thérapeutique le plus important, son taux de guérison étant d'environ 80 % en présence d'une tumeur métastatique. Ce potentiel thérapeutique est majoritairement dû à l'effet du cisplatine. Les facteurs contribuant à la sensibilité accrue au cisplatine sont associés à des défauts de réparation des dommages à l'ADN et à une réponse apoptotique très importante en réponse à ces dommages. Cependant, chez environ 10 à 15 % des patients, les chimiothérapies associées au cisplatine ne sont pas efficaces (Adra and Einhorn, 2017) et environ 3 à 5 % des patients présentant des TGTs vont mourir faute de traitement efficace. Plusieurs mécanismes associés à la résistance au cisplatine dans le cadre des TGTs ont été mis en évidence.

Une analyse de l'ensemble des séquences codantes du génome (WES, *Whole Exome Sequencing*) a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les tumeurs résistantes ou sensibles au cisplatine. Des mutations de *KIT*, *TP53* (*Tumor Protein 53*), *WNT* (*Wingless iNTegration site*) et des mutations des gènes de la voie de signalisation RAS/RAF sont observées dans les tumeurs résistantes (Loveday et al., 2020).

Par ailleurs, il est connu que des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* sont présentes dans plus de la moitié des cancers chez l'Homme. Cependant, ces mutations sont très peu fréquentes dans les TGTs, suggérant que la voie TP53 est importante afin d'assurer une réponse apoptotique efficace (Kersemaekers et al., 2002). La protéine MDM2 (*Mouse Double Minute 2 homolog*) est un antagoniste de TP53 qui promeut sa dégradation par le protéasome ; dans plusieurs lignées cellulaires de TGTs une diminution des processus apoptotiques *via* TP53 a été observée et semble liée à la formation de complexes MDM2-TP53. En effet, dans plusieurs lignées cellulaires, dont une lignée résistante au cisplatine, un traitement avec un inhibiteur de MDM2 entraîne une augmentation importante de TP53 et permet d'augmenter l'apoptose induite par TP53 (Koster et al., 2011). Par ailleurs, un des gènes cibles de TP53, *NOXA*, joue également un rôle majeur dans l'apoptose causée par le cisplatine dans les TGTs (Gutekunst et al., 2011). L'expression de OCT3/4 est corrélée à celle de NOXA et une invalidation de *OCT3/4* conduit à une diminution de l'accumulation des transcrits de *NOXA*, ce qui entraîne une diminution de la sensibilité au cisplatine (Gutekunst et al., 2013). De plus, OCT3/4 régule également l'expression de *P21* qui est corrélée à la sensibilité au cisplatine *in vivo* comme *in*

vitro (Koster et al., 2010; Wu et al., 2012). La sensibilité des cellules de TGTs au cisplatine semble donc être dépendante de la fonction pro-apoptotique de TP53, associée à des niveaux importants de OCT3/4 qui régule positivement NOXA4 et négativement P21. En effet, les cellules de TGTs résistantes au cisplatine présentent des taux d'expression de *TP53*, *MDM2* et *P21* élevés, associés à une diminution de l'expression de *OCT3/4* et *NOXA4* (di Pietro et al., 2012).

Plusieurs études cliniques ont supposé un impact majeur de la méthylation d'ADN dans la résistance au cisplatine dans les TGTs. Les cellules les moins différenciées (telles que celles composant les séminomes) présentent très rarement des résistances au cisplatine et sont associées à un degré de méthylation de l'ADN plus faible que les non-séminomes (Wermann et al., 2010). Par ailleurs, des traitements avec des agents déméthylants peuvent contrecarrer la résistance au cisplatine mais des études plus avancées sont nécessaires afin d'explorer le potentiel des agents déméthylants (Biswal et al., 2012). Le blocage de la méthylation H3K27 *via* EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*) est un mécanisme associé à la résistance au cisplatine dans les TGTs (Singh et al., 2019). De plus, la répression du complexe PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) semble être une approche intéressante afin d'améliorer la résistance aux traitements (Singh et al., 2019).

Une dérégulation de la voie PI3K/AKT est observée dans les TGTs et la perte de *PTEN* (inhibiteur de la voie PI3K/AKT) est retrouvée dans 50 % des TGTs (Di Vizio et al., 2005). Un lien entre cette voie de signalisation et la résistance au cisplatine a été décrit (Juliachs et al., 2014) et, dans des lignées cellulaires de TGTs résistantes au cisplatine, AKT est sur-activée par rapport à des lignées sensibles. La voie PI3K/AKT semble donc être un candidat important afin d'améliorer la résistance au cisplatine dans le cadre des TGTs. Par ailleurs, cette voie active plusieurs effecteurs dont mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase). Dans des lignées de TGTs résistantes, l'inhibition de mTOR permet de sensibiliser les cellules au cisplatine en entraînant l'apoptose et en améliorant l'inhibition de la croissance cellulaire induite par le cisplatine (Rosas-Plaza et al., 2020).

Une approche bio-informatique par analyse micro-array a également mis en évidence une expression différentielle de la cycline D1 (CCND1) entre les lignées cellulaires résistantes au cisplatine et celles qui y sont sensibles. De plus, l'expression de *CCND1* est plus élevée dans les TGTs résistantes par rapport aux tumeurs sensibles aux traitements (Noel et al., 2010).

Par ailleurs, le gène *TDRG1* (*Testis Developmental Related Gene 1*) impliqué dans la prolifération des cellules séminomateuses semble également jouer un rôle dans la chimiorésistance des TGTs. En effet, la sur-expression de ce gène conduit à une activation de l'autophagie et à la résistance au cisplatine alors que, à l'inverse, son inactivation conduit à une inhibition de l'autophagie et entraîne la chimio-sensibilité des TGTs *in vitro* et *in vivo* (Peng et al., 2019). Il est important de noter qu'une activation de l'autophagie peut entraîner la croissance et la survie des cellules tumorales (Amaravadi et al., 2016) mais également inhiber l'apoptose, conduisant à une résistance aux chimiothérapies (Xu et al., 2017).

Une étude clinique a par ailleurs mis en évidence une association entre l'expression de *ERCC1* (*Excision Repair Cross-Complementation group 1*) et *NF-κB* et un mauvais pronostic associé à une réapparition des tumeurs après traitement (Azambuja et al., 2020). Cela suggère que ces gènes peuvent être des marqueurs associés à l'insensibilité au cisplatine mais des études supplémentaires restent nécessaires. *ERCC1* a déjà été associé à la chimio-résistance au cisplatine dans plusieurs types de cancers (Kang et al., 2010) et *NF-κB* est connu pour médier la résistance au cisplatine (Koga et al., 2011).

La résistance aux traitements de chimiothérapies représente actuellement un enjeu majeur puisqu'elle concerne 10 à 15 % des patients atteints de TGTs. Les mécanismes mis en jeu sont, pour la plupart, associés aux voies de signalisation KIT, TP53, WNT et PI3K/AKT qui sont des voies associées à la prolifération cellulaire. La méthylation de l'ADN joue également un rôle clé et différents gènes comme ceux codant CCND1, TDRG1 et ERCC1 semblent être impliqués bien que les mécanismes mis en jeu ne soient actuellement pas connus.

B. Impact des traitements de chimiothérapie sur la fertilité masculine

Les traitements de chimiothérapies présentent de nombreux effets secondaires dont l'un des majeurs est l'impact sur la fertilité. Dans la majorité des cas, les traitements conduisent à une diminution importante de la production de spermatozoïdes, sans impact majeur sur la fonction endocrine. Il a été montré pour la première fois en 1948 une absence de spermatogenèse chez 27 hommes sur 30 traités pour un lymphome avec de la moutarde azotée (Spitz, 1948).

Depuis plusieurs années, les cancers sont de mieux en mieux traités mais les effets secondaires associés aux traitements restent importants. Il est donc primordial de pallier ces effets afin d'améliorer la qualité de vie des patients. Depuis les années 1970, les centres d'études

et de conservation des œufs et du sperme (CECOS) proposent la conservation de sperme avant un traitement de chimiothérapie ayant des effets gonadotoxiques.

1. Epidémiologie

a) Traitements chez l'adulte

En 2020, environ 19,3 millions de nouveaux cas de cancers ont été recensés dans le monde. Les cancers les plus fréquents chez l'adulte sont le cancer du sein, le cancer du poumon, le cancer colorectal, le cancer de la prostate et le cancer de l'estomac (International Agency for Research on Cancer, 2020).

Les traitements de chimiothérapies sont gonadotoxiques, particulièrement les agents alkylants qui causent des azoospermies. Une azoospermie totale est observée chez 79 % des patients ayant subi une transplantation de cellules souches hématopoïétique après 25 ans (Rovo et al., 2013). La transplantation de cellules souches nécessite un conditionnement avec de fortes quantités de chimiothérapies et/ou de radiothérapie. Les chimiothérapies principalement utilisées dans ce cas sont les agents alkylants avec notamment le busulfan, le melphalan et la cyclophosphamide (Zulu and Kenyon, 2018).

L'hormone anti-mullerian (AMH), la FSH, l'inhibine B et la testostérone seraient des marqueurs de la toxicité testiculaire causée par une chimiothérapie (Levi et al., 2015). Les diminutions du nombre de spermatocytes et spermatides induites par le traitement vont conduire à une diminution de la production d'inhibine B. L'inhibine B diminue la production d'AMH *via* l'inhibition de l'effet de la FSH sur les cellules de Sertoli (Marchetti et al., 2003).

b) Cancers pédiatriques

Chaque année, environ 400 000 enfants et adolescents âgés entre 0 et 19 ans sont diagnostiqués avec un cancer. Grâce aux avancées majeures de la médecine, dans les pays développés, environ 84 % des enfants atteints de cancers vont survivre plus de 5 ans contre 58 % dans les années 1970 (Steliarova-Foucher et al., 2017).

Les cancers les plus fréquents chez l'enfant de 0 à 14 ans sont les leucémies (représentant 46 % des cancers pédiatriques), les tumeurs du cerveau et de la moelle épinière (28 %) et les lymphomes (15 %) (Steliarova-Foucher et al., 2017).

Une étude a été réalisée chez les hommes ayant survécu à un cancer dans l'enfance par la CCSS (*Childhood Cancer Survivor Study*). La prévalence de l'infertilité était de 46 % chez ces hommes alors qu'elle n'est que de 17,5 % chez leurs frères n'ayant pas eu de cancer (Wasilewski-Masker et al., 2014). Les chimiothérapies étant associées aux troubles de la fertilité sont les agents alkylants, principalement lors de traitements avec des doses cumulées (Green et al., 2010). De plus, 69 % des patients traités avec une molécule de chimiothérapie avant une transplantation hématopoïétique de cellules souches présentent un risque accru d'azoospermie persistante (Borgmann-Staudt et al., 2012).

2. Impact des traitements de chimiothérapie sur la lignée germinale mâle

Il existe différents types de chimiothérapie : les agents alkylants (tels que le cisplatine et le busulfan), les antimétabolites (5-fluorouracile), les alcaloïdes végétaux, les inhibiteurs de la topoisomérase (etoposide), les antibiotiques antitumoraux (bléomycine), les inhibiteurs de facteur de croissance ou encore l'hormonothérapie.

Il a récemment été mis en évidence que les agents alkylants conduisent à une déplétion du pool de spermatogonies à long terme, alors que les patients traités avec d'autres molécules qui ne sont pas des agents alkylants présentent un nombre de spermatogonies normal après traitement (Poganitsch-Korhonen et al., 2017).

Les agents alkylants sont les molécules de chimiothérapies ayant l'impact le plus important sur la lignée germinale. Les impacts du cisplatine, utilisé dans le traitement de nombreux cancers dont le cancer germino-testiculaire, et du busulfan, utilisé avant une greffe de moelle osseuse, notamment chez l'enfant, seront étudiés ci-après.

a) Le cisplatine

Dès 3 jours après traitement au cisplatine chez la souris, une diminution du nombre de spermatocytes primaires est observée sans impact sur les autres types cellulaires retrouvés au sein du testicule (Vawda and Davies, 1986). Cet effet est associé au fait que le cisplatine entraîne une augmentation importante de l'apoptose des cellules germinales saines (Zhang et al., 2001). Par ailleurs, sur le tissu testiculaire pré-pubertaire *in vitro,* le cisplatine conduit à la diminution de la prolifération des cellules germinales et à une augmentation de l'expression de γH2AX, suggérant une augmentation du nombre de cassures ADN (Smart et al., 2018). Dès une semaine après traitement au cisplatine, sur un modèle *in vitro* de tissu testiculaire pré-pubertaire, une diminution importante du nombre de cellules indifférenciées (positives pour le

marqueur PLZF) et de cellules méiotiques ($SCP3^+$) est observée, associée à une diminution de la prolifération (Lopes et al., 2020). Il s'agit d'un impact transitoire puisque le nombre de spermatogonies indifférenciées revient à la normale dès 4 semaines après traitement.

Chez le rat adulte, 9 jours après injection intra-péritonéale de cisplatine, une diminution du nombre de spermatocytes et de spermatides rondes est observée. Cet effet est également lié à une diminution de la fertilité associée à une diminution du nombre d'implantation chez les femelles gestantes (Kinkead et al., 1992). Le cisplatine à des doses élevées entraîne également une diminution de la concentration en testostérone ainsi qu'en LH et FSH dans le sang, indiquant un impact toxique de la molécule de chimiothérapie sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Chez des souris adultes, un traitement au cisplatine conduit, 1 mois après traitement, à une diminution du poids du testicule, associée à une diminution du nombre de spermatozoïdes mobiles dans l'épididyme. Ces effets sont combinés à une diminution du nombre de spermatogonies et de spermatocytes en prolifération et à une augmentation de l'apoptose dans les testicules (Levi et al., 2016).

L'exposition de testicules fœtaux humains et de tissu testiculaire pré-pubertaire au cisplatine conduit à une diminution importante du nombre de cellules germinales initiée par une perte des gonocytes et suivie par une diminution du nombre de spermatogonies. Cet effet est également associé à une diminution d'environ 70 % de la prolifération des cellules germinales (Tharmalingam et al., 2020).

Le mécanisme de repro-toxicité induit par le cisplatine est associé au stress oxydatif caractérisé notamment par une augmentation de la peroxydation des lipides. De plus, le traitement de rats au cisplatine conduit à une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes SOD (*SuperOxide Dismutase*), CAT (*CATalase*) et GST (*Glutathione S-Transferase*) dans le testicule associée à une augmentation des niveaux d'anion superoxide (Ahmed et al., 2011).

b) <u>Le busulfan</u>

Le busulfan est utilisé afin de conditionner une transplantation de cellules progénitrices pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques. Il agit préférentiellement en ajoutant un groupement alkyl entre deux guanines de l'ADN ou entre une guanine et une adénine. L'ajout de ce groupement qui forme des ponts intra brins dans l'ADN conduit à des cassures simples brins qui vont entraîner un blocage de la réplication et de la transcription de l'ADN. A

plus long terme, l'inhibition de la prolifération et de la différenciation cellulaire est observée (Iwamoto et al., 2004). Son effet toxique est exercé sur les cellules en phase G1 préférentiellement (Bucci and Meistrich, 1987; Rooij and Kramer, 1968).

Un dommage à l'ADN causé par le busulfan va entraîner une augmentation de l'expression de *TP53* conduisant à l'apoptose des cellules (Zhang et al., 2019). TP53 active la protéine ASK (*Activator of S-phase Kinase*), entraînant l'activation de BAX (*Bcl-2 Associated X*) et l'expression de gènes cibles tels que *BAX*, *BID* (*BH3 Interacting Domain Death Agonist*) ou encore *PUMA* (Zhivotovsky and Kroemer, 2004). L'induction de ces gènes va permettre une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale entraînant le relargage du cytochrome C et l'induction de l'apoptose.

Par ailleurs, une augmentation de la peroxydation des lipides dans les testicules traités au busulfan après 1 à 2 semaines a été observée (Cai et al., 2016), suggérant une augmentation de la production d'espèces oxygénées réactives (ROS). En effet, les souris traitées avec de la mélatonine après une injection de busulfan présentent une spermatogenèse améliorée (Mirhoseini et al., 2014). La mélatonine entraîne l'expression de *MnSOD* (*MaNganese SuperOxide Dismutase*) qui permet de contrecarrer l'apoptose causée par des concentrations importantes de ROS induites par le busulfan (Li et al., 2018a). En parallèle, la mélatonine entraîne l'expression de *SIRT1* qui participe à la déacétylation de TP53 conduisant à la dégradation de TP53, ce qui entraîne la résistance des cellules à l'apoptose.

Un traitement au busulfan entraîne une azoospermie prolongée, associée à un impact majeur du traitement sur les spermatogonies (Rooij and Kramer, 1968). Trois jours après traitement au busulfan, une diminution de plus de 99 % des SSCs est observée (Zohni et al., 2012), conduisant à une perte majeure des autres types cellulaires entre 2 et 4 semaines post-traitement. Au-delà de trois jours, le nombre de SSCs va ensuite être restauré afin de retrouver un nombre de SSCs normal, la durée nécessaire pour la récupération du nombre de SSCs est dépendante de la dose utilisée (Zohni et al., 2012). L'effet du busulfan est en effet transitoire selon la dose utilisée ; une fois le nombre de SSCs restauré, la spermatogenèse va reprendre et le nombre de cellules au sein du tube séminifère ainsi que la fertilité redeviendront normaux, bien que la durée de récupération soit dépendante de la dose utilisée.

3. Préservation de la fertilité

Deux approches sont actuellement étudiées afin de contrer les effets des chimiothérapies sur la fertilité. La première consiste à minimiser l'impact du traitement sur le testicule afin de protéger les cellules germinales *in vivo*, et la deuxième est de préserver les spermatozoïdes ou le tissu testiculaire avant traitement.

Afin de préserver les cellules germinales, des traitements gonadoprotecteurs sont en cours d'essai. Chez les rongeurs, l'utilisation de suppresseurs hormonaux rendent les testicules moins sensibles aux effets des chimiothérapies (Shetty and Meistrich, 2005) mais cet impact n'a pas été confirmé chez l'homme (Johnson et al., 1985). A l'inverse, un traitement avec un antagoniste de la GnrH ou avec la FSH protège les gonades d'un traitement par radiothérapie chez le primate (Kamischke et al., 2003). Actuellement, aucun médicament gonadoprotecteur n'est utilisable chez l'homme.

Il existe différents moyens de préserver la fertilité lors de traitements de chimiothérapie. Chez les patients pubères, un recueil de sperme est systématiquement proposé aux patients avant un traitement de chimiothérapie, il est effectué afin de réaliser une congélation des spermatozoïdes. Celle-ci se fait dans l'azote liquide à une température de -196°C (Donnelly et al., 2001). La congélation doit avoir lieu avant un traitement gonadotoxique étant donné le risque mutagène important des traitements sur les spermatozoïdes.

Concernant les hommes présentant des azoospermies ou des oligospermies sévères, une extraction des spermatozoïdes peut être réalisée à partir de tissu testiculaire, ils seront ensuite cryopréservés de la même manière. Les spermatozoïdes conservés pourront être utilisés selon différentes techniques d'assistance médicale à la procréation par insémination ou FIV (Fécondation *In Vitro*).

Dans le cas d'un échec de recueil de spermatozoïdes ainsi que chez les patients prépubères, une biopsie testiculaire est réalisée afin de congeler le tissu testiculaire. Actuellement, la production de spermatozoïdes fonctionnels à partir de biopsie testiculaire n'a pas encore été mise au point, trois techniques principales sont en cours d'étude :

- L'injection directe de cellules souches spermatogoniales dans les tubes séminifères : il s'agit d'une transplantation des cellules germinales dans le testicule après la fin

du traitement gonadotoxique. Cette méthode a été réalisée chez la souris et a permis la production de spermatozoïdes matures (Brinster and Zimmermann, 1994).

- La greffe de tissu testiculaire dans un autre organisme ; les cellules germinales vont pouvoir se différencier afin de produire des spermatozoïdes viables permettant une descendance chez la souris. Cependant, la xénogreffe de tissu testiculaire humain prépubertaire chez des souris immunodéficientes ne permet pas l'obtention de spermatides différenciées (Geens et al., 2006).
- La maturation des spermatogonies *in vitro* afin d'obtenir des spermatozoïdes matures. Un système de culture soft-agar en 3D a permis la différenciation de spermatogonies souches murines en spermatozoïdes (Stukenborg et al., 2008), ceux-ci sont fonctionnels et permettent d'obtenir une descendance viable et fertile chez la souris (Sato et al., 2011).

La préservation de la fertilité chez l'homme pubère est couramment utilisée et est systématiquement proposée avant un traitement de chimiothérapie. Cependant, chez l'homme pré-pubère ou présentant une azoospermie, la préservation de la fertilité est bien plus complexe et est actuellement encore au stade expérimental. Il apparaît donc capital de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu afin de minimiser les effets gonadotoxiques des chimiothérapies.

Objectif du travail de thèse

TGR5 est le principal récepteur membranaire des acides biliaires, son expression est majoritaire dans l'épithélium de la vésicule biliaire, l'intestin, le muscle squelettique et le tissu adipeux. TGR5 est largement étudié du fait de son rôle majeur dans le métabolisme des acides biliaires et son implication dans la dépense énergétique ainsi que dans la régulation de la glycémie.

Récemment, des travaux réalisés dans l'équipe ont mis en évidence l'impact délétère des acides biliaires sur le testicule, conduisant notamment à une rupture de la barrière hémato-testiculaire *via* l'altération de gènes impliqués dans les interactions cellule – cellule tels que *Cnx43*. Par ailleurs, un régime riche en acides biliaires chez le mâle conduit à des troubles métaboliques chez la descendance, indiquant un impact intergénérationnel des acides biliaires. Cet impact délétère des acides biliaires est dépendant du récepteur TGR5 ; en effet, les souris invalidées pour *Tgr5* nourries avec un régime riche en acides biliaires présentent des défauts testiculaires moindres par rapport aux souris sauvages. L'ensemble de ces données suggère un rôle important de TGR5 sur la fertilité et plus particulièrement sur la spermatogenèse. En effet, l'équipe a mis en évidence que l'expression de *Tgr5* au sein du testicule est retrouvée dans les cellules germinales.

L'objectif de ce projet était donc d'étudier le rôle de TGR5 dans la physiologie et la physiopathologie testiculaires, notamment dans la lignée germinale. D'une part, (1) le rôle de TGR5 a été étudié dans la spermatogenèse en réponse à un traitement de chimiothérapie sur un modèle murin. Un traitement au busulfan (molécule de chimiothérapie de type agent alkylant) qui permet l'étude des mécanismes de survie, de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire a été réalisé afin d'analyser le rôle de TGR5 dans les cellules germinales. Il s'agit d'un modèle dynamique de perte transitoire de la spermatogenèse permettant d'étudier le rôle de TGR5 dans la physiologie testiculaire mais également dans la chimiosensibilité des cellules germinales. Dans ce contexte, des analyses phénotypiques et histologiques ont été réalisées sur des souris sauvages, invalidées pour *Tgr5* de manière totale ou invalidées pour *Tgr5* spécifiquement dans la lignée germinale. Afin de s'affranchir des biais de cellularité retrouvés à l'échelle du testicule *in vivo*, des analyses phénotypiques, histologiques, moléculaires ainsi qu'une approche transcriptomique par une analyse RNA-seq ont été réalisées sur une lignée de cellules germinales murines GC1-spg (spermatogonies B/spermatocytes primaires) transfectées avec un siARN contrôle ou dirigé contre *Tgr5*. Les résultats majeurs ont ensuite été validés sur

des cellules GC1-spg invalidées pour le gène codant TGR5 par la technique de CRISPR/Cas9. Les données obtenues montrent que le *knock-out* de *Tgr5* permet un redémarrage précoce de la spermatogenèse après un traitement au busulfan *via* la modulation des capacités de prolifération et d'apoptose des cellules germinales. Ces effets sont associés aux voies de signalisation TGR5 – GLIS2 (*GLI-Similar 2*) – TP53.

D'autre part, (2) l'implication de TGR5 dans les cancers germino-testiculaires a été évaluée. Le rôle clé de TGR5 dans les cellules germinales indifférenciées décrit dans la première partie de ces travaux soulèvent le questionnement d'un rôle de TGR5 dans le développement du cancer germino-testiculaire. En effet, ce cancer est initié par les cellules germinales indifférenciées. L'implication de TGR5 dans le cancer germino-testiculaire a donc été étudié. Des analyses *in silico* ont tout d'abord été réalisées afin d'étudier les gènes en lien avec *Tgr5* pouvant être impliqués dans les TGTs. Des expériences ont ensuite été réalisées sur une lignée de cellules tumorales humaines de type non-séminomes NCCIT. Des analyses phénotypiques, histologiques et moléculaires ont été réalisées sur des cellules parentales ou invalidées pour *Tgr5* par une approche CRISPR/Cas9. Un lien majeur entre TGR5 et les gènes de pluripotence associés aux TGTs a été observé, suggérant que la modulation de TGR5 pourrait être impliquée dans l'initiation, le développement ou la chimiorésistance des TGTs.

RÉSULTATS

Article 1

TGR5 signaling controls undifferentiated germ cell homeostasis through the GLIS2-TP53 pathway in response to chemotherapy. En revision

Laura Thirouard, Hélène Holota, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Angélique De Haze, Christelle Damon-Soubeyrand, Yoan Renaud, Jean-Paul Saru, Claude Beaudoin, David H Volle.

A. Introduction

Chez l'homme, comme dans des modèles murins, des liens entre les troubles hépatiques et les troubles de la fertilité ont été observés. La plupart des troubles hépatiques présentent une augmentation des taux plasmatiques d'acides biliaires, le lien entre la fertilité et les acides biliaires a été évalué. Il a été montré, chez la souris, que les acides biliaires entraînent des défauts testiculaires ce qui conduit à une altération de la fertilité. Cet effet est notamment dépendant du récepteur TGR5 ; en effet, l'impact néfaste d'un régime supplémenté en acide cholique est atténué chez les souris invalidées pour le gène *Tgr5* par rapport aux souris sauvages (Baptissart et al., 2014). Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle de TGR5 dans la physiologie et la physiopathologie testiculaires.

Afin de mieux comprendre le rôle de TGR5 dans la physiologie testiculaire, un modèle d'étude classique de celle-ci a été utilisé : l'exposition aiguë au busulfan. Le busulfan est une molécule de chimiothérapie couramment utilisée dans le traitement pré-greffe de moelle osseuse. Il s'agit d'une molécule décrite comme affectant la spermatogenèse avec une dose unique (Bucci and Meistrich, 1987). Le busulfan est donc couramment utilisé dans l'étude de celle-ci. En outre, le busulfan étant une molécule de chimiothérapie, son utilisation permet d'étudier la chimiosensibilité et/ou la chimiorésistance des cellules germinales. En effet, l'impact délétère des chimiothérapies (principalement les agents alkylants) sur la qualité de vie post-traitement, notamment sur la fertilité, pose un problème majeur pour les patients ayant survécu au cancer. La compréhension des mécanismes mis en jeu est donc un élément clé afin d'améliorer les conséquences à long terme des traitements anti-cancéreux.

Nos résultats démontrent que l'invalidation du gène codant pour TGR5 permet de minimiser les conséquences délétères à long terme de la chimiothérapie sur la lignée germinale. En effet, les souris invalidées pour *Tgr5* présentent un nombre de cellules apoptotiques moins important que les souris sauvages après un traitement au busulfan. De plus, deux semaines après

traitement au busulfan, la totalité des spermatogonies ($PLZF^+$) prolifèrent chez les individus invalidés pour *Tgr5*, contrairement aux individus sauvages, permettant un redémarrage plus précoce de la spermatogenèse. A l'inverse, l'activation de TGR5, induite par un régime supplémenté en acide cholique, de manière synergique avec un traitement de chimiothérapie sensibilise les cellules germinales à la chimiothérapie conduisant à un retard dans le redémarrage de la spermatogenèse.

Des analyses transcriptomiques réalisées à partir d'une approche RNAseq puis validées par qPCR ont permis de mettre en évidence que la protection des cellules germinales face au busulfan chez les individus invalidés pour le gène *Tgr5* est associée à la surexpression de *Glis2* qui permet notamment de contrecarrer les effets du busulfan sur l'activation de la voie de signalisation TP53 conduisant à l'apoptose des cellules germinales. Ces travaux démontrent le rôle majeur d'un axe de signalisation TGR5 – GLIS2 – TP53 dans la chimio-sensibilité des cellules germinales.

Manuscript Click here to view linked References

TGR5 signaling controls undifferentiated germ cell homeostasis through the GLIS2-TP53 pathway in response to chemotherapy.

Thirouard Laura[1], Holota Hélène[1], Monrose Mélusine[1], Garcia Manon[1], de Haze Angélique[1], Damon-Soubeyrand Christelle[1], Renaud Yoan[2], Saru Jean-Paul[1], Beaudoin Claude[1] and Volle David H[1*].

[1] INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD Institute, Team-Volle, F-63037 Clermont–Ferrand, France

[2] INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD Institute, Bio-informatic facility, F-63037 Clermont–Ferrand, France

***Correspondence.** D.H. VOLLE or C. BEAUDOIN. INSERM U1103, CNRS UMR-6293, UCA, GReD Institute, 28 place Henri Dunant, TSA 50400, 63037 Clermont-Ferrand, France. Email addresses: claude.beaudoin@uca.fr, david.volle@inserm.fr or david.volle@uca.fr

Key words: TGR5, Chemo-drug, Bile acid, Stem cell regeneration, Fertility recovery.

Highlights

- TGR5 is a key mediator of fertility disorders induced by chemodrugs.
- TGR5 is a gatekeeper of undifferentiated germ cells homeostasis
- Lack of TGR5 leads to an early resurgence of in undifferentiated germ cells following busulfan exposure.
- TGR5 activation delayed germ cell resurgence following busulfan exposure.
- TGR5 regulates GLIS2/TP53 signaling pathways in undifferentiated germ cells.

Abstract.

Spermatogonial stem cells (SSCs) have the ability to regenerate and maintain spermatogenesis throughout life, making the testis a good model for studying stem cell biology. The roles of the bile acid receptor TGR5 on spermatogonial cells have never been studied. Using a classical model of transient germ cell depletion by *in vivo* busulfan treatment in germ cell specific or complete Tgr5 knockout mice, combined with *in vitro* and pharmacological approaches, we define the roles of Tgr5 on the regenerative abilities of undifferentiated germ cells, on germ cell lineage resurgence and subsequently on fertility. These effects result from TGR5 regulation of stem cell renewal and survival genes through the GLIS2 and TP53 signaling pathways. Our data demonstrate key roles for TGR5 on undifferentiated germ cell homeostasis and suggest that modulation of TGR5 could be targeted for the development of therapeutic solutions for fertility disorders in the context of cancer treatment.

Introduction

Spermatogenesis process is responsible of the generation of male gametes. The duration of each stage of spermatogenesis is defined and it takes approximately 1-2 weeks to progress from spermatogonia to spermatocytes and then around another 2 weeks to give rise to spermatids.

During adult mammalian life, the spermatogonial stem cell (SSC) pool is key to the maintenance of spermatogenesis (de Rooij and Russell, 2000). This results from a balance between self-renewal and differentiation processes of germline cells to enable sperm production (Griswold and Oatley, 2013; Oatley and Brinster, 2012).

However, much remains to be defined regarding the regulation of SSC pool homeostasis.

A property of SSC is their ability to regenerate following injuries allowing fertility recovery over time. Germ cells are very sensitive to chemotherapies such as alkylating agents because of their high proliferation rate (Zohni et al., 2012). Exposure to chemodrugs represents a good experimental model to study the actors involved in the regeneration capacities of undifferentiated germ cells.

Over the last decades bile acids have been demonstrated to be signaling molecules regulating many physiological functions such as lipid, energetic or glucose metabolism as well as male fertility (Martinot et al., 2017a; Sedes et al., 2017). The membrane bile acid receptor TGR5 (G-protein coupled bile acid receptor-1; GPBAR-1) is expressed in the testis (Baptissart et al., 2014, 2018); but its impact on spermatogonia homeostasis and on their regenerative capacities have never been studied so far.

In order to define the roles of the TGR5 signaling pathway on spermatogonia, we used a combination of *in vivo*, *in vitro* and pharmacological approaches. We demonstrated that *Tgr5* deficiency is associated with an early resurgence of the germ cell lineage after exposure to Bu. At the molecular level, this results from the interferences of TGR5 signaling with the modulation of the expression of undifferentiated germ cell genes (e.g. Gfra1, *Fgfr2*) and with the GLIS2 and TP53 signaling pathways, which control stem cell renewal and survival. Conversely, activation of TGR5 by agonists leads to germ cell sensitization to chemotherapy *in vivo* and *in vitro* and by the way a delay for germ cell recovery.

In conclusion, all these data indicate that modulation of the TGR5 signaling pathway, as a therapeutic target, could pave the way for new treatment solutions for fertility disorders.

Results

The lack of TGR5 lowers the impacts of busulfan on male fertility.

To decipher the role of TGR5 on the responsiveness of germ cells to chemotherapies,

148 and on their subsequent regenerative capacities, 12-week-old wild type (*Wt*) males and *Tgr5*-
149 deficient (*Tgr5*$^{-/-}$) male mice were treated with a single injection of busulfan (Bu) (15mg/kg)
150 (Zohni et al., 2012). Exposure to Bu had almost no adverse impact on body weight in *Wt* and
151 *Tgr5*$^{-/-}$ male mice (**Supplementary Fig.1A**). The impacts of Bu on male fertility were
152 analyzed from 6 weeks to 20 weeks after treatment. No statistical difference between groups
153 was found in the percentage of plugged females (**Supplementary Fig.1B**). All *Wt* and *Tgr5*$^{-/-}$
154 *males* exposed to Bu were sterile 6-8 weeks after exposure (**Figure 1A**). Interestingly, 12
155 weeks after Bu exposure, only 18% of *Wt* males recovered fertility, while 55% of *Tgr5*$^{-/-}$
156 males gave birth to offspring (**Figure 1A**). After 20 weeks, 80% of *Tgr5*$^{-/-}$ busulfan-treated
157 males regained fertility, when only 42% of *Wt* males did (**Figure 1A**). In addition, after 12
158 weeks, in the fertile males, treatment with Bu resulted in a drastic decrease in the number of
159 pups per litter in *Wt (1.5 per litter)*; whereas almost no impact was observed on *Tgr5*$^{-/-}$ males
160 (6.8 per litter) compared to their respective vehicle-treated controls (**Figure 1B**). These data
161 indicate that *Tgr5*$^{-/-}$ males recovered their fertility faster than *Wt* males after exposure to the
162 chemical drug.
163 These results on reproductive capacities were supported by analysis of the number of
164 sperm cells produced as revealed by the count of sperm cells in the head of the epididymis.
165 As expected in *Wt* males, Bu treatment was associated with a significant and progressive
166 decrease in sperm cell production from 2 weeks with a major effect at 8 weeks after
167 treatment (**Supplementary Fig.1C** & **Figure 1C**). Thereafter, sperm cell production
168 increased and gradually recovered at 12 and 20 weeks after treatment with Bu (**Figure 1C**).
169 Consistent with reproductive capacity, no statistical difference was noticed between *Wt* and
170 *Tgr5*$^{-/-}$ males at 8 weeks following Bu exposure, but then at 12 and 20 weeks the relative
171 sperm cell counts were higher in *Tgr5*$^{-/-}$ males compared to *Wt* males (**Figure 1C**).
172 To better understand the impacts of Bu on sperm production in *Wt* and *Tgr5*$^{-/-}$ males,
173 we focused on the analysis of testis.
174 All these data (fertility, sperm count) were consistent with the observation that *Wt*
175 and *Tgr5*$^{-/-}$ males showed significant loss of germ cells as shown by the thickness of the
176 epithelium at 4 and 8 weeks (**Figure 1D)**, as illustrated by the H&E staining. No major
177 impacts of Bu were noticed at 1 and 2 weeks with H&E staining (**Supplementary Figure**
178 **1D**). The significant germ cell loss, mainly observed 4 weeks after treatment, was correlated
179 with an increased rate of apoptotic germ cells, which was greater in *Wt* males than in *Tgr5*$^{-/-}$
180 males (**Figure 1E**). This lower apoptotic level in *Tgr5*$^{-/-}$ testis was followed by a more rapid
181 regeneration phase of the germ cell lineage from 8 to 20 weeks compared to *Wt* (**Figure 1D**).
182 These data support the identification of a main role of TGR5 as a modulator of male
183 reproductive capacities following injury.
184

185

186 **TGR5 is a master gene of undifferentiated spermatogonia homeostasis in response to**
187 **busulfan.**

188 Based on the data observed in the H&E analysis, we first analyzed the number of
189 seminiferous tubules with post-meiotic spermatid cells (acetylated histone H4 positive cells;
190 acetylated-H4+) was significantly reduced 4 weeks after treatment with Bu in both Wt and
191 Tgr5$^{-/-}$ males (**Figure 2A**). *Tgr5*$^{-/-}$ males showed faster recovery of acetylated-H4+
192 spermatids as observed 8 weeks after exposure (**Figure 2B**). This pattern of recovery is
193 consistent with the differential impact of Bu on sperm cell production and fertility between *Wt*
194 and *Tgr5*$^{-/-}$ males since 10 weeks after treatment.

195 As spermatogonia support spermatogenesis, we then analyzed the population of
196 undifferentiated spermatogonial cells. These later are highly susceptible to anti-cancer drugs
197 due to their high proliferation rate and define the capacities of fertility recovery. Note that in
198 the vehicle-treated groups, no difference was observed in the number of PLZF+ cells
199 (undifferentiated spermatogonia) per seminiferous tubules between *Wt* and *Tgr5*$^{-/-}$ males
200 (**Supplementary Fig.2A)**. The present data showed that the undifferentiated germ cell
201 population (PLZF-positive cells) was the first to be affected after exposure to Bu with an
202 initial loss beginning 1 day after treatment up to 7 days (**Supplementary Fig.2B**). The effect
203 of Bu on PLZF+ cell loss was similar between *Wt* and *Tgr5*$^{-/-}$ males at 5 days after treatment
204 with Bu, where almost 80% of these cells were lost (**Supplementary Fig.2C**). The present
205 data showed that PLZF+ cell number was higher in *Tgr5*$^{-/-}$ male mice than in *Wt* 1 and 2
206 weeks after treatment with Bu (**Figure 2C & 2D**). At 4 weeks after Bu exposure, the number
207 of PLZF+ cells was comparable to vehicle-treated groups in both genotypes (**Figure 2E**).
208 These data suggest that the absence of TGR5 minimized the deleterious effects of Bu on the
209 regenerative capacities of the PLZF+ cells. This effect was not associated with alteration of
210 the apoptotic cell rates 2 weeks after exposure to Bu between genotypes (**Supplementary**
211 **Fig.2D**). In contrast, a lower percentage of PLZF+ proliferating (PCNA) cells was observed 2
212 weeks after treatment with Bu in *Wt* mice (79% compared to control vehicle-treated mice)
213 compared to *Tgr5*$^{-/-}$ males where no impact was noticed on the rate of PCNA+/PLZF+ cells
214 (99% compared to control vehicle-treated mice) (**Figure 2F**). This may partly explain how
215 *Tgr5*$^{-/-}$ males recovered faster than *Wt* males.

216 These data support the findings that Bu first affects spermatogonia leading to germ cell
217 loss, which is then followed by germ cell lineage regeneration initiated from the remaining
218 SSCs to give rise to a new wave of spermatogenesis. In addition, these *in vivo* data suggests
219 that Bu mediated its effects *via* alterations of apoptotic and proliferation processes, all of
220 which were minimized in *Tgr5*$^{-/-}$ male mice.

221

222 **Spermatogonial Tgr5 signaling pathway plays a major role in the effects of busulfan**
223 **exposure**.
224 TGR5 was demonstrated to be expressed in the germ cell lineage (Baptissart et al.,
225 2014). This is consistent with the fact that Tgr5 could play a direct role within spermatogonia
226 explaining that *Tgr5*$^{-/-}$ mice recovered faster than *Wt* males after exposure to chemotherapy.
227 To better decipher the roles of TGR5 within the germ cell lineage, we generate mice with a
228 specific deletion of the *Tgr5* gene in germ cells using *Tgr5*-floxed mice and a model
229 controlling the expression of recombinase-CRE in germ cells through the Vasa
230 promoter(Gallardo et al., 2007). As the use of recombinase-CRE in germ cells led to the
231 passage of the recombinant allele to the next generation, the mice used in this work were
232 *Tgr5*$^{f/-}$ and the phenotypes of *Tgr5*$^{f/-}$ were analyzed by comparing the response to Bu in *Cre*$^{-/-}$
233 and *Cre*$^{+/-}$ male mice. The *Tgr5*$^{f/-}$; *Cre*$^{+/-}$ (referred to as *Tgr5*$^{GC-KO}$) corresponded to germ cell
234 specific knockout males (**Supplementary Fig. 2E**). Analysis of fertility revealed no difference
235 between genotypes (*Tgr5*$^{f/-}$; *Cre*$^{-/-}$ and *Tgr5*$^{GC-KO}$) in control DMSO-treated condition (vehicle:
236 veh.) (**Supplementary Fig. 2F**). Bu led to a complete sterility in both genotypes with all
237 males being sterile 8 weeks after treatment (**Figure 3A left panel**). Interestingly, *Tgr5*$^{GC-KO}$
238 males showed an early recovery of fertility after Bu exposure compared to *Tgr5*$^{f/-}$*; Cre*$^{-/-}$ males
239 (**Figure 3aA left panel**). This confirmed the concordance of Bu and TGR5 signaling
240 pathways in the germ lineage. Indeed, even if the difference was not significant 13% of
241 *Tgr5*$^{GC-KO}$ male mice recovered fertility at 10 weeks whereas all *Tgr5*$^{f/-}$*; Cre*$^{-/-}$ remained sterile
242 (**Figure 3A, left panel**). Then, fertility capacities were statistically different between
243 genotypes 10-13 weeks after Bu exposure as 86% of *Tgr5*$^{GC-KO}$ males gave birth to offspring
244 while only 59% of *Tgr5*$^{f/-}$*; Cre*$^{-/-}$ males did (**Figure 3A, left panel**). At 8 weeks, if no progenies
245 were obtained from *Tgr5*$^{f/-}$; *Cre*$^{-/-}$ males *Tgr5*$^{GC-KO}$ males give rise to 1.5 pups per litter,
246 highlighting the start of fertility recovering (**Figure 3A, right panel**). 13 weeks after Bu
247 exposure in the fertile males the number of pups per litter was similar between groups
248 (**Figure 3A, right panel**). These data support the conclusion that TGR5 acts within germ
249 cells to modulate the effects of Bu.
250
251
252 ***TGR5 controls undifferentiated germ cell homeostasis.***
253 Treatment with Bu led to a significant modulation of testicular cellularity with germ cell
254 loss, so that molecular analyses on the whole testis may not be totally reliable. To better
255 define how TGR5 modulates the effects of Bu in germ cells, we used the spermatogonial cell
256 line GC1spg. The effects of Bu were analyzed on GC1spg cells that were transfected with a
257 control siRNA (siCtrl) or a siRNA directed against Tgr5 (siTgr5) (**Supplementary Fig.3A**)
258 and exposed to Bu (200µM) for 24 or 48 hours. Bu initially resulted in a similar decrease

259 (around 14 to 19% respectively) in the number of cells in siCtrl-GC1spg and siTgr5-GC1spg
260 groups 24 hours after treatment with Bu (**Figure 3B**). The impact of Bu was then
261 exacerbated after 48 hours in siCtrl-GC1spg cells with a 54% decrease in cell numbers
262 (**Figure 3B**); whereas in cells transfected with siTgr5 a lower impact was observed (**Figure**
263 **3B**). These data were consistent with *in vivo* results and suggest that lower levels of *Tgr5*
264 attenuate the long-term deleterious effects of Bu on spermatogonial cells.

265 Consistent with *in vivo* data, the decrease in the number of siCtrl-GC1spg cells after
266 Bu treatment was associated with a higher level of apoptotic cells compared to cells treated
267 with vehicle (**Figure 3C**). This increase in Bu-induced apoptosis was less pronounced in
268 siTgr5-transfected cells (**Figure 3C**).

269 Interestingly, mRNA accumulation of *Gfra1, a* gene related to undifferentiated
270 spermatogonia self-renewal and survival, was upregulated in the siTgr5-transfected cells
271 compared to siCtrl-transfected cells (**Figure 3D**). Moreover, *Gfra1,* encoding the GDNF
272 receptor-alpha1, was identified among the genes that were differentially modulated by Bu in
273 siCtrl-transfected cells. As confirmed by qPCR approaches, *Gfra1* expression was decreased
274 by Bu in siCtrl-transfected cells and the effect was less pronounced in siTgr5-transfected
275 cells (**Figure 3D**).

276 To better define the molecular mechanisms associated with the impacts of TGR5
277 signaling on Bu sensitivity, we then progressed using RNAseq approach. Four groups were
278 analyzed (**Figure 3E**) corresponding to GC1spg cells transfected with siCtrl or siTgr5 and
279 exposed to the vehicle or Bu 200µM for 24 hours.

280 To better understand the functions of TGR5 in spermatogonia in the context of Bu
281 exposure, we generated lists of genes that were differentially expressed after Bu exposure in
282 cells transfected with siCtrl (siCtrl-Bu vs siCtrl-DMSO; **Table S1A**) or with siTgr5 (siTgr5-Bu
283 vs siTgr5-DMSO; **Table S1B**).

284 In cells transfected with siCtrl, 1145 genes were significantly modulated by Bu (**Table**
285 **S1A**). A majority of 718 genes (62.7%) were suppressed (**Table S1A-1**), while 427 (37.3%)
286 were upregulated (**Table S1A-2**) compared to the vehicle-treated group (**Figures 3F**).
287 Applying the same criteria, analyses performed on cells transfected by siTgr5 showed that
288 888 genes were significantly modulated by Bu (**Table S1B**). Of these, 504 (56.76%) genes
289 were suppressed (**Table S1B-1**), while 384 (43.24%) genes were upregulated compared to
290 the group treated with vehicle (**Table S1B-2**). To better understand how the low levels of
291 TGR5 modulates the long-term impacts of Bu, comparison of these lists allowed
292 discriminating genes that were specifically affected by Bu only in cells transfected by siCtrl
293 (**Table S1C**), we focused on the list of 601 genes that were affected by Bu specifically in
294 cells transfected with siCtrl. Of these, 431 were downregulated and 170 were upregulated
295 (**Table S1C-1 & S1C-2** respectively) (**Figures 3F, 3G & 3H**).

296 The lists of genes affected by Bu specifically in siCtrl-transfected cells (**Table S1C-1**
297 **& S1C-2**) were subjected to an over-representation analysis of gene ontology (GO) terms
298 according to a classification by molecular and biological process using MouseMine. The
299 analyses revealed multiple processes such as apoptosis/DNA damage, TP53 transduction
300 signal or cell fate differentiation (**Figure 3I)**. The use of GeneMania® analysis showed the
301 interconnections of genes sorted regulated by Bu specifically in cells transfected by siCtrl
302 (**Supplementary Fig.3B**).
303
304 **TGR5 acts as a major regulator of the effect of Busulfan on TP53 signal pathway**.
305 Analysis using CisTarget software revealed that 62% (106/170) of the genes
306 positively regulated by Bu in siCtrl-transfected cells, with an effect that was counteracted by
307 siTgr5 transfection (**Table S2)**, were associated with TP53 transcription factor as supported
308 by the defined DNA binding site (**Supplementary Fig. 3C).** This was consistent with the
309 known role of TP53 on the apoptotic process even after Bu (Li et al., 2018). Present data
310 showed the impacts of Bu on apoptosis *in vivo* and *in vitro* were moderated in the context of
311 *Tgr5* loss (*Tgr5*$^{-/-}$ mice and siTgr5 transfected cells). Among the genes identified in the TP53
312 network, several have been validated by qPCR approach such as *Perp*, *Phlda3* and *Mmp24*
313 (**Figure 4A**). These data highlight the identification of crosstalk between the TGR5 and TP53
314 signaling pathways, as for all these genes, the effect of Bu was reduced in siTgr5-transfected
315 cells (**Figure 4A**). In agreement with the above data, the western blot analyses showed that
316 protein levels of Phospho-TP53 (P-TP53) and TP53 were increased in response to Bu
317 treatment (24h) in siCtrl-transfected cells. These effects were less pronounced in siTgr5-
318 transfected cells (**Figure 4B**). Current data reveal how TGR5 is involved in the control of
319 germ cell apoptosis in response to chemotherapies and highlight links between TGR5 and
320 TP53 signaling pathways.
321
322
323 **TGR5-GLIS2 pathway acts as a major regulator of spermatogonia homeostasis.**
324 Analysis of genes down-regulated by Bu in siCtrl-transfected cells (**Table S3**), using
325 Cis-Target, showed that 53% (229/431) of these genes were associated with GLIS2
326 transcription factor as defined by the identification of the DNA binding site (**Supplementary**
327 **Fig. 3D**). GLIS2 has previously been shown to be involved in the maintenance of stem cell
328 pluripotency and is also associated with chemosensitivity (Yuan et al., 2019). Interestingly,
329 *Glis2* mRNA was itself down regulated by Bu in cells transfected by siCtrl (**Supplementary**
330 **Fig.3E data from RNAseq**). qPCR analyses on additional experiments confirmed that *Glis2*
331 mRNA accumulation was increased in siTgr5 GC1spg transfected cells compared to siCtrl
332 GC1spg transfected cells (**Figure 4C**). Moreover, qPCR analyses validated the

333 downregulation of *Glis2* expression 6 hours after exposure to Bu in cells transfected with
334 siCtrl and these effects were less pronounced in siTgr5-transfected cells (**Figure 4C**). We
335 then analyzed GLIS2 target genes by qPCR. The impact of TGR5 signaling on the GLIS2
336 pathway was supported by data showing that the accumulations of *Glis2* target genes *Fgfr2*,
337 *Adgrg1* and *Wfdc1* were increased in cells transfected by siTgr5 compared to cells
338 transfected by siCtrl (**Figure 4D**). qPCR analyses showed that the mRNA accumulations of
339 *Fgfr2*, *Izumo4, Adgrg1* and *Wfdc1* were modified by Bu specifically in cells transfected with
340 siCtrl with lower impact of Bu in siTgr5-transfected cells for some of them such as Fgfr2,
341 *Izumo4, Adgrg1* and *Wfdc1* (**Figure 4D**). Note that the levels of these GLIS2 target genes
342 were higher in siTgr5-transfected cells compared to cells transfected by siCtrl in both veh
343 and Bu treated groups (**Figure 4D**).
344 To determine whether GLIS2 could be involved in the sensitivity of germ cells to Bu,
345 GC1spg cells were transfected with a plasmid for the overexpression of GLIS2 in order to
346 counteract the impact of Bu on the decrease in *Glis2* expression and to mimic the increase in
347 Glis2 expression observed in siTgr5-transfected cells compared to siCtrl-transfected cells.
348 Overexpression of GLIS2 (**Figure 4E**) led to a lower impact of Bu at 24 and 48h on the
349 number of adherent cells compared to the control group (**Figure 4F**). The qPCR analyses
350 showed that GLIS2 overexpression reduced the impact of Bu on TP53 target gene, namely
351 *Perp* (**Figure 4G**). In addition, a lower impact of Bu on the accumulation of Phospho-TP53
352 (P-TP53) was observed in cells overexpressing GLIS2 compared to control cells (**Figure**
353 **4H**). GLIS2 overexpression was also associated with a lower rate of apoptosis in response to
354 Bu, as identified by the TUNEL experiments (**Figure 4I**). These data define a crosstalk
355 between GLIS2 and TP53 in response to Bu, which is controlled by TGR5.
356
357 **The Crispr/CAS9 approach validates the roles of TGR5 in the GC1spg cell line**.
358 In order to validate the data obtained using siRNA-based approach, we generated a
359 GC1spg cell line deficient for the Tgr5 gene (GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells), using the Crispr/Cas9
360 technology (**see materials and methods & Supplementary Fig.4A, 4B, 4C & 4D**). GC1spg
361 and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells were exposed to Bu (200µM) for 24 or 48 hours. Bu treatment
362 resulted in a decrease of the number of adherent cells after 24 hours and the impact of Bu
363 was exacerbated in GC1-spg cells after 48hours with a 50% decrease in cell numbers.
364 These effects were less pronounced in the GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ at 24 hours and 48-hours after Bu
365 exposure (**Figure 5A**). These data are fully consistent with what was observed using the
366 siRNA approach.
367 Furthermore, it is interesting to note that in GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells, the data confirmed
368 that the mRNA accumulation of *Gfra1* mRNA was increased in GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ compared to
369 GC1spg (**Figure 5B, left panel**). In addition, the decreased expression of *Gfra1* in response

370 to Bu was less pronounced in GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells compared to GC1spg (**Figure 5B, right**
371 **panel**).
372 Moreover, the data showed that the increase in the rate of Bu-induced apoptosis was
373 counteracted in GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells compared to GC1-spg cells (**Figure 5C**). Consistently,
374 the impact of Bu on P-TP53 and TP53 levels was less pronounced in GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells
375 compared to GC1-spg cells (**Figure 5D**). In addition, mRNA accumulation of the TP53 target
376 gene, namely *Perp* was less modulated by Bu in GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells than in GC1-spg cells
377 (**Figure 5E**). These data using GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells supported the primary role of TGR5 within
378 germ cells to counteract the impact of Bu.
379
380
381 **Activation of TGR5 sensitized cells to busulfan.**
382 Since the absence of TGR5 protects germ cells from the long-term effects of Bu, we
383 decided to analyze the impact of TGR5 activation using its agonist INT-777. GC1-spg cells
384 were pretreated 24 hours with INT-777 and then with Bu for 24 or 48 hours and the data
385 were compared to cells exposed to Bu alone. The results showed that cell counts were lower
386 when GC1spg cells were exposed to INT-777 and Bu compared to exposure to Bu alone 24
387 and 48 hours after exposure to Bu (**Figure 6A**). This additive effect of INT and Bu was not
388 observed in GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells (**Figure 6A**).
389 To explain the lower number of adherent cells in the INT+Bu condition compared to
390 Bu, we wonder whether activation of TGR5 by INT-777 could additively with Bu modified the
391 proliferation/apoptotic balance. In a first step, the rate of cell proliferation was analyzed. No
392 effect of INT+Bu was observed on proliferation as revealed by BrdU incorporation
393 (**Supplementary Fig.5**). Interestingly, at 48 hours after Bu-treatment, a significant higher
394 increase in apoptosis cell rates was observed in GC1spg *Wt* cells treated by both Bu and
395 INT-777 compared to Bu, INT or Veh (**Figure 6B**). Note that no significant effect was
396 observed in the GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ (**Figure 6B**). In that line, additive alterations in mRNA
397 accumulations of the TP53 target genes by INT-777 and Bu compared to Bu alone were
398 observed at 24 hours for *Perp*, *Phld3a* and *Mmp24* (**Figure 6C**). All these effects were
399 mediated by TGR5, as revealed using GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells (**Figure 6A, 6B and 6C**).
400 These data highlight that the activation of TGR5 sensitized cells to chemotherapy
401 exposure, which as expected, is the exact opposite of the effect of TGR5 deficiency.
402 Based on the results obtained with the combination of Bu and INT-777 on GC1spg
403 cells, we speculate that a combination of busulfan and bile acids (endogenous TGR5
404 ligands) could lead to synergistic deleterious effects on germ cell *in vivo*. Wild type males
405 were treated once with Bu at the beginning of the experiment and received a diet
406 supplemented with 0.5% cholic acid (CA) for 8 weeks. Male mice treated with Bu and

407 sacrificed after 4 weeks showed an almost complete recover of PLZF+ cell counts (**Figure**
408 **6D**) consistently with what was reported above (**Figure 2**). In contrast, a decrease of around
409 50% of the number of PLZF+ cells was still observed in mice treated with Bu+CA at 4 weeks
410 after treatments (**Figure 6D**). Consistently, 8 weeks after Bu treatment, the number of
411 seminiferous tubules with positive acetylated-H4 spermatid cells was lower in the Bu+CA
412 treated group than in Bu treated groups (**Figure 6E**). This prolonged germ cell loss in the
413 Bu+CA group was associated, 8 weeks after treatment, with a higher rate of apoptotic cells
414 compared to the Bu-treated group (**Figure 6F**).
415
416 **Discussion.**
417 Regarding the responsiveness to busulfan, and in agreement with other studies (Li et
418 al., 2018), the present work shows that busulfan acts primarily on undifferentiated
419 spermatogonial cells. Busulfan leads to a decrease in the number of undifferentiated germ
420 cells from the first days following treatment. Then, in turn, this effect on undifferentiated germ
421 cells leads to a major impact observed on spermatocytes, then on spermatids and finally on
422 sperm cells and fertility. This confirms that this busulfan-based approach is relevant to study
423 the properties of undifferentiated germ cells.
424 It is interesting to note that the initial effects of busulfan on testicular physiology and in
425 particular on germ cells are almost similar between *Wt* and *Tgr5*$^{-/-}$ males. Indeed, at the dose
426 used. The present data demonstrate that Tgr5 is a key factor for cellular repair and tissue
427 regeneration within testis following injuries. Indeed, differences are observed between
428 genotypes mainly at the time of recovery of germ cell lineage resulting from the differential
429 ability of *Tgr5*$^{-/-}$ undifferentiated germ cells to proliferate and/or differentiate. These results
430 clearly confirmed the major role of TGR5 in the regeneration of spermatogonial cell
431 population following injury as highlighted here through the use of chemodrug.
432 Focusing on undifferentiated spermatogonia, the present results demonstrate that Bu
433 exposure decreased *Gfra1* and Fgfr2 mRNA accumulations and these effects were lowered
434 in a low TGR5 state. Moreover, the negative modulation of Tgr5 induces an increase in *Fgfr2*
435 and *Gfra1* mRNA accumulations. Both Fgfr2 and Gfra1 are defined as critical actors of the
436 self-renewal of spermatogonial stem cells (Garbuzov et al., 2018; Takashima et al., 2015).
437 Moreover, recent data highlight the role of Fgfr2 in the induction of germ cell differentiation
438 (Masaki et al., 2018). All these data support the fact that Tgr5 may play a critical role in the
439 maintenance of the SSC pool as well as in the mechanisms of cell fate and regeneration
440 following injuries as illustrated here using anti-cancer therapy; and may explain in part how
441 the germ cells of *Tgr5*$^{-/-}$ males are able to more rapidly initiate a new wave of
442 spermatogenesis to repopulate the seminiferous tubules and give birth to offspring.
443 We demonstrate here the alterations of apoptotic process as one of main mediators

444 of busulfan's effects on germ cells and for their capacities to regenerate. Analysis of the
445 RNAseq data allowed us to identify two key pathways associated with TGR5, namely GLIS2
446 and TP53. In addition, our data demonstrate the link between GLIS2 and TP53 in germ cell
447 sensitivity to busulfan. To date, very few links have been established between GLIS2 and
448 TP53. It is interesting to note that the absence of GLIS2 stabilizes the accumulation of TP53
449 as well as the post-translational modulation of TP53 (Lu et al., 2016). Our data using genetic
450 tools and pharmacological approaches demonstrate that this GLIS2-TP53 pathway is
451 regulated by TGR5 in the context of busufan exposure. Furthermore, all data presented
452 confirm the primary role of TGR5 in the impact of busulfan *via* the GLIS2-TP53 pathway.
453
454 Recently it has been demonstrated that the nuclear receptor of bile acid, namely
455 FXRα also plays a key role in the homeostasis of undifferentiated germ cells as the mice
456 invalidated for FXRα present an increased number of undifferentiated germ cells throughout
457 postnatal life (Martinot et al., 2017b). This was associated with maintenance of reproductive
458 capacities during aging (Martinot et al., 2017b). As in normal animals, the testicular
459 physiology is normal and spermatogenesis is efficient, we were not able to see differences
460 between *Wt* and *Tgr5*$^{-/-}$ males. However, the use of the busulfan as a classical model of
461 transient germ cell depletion allows identifying critical roles of Tgr5 signaling pathways in
462 germ cells following injuries. These data combined with the present data highlight the key
463 role of bile acid homeostasis in undifferentiated germ cell homeostasis via FXRα and TGR5
464 signaling pathways. However, both receptors seemed to play differential roles as the lack of
465 FXR impacts germ cells in normal conditions (Martinot et al., 2017b), whereas the impact of
466 TGR5 was mainly observed in response to cellular damages as shown here using exposure
467 to chemodrug (this study).
468 This is of major interest as impaired male fertility can result from cellular damage due
469 to various stresses such as metabolic disorders, environmental or drug exposures. In that
470 line, if in the present manuscript we used busulfan as an experimental model to study the
471 process of spermatogenesis, one could think that it could also be taken as a model to study
472 the response to chemodrug per se. Our data represent nice scientific advance for fertility
473 disorders in the context of cancer treatments. It has been well known that anti-cancer
474 treatments can lead to long-term fertility disorders. Among chemotherapies, alkylating agents
475 induce long-term testicular dysfunction and impair fertility (Beaud et al., 2019). But apart from
476 cryopreservation of sperm, which is not always possible, little progress has been made to
477 preserve male fertility following cancer treatments, particularly chemotherapy. From this point
478 of view, the limitation of side effects on quality of life, including the preservation of fertility, is
479 a key issue. It is therefore important to pursue research programs to decipher the molecular
480 mechanisms involved in order to improve cancer treatments while minimizing their long-term

481 side effects, particularly on fertility. This is a public health issue, because with advances in
482 the effectiveness of cancer treatments, patient survival rates have increased (Beaud et al.,
483 2019; Del-Pozo-Lérida et al., 2019), it is estimated that 1 in 530 young adults aged 20 to 40
484 years is a cancer survivor (Ward et al., 2014) ; and this relative number is expected to
485 increase in the coming decades.

486 Recent publications demonstrate that reduction of the richness and/or diversity of
487 intestinal microbiota (IM) in the contextdiet or exposure to anticancer drugs (Busufan),
488 negatively impact testicular physiology leading to reduced sperm production (Zhang et al.,
489 2021). Microbiota is involved in the synthesis of secondary BA, which are endogenous
490 lignads of TGR5. It will have to be explored to the potential involvemeny of TGR5 to better
491 understand how microbiota-induced modulation of BA might impact male fertility (Martinot et
492 al., 2021).

493 Next to this, our data show that co-exposure to Bu and bile acids (endogenous
494 ligands of TGR5) lead to synergic deleterious effects on testicular physiology *in vivo*. These
495 data support the idea that in pathophysiological conditions of cancer-treatment using
496 chemotherapy, this is critical to consider pre-existent hepatotoxicity. Indeed, it could lead to
497 lower efficiency of the treatment to limit the tumor growth (Phelan et al., 2017) and/or to a
498 more permanent effect of the chemotherapy on germ cell capacity to recover (this study).
499 These data must be useful to understand the variability of the long-term impacts of cancer
500 treatments on reproductive capacity among patients.

501 In conclusion, the present work defines the hitherto unidentified roles of the TGR5 bile
502 acid receptor on spermatogonial cell physiology. The early germ cell resurgence in Tgr5-/-
503 males after Busulfan exposure and the prolonged effect of Busulfan when combined with a
504 Tgr5 agonist demonstrate the major involvement of this pathway in controlling germ cell fate.
505 These results identify the key involvement of TGR5-mediated modulation of GLIS2- TP53
506 pathways in the regulation of stem cell renewal and survival gene expression. This work
507 opens new perspectives for the development of therapeutic solutions for fertility disorders
508 targeting TGR5 to promote germ cell lineage regeneration.
509
510
511 **Competing interests.** The authors have no conflict of interest.
512
513 **Grant supports.** The study was funded by Inserm; CNRS; Université Clermont Auvergne;
514 *Ligue contre le cancer* (comité Puy de Dôme); *Fondation ARC pour la recherche contre le*
515 *cancer* (R16142CC). Laura Thirouard and Manon Garcia received support from the
516 *Fondation Recherche Médicale* (FDT202001010780 and R17089CC). Volle's team received

support by the Cancer-Inserm (C20010CS) and by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

Author contributions. All authors agree with this publication.

Perform and design exp T.L and V.DH
Perform experiments T.L, H.H, M.M, G.M, dH.A, D-S.C, RY, S.J-P
Participate to write the paper: T.L., H.H, R.Y, B.C & V.DH
Corresponding Author and Lead Contact: V.DH

Acknowledgments
We thank Sandrine Plantade, Khirredine Ouchen and Philippe Mazuel for their help at the animal facility. We also thank the AniPath plateform from the GReD for histological analysis on mice. « Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the "France Génomique" consortium (ANR-10-INBS-0009) ». We would like to thanks Pr Castillon and Pr Livera for giving us access to Vasa-Cre mice and Pr Schoonjans and Pr Auwerx's for *Tgr5* mouse models. We thank Dr Benoit for his advice on CRispr/CAS9 experiments.

Experimental procedures

Animals

C57Bl/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) mice were acclimated at least 2 weeks before experiments. The *Tgr5*$^{-/-}$ mice used have been previously described(Thomas et al., 2009a). The mice used in this study were maintained in a C57BL/6J background.

To better decipher the role of TGR5 within the germ cell lineage, specific germ cell KO mice were generated using the *Tgr5* floxed mice(Thomas et al., 2009b) and the model driving the expression of the recombinase-CRE under the control of the Vasa-promoter(Gallardo et al., 2007).

Mice were housed in temperature-controlled rooms with 12 hours light/dark cycles. Mice had *ad libitum* access to food and water. The refinement is based on the housing and monitoring of the animals as well as the development of protocols that take into account the animal welfare. This has been achieved by enriching the cages (cardboard tunnel and mouse houses). The mice were housed in social groups with cage sizes that complied with the legislation according to the number of mice12-week-old mice were exposed to busulfan

552 (once, IP, 15mg/kg) and organs were harvested at several time points after from 1 day up to
553 20 weeks after busulfan exposure. The number of animals per group was defined on
554 independent experiments to validate the reproducibility of results.
555 To minimise the confounders, several independent experiments were done and groups of
556 animals were not sacrifice in the same order from one experiment to another. These
557 protocols have already been performed in adult mice where no suffering was reported in the
558 time frame of our experiment. However, we have perform daily monitoring of the animals in
559 the first few days following the busulfan injection. We will monitor food consumption, the
560 possibility of diarrhea, as well as the weight of the mice twice a week. Thereafter and until
561 the end of the experiment, the weight of the mice will be monitored once a week. We have
562 checked for signs of suffering activity disorders or physiological changes such as altered
563 feces, increased weight loss in response to bile acids. The signs observed will be abnormal
564 weight loss or activity disorders (hypoactivity), hunched back, sunken eyes. No case
565 suffering signs were reported.
566 This study was conducted in accordance with current regulations and standards approved by
567 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Animal Care Committee and by the
568 animal care committee (CEMEA Auvergne; protocol CE 07-12 & APAFIS#19626-
569 2020072312102562v3).
570
571 ***Fertility Test***
572 Each male was mated at night with a female C57Bl6J (Charles River) for 10 days. Mating
573 was monitored daily for vaginal plugging to determine if mating had occurred. After 17 days,
574 the mating efficiency was inspected and the number of pups per litter was counted.
575
576 ***Histology***
577 The testes were collected, fixed in 4% PFA and embedded in paraffin, and 5µm-thick
578 sections were prepared and stained with H&E (n= 6–10 animals per group).
579
580 ***In vivo TUNEL Analysis.***
581 TUNEL experiments were performed, as previously described(Baptissart et al., 2014) on
582 5µm of testis fixed in paraformaldehyde 4%. The results are expressed as the relative
583 number of TUNEL positive cells per seminiferous tubules. Vehicle groups of each genotypes
584 have been arbitrarily set at 1.
585
586 ***Immunohistochemistry***
587 5µm sections were mounted on positively charged glass slides (Superfrost plus),
588 deparaffinized, rehydrated, treated for 20 min at 93°–98°C in 0.01 M citric buffer-tween 0.1%

589 (pH 6), rinsed in osmosed water (2 × 5 min), and washed (2 × 5 min) in Phosphate-buffered
590 saline (PBS). Immunohistochemical studies were conducted according to the manufacturer's
591 recommendations. Slides were then counterstained with Hoechst medium (1 mg/mL) and
592 then mounted on PBS/glycerol (50/50). The antibodies used are reported in **Table S4**.
593
594
595 **Cell line approaches.**
596 GC1spg cells were used as previously described(Baptissart et al., 2014). GC1spg
597 Tgr5 knockout cells (GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$) were generated as following:
598 **** Generation of Crispr/CAS9 Tgr5 deficient GC1spg cells***
599 For the generation of the GC1spg Tgr5 knockout cells, using Crispr/CAS9 approach (**see**
600 **Supplementary Fig.5**). Guides were defined based on the mm9 version of the mouse
601 genome and using the website http://crispor.tefor.net/. The sequences used are for guide-1:
602 GGCTGCGCAAGTGGCGGTCC and for guide-2: GCCGGAACCATCAGGGCTAC. Then, the
603 guides were introduced on PX458: pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene Plasmid
604 #48138) and PX459: pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene Plasmid #62988).
605 pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 48139;
606 http://n2t.net/addgene:48139 ; RRID:Addgene_48139)(Ran et al., 2013). Guides were cloned
607 on vectors at the BbsI restriction site.
608 GC1spg cells were plated on 6-well plates and transfected, using Jet PEI (Ozyme) with 1 µg
609 of guide 1 in PX458 (expressing pfg) and 2 µg of guide 2 in PX459. 24 hours after
610 transfection, using GFP expression, GC1spg cells were sorted by FACS (BD FACSMelody™
611 Cell Sorter from BD Biosciences) and plated as individual cell in a 96-well plate in GC1spg
612 conditioned medium (DMEM and 1% SVF). The clones were then validated by sequencing
613 and genotyping. Primer sequences for PCR see **Table S5**.
614
615 For non-transfected GC1spg or GC1spg^{KoTgr5} cells, cells were plated in 6 well plates. 24
616 hours after plating, cells were treated for with vehicle (DMSO, 1/1,000), INT777 (50 µM;
617 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or busulfan 200mM. Then, cells were harvested at different
618 time points later, and messenger RNA (mRNA) or protein extractions were performed.
619
620 **** Transient Transfection.***
621 ***# For siRNA experiments***. GC1spg cells were transfected with small
622 interfering RNA (siRNA) using interferin (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) in
623 six-well plates (50 000 cells per well). The siRNA directed against *Tgr5,* as well as
624 control siRNA, siCtrl (si Gfp), were transfected at 5 ng per well.
625 **# For GLIS2 over-expression**. GC1spg cells were transfected with Jet-PEI

626 RNA (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) in six-well plates (50,000 cells per
627 well). The plasmids vector of GLIS2 (Addgene) or empty vector were transfected at
628 200 ng per well.
629
630 **** Treatments.***
631 # For Bu alone experiments: 24 hours after the transfection cells were starved
632 for 12 hours and treated for 6 to 24 hours later with either DMSO or busulfan (200mM).
633 # For INT+Bu experiments: cells were pre-treated with vehicle (DMSO,
634 1/1000), INT-777 (50µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 24 hours later with either DMSO
635 (1/1000) or busulfan (200mM).
636 For each kind of experiments, cells were harvested at 6h, 12h, 24h or 48h later, and
637 immunocytochemistry mRNA or protein extractions were performed.
638 **** BrdU incorporation.*** To define proliferation rate, cells were pre-treated with INT-
639 777 or DMSO for 24hours and cells were exposed to DMSO or Bu for 24 hours. Cells were
640 then incubated with BrdU (10µM) for the one last hour. Then cells were washed with PBS1X
641 and then fixed with methanol. The detection of BrdU was performed using primary antibody
642 anti-Bromodeoxyuridine (11170376001, Merck) revealed with specific Alexa488-coupled
643 secondary antibody.
644 **** TUNEL.*** For TUNEL experiments, cells were fixed with PFA 1% on 6 well plates and
645 then the experiments were performed as described above in the immunohistochemistry
646 section. The revelation of the staining was visualized by immunofluorescence.
647
648 **Real-time RT-PCR**
649 RNA from GC1spg samples was isolated using RNAzol. cDNA was synthesized from total
650 RNA with the MMLV and random hexamer primers (Promega, Charbonnières-les-Bains,
651 France). The real-time PCR measurement of individual cDNA was performed using SYBR
652 green dye (Master mix Plus for SYBR Assay, *Takara Bio*) to measure duplex DNA formation
653 with the Eppendorf-Realplex system. For each experiment, standard curves were generated
654 with pools of cDNA from cells with different genotypes and/or treatments. The results were
655 analyzed using the ΔΔct method. Primers sequences are reported in **Supplementary Table**
656 **S5**.
657
658 ***Western Blotting***
659 GC1spg proteins were extracted from tissues using RIPA lysis buffer completed with
660 protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). Antibodies were suspended in Tris-
661 buffered saline, 0.1% Tween, and 5% BSA. The list of Abs used is given in the Supporting
662 Information (**Table S6**).

663

664 ***RNA-Seq***

665 The experiment was performed on *GC1spg cells* transfected with siRNA-*Ctrl* or siRNA-*Tgr5*
666 and treated with DMSO or busulfan. Starting from RNA, all preparations were made using
667 the IGBMC platform (Illkirch). The mRNA-seq libraries were sequenced (1 × 50 b).
668 Reads were mapped onto the mm10 assembly of the mouse genome using Hisat2 v2.1.0
669 (Kim et al., 2019) and the BoWtie2 v2.1.0 aligner(Langmead and Salzberg, 2012). Only
670 uniquely aligned reads were retained for further analysis.
671 Quantification of gene expression was performed using HTSeq v0.5.4p3(Anders et al., 2015)
672 using gene annotations from Ensembl release 77.
673 Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders and
674 Huber(Anders and Huber, 2010). Comparison between groups was performed using the
675 method proposed previously define(Love et al., 2014) implemented in the DESeq2
676 Bioconductor library (DESeq2 v1.0.19). Resulting p values were adjusted for multiple testing
677 using the method of Benjamini and Hochberg(Benjamini and Hochberg, 1995).
678 We generated lists of genes (FC>1.25 and p<0.01) that were differentially expressed after Bu
679 exposure in cells transfected with siCtrl or with siTgr5.
680 The accession number for the RNA-seq data reported in this paper is **GSE164734**.
681

682 ***Statistical Analyses***

683 Number and type of replicates (e.g., technical replicates, independent experiment, number of
684 mice, and number of independent litters) are reported in the figure legends. Error bars
685 represent SEM. Differences between groups were determined by ANOVA or two-way
686 ANOVA. Multiple comparisons were made with by Dunnett or Holm-Sidak's test respectively
687 for ANOVA1 and ANOVA2. All numerical data are represented as mean ± SEM. Significant
688 difference was set at $P < 0.05$.
689
690
691 **Data availability**
692
693 Data are available from corresponding author.
694
695
696
697
698
699

700 **References.**

701 Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence
702 count data. Genome Biol. *11*, R106.

703 Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work
704 with high-throughput sequencing data. Bioinforma. Oxf. Engl. *31*, 166–169.

705 Baptissart, M., Vega, A., Martinot, E., Pommier, A.J., Houten, S.M., Marceau, G.,
706 Haze, A. de, Baron, S., Schoonjans, K., Lobaccaro, J.-M.A., et al. (2014). Bile acids
707 alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways
708 in mice. Hepatol. Baltim. Md *60*, 1054–1065.

709 Baptissart, M., Sèdes, L., Holota, H., Thirouard, L., Martinot, E., de Haze, A.,
710 Rouaisnel, B., Caira, F., Beaudoin, C., and Volle, D.H. (2018). Multigenerational
711 impacts of bile exposure are mediated by TGR5 signaling pathways. Sci. Rep. *8*,
712 16875.

713 Beaud, H., Tremblay, A.R., Chan, P.T.K., and Delbes, G. (2019). Sperm DNA
714 Damage in Cancer Patients. Adv. Exp. Med. Biol. *1166*, 189–203.

715 Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A
716 Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B
717 Methodol. *57*, 289–300.

718 Del-Pozo-Lérida, S., Salvador, C., Martínez-Soler, F., Tortosa, A., Perucho, M., and
719 Giménez-Bonafé, P. (2019). Preservation of fertility in patients with cancer (Review).
720 Oncol. Rep. *41*, 2607–2614.

721 Gallardo, T., Shirley, L., John, G.B., and Castrillon, D.H. (2007). Generation of a
722 germ cell-specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre. Genes. N. Y. N 2000 *45*,
723 413–417.

724 Garbuzov, A., Pech, M.F., Hasegawa, K., Sukhwani, M., Zhang, R.J., Orwig, K.E.,
725 and Artandi, S.E. (2018). Purification of GFRα1+ and GFRα1- Spermatogonial Stem
726 Cells Reveals a Niche-Dependent Mechanism for Fate Determination. Stem Cell
727 Rep. *10*, 553–567.

728 Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S.L. (2019). Graph-based
729 genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nat.
730 Biotechnol. *37*, 907–915.

731 Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2.
732 Nat. Methods *9*, 357–359.

733 Li, B., He, X., Zhuang, M., Niu, B., Wu, C., Mu, H., Tang, F., Cui, Y., Liu, W., Zhao,
734 B., et al. (2018). Melatonin Ameliorates Busulfan-Induced Spermatogonial Stem Cell
735 Oxidative Apoptosis in Mouse Testes. Antioxid. Redox Signal. *28*, 385–400.

736 Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change
737 and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. *15*, 550.

738 Lu, D., Rauhauser, A., Li, B., Ren, C., McEnery, K., Zhu, J., Chaki, M., Vadnagara,
739 K., Elhadi, S., Jetten, A.M., et al. (2016). Loss of Glis2/NPHP7 causes kidney

740 epithelial cell senescence and suppresses cyst growth in the Kif3a mouse model of
741 cystic kidney disease. Kidney Int. *89*, 1307–1323.

742 Martinot, E., Sèdes, L., Baptissart, M., Lobaccaro, J.-M., Caira, F., Beaudoin, C., and
743 Volle, D.H. (2017a). Bile acids and their receptors. Mol. Aspects Med.

744 Martinot, E., Sèdes, L., Baptissart, M., Holota, H., Rouaisnel, B., Damon-
745 Soubeyrand, C., De Haze, A., Saru, J.-P., Thibault-Carpentier, C., Keime, C., et al.
746 (2017b). The Bile Acid Nuclear Receptor FXRα Is a Critical Regulator of Mouse
747 Germ Cell Fate. Stem Cell Rep. *9*, 315–328.

748 Martinot, E., Baptissart, M., Véga, A., Sèdes, L., Rouaisnel, B., Vaz, F., Saru, J.-P.,
749 de Haze, A., Baron, S., Caira, F., et al. (2017c). Bile acid homeostasis controls CAR
750 signaling pathways in mouse testis through FXRalpha. Sci. Rep. *7*, 42182.

751 Martinot, E., Thirouard, L., Holota, H., Monrose, M., Garcia, M., Beaudoin, C., and
752 Volle, D.H. (2021). Intestinal microbiota defines the GUT-TESTIS axis. Gut.

753 Masaki, K., Sakai, M., Kuroki, S., Jo, J.-I., Hoshina, K., Fujimori, Y., Oka, K., Amano,
754 T., Yamanaka, T., Tachibana, M., et al. (2018). FGF2 Has Distinct Molecular
755 Functions from GDNF in the Mouse Germline Niche. Stem Cell Rep. *10*, 1782–1792.

756 Phelan, J.P., Reen, F.J., Caparros-Martin, J.A., O'Connor, R., and O'Gara, F. (2017).
757 Rethinking the bile acid/gut microbiome axis in cancer. Oncotarget *8*, 115736–
758 115747.

759 Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013).
760 Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat. Protoc. *8*, 2281–2308.

761 Sedes, L., Martinot, E., Baptissart, M., Baron, S., Caira, F., Beaudoin, C., and Volle,
762 H., David (2017). Bile acids and male fertility: From mouse to human? Mol. Aspects
763 Med. *56*, 101–109.

764 Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Morimoto, H., Inoue, K.,
765 Ogonuki, N., Jijiwa, M., Takahashi, M., Ogura, A., and Shinohara, T. (2015).
766 Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse
767 spermatogonial stem cell self-renewal. Stem Cell Rep. *4*, 489–502.

768 Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A.,
769 Yamamoto, H., Mataki, C., Pruzanski, M., et al. (2009a). TGR5-mediated bile acid
770 sensing controls glucose homeostasis. Cell Metab. *10*, 167–177.

771 Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A.,
772 Yamamoto, H., Mataki, C., Pruzanski, M., et al. (2009b). TGR5-mediated bile acid
773 sensing controls glucose homeostasis. Cell Metab. *10*, 167–177.

774 Ward, E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B., and Jemal, A. (2014). Childhood and
775 adolescent cancer statistics, 2014. CA. Cancer J. Clin. *64*, 83–103.

776 Yuan, J., Tan, L., Yin, Z., Tao, K., Wang, G., Shi, W., and Gao, J. (2019). GLIS2
777 redundancy causes chemoresistance and poor prognosis of gastric cancer based on
778 co-expression network analysis. Oncol. Rep. *41*, 191–201.

Zhang, P., Feng, Y., Li, L., Ge, W., Yu, S., Hao, Y., Shen, W., Han, X., Ma, D., Yin, S., et al. (2021). Improvement in sperm quality and spermatogenesis following faecal microbiota transplantation from alginate oligosaccharide dosed mice. Gut *70*, 222–225.

Zohni, K., Zhang, X., Tan, S.L., Chan, P., and Nagano, M.C. (2012). The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *27*, 44–53.

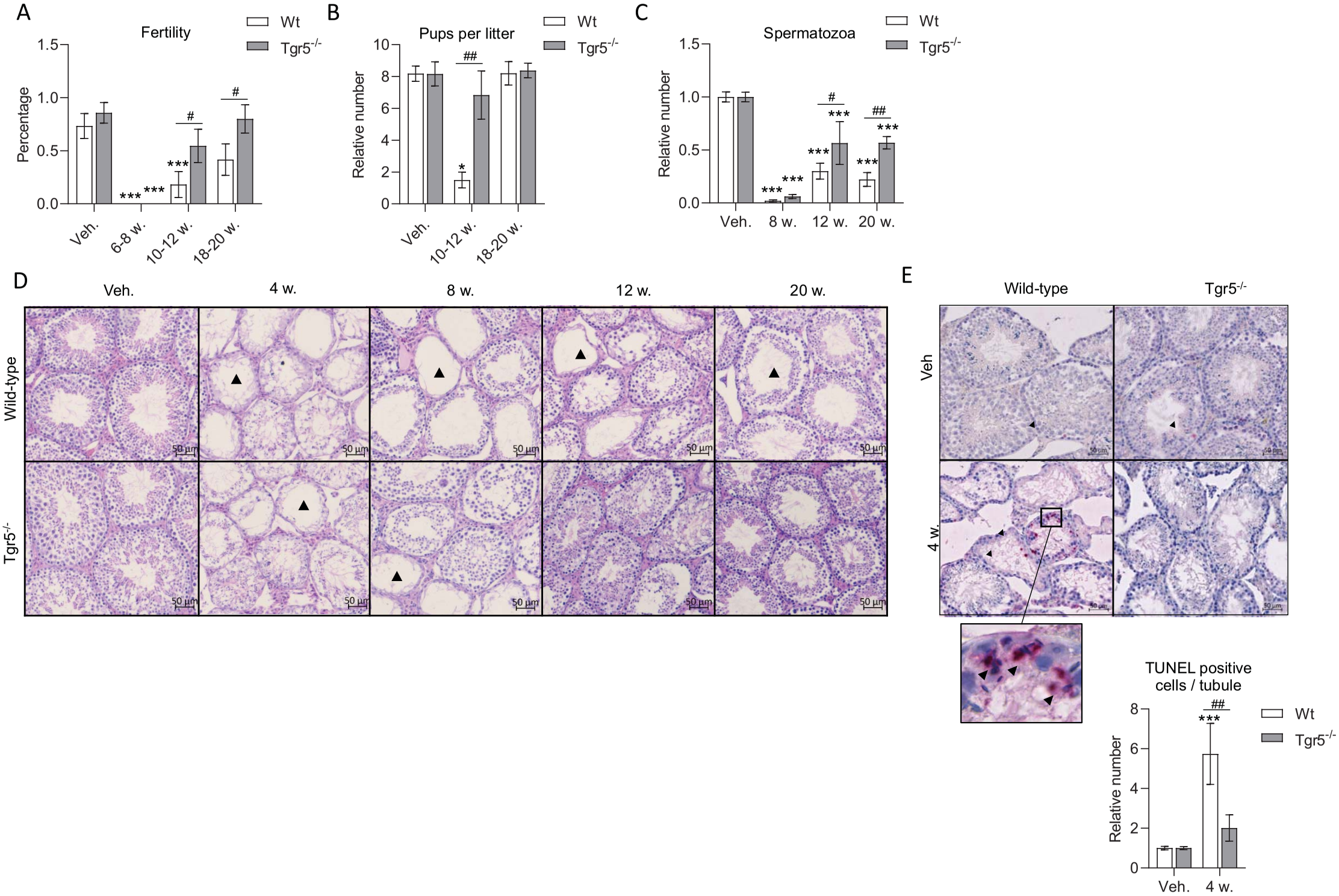

A
Fertility
Wt
Tgr5-/-
Percentage
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
***
#
#
Veh.
6-8 w.
10-12 w.
18-20 w.
B
Pups per litter
Wt
Tgr5-/-
Relative number
10
8
6
4
2
0
##
*
Veh.
10-12 w.
18-20 w.
C
Spermatozoa
Wt
Tgr5-/-
Relative number
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
***
***
#
***
##
***
Veh.
8 w.
12 w.
20 w.
D
Veh.
4 w.
8 w.
12 w.
20 w.
Wild-type
Tgr5-/-
50 µm
E
Wild-type
Tgr5-/-
Veh
4 w.
TUNEL positive
cells / tubule
Relative number
8
6
4
2
0
##
***
Wt
Tgr5-/-
Veh.
4 w.

Figure 1

789 **Figure-1.**

790 **(A)** Percentage of fertile *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males 6-8, 10-12 or 18-20 weeks after busulfan or
791 vehicle treatments.

792 (**B)** Number of pups per litter obtained from fertile *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males 10-12 or 18-20 weeks
793 after busulfan or vehicle treatments.

794 **(C)** Sperm count in the epididymis head of *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males 8, 12 and 20 weeks after
795 busulfan or vehicle treatments.

796 **(D)** Representative micrographs of hematoxylin/eosin-stained testes of *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males
797 treated with the vehicle or 4, 8, 12 and 20 weeks after busulfan treatment. The arrowhead
798 indicates tubules with germ cell loss.

799 **(E)** (Top) Representative micrograph of testis of vehicle or Bu treated Wt or *Tgr5*$^{-/-}$ males
800 stained for TUNEL. (Bottom) Quantification of the relative number of TUNEL positive cells
801 per seminiferous tubules of *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males treated with the vehicle or busulfan (4 weeks
802 after treatment).

803 In all panels, n=12-40 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the
804 means ± SEM. Statistical analysis: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ *vs* respective vehicle
805 group for each genotypes. #, $p<0.05$; ##; $p<0.01$; ###, $p<0.001$ *between genotypes exposed*
806 *to same treatments*. Veh: vehicle and Bu: Busulfan.

807

808

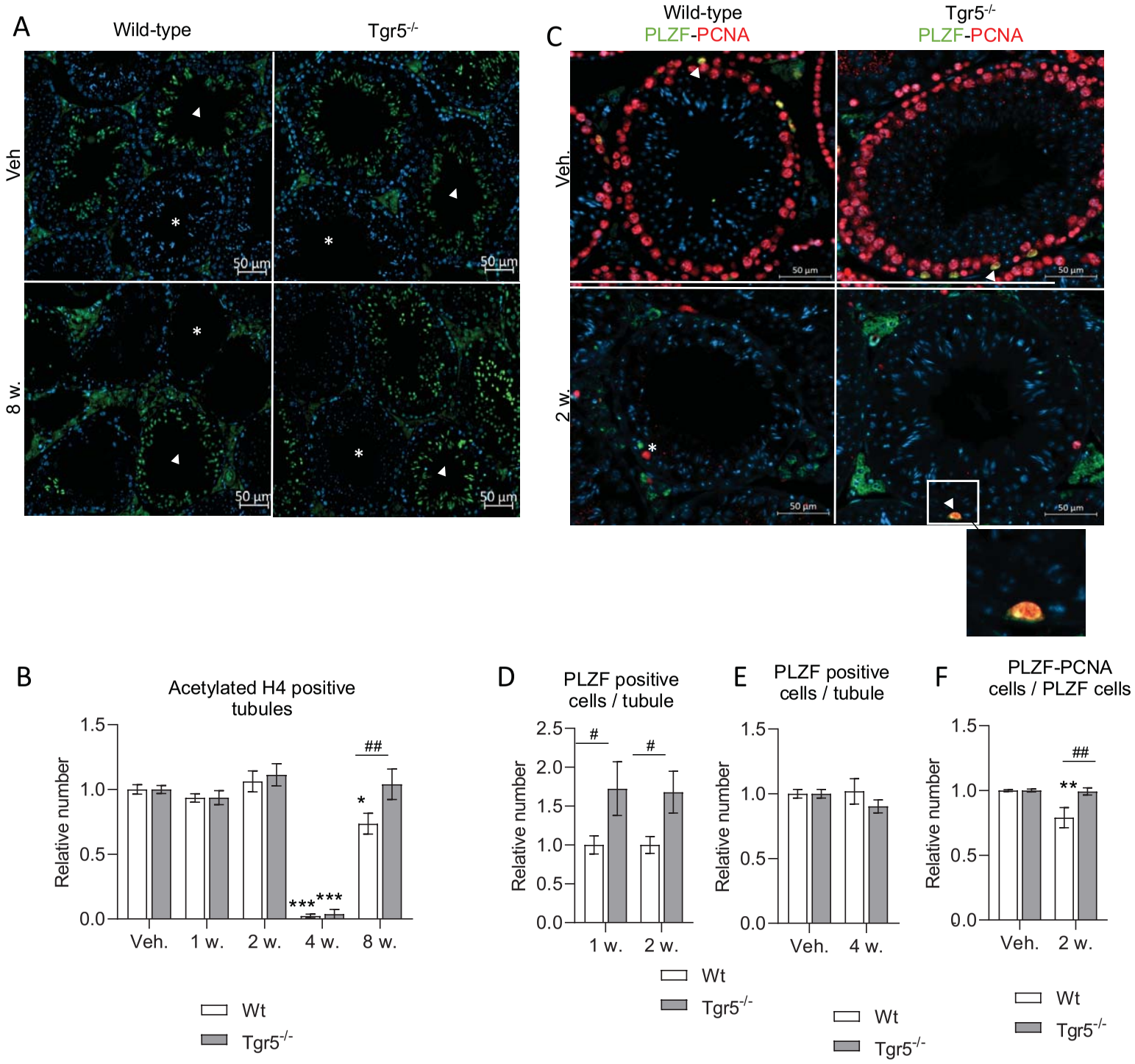

A
Wild-type
Tgr5-/-
Veh
8 w.
50 µm
C
Wild-type
PLZF-PCNA
Tgr5-/-
PLZF-PCNA
Veh.
2 w.
B
Acetylated H4 positive tubules
Relative number
Veh.
1 w.
2 w.
4 w.
8 w.
Wt
Tgr5-/-
D
PLZF positive cells / tubule
1 w.
2 w.
E
PLZF positive cells / tubule
Veh.
4 w.
F
PLZF-PCNA cells / PLZF cells
Veh.
2 w.

Figure 2

809 **Figure-2.**

810 **(A)** Representative micrograph of vehicle or Bu treated Wt or *Tgr5*$^{-/-}$ testis stained for
811 acetylated histone H4 (acetylated H4).

812 **(B)** Quantification of the relative number of acetylated H4 positive seminiferous tubules in
813 testis of *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males treated with the vehicle or busulfan (1, 2, 4 and 8 weeks after
814 treatment). The arrowhead indicates acetylated H4 positive tubules and the star indicates
815 acetylated H4 negative tubules.

816 **(C)** Representative micrograph of vehicle or Bu treated Wt or *Tgr5*$^{-/-}$ testis stained for PLZF
817 green) and PCNA (red). The arrowhead indicates acetylated PLZF-PCNA positive cells and
818 the star indicates PCNA negative and PLZF positive cells.

819 **(D)** Quantification of the relative number of PLZF positive cells per seminiferous tubules in
820 *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ testis treated with busulfan (1 week and 2 weeks after treatment). The mean
821 number of PLZF+ cells observed in *Wt* males treated with Bu was arbitrarily set at 1 for
822 comparison with the number of PLZF+ cells observed one and two weeks after treatment.

823 **(E)** Quantification of the relative number of PLZF positive cells per seminiferous tubules in *Wt*
824 or *Tgr5*$^{-/-}$ males treated with the vehicle or busulfan (4 weeks weeks after treatment).

825 **(F)** Relative quantification of the relative number of double stained PLZF-PCNA cells per
826 seminiferous tubules in *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males treated with the vehicle or busulfan (2 weeks after
827 treatment).

828 In all panels, n=11-23 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the
829 means ± SEM. Statistical analysis: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ *vs* respective vehicle
830 group for each genotype. #, $p<0.05$; ##, $p<0.01$; ###, $p<0.001$ *between genotypes exposed*
831 *to same treatments*. Veh: vehicle and Bu: Busulfan.

832

833

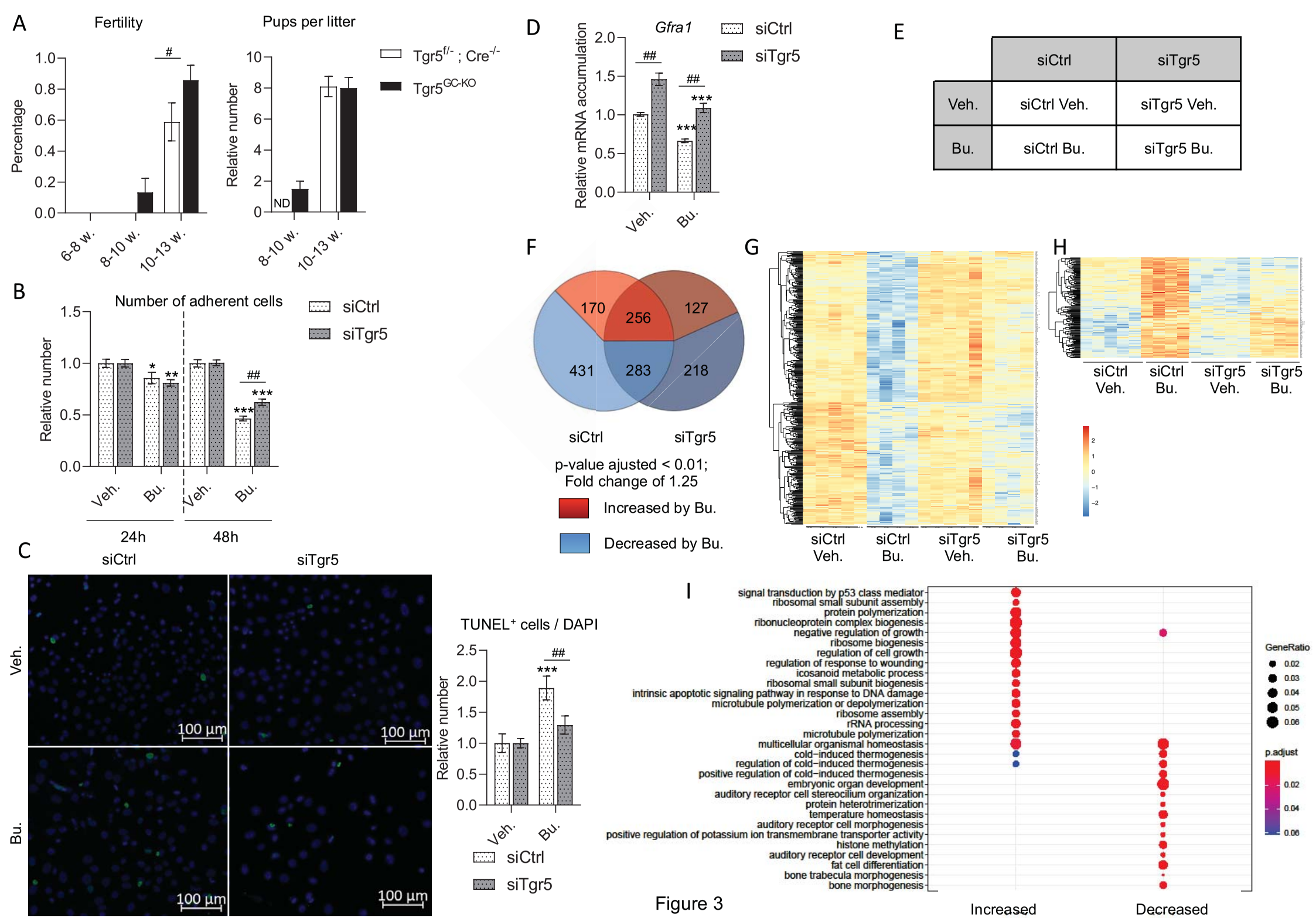

A
Fertility
Pups per litter
Percentage
Relative number
ND
#
6-8 w.
8-10 w.
10-13 w.
Tgr5f/- ; Cre-/-
Tgr5GC-KO
B
Number of adherent cells
siCtrl
siTgr5
Relative number
Veh.
Bu.
24h
48h
C
siCtrl
siTgr5
Veh.
Bu.
100 µm
TUNEL+ cells / DAPI
Relative number
D
Gfra1
Relative mRNA accumulation
E
siCtrl
siTgr5
Veh.
siCtrl Veh.
siTgr5 Veh.
Bu.
siCtrl Bu.
siTgr5 Bu.
F
170
256
127
431
283
218
p-value ajusted < 0.01;
Fold change of 1.25
Increased by Bu.
Decreased by Bu.
G
H
I
signal transduction by p53 class mediator
ribosomal small subunit assembly
protein polymerization
ribonucleoprotein complex biogenesis
negative regulation of growth
ribosome biogenesis
regulation of cell growth
regulation of response to wounding
icosanoid metabolic process
ribosomal small subunit biogenesis
intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage
microtubule polymerization or depolymerization
ribosome assembly
rRNA processing
microtubule polymerization
multicellular organismal homeostasis
cold-induced thermogenesis
regulation of cold-induced thermogenesis
positive regulation of cold-induced thermogenesis
embryonic organ development
auditory receptor cell stereocilium organization
protein heterotrimerization
temperature homeostasis
auditory receptor cell morphogenesis
positive regulation of potassium ion transmembrane transporter activity
histone methylation
auditory receptor cell development
fat cell differentiation
bone trabecula morphogenesis
bone morphogenesis
Increased
Decreased
GeneRatio
p.adjust

Figure 3

834 **Figure 3.**

835 **(A)** (Left panel) Percentage of fertile *Tgr5*$^{f/-}$ *; Cre*$^{-/-}$ and *Tgr5*$^{GC-KO}$ males 6-8, 8-10 and 10-13
836 weeks after vehicle or busulfan treatment following breeding with C57Bl6J females for 10
837 days. (Right panel) Number of pups per litter obtained in breeding with C57Bl6J females with
838 *Tgr5*$^{f/-}$ *; Cre*$^{-/-}$ or *Tgr5*$^{GC-KO}$ males 8-10 and 10-13 weeks after busulfan treatment. ND: Not
839 determined as *Tgr5*$^{f/-}$ *; Cre*$^{-/-}$ *were sterile and did not give progeny.*

840 **(B)** Number of adherent cells after 24 or 48 hours of treatment with vehicle or Bu in siCtrl and
841 siTgr5 GC1spg transfected cells.

842 **(C)** (Left) Representative micrograph of GC1spg cells transfected with siCtrl or siTgr5 and
843 treated with vehicle or Bu for 24 hours and stained for TUNEL. (Right) Quantification of the
844 relative number of TUNEL positive GC1spg cells transfected with siCtrl and siTgr5 and
845 vehicle or Bu treated for 24 hours.

846 In a to c panels, n=5-15 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the
847 means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 *vs* respective vehicle
848 group for each genotypes. #, p<0.05; ##, p<0.01; ###, p<0.001 *between genotypes exposed*
849 *to same treatments*. Veh: vehicle and Bu: Busulfan.

850 **(D)** Relative *Gfra1* mRNA accumulation normalized to β-actin on GC1spg cells transfected
851 with siCtrl or siTgr5 and treated 24 hours with vehicle or with 200μM of Bu.

852 **(E)** Representation of the RNAseq groups: GC1spg cells transfected with siCtrl or siRNA
853 directed against Tgr5 (siTgr5) and treated 24 hours with vehicle or with 200μM of Bu.

854 **(F)** Venn diagram for differentially expressed genes in GC1spg cells transfected with siCtrl or
855 siTgr5 and treated 24 hours with vehicle or with 200μM of Bu.

856 **(G)** Heatmap of differentially dowregulated genes following 24 hours exposure to Bu
857 specifically in GC1spg cells transfected with siCtrl based on Table S1c-1.

858 **(H)** Heatmap of differentially increased genes following 24 hours exposure to Bu specifically
859 in GC1spg cells transfected with siCtrl based on Table S1c2.

860 **(I)** Gene ontology analysis based on the list of differentially expressed genes specifically in
861 GC1spg cells transfected with siCtrl following Bu exposure compared to siTgr5-transfected
862 cells treated with Bu. Based on gene lists Table S1c1 and TableS1c2.

863 In panel d, n=25-27 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the means
864 ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 *vs* respective vehicle group for
865 each genotype. #, p<0.05; ##, p<0.01; ###, p<0.001 *between genotypes exposed to same*
866 *treatments.* Veh: vehicle and Bu: Busulfan.

867

868

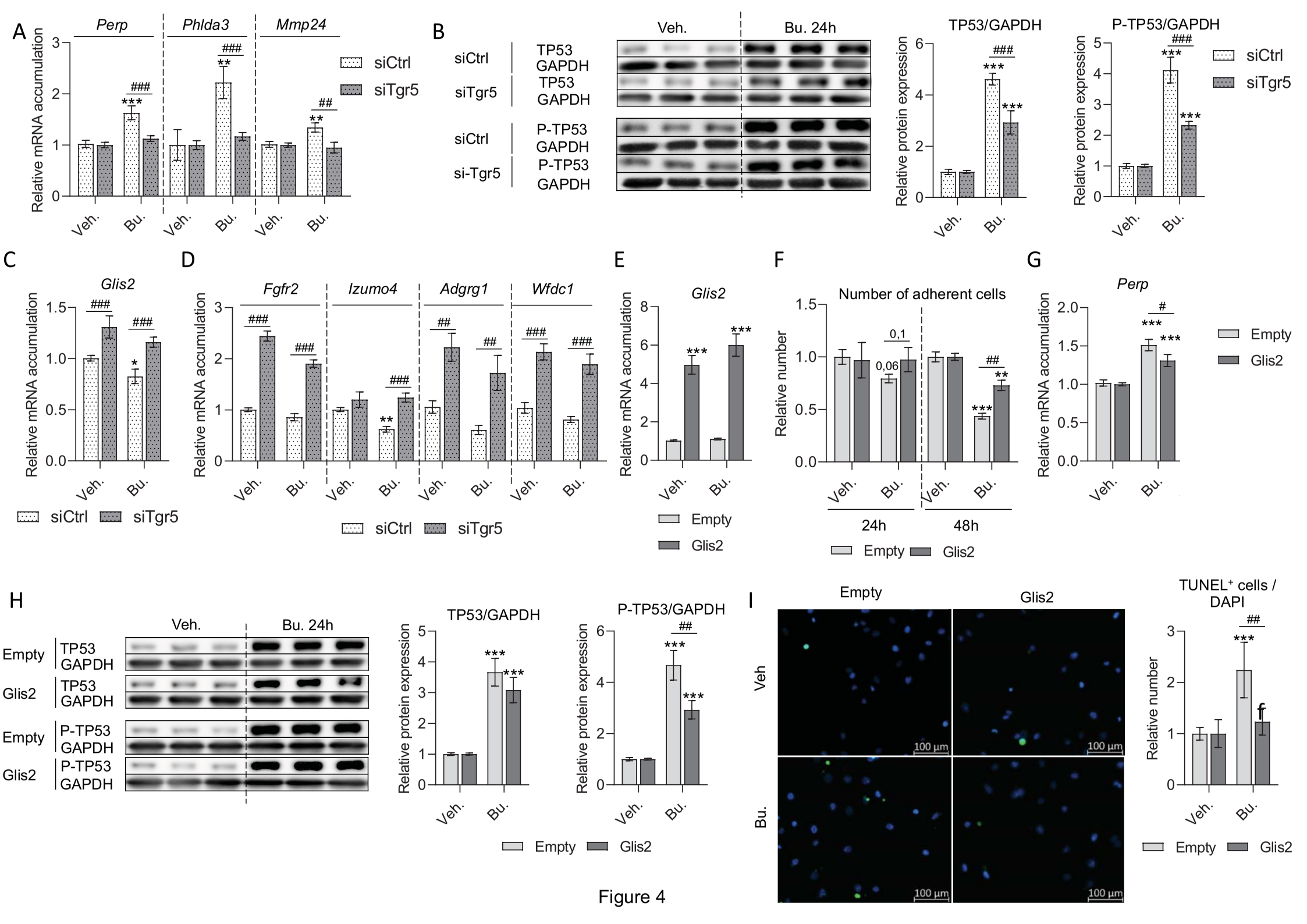

A
Perp
Phlda3
Mmp24
Relative mRNA accumulation
siCtrl
siTgr5
Veh.
Bu.
B
Veh.
Bu. 24h
siCtrl
siTgr5
TP53
GAPDH
P-TP53
si-Tgr5
TP53/GAPDH
P-TP53/GAPDH
Relative protein expression
C
Glis2
D
Fgfr2
Izumo4
Adgrg1
Wfdc1
E
Empty
Glis2
F
Number of adherent cells
Relative number
24h
48h
G
Perp
H
I
Empty
Glis2
Veh
Bu.
100 µm
TUNEL⁺ cells / DAPI

Figure 4

869 **Figure 4.**

870 **(A)** *Perp*, *Phlda3* and *Mmp24* mRNA accumulations normalized to β-actin on GC1spg cells
871 transfected with siCtrl or siTgr5 and treated 24 hours with vehicle or with 200μM of Bu.

872 **(B)** Representative western blots of GAPDH, TP53 and Phospho-TP53 (P-TP53), and
873 quantification of ratios in GC1spg cells transfected with siCtrl and siTgr5 and treated with
874 vehicle or Bu for 24 hours.

875 **(C)** *Glis2* mRNA accumulation normalized to β-actin on GC1spg cells transfected with siCtrl
876 or siTgr5 and treated 6h with vehicle or with 200μM of Bu.

877 **(D)** *Fgfr2*, *Izumo4* and *Wfdc1* mRNA accumulations normalized to β-actin on GC1spg cells
878 transfected with siCtrl or siTgr5 and treated 12 hours with vehicle or with 200μM of Bu.

879 **(E)** *Glis2* mRNA accumulation normalized to β-actin on GC1spg cells treated with vehicle or
880 Bu (24h) in cells transfected with an empty vector or a vector for overexpression of GLIS2.

881 **(F)** Number of adherent cells transfected with an empty vector or a vector for overexpression
882 of GLIS2 and treated with vehicle or Bu for 24 or 48 hours.

883 **(G)** *Perp* mRNA accumulation normalized to β-actin in GC1spg cells transfected with an
884 empty vector or a vector for overexpression of GLIS2 and treated with vehicle or Bu for 24
885 hours.

886 **(H)** Representative western blots of GAPDH, TP53 and Phospho-TP53 (P-TP53), and
887 quantification of ratios in GC1spg cells transfected with an empty vector or a vector for
888 overexpression of GLIS2 and treated with vehicle or Bu for 24 hours.

889 **(I)** (Left) Representative micrograph of GC1spg cells transfected with an empty vector or a
890 vector for overexpression of GLIS2 and treated with vehicle or Bu for 24 hours and stained
891 for TUNEL. (Right) Quantification of the relative number of TUNEL positive GC1spg cells
892 transfected with an empty vector or a vector for overexpression of GLIS2 and treated with
893 vehicle or Bu for 24 hours.

894 In all panels, n=5-26 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the means
895 ± SEM. Statistical analysis: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ *vs* respective vehicle group for
896 each genotype. #, $p<0.05$; ##, $p<0.01$; ###, $p<0.001$ *between genotypes exposed to same*
897 *treatments.* Veh: vehicle and Bu: Busulfan.

898

899

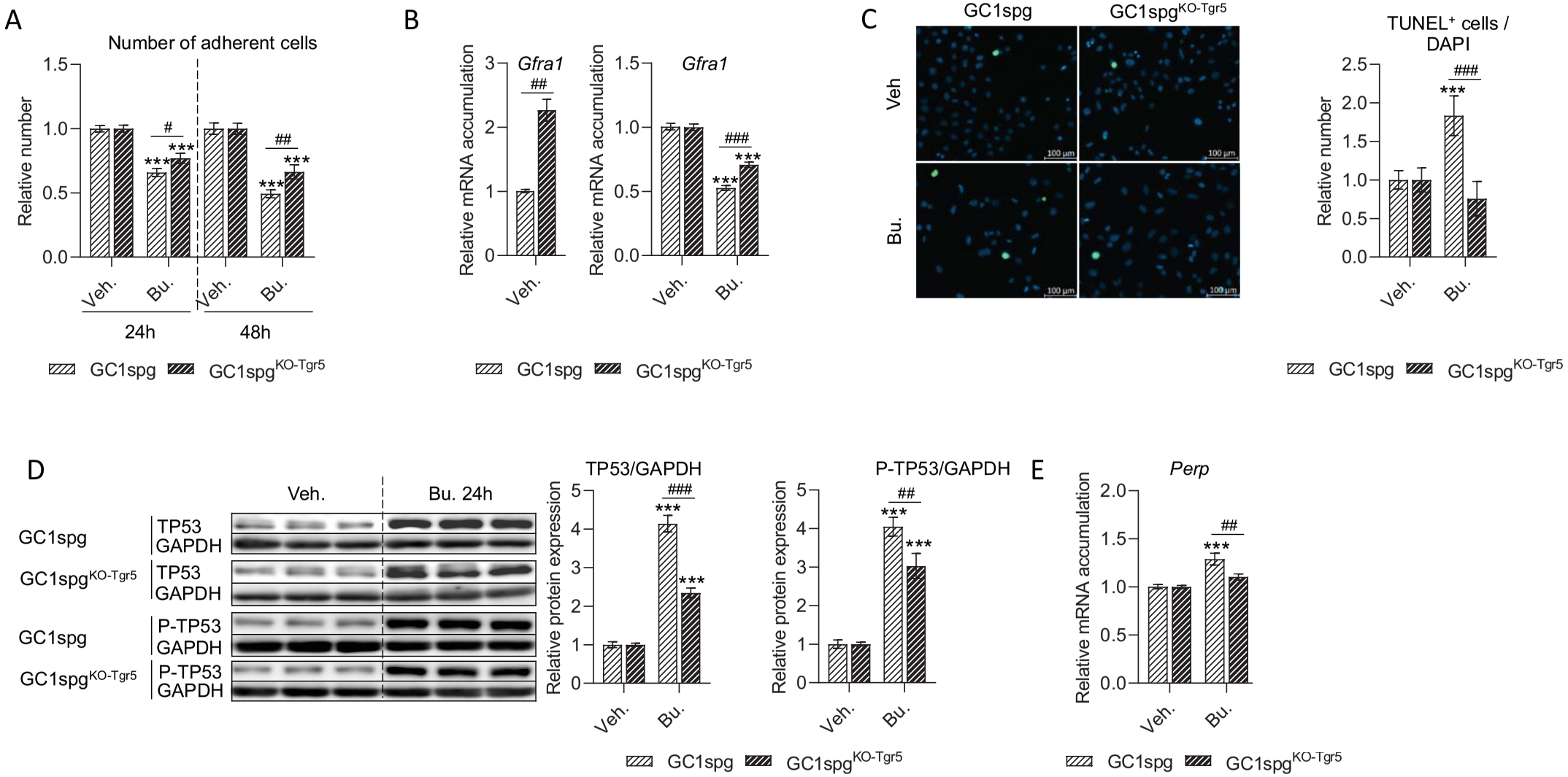

A
Number of adherent cells
Relative number
Veh.
Bu.
24h
48h
GC1spg
GC1spgKO-Tgr5
B
Gfra1
Relative mRNA accumulation
C
GC1spg
GC1spgKO-Tgr5
Veh
Bu.
TUNEL+ cells / DAPI
D
Veh.
Bu. 24h
TP53
GAPDH
P-TP53
TP53/GAPDH
P-TP53/GAPDH
Relative protein expression
E
Perp

Figure 5

900 **Figure 5.**

901 **(A)** Number of adherent GC1spg and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells exposed to veh. or Bu 200μM for
902 24 or 48 hours.

903 **(B)** (Left) *Gfra1* mRNA accumulation normalized to β-actin in GC1spg and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$
904 cells; GC1spg were arbitrarily set at 1. (Right) *Gfra1* mRNA accumulation normalized to β-
905 actin in GC1spg and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells were exposed to vehicle or Bu 200μM for 24 hours.
906 Vehicle groups of each genotype were arbitrarily set at 1.

907 **(C)** (Left) Representative micrograph in GC1spg and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$cells exposed to Bu
908 200μM for 24 hours and stained for TUNEL. (Right) Quantification of the relative number of
909 TUNEL positive GC1spg cells and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells exposed to vehicle or Bu 200μM for 24
910 hours.

911 **(D)** Representative western blots of GAPDH, TP53 and Phospho-TP53 (P-TP53), and
912 quantification of ratios in GC1spg cells and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells treated with vehicle or Bu for
913 24 hours.

914 **(E)** *Perp* mRNA accumulation normalized to β-actin in GC1spg cells and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells
915 treated with vehicle or with 200μM of Bu for 24 hours.

916 In all panels, n=6-18 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the means
917 ± SEM. Statistical analysis: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$ *vs* respective vehicle group for
918 each genotype. #, $p<0.05$; ##, $p<0.01$; ###, $p<0.001$ *between genotypes exposed to same*
919 *treatments.* Veh: vehicle and Bu: Busulfan.

920

921

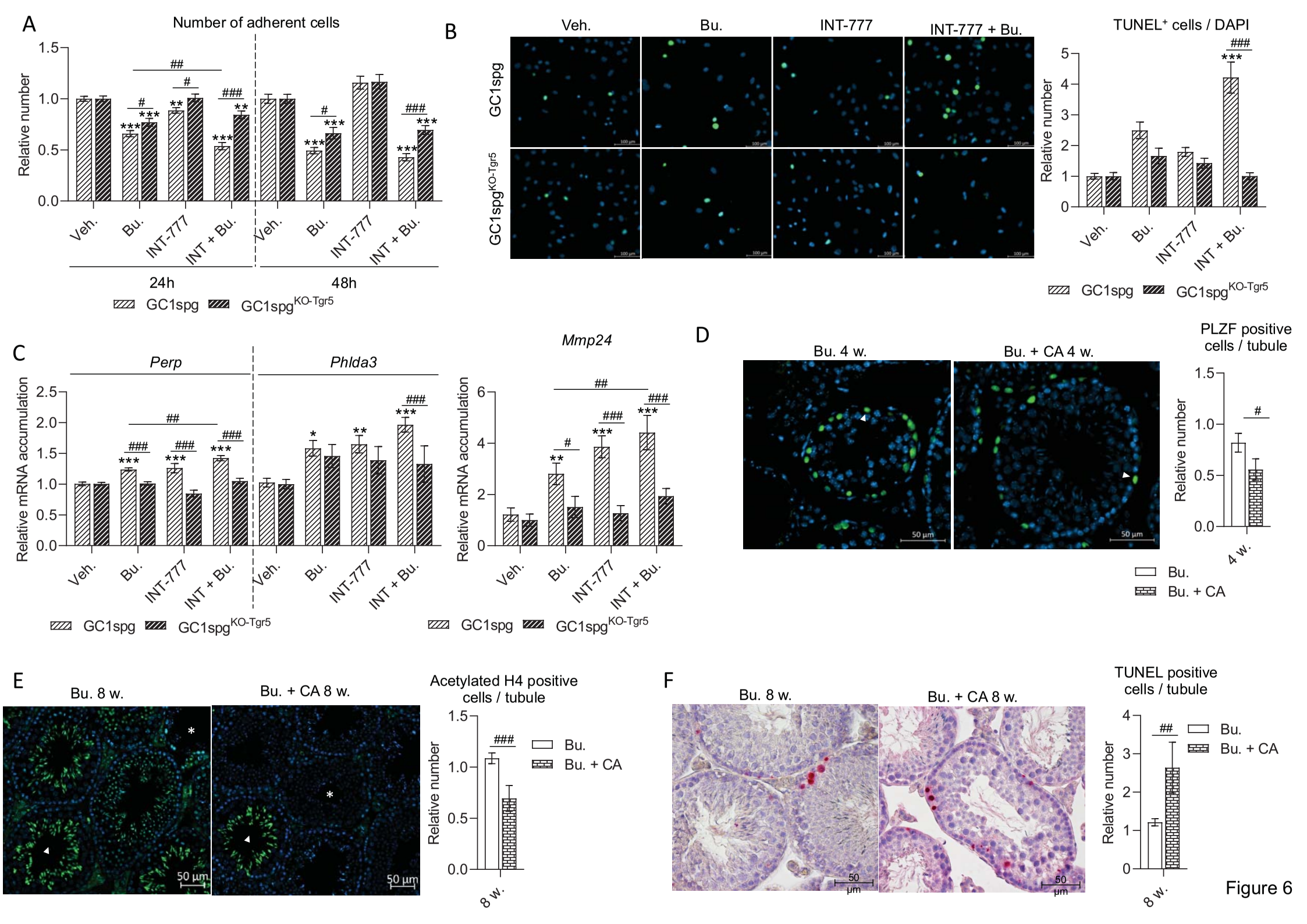

A
Number of adherent cells
Relative number
Veh.
Bu.
INT-777
INT + Bu.
24h
48h
GC1spg
GC1spgKO-Tgr5
B
Veh.
Bu.
INT-777
INT-777 + Bu.
GC1spg
GC1spgKO-Tgr5
TUNEL+ cells / DAPI
Relative number
C
Perp
Phlda3
Mmp24
Relative mRNA accumulation
D
Bu. 4 w.
Bu. + CA 4 w.
50 µm
PLZF positive cells / tubule
Relative number
4 w.
Bu.
Bu. + CA
E
Bu. 8 w.
Bu. + CA 8 w.
50 µm
Acetylated H4 positive cells / tubule
Relative number
8 w.
Bu.
Bu. + CA
F
Bu. 8 w.
Bu. + CA 8 w.
50 µm
TUNEL positive cells / tubule
Relative number
8 w.
Bu.
Bu. + CA

Figure 6

922 **Figure 6.**

923 **(A)** Number of adherent cells in GC1spg and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells pre-exposed 24h with INT-
924 777 and then to Bu (200µM) for 24 or 48 hours.

925 **(B)** (Left) Representative micrograph of GC1spg and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells pre-exposed 24h
926 with INT-777 and then to Bu 200µM for 48 hours and stained for TUNEL. (Right)
927 Quantification of the relative number of TUNEL positive GC1spg and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells pre-
928 exposed 24h with INT-777 and then with Bu (200µM) for 48 hours.

929 **(C)** *Perp, Phld3a* and *Mmp24* mRNA accumulations normalized to β-actin in GC1spg cells
930 and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells pre-exposed 24h with INT-777 and then to Bu 200µM for 24 hours**.**

931 **(D)** (Left) Representative micrograph of testis of Bu or Bu+CA treated Wt male stained for
932 PLZF. (Right) Quantification of the relative number of positive PLZF cells per seminiferous
933 tubules of males treated with the Bu or Bu+CA (4 weeks after treatment).

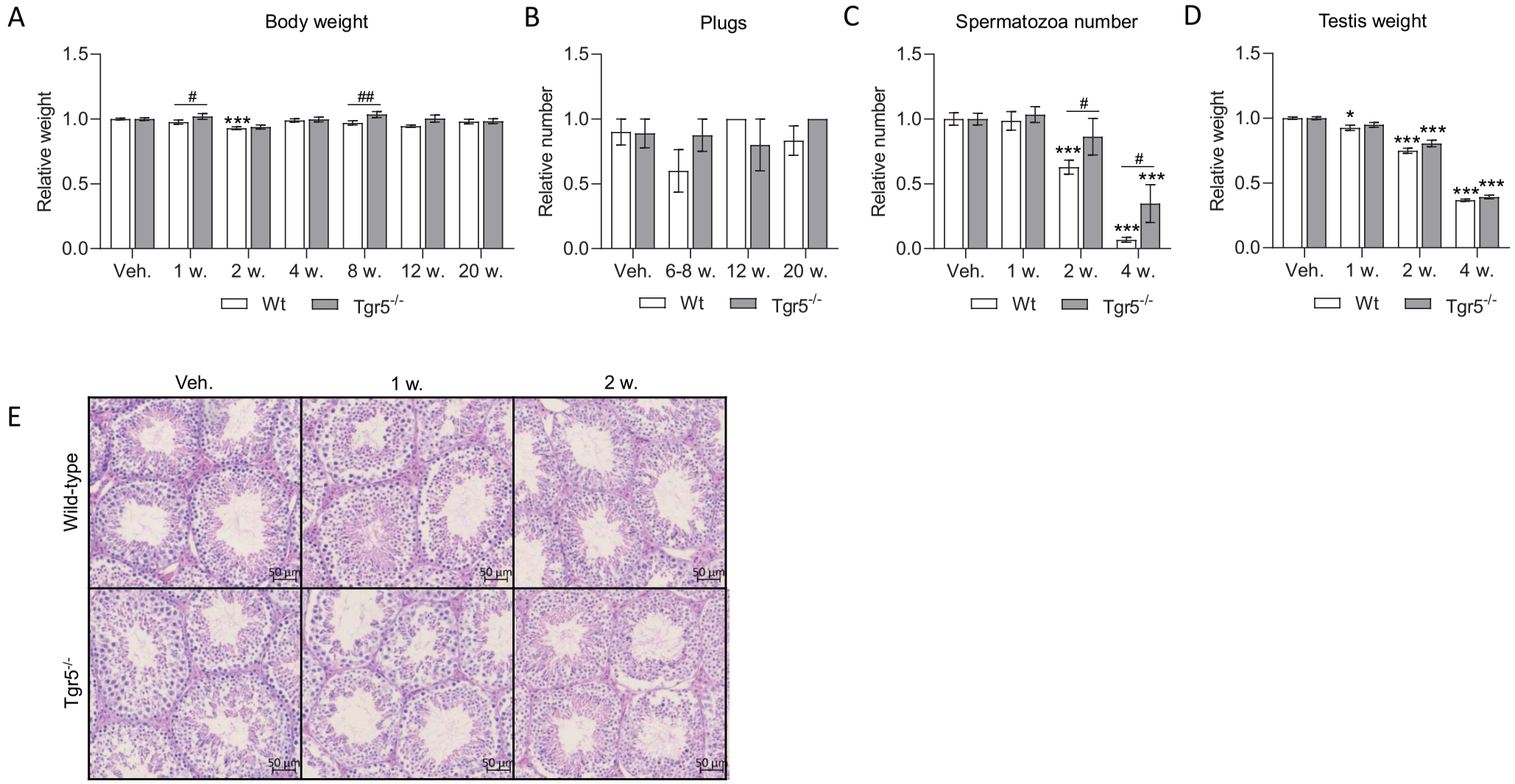
934 **(E)** (Left) Representative micrograph of testis of Bu or Bu+CA treated Wt males stained for
935 acetylated H4. (Right) Quantification of the relative number of acetylated H4 positive
936 seminiferous tubules of males treated with the Bu or Bu+CA (8 weeks after treatment).

937 **(F)** (Left) Representative micrograph of testis of Bu or Bu+CA treated Wt males stained for
938 TUNEL. (Right) Quantification of the relative number of TUNEL positive cells per
939 seminiferous tubules of testes from Wt males treated with Bu or Bu+CA (8 weeks after
940 treatment).

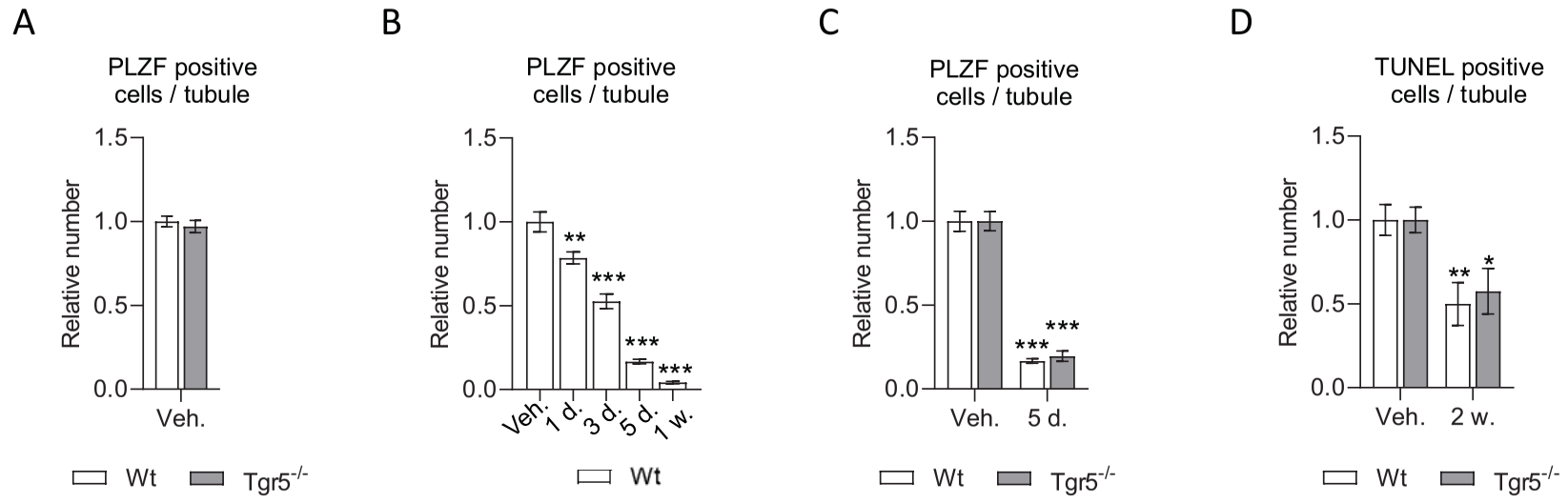
941 In a to c panels, n=6-24 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the
942 means ± SEM. Statistical analysis: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$ *vs* respective vehicle
943 group for each genotype. #, $p<0.05$; ##, $p<0.01$; ###, $p<0.001$ *between genotypes exposed*
944 *to same treatments.* Veh: vehicle and Bu: Busulfan.

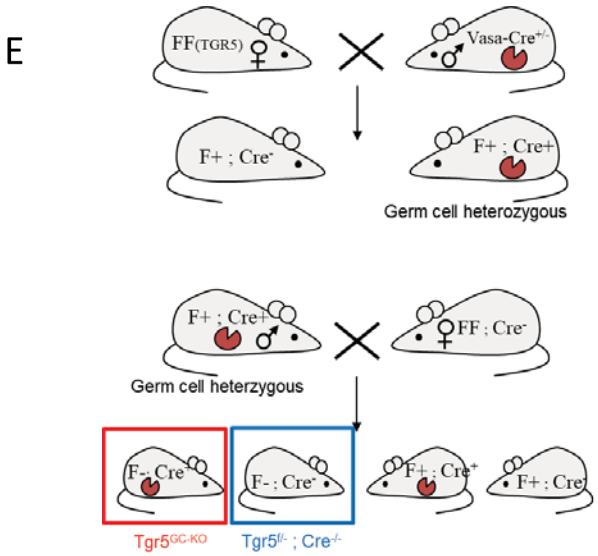
945 In panels d to f, n=7-15 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the
946 means ± SEM. Statistical analysis: #, $p<0.05$; ##, $p<0.01$; ###, $p<0.001$ *between genotypes*
947 *exposed to same treatments.* CA: cholic acid and Bu: Busulfan.

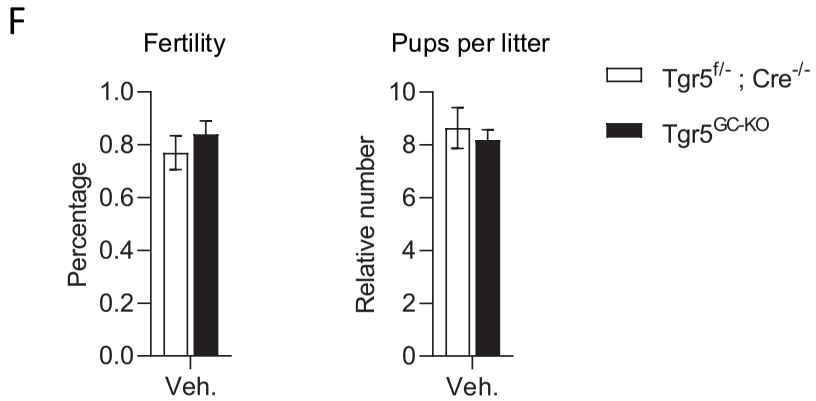
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958


A
Body weight
Relative weight
1.5
1.0
0.5
0.0
#
***
##
Veh.
1 w.
2 w.
4 w.
8 w.
12 w.
20 w.
Wt
Tgr5-/-
B
Plugs
Relative number
Veh.
6-8 w.
12 w.
20 w.
C
Spermatozoa number
Relative number
***
#
Veh.
1 w.
2 w.
4 w.
D
Testis weight
Relative weight
*
***
Veh.
1 w.
2 w.
4 w.
E
Veh.
1 w.
2 w.
Wild-type
Tgr5-/-
50 µm

959 **Supplemental Figure 1.**
960 **(A)** Body weight of Wt or *Tgr5*$^{-/-}$ males treated with the vehicle or busulfan for 1, 2, 4, 8, 12 or
961 20 weeks.
962 **(B)** Relative percentage of C57BL/6J females plugged per male (visualized by vaginal plug)
963 after 10 days of reproduction with Wt or *Tgr5*$^{-/-}$ males.
964 **(C)** Sperm count in the epididymis head of Wt or *Tgr5*$^{-/}$ males 1, 2, 4 weeks after busulfan or
965 vehicle treatments.
966 **(D)** Representative micrographs of hematoxylin/eosin-stained testes of Wt or *Tgr5*$^{-/-}$ males
967 treated with the vehicle or 1, 2 weeks after busulfan treatment.
968
969 In all panels, n=5-50 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the means
970 ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.005 *vs* respective vehicle group for
971 each genotypes. #, p<0.05; ##, p<0.01; ###, p<0.005 *between genotypes exposed to same*
972 *treatments*.
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983







Supplementary Fig.2

Supplemental Figure 2.

(A) Quantification of the relative number of positive PLZF cells per seminiferous tubules in testes of *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males treated with vehicle.

(B) Quantification of the relative number of positive PLZF cells per seminiferous tubules in testes of *Wt* males treated with the vehicle or busulfan (1 day, 3 days, 5 days or 1 weeks after treatment).

(C) Quantification of the relative number of positive PLZF cells per seminiferous tubules in testes of *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males treated 5 days with vehicle or Bu.

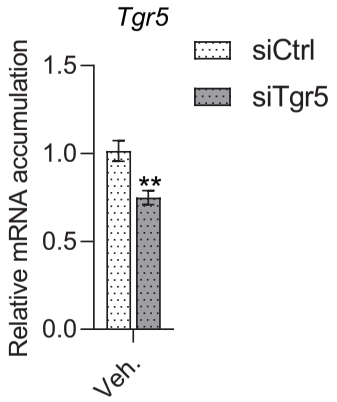
(D) Quantification of the relative number of TUNEL positive cells per seminiferous tubules in testes of *Wt* or *Tgr5*$^{-/-}$ males treated with vehicle or busulfan (2 weeks after treatment).

(E) Schematic representation of the generation of *Tgr5* specific germ cell knockout (*Tgr5*$^{GC-KO}$*).*

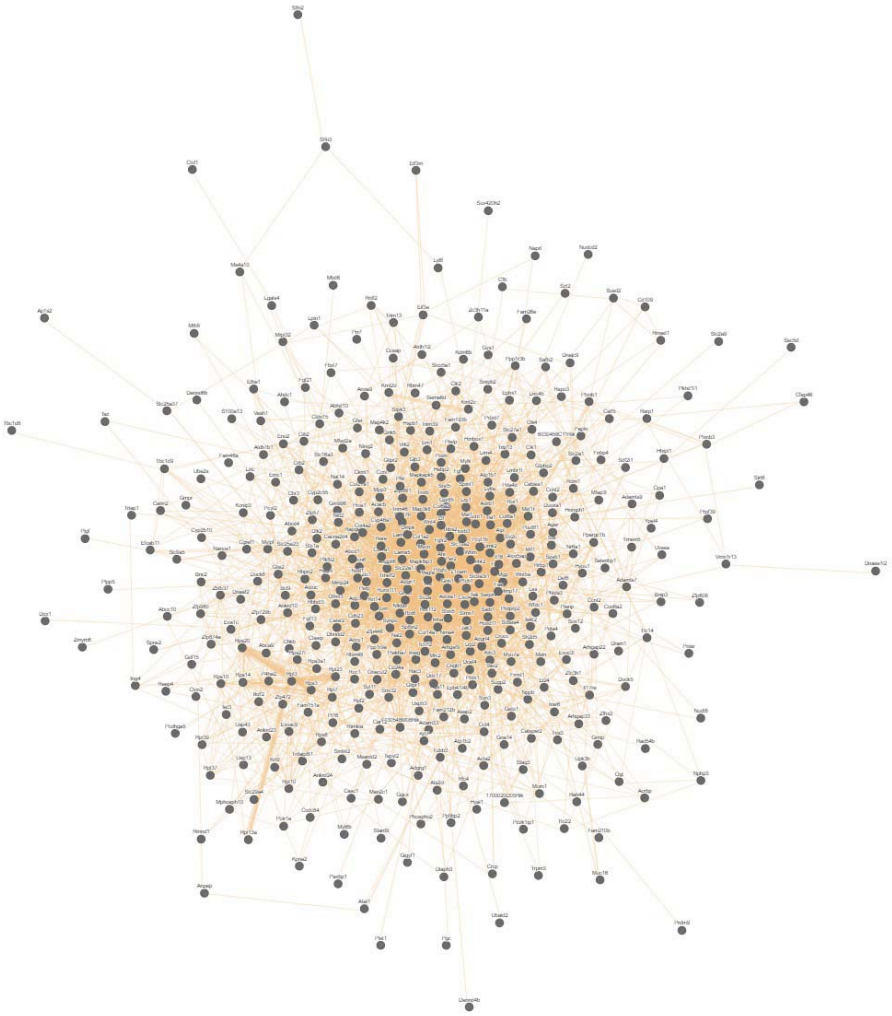
In a to e panels, n=9-23 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.005 *vs* respective vehicle group for each genotypes. #, p<0.05; ##, p<0.01; ###, p<0.005 *between genotypes exposed to same treatments*.

(F) (Left) Percentage of fertile *Tgr5*$^{f/-}$*; Cre*$^{-/-}$ *and Tgr5*$^{GC-KO}$ males after vehicle treatment and breeding with C57Bl6J females for 10 days. (Right) Number of pups per litter obtained in breeding C57Bl6J females with *Tgr5*$^{f/-}$*; Cre*$^{-/-}$ and *Tgr5*$^{GC-KO}$ males after vehicle treatment. n=5-15 from 3 to 6 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.005 *vs* respective vehicle group for each genotypes. #, p<0.05; ##, p<0.01; ###, p<0.005 *between genotypes exposed to same treatments*.

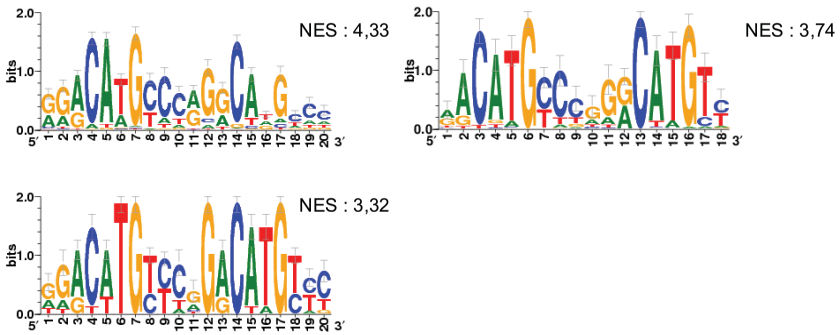
A



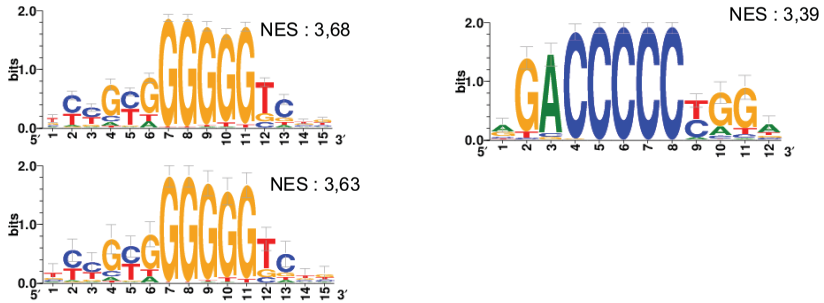
B



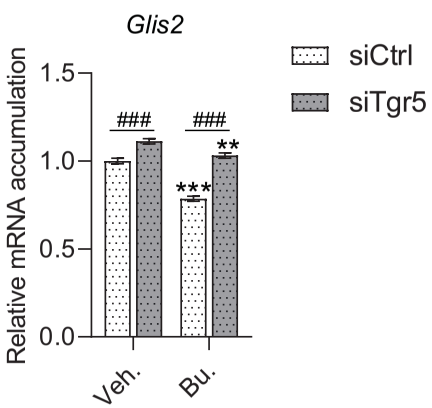
C



D



E



Supplementary Fig.3

1012 **Supplemental Figure 3.**
1013 **(A)** Relative *Tgr5* mRNA accumulation normalized to β-actin in GC1spg cells transfected with
1014 siCtrl or siTgr5. 48h post transfection (at the time of treatment with Bu). n=12 from 3 to 6
1015 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *,
1016 p<0.05; **, p<0.01;, ***, p<0.005 *vs* respective vehicle group for each genotypes. #, p<0.05;
1017 ##, p<0.01; ###, p<0.005 *between genotypes exposed to same treatments*.
1018 **(B)** Analysis of the interconnections of genes sorted either upwards or downwards, regulated
1019 by Bu specifically in cells transfected by siCtrl using GeneMania®.
1020 **(C)** Sequences of the DNA binding site defined by CisTarget for TP53 in the genes positively
1021 regulated by Bu in siCtrl-transfected cells only.
1022 **(D)** Sequences of the DNA binding site defined by CisTarget for GLIS2 in the genes
1023 negatively regulated by Bu in siCtrl-transfected cells specifically.
1024 **(E)** Glis2 mRNA accumulation observed in the RNAseq data from GC1spg cells transfected
1025 with siCtrl or siTgr5 and treated 24 hours with vehicle or with 200μM of Bu. n=4 to 5.
1026
1027 Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, p<0.05; **, p<0.01; ***,
1028 p<0.005 *vs* respective vehicle group for each genotypes. #, p<0.05; ##, p<0.01; ###,
1029 p<0.005 *between genotypes exposed same treatments*.
1030
1031
1032
1033
1034
1035

A Experimental design primers of CRISPR/CAS9 experiment for TGR5

TGR5_mRNA (990 bp)

mTGR5_ctrl_fwd

ATGATGACACCCAACAGCACTGAGCTGTCGGCCATTCCCATGGGGGTTCTGGGGCTTTCCTTGGCCCTGGCAAGCCTCATCGTCATCGCCAAC

10 20 30 40 50 60 70 80 90

mTGR5_G1_RC

CTGCTCCTGGCCCTAGGCATCGCCCTGGACCGCCACTTGCGCAGCCCACCTGCTGGCTGCTTCTTCCTAAGCCTACTACTAGCCGGGCTGCTC

mTGR5_int_rev

100 110 120 130 140 150 160 170 180

mTGR5_G2

ACAGGGCTGGCACTGCCCATGCTGCCTGGGCTATGGAGCCGGAACCATCAGGGCTACTGGTCCTGCCTCCTTCTCCACTTGACCCCCAACTTT

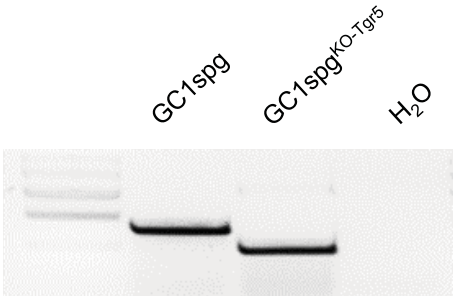
190 200 210 220 230 240 250 260 270

TGTTTCCTTTCCCTGCTTGCCAATCTGCTGCTGGTGCATGGGGAACGCTACATGGCAGTGTTGCAGCCACTCCGGCCCCATGGAAGTGTGCGG

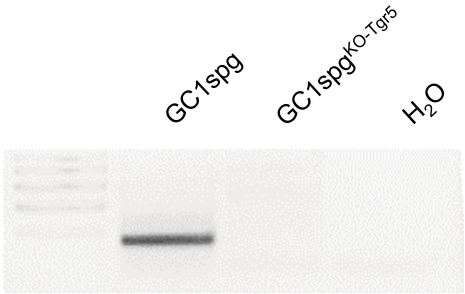
mTGR5_ctrl_rev

280 290 300 310 320 330 340 350 360 370

B Genotyping



C RT-PCR

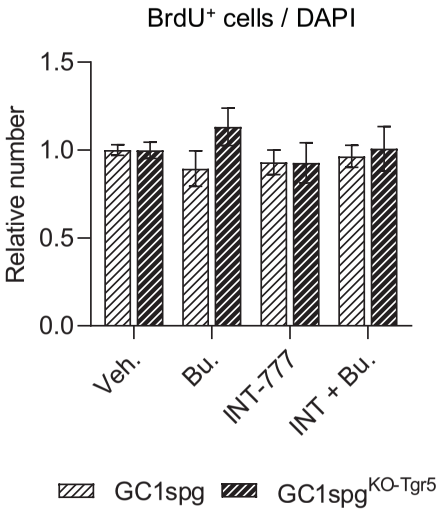


D Protein alignment

```
clustalw.aln

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment


TGR5_WT         MMTPNSTELSAIPMGVLGLSLALASLIVIANLLLALGIALDRHLRSPPAGCFFLSLLLAG
TGR5_KO         MMTPNSTELSAIPMGVLGLSLALASLIVIANLLLALGIALDTGPASFST-PPTFVSFPCL
                ****************************************    * .:    :  : .

TGR5_WT         LLTGLALPMLPGLWSRNHQGYWSCLLLHLTPNFCFLSLLANLLLVHGERYMAVLQPLRPH
TGR5_KO         PICCWCMGNATWQCCSHSGPMEVCG-PCSSPGSAPCSLPACLLWAG------TIGALMPT
                 :   .:   .   . :      *     :*. .  ** * ** .       .: .* *

TGR5_WT         GSVRLALFLTWVSSLFFASLPALGWNHWSPDANCSSQAVFPAPYLYLEVYGLLLPAVGAT
TGR5_KO         AAPKLSSQPPTSTWKFMASCCLP----WGPLP-FSLSACWPLPTASCVRSADWSGQCAAM
                .: :*:   .  :  *:**        *.* .  * .* :* *       .      .*

TGR5_WT         ALLSVRVLATAHRQLCEIRRLERAVCRDVPSTLARALTWRQARAQAGATLLFLLCWGPYV
TGR5_KO         YPQPWLGLSPGGRLGHRQEPHCSSCCVGGP-------MWPHCSCQS---------WPMSV
                   .   *:.. *   . .    : * . *        * :. .*:         *   *

TGR5_WT         ATLLLSVLAYERRPPLGPGTLLSLISLGSTSAAAVPVAMGLGDQRYTAPWRTAAQRCLRV
TGR5_KO         AHH-GLELCYRSSHWAAPVLPLCLWPWGWVISATQPPGGQLPKG---------VYECFEE
                *      *.*.     .*   *.* . * . :*: * .  * .          . .*:.

TGR5_WT         LRGRAKRDNPGPSTAYHTSSQCSIDLDLN-
TGR5_KO         EPRGTIQAPALPTTPVANAALTWT-I----
                    : :  . *:*.  .::     :
```

Supplementary Fig.4

1036 **Supplemental Figure 4.**
1037 **(A)** Schematic representation of the experimental design (primers) of Crispr/CAS9
1038 experiment for the deletion of TGR5.
1039 **(B)** Representative images of genotyping PCR.
1040 **(C)** *Tgr5* mRNA accumulation observed in GC1spg and Crispr/Cas9 Tgr5 knockout GC1spg
1041 cells ($GC1spg^{KO\text{-}Tgr5}$) as observed by RT-PCR.
1042 **(D)** Protein alignment between wild type TGR5 protein and the truncated protein obtained
1043 following Crispr/CAS9 protocol.
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051



Supplementary Fig.5

1052 **Supplemental Figure 5.**
1053 Quantification of the relative number of BrdU positive GC1spg and GC1spg$^{KO\text{-}Tgr5}$ cells pre-
1054 exposed 24h with INT-777 and then to Bu (200µM) for 24 hours**.** n=15 to 21 from 3 to 6
1055 independent experiments. Veh.: vehicle; Bu: Busulfan.
1056

Supplemental tables : upon request

B. Discussion

L'ensemble des résultats présentés dans cette étude montrent que TGR5 joue un rôle majeur dans la physiopathologie testiculaire. En effet, l'invalidation de *Tgr5* permet de minimiser les effets indésirables d'un traitement au busulfan sur la fertilité en agissant sur les cellules germinales indifférenciées, permettant un redémarrage précoce de la spermatogenèse. L'invalidation de *Tgr5*, ou son inactivation par un antagoniste, permettrait de protéger la lignée germinale afin de limiter les impacts délétères des chimiothérapies sur la fertilité. Au contraire, l'activation de TGR5 dans le cadre des traitements du cancer germino-testiculaire pourrait améliorer l'efficacité des traitements, notamment dans le cas de tumeurs résistantes aux chimiothérapies qui représentent 10 à 15 % des cancers germino-testiculaires. Nous posons donc l'hypothèse que la modulation de TGR5 pourrait être intégrée dans les protocoles de traitements anti-cancéreux. Cette modulation, par activation ou inactivation, nécessitera d'être vectorisée afin d'induire une modulation de TGR5 spécifiquement dans le tissu d'intérêt, permettant de s'affranchir d'effets sur d'autres types cellulaires. Cependant, afin de mieux comprendre le rôle de TGR5 dans la physiologie et la physiopathologie testiculaires, de nombreuses questions subsistent.

1. Quel est le rôle de TGR5 dans l'homéostasie des cellules progénitrices et des spermatogonies indifférenciées ?

Les résultats obtenus par qPCR ainsi qu'avec l'analyse du transcriptome par une approche RNAseq ont permis de mettre en évidence que les cellules GC1-spg (spermatogonies) transfectées avec un siARN dirigé contre *Tgr5* (si*Tgr5*) présentent une accumulation des transcrits de *Gfrα1*, *Nanog* et *Fgfr2* plus importante que les cellules transfectées avec un siARN contrôle. Ces résultats suggèrent un rôle de TGR5 dans l'établissement et/ou le maintien du pool de cellules souches puisque ces différents gènes sont des gènes clés de l'homéostasie des SSCs. De plus, nos résultats mettent en évidence que l'invalidation du gène *Tgr5* permet une protection des effets à long terme du busulfan conduisant au redémarrage précoce de la spermatogenèse. En effet, de manière intéressante, il est observé que les cellules germinales indifférenciées (positives pour PLZF) conservent leur capacité proliférative chez les individus invalidés pour *Tgr5* deux semaines après traitement au busulfan par rapport aux individus sauvages, suggérant que TGR5 est impliqué dans la prolifération des cellules indifférenciées, qui représente une caractéristique clé de ce type cellulaire.

De plus, les données issues de l'analyse transcriptomique par une approche de RNAseq puis validées biologiquement ont mis en évidence un impact majeur de TGR5 sur la signalisation GLIS2. Ces résultats démontrent effectivement que le *knock-down* de *Tgr5* entraîne une augmentation de l'accumulation des transcrits de *Glis2*. Il est intéressant de noter que, dans des cellules souches pluripotentes (hPSCs), le *knock-down* de *GLIS2* entraîne une diminution de marqueurs de pluripotence tels que *OCT3/4*, *SOX2* et *NANOG* (Scoville et al., 2017). GLIS2 semble donc jouer un rôle majeur dans le maintien de la pluripotence des cellules souches. De plus, il a été mis en évidence que des sites de liaison à *Glis2* sont présents dans les séquences régulatrices des gènes *Oct3/4* et *Nanog*, suggérant que ces gènes sont directement régulés par GLIS2. Parallèlement, le *knock-down* de *Oct3/4* entraîne également une diminution de l'expression de *Glis2*, suggérant que *Glis2* pourrait être régulé transcriptionnellement par *Oct3/4*. *Oct3/4* et *Nanog* étant des gènes clés des cellules germinales souches, cela suggère que GLIS2 peut jouer un rôle important dans ces cellules et que le rôle de TGR5 dans le contrôle de l'homéostasie des cellules germinales souches pourrait impliquer une signalisation GLIS2 – NANOG – OCT3/4.

Nos données démontrent, en appui des données décrites précédemment publiées (Xie et al., 2020), que l'impact initial du busulfan est observé sur les cellules indifférenciées positives pour le marqueur PLZF dès 1 jour après traitement. Cependant, ce marqueur est largement exprimé dans la population de spermatogonies et ne permet pas de dissocier les spermatogonies souches des spermatogonies indifférenciées. Il serait intéressant de réaliser des immunomarquages avec ID4 ou encore PAX7 (marqueurs de SSCs) (Aloisio et al., 2014; Oatley et al., 2011) afin de savoir si le redémarrage précoce initié chez les individus invalidés pour *Tgr5* concerne les spermatogonies indifférenciées de manière générale ou s'il s'agit d'un effet spécifique aux cellules germinales souches (SSCs).

Afin de confirmer si le rôle protecteur de TGR5 est spécifique aux cellules germinales indifférenciées, un tri des SSCs pourrait être réalisé à l'aide du marqueur THY1 par FACS ou tri magnétique. Ce tri consiste à isoler l'ensemble des cellules positives pour le marqueur THY1 qui est exprimé uniquement à la surface des cellules germinales indifférenciées (Kubota et al., 2003). Le tri des SSCs pourrait également être réalisé sur des souris *Id4*-GFP (*Green Fluorescent Protein*) (collaboration J. Oatley) croisées avec des souris invalidées pour le gène codant TGR5 : un tri des populations cellulaires exprimant la GFP serait réalisé et permettra de récupérer l'ensemble des cellules $ID4^+$. Les cellules indifférenciées ainsi triées pourront être transplantées chez des individus du génotype opposé : transplantation de SSCs issues

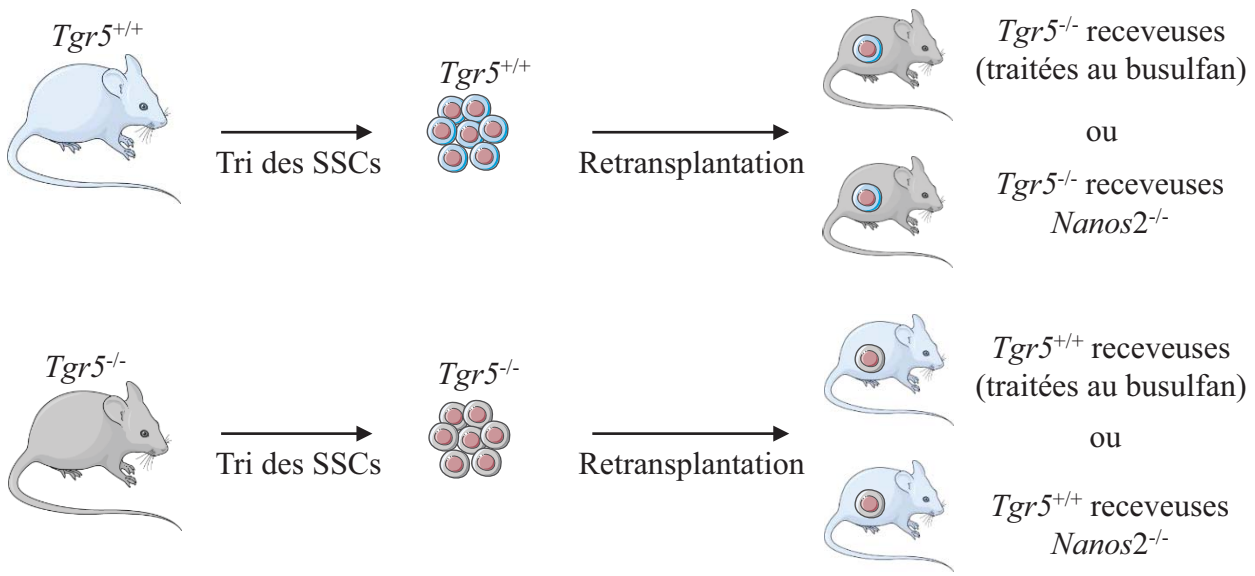


Figure 24 : Schéma du protocole de transplantation des SSCs.
Les SSCs de souris sauvages (*Tgr5*$^{+/+}$) ou invalidées pour *Tgr5* (*Tgr5*$^{-/-}$) seront triées par tri magnétique ou FACS, soit avec le marqueur THY1 spécifique des SSCs, soit avec la GFP à partir de souris *Id4*-GFP (voire des souris *Oct3/4*-GFP déjà disponibles dans l'équipe). Ces SSCs isolées seront ensuite re-transplantées dans des souris receveuses (qui ne présentent pas de spermatogenèse) du génotype opposé. Afin d'obtenir des souris receveuses nous utiliserons soit des souris traitées avec une dose importante de busulfan permettant une perte de la lignée germinale complète et définitive, soit des souris invalidées pour le gène codant NANOS2 qui présentent une azoospermie totale.

d'individus *Tgr5*$^{-/-}$ chez des souris sauvages et inversement. Il est possible de transplanter les SSCs isolées chez des souris receveuses traitées au busulfan à une dose importante (afin d'induire une déplétion des cellules germinales quasiment définitive) ou chez des souris invalidées pour *Nanos2* qui présentent une stérilité (Tsuda et al., 2003) (**Figure 24**).

Les SSCs re-transplantées chez des individus présentant une déplétion de cellules germinales recoloniseront les épithéliums séminifères afin de retrouver une spermatogenèse complète après plusieurs semaines. Il serait intéressant d'observer si les SSCs invalidées pour le gène codant TGR5 recolonisent les tubes séminifères plus rapidement ou non, ce qui permettrait d'évaluer le rôle de TGR5 dans la recolonisation des tubes séminifères. De plus, la transplantation de SSCs chez des individus invalidés pour *Nanos2* (souris présentant une stérilité) permet d'éviter un traitement au busulfan. Cela permet de s'affranchir de tout effet systémique du busulfan sur le foie ou l'intestin, mais également sur les cellules somatiques testiculaires, permettant ainsi d'étudier le rôle de TGR5 dans le redémarrage de la spermatogenèse spécifiquement *via* les SSCs. En effet, le busulfan peut conduire à l'altération des cellules somatiques (cellules de Leydig et cellules de Sertoli principalement) qui produisent des facteurs essentiels aux cellules germinales. Chez le rat, le busulfan entraîne l'apoptose des cellules de Leydig et des cellules myoïdes péritubulaires et conduit à une diminution des taux de testostérone (Sasso-Cerri et al., 2017). Chez la souris, le busulfan conduit à une augmentation de l'expression de *Sat2* (*Spermidine/Spermine N1-AcetylTrasnferase 2*) dans les cellules de Sertoli *in vitro*, et la sur-expression de *Sat2* dans ces cellules conduit à une inhibition de la prolifération cellulaire associée à un arrêt du cycle cellulaire, suggérant que le busulfan altère également les cellules de Sertoli (*in vitro*) (Xian et al., 2017). Il est donc envisageable dans notre modèle que le busulfan ait un impact délétère sur les cellules testiculaires somatiques, ce qui conduirait à une modulation des facteurs clés produits par ces cellules et nécessaires aux cellules germinales, et que TGR5 joue un rôle dans ce contexte. En effet, les cellules de Sertoli produisent des facteurs essentiels aux cellules germinales comme le GDNF ou les FGFs. Si le busulfan a un impact sur les cellules de Sertoli il est possible qu'il joue sur la production de ces facteurs. Les cellules germinales invalidées pour *Tgr5* présentant une accumulation des transcrits de *Fgfr2* et *Gfra1* plus importante, il est donc possible que le rôle protecteur de l'invalidation de *Tgr5* soit associé à ces facteurs puisque les cellules germinales invalidées pour *Tgr5* pourraient être plus réceptives aux facteurs produits par les cellules de Sertoli.

Nous posons également l'hypothèse que TGR5 joue un rôle clé dans les cellules progénitrices, qui représentent une population de cellules capable de réalimenter le nombre de

cellules souches, ce qui expliquerait le redémarrage précoce de la spermatogenèse après un traitement au busulfan. En effet, une étude a mis en évidence qu'après un traitement au busulfan les cellules progénitrices participaient à la restauration du pool de cellules souches. Il a été démontré que les spermatogonies progénitrices NGN3$^+$ pouvaient conduire à la production de cellules ID4$^+$, suggérant que les SSCs sont restaurées. Ce rôle est dépendant de l'activité de DMRT1 qui est essentiel pour ce processus (Zhang et al., 2016b). En effet, DMRT1 est requis pour le maintien du pouvoir souche des SSCs. Son invalidation dans les cellules NGN3$^+$ empêche le renouvellement des SSCs après un traitement au busulfan et va conduire à la perte de l'expression de PLZF dans les spermatogonies indifférenciées, conduisant à la différenciation de ces cellules et à une perte progressive de la spermatogenèse. Il serait important d'étudier l'impact de l'invalidation de *Tgr5* dans la reprogrammation des cellules indifférenciées progénitrices en cellules souches. En effet, la reprogrammation des cellules progénitrices permet de renouveler un pool de SSCs plus important qui conduira à un redémarrage précoce de la spermatogenèse. Dans ce contexte il serait donc majeur d'analyser les liens entre TGR5 et DMRT1.

Par ailleurs, une étude a identifié une nouvelle sous-population de spermatogonies NGN3$^+$ exprimant MIWI2 (PIWIL4) essentielle à la régénération du tissu testiculaire après un dommage. De manière basale, en l'absence de dommage testiculaire, l'invalidation du gène codant pour MIWI2 conduit à une diminution progressive du nombre de cellules germinales (Carmell et al., 2007). Après un traitement au busulfan, les souris invalidées pour le gène *Miwi2* ne présentent pas de redémarrage de la spermatogenèse contrairement aux individus contrôles (Carrieri et al., 2017). A l'inverse, une retransplantation de cellules MIWI2$^+$ dans un testicule vidé de cellules germinales permet une reconstitution du pool de cellules souches, ce qui permet de conclure que les spermatogonies indifférenciées exprimant *Miwi2* constituent une population essentielle à la capacité régénératrice du testicule après un dommage. L'implication de TGR5 dans la population de cellules MIWI2$^+$ est donc à évaluer afin de mieux comprendre son rôle dans les mécanismes impliqués dans la capacité de régénération du testicule après un traitement au busulfan.

2. Comment TGR5 module-t-il l'apoptose des cellules germinales ?

Les résultats obtenus dans cette étude ont mis en évidence que les effets initiaux du busulfan sont similaires entre les deux groupes d'individus sauvages et *Tgr5*$^{-/-}$ avec une diminution importante du nombre de cellules PLZF$^+$ entre 1 et 7 jours après traitement au

busulfan. Afin d'évaluer le mécanisme conduisant à cette perte des cellules indifférenciées, il serait intéressant de réaliser un co-marquage TUNEL-PLZF (*Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUtp Nick End Labeling*) afin d'évaluer le pourcentage de cellules indifférenciées dégradées par apoptose.

De plus, les résultats obtenus ont mis en évidence que le busulfan entraîne une activation de la voie TP53 (conduisant à l'apoptose des cellules) et que cet effet est contrecarré par l'invalidation de *Tgr5*. Des données supplémentaires (non publiées) montrent de manière basale (en l'absence de traitement) une activation de la voie de signalisation TP53 plus importante dans les cellules transfectées avec un siARN dirigé contre *Tgr5* ou invalidées pour *Tgr5* par rapport à des cellules sauvages. En parallèle, une apoptose plus importante est observée dans les cellules GC1-spg invalidées pour *Tgr5* par rapport aux cellules GC1-spg sauvages non traitées. Ces résultats montrent que l'implication de TGR5 sur la voie de signalisation TP53 et sur la mort cellulaire n'est pas le même en conditions basales qu'après un traitement au busulfan et suggèrent que TGR5 pourrait avoir un impact de manière physiologique sur la mort cellulaire en l'absence de traitement. De manière intéressante, dans des cellules de cancer du sein, l'activation de TGR5 avec du LCA entraîne un effet pro-apoptotique avec une augmentation de l'expression de TP53 et une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (*B-Cell cll/Lymphoma 2*) (Luu et al., 2018). TGR5 semble donc jouer un rôle clé dans la régulation de la signalisation TP53, bien que son impact soit dépendant du tissu.

Par ailleurs, une étude a mis en évidence, dans des cellules rénales, que l'invalidation du gène codant pour GLIS2 (sur-exprimé dans notre modèle en l'absence de *Tgr5*) permettait de contrecarrer l'apoptose et d'induire la senescence des cellules *via* l'activation de CHK1 (*CHeckpoint Kinase 1*) qui permet de stabiliser TP53 (Lu et al., 2016). Il existe donc un lien TP53 – GLIS2 et, d'après nos données transcriptomiques acquises par une analyse RNAseq, il existe une association importante entre les voies de signalisation TP53 – GLIS2 – TGR5. Il serait donc intéressant d'étudier après un traitement au busulfan l'activation de la protéine CHK1 afin de définir si la protection induite par l'invalidation de *Tgr5* est dépendante de ce facteur, lui-même régulé par GLIS2.

L'analyse des liens entre les voies de signalisation TP53 – GLIS2 – TGR5 nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans notre modèle.

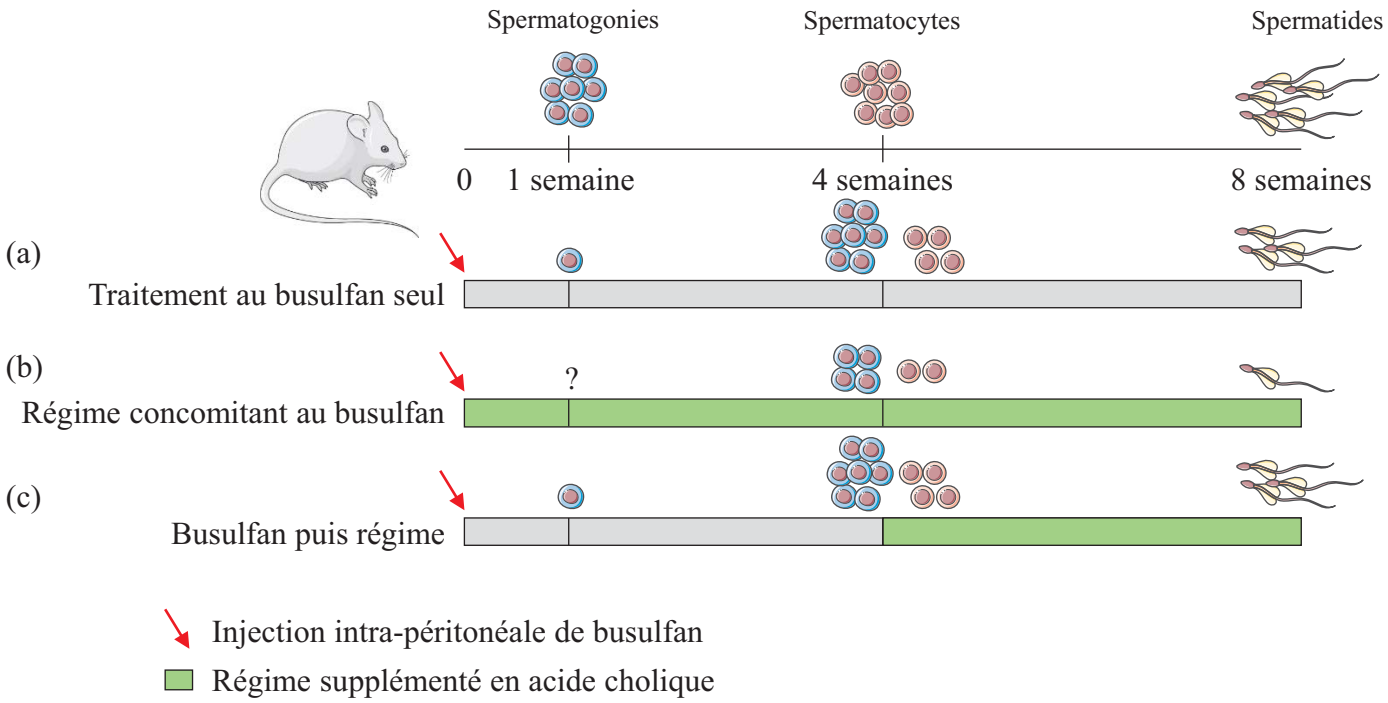


Figure 25 : Schéma du protocole expérimental utilisé.
Le nombre de spermatogonies a été évalué entre 1 et 8 semaines après traitement au busulfan afin d'étudier la perte de ces cellules induites par le busulfan, puis le retour à la normale de ces cellules. Le nombre de spermatogonies, de spermatocytes et de spermatides a été analysé 1 à 8 semaines après traitement respectivement.
(a) Un traitement au busulfan seul entraîne une diminution importante du nombre de spermatogonies à 1 semaine, qui va conduire à une diminution du nombre de spermatocytes à 4 semaines associée à une diminution du nombre de spermatides à 8 semaines (b) Un traitement au busulfan en parallèle d'un régime supplémenté en acide cholique accentue les effets du busulfan sur la diminution du nombre de spermatocytes et de spermatides et entraîne également un retard dans la recolonisation des spermatogonies 4 semaines après traitement (c) Un traitement au busulfan, suivi 4 semaines après par un régime supplémenté en acide cholique, n'accentue pas les effets du busulfan visibles 8 semaines après injection.

3. Comment l'activation de TGR5 permet de sensibiliser au busulfan ?

Les résultats exposés ici ont mis en évidence qu'un régime supplémenté en acide cholique concomitant à un traitement au busulfan, dès le début du protocole expérimental, accentue les effets délétères du busulfan sur la lignée germinale, entraînant un retard du redémarrage de la spermatogenèse. Cela suggère que la présence de problèmes hépatiques pourrait accentuer les effets délétères du busulfan. De ce fait, il apparaît donc primordial de prendre en compte les problèmes hépatiques préexistants (souvent associés à une augmentation des taux plasmatiques d'acides biliaires) chez les patients avant un traitement de chimiothérapie en réalisant un dosage d'acides biliaires.

De manière intéressante, des données (non publiées) collectées dans l'équipe ont permis de mettre en évidence que, contrairement aux souris traitées au busulfan et nourries avec un régime supplémenté en acide cholique de manière concomitante, des souris traitées au busulfan puis nourries avec un régime supplémenté en acide cholique à partir de 4 semaines après le traitement au busulfan ne présentent pas de retard dans le redémarrage de la spermatogenèse (**Figure 25**). En effet, lorsque le régime supplémenté en acide cholique est initié 4 semaines après traitement au busulfan – après le retour à la normale du nombre de spermatogonies $PLZF^+$ – l'impact du busulfan n'est pas accentué par le régime supplémenté en acide cholique, contrairement à ce qui a été démontré dans notre étude. Ces résultats mettent en évidence que le rôle majeur de TGR5 après un traitement au busulfan se fait dans la phase de redémarrage de la spermatogenèse en amont du retour à la normale du nombre de spermatogonies $PLZF^+$ (4 semaines après traitement), confirmant ainsi le fait que le rôle de TGR5 est retrouvé sur les cellules indifférenciées.

Par ailleurs, les résultats obtenus *in vivo* avec le régime supplémenté en acide cholique n'ayant pas été réalisés sur les individus invalidés pour *Tgr5*, l'implication d'autres récepteurs des acides biliaires reste envisageable. Pour contrer ce problème, il serait intéressant de réaliser des traitements avec de l'INT-777 (agoniste synthétique spécifique de TGR5) concomitant avec un traitement au busulfan afin de vérifier que l'impact des acides biliaires dans ce contexte soit bien un effet spécifique de TGR5. Par ailleurs, l'utilisation de souris invalidées pour *Tgr5* nourries avec un régime supplémenté en acide cholique ou traitées avec de l'INT-777 en simultané avec du busulfan permettrait de valider la spécificité de ces molécules et de pouvoir s'assurer que les effets observés sont spécifiques à TGR5.

4. TGR5 est-il impliqué dans la qualité spermatique ?

Les chimiothérapies sont des molécules connues pour entraîner des dommages à l'ADN ; le busulfan, comme les autres agents alkylants, va causer des dommages à l'ADN en réalisant des ponts intra brins dans l'ADN, conduisant à des cassures de celui-ci, provoquant de ce fait la mort de la cellule (Iwamoto et al., 2004). Les molécules de chimiothérapie ont un effet préférentiellement sur les cellules en prolifération telles que les cellules germinales (spermatogonies principalement). Leur impact va dépendre du type de chimiothérapie ainsi que de la dose utilisée (Giwercman and Petersen, 2000). Au-delà de leurs conséquences sur la quantité de spermatozoïdes produits, les chimiothérapies pourraient également avoir un impact majeur sur leur qualité puisqu'elles peuvent causer des mutations dans les cellules germinales.

Nos résultats démontrent que l'invalidation de *Tgr5* permet de minimiser les effets à long terme du busulfan en entraînant un redémarrage précoce de la spermatogenèse qui conduit à un retour précoce de la fertilité. Cependant, il serait important d'étudier la qualité des spermatozoïdes chez les individus invalidés pour *Tgr5* après traitement au busulfan. Le redémarrage de la spermatogenèse étant précoce, il est important de s'affranchir de problèmes liés à la réparation de l'ADN. En effet, les cellules repartent plus vite mais cela peut être associé à une mauvaise réparation de l'ADN qui conduirait à des défauts de qualité des spermatozoïdes pouvant entraîner des défauts développementaux sur la descendance. Les analyses de fertilité réalisées dans notre étude ont mis en évidence que 6 à 8 semaines après un traitement au busulfan l'ensemble des animaux (sauvages ou *Tgr5*$^{-/-}$) sont stériles. Lors du retour à la normale de la spermatogenèse, les mâles invalidés pour *Tgr5*, traités au busulfan puis mis en reproduction après 20 semaines avec une femelle non traitée, donnent naissance à un nombre de petits par portée normal sans impact majeur sur le nombre de fœtus morts *in utero*. Cependant il est envisageable que le busulfan ait un impact sur la qualité spermatique, ce qui pourrait entraîner un impact sur la descendance.

L'impact qualitatif sur les spermatozoïdes est pertinent dans la poursuite de notre étude car il est connu que l'invalidation de *Tgr5* permet de contrecarrer les défauts testiculaires et la dégradation de la qualité spermatique, induits par un régime supplémenté en acide cholique ayant un impact métabolique majeur sur plusieurs générations d'individus (Baptissart et al., 2018). Cela suggère que TGR5 joue un rôle important dans la préservation de la qualité du spermatozoïde et cet effet semble être dépendant de l'enzyme ADN méthyltransferase *de novo* DNMT3B. En effet, un régime supplémenté en acide cholique conduit à une diminution de

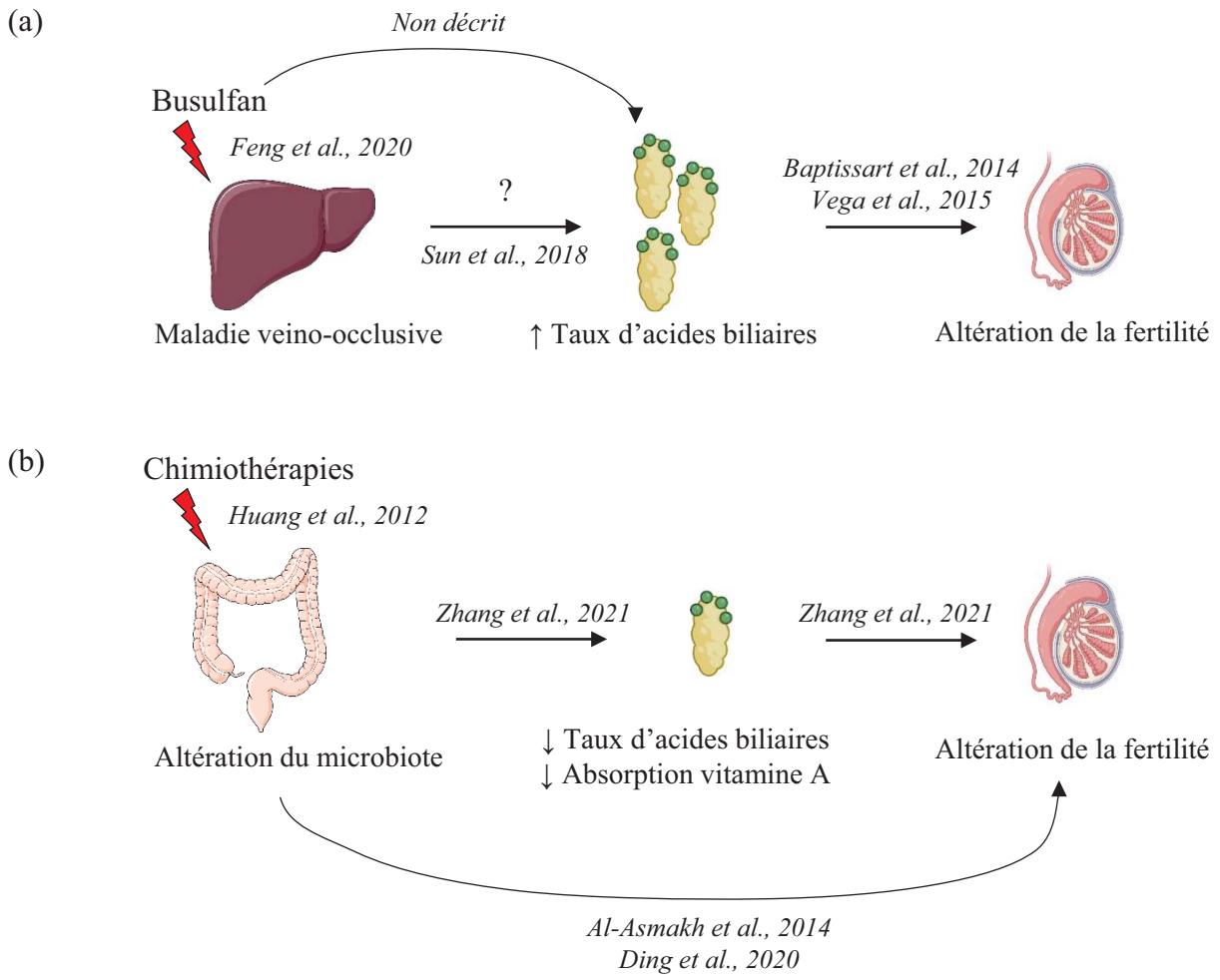


Figure 26 : Schéma bilan de la bibliographie sur l'impact du busulfan sur le foie et l'intestin.
(a) Il a été démontré que le busulfan conduisait au développement de maladies veino-occlusives (Feng et al., 2020). Chez un patient atteint de cette maladie, une augmentation des taux d'acides biliaires a été observée (Sun et al., 2018) bien que le lien entre les deux n'ait pas été décrit. Il n'existe aucun lien décrit entre le busulfan et une modulation des taux d'acides biliaires. Il a également été démontré que les acides biliaires conduisent à une altération de la fertilité (Baptissart et al., 2014 et Vega et al., 2015). Il serait donc important de s'affranchir des effets du busulfan sur le foie en réalisant une injection intra-testiculaire de busulfan.
(b) Les chimiothérapies entraînent une altération du microbiote intestinal (Huang et al., 2012) et la modulation du microbiote peut conduire à des défauts de fertilité (Al-Asmakh et al., 2014 et Ding et al., 2020). L'altération du microbiote peut également entraîner une diminution des taux d'acides biliaires associée à une diminution des taux d'absorption de la vitamine A conduisant à des altérations de la fertilité (Zhang et al., 2021). Il est majeur de mieux comprendre l'impact des chimiothérapies sur le microbiote et de savoir si l'altération du microbiote induite par une chimiothérapie entraîne une altération de la fertilité *via* les acides biliaires et la vitamine A.

l'expression de *Dnmt3b* dans les cellules germinales, entraînant une diminution de la méthylation de l'ADN. Cet effet est dépendant de TGR5 puisqu'il n'est pas retrouvé chez les souris invalidées pour *Tgr5*. La régulation de *Dnmt3b* par TGR5 pourrait donc constituer l'un des événements moléculaires initiateurs de l'altération de la qualité spermatique conduisant à des défauts sur plusieurs générations d'individus.

Avant de proposer en clinique la modulation de TGR5 afin de sauvegarder la fertilité après une chimiothérapie, il est donc primordial de connaître son impact sur la qualité des spermatozoïdes et sur la descendance sur plusieurs générations sur des modèles expérimentaux. Cela permettra de s'affranchir de défauts de qualité spermatique qui seraient susceptibles de conduire à la transmission transgénérationnelle d'anomalies.

5. Quel est l'impact du busulfan et le rôle de TGR5 sur les liens entre le foie, l'intestin et le testicule ?

Le rôle protecteur de l'invalidation de *Tgr5* après un traitement au busulfan implique la signalisation germinale de TGR5 étant donné que les souris invalidées pour *Tgr5* spécifiquement dans la lignée germinale ($Tgr5^{GC\text{-}KO}$) présentent un retour de la fertilité précoce par rapport aux individus sauvages. La question de savoir comment est mobilisée cette signalisation TGR5 en présence de busulfan se pose et permettrait de mieux comprendre son rôle.

Il est décrit que le busulfan a un impact important sur le foie ; il peut en effet entraîner une maladie veino-occlusive hépatique qui conduit à une obstruction des petites veines hépatiques (Feng et al., 2020). Une étude a mis en évidence que chez un patient présentant une maladie veino-occlusive hépatique une augmentation des taux d'acides biliaires était observée, cependant le lien direct de la pathologie sur les taux d'acides biliaires n'a pas été mis en évidence (Sun et al., 2018b). De plus, à l'heure actuelle, aucun lien n'a été mis en lumière entre un traitement au busulfan et une modulation des taux d'acides biliaires. Une relation importante ayant tout de même été mise en évidence entre le foie et le testicule, il est envisageable de considérer que le busulfan a un impact sur le testicule *via* un effet systémique impliquant des dérégulations au niveau hépatique (**Figure 26**). Afin de s'affranchir de ces effets, il serait intéressant de réaliser des injections de busulfan intra-testiculaires et non pas intra-péritonéales. Ainsi le busulfan n'aurait un impact direct que sur le testicule.

Au-delà de leur impact hépatique, de nombreuses molécules de chimiothérapie conduisent à des effets indésirables sur le microbiote intestinal (Huang et al., 2012). La modulation de celui-ci conduisant à des altérations de la fertilité (Al-Asmakh et al., 2014), il a été suggéré que l'impact délétère du busulfan sur la fertilité soit dépendant du microbiote (Zhao et al., 2020). En effet, la transplantation de microbiote fécal après une exposition au busulfan permet d'améliorer la spermatogenèse. Le microbiote joue un rôle majeur dans le métabolisme des acides biliaires en réalisant les réactions de déconjugaison et déhydroxylation qui permettent la production d'acides biliaires secondaires notamment. TGR5 étant principalement activé par les acides biliaires secondaires, il existe un lien majeur entre TGR5 et la modulation du microbiote intestinal. Le rôle protecteur de TGR5 sur la fertilité en réponse au busulfan pourrait alors dépendre de la modulation du microbiote par la chimiothérapie.

Cette hypothèse pourrait être élargie à d'autres pathologies ; en effet, en présence d'un syndrome métabolique (mimé par un régime riche en protéines), une altération de la spermatogenèse est observée et conduit à des troubles de la reproduction (Attaman et al., 2012). De même, il a été mis en évidence qu'un régime riche en protéines conduisait à une augmentation du nombre de tubes séminifères anormaux et à une diminution de la différenciation des spermatogonies (Zhang et al., 2021b). Ces effets sont associés à une diminution des taux d'acides biliaires, induite par une dérégulation du microbiote intestinal, qui entraîne une diminution de l'absorption de la vitamine A. Cette diminution des taux de vitamine A engendre des altérations méiotiques et conduit à une altération de la spermatogenèse et, à terme, de la fertilité (Zhang et al., 2021b).

Il a également été mis en évidence qu'un régime riche en graisses conduisait à l'infertilité *via* une modification du microbiote (Ding et al., 2020). En effet, lors d'une transplantation du microbiote intestinal d'une souris nourrie avec un régime riche en graisses chez une souris receveuse, une augmentation des taux des bactéries *Bacteroides* et *Prevotella* est observée dans les intestins. De manière intéressante, une corrélation inverse a été mise en évidence entre la quantité de *Bacteroides-Prevotella* et la mobilité des spermatozoïdes, ce qui permet de définir une des voies d'impact du microbiote sur la fertilité.

L'implication du microbiote (dont les acides biliaires secondaires sont les métabolites) dans notre modèle n'a pas été défini mais il serait important d'étudier l'impact du busulfan sur le microbiote et sur les taux de vitamine A (impliqué dans la méiose) chez des individus

sauvages ou invalidés pour *Tgr5*. Cela permettrait de confirmer ou non l'impact systémique de l'homéostasie des acides biliaires sur le testicule.

6. La modulation de TGR5 pourrait-elle être utilisée en thérapeutique ?

Les résultats présentés ici démontrent qu'après une injection unique de busulfan chez l'adulte, les souris invalidées pour *Tgr5* présentent une recolonisation précoce des tubes séminifères, conduisant à un retour de la fertilité plus rapide que chez les individus sauvages.

En clinique, les chimiothérapies telles que le busulfan sont majoritairement utilisées en cycles avec des expositions chroniques plutôt qu'avec une exposition aiguë, permettant d'améliorer leur efficacité. Le busulfan est principalement utilisé en exposition chronique, en combinaison avec la fludarabine ou le cyclophosphamide. Il est utilisé avec des doses moins importantes (3,2 mg/kg) que celles utilisées dans cette étude (15mg/kg) mais répétées sur 2 à 3 jours consécutifs lors d'une combinaison avec la fludarabine et sur 4 jours consécutifs avec le cyclophosphamide (Geddes et al., 2008) (Agence Nationale de Sécurité du Médicament). La dose finale utilisée est donc cohérente entre ce qui est utilisé en clinique et ce que nous avons réalisé dans notre modèle, bien qu'il soit possible qu'il y ait une différence entre une exposition aiguë et chronique. Un de nos questionnements majeurs concerne donc l'analyse des souris sauvages et invalidées pour *Tgr5* traitées de manière chronique au busulfan afin de confirmer ou non le fait que l'absence de *Tgr5* permet un redémarrage précoce de la spermatogenèse et donc de la fertilité par rapport aux individus sauvages dans un contexte plus proche de ce qui est réalisé en clinique.

L'efficacité des traitements de chimiothérapie est dépendante de la biodisponibilité de celles-ci, notamment de leur élimination et des mécanismes de détoxication mis en jeu. L'invalidation de *Tgr5* permet de minimiser les effets à long terme du busulfan sur la fertilité. De ce fait, la question du rôle de TGR5 sur la biodisponibilité du busulfan, notamment dans la détoxication, se pose. En effet, il serait intéressant de réaliser un dosage sanguin et testiculaire du busulfan chez les individus sauvages et invalidés pour *Tgr5* afin d'analyser le temps nécessaire à l'élimination du busulfan chez les individus invalidés pour *Tgr5*. Cependant, les résultats obtenus dans notre étude montrent que l'impact initial du busulfan sur la perte des cellules germinales (des spermatogonies aux spermatides) est le même dans les deux groupes d'individus (*Wt* et *Tgr5*$^{-/-}$) et que les premières différences ne sont observées que dans le redémarrage de la spermatogenèse deux semaines après traitement au busulfan. La demi-vie du

busulfan étant d'environ 3h (Almog et al., 2011), il semble peu probable que TGR5 soit impliqué dans la détoxication du busulfan.

Le rôle de TGR5 a été évalué en réponse au busulfan car il s'agit d'une molécule communément utilisée dans l'étude de la spermatogenèse, ce qui représente donc un modèle d'étude classique de celle-ci. Nos résultats ont mis en évidence que l'invalidation de *Tgr5* chez la souris permet de minimiser les effets du busulfan sur la spermatogenèse, ce qui soulève la question de l'impact de TGR5 en réponse à d'autres chimiothérapies.

Il existe différents types de chimiothérapie : les agents alkylants (cisplatine, busulfan), les antimétabolites (5-fluorouracile), les alcaloïdes végétaux, les inhibiteurs de la topoisomérase (etoposide), les antibiotiques antitumoraux (bléomycine), les inhibiteurs de facteurs de croissance ou encore l'hormonothérapie. Dans un premier temps il serait intéressant d'étudier le rôle de TGR5 après un traitement au cisplatine qui est, comme le busulfan, un agent alkylant mais qui est retrouvé dans la classe des sels de platine. Le cisplatine est connu pour avoir un impact délétère majeur sur le testicule et la fertilité, il est également utilisé de manière très large dans le traitement de nombreux cancers. Son impact concerne donc un nombre de patients important. Dans un second temps, l'analyse du rôle de TGR5 en réponse à un antimétabolite tel que le 5-fluorouracile permettrait de comprendre si le rôle protecteur de TGR5 peut être retrouvé en réponse à d'autres molécules qui présentent des caractéristiques plus éloignées des agents alkylants. Il est cependant important de noter que les chimiothérapies de type anti-métabolites conduisent uniquement à des diminutions temporaires du nombre de spermatozoïdes, les agents alkylants étant les molécules ayant l'impact le plus important sur la spermatogenèse et la fertilité (Vakalopoulos et al., 2015). Dans un dernier temps, le rôle de TGR5 en réponse à des cocktails de chimiothérapies pourrait être étudié. En effet, fréquemment, plusieurs chimiothérapies sont utilisées en combinaison afin d'améliorer l'efficacité de celles-ci en ciblant plusieurs mécanismes à la fois. Il serait notamment intéressant d'étudier l'impact de TGR5 en réponse à un traitement au BEP (bléomycine, étoposide et cisplatine) qui représente le traitement standard des cancers germino-testiculaires (Williams et al., 1987).

Les résultats obtenus avec un régime supplémenté en acide cholique, concomitant au traitement au busulfan, suggèrent que dans le cadre de traitements du cancer germino-testiculaire la présence d'un fort taux d'acides biliaires pourrait augmenter l'efficacité du traitement en entraînant une mort plus importante des cellules et qui perdure dans le temps. Il serait intéressant de réaliser une analyse de souris traitées au BEP et avec un agoniste de TGR5

de manière vectorisée pour cibler les cellules tumorales. La vectorisation d'un agoniste de TGR5 consiste à associer la molécule agoniste avec un vecteur qui sera capable de reconnaître le tissu ou les cellules d'intérêt afin de cibler ce type cellulaire pour délivrer l'agoniste. Cela permettrait de comprendre si l'activation de TGR5 peut améliorer l'efficacité des traitements anti-cancéreux, notamment dans le cadre de tumeurs résistantes aux chimiothérapies.

Le busulfan est principalement utilisé avant une transplantation de moelle osseuse, dans le cadre de leucémies ou de lymphomes. Ces cancers étant ceux les plus fréquents chez les enfants, le busulfan est donc couramment utilisé chez des garçons avant leur puberté, lorsque la préservation de spermatozoïdes n'est pas envisageable puisqu'ils ne présentent que des spermatogonies et aucune cellule méiotique ni post-méiotique. Étant donné les avancées majeures dans les traitements anti-cancéreux depuis plusieurs années, la survie des enfants atteints de cancer est en forte augmentation (Steliarova-Foucher et al.). Il est donc important d'améliorer les traitements afin de minimiser leurs effets secondaires sur la qualité de vie.

Il a été démontré que 69 % des patients traités avec une chimiothérapie (qu'il s'agisse de busulfan ou d'autres chimiothérapies telles que le melphalan) avant une transplantation hématopoïétique de cellules souches ont un risque accru d'azoospermie persistante (Borgmann-Staudt et al., 2012). De plus, un traitement au busulfan chez des individus prépubères conduit selon la dose à un retard de la puberté chez environ 10 % des patients (Weinhard et al., 2020), à une diminution de la fertilité sur le long terme voire à une stérilité à long terme. Dans le cas d'un traitement au busulfan chez le jeune, il serait pertinent de comprendre si le rôle de TGR5 est conservé. Cela placerait TGR5 comme une cible afin de préserver la fertilité des patients traités avec une chimiothérapie avant la puberté dont la préservation de la fertilité n'est actuellement pas possible.

Article 2

TGR5 is a potential actor of tumoral process in testicular germ cell cancers. En preparation.
Laura Thirouard, Hélène Holota, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Emanuelle Martinot, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H Volle.

A. Introduction

Le cancer germino-testiculaire est un cancer rare, touchant environ 1 % des hommes. Il s'agit cependant du cancer le plus commun chez l'adolescent et l'homme jeune (Adami et al., 1994) et son incidence est en augmentation depuis de nombreuses années. Les tumeurs germino-testiculaires (TGTs) ont une origine commune : les néoplasies germinales *in situ* (GCNIS), qui proviennent des PGCs ou des gonocytes qui se transformeraient en néoplasie au cours du développement embryonnaire. Les GCNIS sont composés de cellules proches des PGCs et des gonocytes qui partagent l'expression de nombreux marqueurs de pluripotence, tels que OCT3/4 ou NANOG (Kristensen et al., 2008). Les résultats obtenus précédemment (Thirouard et al., Article 1) suggèrent un rôle majeur de TGR5 dans l'homéostasie des cellules germinales indifférenciées. Par conséquent, les travaux réalisés dans cette étude visent à comprendre les rôles de TGR5 dans le cancer germino-testiculaire, dans l'étiologie mais également dans la chimiorésistance. Chez l'homme, 10 à 15 % des patients atteints de TGTs présentent une chimiorésistance dont les mécanismes sont peu connus, il est donc primordial de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu.

Dans la lignée de spermatogonies murines GC1-spg, le *knock-down* ou l'invalidation de *Tgr5* entraîne une augmentation de l'accumulation des transcrits de *Gfra1*, *Nanog* et *Fgfr2*, démontrant que TGR5 régule l'expression de gènes de cellules indifférenciées et qu'il existe une corrélation inverse entre l'expression de *Tgr5* et celle de ces gènes. Une étude à partir de données disponibles *via The Cancer Genome Atlas* (TCGA) a été réalisée, où 137 échantillons de TGTs, caractérisés de manière précise d'un point de vue moléculaire, sont retrouvés (Shen et al., 2018). Les analyses de ces données montrent dans les séminomes comme dans les non-séminomes une corrélation inverse entre l'expression de *TGR5* et celle de *NANOG*, ainsi qu'entre *TGR5* et *OCT3/4* uniquement dans les échantillons de type non-séminome. De plus, une corrélation positive est observée entre l'expression de *TGR5* et celle de *GFRA1* et *GLIS2*. L'ensemble de ces gènes (*NANOG*, *OCT3/4*, *GFRA1* et *GLIS2*) est associé à la pluripotence des cellules. La dérégulation de l'expression des gènes de pluripotence étant à l'origine des

TGTs, la question de l'implication de TGR5 dans ce processus s'est posée. L'analyse d'échantillons sains et tumoraux a permis de mettre en évidence que l'accumulation des transcrits de *TGR5* est diminuée dans les échantillons de biopsie de cancer testiculaire par rapport à des tissus sains. De plus, les données issues de l'analyse des échantillons de la cohorte de TCGA montrent qu'au sein des TGTs l'expression de *TGR5* est plus importante dans les échantillons de non-séminomes par rapport aux échantillons de séminomes.

Par ailleurs, ces analyses *in silico* ont permis de mettre en évidence que l'expression de *TGR5* est corrélée positivement avec la méthylation des ilots CpG dans l'ensemble des types de TGTs. De manière intéressante, une corrélation inverse est observée entre les transcriptomes associés à l'expression de *TGR5* et de *OCT3/4*, ou de *NANOG*, ou de *DNMT3B* (*DNA Methyltransferase 3 Beta*) dans les échantillons de séminomes ainsi que de non-séminomes. De plus, il existe une corrélation positive entre les transcriptomes associés à *TGR5* et à *KDM6B* (*Histone Lysine Demethylase 6B*) dans les échantillons de type non-séminome.

L'ensemble des analyses réalisées *in silico* ne permettent pas de s'affranchir de biais dû à la cellularité ; de ce fait, des lignées cellulaires tumorales humaines de type non-séminome (NCCIT) invalidées pour *TGR5* ont été générées et évaluées *in vitro* par rapport à la lignée cellulaire parentale afin de mieux comprendre le rôle de TGR5 dans les TGTs. Deux clones de NCCIT *Tgr5*^{KO} ont été étudiés, les corrélations observées *in silico* sont cohérentes avec ce qui a été observé sur les deux clones pour *NANOG* et les corrélations associées à *DNMT3B* et *OCT3/4* ont été observées sur un seul de ces clones. Il existe donc une différence selon les clones de NCCIT utilisés mais de manière générale, et parallèlement à ce qui a été observé dans les cellules murines GC1-spg, l'invalidation du gène codant pour TGR5 semble être associée à une augmentation de l'accumulation des transcrits de gènes retrouvés dans les cellules indifférenciées. A l'inverse de ce qui a été démontré *in silico* entre les transcriptomes de *TGR5* et *KDM6B*, une corrélation négative est observée entre l'expression de ces deux gènes dans les deux clones de NCCIT. De plus, *in silico* il a été observé une corrélation positive dans les échantillons de type non-séminomes entre *TGR5* et *GFRA1* et entre *TGR5* et *GLIS2*, alors qu'une corrélation négative est observée entre *TGR5* et ces gènes dans les cellules NCCIT. Il est important de noter qu'il existe une cellularité importante dans les échantillons *in vivo* utilisés dans les bases de données de TCGA pouvant expliquer les différences observées *in silico* par rapport aux analyses réalisées dans les cellules NCCIT.

Au-delà des analyses transcriptomiques réalisées *in silico* et des analyses par qPCR *in vitro*, nos résultats démontrent que l'invalidation de *TGR5* entraîne une diminution de la prolifération des cellules NCCIT, suggérant que TGR5 pourrait jouer sur les caractéristiques clés tumorales des TGTs.

Par ailleurs, notre première étude (Thirouard et al., Article 1) a permis de mettre en évidence une association importante entre les voies de signalisation TGR5 – GLIS2 – TP53 dans les cellules germinales. Des analyses *in silico*, issues des échantillons de la cohorte de TCGA, ont permis de confirmer que l'association entre ces voies de signalisation est conservée dans les TGTs, mais également dans d'autres cancers, démontrant ainsi que ces acteurs sont associés dans les cancers de manière plus générale.

Les résultats obtenus lors de notre première étude ont démontré que l'activation de TGR5 par son agoniste permettait de chimiosensibiliser les cellules germinales saines au busulfan. Cette chimiosensibilisation est conservée dans des cellules tumorales humaines de type non-séminome (NCCIT).

L'ensemble de ce travail suggère que TGR5 pourrait être un acteur clé des TGTs et que sa modulation pourrait être associée à la chimiosensibilité ou la chimiorésistance des TGTs.

TGR5 is a potential actor of tumoral process in testicular germ cell cancers.

Thirouard Laura[1*], Holota Hélène[1*], Monrose Mélusine[1], Garcia Manon[1], Martinot Emmanuelle[1], De Haze Angélique[1], Saru Jean-Paul[1], Caira Françoise[1], Beaudoin Claude[1] and Volle David H.[1#]

[1] INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, iGReD, team-Volle, F-63001 Clermont–Ferrand, France.

* These authors equally contributed to this work.

 # Correspondance. D.H. VOLLE. INSERM U1103, CNRS UMR-6293, UCA, iGReD, 28 place Henri Dunant, TSA 50400, 63037 Clermont-Ferrand, France.
Email address: david.volle@inserm.fr.

Running title: TGR5 & testicular germ cell cancer.

Key words: TGR5, testicular germ cell cancer, etiology, chemoresistance.

Disclosure. The authors declare to have no conflict of interests.

Grant supports. The study was funded by Inserm; CNRS; Université Clermont Auvergne; Plan cancer (C14012CS), Cancer Inserm (C20010CS); Ligue contre le cancer (comité Puy de Dôme); ARC (R16142CC). *Fondation Recherche Médicale* (FDT202001010780). Volle's team received supports by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

Abstract.

Testicular cancer is a rare solid tumor that accounts for 1% of cancers in men. Testicular germ cell tumors (TGCT) are the most frequently diagnosed cancer in young men (15-39 years) and their incidence has been steadily increasing over the past 30 years in most industrialized countries. The initial lesion, intratubular germ cell neoplasm *in situ* (GCNIS), originates from impairments of gonocyte homeostasis as a result of alterations in the processes of proliferation, cell survival and/or differentiation. These GCNIS express pluripotency genes such as *OCT3/4* and *NANOG*. Over the years, early fetal origin of the disease has been suggested. However, the etiology of TGCT remains elusive. Recently, the bile acid receptor TGR5 has been defined to control germ cell line homeostasis. In addition, TGR5 also controls the chemosensitivity of mouse germ cells. Therefore, we hypothesized that in human, TGR5 may be involved in the initiation, development or resistance to treatment of testicular germ cell cancer. *In silico* analyses of the public TCGA dataset from cohorts of TGCT patients support the link between the TGR5 signaling pathway and pluripotency gene networks such as *NANOG* and *OCT3/4* as well as genes involved in epigenetic processing including *KDM6B* and *DNMT3B*. Some of these data have been validated using the human NCCIT cell line derived from non-seminomatous tumors. We also highlight connections between TGR5-GLIS2 and TP53 with potential impacts on chemosensitivity. Further studies will be necessary to confront these data with human biological samples and validate the relevance of our approach for transfer to clinical applications for patient management.

Introduction

Testicular cancer is a rare solid tumor that accounts for 1% of all cancers in men. In 95% of cases, testicular cancers originate from germinal cells; the remaining 5% are derived from somatic cells[1]. Testicular germ cell tumors (TGCTs) make up 0.5% of pediatric malignancies, 14% of adolescent malignancies, and are the most common malignancies in young adult men[2]. 60% of TGCT correspond to seminomatous germ cell tumors (SGCT) and 40% to non-seminomatous germ cell tumors (NSGCT)[3]. If the composition of the SGCT is homogenous at the macroscopic level, that of the NSGCT is much more heterogeneous becoming closer to the undifferentiated embryonic tissues (embryonal carcinomas) or differentiated ones with the formation of specialized tissues derived from the early embryo (teratomas) or extraembryonic tissues such as yolk sac (yolk sac tumors) or placenta (choriocarcinomas). Several serum markers are used for the diagnosis and classification of TGCT such as the alpha feto-protein, the chorionic gonadotropin and lactate dehydrogenase[4].

The incidence of TGCT has been increasing throughout Europe over the last 30 years including France, where the annual incident rate has doubled from 3.4/100 000 in 1980 to 7/100 000 in 2008[5]. Wide discrepancies in incidence exist between European countries[6]. Of the major influences described, ethnicity and familial history of TGCT are known to be associated with increased TGCT risk. It is estimated that 40% of TGCT are of genetic origin[7,8]. In addition, several polymorphisms have been identified as risk factors. KIT, TP53, KRAS/NRAS and BRAF are among the most often mutated genes in TGCT. Due to the increase of incidence over the last decades and the discrepancy between countries, exogenous chemicals with endocrine disrupting properties have also been suggested to influence the development of TGCT[9,10].

Most of these TGCT are thought to derive from intratubular germ cell neoplasia *in situ* (GCNIS)[11]. GCNIS consist of cells similar to fetal gonocytes, from a morphological point of view as well as gene expression. Indeed, they express factors of pluripotent cells such as *OCT3/4* (*POU5F1*) or *NANOG*[12]; which have been demonstrated to sustain embryonic stem cell self-renewal. In that line, it has been suggested that *OCT-3/4* must be involved in the genesis of TGCT, influencing the ES cells' oncogenic/malignant potential[13].

The generally accepted etiology for germ cell cancer suggests that disruption of the natural formation of spermatogonial stem cells and/or their niche is the cause of GCNIS[14]. This is sustained by the fact that, as fetal germ cells, GCNIS and seminoma (none differentiated TGCT) exhibit low levels of DNA methylation and permissive chromatin structure associated with high transcriptional and proliferative activity. In addition, the disturbances in the microenvironment provided by the Sertoli and Leydig cells may play a role as spermatogenesis strictly depends on signals provided by the local environment within the spermatogonial stem cell niche[15, 16,17].

The above data highlight that modulations of the processes controlling cell fate are key events for the development of tumors[18,19]. Thus, the analysis of factors involved in the control of germ cell differentiation is of major importance to better decipher the mechanisms of TGCT biology, from etiology to treatment resistance. Recently, the G-protein-coupled bile acid receptor, TGR5 (GPBAR-1) was demonstrated to be expressed in germ cell lineage[20] and particularly in undifferentiated spermatogonia (Thirouard 1st paper of the thesis manuscript). Consistently, analyses of published single-cell data showed that TGR5 was observed in mouse and human spermatogonia (Supplemental data in [21,22]). In these studies, *TGR5* expression appeared to be significantly modulated in pseudotime analyses, defining *TGR5* to belong to a group of genes of undifferentiated germ cells (Supplemental data in [21]). TGR5 was also found in early genes along the trajectory of spermatogonia representing a pattern consistent with SSC specification (Supplemental data in [22]). These data suggest that within undifferentiated germ cells (PCG to spermatogonia), TGR5 might be involved in transition phase from one step to another controlling proliferation and/or differentiation processes. Due to this particular expression pattern, we decided to analyze whether modulation of TGR5 expression and/or activity could be correlated with TGCT.

To define the potential effects of TGR5 signaling pathways on germ cell tumors, we used a combination of *in vitro* and pharmological approaches with bioinformatics analyses. We demonstrate that TGR5 regulates the expression of genes of undifferentiated spermatogonia in mouse. Moreover, our data show that *TGR5* mRNA accumulation is decreased in human tumoral testicular germ cell biopsies compared to normal tissues. We showed an inverse correlation between TGR5's expression and the ones of pluripotency genes that reinforced the idea of the role of TGR5 in TGCT. Analysis of public database of testicular germ cell cancers showed that *TGR5* is quite low expressed in both seminomas and non-seminomas compared to normal testicular tissue. *In silico* analyses confirmed that *TGR5* expression is inversely correlated with gene networks associated with pluripotency genes such as *OCT3/4* and *NANOG*. In addition, there was also an association between *TGR5* associated gene network and those of actors involved in epigenetic processes such as DNMT3B and KDM6B. We also highlight connections between TGR5-GLIS2 and TP53 with potential impacts on xenobiotic metabolism. Most of these data were corroborated using a TGR5-deficient models generated using Crispr/CAS9 system on the human non-seminomatous cell line NCCIT. All these data highlight that TGR5 is a promising target to focus on in human testicular germ cell cancers.

Results

TGR5 mRNA accumulation is low in human TGCT biopsies

Results of our previous paper suggest that in the context of the exposure to chemotherapy drug, namely busulfan, TGR5 signaling pathway controls the expression of genes involved in germ cell self-renewal such as *Gfra1* and *Fgfr2* (Thirouard et al. submitted & **Figure 1A**). Here using siRNA based approach, we demonstrated that knowck-down of *Tgr5* led to an increase of the mRNA accumulation of *Gfra1*, *Fgfr2*, *Glis2* as well as *Nanog* and *Id4* (**Figure 1A**).

The above data suggest a putative negative correlation between *TGR5* expression and those of genes expressed in undifferentiated spermatogonia. Deregulation of pluripotency genes is a well-characterized feature of testicular germ cell tumors (TGCT) as highlighted by the increase of *NANOG* and *OCT3/4* compared to control tissues (**Figure 1B)**. The validity of the samples was confirmed by the increased mRNA accumulations of *CCND2* and *KIT* in tumor samples compared to control ones (**Figure 1B)**. We wondered whether *TGR5* mRNA accumulation could be affected in TGCT. Analysis of testicular gem cell cancers biopsies showed that there was a decrease of *TGR5* mRNA accumulation in TGCT compared to normal tissues (**Figure 1B)**. Data also showed an inverse correlation gradient between *TGR5* and *NANOG* and *OCT3/4* between normal tissue and TGCT, but also within TGCT subtypes. Indeed, the expression levels of *NANOG* and *OCT3/4* was decreased with differentiation in the TGCT (compare Seminoma and teratoma) whereas *TGR5* as an opposite pattern (**Figure 1B)**. Moreover, these results were confirmed by comparing the different types of TGCT through the analyses of public available data of The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) of TGCT using either GEPIA2 or Cbioportal softwares. Indeed, a lower expression of TGR5 was observed in seminoma compared to non-seminoma samples (**Figure 1C**).

Regarding the overall TGCT samples, results showed that no significant enrichment of *TGR5* mutation rate was observed among TGCT samples. No correlation between TGR5 and familial history of cancers (**Figure 2A**) or fraction of genome alterations (**Figure 2A**) was defined. In addition, *TGR5* mRNA accumulation was not associated with leucocytes infiltration (**Figure 2A**). Using the combined Cbioportal and GEPIA2 analyses, when all samples (seminomas and non-seminomas) were analyzed, no clear correlation was observed between *TGR5* mRNA expression levels and the mRNA expression levels of *CBL*, *KITL*, *NRAS* and *KRAS*, key genes involved in TGCT (**Figure 2B**). In contrast, a correlation was noticed between CpG DNA methylation levels and *TGR5* mRNA expression (**Figure 2C**). This correlation between TGR5 expression and DNA methylation was observed in both seminoma and non-seminoma (**Figure 2C**).

TGR5 gene network is associated with extracellular matrix in human TGCT biopsies

Then we moved forward to analyze genes that were correlated with the expression of TGR5 within seminoma and/or non-seminoma. For that kind of analysis, we arbitrarily used the median value of TGR5 to define samples with low and high expression as proposed by GEPIA2 software for some analyses (**Figure 3A**). Data showed that 1569 genes were correlated with the mRNA accumulation of TGR5 (Fold >2 and $p<0.05$) (**Table S1**).

The analysis using GeneOntolgy for the genes correlated with TGR5 in all TGCT (seminoma and non-seminoma) revealed the enrichment in genes associated with interesting points such as extracellular matrix, retinol metabolism, xenobiotic metabolism well as bile secretion (**Figure 3B & 3C**). Interestingly, the analysis of the list of genes associated with TGR5 showed interactions with genes related to estrogen receptor 2, growth factor (EGF), TP53 signaling pathways (**Figure 3D**) that must be interesting target to understand the role of TGR5 in the biology of TGCT.

We next decided to move forward through the analysis, within the TCGA data, of mRNA accumulations of specific genes and their comparison with the one of TGR5.

TGR5 gene network crosstalks with OCT3/4 and NANOG gene networks in human TGCT biopsies

Validation of TGCT samples using qPCR showed inverse expression pattern between pluripotency genes *NANOG* and *OCT3/4* and *TGR5* (**Figure 1B**). We decided to analyze public available data set of TGCT from TCGA cohort with a focus on the link between *TGR5*, *OCT3/4* and *NANOG*. Consistent with the data obtained from the samples analyzed by qPCR, the TCGA database confirmed that *TGR5* mRNA accumulation showed an opposite accumulation pattern compared to pluripotency genes such as *OCT3/4* and *NANOG* both in seminoma and non-seminoma TGCT (**Table 1**) (note that data were consistent using either GEPIA2 or Cbioportal). This sustains the idea of an inverse correlation between TGR5 and pluripotency.

To go further, we have defined the genes associated with the mRNA accumulation of *OCT3/4* or *NANOG* and then compared them with those associated with *TGR5*. Inverse correlation between genes associated with *TGR5* and *OCT3/4* or *NANOG* was observed (**Figure 4A**). Interestingly, the crosstalk between genes associated with *TGR5*, *NANOG* or *OTC3/4* was observed in all TGCT sub-types, seminoma and non-seminoma. The maximum of overlap was observed for genes positively correlated with *TGR5* and those that were negatively correlated to *OCT3/4* and *NANOG* (**Figure 4A**).

The GeneOntology analysis of these common genes highlighted roles in DNA synthesis, maintenance of telomeres in links with genes associated with Cajal Bodies. These

later could be involved in RNA-related metabolic processes, histone mRNA processing and the maintenance of telomeres. These common genes showed an enrichment of proteins chaperonin domains. Analyses showed that the enriched pathways relied on actin folding but also on beta-oxidation of pristanoyl-CoA, which gives raise molecules of propionyl-CoA, acetyl-CoA and of isobutyryl-CoA. Even thus it is not completely clear this metabolic pathway has been potentially involved in metabolic change during oncogenesis.

Some genes interacting with *NANOG*, *OCT3/4* and *TGR5* also interact with vir-like m^6A methyltransferase-associated (VIRMA, also called KIAA1429). It is part of the m^6A multicomponent methyltransferase complexes. The m^6A RNA methylation has already been associated with tumoral process. This clearly opens a new link between TGR5 and tumoral process.

Analysis of the list of these common genes using iCisTarget revealed as potential regulator of their expression the HNF family among which the HNF1B factor. It is interesting to note that HNF1B was one of the genes that were correlated with TGR5. It could thus be hypothesized that TGR5 through the regulation of HNF1B to modulate the gene networks associated with *NANOG* and *OCT3/4*.

TGR5 is negatively correlated with DNMT3B in human TGCT biopsies

As mentioned previously, TGR5 expression level was correlated with DNA methylation (**Figure 2C**). Correlation analysis showed no correlation between TGR5 and the expression of the members of the DNA methyltransferase family; even for DNMT3B (**Table S1**).

However, as we have previously demonstrated that TGR5 controls the expression of *Dnmt3b* in mouse germ cell lineage[23]; and it has been demonstrated that patients with seminomas showing focal *DNMT3B* expression are at increased risk of relapse[24]; we thus decided to analyze a potential association between *TGR5* and *DNMT3B* through the analysis of data set of TGCT from TCGA public available dataset. Regarding the overall genes correlated with *DNMT3B* in all TGCT, seminoma or non-seminoma, even if the respective repartitions varied from each subtypes, data showed and inverse correlation between the gene network associated with *TGR5* and those associated with *DNMT3B* (**Figure 4B**). No crosstalk was observed in genes negatively correlated with *TGR5* and those negatively correlated with *DNMT3B* (**data not shown**). It is interesting to note that the main overlaps were observed between genes positively correlated with *TGR5* and those negatively correlated with *DNMT3B* as revealed in the specific study of seminoma (**Figure 4B**). Then GeneOntology analysis revealed that these common genes were identified to be mainly involved in reproductive processes, and at the cellular levels to extracellular regulation process. We went further analyzing potential transcriptional regulators using using the

ICisTarget software. Next to associations with alterations of histone modifications (H3K27me3 or histones acetylation), analyses gave quite a lot of putative transcriptional regulators of these common genes among which YWHAE, FOXO1, TBF1 and RARα. It would be of interest to analyze the putative links between TGR5 and these transcription factors to decipher whether they could play a role in the tumor processes.

TGR5 gene network is correlated with KDM6B in human TGCT biopsies

The presence of *KDM6B* alterations are associated with lower survival rate in patients (p = 0.00907) [25]. It has been demonstrated in ES cells and in different cancer types that KDM6B regulates the expression of genes such as *OCT3/4* and *NANOG*[26]. As opposite expression patterns have been identified between *OCT3/4*, *NANOG* and *TGR5* in TGCT, we wondered whether a link between *KDM6B* and *TGR5* might exist in TGCT. We have analyzed the public available data set of TGCT from TCGA. Interestingly, when analyzing all non-seminoma, a positive correlation of transcriptomes associated between *TGR5* and *KDM6B* was observed, which showed that a huge majority of the genes correlated with *TGR5* overlapped with those associated with *KDM6B* (**Figure 4C**). This data clearly suggests that a crosstalk might exist between both signaling pathways. In contrast, even if very few genes were correlated with *KDM6B* in seminoma, the association of both associated transcriptomes (associated with *TGR5* or *KDM6B*) was in an opposite manner. This data showed a quite more complex mechanism that must be different between TGCT subtypes.

Focusing on non-seminoma, GeneOntology analysis revealed groups involved in development, hormone homeostasis and cell fate. Common genes between *TGR5* and *KDM6B* referred to enriched proteins with cadherin and homeobox domains. The enriched pathways dealt with extracellular matrix, retinol, metabolism and bile secretion.

ICisTarget analyses revealed potential regulation by H3K27me3 as expected by the fact that KDM6B is the H3K27me3 demethylase. Moreover, it revealed that a potential transcriptional regulator of their expression could be the HNF1 family such as HNF1A and HNF1B. This overlap with the results found with TGR5, what was not surprising as 95% of the KDM6B correlated genes matched with those of TGR5.

TGR5, GLIS2 and TP53 pathways are associated in human testicular germ cell cancers.

To determine whether the effect of the TGR5 signaling pathway and its interference with chemotherapies as Bu in GC1spg cells (Thirouard et al. first article of this thesis) could be observed in human cells, experiments were performed in the NCCIT human non-seminoma tumor germ cell line. As with the GC1spg cell line, NCCIT cells were pretreated 24

hours with INT-777 and then with Bu for 24 hours. No impact of Bu or INT-777 alone was observed on NCCIT (**Figure 5A**). Results showed that the cell numbers were lower when cells were exposed to INT-777 and Bu (**Figure 5A**). These data suggest that TGR5 signaling pathway also modified chemosensitivity in human tumor cell line.

In the first paper from Thirouard *et al.* (this thesis manuscript), we have identified in mice that TGR5, GLIS2 and TP53 are three interconnected factors involved in germ cell resistance or sensitivity to chemotherapy exposures. To determine whether TGR5-GLIS2-TP53 axis could exist in human testicular germ cell cancer (TGCT), we analyzed the published and publicly available RNAseq database of the TCGA cohort using cBioportal website. We chose the median level of their respective expression to define samples with low or high expression. Analyses were performed in TGCTs. We defined the lists of genes that were associated with *TGR5* (**Table S2A**), *GLIS2* (**Table S2B**) or *TP53* (**Table S2C**). Significant overlap was observed between the genes associated with *TGR5* and *GLIS2* or *TGR5* and *TP53*. 88% of the genes associated with *GLIS2* were common with those of *TGR5*, and 76% of the genes associated with *TP53* were common with those of *TGR5* (**Figure 5B & 5C**). A total of 262 genes were correlated with the 3 markers representing 16%, 26% and 72% of the genes associated with *TGR5*, *GLIS2* or *TP53* respectively (**Figure 5B**). The crosstalk between these pathways were highlighted by the schematic representation of the percentage of the overlaps between *TGR5* associated genes and those of *GLIS2* and/or *TP53* (**Figure 5C**), and the percentage of the overlaps between *GLIS2* associated genes with those of *TGR5* and/or *TP53* (**Figure 5D**), or the percentage of the overlaps between TP53 associated genes and those of *TGR5* and/or *GLIS2* (**Figure 5E**).

Using Human-mine online software, analyses of gene list of genes associated with TGR5 by the KEGG pathways showed that the enriched pathways referred to cytochrome P450 metabolism of xenobiotics (p=0.0015) and drug metabolism (p=0.001) (**Figure 5F**). Interestingly, the analysis of the TGR5 list *per se* revealed interaction with TP53 signaling pathway (**Figure 3D**). These data clearly support the potential implication of this cascade on chemo-resistance/susceptibility. Then, analysis of the enrichment of the gene list of genes associated with TGR5-GLIS2 and TP53 by the KEGG pathway showed enriched pathways with xenobiotic and drug metabolism (**Figure 5F**).

To define whether this TGR5-GLIS2-TP53 axis could be extended to other tissues, using RNAseq database of the TCGA cohort, primary tumor analysis showed that all three targets (TGR5, GLIS2 and TP53) were expressed and enriched in many tumors, including esophagus, pancreas and colon (**Figures 6A, B, C**). In esophageal cancers, the TGR5-GLIS2-TP53 cascade appears to be very well conserved. 38% of the GLIS2 genes and 90% of the TP53 genes were correlated with those of TGR5 (**Figure 6A**). In pancreatic cancers, 25% of the GLIS2 genes and 20% of the TP53 associated genes were correlated with those

of TGR5 (**Figure 6B**). In contrast, analysis of colon cancer samples revealed a strong interference between TGR5 and GLIS2, as 37% of the genes were overlapping; in contrast, only 5% of the genes correlated with TP53 correlated with those of TGR5 (**Figure 6C**). Combined, these data supported the observation of a strong association of the TGR5 and GLIS2 pathways in tumor tissues. It also appears that these pathways are frequently associated with TP53 modulation.

TGR5 expression alters proliferation process in human non-seminoma tumor NCCIT cell line.

All the previous analyses on TCGA database could mainly reflect some cellularity. To decipher whether the observed association between TGR5, NANOG, OCT3/4, KDM6B and DNMT3B could be due to transcriptional regulations, we have generated Crispr/CAS9 knockout clones of TGR5 using the human non-seminoma cell line NCCIT. Here we show data from 2 different NCCIT$^{TGR5\text{-}KO}$ clones (P2D7 and P1G6) (**Supplemental Fig.1**)

The obtained clones were validated by qPCR for *TGR5* mRNA accumulation (**data not shown**). We also confirmed that correlations observed on TCGA samples analyses were confirmed by expression patterns of *GFRA1*, *NANOG* and *DNMT3B* in the P1G6 clone whereas validation of correlation was observed for *GFRA1*, *NANOG*, *OCT3/4* and *ID4* in the P2D7 clone (**Figure 7**). These data highlighted some differences between the clones but defined in the overall that, as in the GC1spg cells, the *TGR5* KO was associated with a higher mRNA accumulation of undifferentiated genes in the human NCCIT cell line (**Figure 7**). It is interesting to note that gene expressions between WT and KO cell lines could be modulated in the presence or absence of serum in the culture medium suggesting potential crosstalk between TGR5 and signaling pathway of growth factors.

We observed in both clones a negative association between the expression of TGR5 and KDM6B in NCCIT cells (**Figure 7**). Indeed the expression of KDM6B was increased in NCCIT$^{TGR5\text{-}KO}$ cells compared to parental ones (**Figure 7**). This result was quite intriguing as a positive correlation between transcriptomes was observed between TGR5 and KDM6B in the TCGA cohort of TGCT non-seminoma samples. However, a negative correlation of TGR5 and KDM6B gene networks was observed in seminoma samples. Thus it could be hypothesized that NCCIT$^{TGR5\text{-}KO}$ cells could have derived from non-seminoma to seminoma pattern.

Even if it will need a deep study, these preliminary data suggest that we do have a good model to analyze the role of TGR5 at least in non-seminoma tumors. To first define the role of TGR5 on TGCT we analyzed the characteristic of our cell lines. Unexpectedly, if NCCIT$^{TGR5\text{-}KO}$ expressed higher levels of NANOG, these cells showed a lower proliferation rate than parental NCCIT cell line. Indeed, 48 hours after plating, there was around half-cell

number of KO cells compared to parental cell line as validated by cell count and experiments using BrdU incorporation (**Figure 8A & 8B**). This effect was observed in both complete or serum depleted medium. So far, this result remains quite intriguing; but it is quite interesting, as seminoma samples tend *to* grow slower than non-seminomas. Based these data, it could reinforced our hypothesis that cells moved from non-seminoma to seminoma.

TGR5 signaling pathway is efficient in NCITT cell line.

In order to define the potential impact of the inhibition of TGR5 signaling pathway using another approach that genetic invalidation, we decided to use a TGR5 antagonist, namely SBI-115 [27]. Data showed that 3 hours exposure to SBI-115, either at 3 or 6µM, led to an increase of GLIS2, DNMT3B, ID4, KDM6B and OCT3/4 in parental NCCIT and not in $NCCIT^{TGR5KO}$ **(Figure 9**). Note that these effects of SBI-115 were not observed under conditions where a 12-hour serum pre-weaning was not performed. Once again these data suggest a crosstalk between TGR5 and growth factors signaling pathways.

To better decipher the role of TGR5 in NCCIT, we used the specific synthetic agonist INT-777. Treatment of NCCIT cell line led to a very slight but significant increase of the Phospho-CREB/CREB following 30 minute or 1 hour exposure with INT-777 either in serum free on complete medium **(Figure 10)**. However, we were not able to show significant modulation of gene expression. We have to work on dose and time experiments; or even try other TGR5 agonist such as the RO agonist [28]. But the difficulty to visualize the effect of TGR5 activation could be due to the fact that the level of Phospho-CREB was very high in basal level in NCCIT. It could be of interest to decrease the level of P-CREB (using drugs or siRNA) in order to visualize gene expression modulation following the treatment with INT-777.

Discussion.

In the last decades, the overall incidence of TGCT has increased. Although incidence rates have stabilized in the highest-risk European countries, large increases have been observed in the lowest-risk countries. The number of patients with testicular cancer is expected to increase in 20 of 28 countries by 2035, compared with 2010[29]. In conclusion, the incidence burden of testicular cancer in Europe will continue to increase. This reinforces the need for further definition of an effective treatment.

Most of the testicular cancers originate from germ cells with an initiation of the tumoral process during the embryonic development. The knowledge of germ cell homeostasis during embryonic period is thus critical. Here, using different approaches, we demonstrate that the expression of *TGR5* seems to be inversely correlated with critical genes of undifferentiated germ cells such as *GFRA1* and *ID4* and of pluripotent genes such as *OCT3/4* or *NANOG*. It

could be hypothesized that TGR5 could thus participate to the biology of testicular germ cell cancers.

To better define the role of TGR5 in the homeostasis of germ cells at the origin of testicular germ cell cancer, in line with the embryonic origin of TGCT, we would like to analyze expression patterns of tumor genes such as *KIT*, *KRAS*, *NANOG*, *OCT3/4* as well as *TGR5* in primordial germ cells, in gonocytes as well as in early undifferentiated spermatogonia. For that purpose, we will study the expression of these genes in FACS cell sorted germ cell from *Oct4*-GFP and *Oct4*-GFP-*Tgr5*$^{-/-}$ male mice (available in the lab) at different time points during embryonic and neonatal development. We will also analyze the expression pattern of *TGR5* within human testis and particularly on human fetal testis (Collaboration IRSET). We will make some co-staining of TGR5 and OCT3/4 or SSEA1 to define if TGR5 is expressed in precursor germ cells as suggested in single cell studies[21,22]. All these data will allow us to define the correlations between TGR5 expression and the targeted markers in order to determine if TGR5 is a good candidate to target in the tumor process. In addition we will have to pursue our effort in order to decipher whether the lack of TGR5 impacts the classic characteristics for tumor cells. Proliferation and survival rates will be analyzed using immunohistochemistry experiments (BrdU, TUNEL) or by flow cytometry. We have already defined that the lack of TGR5 leads to lower cell count associated with a lower proliferation index. We will next use the most widely accepted cell migration technique, which is the Boyden Chamber test. In addition, cell migration will also be analyzed using scratch tests. In addition, we will use a soft agar colony formation assay to characterize the ability of transformed cells to grow independently of a solid surface, a characteristic of carcinogenesis. We will also analyze the ability of tumor cells to produce extracellular matrix (ECM) proteins. Indeed, they are produced and secreted in the surrounding cellular environment, regulating cell adhesion, differentiation, proliferation, migration, invasion and survival. The present data using bioinformatics analysis showed that *TGR5* expression seemed to be correlated with genes involved in extracellular matrix. To decipher whether the lack of TGR5 could be involved in the tumoral process, we will perform xenografts of NCCIT cells on Nude mice. In addition, we have generated a double mutant showing the deletion of the tumor suppressor *Pten* and the deletion *Tgr5*. This will be an interesting tool to define the involvement of TGR5 in initiation, development or chemoresistance to treatment of testicular germ cell tumors.

DNA methylation is the most studied epigenetic regulatory mechanism. It occurs mainly in the CpG islands, which are often found nearby or in the promoter regions of genes, and is maintained by DNA methyltransferases. Methylation suppresses transcription of genes. Epigenetic changes participate in the normal development of the germ line. Interestingly, several studies have associated epigenetic regulations in the development of

germ cell tumors[30]. GCNIS (initial stage of TGCT) as well as seminomas have low levels of DNA methylation associated with high transcriptional activity. More differentiated TGCTs (yolk sac tumors, choriocarcionomas and teratomas) show higher degrees of methylation. In these cells, the change in methylation status may be associated with the *DNMT3B* gene, which encodes for DNA methyltransferase 3 beta. *DNMT3B* has been shown to be upregulated in embryonic carcinoma compared to seminoma. However, DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma[24].

It has been demonstrated in human testicular cancers that DNMT3B control the expression of *OCT3/4* and *NANOG*[31]. It is thus interesting to highlight that our results show a crosstalk between TGR5 and DNMT3B on one hand and on the other hand between TGR5 and NANOG/OCT3/4. In that line, as showed by our analysis, a high proportion of NANOG/OCT3/4 correlated genes overlapped with those associated with DNMT3B (**data not shown**). These data support the idea that TGR5 signaling pathways could be involved in the modulation of DNMT3B signaling pathway that could in turn impacts *OCT3/4* and *NANOG* gene networks. It would thus be of interest to test by chromatin-Immunoprecipitation if there is modification of methylation levels or profiles on the promoters of *NANOG* and *OCT3/4* and those of their target genes following the modulation of TGR5 either *via* the use of agonist (INT-777), antagonist (SBI-115) or gene invalidation (Crispr-CAS9).

In addition, methylation levels have been shown to be associated with tumor drug resistance. Undifferentiated tumors, often hypomethylated[32], are much more sensitive to chemotherapy than well-differentiated tumors, while chemoresistant seminoma often exhibit a high degree of methylation[32]. Thus, demethylation of a seminoma cell line has led to increased chemosensitivity. In parallel, non-coding RNAs have also been identified in this phenomenon of chemo-resistance. Studies have shown that the miR-371-373 cluster could be an avenue of interest in understanding cases of resistance to treatment with cisplatin [33,34]. In addition, a study shows that the quantification of miR-371a-3p could help predict viable germ cell tumors in residual masses after chemotherapy. Interestingly, studies have shown the potential involvement of other microRNAs[32].

Thus, certain genomic and epigenetic signatures are useful for the molecular classification and the prognosis of chemoresistance of tumors. However, few data have identified treatments to sensitize chemoresistant TGCTs. The question of the chemosensitivity of TGCTs and the mechanisms involved in the development of resistance to treatment is therefore critical in order to continue to improve the effectiveness of treatments by identifying new therapeutic targets to improve the care of affected patients.

The obtained results on testicular cancer samples are also of interest in the context of chemo-resistance/sensitivity. It has been demonstrated that primary TGCTs are uniformly

wild type for *TP53*[35]. It seems that primary TGCTs have high mitochondrial priming that facilitates chemotherapy-induced apoptosis[35]. Interestingly it has been proposed that DNMT3B could be associated with chemoresistance through the inhibition of the TP53 signaling pathway[36]. In that line, we have previously demonstrated that TGR5 regulated TP53 pathways (Thirouard *et al*. Article-1). Thus, it could be speculated that TGR5 might control TP53 signaling pathway and germ cell chemosensitivity, through the regulation of *DNMT3B* expression.

In addition, we have been able to demonstrate as in mouse germ cells, a crosstalk between the TGR5, GLIS2 and TP53 signaling pathways that could thus be associated with chemoresistance as the bioinformatics analysis define that associated genes are related to cytochrome P450 metabolism of xenobiotics and genes involved in drug metabolism.

The link between TGR5 and TP53 could also involve KDM6B as this later has been demonstrated to control TP53 nuclear cellular localization and nuclear stabilization[37].

Interestingly, it has been demonstrated that loss of pluripotency markers (*NANOG* and *POU5F1*) is observed in in chemoresistant teratomas [35].Several data highlight that OCT3/4 maintains the pluripotency of human embryonic stem cells by inactivating TP53. The links between TP53 and pluripotency is quite complex. In normal condition, some studies showed that TP53 was required for mouse ESC self-renewal. Other study showed that the half level expression of the deleted TP53 protein version, △40p53, caused a loss of pluripotency in ESCs and initiation of differentiation into somatic cells, while its increased dosage maintained pluripotency and inhibited differentiation[38].

In contrast, in the context of DNA damage in ESCs, phosphorylation of TP53 at serine 315 leads to high expression of the TP53 protein and in turn to regulation of *NANOG* expression[39]. The activation of TP53 inhibits transcription factor *NANOG*, and thereby promote cell differentiation, which could inhibit tumorigenesis. Combined, all these data suggest that the links between TGR5, NANOG, OCT3/4, DNMT3B, KDM6B, GLIS2 and TP53 need to be more deeply analyzed to better define the biology of TGCT.

In the present work, the analyses from the TCGA databases showed that *TGR5* is more expressed in non-seminoma tumor samples, which represent the most differentiated TGTs. This result raises the question of the involvement of TGR5 in the differentiation status of TGCT. It is commonly described that seminomas and non-seminomas are two tumor types derived from a common origin: GCNIS. However, it has been described that non-seminomas could also originate from reprogramming of seminoma cells[40,41]. This reprogramming currently remains hypothetical and no associated mechanism has been described.

Interestingly, beyond the possibility of differentiation of seminomas into non-seminomas one study suggests that there may be a "switch" between seminomas and non-seminomas in both directions via cell reprogramming[42]. At present, there is no evidence for "trans-

differentiation" from non-seminomas to seminomas. Our results suggest that TGR5 may be involved in such trans-differentiation. Indeed, our results showed that *TGR5* invalidation in non-seminoma cells (more differentiated cells) is associated with an increase in the accumulation of stem cell genes but also that *TGR5* invalidated cells have a lower proliferation capacity than parental NCCIT cells. These results are therefore consistent with the hypothesis that TGR5 is involved in trans-differentiation since seminomas are tumors with more stem cell characteristics associated with less proliferation than non-seminomas. It would now be of interest to decipher the existence of trans-differentiation and the involvement of TGR5 using differential analysis of wild-type NCCITs as well as different NCCIT clones invalidated for TGR5.

Several polymorphisms of TGR5 have been identified and have been characterized regarding their impacts on TGR5 activity. It will thus be of interest to analyze on testicular cancer biopsies whether such polymorphism could be found and if it could be associated with etiology, development or chemo-sensitivity/resistance of TGCT.

In conclusion, the data of this preliminary work support the idea that TGR5 could play an important role in the homeostasis of germ cells and that alteration of its expression and/or activity could lead to the deregulation of gene networks that could in turn be involved in TGCT process either initiation, development or chemo-resistance. Further studies are thus needed to validate this hypothesis and then propose TGR5 as a diagnosis/prognostic marker or a valuable target for TGCT treatment.

Materials and Methods

Cell line approaches.

Transient Transfection of murine cell line. GC1-spg cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) using interferin (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) in six-well plates (50 000 cells per well). The siRNA directed against *Tgr5,* as well as control siRNA (siGfp), was transfected at 5 ng per well.

Generation of Crispr/CAS9 Tgr5 deficient NCCIT cells ($NCCIT^{TGR5\text{-}KO}$).

NCCIT Tgr5 knockout cells were generated as following. For the generation of the NCCIT Tgr5 knockout cells, using Crispr/CAS9 approach (**see Supplemental Fig1**). Guides were defined based on the mm9 version of the mouse genome and using the website http://crispor.tefor.net/. Two guides were used Then, the guides were introduced on PX458: pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene Plasmid #48138) and PX459: pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene Plasmid #62988). pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) was a gift

from Feng Zhang (Addgene plasmid # 48139; http://n2t.net/addgene:48139 ; RRID:Addgene_48139)[30]. Guides were cloned on vectors at the BbsI restriction site.

NCCIT cells were plated on 6-well plates and transfected, using Jet PEI (Ozyme) with 1 µg of guide 1 in PX458 (expressing pfg) and 2 µg of guide 2 in PX459. 24 hours after transfection, using GFP expression, GC1spg cells were sorted by FACS (BD FACSMelodyTM Cell Sorter from BD Biosciences) and plated as individual cell in a 96-well plate in GC1spg conditioned medium (DMEM and 1% SVF). The clones were then validated by sequencing and genotyping. Primer sequences for PCR **are available upon request.**

Pharmocological approach.

Parental NCCIT cells were used as previously described[20] or generated in this study ($NCCIT^{TGR5\text{-}KO}$). Cells were plated at 100 000 cells per well. 24h hours after plating, cells were treated for 24 hours with vehicle (DMSO, 1/4,000), INT-777 (25 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or SBI (3 to 6µM). Then, cells were harvested at different time points later, and messenger RNA (mRNA) or protein extractions were performed.

Real-time RT-PCR

RNA from mouse testis samples was isolated using Nucleospin RNA L (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). cDNA was synthesized from total RNA with the MMLV reverse transcriptase and random hexamer primers (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The real-time PCR measurement of individual cDNA was performed using SYBR green dye (Master mix Plus for SYBR Assay, Eurogentec, Angers, France) to measure duplex DNA formation with the Eppendorf-Realplex system. For each experiment, standard curves were generated with pools of testis cDNA from animals with different genotypes and/or treatments. The results were analyzed using the ΔΔct method. Primers sequences **are available upon request.**

TCGA analysis.

The transcriptomes (TGCT, ESCA, PAAD, COAD), available on the broad institut website (https://gdac.broadinstitute.org/), were compared using the R library DESeq2 (Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution), by separating the samples into two groups ("plus" and "minus") based on the median expression of the gene concerned. This library allows to generate the PCA, the MA plot, and an excel table with among others the log2fold change and the pvalue for each gene. After sorting, only genes with a log2foldchange >2 or/and <-2 and an adjusted pvalue <0.05 are kept.

The clinical data of each patient[43] were used to separate the samples into seminomas and

nonseminomas so that they could be analyzed separately. Parameters such as methylation or expression of certain genes were analyzed in relation to TGR5 expression. The calculation of the Pearson correlation coefficient allows measuring the linear interaction between these variables.

BrdU incorporation. To define proliferation rate, we studied NCCIT$^{TGR5\text{-}KO}$ compared to parental NCCIT (ATCC). Cells were then incubated with BrdU (10µM) for the one last hour. Then cells were washed with PBS1X and then fixed with methanol. The detection of BrdU was performed using primary antibody anti-Bromodeoxyuridine (11170376001, Merck) revealed with specific Alexa488-coupled secondary antibody.

Statistical Analyses

Number and type of replicates (e.g., technical replicates, independent experiment, number of mice, and number of independent litters) are reported in the figure legends. Error bars represent SEM, and statistical tests are described in the Experimental Procedures or legends. Differences between groups were determined by ANOVA or two-way ANOVA. Multiple comparisons were made with by Dunnett or Holm-Sidak's test respectively for ANOVA1 and ANOVA2. All numerical data are represented as mean ± SEM. Significant difference was set at $P < 0.05$.

Acknowledgments

We thank Sandrine Plantade, Khirredine Ouchen and Philippe Mazuel for their help at the animal facility. We also thank the AniPath plateform from the GReD for histological analysis on mice.

References.

1. Cheng, L. *et al.* Testicular cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, 29 (2018).
2. Pinto, M. T., Cárcano, F. M., Vieira, A. G. S., Cabral, E. R. M. & Lopes, L. F. Molecular Biology of Pediatric and Adult Male Germ Cell Tumors. *Cancers* **13**, 2349 (2021).
3. Nauman, M. & Leslie, S. W. Nonseminomatous Testicular Tumors. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
4. Murez, T. *et al.* [French ccAFU guidelines - update 2020-2022: testicular germ cell tumors]. *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* **30**, S280–S313 (2020).
5. Belot, A. *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev. Dépidémiologie Santé Publique* **56**, 159–175 (2008).
6. Chia, V. M. *et al.* International trends in the incidence of testicular cancer, 1973-2002. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **19**, 1151–1159 (2010).
7. Mucci, L. A. *et al.* Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic

Countries. *JAMA* **315**, 68–76 (2016).
8. Litchfield, K., Shipley, J. & Turnbull, C. Common variants identified in genome-wide association studies of testicular germ cell tumour: an update, biological insights and clinical application. *Andrology* **3**, 34–46 (2015).
9. Skakkebaek, N. E. A Brief Review of the Link between Environment and Male Reproductive Health: Lessons from Studies of Testicular Germ Cell Cancer. *Horm. Res. Paediatr.* **86**, 240–246 (2016).
10. Rajpert-De Meyts, E., McGlynn, K. A., Okamoto, K., Jewett, M. A. S. & Bokemeyer, C. Testicular germ cell tumours. *Lancet Lond. Engl.* **387**, 1762–1774 (2016).
11. Berney, D. M. *et al.* Germ cell neoplasia in situ (GCNIS): evolution of the current nomenclature for testicular pre-invasive germ cell malignancy. *Histopathology* **69**, 7–10 (2016).
12. Rajpert-De Meyts, E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum. Reprod. Update* **12**, 303–323 (2006).
13. Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y. & Pikarsky, E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* **4**, 361–370 (2003).
14. Kristensen, D. M. *et al.* Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **288**, 111–118 (2008).
15. Skinner, M. K. *et al.* Cell-cell interactions and the regulation of testis function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **637**, 354–363 (1991).
16. Verhoeven, G. Local control systems within the testis. *Baillières Clin. Endocrinol. Metab.* **6**, 313–333 (1992).
17. Jégou, B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.* **147**, 25–96 (1993).
18. Lytle, N. K., Barber, A. G. & Reya, T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 669–680 (2018).
19. Tsuchiya, M., Giuliani, A. & Yoshikawa, K. Cell-Fate Determination from Embryo to Cancer Development: Genomic Mechanism Elucidated. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4581 (2020).
20. Baptissart, M. *et al.* Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. *Hepatol. Baltim. Md* **60**, 1054–1065 (2014).
21. Hermann, B. P. *et al.* The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. *Cell Rep.* **25**, 1650-1667.e8 (2018).
22. Law, N. C., Oatley, M. J. & Oatley, J. M. Developmental kinetics and transcriptome dynamics of stem cell specification in the spermatogenic lineage. *Nat. Commun.* **10**, 2787 (2019).
23. Baptissart, M. *et al.* Multigenerational impacts of bile exposure are mediated by TGR5 signaling pathways. *Sci. Rep.* **8**, 16875 (2018).
24. Arai, E., Nakagawa, T., Wakai-Ushijima, S., Fujimoto, H. & Kanai, Y. DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. *Histopathology* **60**, E12-18 (2012).
25. Lobo, J., Henrique, R. & Jerónimo, C. The Role of DNA/Histone Modifying Enzymes and Chromatin Remodeling Complexes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cancers* **11**, 6 (2018).
26. Shan, Y. *et al.* JMJD3 and UTX determine fidelity and lineage specification of human neural progenitor cells. *Nat. Commun.* **11**, 382 (2020).
27. Masyuk, T. V. *et al.* TGR5 contributes to hepatic cystogenesis in rodents with polycystic liver diseases through cyclic adenosine monophosphate/Gαs signaling. *Hepatol. Baltim. Md* **66**, 1197–1218 (2017).

28. Bidault-Jourdainne, V. *et al.* TGR5 controls bile acid composition and gallbladder function to protect the liver from bile acid overload. *JHEP Rep. Innov. Hepatol.* **3**, 100214 (2021).
29. Znaor, A. *et al.* Testicular cancer incidence predictions in Europe 2010-2035: A rising burden despite population ageing. *Int. J. Cancer* **147**, 820–828 (2020).
30. Martinot, E., Baptissart, M., Sédes, L. & Volle, D. H. Chapter 2 - Role of Epigenetics in Testicular Cancer. in *Epigenetic Mechanisms in Cancer* (ed. Saldanha, S.) vol. 3 31–57 (Academic Press, 2018).
31. Li, J.-Y. *et al.* Synergistic Function of DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the Methylation of Oct4 and Nanog. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8748–8759 (2007).
32. Buljubašić, R. *et al.* Epigenetics and testicular germ cell tumors. *Gene* **661**, 22–33 (2018).
33. Dieckmann, K.-P. *et al.* MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours. *Br. J. Cancer* **107**, 1754–1760 (2012).
34. Regouc, M., Belge, G., Lorch, A., Dieckmann, K.-P. & Pichler, M. Non-Coding microRNAs as Novel Potential Tumor Markers in Testicular Cancer. *Cancers* **12**, 749 (2020).
35. Taylor-Weiner, A. *et al.* Genomic evolution and chemoresistance in germ-cell tumours. *Nature* **540**, 114–118 (2016).
36. Jostes, S., Nettersheim, D., Schneider, S. & Schorle, H. Cultivation of Testicular Germ Cell Cancer Cell Lines and Establishment of Gene-Edited Subclones Using CRISPR/Cas9. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2195**, 85–97 (2021).
37. Ene, C. I. *et al.* Histone Demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a Tumor Suppressor by Regulating p53 Protein Nuclear Stabilization. *PLoS ONE* **7**, e51407 (2012).
38. Ungewitter, E. & Scrable, H. Delta40p53 controls the switch from pluripotency to differentiation by regulating IGF signaling in ESCs. *Genes Dev.* **24**, 2408–2419 (2010).
39. Lin, T. *et al.* p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat. Cell Biol.* **7**, 165–171 (2005).
40. Oosterhuis, J. W. & Looijenga, L. H. J. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 210–222 (2005).
41. McIver, S. C. *et al.* The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 are implicated in human seminoma metastasis. *Andrology* **1**, 517–529 (2013).
42. Boublikova, L., Buchler, T., Stary, J., Abrahamova, J. & Trka, J. Molecular biology of testicular germ cell tumors: unique features awaiting clinical application. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **89**, 366–385 (2014).
43. Shen, H. *et al.* Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors. *Cell Rep.* **23**, 3392–3406 (2018).

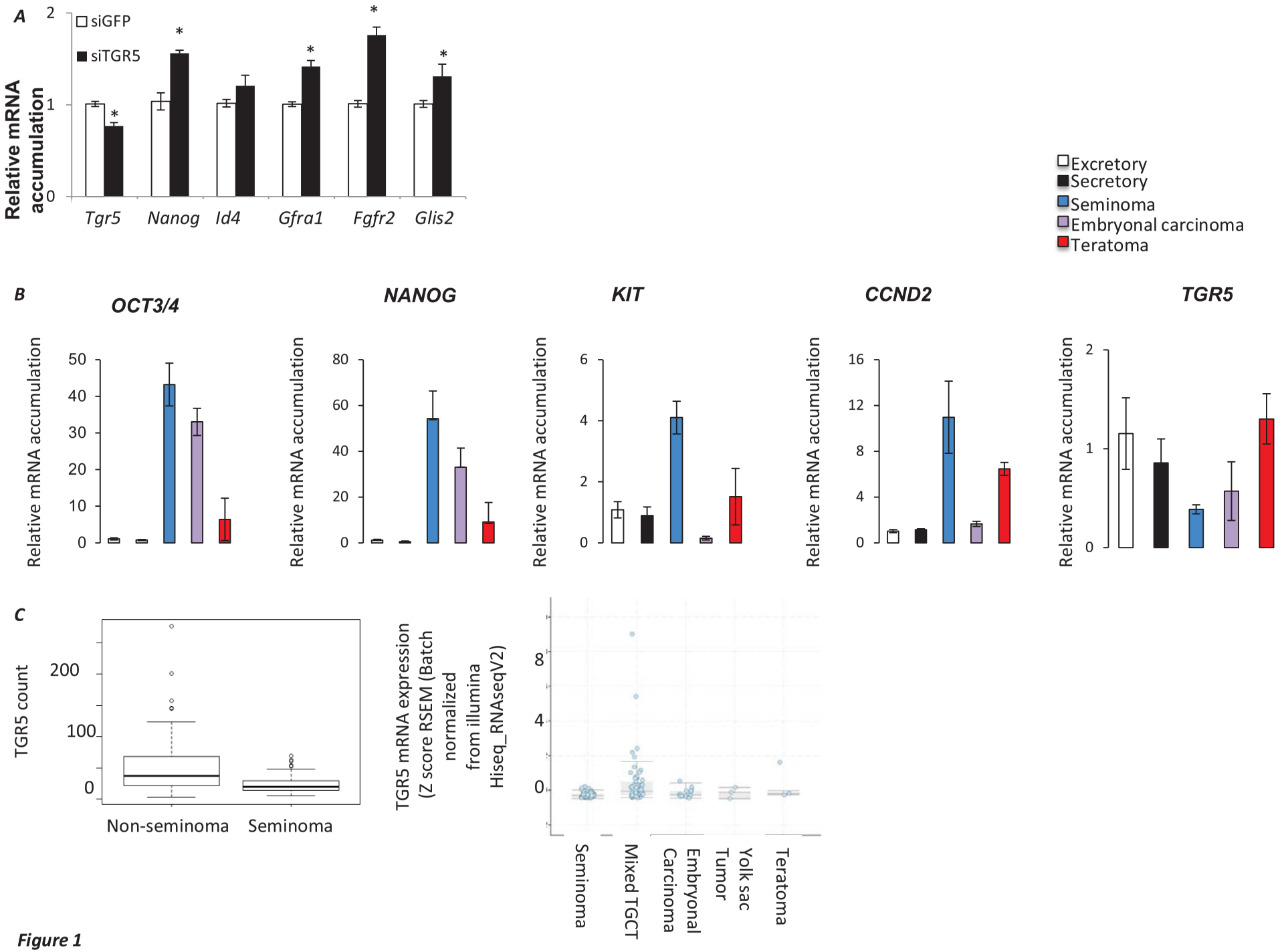

A
siGFP
siTGR5
Relative mRNA accumulation
Tgr5
Nanog
Id4
Gfra1
Fgfr2
Glis2
Excretory
Secretory
Seminoma
Embryonal carcinoma
Teratoma
B
OCT3/4
NANOG
KIT
CCND2
TGR5
Relative mRNA accumulation
C
TGR5 count
Non-seminoma
Seminoma
TGR5 mRNA expression (Z score RSEM (Batch normalized from illumina Hiseq_RNAseqV2)
Seminoma
Mixed TGCT
Embryonal Carcinoma
Yolk sac Tumor
Teratoma

Figure 1

Figure 1:

A- Relative Tgr5, Nanog, Id4, *Gfra1, Fgfr2 and Glis2* mRNA accumulation normalized to β-actin on GC1spg cells transfected with siCtrl or siTgr5 and treated 24 hours with vehicle or with 200μM of Bu. n=10 from 3 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: *, $p<0.05$. veh.: vehicle and Bu: Busulfan.

B- Relative OCT3/4, NANOG, KIT, CCDN2 and TGR5, in human testicular biopsies of testis from patients with excretory azoospermia, secretory azoospermia, seminam, embryonal carcinoma or teratorma. n=6.

C- Analysis of TCGA data of the cohort of patients with TGCT for TGR5 count in seminoma or non-seminoma (left panel) or subtypes of TGCT (right panel).

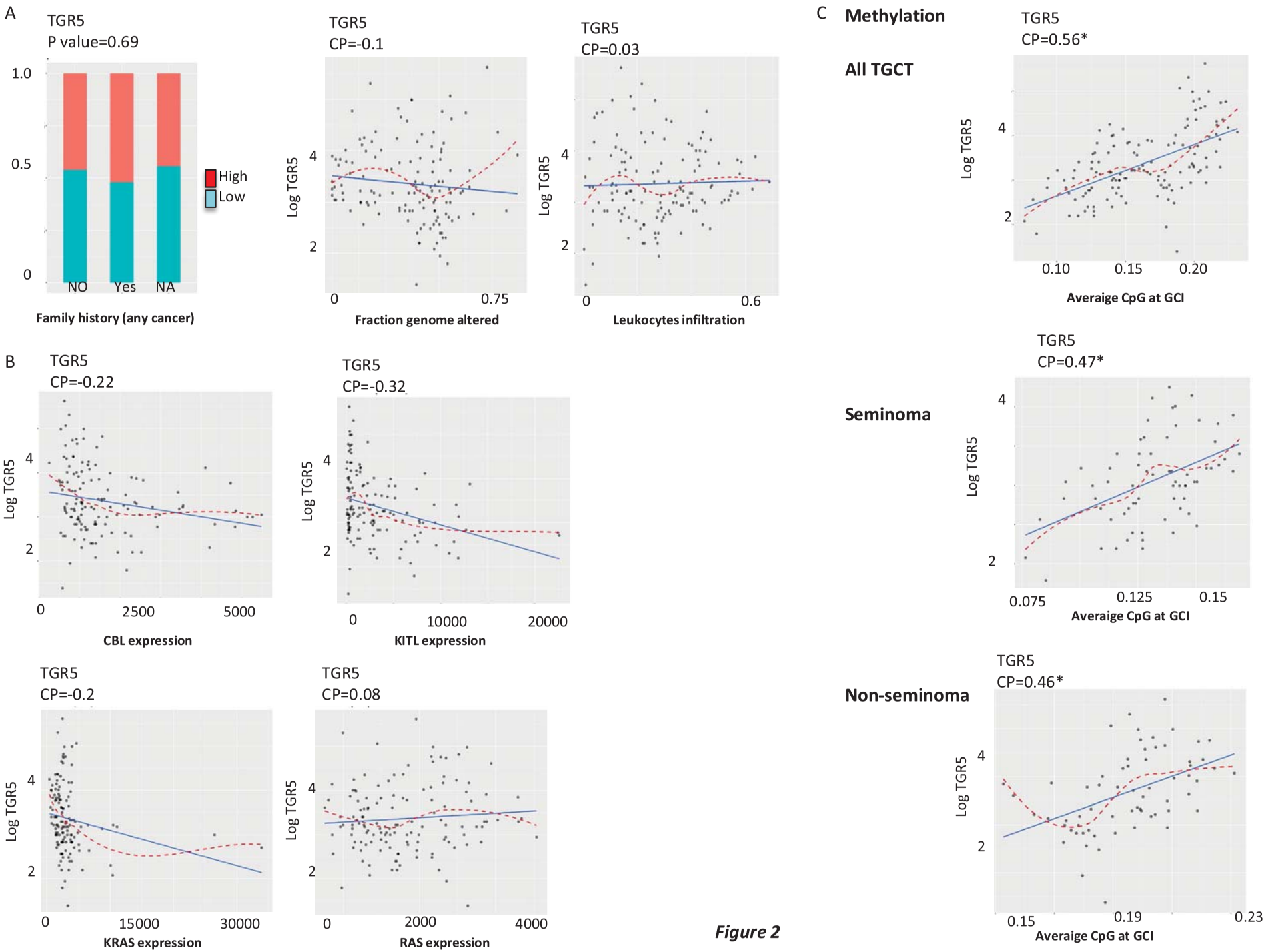

A
TGR5
P value=0.69
1.0
0.5
0
High
Low
NO
Yes
NA
Family history (any cancer)
TGR5
CP=-0.1
Log TGR5
4
2
0
0.75
Fraction genome altered
TGR5
CP=0.03
Log TGR5
4
2
0
0.6
Leukocytes infiltration
B
TGR5
CP=-0.22
Log TGR5
4
2
0
2500
5000
CBL expression
TGR5
CP=-0.32
Log TGR5
4
2
0
10000
20000
KITL expression
TGR5
CP=-0.2
Log TGR5
4
2
0
15000
30000
KRAS expression
TGR5
CP=0.08
Log TGR5
4
2
0
2000
4000
RAS expression
C
Methylation
All TGCT
TGR5
CP=0.56*
Log TGR5
4
2
0.10
0.15
0.20
Averaige CpG at GCI
Seminoma
TGR5
CP=0.47*
Log TGR5
4
2
0.075
0.125
0.15
Averaige CpG at GCI
Non-seminoma
TGR5
CP=0.46*
Log TGR5
4
2
0.15
0.19
0.23
Averaige CpG at GCI

Figure 2

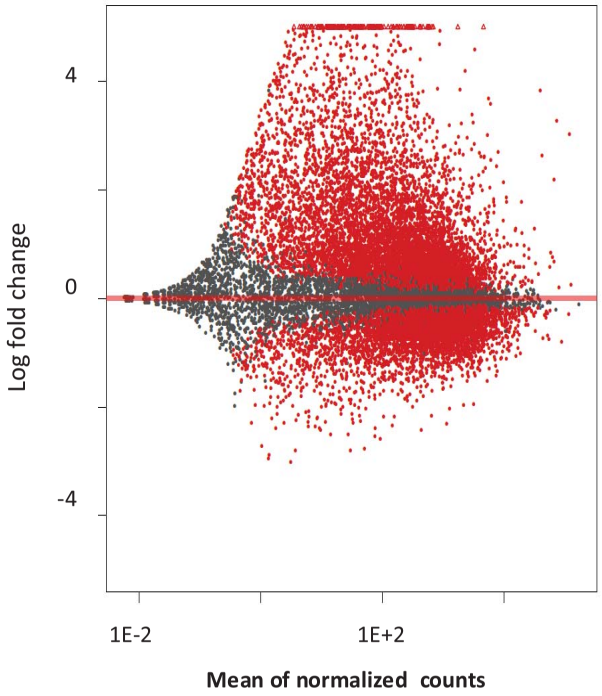
Figure 2. - Analysis of TCGA data of the cohort of patients with TGCT.

A- Association between TGR5 mRNA expression and family of history, the fraction of altered genome, of leukocytes infiltration.

B- Association between TGR5 mRNA expression and the expression levels of CBL, KIT, NRAS or KRAS.

C- Association between TGR5 mRNA expression and the levels of 5meC DNA methylation in all TGCT, seminoma or non-seminoma..

A



B

Gene ontology (1569 genes correlated with TGR5)

GO cellular processes	p value
extracellular region	2.3450143864275746e-62
extracellular space	2.336683825600922e-53
extracellular matrix	7.778119008246625e-40
external encapsulating structure	9.94117694276672e-40
cell periphery	1.315910840162617e-32
collagen-containing extracellular matrix	2.6537439541116485e-30
intrinsic component of plasma membrane	4.286410896599712e-18
integral component of plasma membrane	1.6072269051935768e-16
apical plasma membrane	7.352644487923202e-14
plasma membrane	2.7655101085112414e-13
apical part of cell	2.923365693687243e-12
extracellular vesicle	4.01508898144061e-12
extracellular organelle	4.522913150340815e-12
blood microparticle	4.7504729051466714e-12
extracellular exosome	1.3191105010628933e-11
plasma membrane region	3.136885120000912e-11
endoplasmic reticulum lumen	1.893323398700983e-8
collagen trimer	1.1902168466281314e-7
fibrillar collagen trimer	0.000001074691389407445 8

C

KEGG Enriched pathways associated with TGR5

Pathways	p Value
Protein digestion and absorption	5,0E-09
Neuroactive ligand-receptor interaction	1,5E-05
Bile secretion	1,7E-05
Retinol metabolism	2,9E-05
Tyrosine metabolism	6,7E-04
ECM-receptor interaction	1,1E-03
Dilated cardiomyopathy	2,2E-03
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	4,0E-03
Drug metabolism - cytochrome P450	5,3E-03

D

Interactions pathways associated with TGR5

BioEntity.name	Interactions
amyloid beta precursor protein	57
growth factor receptor bound protein 2	42
vir like m6A methyltransferase associated	40
estrogen receptor 2	33
tumor protein p53	33
epidermal growth factor receptor	32
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	30
chromodomain helicase DNA binding protein 4	27

Figure 3

Figure 3.

A- Analysis of genes differentially expressed in TGCT and correlated with TGR5 mRNA levels.

B- Gene ontology analysis of differentially expressed genes. **C-** KEGG Enriched pathways associated with TGR5. **D-** Interactions pathways associated with TGR5.

All TGCT						
		OCT3/4	**NANOG**	**DNMT3B**	**KDM6B**	
	GPBAR1	-0,438	-0,426	-0,0465	0,275	**R2**
		0,000000131	0,000000316	0,595	0,00136	**p value**
		133	133	133	133	**N**

Seminoma						
		OCT3/4	**NANOG**	**DNMT3B**	**KDM6B**	
	GPBAR1	-0,315	-0,441	-0,297	0,0638	**R2**
		0,00887	0,00017	0,014	0,605	**p value**
		68	68	68	68	**N**

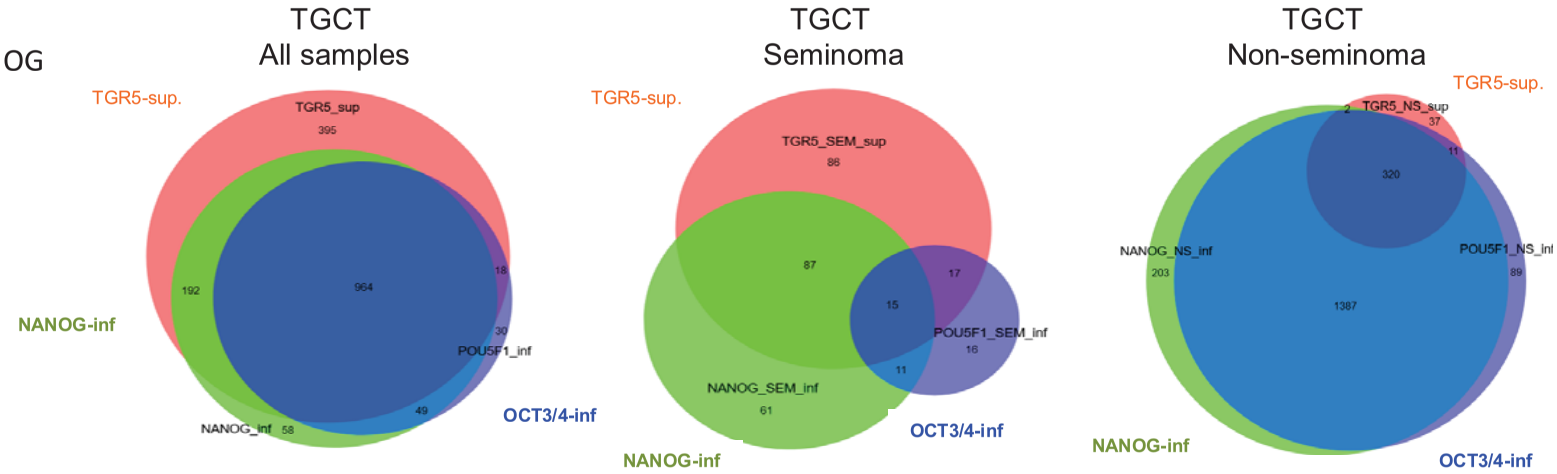
Non-seminoma						
		OCT3/4	**NANOG**	**DNMT3B**	**KDM6B**	
	GPBAR1	-0,485	-0,453	-0,398	0,238	**R2**
		0,0000429	0,000154	0,00102	0,0567	**p value**
		65	65	65	65	**N**

Table 1

Table 1. Analysis of correlation rates between the mRNA expression levels of TGR5 and those of OCT3/4, NANOG, KDM6B and DNMT3B in all TGCT, in seminoma and in non-seminoma.

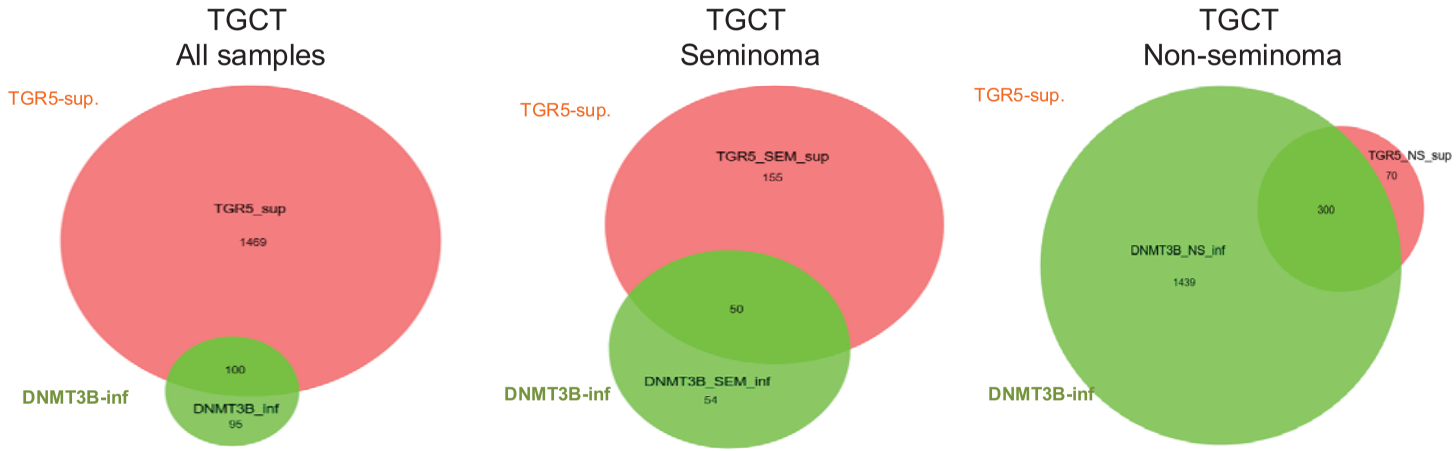
A

TGR5 and OCT3/4 & NANOG



B

TGR5 and DNMT3B



C

TGR5 and KDM6B

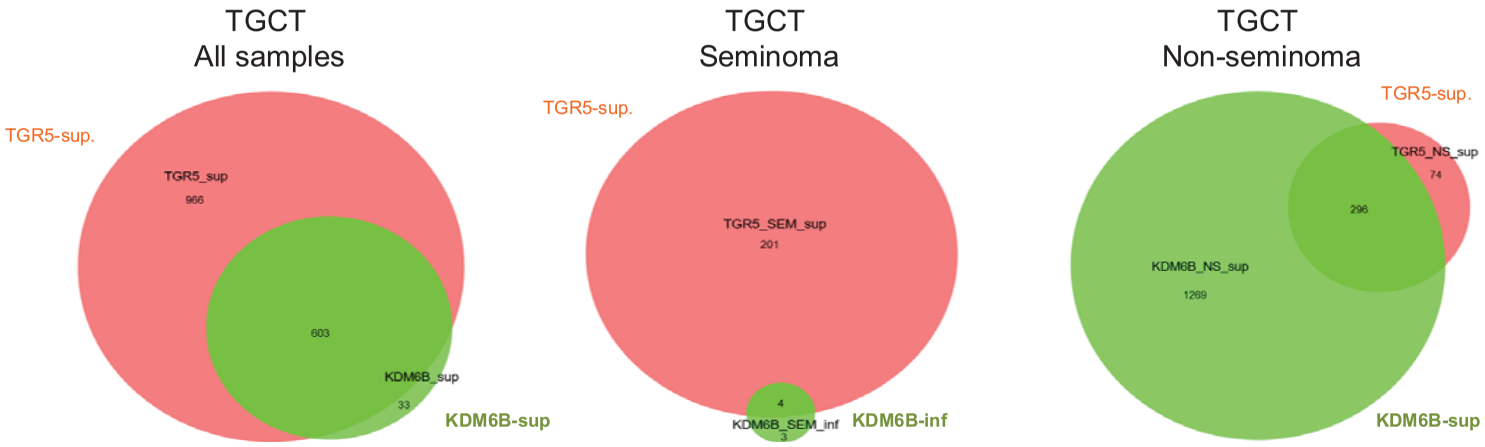
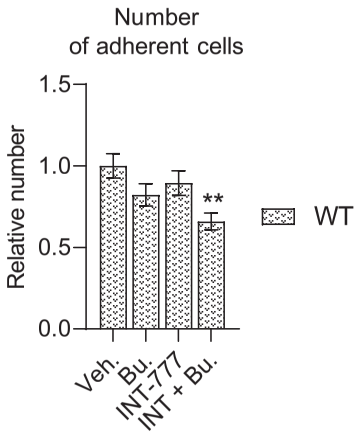


Figure 4

Figure 4. Analysis of correlation rates between the transcriptomes associated with TGR5 and those correlated with OCT3/4, NANOG, KDM6B or DNMT3B in all TGCT, in seminoma and in non-seminoma.

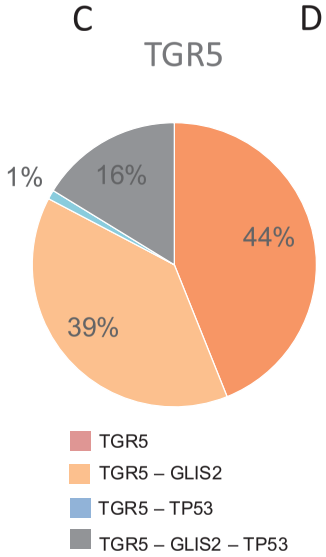
A



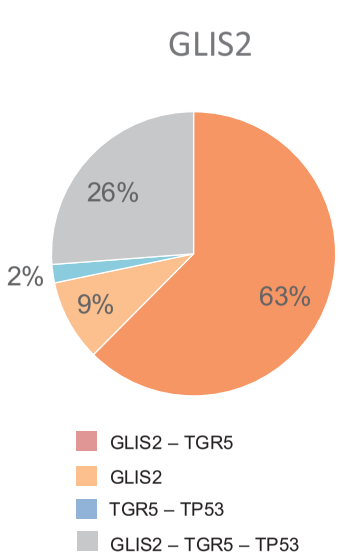
B

	Total genes	Common					
		TGR5	GLIS2	TP53	GLIS2 TP53	TGR5 TP53	GLIS2 TGR5
TGR5	1618	100.0	**55.0**	**17.3**	**16.3**		
Glis2	1004	**88.6**	100.0	28.3		**26.2**	
TP53	364	**76.9**	78.0	100.0			**72.3**

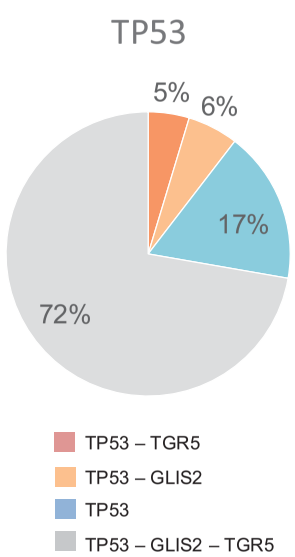
C



D



E



F **KEGG Enriched pathways associated with TGR5 – P53 – Glis2**

Pathways	P Value
Retinol metabolism	0,00069
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0,00153
Drug metabolism - cytochrome P450	0,00188
Tyrosine metabolism	0,00506
Bile secretion	0,01418
Starch and sucrose metabolism	0,02754

Figure 5

Figure 5.

A- Number of adherent NCCIT cells pre-exposed 24h with INT-777 and then to Bu 200µM for 24 hours. n=10 from 3 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: **, $p<0.01$. veh.: vehicle and Bu: Busulfan.

B- Table showing the percentage of common genes between TGR5, GLIS2 and TP53.

C- Schematic representation of TGR5 associated genes as a relative percentage of TGR5; TGR5-GLIS2; TGR5-TP53 and TGR5-GLIS2-TP53.

D- Schematic representation of GLIS2 associated genes as a relative percentage of GLIS2; GLIS2-TGR5; GLIS2-TP53 and GLIS2-TGR5- TP53.

E Schematic representation of TP53 associated genes as a relative percentage of TP53; -TP53-TGR5; TP53- GLIS2 and TP53-GLIS2-TGR5.

F- KEGG pathway analysis on differentially expressed genes associated with TGR5 in all testicular germ cell cancers (TGCT).

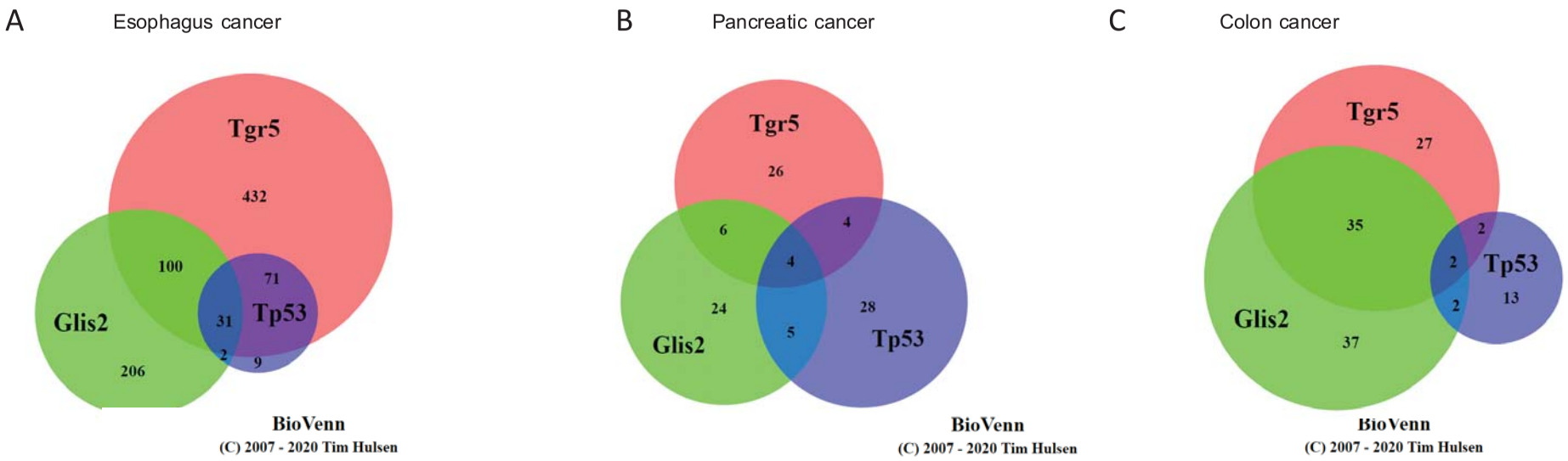

A
Esophagus cancer
Tgr5
432
100
71
Glis2
31
Tp53
2
9
206
BioVenn
(C) 2007 - 2020 Tim Hulsen
B
Pancreatic cancer
Tgr5
26
6
4
4
24
28
5
Glis2
Tp53
BioVenn
(C) 2007 - 2020 Tim Hulsen
C
Colon cancer
Tgr5
27
35
2
2
Tp53
13
2
Glis2
37
BioVenn
(C) 2007 - 2020 Tim Hulsen

Figure 6

Figure 6.

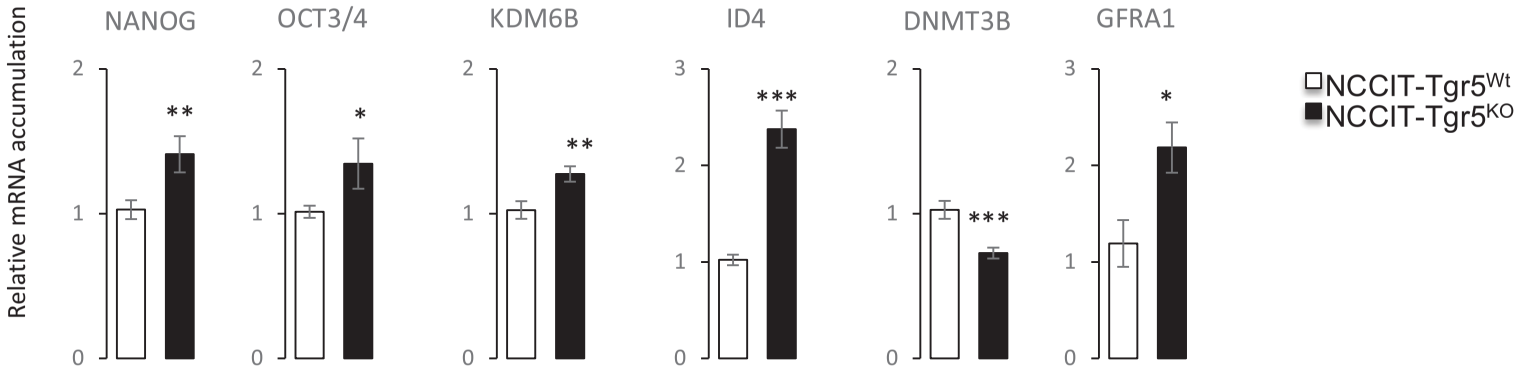
A- Venn representation obtained with lists of specifically differentially expressed genes associated with TGR5 or GLIS2 or TP53 in esophagus cancers.

B- Venn representation obtained with lists of specifically differentially expressed genes associated with TGR5 or GLIS2 or TP53 in pancreatic cancers.

C- Venn representation obtained with lists of specifically differentially expressed genes associated with TGR5 or GLIS2 or TP53 in colon cancers.

Serum free experiments

Clone P2D7



Clone P1G6

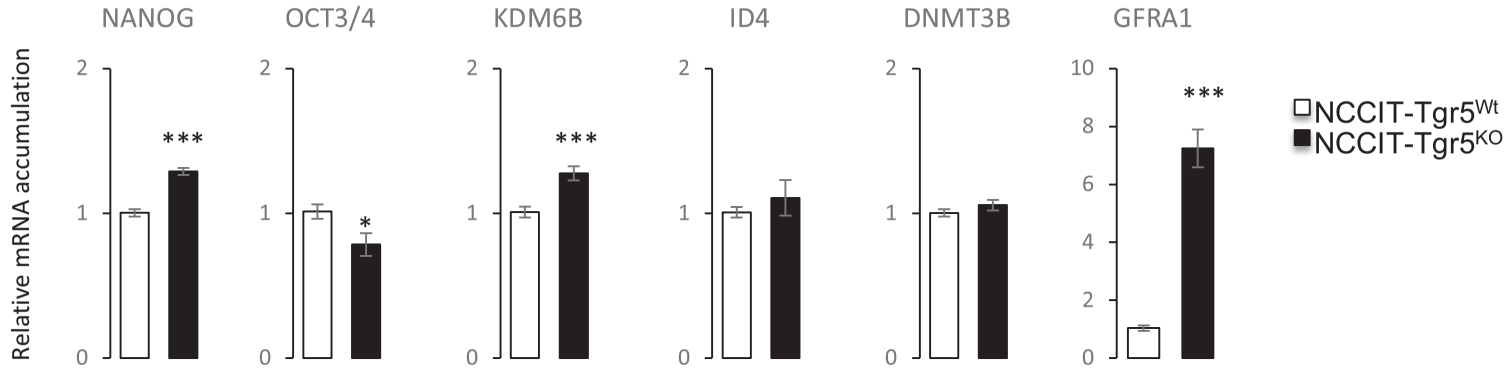


Figure 7

Figure 7.

Relative NANOG, OCT3/4, KDM6B, ID4, DNMT3B and GFRA1 mRNA accumulation normalized to β-actin on NCCIT-Tgr5^{Wt} and 2 different clones of NCCIT-Tgr5$^{KO.}$

n=10 from 3 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

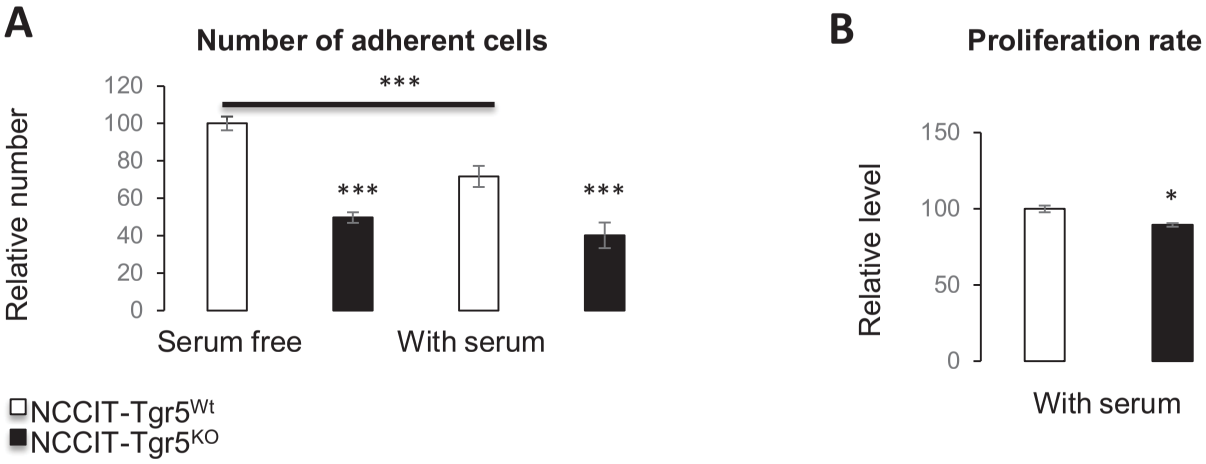

A
Number of adherent cells
Relative number
120
100
80
60
40
20
0
***
***
***
Serum free
With serum
NCCIT-Tgr5Wt
NCCIT-Tgr5KO
B
Proliferation rate
Relative level
150
100
50
0
*
With serum

Figure 8

Figure 8

A- Number of adherent NCCIT-Tgr5^{Wt} or NCCIT-Tgr5^{KO}. n=10 from 3 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: * $p<0.05$; *** $p<0.001$.

B- Relative quantification of the proliferative NCCIT-Tgr5^{Wt} or NCCIT-Tgr5^{KO} cells stained with BrdU.

n=6. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: * $p<0.05$.

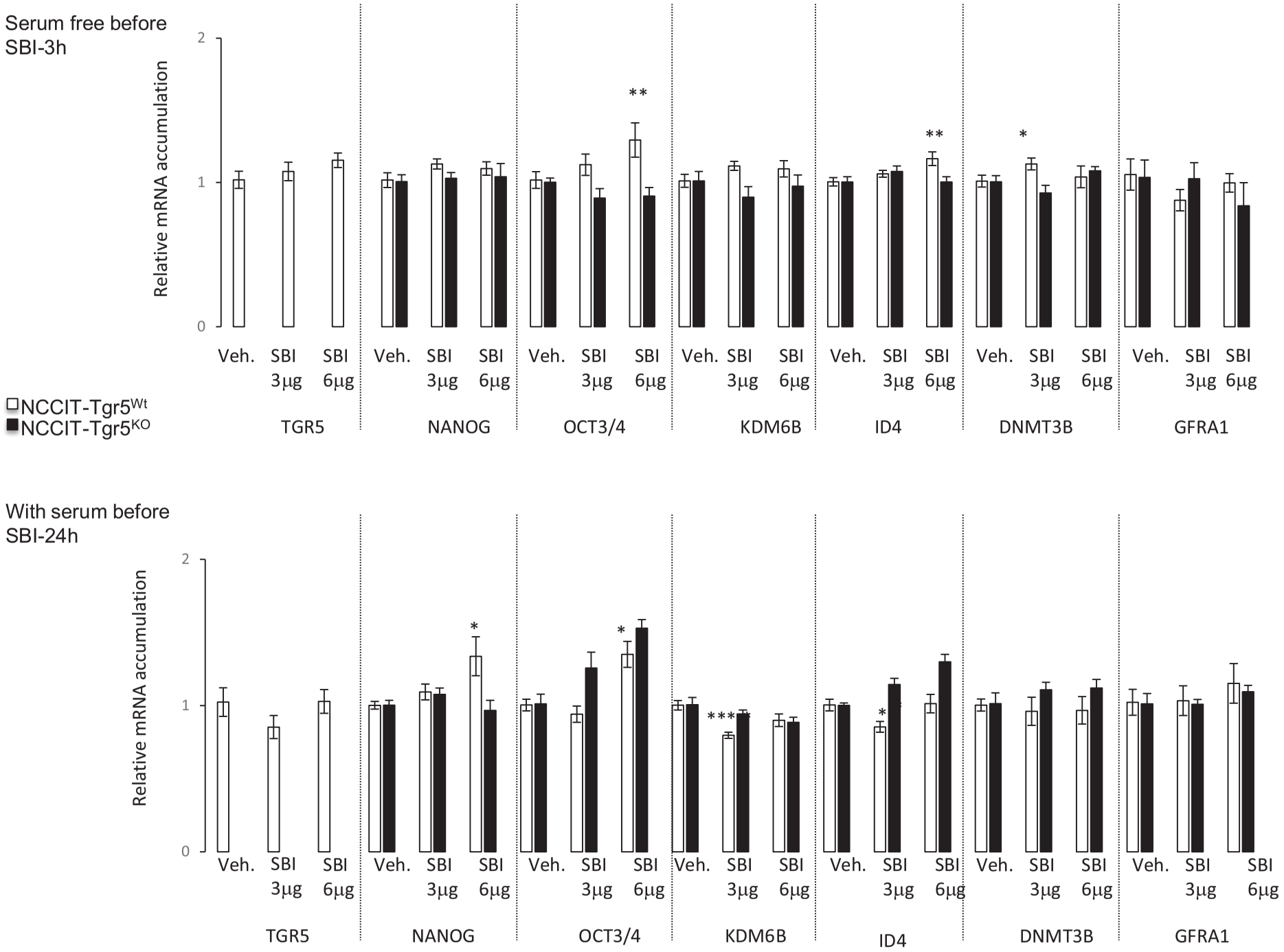

Serum free before SBI-3h
Relative mRNA accumulation
2
1
0
Veh.
SBI 3µg
SBI 6µg
TGR5
NANOG
OCT3/4
KDM6B
ID4
DNMT3B
GFRA1
**
**
*
NCCIT-Tgr5Wt
NCCIT-Tgr5KO
With serum before SBI-24h
*
*
***
*

Figure 9

Figure 9.

Relative TGR5, NANOG, OCT3/4, KDM6B, ID4, DNMT3B and GFRA1 mRNA accumulation normalized to β-actin on NCCIT-Tgr5^{Wt} and NCCIT-Tgr5^{KO} in condition with or without serum deprivation followed by a 24 hours treatment with vehicle or with SBI115 (3 or 6 μM). n=10 from 3 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: **, p<0.01. veh.: vehicle and Bu: Busulfan.

n=10 from 3 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001.

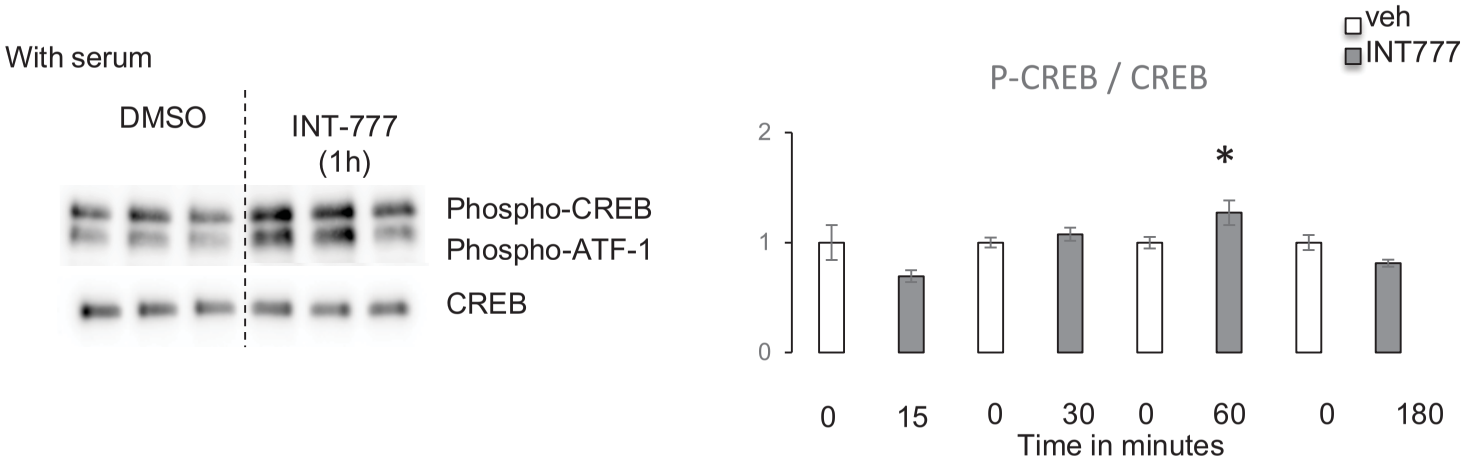
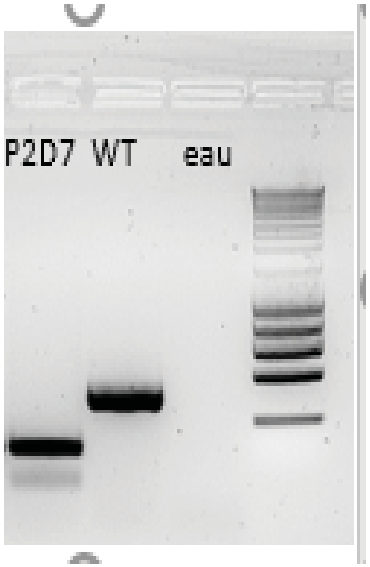

With serum
DMSO
INT-777
(1h)
Phospho-CREB
Phospho-ATF-1
CREB
P-CREB / CREB
veh
INT777
2
1
0
*
0
15
0
30
0
60
0
180
Time in minutes

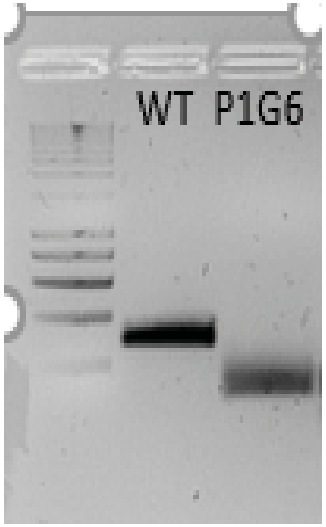
Figure 10

Figure 10.

Representative western blots of Phospho-CREB, Phospho-ATF1 and CREB and quantification of ratios in NCCIT-Tgr5^{Wt} and NCCIT-Tgr5^{KO} treated with vehicle or INT777 for 15, 30, 60 or 180 minutes..

n=10 from 3 independent experiments. Data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: * $p<0.05$.


P2D7
WT
eau


WT
P1G6

Supplemental Figure 1

Validation using PCR of the two clones of NCCIT-Tgr5^{KO} compared to NCCIT-Tgr5^{Wt}.

B. Discussion

L'incidence des TGTs étant en augmentation depuis de nombreuses années, il est important de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. Les données disponibles dans des bases de données telles que GEPIA2, mais également les résultats validés dans l'équipe par qPCR, mettent en évidence que *TGR5* est moins exprimé dans les tissus testiculaires tumoraux que dans les tissus sains, indiquant que TGR5 pourrait jouer un rôle dans les TGTs. Par ailleurs, au sein des TGTs, il a été démontré que *TGR5* est plus exprimé dans les non-séminomes que dans les séminomes, suggérant que TGR5 pourait être un marqueur du type tumoral. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que TGR5 pourrait réguler des gènes de pluripotence associés aux TGTs, ce qui permet de supposer que TGR5 est un acteur impliqué dans la biologie des cancers germino-testiculaires et que sa modulation peut être associée à la chimiosensibilité ou la chimiorésistance des TGTs.

1. Quel est le rôle de TGR5 dans la physiologie des cellules souches ?

Nos résultats démontrent que l'invalidation de *TGR5* dans des cellules NCCIT dérivées d'une tumeur de type non-séminome est associée à une augmentation de l'accumulation des transcrits de différents gènes associés au statut indifférencié des cellules tels que *NANOG*, *OCT3/4*, *DNMT3B* et *GFRA1*. Les TGTs étant des tumeurs qui dérivent des cellules indifférenciées (PGCs et/ou gonocytes), il serait intéressant d'étudier l'expression de TGR5 dans les PGCs, les gonocytes et les spermatogonies indifférenciées. Pour cela, un tri des cellules germinales (PGCs, gonocytes ou spermatogonies indifférenciées) pourrait être effectué chez des souris *Oct3/4*-GFP (disponibles au laboratoire). Ces souris expriment la GFP sous le contrôle du promoteur d'*Oct3/4*, l'ensemble des cellules exprimant *Oct3/4* est donc positive à la GFP. L'analyse des différents stades cellulaires sera faite grâce à la réalisation des tris des populations cellulaires positives à la GFP à différents moments du développement : lors du développement embryonnaire puis en néonatal. L'étude de l'expression de *Tgr5* et des différents gènes de pluripotence permettra de vérifier si la corrélation observée entre les différentes voies de signalisation dans les TGTs est visible également dans les différents types cellulaires qui sont les progéniteurs des TGTs. Chez l'homme, cette analyse pourra être réalisée avec l'étude de testicules fœtaux humains disponibles grâce à une collaboration avec l'IRSET (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail) (équipe N. Dejucq-Rainsford).

L'ensemble de ces analyses permettra d'étudier le rôle de TGR5 dans les processus de devenir cellulaire et ainsi de comprendre si TGR5 peut être impliqué dans l'étiologie des TGTs

via l'altération des processus associés à la prolifération, la différenciation ou encore la mort cellulaire.

2. TGR5 est-il impliqué dans les caractéristiques tumorales des cellules ?

Nos résultats ont mis en évidence que le nombre de cellules adhérentes NCCIT invalidées pour *TGR5* était plus faible que le nombre de cellules NCCIT parentales. Cet effet est associé à un taux de prolifération, visualisé par un marquage au BrdU (BRomoDésoxyUridine), plus faible dans les cellules *TGR5*$^{-/-}$. Les résultats obtenus sur les NCCIT dans cette étude semblent cohérents avec des données déjà publiées qui ont démontré que TGR5 était nécessaire à la prolifération des cholangiocytes, notamment *via* l'augmentation des espèces oxygénées réactives (ROS) et l'activation de SRC (Reich et al., 2016). Il a aussi été démontré que l'activation de TGR5 par les acides biliaires entraînait la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin *via* SRC (Sorrentino et al., 2020). De ce fait, il serait intéressant d'étudier la production de ROS ainsi que l'activation de SRC dans les NCCIT parentales ou invalidées pour *TGR5* afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de la prolifération *via* TGR5.

Afin de mieux appréhender le rôle de TGR5 sur les caractéristiques tumorales des cellules, une analyse de l'apoptose devra être effectuée par un marquage au TUNEL et l'analyse du cycle cellulaire pourra être réalisée *via* une analyse au FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Un lien a en effet été observé entre TGR5 et l'apoptose où l'activation de TGR5 par l'INT-777 permet de diminuer l'apoptose de cellules neuronales ainsi que le stress oxydatif de ces cellules (Zuo et al., 2019).

Afin d'étudier le rôle de TGR5 dans la migration cellulaire, une analyse des cellules en chambre de Boyden sera réalisée ainsi que des tests de blessure. TGR5 conduit à la croissance et à la migration des cellules de cancer du poumon de type « non à petites cellules » (Liu et al., 2018) suggérant que TGR5 pourrait être un marqueur de l'agressivité tumorale. Les capacités invasives des cellules à se développer en dehors d'une surface solide seront également analysées à l'aide de tests de formation de colonies sur agar mou. Par ailleurs, l'étude de l'expression des gènes associés à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) mais également à l'adhésion, la différenciation, la prolifération, la migration, l'invasion ainsi que la survie sera réalisée afin de mieux comprendre l'implication de TGR5 dans le développement tumoral.

L'ensemble de ces résultats nous permettra de comprendre si TGR5 peut être caractérisé comme un oncogène dans les TGTs et s'il peut être un marqueur tumoral ou un marqueur

d'agressivité tumorale. De plus, les cellules NCCIT invalidées pour *TGR5* ou parentales pourront être utilisées en xénogreffes sur des souris nudes afin d'étudier le rôle de TGR5 dans les processus tumoraux. Enfin, un modèle de souris double mutantes pour *Pten* et *Tgr5* est disponible dans l'équipe et nous permettra d'étudier le rôle de TGR5 dans l'initiation et le développement tumoral ainsi que dans la chimiorésistance des TGTs avec un traitement BEP.

3. Quel est le lien entre TGR5 et TP53 dans la chimiorésistance ?

Un pré-traitement à l'INT-777 (agoniste de TGR5) puis au busulfan sur des cellules NCCIT a permis de mettre en évidence une diminution du nombre de cellules plus importante que lorsque ces cellules sont traitées uniquement avec l'INT-777 ou le busulfan. Ces résultats suggèrent que l'activation de TGR5 dans ces cellules permet de chimiosensibiliser les cellules au busulfan. TGR5 joue donc un rôle dans la chimiosensibilité des cellules germinales tumorales humaines et il paraît majeur de comprendre les mécanismes impliqués.

Les TGTs sont des tumeurs sauvages pour TP53 mais il a été démontré que TP53 pouvait être impliqué dans la résistance aux radiations *via* son inhibition par DNMT3B dans le cancer nasopharyngé (Wu et al., 2020). Les résultats obtenus précédemment (Thirouard et al., Article 1) ont mis en évidence un rôle de TGR5 dans la chimiorésistance des cellules germinales *via* TP53. Il est donc envisageable que TGR5 régule TP53 *via* la modulation de DNMT3B afin d'induire la chimiosensibilité des cellules germinales tumorales humaines. Il a en effet déjà été démontré que l'activation de TGR5 par les acides biliaires conduit à une diminution de l'expression de DNMT3B dans les cellules germinales (Baptissart et al., 2018). De manière cohérente, d'après nos résultats dans les cellules NCCIT, en l'absence de sevrage des cellules, l'accumulation des transcrits de *DNMT3B* est plus important dans les cellules invalidées pour *TGR5* que dans les cellules parentales.

Par ailleurs, KDM6B, une histone lysine déméthylase, contrôle la localisation et la stabilisation nucléaires de TP53, la dérégulation de *KDM6B* (*via* des mutations ou une répression de son expression) conduisant à l'inhibition de la voie de signalisation TP53 (Ene et al., 2012). Il a été observé que *KDM6B* est plus faiblement exprimé dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains (GEPIA2). Il est donc envisageable que TGR5 module TP53 *via* KDM6B dont l'accumulation des transcrits est augmentée dans les cellules invalidées pour *TGR5* par rapport à des cellules sauvages.

Les résultats obtenus précédemment (Thirouard et al., Article 1) ont mis en évidence que TGR5 régule la chimiosensibilité des cellules germinales *via* les voies de signalisation GLIS2 – TP53. Un lien entre GLIS2 et TP53 ayant déjà été décrit *via* l'activation de CHK1 (Lu et al., 2016) et GLIS2 étant associé à la chimiorésistance (Yuan et al., 2018), il est également envisageable que l'implication de TGR5 dans la chimiorésistance *via* TP53 soit dépendante de GLIS2. De plus, nos données suggèrent que les signalisations TGR5 – GLIS2 – TP53 sont très conservées dans différents cancers, indiquant qu'il s'agit d'un mécanisme non spécifique aux TGTs.

Dans le cadre des dommages à l'ADN, il a également été observé une phosphorylation de TP53 qui conduit à une augmentation de son expression, entraînant l'inhibition de NANOG (Lin et al., 2005). L'expression de *TGR5* étant négativement corrélée à celle de *NANOG* dans les TGTs, il est envisageable qu'il existe un lien important entre les voies de signalisation TGR5 – TP53 – NANOG.

L'ensemble de nos résultats suggère que TGR5 peut jouer un rôle dans la chimiorésistance des cellules germinales *via* TP53 mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas connus. Il serait important d'étudier les différentes voies de signalisation (TGR5 – TP53 – DNMT3B – KDM6B – GLIS2 – NANOG) pouvant être impliquées ainsi que les liens entre ces différentes voies.

4. Existe-t-il un lien entre TGR5, cancer germino-testiculaire et épigénétique ?

Une association a été mise en évidence entre les régulations épigénétiques et le développement des TGTs (la Rosa et al., 2017). L'une des marques épigénétiques les plus étudiées concerne la méthylation de l'ADN qui apparaît principalement sur les ilots CpG et qui est maintenue par les ADN méthyltransférases. La méthylation permet de supprimer la transcription des gènes et il est largement décrit que les GCNIS, tout comme les séminomes, présentent un degré de méthylation faible, associé à une activité transcriptionnelle importante. En parallèle, les tumeurs plus différenciées de type non-séminomes présentent des degrés de méthylation plus importants. Cette modification dans la méthylation est associée en partie au gène *DNMT3B* qui est surexprimé dans les carcinomes embryonnaires par rapport aux séminomes et dont l'expression est associée à un risque de rechute plus important (Arai et al., 2012).

Il a été démontré dans les TGTs chez l'homme que DNMT3B contrôle l'expression de *OCT3/4* et *NANOG* (Li et al., 2007). Nos résultats montrent une association entre *TGR5* et *DNMT3B* mais également entre *TGR5* et *OCT3/4* et *NANOG*, suggérant que TGR5 peut moduler *OCT3/4* et *NANOG* *via* DNMT3B. Il serait donc intéressant de réaliser des immunoprécipitations de la chromatine afin d'étudier la méthylation des promoteurs de *OCT3/4* et *NANOG* après l'activation de TGR5 par son agoniste ou dans des cellules invalidées pour *TGR5* en comparaison avec des cellules parentales.

Par ailleurs, les niveaux de méthylation sont associés à la résistance aux chimiothérapies. Les tumeurs indifférenciées de type séminomes, souvent hypométhylées, sont plus sensibles aux chimiothérapies que les tumeurs différenciées (non-séminomes) qui présentent un niveau de méthylation plus élevé (Buljubašić et al., 2018). De manière intéressante, TGR5 est plus exprimé dans les échantillons de non-séminomes et son expression est positivement corrélée à la méthylation. Cela suggère donc que l'analyse de l'implication de TGR5 dans les processus épigénétiques associés aux TGTs permettrait de mieux comprendre le rôle de TGR5 et notamment son implication dans les mécanismes de chimiorésistance.

5. TGR5 module-t-il la différenciation cellulaire ?

Les analyses réalisées à partir des bases de données issues des échantillons de TCGA ont mis en évidence que TGR5 est plus exprimé dans les échantillons tumoraux de non-séminomes, qui représentent des TGTs plus différenciées que les séminomes. Ces résultats soulèvent donc une interrogation au sujet de l'implication de TGR5 dans la différenciation cellulaire.

Une étude a mis en évidence que les acides biliaires conduisaient à la différenciation des monocytes en cellules dendritiques *via* la voie de signalisation TGR5 – AMPc (Ichikawa et al., 2012). En effet, des monocytes, cultivés en présence d'acides biliaires, conduisent à la formation de cellules dendritiques produisant de faibles niveaux d'interleukine 12 (IL-12) et de TNFα. Cette différenciation n'est pas affectée par l'activation de FXRα contrairement à un traitement avec un agoniste spécifique de TGR5 ou une stimulation avec l'AMPc, ce qui permet de confirmer qu'il s'agit d'un impact spécifique de TGR5. De plus, l'activation de TGR5 conduit à la différenciation des cellules musculaires (Sasaki et al., 2018). En effet, des cellules myoblastiques C2C12 sur-exprimant TGR5 et traitées avec du TLCA présentent une augmentation de l'accumulation des transcrits de *Sik1* (*Salt Inducible Kinase 1*) ainsi que de gènes marqueurs de différenciation (tels que *MyoD* (*MYOblast Determination protein 1*), *Myogenin*, etc.). Il est également retrouvé un nombre de cellules différenciées plus important

dans les cellules traitées au TLCA. Par ailleurs, TGR5 est exprimé dans les adipocytes et son activation conduit à l'apparition de marqueurs des adipocytes beiges. TGR5 est décrit comme étant impliqué dans le processus de différenciation des pré-adipocytes en adipocytes beiges (Velazquez-Villegas et al., 2018). De manière intéressante, il a également été démontré que l'activation de TGR5 entraîne la différenciation des cellules ostéoblastiques et cet effet est aboli en présence d'un siARN dirigé contre le gène codant pour TGR5 (Wang et al., 2018).

A l'inverse, une autre étude a mis en évidence que l'invalidation de *TGR5* induit la différenciation des ostéoclastes. Il est intéressant de noter que des traitements avec différents agonistes de TGR5 inhibent cette différenciation et cet effet est dépendant de la voie de signalisation AMPc/AMPK (Li et al., 2018b).

L'ensemble de ces données suggère que TGR5 joue un rôle clé dans la différenciation cellulaire qui peut être pro ou anti-différenciation selon le type cellulaire, bien que son activation favorise principalement la différenciation. D'après les résultats obtenus avec les analyses des échantillons issus de la cohorte de TCGA, TGR5 pourrait être impliqué dans la différenciation des TGTs puisqu'on le retrouve plus exprimé dans les échantillons différenciés que dans les échantillons moins différenciés.

De manière courante, les séminomes et les non-séminomes sont décrits comme deux types de tumeurs dérivants d'une origine commune : les néoplasies germinales *in situ* (GCNIS). Il a cependant été décrit que les non-séminomes pouvaient également provenir d'une reprogrammation de cellules de séminomes (van de Geijn et al., 2009; McIver et al., 2013; Oosterhuis and Looijenga, 2003, 2005). Cette reprogrammation reste à l'heure actuelle hypothétique et aucun mécanisme associé n'a été décrit.

Il est intéressant de noter qu'au-delà de la possibilité de différenciation des séminomes en non-séminomes une étude suggère qu'il pourrait y avoir un « switch » entre séminomes et non-séminomes dans les deux sens *via* la reprogrammation des cellules (Boublikova et al., 2014). A l'heure actuelle, aucune donnée ne prouve une « transdifférenciation » des non-séminomes vers les séminomes. Cependant, l'hypothèse que cette différenciation existe reste plausible et nos résultats suggèrent que TGR5 pourrait être impliqué dans cette transdifférenciation. En effet, comme indiqué précédemment, TGR5 semble impliqué dans le pouvoir souches des cellules mais il joue également un rôle dans la différenciation cellulaire. Le fait que les cellules de non-séminomes (cellules plus différenciées) invalidées pour *TGR5* expriment plus fortement certains marqueurs de pluripotence pourrait être associé à un

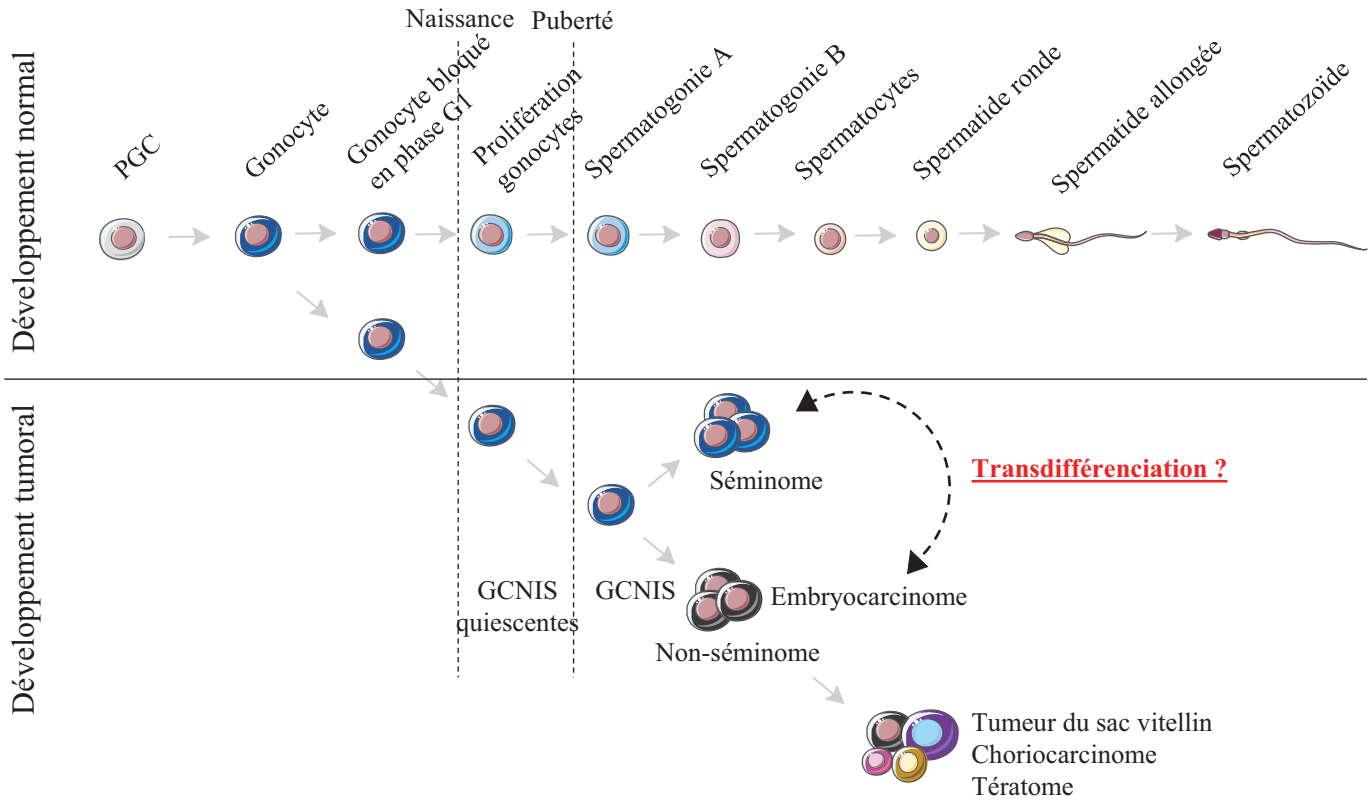


Figure 27 : Hypothèse de transdifférenciation des tumeurs de type séminome en non-séminome et inversement. Nous posons l'hypothèse que TGR5 joue un rôle dans la transdifférenciation des non-séminomes en séminomes.

mécanisme de transdifférenciation de non-séminomes vers séminomes (**Figure 27**). Nos résultats ont en effet permis de mettre en évidence que l'invalidation de *TGR5* est associée à une augmentation de l'accumulation des transcrits de gènes associés au statut indifférencié des cellules (*DNMT3B*, *NANOG*, *OCT3/4*) dans les échantillons de non-séminomes mais également que les cellules invalidées pour *TGR5* présentent une capacité de prolifération moins importante que des NCCIT parentales. Les séminomes étant des tumeurs présentant des caractéristiques plus souches associées à une prolifération moins importante que les non-séminomes, il est donc envisageable que l'invalidation de TGR5 ait modifié les capacités de ces cellules *via* la transdifférenciation de celles-ci.

La transdifférenciation est un mécanisme déjà décrit qui est associé à la reprogrammation des cellules. Il a été démontré que les cellules α des ilots pancréatiques pouvaient être reprogrammées *via* TGR5 notamment pour favoriser la sécrétion de GLP-1 (Kumar et al., 2016). L'hypothèse de transdifférenciation étant associée à la reprogrammation des cellules, il semble que TGR5 puisse donc jouer un rôle dans ce mécanisme. Par ailleurs, il est connu que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un mécanisme de transdifférenciation puisque des cellules épithéliales vont se différencier en cellules mésenchymateuses. A partir de l'étude de lignées cellulaires de cancer gastrique, il a été démontré que TGR5 est exprimé dans les stades les plus avancés du cancer gastrique et que son expression est corrélée à des marqueurs de l'EMT, suggérant un rôle potentiel de TGR5 dans la transdifférenciation (Carino et al.).

Afin de mieux comprendre l'implication de TGR5 dans une potentielle transdifférenciation des non-séminomes en séminomes, il serait intéressant de réaliser une analyse transcriptomique des NCCIT parentales ainsi que de différents clones de NCCIT invalidés pour *TGR5*. Dans un premier temps, les marqueurs spécifiques aux séminomes ou aux non-séminomes pourraient être évalués mais la comparaison de cette analyse avec des données disponibles sur les différents types tumoraux de TGTs permettrait d'affiner l'hypothèse de transdifférenciation. En effet, il serait important d'étudier si les différences transcriptomiques retrouvées entre des NCCIT parentales et invalidées pour *TGR5* sont associées à un type tumoral spécifique plutôt qu'un autre.

6. Quel pourrait être le rôle de TGR5 en thérapeutique ?

Nos données préliminaires ne permettent actuellement pas de conclure que TGR5 joue un rôle dans la transdifférenciation des non-séminomes en séminomes. Cependant, si tel est le cas, cela ouvre des perspectives importantes quant au rôle de TGR5 en clinique. En effet, les séminomes sont des tumeurs de meilleur pronostic et plus sensibles aux traitements que les non-séminomes (Chung and Warde). Dans le cas où l'invalidation de *TGR5* permettrait une transdifférenciation des non-séminomes vers les séminomes, cela suggérerait que l'invalidation de *TGR5* pourrait être une piste thérapeutique dans l'amélioration des traitements des cancers germino-testiculaires.

L'analyse de la chimiosensibilité de ces tumeurs est elle aussi majeure. Il serait tout d'abord intéressant d'observer s'il existe une corrélation entre l'expression de *TGR5* et la chimiorésistance des tumeurs. Par ailleurs, si TGR5 est capable de cibler la transdifférenciation des non-séminomes en séminomes, il pourrait être intéressant d'étudier la modulation de TGR5 *via* l'utilisation d'un agoniste ou d'un antagoniste dans le cadre des traitements des TGTs en combinaison avec les chimiothérapies utilisées de manière courante. Comme suggéré précédemment, il a été montré que l'activation de TGR5 en combinaison avec une molécule de chimiothérapie permet de chimiosensibiliser les cellules germinales tumorales humaines NCCIT (Thirouard et al., Article 2) et les cellules germinales murines (Thirouard et al., Article 1). La modulation positive de TGR5 avec un agoniste pourrait permettre de chimiosensibiliser les TGTs dans le cadre de TGTs chimiorésistantes.

Par ailleurs, il est envisageable que TGR5 puisse être un marqueur du type de TGTs. En effet, nos résultats ont mis en évidence que *TGR5* est plus fortement exprimé dans les échantillons de non-séminomes. Il pourrait donc s'agir d'un marqueur du type tumoral voire d'un marqueur pronostic si une corrélation entre l'expression de *TGR5* et le stade tumoral est observée.

Afin d'évaluer l'implication de TGR5 dans le développement et l'agressivité tumorale, la transplantation de NCCIT parentales ou invalidées pour *TGR5* pourrait être réalisée *via* des xénogreffes chez des souris nudes. Dans un premier temps, l'analyse anatomopathologique des tumeurs permettrait d'étudier l'impact de TGR5 dans le développement tumoral. Il serait également intéressant d'analyser les différences dans le développement tumoral entre une souris ayant reçu une xénogreffe de cellules NCCIT parentales vis-à-vis d'une souris ayant reçu une transplantation de cellules NCCIT invalidées pour *TGR5*. Dans un second temps, l'agressivité

de ces tumeurs pourra être évaluée ; en effet, il serait intéressant d'étudier le rôle de TGR5 dans le stade tumoral et ainsi, dans l'agressivité tumorale afin de mieux appréhender l'implication de TGR5 dans ce contexte.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion générale

L'ensemble des travaux réalisés dans cette étude permet de mieux appréhender les rôles de TGR5 dans la physiologie et la physiopathologie du testicule. Les points majeurs issus de nos études seront discutés dans cette partie. Dans un premier temps, (A) le rôle physiologique de TGR5 dans l'homéostasie des cellules souches sera évoqué. Dans un second temps, (B) nous discuterons de l'implication de TGR5 dans la chimiosensibilité, et de la possibilité de moduler TGR5 dans le cadre de traitements. Enfin, (C) la question de la régulation de TGR5 au sein du testicule sera détaillée.

A. TGR5 contrôle-t-il l'homéostasie des cellules souches ?

1. TGR5 régule l'expression de gènes de pluripotence

Les résultats obtenus par l'analyse du transcriptome (par une approche RNAseq) des cellules murines GC1-spg, transfectées avec un siARN dirigé contre *Tgr5* ou avec un siARN contrôle, validés par qPCR, ont permis de mettre en évidence que le *knock-down* de *Tgr5* conduit à l'augmentation de l'accumulation des transcrits de gènes de cellules indifférenciées tels que *Gfra1*, *Nanog* et *Fgfr2*. En parallèle, dans des cellules tumorales humaines NCCIT, l'invalidation de *TGR5* est associée à une augmentation de l'accumulation des transcrits des gènes *NANOG*, *OCT3/4*, *GFRA1* et *DNMT3B* qui sont associés au statut indifférencié des cellules. L'ensemble de ces résultats suggère donc que TGR5 joue un rôle clé dans les cellules germinales indifférenciées et que cet effet est conservé au sein des espèces.

Une des questions majeures est de comprendre comment TGR5 régule l'expression de ces gènes de pluripotence. La voie de signalisation principale de TGR5 étant l'activation de la protéine kinase A (PKA) par l'AMPc *via* l'adénylate cyclase, il est envisageable que ces gènes soient régulés par la PKA. Afin de confirmer ou non cette hypothèse, un traitement des cellules avec le H-89 dihydrochloride, qui est un inhibiteur de la PKA, pourrait être réalisé. Dans le cas où la régulation de l'expression des gènes de pluripotence par TGR5 ne serait pas dépendante de la PKA, il serait intéressant d'étudier les autres voies de signalisation associées à TGR5 (ERK1/2, MAPKs etc.) ou encore de trouver un ou des intermédiaires directement modulés par TGR5 qui réguleraient les gènes de pluripotence. Afin de trouver des intermédiaires potentiels, il est possible de réaliser des analyses avec l'outil i-cisTarget. Cet outil permet d'obtenir les différents facteurs de transcription dont la séquence de fixation est présente sur le promoteur des gènes analysés. Des analyses préliminaires ont été réalisées sur les gènes régulés

négativement par TGR5 dans les cellules NCCIT (gènes dont l'accumulation des transcrits est augmentée par l'invalidation de *TGR5*). Cette étude a permis de mettre en évidence que la modulation de ces gènes pourrait être associée aux facteurs de transcription NKX3-1, PROP1 ou encore HNF4A (*Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha*). Aucune donnée dans la littérature ne permet de relier directement ces facteurs à TGR5 et il existe peu d'informations quant au rôle de ces facteurs de transcription dans le testicule. NKX3-1 est exprimé dans le testicule et son expression est perdue dans les TGTs (Skotheim et al., 2003) bien qu'aucun mécanisme n'ait été décrit. Il serait intéressant d'avoir des listes de gènes régulés par TGR5 plus importantes en réalisant une analyse « avec *a priori* » sur différents gènes associés à la pluripotence des cellules souches qui pourraient donc être ajoutés à notre analyse i-cisTarget. Cela permettrait de renforcer les analyses déjà réalisées afin de trouver plus de facteurs de transcription impliqués, mais cela pourrait également permettre de renforcer les statistiques. En parallèle, l'analyse du transcriptome, par RNAseq, de spermatogonies triées invalidées pour *TGR5*, en comparaison à des spermatogonies sauvages, permettrait d'étudier l'ensemble des gènes modulés par TGR5 et ainsi de mieux comprendre par quels mécanismes TGR5 régule ces différents gènes.

L'implication de TGR5 dans les spermatogonies indifférenciées ou dans les cellules souches de manière basale n'est actuellement pas décrite mais plusieurs études ont mis en évidence, en accord avec nos données, un rôle de TGR5 dans les cellules souches d'autres tissus après un dommage (voir ci-après).

2. Régénération tissulaire après un dommage

En l'absence de traitement, chez la souris, il n'est pas observé de différence du nombre de cellules germinales indifférenciées PLZF$^+$ entre les individus sauvages ou invalidés pour *Tgr5*. De plus, aucune différence du nombre de spermatozoïdes ou du nombre de petits par portée n'est observée. Au contraire, après un traitement au busulfan, l'invalidation du gène *Tgr5* permet un redémarrage précoce de la spermatogenèse, suggérant que TGR5 peut être impliqué en condition physiopathologique après un dommage tissulaire. En accord avec nos données, plusieurs études ont mis en évidence l'implication des acides biliaires et de TGR5 dans le renouvellement cellulaire après un dommage dans différents tissus.

Dans l'épithélium de l'intestin, des métabolites, dont les acides biliaires, contrôlent la niche des cellules souches intestinales, permettant le renouvellement et le remodelage tissulaire. Des données ont mis en évidence que l'activation de TGR5 par les acides biliaires conduisant à l'activation de SRC et YAP (*Yes-Associated Protein*) et à l'activation de leurs gènes cibles

permettait la régénération de l'épithélium intestinal (Sorrentino et al., 2020). De plus, YAP est exprimé dans les spermatogonies et est associé à l'expression de gènes impliqués dans le devenir des cellules indifférenciées tels que *Sohlh1* et *Ngn3*, bien que son invalidation ne soit pas suffisante pour entraîner une altération de la spermatogenèse *in vivo* (Abou Nader et al., 2019). Ces données suggèrent que la régulation de SRC et de YAP par TGR5 pourrait être un mécanisme important dans le lien entre TGR5 et la spermatogenèse. De plus, il a été mis en évidence que le relargage d'acides biliaires endogènes dans la lumière intestinale est suffisant pour entraîner l'auto-renouvellement des cellules souches intestinales et leur prolifération *via* TGR5 en réponse à un dommage. Ces résultats montrent un rôle important de TGR5 dans l'homéostasie des cellules souches, mais également dans la régénération d'un tissu après un dommage. Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence l'implication des acides biliaires, induisant l'activation de YAP, dans le développement du cancer du foie (Anakk et al., 2013) et dans la dissémination métastatique des nodules lymphatiques (Lee et al., 2019). Ces études ne démontrent pas d'implication de TGR5 dans le lien entre les acides biliaires, l'activation de YAP et le développement tumoral mais les résultats obtenus plus récemment suggèrent que cet impact pourrait être dépendant de TGR5 (Sorrentino et al., 2020).

Par ailleurs, il a été démontré que TGR5 est exprimé dans les cellules souches de l'épiderme et que son expression est diminuée après une irradiation aux UV-B. L'activation de TGR5 permet également de prévenir le stress oxydatif induit par les UV-B. Dans les cellules souches de l'épiderme, l'activation de TGR5 entraîne une augmentation de l'expression de *Wnt1a*, *Wnt3a*, *Myc* et de la C*ycline D1*, suggérant une nouvelle fonction de TGR5 dans la régulation des cellules souches de l'épiderme (Chang and Yu, 2019).

Ces études permettent de conclure que TGR5 semble jouer un rôle dans les cellules souches de différents tissus, notamment après un dommage tissulaire, suggérant que TGR5 pourrait être impliqué dans la régénération d'un tissu, après une altération de celui-ci. L'implication de TGR5 en réponse à un dommage semble dépendre du tissu ou du type de dommage. En effet, dans les premiers cas son activation permet une protection vis-à-vis des dommages alors que dans notre modèle l'effet inverse est observé : l'activation de TGR5 accentue les effets délétères du busulfan, alors que son invalidation permet un redémarrage précoce de la spermatogenèse.

La question de l'implication de TGR5 dans le contrôle de l'homéostasie des cellules souches germinales est donc majeure afin de mieux comprendre le rôle de TGR5 (1) dans la

régénération tissulaire après un dommage tel qu'un traitement avec une chimiothérapie, (2) dans la physiologie testiculaire, notamment au moment de la mise en place de la spermatogenèse et (3) dans le cancer testiculaire dont les cellules souches sont à l'origine.

3. Implication de TGR5 dans la mise en place de la spermatogenèse

Nos résultats ont mis en évidence que TGR5 est impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes associés à la pluripotence des cellules germinales indifférenciées. Bien que chez l'adulte aucune différence du nombre de spermatogonies indifférenciées n'ait été observée entre des individus sauvages ou invalidés pour *Tgr5* non traités, un rôle bénéfique de l'invalidation de *Tgr5* après un traitement au busulfan a été démontré. Dans ce contexte, le rôle physiologique de TGR5 dans la mise en place de la spermatogenèse semble être un élément clé à étudier. En effet, le redémarrage précoce de la spermatogenèse suite à un traitement de chimiothérapie est un mécanisme pouvant être mis en parallèle de la mise en place de la spermatogenèse, lors de la puberté. De ce fait, l'analyse de souris de la naissance et jusqu'à la production spermatique, en l'absence de traitement, permettrait d'étudier la spermatogenèse dès les premiers stades jusqu'à la puberté et ainsi de mieux comprendre le rôle de TGR5 dans cette mise en place. Afin d'étudier ces mécanismes, des colorations immunohistochimiques, permettant d'étudier la structure des tubes séminifères et la mise en place de la spermatogenèse, seront réalisées, ainsi que des analyses de l'expression des gènes méiotiques. Les spermatogonies A différenciées apparaissent aux alentours du 6ème jour post-partum, un marquage d'une coupe testiculaire avec le marqueur PLZF, 6 jours après la naissance, chez des individus sauvages ou invalidés pour *Tgr5* permettra d'étudier les premiers stades de la spermatogenèse. Dix jours après la naissance, les premiers spermatocytes primaires sont observés (McLean et al., 2003), la réalisation d'un marquage avec G9A, spécifique des spermatocytes, pourra être réalisé à ce moment. L'apparition des spermatides rondes et des spermatides allongées se fait autour du 20ème jour et du 28ème jour post-natal, respectivement, moment auquel un immunomarquage avec le marqueur H4 acétylé pourra être réalisé. L'ensemble de ces analyses permettra d'étudier l'impact de l'invalidation de *Tgr5* sur la mise en place de la spermatogenèse.

Il est intéressant de noter qu'il a déjà été mis en évidence que les acides biliaires pouvaient être impliqués dans la mise en place de la spermatogenèse *via* le récepteur nucléaire des acides biliaires FXRα (Martinot et al., 2017). En effet, quinze jours après leur naissance, les souris *Fxrα*$^{-/-}$ présentent plus de cellules post-méiotiques que les souris *Wt*, suggérant que

les souris invalidées pour *Fxrα* présentent une mise en place précoce de la spermatogenèse. D'après ces données et les résultats obtenus dans notre étude, il est donc envisageable que TGR5 soit également impliqué dans ce mécanisme.

4. Rôle de TGR5 dans la différenciation des cellules germinales

Les résultats obtenus dans nos travaux ont permis de mettre en évidence que TGR5 est impliqué dans les mécanismes de prolifération des cellules germinales. Dans un modèle cellulaire humain (NCCIT), il a été observé un nombre de cellules adhérentes moins important pour les cellules invalidées pour *TGR5*, par rapport aux cellules NCCIT parentales. Cette diminution du nombre de cellules est associée à une prolifération plus faible (visualisée par un marquage au BrdU) des cellules *TGR5*$^{-/-}$ par rapport aux cellules sauvages (Thirouard et al., Article 2). Ces résultats vont à l'inverse de ce qui a été observé chez la souris, où, en réponse au busulfan, les cellules invalidées pour *Tgr5* entraînent un redémarrage précoce de la spermatogenèse, associé au maintien de la prolifération des cellules PLZF^{+} (Thirouard et al., Article 1). Il existe donc une différence entre les cellules germinales murines « saines » traitées au busulfan et les cellules germinales tumorales humaines NCCIT non traitées. TGR5 semble avoir un impact différentiel sur la prolifération selon l'espèce et/ou selon qu'il s'agisse de conditions physiologiques, pathologiques (cellules tumorales) ou suite à un traitement.

a) Spermatogenèse

Au-delà de l'impact de TGR5 sur la prolifération, il a également été démontré que TGR5 pouvait jouer un rôle dans l'apoptose des cellules germinales, notamment après un traitement au busulfan. Cependant, l'implication de TGR5 dans la différenciation des cellules germinales n'a pas été étudiée. La différenciation des cellules germinales est un mécanisme physiologique, nécessaire au bon déroulement de la spermatogenèse puisqu'elle permet la formation des stades plus tardifs de la spermatogenèse à partir des spermatogonies. La différenciation des cellules germinales est notamment dépendante de la voie des acides rétinoïques, qui vont induire l'expression de STRA8. Il serait intéressant de comparer l'accumulation des transcrits de *Stra8* chez des souris ou dans des cellules GC1-spg sauvages ou invalidées pour *Tgr5* afin d'étudier l'implication de TGR5 dans ce mécanisme.

Par ailleurs, un traitement *in vivo* ou *in vitro* avec des acides rétinoïques afin d'induire la différenciation de ces cellules germinales pourrait être réalisé afin d'étudier l'expression de TGR5 et de comprendre s'il existe une corrélation entre l'expression et/ou l'activité de TGR5

et le stade de différenciation des cellules germinales. De manière intéressante, il a été démontré dans des adipocytes sous-cutanés humains une augmentation importante de l'accumulation des transcrits de *TGR5* au cours de la différenciation (Mališová et al., 2013), suggérant que TGR5 est associé à ce mécanisme.

b) Cancer testiculaire

i. Initiation du cancer testiculaire

Les résultats obtenus dans notre étude (Thirouard et al., Article 2) soulèvent une interrogation quant à l'implication de TGR5 dans l'initiation du cancer testiculaire. Le développement des tumeurs germino-testiculaires (TGTs) est associé à des troubles de la prolifération et/ou de la différenciation des gonocytes en spermatogonies. En effet, les TGTs dérivent des cellules germinales et ont comme précurseurs communs les néoplasies germinales *in situ* (GCNIS). Les GCNIS proviennent de PGCs ou de gonocytes, qui au lieu de se différencier normalement se transforment en néoplasie. Cela place la différenciation comme un mécanisme clé de l'initiation tumorale, il serait donc intéressant de comprendre le rôle de TGR5 dans ce mécanisme.

Afin d'étudier si TGR5 est capable d'initier le cancer germino-testiculaire, un modèle de souris invalidées pour *Pten* et pour *Tgr5* est disponible dans l'équipe de recherche. Il est connu que les souris invalidées pour *Pten* seul, à partir du stade PGCs, présentent des tératomes avec très peu de cas d'embryocarcinomes et un taux très faible de métastases (Kimura et al., 2003). Une autre étude a mis en évidence que dans les spermatogonies, l'invalidation de *Pten* par l'utilisation d'un système Cre-Lox par la recombinase Cre sous le contrôle des séquences régulatrices de *Stra8*, permettant une invalidation dès les stades embryonnaires, conduit au développement de tumeurs dans environ 20 % des cas (Pierpont et al., 2017).

L'expression de TGR5 dans les néoplasies germinales *in situ* (GCNIS) pourrait être évaluée en comparaison avec des PGCs, des gonocytes ou des tumeurs plus différenciées de type séminome ou non-séminome afin de comprendre s'il existe une association entre l'expression de TGR5 et le stade de différenciation cellulaire. De plus, la modulation de TGR5 par un agoniste ou un antagoniste chez les souris invalidées pour *Pten* à des stades précoces (PGCs, gonocytes) permettrait d'étudier son rôle sur la différenciation de ces cellules en GCNIS ou en spermatogonies, afin de mieux appréhender l'implication de TGR5 dans l'initiation du cancer testiculaire. Au-delà de la modulation de l'activité de TGR5, il serait également

envisageable de réaliser une invalidation de *Tgr5* dans ces mêmes souris *Pten*$^{-/-}$ à des stades précis du développement (stade PGCs ou gonocytes) à l'aide d'un modèle TGR5-flox Cre avec l'utilisation d'une Cre inductible (qui permettra d'induire l'invalidation de TGR5 à partir d'un stade précis). L'invalidation de *Tgr5* en plus de l'invalidation de *Pten* permettrait de voir si une augmentation du nombre de tumeurs est visible mais également si ces tumeurs sont plus ou moins agressives.

Un modèle de souris invalidées pour le gène codant PTEN et présentant une surexpression du gène codant pour KRAS *via* la Cre sous le contrôle du promoteur de *Stra8* a été généré plus récemment (Pierpont et al., 2017). Ces souris développent des tumeurs dans 75 % des cas ; il serait intéressant en parallèle de ce modèle génétique de moduler l'activité de TGR5 par des traitements avec un agoniste ou un antagoniste de TGR5 afin de pouvoir évaluer l'implication de TGR5 dans l'initiation tumorale. Ce modèle permettrait de voir si TGR5 favorise le développement tumoral ou au contraire le ralentir.

ii. Différenciation des cellules germinales tumorales

Comme déjà évoqué dans la discussion de l'article 2, l'implication de TGR5 dans la différenciation suggère son rôle potentiel dans la différenciation du cancer testiculaire : de séminome vers non-séminome, mais également dans l'hypothèse de transdifférenciation : de non-séminome vers séminome. Plusieurs études ont décrit que les non-séminomes pouvaient provenir de séminomes (McIver et al., 2013; Oosterhuis and Looijenga, 2003, 2005) et une étude suggère que cette différenciation pourrait se faire dans les deux sens en posant l'hypothèse d'une transdifférenciation des non-séminomes vers les séminomes (Boublikova et al., 2014). A l'heure actuelle, les mécanismes impliqués n'ont pas été décrits mais il semble qu'ils pourraient être associés à la reprogrammation des cellules. TGR5 étant impliqué dans l'homéostasie des cellules souches ainsi que dans la différenciation cellulaire, il est envisageable que TGR5 puisse être impliqué dans le mécanisme de transdifférenciation.

Afin de mieux comprendre l'implication de TGR5 dans les mécanismes de différenciation, plusieurs études pourront être réalisées. Dans un premier temps, l'expression de *TGR5* pourrait être évaluée dans des cellules tumorales traitées avec des acides rétinoïques, permettant leur différenciation, par rapport à des cellules tumorales contrôles afin de comprendre si la différenciation peut réguler l'expression de *TGR5*. Dans un second temps, la différenciation des cellules tumorales NCCIT pourrait être analysée avec l'expression du récepteur aux acides rétinoïques, notamment dans des lignées cellulaires sauvages ou invalidées

pour *TGR5*. L'ensemble de ces résultats permettrait de savoir si TGR5 régule la différenciation cellulaire, et donc s'il peut être un acteur du développement tumoral. Par ailleurs, des analyses transcriptomiques de différents types tumoraux pourraient être réalisées afin d'étudier l'implication de TGR5 dans les mécanismes de différenciation des tumeurs. Il serait en effet intéressant d'étudier les différents types de TGTs à différents stades de différenciation en réalisant un gradient à partir des embryocarcinomes qui représentent les non-séminomes les moins différenciés, jusqu'aux tératomes qui sont les TGTs les plus différenciées.

L'implication de TGR5 dans le cancer testiculaire amène également à une autre question qui est de mieux comprendre les rôles de TGR5 en réponse aux chimiothérapies afin de savoir si la modulation de TGR5 peut être utilisée dans les traitements.

B. La modulation de TGR5 peut-elle être utilisée dans un cadre clinique ?

1. Utilisation de TGR5 en clinique

Nos données démontrent que l'invalidation de *Tgr5* permet un redémarrage précoce de la spermatogenèse après un traitement au busulfan. A l'inverse, l'activation de TGR5 par un régime supplémenté en acide cholique *in vivo* ou par un pré-traitement à l'INT-777 *in vitro* accentue les effets du busulfan et sensibilise les cellules murines GC1-spg, comme les cellules humaines NCCIT, au busulfan. Cela place donc TGR5 comme un acteur majeur de la chimiosensibilité des cellules germinales. Il est donc important de mieux comprendre si la modulation de TGR5 peut être impliquée dans la repro-toxicité dans le cadre de traitements de chimiothérapie mais également s'il peut entrer dans les traitements de chimiothérapie afin de sensibiliser les cellules tumorales aux traitements.

a) Repro-toxicité

Dans le cadre d'un traitement au busulfan, connu pour avoir un impact délétère majeur sur la lignée germinale et à terme sur la fertilité, il serait pertinent d'étudier les effets d'un cotraitement avec un antagoniste de TGR5, utilisé de manière vectorisée comme décrit précédemment, avec le busulfan. D'après les résultats obtenus dans notre étude, où l'invalidation de *Tgr5* permet un redémarrage précoce de la spermatogenèse après un traitement au busulfan, il semblerait que l'inactivation de TGR5 par un antagoniste pourrait améliorer la fertilité des patients traités au busulfan. Avant de pouvoir intégrer la modulation de TGR5 dans les protocoles de traitement, de nombreuses questions subsistent cependant.

Dans un premier temps, comme déjà évoqué, il est important d'étudier le rôle de TGR5 après un traitement chronique au busulfan, en combinaison avec d'autres molécules (cyclophosphamide ou fludarabine) comme utilisé en clinique. Par ailleurs, il sera majeur de comprendre si le rôle de TGR5 après un traitement au busulfan peut être ouvert de manière plus large à d'autres molécules telles que le cisplatine, couramment utilisé dans le traitement de nombreux cancers, permettant d'élargir le rôle de TGR5 dans la préservation de la fertilité.

b) Chimiosensibilisation des cellules tumorales

Lors de traitements du cancer testiculaire, il serait intéressant d'étudier le rôle de TGR5 après un traitement au BEP, afin de confirmer, ou non, que l'activation de TGR5 sensibilise les cellules germinales aux chimiothérapies. Ceci pourrait être une avancée majeure dans le traitement des TGTs chimiorésistantes. Par ailleurs, l'activation de TGR5 dans d'autres types cellulaires, tels que les cellules souches hématopoïétiques, en parallèle d'un traitement au busulfan, permettrait de comprendre si TGR5 peut sensibiliser d'autres types cellulaires à la chimiothérapie.

Une étude a mis en évidence que des patients pédiatriques traités avec des chimiothérapies (différentes chimiothérapies dans le cadre de divers cancers) présentent une augmentation des taux d'acides biliaires lors du rétablissement de la moelle osseuse après une myélosuppression (Sigurdsson et al., 2020). Chez la souris, cet effet est également observé après un traitement au 5-fluorouracile (molécule de chimiothérapie de type anti-métabolite) (Sigurdsson et al., 2020). Dans un modèle murin d'altération de la composition des acides biliaires, induite par une invalidation pour le gène codant CYP8B1, un mauvais rétablissement du pool de cellules hématopoïétiques est observé après un traitement avec une chimiothérapie (Sigurdsson et al., 2020). Cet effet est corrélé avec des taux d'acides biliaires faibles, associés à une modification de la composition du pool d'acides biliaires. A l'inverse, les souris traitées avec une chimiothérapie et nourries avec un régime enrichi en acides biliaires présentent une amélioration dans le retour à la normale du nombre de cellules. Ces résultats ont permis de conclure que les acides biliaires supportent le rétablissement du pool de cellules après une chimiothérapie, ce qui est contraire à ce qui a été observé dans nos travaux, où nous avons montré que l'invalidation de *Tgr5* permet d'améliorer le redémarrage de la spermatogenèse après un traitement avec une molécule de chimiothérapie (Thirouard et al., Article 1). Au regard de cette différence entre les tissus, il apparaît donc majeur de comprendre si TGR5 est impliqué dans ce mécanisme.

Il a été démontré que l'acide ursodésoxycholique (UDCA, UrsoDeoxyCholic Acid) peut protéger des dommages induits par des drogues anti-cancéreuses. L'UDCA peut en effet atténuer les effets délétères du 5-fluorouracil au niveau gastro-intestinal chez le rat (Kim et al., 2018). Par ailleurs, après un traitement au cisplatine, l'UDCA présente un effet neuroprotecteur *via* la modulation de la voie de signalisation TP53 (Park et al., 2008). Plusieurs études ont mis en évidence que l'UDCA semble agir comme un agoniste de TGR5. Cet effet a été observé dans les cellules HEK293T (Carino et al., 2019) mais également dans des cellules issues d'adénocarcinome du côlon (HCT116 et SW480) (Zhang et al., 2021a) ainsi que dans les cardiomyocytes ventriculaires murins en néonatal (Ibrahim et al., 2018). Il est important de noter que l'UDCA module en premier lieu la composition du pool d'acides biliaires, il est donc envisageable que, au-delà de son activité directe sur TGR5, l'UDCA régule TGR5 *via* une modification du pool d'acides biliaires. L'ensemble de ces données suggère que l'UDCA, potentiellement capable d'activer TGR5 selon le tissu étudié, pourrait être utilisé dans la combinaison de molécules anti-cancéreuses. A l'inverse de son impact protecteur après un dommage, il a également été démontré que l'UDCA pouvait promouvoir la réponse apoptotique induite par un inhibiteur de la topoisomérase de type I dans différentes lignées de cellules tumorales (Ikegami et al., 2006). De plus, il existe un effet synergique de l'UDCA sur l'activité anti-tumorale du sorafenib (molécule de chimiothérapie) dans les carcinomes hépatocellulaires. Ces résultats mettent en évidence que l'UDCA pourrait être combiné aux cocktails de chimiothérapies afin d'améliorer l'efficacité des traitements. L'ensemble de ces données, associé au fait que l'UDCA a été décrit comme un potentiel agoniste de TGR5, pose la question de l'implication de TGR5 dans la sensibilisation des cellules germinales au busulfan en clinique.

2. Etude de cohortes

Les résultats obtenus dans notre étude, associés aux données issues de la littérature, nous mènent à la conclusion que TGR5 est un acteur clé dans la chimiosensibilité des cellules. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et avant de proposer la modulation de TGR5 dans les cocktails de chimiothérapies d'un point de vue clinique, la réalisation de différentes analyses dans des cohortes de patients serait décisive.

Dans un premier temps, l'expression de *TGR5* dans une cohorte de patients adultes ayant été traités au busulfan pourrait être évaluée afin d'observer si le busulfan module l'expression de *TGR5*, notamment au sein du testicule. Par ailleurs, d'une manière plus précise, il serait

intéressant de réaliser des corrélations entre l'expression de *TGR5* et différents paramètres : la corrélation de TGR5 avec le temps nécessaire à la récupération de la fertilité permettrait d'indiquer si TGR5 est bien impliqué dans la chimiosensibilité des cellules germinales saines lors d'un traitement au busulfan. De plus, l'analyse de l'expression de *TGR5* en lien avec la réponse à la chimiothérapie (chimiosensibilité ou chimiorésistance) permettra de confirmer ou non si la sensibilité aux traitements de chimiothérapies peut être associée à TGR5.

Dans un second temps, une cohorte de patients adultes, ayant été traités au busulfan dans l'enfance (avant la puberté), pourrait être étudiée. L'expression de *TGR5* pourra également être corrélée avec la fertilité des individus.

Enfin, de manière plus large, l'expression de *TGR5* pourrait être analysée en parallèle de la sensibilité des tumeurs aux chimiothérapies dans l'ensemble des types de cancers, bien que TGR5 ait été associé à des mécanismes très divergents selon le tissu tumoral.

C. Comment TGR5 est-il modulé dans le testicule ?

L'ensemble de nos résultats a mis en évidence que TGR5 joue un rôle majeur au sein du testicule ; cependant, à l'heure actuelle, on ne sait pas comment l'expression et l'activité de TGR5 sont modulées dans ce tissu. Il a été démontré que *Tgr5* est exprimé dans le testicule murin (Vassileva et al., 2006) ainsi que le testicule humain (Kawamata, 2003). Au sein du testicule, *Tgr5* est exprimé majoritairement dans les cellules germinales (Baptissart et al., 2014), notamment dans les cellules germinales indifférenciées (données non publiées).

1. Régulation de l'expression de TGR5

Des souris obèses (invalidées pour la leptine) présentent une expression de TGR5 plus importante dans le foie (visualisé par immunohistochimie) que des souris contrôles (Chen et al., 2019), suggérant que l'expression de TGR5 pourrait être modulée par des défauts métaboliques. Cela semble très intéressant car il a été largement décrit que l'obésité et les troubles métaboliques de manière plus large sont impliqués dans des défauts de fertilité (Kahn and Brannigan, 2017). Ces défauts sont notamment associés à des dommages liés au stress oxydatif dans les spermatozoïdes, affectant leur qualité.

Par ailleurs, chez des souris obèses (nourries avec un régime riche en graisses), l'activation de FXRα par l'INT-767 entraîne l'expression de *Tgr5* permettant l'amélioration du métabolisme du glucose et des lipides *via* la stimulation de GLP-1 par l'AMPc (Pathak et al.,

2017). Ces résultats suggèrent donc que la régulation de l'expression de *TGR5* peut être dépendante d'un autre récepteur des acides biliaires : FXRα.

Cependant, il existe peu de travaux démontrant une régulation génique de *Tgr5*, ce qui ne nous permet pas de comprendre exactement comment l'expression de *Tgr5* est régulée. Afin de mieux comprendre cette régulation, il serait intéressant de réaliser des analyses sur le promoteur du gène de *Tgr5*, notamment à l'aide de l'outil Genomatix. Cet outil permet de trouver l'ensemble des sites de régulation potentiels retrouvés sur un promoteur et de comparer les promoteurs d'un même gène dans différentes espèces. Cette analyse nous permettrait d'étudier les potentielles régulations géniques de *Tgr5* et notamment de retrouver celles conservées entre les espèces, qui sont probablement les plus importantes puisque le rôle de TGR5 dans les cellules germinales indifférenciées est conservé entre les souris et les échantillons humains. Selon les différents sites potentiels retrouvés, il sera intéressant d'étudier en particulier ceux qui sont associés aux gènes exprimés au sein du testicule afin de mieux appréhender la régulation de l'expression génique de *TGR5* au sein de ce tissu.

D'après les résultats et les conclusions que nos travaux ont apportés, suggérant un rôle de TGR5 au sein des cellules germinales souches ainsi que dans leur différenciation cellulaire, il serait déterminant de comprendre si l'expression de *TGR5* peut être régulée par des acteurs clés de la niche de cellules souches germinales. Afin d'étudier cette hypothèse, l'expression de TGR5 pourrait être évaluée dans des cellules germinales traitées avec du GDNF ou du FGF2, qui représentent des acteurs clés de l'homéostasie des cellules souches germinales. Pour comprendre si TGR5 peut être régulé par des acteurs de la différenciation, le traitement de cellules ou de souris avec des acides rétinoïques, associé à l'analyse de l'expression de TGR5 dans les différentes conditions, pourrait être réalisé.

A plus long terme, il pourra être majeur d'étudier l'impact des gènes régulant l'expression du gène codant pour TGR5 sur les mécanismes évoqués dans nos travaux. En clinique, la modulation des gènes régulant TGR5 pourra également être évaluée et, ainsi, être potentiellement associée aux combinaisons de traitements dans le cadre du cancer germino-testiculaire, mais également afin de minimiser la repro-toxicité des traitements anti-cancéreux. En effet, si les gènes impliqués dans la régulation de TGR5 se trouvent par exemple être des récepteurs, il pourra être intéressant d'étudier l'impact de leur activation ou de leur inactivation.

Au-delà de la régulation de l'expression de *TGR5* dans le testicule, on sait que son activité peut également être modulée, notamment *via* la variation des concentrations et la biodisponibilité des ligands de TGR5 que sont principalement les acides biliaires.

2. Modulation de l'activité de TGR5

Il est connu que l'activité de TGR5 peut être modulée dans de nombreux cas. La régulation de l'activité de TGR5 implique la présence d'agonistes ou d'antagonistes. La biodisponibilité des agonistes, tels que les acides biliaires secondaires principalement, est donc un élément clé. Il existe de nombreuses pathologies associées à des variations des taux d'acides biliaires, et donc à terme capables de moduler l'activité de TGR5.

Les troubles hépatiques sont connus pour être associés à des modulations des taux d'acides biliaires. La cholestase représente un trouble hépatique important. Elle est caractérisée par une diminution du flux biliaire des hépatocytes vers le système digestif, entraînant une augmentation des taux d'acides biliaires dans le foie et le sang notamment, conduisant à une inflammation et à des dommages dans les hépatocytes et les voies biliaires.

Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre les troubles hépatiques et les troubles de la fertilité (Durazzo, 2006; Mooradian et al., 1985). Dans une cohorte de 50 patients atteints d'hépatite C chronique, un tiers d'entre eux présente une hypofertilité et deux tiers sont stériles. Les patients présentent une diminution de 50 % du nombre de spermatozoïdes et des anomalies morphologiques de ceux-ci sont observées (Hofny et al., 2011). Chez des modèles animaux, la ligature des voies biliaires entraîne une accumulation des acides biliaires dans le foie, mimant la pathologie hépatique (Kiani et al., 2009). Dans ce contexte pathologique, une diminution du taux de testostérone plasmatique est observée. Par ailleurs, un modèle murin de cirrhose, induite par un agent chimique, conduit à une déstructuration de la BHT (Castilla-Cortázar, 2004). De plus, il a été mis en évidence, au sein de l'équipe, une corrélation entre les concentrations plasmatiques d'acides biliaires et la diminution du nombre de petits par portée (Baptissart et al., 2014). Cette étude a également démontré qu'un régime riche en acides biliaires, mimant une cholestase, entraînait des défauts de la BHT et que cet effet est contrecarré en l'absence de *Tgr5*, permettant de conclure que l'activation de TGR5 est impliquée dans ce mécanisme. Les troubles hépatiques conduisent à des modulations des taux d'acides biliaires pouvant entraîner des altérations testiculaires associées à l'infertilité et cet effet est dépendant de TGR5. L'utilisation d'un modèle de souris nourries avec un régime supplémenté en acide cholique

mène à un retard dans le redémarrage de la spermatogenèse après un traitement au busulfan, suggérant que les cholestases peuvent être impliquées dans ce mécanisme.

Il a été démontré une altération majeure de la qualité des spermatozoïdes de mâles nourris avec un régime riche en acides biliaires. Cet effet conduit à des troubles métaboliques dans la descendance de ces mâles sur plusieurs générations et est dépendant de TGR5 (Baptissart et al., 2018). Ceci pose la question sur l'impact d'une modulation de TGR5 à différents moments de la vie (néonatal, prépubère, adulte) et à long terme. Il est posé l'hypothèse que la modulation de TGR5 peut avoir un impact épigénétique sur la lignée germinale qui impliquera des altérations à long terme, notamment sur plusieurs générations.

De manière intéressante, il est connu que des altérations épigénétiques sont impliquées dans le développement du cancer testiculaire et notamment que les TGTs de type séminomes présentent des niveaux de méthylation plus faibles que les non-séminomes. Il se pose donc la question de savoir si une modulation de TGR5 à un moment précis dans la vie de l'individu pourrait prédisposer au cancer testiculaire ou à l'infertilité. Il a récemment été démontré que TGR5 module DNMT3B, qui est une ADN méthyltransférase (Baptissart et al., 2018), impliquant un lien entre TGR5 et les modifications épigénétiques. Par ailleurs, sachant que les troubles hépatiques sont associés à l'infertilité, et que celle-ci est liée au risque de développement d'un cancer testiculaire, se pose la question de l'implication d'une cholestase, ou d'un autre trouble hépatique, *via* la modulation de l'activité de TGR5, sur le développement tumoral testiculaire. Il pourrait être intéressant d'observer le développement de TGTs chez des souris invalidées pour *Pten* et sur-exprimant *Kras* nourries avec un régime riche en acides biliaires afin d'étudier cette hypothèse.

Au-delà des troubles hépatiques, on sait que la composition du pool d'acides biliaires est modulée dans d'autres pathologies. Le diabète de type 2, l'obésité, ainsi que la stéatose hépatique non alcoolique sont associés à des dysbioses ainsi qu'à des modifications de la quantité et de la composition du pool d'acides biliaires (Boursier and Diehl, 2015; Haeusler et al.; Lake et al., 2013; Prinz et al., 2015). Il est également connu qu'une hépatectomie majeure (résection d'au moins 3 segments hépatiques) est associée à une modification de la composition du pool d'acides biliaires en faveur d'acides biliaires hydrophobes et que TGR5 est impliqué dans ce processus (Bidault-Jourdainne et al., 2020). L'ensemble de ces données met en évidence qu'il existe de nombreuses causes pouvant modifier les taux d'acides biliaires ainsi que la composition du pool d'acides biliaires, conduisant ainsi à la modulation de l'activité de TGR5

dans différents tissus. Il serait pertinent d'étudier l'impact de ces modulations sur TGR5 dans le testicule dans les différentes pathologies et conditions citées dans ce paragraphe.

Enfin, il serait important de comprendre si l'altération de l'homéostasie des acides biliaires, connue pour être impliquée dans les troubles de la fertilité, est impliquée directement ou s'il s'agit d'un effet indirect. Dans le cas où cet effet serait indirect, et comme discuté précédemment, l'implication du microbiote serait à évaluer puisqu'il est connu que la modulation du microbiote altère également la fertilité et qu'il existe des liens forts entre le microbiote et les pathologies hépatiques. Il serait intéressant d'étudier l'implication des pathologies hépatiques ainsi que du microbiote sur la physiologie et la physiopathologie testiculaire, notamment sur la fertilité, la régénération de la spermatogenèse après un traitement de chimiothérapie, mais également dans le cancer germino-testiculaire.

Mes travaux ont donc ouvert de nouvelles perspectives sur le rôle de TGR5 dans la physiologie du testicule. Nous avons démontré un rôle majeur de TGR5 dans la spermatogenèse, principalement après un dommage testiculaire, mais également dans l'homéostasie des cellules souches testiculaires. Nos résultats suggèrent par ailleurs que TGR5 pourrait être impliqué dans le cancer testiculaire.

ANNEXES

Annexe 1 :

Analysis of the Reversible Impact of the Chemodrug Busulfan on Mouse Testes. Cells (2021).

Laura Thirouard, Hélène Holota, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H Volle.

cells

MDPI

Article

Analysis of the Reversible Impact of the Chemodrug Busulfan on Mouse Testes

Laura Thirouard, Hélène Holota, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin * and David H. Volle *

INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD Institute, Team-Volle, F-63001 Clermont-Ferrand, France; laura.thirouard@uca.fr (L.T.); Helene.HOLOTA@uca.fr (H.H.); Melusine.MONROSE@uca.fr (M.M.); Manon.GARCIA@uca.fr (M.G.); Angelique.DE_HAZE@uca.fr (A.D.H.); J-Paul.SARU@uca.fr (J.-P.S.); Francoise.CAIRA@uca.fr (F.C.)

* Correspondence: claude.beaudoin@uca.fr (C.B.); david.volle@inserm.fr (D.H.V.)

Abstract: Spermatogenesis is a process within the testis that leads to the production of spermatozoa. It is based on a population of spermatogonial stem cells, which have the capacity to self-renew and to differentiate throughout life to ensure the functions of reproduction are maintained. Male fertility disorders are responsible for half of the cases of infertility in couples worldwide. It is well known that cancer treatments are associated with reversible or irreversible fertility disorders. Busulfan (Bu) is an alkylating agent that significantly inhibits spermatogenesis. The present study relied on a combination of in vivo and in vitro approaches as well as RNAseq analysis to characterize the effects of Bu, in which mouse testes were used as a model. An in silico analysis revealed that many of the Bu-modulated genes are potentially regulated by the SIN3 Transcription Regulator Family Member A (SIN3A) and E2F Transcription Factor (E2F) families of transcription factors. The results demonstrate that the deregulated genes function in processes related to the cell cycle, DNA repair, and cell death mechanisms, including the Tumor Protein 53 (TP53) pathway. This reinforces the role of the TP53 signaling pathway as a major player in Bu effects. In addition, Bu altered the patterns of mRNA accumulation for various genes in undifferentiated spermatogonia. This work provides significant insight into the kinetics and impacts of busulfan, which could pave the way for developing strategies to minimize the impact of chemodrugs and, thus, could lead to germ cell lineage regeneration following anticancer treatments.

Keywords: spermatogonial stem cell; chemotherapy; depletion; regeneration and fertility

check for updates

Citation: Thirouard, L.; Holota, H.; Monrose, M.; Garcia, M.; De Haze, A.; Saru, J.-P.; Caira, F.; Beaudoin, C.; Volle, D.H. Analysis of the Reversible Impact of the Chemodrug Busulfan on Mouse Testes. *Cells* **2021**, *10*, 2403. https://doi.org/10.3390/cells10092403

Academic Editors: Eunju Kang and Jongki Cho

Received: 11 July 2021
Accepted: 9 September 2021
Published: 13 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Spermatogenesis is the process of spermatozoa production. In mammals, spermatogenesis takes place in the testicles beginning at puberty and is constantly maintained throughout life. The duration of spermatogenesis is 35 days in mice and 74 days in humans, and the process is subdivided into several stages, each with a defined duration. The maintenance of spermatogenesis requires spermatogonial stem cells, which self-renew throughout life. These spermatogonial stem cells (*SSC*s) then enter a process of proliferation and differentiation before meiosis is initiated and they become spermatozoa, which are released into the lumen of seminiferous tubules.

For several decades, there has been a steady increase in fertility disorders, which currently affect 10–15% of couples worldwide [1,2]. For 60% of men with fertility problems, the defects correspond to an alteration in the production of spermatozoa by the testicle [3]. Cancer therapies, such as chemotherapy, are known to have significant negative effects on male reproductive function, leaving many men permanently infertile due to changes in spermatogenesis [4,5]. There are many different chemotherapy drugs, administered intravenously or orally, that can be used alone or in combination to treat a wide variety of cancers.

Predicting long-term reproductive outcomes of cancer treatments in cancer survivors based on the specific chemotherapy regimen may improve pretreatment fertility preservation counseling and future reproductive outcomes. Alkylating agents are the chemotherapy molecules with the greatest impact on germ cell lineage. Indeed, alkylating agents have been shown to cause long-term depletion of the spermatogonial pool [6].

Mouse rodent models have been effectively used to better decipher the impact of chemodrugs on male fertility by evaluating their effects on male gonads and, more specifically, on germ cell lineage. Although a combination of chemotherapy drugs is widely exploited to improve cancer treatment in clinical settings, here, we analyzed the impact of a single drug, namely, busulfan (Bu). Busulfan is an alkylating anticancer agent that preconditions for hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukemia. It acts preferentially by adding an alkyl group between two guanines of the DNA or between a guanine and an adenine. The addition of this group results in intra-strand bridge formation in the DNA leading to single-strand breaks that block DNA replication and transcription. In the long term, the inhibition of cell proliferation and differentiation was observed [7]. It has been demonstrated that exposure to chemotherapy leads to testicular damage with germ cell loss. High doses of chemotherapy may lead to complete depletion of the seminiferous tubules, resulting in permanent sterility. At lower doses, germ cell recovery has been observed, as has been documented for busulfan exposure. This work provides insight into the kinetics and impacts of busulfan that could pave the way for developing strategies to minimize the impact of chemodrugs and thus to allow for progression of the germ cell lineage, resulting in regeneration and recolonization of the seminiferous epithelium.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The mice used in this study were based on the C57BL/6J background (Charles River, abresle, France).

Mice were housed in temperature-controlled rooms with 12 h light/dark cycles. Mice had ad libitum access to food and water. The refinement was based on the housing and monitoring of the animals as well as the development of protocols that take into account animal welfare. This was achieved by enriching the cages with cardboard tunnels and mouse houses. The mice were housed in social groups, with cage sizes that complied with the number of mice according to the legislation.

In the experimental design, two groups of 12-week-old mice were used—C57BL/6J males treated with vehicle (DMSO, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France) or busulfan (Bu; 15 mg/kg) (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). The animals were treated only once, at the beginning of the experiment, with a single IP injection of 100 µL. The mice were subsequently sacrificed at different time points. The organs were harvested at determined times after busulfan exposure.

To determine the number of animals to use, we previously conducted experiments to investigate Bu-induced testicular damage [8,9]. Busulfan treatment was expected to be effective if it changed the value of analyzed parameters by 20%, and the results were analyzed with $p < 0.05$ considered to indicate a statistically significant difference. The calculation for the number of animals required to establish statistical significance of the results found was a minimum of $n = 16$ animals per group.

This study was conducted in accordance with the current regulations and standards approved by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Animal Care Committee and by the animal care committee (CEMEA Auvergne; protocol CE 07–12 (19 December 2012) and then renewed as APAFIS #: 19626-2020072312102562v3 (4 January2021)).

2.2. Fertility Test

The fertility tests started 6 weeks after treatment and continued for the following 15 days. Each male ($n = 16$ per group) was mated with a female C57BL/6J (Charles River,

abresle, France) at night, and the males were removed from the female's cage each day. Vaginal plugs were monitored every morning at 8:00 a.m. After 14 days, the mating efficiency was inspected and the numbers of pups per litter were counted.

2.3. Histology

The testes were collected, fixed in 4% PFA, and embedded in paraffin. Then, 5 µm thick sections were prepared and stained with H&E (n = 6–10 animals per group).

2.4. In Vivo TUNEL Analysis

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) experiments were performed as previously described [8] on 5 µm sections of a testis fixed in 4% paraformaldehyde. In each testis, at least 100 random seminiferous tubules were counted from at least 2 independent sections, and all the seminiferous tubules were analyzed for the counting. The results are expressed as the number of TUNEL-positive cells per seminiferous tubule.

2.5. Immunohistochemistry

In the next step, 5 µm sections were mounted on positively charged glass slides (Superfrost plus), and then deparaffinized, rehydrated, treated for 20 min at 93–98 °C in 0.01 M citric buffer–Tween 0.1% (pH 6), rinsed in osmosed water (2 × 5 min), and washed (2 × 5 min) in phosphate-buffered saline (PBS). Immunohistochemical studies were conducted according to the manufacturer's recommendations. The slides were then counterstained with Hoechst medium (1 mg/mL) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and mounted on PBS/glycerol (50/50). For the histological and immunohistological analysis of each section, all of the seminiferous tubules were counted. In each testis, at least 100 random seminiferous tubules were counted from at least 2 independent sections.

2.6. Cell Line Approaches

GC2spd (ts) cells were obtained from ATCC (CRL-2196). GC1spg cells were used as previously described [8]. Then, 24 h after plating, the cells were starved for 12 h and treated with either DMSO or busulfan (200 µM).

2.7. Real-Time RT-PCR (qPCR)

The RNA from the GC1spg samples were isolated using RNAzol-RT (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). cDNA were synthesized from the total RNA with MMLV and random hexamer primers (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The real-time PCR measurement of individual cDNA was performed using SYBR green dye (Master mix Plus for SYBR Assay, Takara Bio Inc, Shiga, Japan) to measure the duplex DNA formation with the Eppendorf Realplex system. For each experiment, standard curves were generated with pools of cDNA from cells with different treatments. The results were analyzed using the ΔΔct method, and the primer sequences were used previously [8,10–12].

2.8. RNASeq

The experiment was performed on GC1spg cells treated for 24 h with DMSO or busulfan (200 µM). Starting with the RNA, all preparations were made using the genomeast IGBMC platform (Illkirch). The mRNAseq libraries were sequenced (1 × 50 b).

Reads were mapped onto the mm10 assembly of the mouse genome using Hisat2 v2.1.0 [13] and the BoWtie2 v2.1.0 aligner [14]. Only uniquely aligned reads were retained for further analysis.

The gene expressions were quantified using HTSeq v0.5.4p3 [15] with gene annotations from Ensembl release 77.

Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders and Huber [16]. The groups were compared using the method previously described [17]

and implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.0.19). The resulting p-values were adjusted for multiple tests using the method of Benjamini and Hochberg [18].

We generated lists of genes (FC > 1.25 and $p < 0.01$) that were differentially expressed after Bu exposure.

The accession number for the RNAseq data reported in this paper is GSE164734.

2.9. Statistical Analyses

The number and type of replicates (e.g., technical replicates, independent experiments, number of mice, and number of independent litters) are reported in the figure legends. Error bars represent the SEM. Differences between the groups were determined by ANOVA. All numerical data are represented as the mean ± SEM. The level of significant difference was set at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

Busulfan has transitory effects on germ cell lineage at low doses. It has been demonstrated that exposure to chemotherapy drugs leads to testicular damage with germ cell loss. High doses of chemotherapy may lead to complete depletion of the seminiferous tubules, resulting in permanent sterility. At lower doses, germ cell recovery was observed; this has been documented in relation to busulfan exposure. Rodent experimental models were used, and the exposure to busulfan was well controlled, allowing for germ cell reemergence, which led to fertility recovery [19]. Using a dose compatible with germ cell recovery (15 mg/kg), our results show that, after busulfan exposure, there was no impact of busulfan on body weight at 4 and 8 weeks compared with vehicle-treated animals (Figure 1A). Regarding the urogenital tract, if no effect of Bu was noticed on the weights of seminal vesicles, a decrease in the epididymis weight was observed at both 4 and 8 weeks after Bu exposure compared with the control animals (Figure 1A). Interestingly, the testicular weight was reduced at 4 weeks and then increased from this point, as observed at 8 weeks (Figure 1A), suggesting an ability of germ cells to regenerate testicular epithelium over time. This was correlated with the analysis of the percentage of seminiferous tubules with altered or almost normal epithelium at 4 and 8 weeks after exposure, as illustrated by H&E staining, which showed a huge loss in germ cells at 4 weeks and recovery by 8 weeks (Figure 1B,C). In addition, our results show that Bu exposure led to a decrease in the number of spermatogonia/spermatocytes, as revealed by G9A immunostaining at 4 weeks (Figure 2A). The number of G9A-positive cells increased back to almost normal levels at 8 weeks (Figure 2B). This impact on germ cells was not associated with altered proliferation, as highlighted by the percentage of positive PCNA on G9A-stained cells (Figure 2C). The significant germ cell loss, mainly observed 4 weeks after treatment, was correlated with an increase in apoptotic germ cells (Figure 2D). The retinoid pathway is demonstrated to alter germ cell production and can lead to meiotic default associated with apoptosis [20]. Our results show that, at 5 days following exposure, Bu led to decreased mRNA accumulation of *Stra8*, a retinoid target gene (Figure 2E). The lower expression of *Stra8* (Stimulated by retinoic acid gene 8), a gene known to be involved in meiosis entry and progression [21], suggests that Bu could be associated with impaired vitamin A homeostasis, explaining some of the observed testicular phenotypes.

These results for testicular histology were supported by analysis of the number of sperm cells produced, as revealed by the count of sperm cells in the head and tail of the epididymis at both 4 and 8 weeks (Figure 3A,B). Interestingly, the impact was first noticed at the head of the epididymis 2 weeks after Bu exposure, clearly illustrating the main impact of Bu on spermatogenesis rather than on epididymis (Figure 3A,B). As expected, Bu treatment was associated with a significant and progressive decrease in sperm cell production at 4 and 8 weeks after treatment, which is consistent with the fact that the testis did not recover its complete structure by 8 weeks. This was associated with a decrease in the percentage of fertile males 8 weeks following Bu exposure (Figure 3C). Indeed, if 80%

of vehicle-treated males were fertile, less than 50% were able to provide progeny in the Bu-treated group.

Analyzing the impacts of Bu on mouse testes is quite complicated because it results in a strong modulation of the representation of different testicular cell types. Thus, at 4 weeks, molecular assays were previously used to track germ cell loss and the reciprocal enrichment of somatic cells [8,9], resulting in an artificial increase in the mRNA accumulation of genes expressed in somatic cells (Leydig cells: *Lhcgr*, or Sertoli cells: *Fshr*) and a decrease in genes expressed in the germ cell lineage (Oct3/4, *G9a*, *Ccna1*, and *Smad6*). Then, a previously published analysis of gene expression kinetics at 8 weeks showed that they reflected the germ cell recovery, returning to an almost normal testicular cell composition and, thus, showing a return to normal expression patterns compared with the vehicle-treated mice (see our previously published work [8,9]).

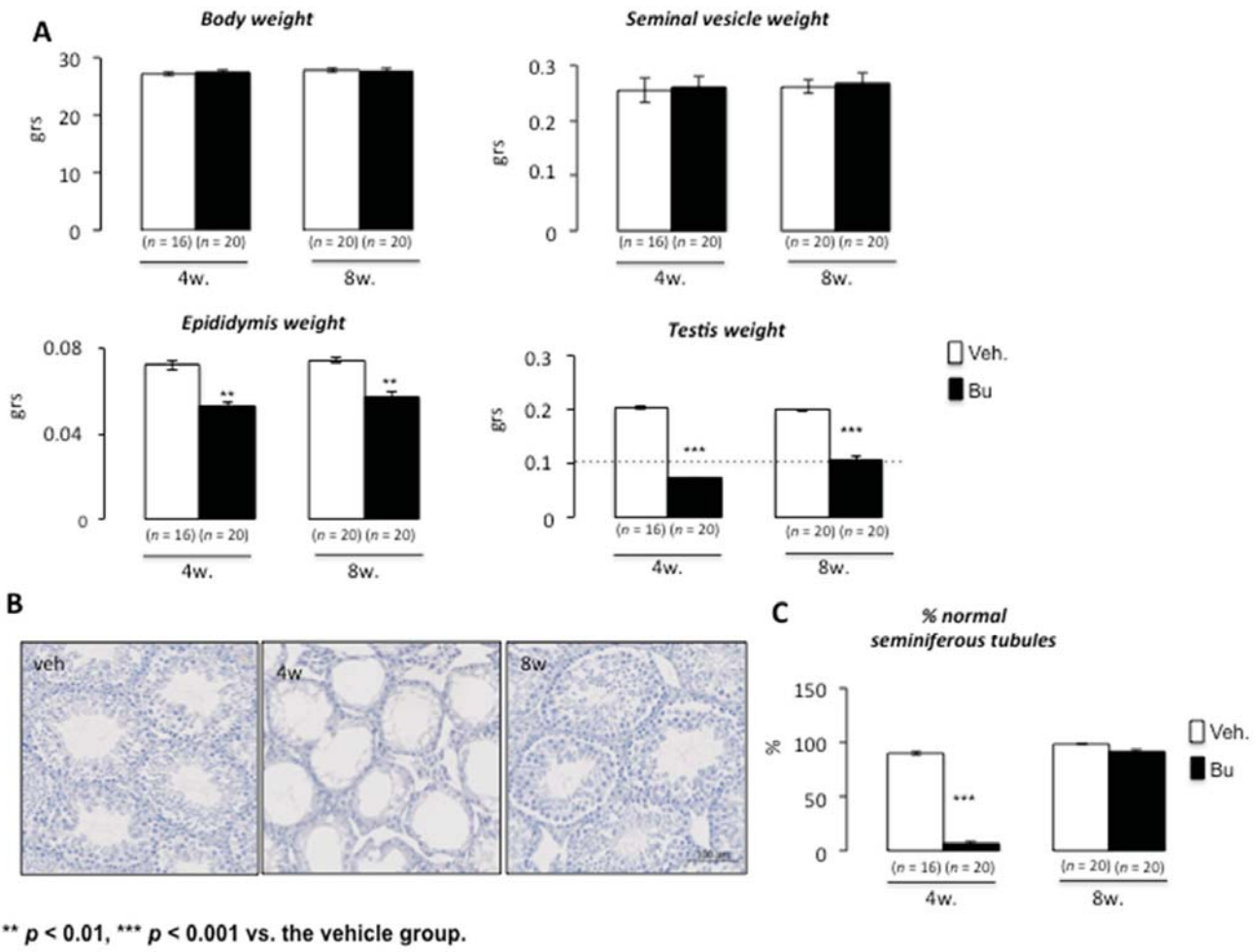


Figure 1. Acute busulfan exposure alters testes in male mice. (**A**) Body, seminal vesicle, epididymis, and testis weights of C57BL/6J males 4 or 8 weeks after busulfan or vehicle treatments. (**B**) Representative micrographs of hematoxylin/eosin-stained testes of C57BL/6J males 4 or 8 weeks after busulfan or vehicle treatments. (**C**) The number of normal seminiferous tubules of C57BL/6J males treated with the vehicle or busulfan (4 or 8 weeks after treatment). For all panels, the data were obtained from at least three independent experiments; the number of animals per group is indicated in brackets below the bars of the graphs. The data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. the vehicle group. Veh.: vehicle and Bu: busulfan.

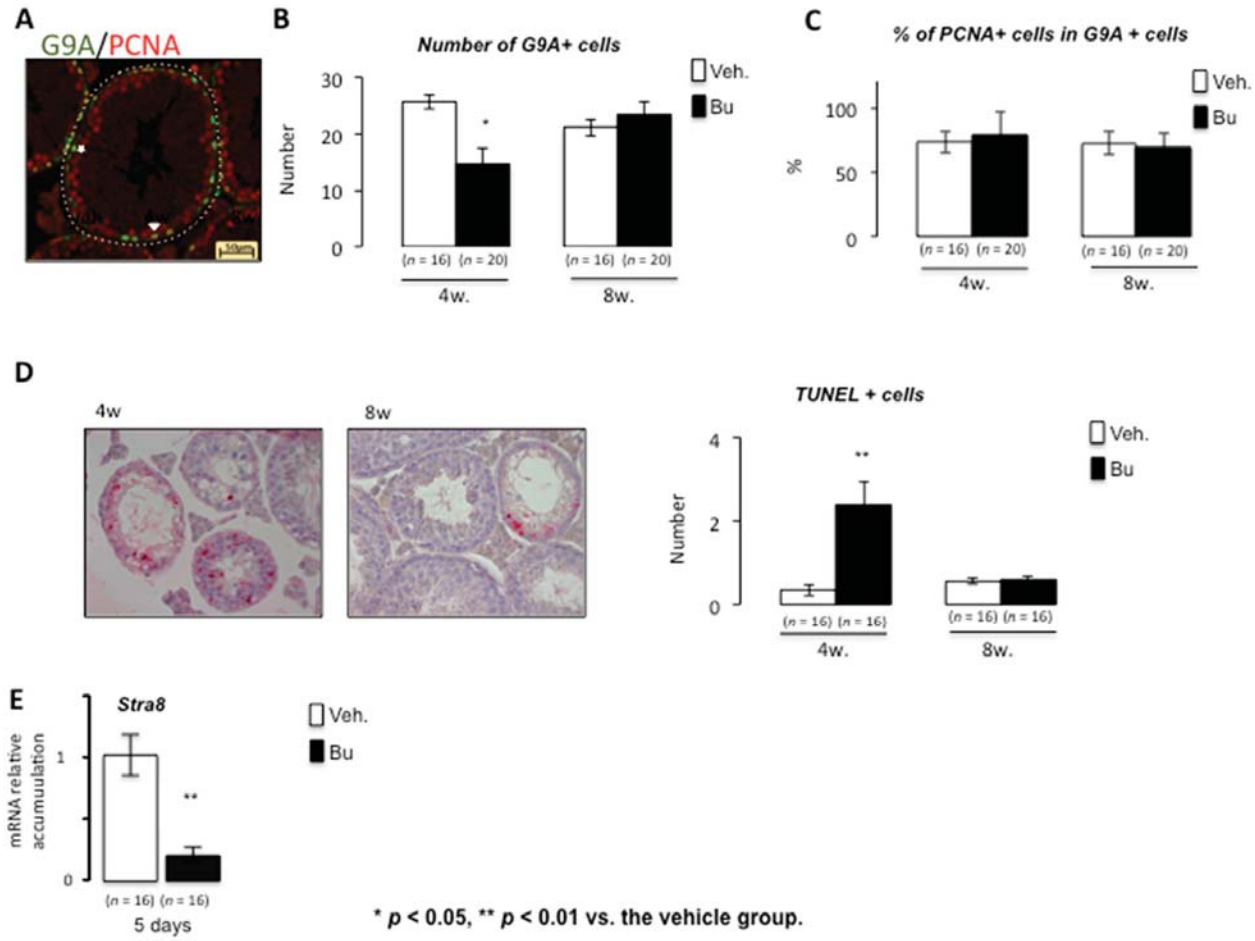


Figure 2. Acute busulfan exposure alters spermatogenesis and germ cell survival in male mice. (**A**) Representative micrograph of vehicle- or Bu-treated testis stained for G9A (green) and PCNA (red). The arrowhead indicates G9A/PCNA-positive cells, and the star indicates PCNA-negative and G9A-positive cells. (**B**) The number of G9A-positive cells per seminiferous tubules in testes treated with vehicle or busulfan (4 and 8 weeks after treatment). (**C**) The percentage of G9A-positive cells co-stained for PCNA in testes treated with vehicle or busulfan (4 and 8 weeks after treatment). (**D**) (Left) Representative micrograph of testes of vehicle- or Bu-treated males stained for TUNEL. (Right) The number of TUNEL-positive cells per seminiferous tubule of males treated with vehicle or busulfan (4 or 8 weeks after treatment). (**E**) Relative *Stra8* mRNA accumulation normalized to β-actin on testis after exposure to vehicle or Bu after 5 days. For all panels, the data were obtained from at least three independent experiments; the number of animals per group is indicated in parentheses below the bars of the graphs. The data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. the vehicle group. Veh.: vehicle and Bu: busulfan.

As Bu exposure led to cellular modulation, we deciphered the effects of Bu using cell line approaches. We analyzed the impact of Bu on two cell lines, the GC1spg and the GC2spd (ts), which represent the spermatogonia/spermatocytes and spermatocytes, respectively, and which are the cell populations impacted by Bu and almost completely lost in mouse testes 4 weeks after the treatment.

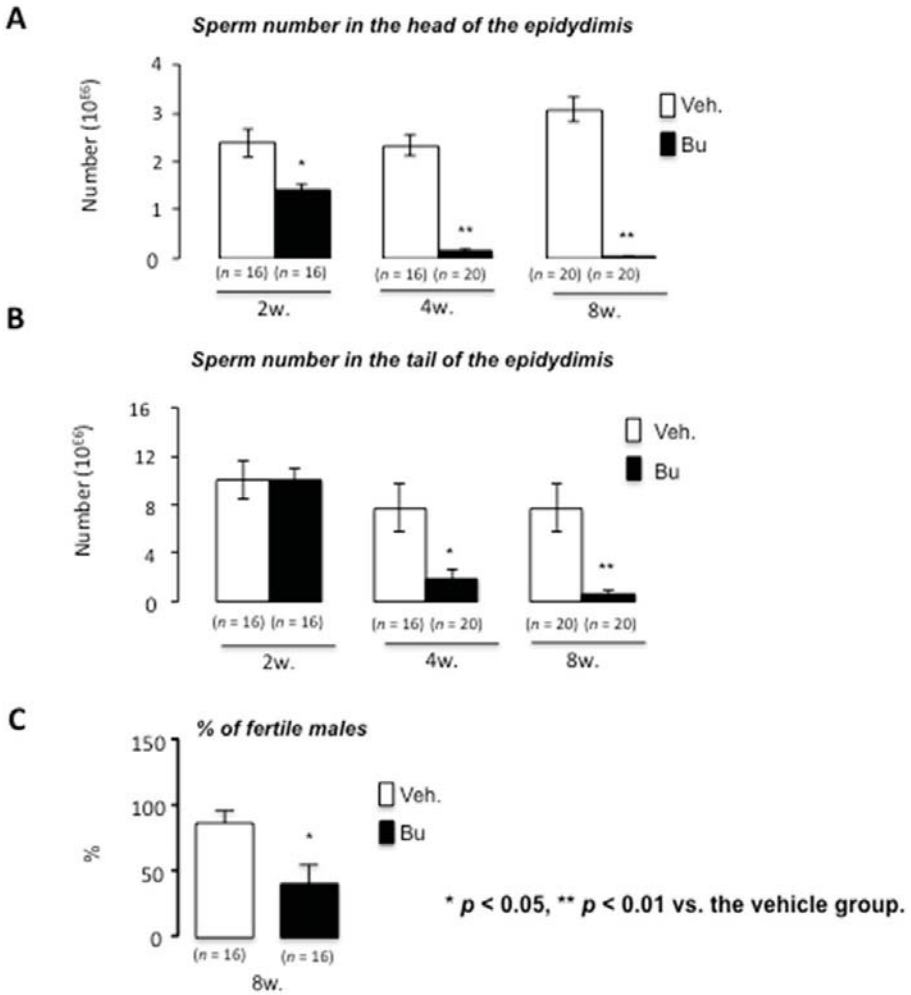


Figure 3. Busulfan alters germ cell production and male fertility in mice. (**A**) Sperm count in the epididymis head of C57BL/6J males at 2, 4, and 8 weeks after busulfan or vehicle treatments. (**B**) Sperm count in the epididymis tail of C57BL/6J males at 2, 4, and 8 weeks after busulfan or vehicle treatments. (**C**) Percentage of fertile males 8 weeks after vehicle or busulfan treatment following breeding with C57BL/6J females. For all panels, the data were obtained from at least the independent experiments; the number of animals per group is indicated in parentheses below the bars of the graphs. The data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. the vehicle group. Veh.: vehicle and Bu: busulfan.

A decrease in the number of GC1spg and GC2spd (ts) cells was observed 48 h after treatment with Bu (Figure 4A,B). This is consistent with the in vivo histological analysis, which highlighted that the first impact of Bu was noticed on spermatogonia, as revealed by PLZF staining starting within the first week after exposure (Supplementary Figure S1). We then decided to focus on GC1spg cells, which were more representative of PLZF + cells. A higher level of apoptotic cells was observed 24 h after treatment with Bu compared with the control cell group (Figure 4C). This could explain the decrease in the number of adherent cells 48 h after Bu exposure (Figure 4C).

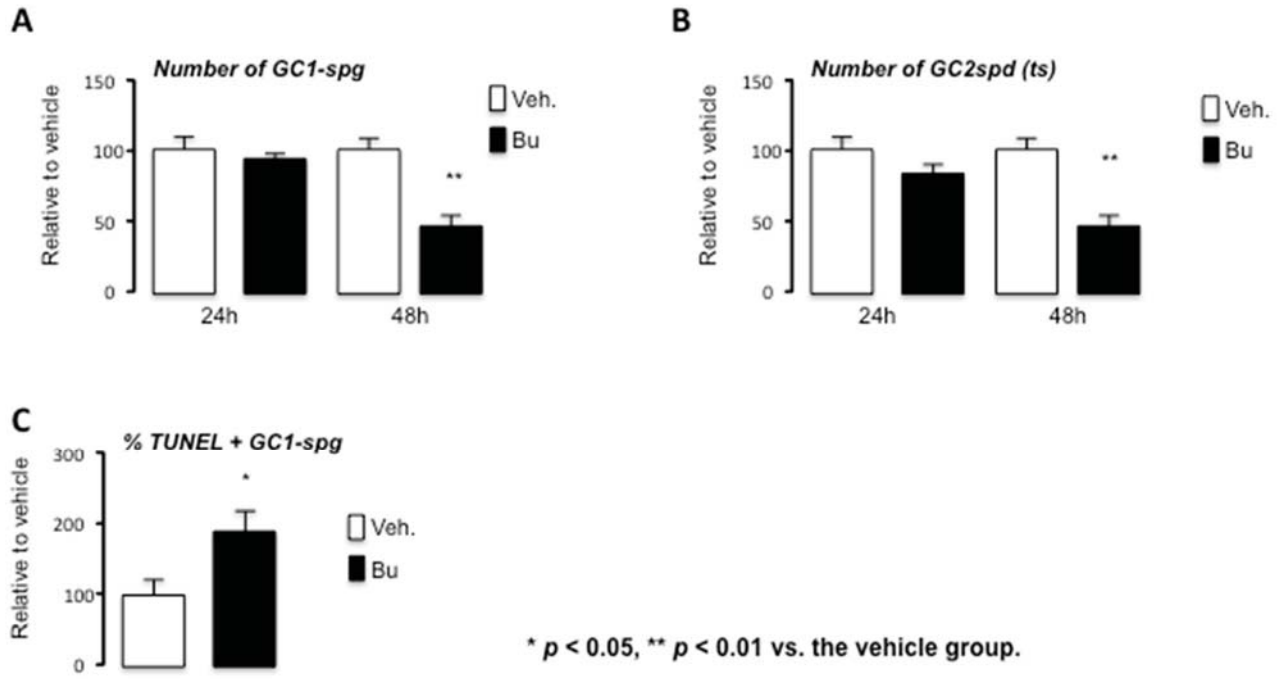


Figure 4. Busulfan treatment leads to the alteration of germ cell numbers through apoptosis in the GC1spg cell line. (**A**) Number of adherent cells after 24 or 48 h of treatment with vehicle or Bu in GC1spg cells. (**B**) Number of adherent cells after 24 or 48 h of treatment with vehicle or Bu in GC2spd (ts) cells. (**C**) The relative number of TUNEL-positive of vehicle- or Bu-treated GC1spg cells after 24 h. For all panels, the data were obtained from at least three independent experiments. The data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. the vehicle group. Veh.: vehicle and Bu: busulfan.

To further analyze the impact of Bu, GC1spg cells were exposed to the vehicle or 200 μM Bu for 24 h. Of the deregulated genes, 37.3% were upregulated (427/1145) (Table S1) and 62.7% (718/1145) were suppressed (Table S2) by Bu compared with the control group (Figure 5A). Based on the *p*-value analysis, the RNAseq results show that the most deregulated gene was *Cdk1*, the cyclin-dependent kinase, highlighting the impact on the cell cycle. Among the genes downregulated by Bu in GC1spg cells, several genes were master genes of undifferentiated germ cells, such as GDNF Family Receptor alpha 1 (*Gfra1*) (Figure 5B). The RNAseq results show that the creatine kinase-1 (*Ckmt1*) was downregulated by Bu (Figure 5B). Depletion of *Ckmt1* induces mitochondrial depolarization and apoptotic cell death. Consistently, the Bu exposure of GC1spg cells was associated with a decrease in mitochondrial activity, as reflected by MTT experiments (Figure 5C).

Moreover, even if we had not identified this pathway in our in silico analysis of the RNAseq data, it was described that an increase in lipid peroxidation was observed in busulfan-treated testes after 1–2 weeks [22], suggesting an increase in reactive oxygen species (ROS) production. Indeed, mice treated with melatonin after busulfan injection showed enhanced spermatogenesis [23], and melatonin drives the expression of MnSOD (manganese superoxide dismutase), which counteracts apoptosis caused by high levels of busulfan-induced ROS [24].

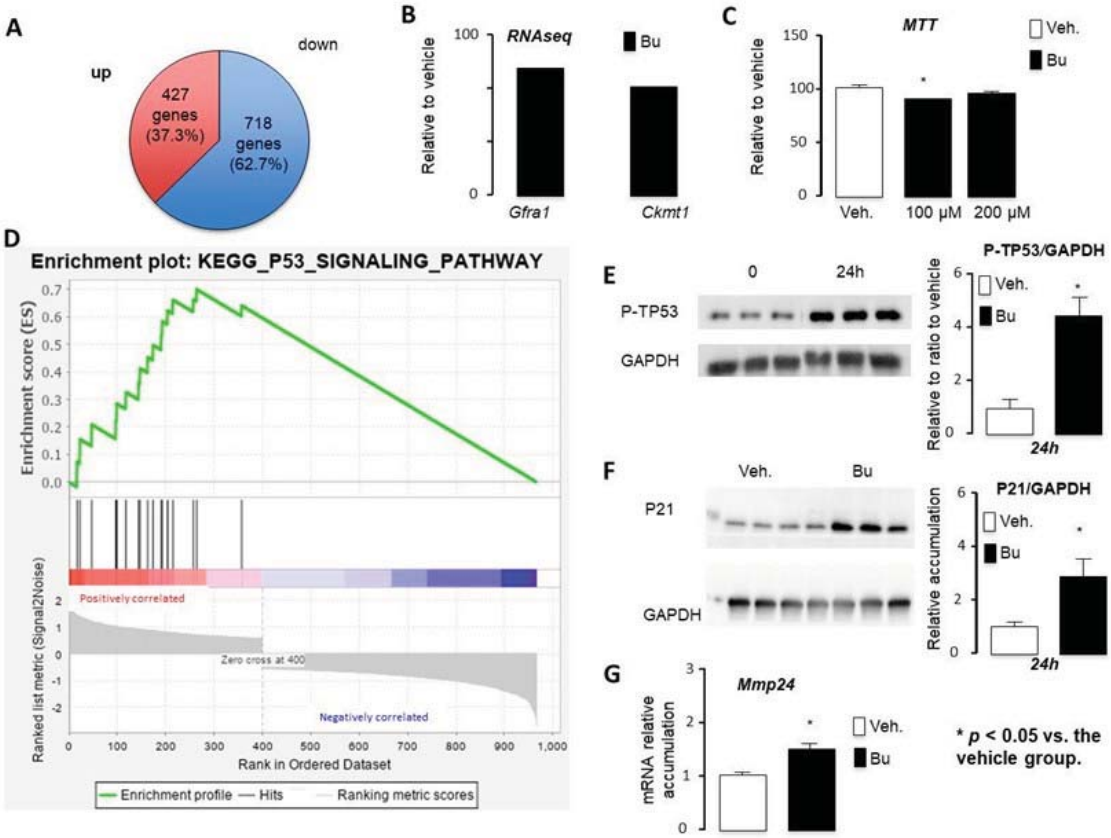


Figure 5. The RNAseq approach defined key targets of busulfan in the GC1spg cell line. (**A**) Venn diagram for differentially expressed genes in GC1spg cells tr eated for 24 h with vehicle or 200 µM Bu. (**B**) Fold change of *Gfra1* and *Ckmt1* obtained from the RNAseq data. (**C**) MTT data for the GC1spg cells treated for 24 h with vehicle or 100 µM or 200 µM Bu. (**D**) GSEA data obtained for genes differentially expressed in Bu- vs. vehicle-treated GC1spg cells. (**E**) Representative Western blots of GAPDH and Phospho-TP53 (P-TP53) and quantification of ratios in GC1spg cells treated with vehicle or Bu for 24 h. (**F**) Representative Western blots of GAPDH and P21 and quantification of ratios in GC1spg cells treated with vehicle or Bu for 24 h. (**G**) Relative *Mmp24* mRNA accumulation normalized to β-actin on GC1spg cells treated for 24 h with vehicle or 200 µM of Bu. Veh.: vehicle and Bu: busulfan. * $p < 0.05$, vs. the vehicle group. Veh.: vehicle and Bu: busulfan.

The list of genes affected by Bu was analyzed for overrepresentation analysis of gene ontology (GO) using Panther software (Table S3). GO analysis revealed enrichment in genes related to the cell cycle through alterations in microtubules and involved in DNA damage-associated processes [8].

The analysis of the Bu-altered genes, using Cistarget, revealed the SIN3A and E2F families as potential regulators of a high proportion of these genes (see Tables S4 and S5).

Of the deregulated genes, 29.5% showed potential regulation by Swi-independent chromatin modifier 3a (SIN3A). SIN3A influences gene expression during development and differentiation through various transcription factors and in a cell-specific manner. SIN3A is required for mitotic re-entry of gonocytes. Indeed, genetic inactivation of *Sin3A* in the male germline leads to infertility, resulting from the early and penetrating apoptotic death observed in germ cells lacking SIN3A and coinciding with re-entry into mitosis.

The E2F family is a potentially important regulator, as illustrated by E2F4, which targets 250 out of the 1145 deregulated genes (around 32%). The E2F transcription factors are primarily implicated in the regulation of entry and exit from the cell cycle. It has been proposed that E2F families might interact to control the maintenance of testicular tissue organization and the entry of undifferentiated quiescent spermatogonial cells into the mitotic proliferation, leading to meiosis and differentiation in the spermatozoa. Interestingly, E2F6 has been shown to form a complex with the Polycomb (PcG) group protein, which has a well-established role in gene silencing. RB/E2F and TP53 are intimately connected,

and crosstalk between these pathways is critical for the induction of cell cycle arrest or cell death in response to cellular stresses. Along that line, GSEA analysis revealed the enrichment of genes associated with the TP53 pathway (Figure 5D). The analysis of KEGG pathways from our RNAseq data, consistent with previously published results, highlighted the main role of TP53 in the impact of Bu. The toxic effect of Bu is preferentially exerted on G1 phase cells [25]. Busulfan-induced DNA damage results in an increased expression of Tp53, leading to cell apoptosis [26]. The TP53 pathway activates *BAX* (Bcl2-associated X) and the expression of target genes, such as *Bax*, *Bid* (BH3-interacting domain death agonist), or *Puma* [27]. The induction of these genes allows for an increase in the permeability of the mitochondrial membrane, leading to the release of cytochrome c and the induction of apoptosis. Consistently, the level of phosphorylated TP53 was increased after Bu exposure (Figure 5E). Moreover, a 2.5-fold increase of P21 protein accumulation, a known target of TP53, was observed following Bu exposure compared with the control group (Figure 5F). In addition, the role of TP53 in the impact of Bu was validated by qPCR through the analysis of a known TP53 target, namely *Mmp24*, which was affected, according to the RNAseq results, and validated using qPCR (Figure 5G). These results highlight the main role TP53 plays in busulfan-induced effects.

To validate some of the results from the in vitro studies on GC1spg cells, we analyzed the expression of some genes by qPCR on the whole testis after a short period when the impact on cellularity was not of importance. The results show that Bu led to a decrease in *Gfra1* at 3 days after the treatment (Figure 6A). In addition, 5 days after the exposure to Bu, there was an increase in the TP53 target gene *Mmp24* (Figure 6A).

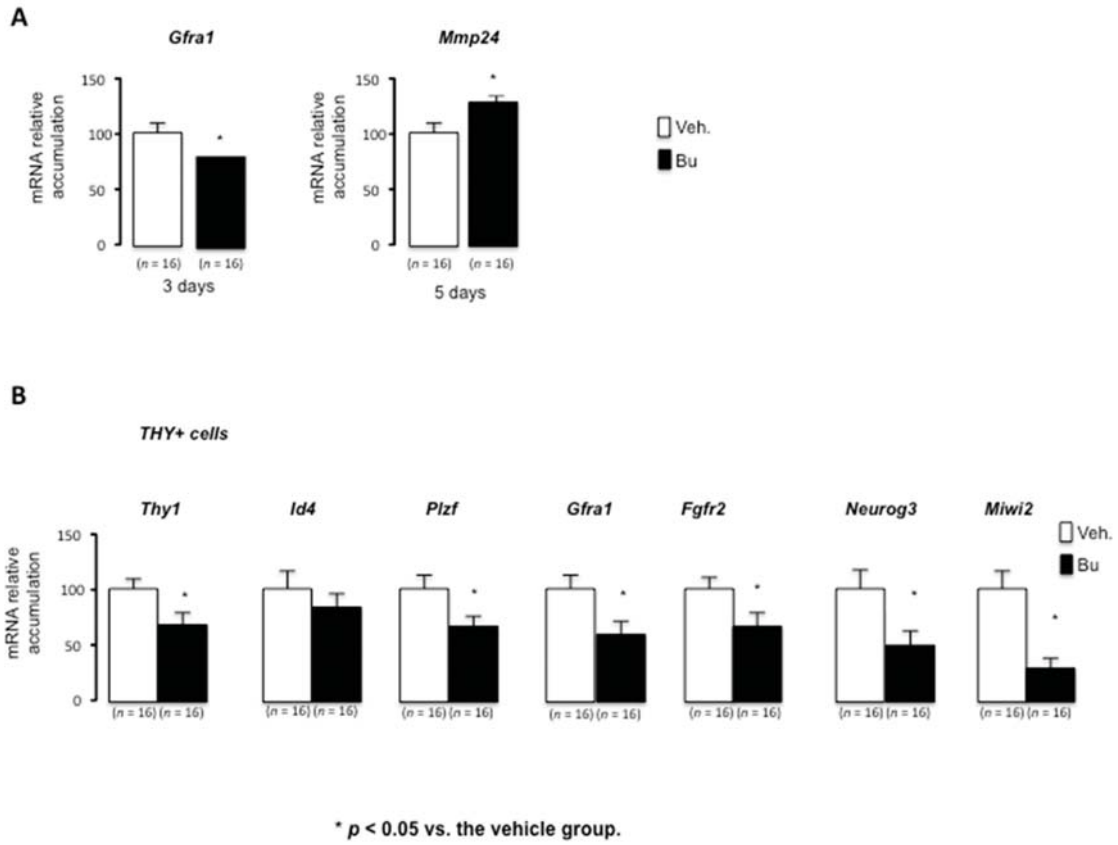


Figure 6. Busulfan alters key genes of undifferentiated spermatogonia in male mice. (**A**) Relative *Gfra1* and *Mmp24* mRNA accumulation normalized to *β-actin* on testes after exposure to vehicle or Bu after 3 or 5 days following exposure. (**B**) Relative *Thy1*, *Id4*, *Plzf*, *Gfra1*, *Fgfr2*, *Neurog3*, and *Miwi2* mRNA accumulation normalized to *β-actin* on FACS cell-sorted Thy1+ cells 1 week after exposure to vehicle or Bu. The data are expressed as the means ± SEM. Statistical analysis: * $p < 0.05$ vs. the vehicle group. Veh.: vehicle and Bu: busulfan.

Treatment with busulfan induces prolonged azoospermia, which is associated with the major impacts of the treatment on spermatogonia. Indeed, busulfan has an early impact on undifferentiated spermatogonia. Five days after busulfan treatment, a decrease of more than 99% of undifferentiated spermatogonia was observed (Supplementary Figure S1), leading to a major loss of other cell types between 2 and 4 weeks post-treatment. Then, the number of undifferentiated spermatogonia was restored to a number similar to the pre-treatment number; the time required for recovery of the number of undifferentiated spermatogonia is dose-dependent [19]. Our results are consistent with this observation. The effect of busulfan is indeed transient; once the number of undifferentiated spermatogonia is restored, spermatogenesis resumes, and the number of cells in the seminiferous tubule and fertility return to normal, although the recovery time is dose-dependent [19]. Regarding the mechanisms at the testicular level, the capacity of germ cells to recolonize is dependent on the population of spermatogonia. Our results highlight the impact on key genes of undifferentiated germ cells. Indeed, using the THY1 + cell sorting of spermatogonia in adult mouse testis, decreased mRNA accumulation of *Thy1*, *Plzf*, *Gfra1*, and *Fgfr2* was observed in the spermatogonia isolated from mice exposed to Bu compared to the control animals (Figure 6B).

Within the testis, there are two subpopulations of undifferentiated spermatogonia, Neurogenin 3 (*NGN3*)-negative cells, which show high stem cell potential, and *NGN3*+ cells, which show high differentiation potential [28]. The transcription factor *NGN3* is expressed in undifferentiated spermatogonia [29] and is required for the entry into the differentiation of *SSC*s [30]. Undifferentiated spermatogonia expressing *Ngn3* therefore do not contribute to *SSC*s; however, after spermatogonial depletion (induced by busulfan treatment), these cells are able to restore the stem cell pool, suggesting that the *NGN3* + cells have been "reprogrammed" into *SSC*s [31]. It appears that *Dmrt1* is required to replenish *SSC*s after germ line depletion [31]. The removal of *Dmrt1* from *NGN3*-positive germ cells was demonstrated to block the replenishment of Id4-GFP-positive *SSC*s and the recovery of spermatogenesis after busulfan treatment. Moreover, it has also been shown that depletion of *Miwi2*-expressing cells results in a transient impact on testicular homeostasis, with this population behaving strictly as transit-amplifying cells under homeostatic conditions. However, upon injury, *Miwi2*-expressing cells are essential for the efficient regenerative capacity of the testis and display facultative stem activity in transplantation assays [32]. In summary, the mouse testis adopted a regenerative strategy to expand stem cell activity by incorporating a transit-amplifying population to the effective stem cell pool, thus ensuring rapid and efficient tissue repair. Interestingly, the present results show that, during a short-term period (1 week), Bu exposure was associated with a decreased expression of *Neurog3* and *Miwi2*, markers of progenitor spermatogonia (Figure 6B). Note that no statistical impact was observed for *Id4*, a main marker of *SSC*s (Figure 6B). This might explain how the germ cell lineage could progress through *SSC*s, resulting in regeneration and recolonization of the seminiferous epithelium.

4. Conclusions

The results of this study suggest that Bu treatment may initially impact both *SSC*s and progenitor spermatogonia. However, it is interesting to note that *Id4* expression was less affected, which may partially explain how the germ cell lineage can reemerge in time. Thus, this mechanism could represent a way to minimize the impact of chemodrugs on key *SSC* genes, such as ID4, in order to stimulate their regenerative capacities. However, it still remains to be determined if the differentiated germ cells are of an appropriate quality to produce normal progeny and without the development of pathologies.

In view of our experimental approach, it is important to keep in mind that this single-molecule approach is the first step to better understanding the chemosensitivity of germ cells during chemotherapy treatment. However, it is now well recognized that cancer treatments are more effective when chemotherapy molecules are administered in combination. This strategy of cocktails of drugs is widely used to improve the treatments

for patients. Indeed, combinations of molecules are known to improve the selectivity of targets and, thus, to prevent the appearance of resistance to treatment. In anticancer drug cocktails, the different chemotherapeutic molecules may work in the same or different pathways to obtain synergistic, additive, and potentiating effects.

It is clear that chemotherapy cocktails must have differential effects compared to exposure to single molecules. We now need to explore whether the identified effects of Bu and potential downstream signaling targets could be extrapolated to protocols using chemotherapy cocktails. Thus, there is still a significant amount of research needed to identify if key markers of *SSC*s, such as ID4, could be associated with the impact of chemodrugs, so as to target them for preserving stem cell populations, which could allow for germ cell regeneration following anticancer treatment.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10092403/s1. Figure S1: The number of PLZF-positive cells per seminiferous tubules in testes treated with vehicle or busulfan (5 days after treatment). Table S1: List of genes decreased by Bu versus the vehicle. Table S2: List of genes increased by Bu versus the vehicle. Table S3: Gene ontology. Table S4: List of genes with potential E2F4 binding sites. Table S5: List of genes potentially regulated by SIN3A.

Author Contributions: Conceptualization, C.B. and D.H.V.; formal analysis, L.T.; investigation, L.T., H.H., M.M., M.G., A.D.H., J.-P.S. and D.H.V.; methodology, H.H.; writing—original draft, D.H.V.; writing—review and editing, F.C. and C.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by Inserm, CNRS, Université Clermont Auvergne, Ligue contre le cancer (comité Puy de Dôme), and Fondation ARC pour la recherche contre le cancer (R16142CC). Laura Thirouard and Manon Garcia received support from the Fondation Recherche Médicale (FDT202001010780 and R17089CC). Volle's team received support from the Cancer-Inserm (C20010CS) and the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20–25).

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with current regulations and was standards approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Animal Care Committee and by the animal care committee (CEMEA Auvergne; protocol CE 07–12 (19 December 2012) and then renewed as APAFIS #: 19626-2020072312102562v3 (4 January 2021)).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available upon request to the corresponding author; for the RNAseq data, the accession number for the RNAseq data reported in this paper is GSE164734.

Acknowledgments: We thank Sandrine Plantade, Khirredine Ouchen, and Philippe Mazuel for their help at the animal facility. We also thank the AniPath platform from the GReD for histological analysis on mice. Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the "France Génomique" consortium (ANR-10-INBS-0009).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Boivin, J.; Bunting, L.; Collins, J.A.; Nygren, K.G. International Estimates of Infertility Prevalence and Treatment-Seeking: Potential Need and Demand for Infertility Medical Care. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2007**, *22*, 1506–1512. [CrossRef] [PubMed]
2. Datta, J.; Palmer, M.J.; Tanton, C.; Gibson, L.J.; Jones, K.G.; Macdowall, W.; Glasier, A.; Sonnenberg, P.; Field, N.; Mercer, C.H.; et al. Prevalence of Infertility and Help Seeking among 15,000 Women and Men. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2016**, *31*, 2108–2118. [CrossRef] [PubMed]
3. Slama, R.; Hansen, O.K.H.; Ducot, B.; Bohet, A.; Sorensen, D.; Giorgis Allemand, L.; Eijkemans, M.J.C.; Rosetta, L.; Thalabard, J.C.; Keiding, N.; et al. Estimation of the Frequency of Involuntary Infertility on a Nation-Wide Basis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2012**, *27*, 1489–1498. [CrossRef]
4. Hotaling, J.M. The Implications of Infertility for Cancer Patients: More than Just Having Kids after Cancer Treatment? *Urol. Oncol.* **2020**, *38*, 8–9. [CrossRef] [PubMed]
5. Burns, W.R.; Sabanegh, E.; Dada, R.; Rein, B.; Agarwal, A. Is Male Infertility a Forerunner to Cancer? *Int. Braz. J. Urol.* **2010**, *36*, 527–536. [CrossRef] [PubMed]

6. 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]
7. Iwamoto, T.; Hiraku, Y.; Oikawa, S.; Mizutani, H.; Kojima, M.; Kawanishi, S. DNA Intrastrand Cross-Link at the 5′-GA-3′ Sequence Formed by Busulfan and Its Role in the Cytotoxic Effect. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 454–458. [CrossRef]
8. Baptissart, M.; Vega, A.; Martinot, E.; Pommier, A.J.; Houten, S.M.; Marceau, G.; de Haze, A.; Baron, S.; Schoonjans, K.; Lobaccaro, J.-M.A.; et al. Bile Acids Alter Male Fertility through G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1 Signaling Pathways in Mice. *Hepatol. Baltim. Md.* **2014**, *60*, 1054–1065. [CrossRef]
9. Martinot, E.; Baptissart, M.; Véga, A.; Sèdes, L.; Rouaisnel, B.; Vaz, F.; Saru, J.-P.; de Haze, A.; Baron, S.; Caira, F.; et al. Bile Acid Homeostasis Controls CAR Signaling Pathways in Mouse Testis through FXRalpha. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42182. [CrossRef]
10. Baptissart, M.; Martinot, E.; Vega, A.; Sédes, L.; Rouaisnel, B.; de Haze, A.; Baron, S.; Schoonjans, K.; Caira, F.; Volle, D.H. Bile Acid-FXRα Pathways Regulate Male Sexual Maturation in Mice. *Oncotarget* **2016**, *7*, 19468–19482. [CrossRef]
11. Martinot, E.; Sèdes, L.; Baptissart, M.; Holota, H.; Rouaisnel, B.; Damon-Soubeyrand, C.; De Haze, A.; Saru, J.-P.; Thibault-Carpentier, C.; Keime, C.; et al. The Bile Acid Nuclear Receptor FXRα Is a Critical Regulator of Mouse Germ Cell Fate. *Stem Cell Rep.* **2017**, *9*, 315–328. [CrossRef] [PubMed]
12. Sedes, L.; Desdoits-Lethimonier, C.; Rouaisnel, B.; Holota, H.; Thirouard, L.; Lesne, L.; Damon-Soubeyrand, C.; Martinot, E.; Saru, J.-P.; Mazaud-Guittot, S.; et al. Crosstalk between BPA and FXRalpha Signaling Pathways Lead to Alterations of Undifferentiated Germ Cell Homeostasis and Male Fertility Disorders. *Stem Cell Rep.* **2018**, *11*, 944–958. [CrossRef] [PubMed]
13. Kim, D.; Paggi, J.M.; Park, C.; Bennett, C.; Salzberg, S.L. Graph-Based Genome Alignment and Genotyping with HISAT2 and HISAT-Genotype. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 907–915. [CrossRef] [PubMed]
14. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [CrossRef]
15. Anders, S.; Pyl, P.T.; Huber, W. HTSeq—A Python Framework to Work with High-Throughput Sequencing Data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2015**, *31*, 166–169. [CrossRef]
16. Anders, S.; Huber, W. Differential Expression Analysis for Sequence Count Data. *Genome Biol.* **2010**, *11*, R106. [CrossRef]
17. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [CrossRef]
18. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. [CrossRef]
19. Zohni, K.; Zhang, X.; Tan, S.L.; Chan, P.; Nagano, M.C. The Efficiency of Male Fertility Restoration Is Dependent on the Recovery Kinetics of Spermatogonial Stem Cells after Cytotoxic Treatment with Busulfan in Mice. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2012**, *27*, 44–53. [CrossRef]
20. Chung, S.S.W.; Wolgemuth, D.J. Role of Retinoid Signaling in the Regulation of Spermatogenesis. *Cytogenet. Genome Res.* **2004**, *105*, 189–202. [CrossRef]
21. Anderson, E.L.; Baltus, A.E.; Roepers-Gajadien, H.L.; Hassold, T.J.; de Rooij, D.G.; van Pelt, A.M.M.; Page, D.C. Stra8 and Its Inducer, Retinoic Acid, Regulate Meiotic Initiation in Both Spermatogenesis and Oogenesis in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14976–14980. [CrossRef]
22. Cai, X.; Wei, J.; He, Y.; Yang, D.; Jiang, E.; Huang, Y.; Han, M.; Feng, S. A Modified Busulfan and Cyclophosphamide Preparative Regimen for Allogeneic Transplantation in Myeloid Malignancies. *Int. J. Clin. Pharm.* **2015**, *37*, 44–52. [CrossRef]
23. Mirhoseini, M.; Saki, G.; Hemadi, M.; Khodadadi, A.; Mohammadi Asl, J. Melatonin and Testicular Damage in Busulfan Treated Mice. *Iran. Red Crescent Med. J.* **2014**, *16*, e14463. [CrossRef] [PubMed]
24. Li, B.; He, X.; Zhuang, M.; Niu, B.; Wu, C.; Mu, H.; Tang, F.; Cui, Y.; Liu, W.; Zhao, B.; et al. Melatonin Ameliorates Busulfan-Induced Spermatogonial Stem Cell Oxidative Apoptosis in Mouse Testes. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *28*, 385–400. [CrossRef] [PubMed]
25. Bucci, L.R.; Meistrich, M.L. Effects of Busulfan on Murine Spermatogenesis: Cytotoxicity, Sterility, Sperm Abnormalities, and Dominant Lethal Mutations. *Mutat. Res.* **1987**, *176*, 259–268. [CrossRef]
26. Zhang, X.; Xia, Q.; Wei, R.; Song, H.; Mi, J.; Lin, Z.; Yang, Y.; Sun, Z.; Zou, K. Melatonin Protects Spermatogonia from the Stress of Chemotherapy and Oxidation via Eliminating Reactive Oxidative Species. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *137*, 74–86. [CrossRef] [PubMed]
27. Zhivotovsky, B.; Kroemer, G. Apoptosis and Genomic Instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 752–762. [CrossRef] [PubMed]
28. Zheng, K.; Wu, X.; Kaestner, K.H.; Wang, P.J. The Pluripotency Factor LIN28 Marks Undifferentiated Spermatogonia in Mouse. *BMC Dev. Biol.* **2009**, *9*, 38. [CrossRef] [PubMed]
29. Yoshida, S.; Takakura, A.; Ohbo, K.; Abe, K.; Wakabayashi, J.; Yamamoto, M.; Suda, T.; Nabeshima, Y.-I. Neurogenin3 Delineates the Earliest Stages of Spermatogenesis in the Mouse Testis. *Dev. Biol.* **2004**, *269*, 447–458. [CrossRef] [PubMed]
30. Kaucher, A.V.; Oatley, M.J.; Oatley, J.M. NEUROG3 Is a Critical Downstream Effector for STAT3-Regulated Differentiation of Mammalian Stem and Progenitor Spermatogonia. *Biol. Reprod.* **2012**, *86*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
31. Zhang, T.; Oatley, J.; Bardwell, V.J.; Zarkower, D. DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1006293. [CrossRef] [PubMed]
32. Carrieri, C.; Comazzetto, S.; Grover, A.; Morgan, M.; Buness, A.; Nerlov, C.; O'Carroll, D. A Transit-Amplifying Population Underpins the Efficient Regenerative Capacity of the Testis. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 1631–1641. [CrossRef] [PubMed]

Annexe 2 :

Multigenerational impacts of bile acid exposure are mediated by TGR5 signaling pathways. **Scientific Report** (2018).

Marine Baptissart, Lauriane Sedès, Hélène Holota, Laura Thirouard, Emmanuelle Martinot, Angélique de Haze, Betty Rouaisnel, Françoise Caira, Claude Beaudoin, David H. Volle.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Multigenerational impacts of bile exposure are mediated by TGR5 signaling pathways

Received: 19 February 2018
Accepted: 16 August 2018
Published online: 15 November 2018

Marine Baptissart, Lauriane Sèdes, Hélène Holota, Laura Thirouard, Emmanuelle Martinot, Angélique de Haze, Betty Rouaisnel, Françoise Caira, Claude Beaudoin & David H. Volle

Besides their well-known roles in digestion and fat solubilization, bile acids (BAs) have been described as signaling molecules activating the nuclear receptor Farnesoid-X-receptor (FXRα) or the G-protein-coupled bile acid receptor-1 (GPBAR-1 or TGR5). In previous reports, we showed that BAs decrease male fertility due to abnormalities of the germ cell lineage dependent on Tgr5 signaling pathways. In the presentstudy, we tested whether BA exposure could impact germ cell DNA integrity leading to potential implications for progeny. For that purpose, adult F0 male mice were fed a diet supplemented with cholic acid (CA) or the corresponding control diet during 3.5 months prior mating. F1 progeny from CA exposed founders showed higher perinatal lethality, impaired BA homeostasis and reduced postnatal growth, as well as altered glucose metabolism in later life. The majority of these phenotypic traits were maintained up to the F2 generation. In F0 sperm cells, differential DNA methylation associated with CA exposure may contribute to the initial programming of developmental and metabolic defects observed in F1 and F2 offspring. Tgr5 knock-out mice combined with *in vitro* strategies defined the critical role of paternal Tgr5 dependent pathways in the multigenerational impacts of ancestral CA exposure.

The last decade has presented evidences that offspring development, behavior and physiology can be determined by parental experiences[1]. In particular, rodent models of paternal exposures to malnutrition, stress or environmental contaminants have been associated with higher susceptibility to metabolic diseases across several generations[2,3]. Deeper explorations identified altered epigenetic patterns in mature sperm as strong candidates for multigenerational programming of diseases[3–6].

Indeed, all along their differentiation male germ cells undergo dynamic epigenetic changes particularly sensitive to environmental stressors. Germ cell genome is progressively methylated to reach high level of DNA methylation in mature sperm[7]. This process relies on the activity of the *de novo* DNA methyltransferase enzymes DNMT3a and DNMT3b that are highly expressed within the germline. After fertilization, most alterations of DNA methylation levels that may occur during spermatogenesis are erased to allow *de novo* programming of the embryo in both somatic and germ cell lineages. However, recent findings suggest that certain alterations can escape a functional erasure and be disseminated over subsequent generations contributing to epigenetically inherited traits[8].

Beside DNA methylation, incorrect histone patterns have been shown to mediate the effects of parental exposures on offspring health[9,10]. If most histones are replaced by protamines during spermiogenesis, 1% to 4% of the mature sperm genome remains associated with nucleosomes. Maintained on the paternal genome after fertilization, the nature of histone modifications and their position on the genome will initiate the proper transcriptional program required for early development of the embryo. The histones inherited from the spermatozoa will also guide the processes of demethylation-methylation of the future zygote genome in both somatic and primordial germ cells. Independently or in interaction with DNA methylation, retained histones contained in the mature spermatozoa are potential messengers of the effects of parental exposures on offspring physiology.

It has been established that bile acids (BAs) act as signaling molecules and regulate many physiological functions, such as lipid, glucose and energy metabolisms *via* the modulation of their two main receptors: the G-protein-coupled bile acid receptor-1 (GPBAR-1, TGR5) and the nuclear receptor Farnesoid-X-receptor alpha (FXRα, NR1H4)[11–13]. In a recent report, we showed that chronic exposure to a diet supplemented with 0.5%

INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD, F-63000, Clermont–Ferrand, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.H.V. (email: david.volle@inserm.fr)

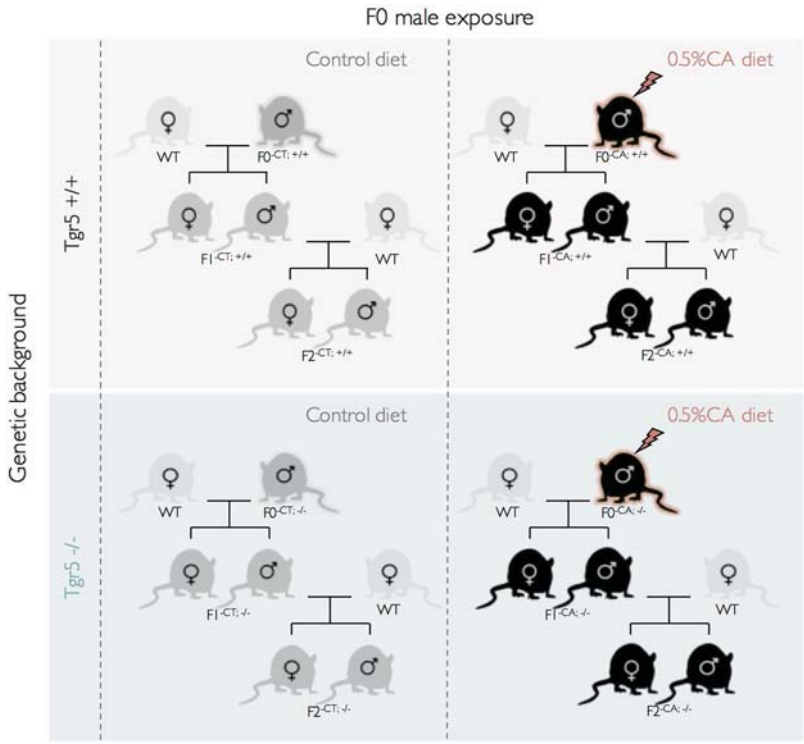


Figure 1. Experimental approach to analyze the multi-generational impacts of the paternal exposure to CA-diet. Adult wild type ($F0^{+/+}$) and *Tgr5* knock-out ($F0^{-/-}$) male founders were exposed to a control diet (CT) or the corresponding diet supplemented with 0.5%-CA (CA). After 3.5 months of exposure, males of each group were bred with unexposed C57BL6J females generating the experimental F1 offspring. These F1 males were then bred with unexposed C57BL6J females generating the experimental F2 offspring.

cholic acid (CA-diet) decreases sperm count and reduces male fertility. Testicular defects associated with the phenotype are dependent upon the activation of the membrane BA receptor Tgr5 within the germ cell lineage[14].

Male germ cells contain fundamental epigenetic and genetic informations, which constitute the molecular basis of the paternal contribution to the next generations. Considering our previous finding, the question arises of whether BAs could impact germ cell integrity and contribute to the programming of phenotypic traits across multiple generations.

The present study shows evidence of altered DNA methylation levels in sperm cells from wild-type males exposed to CA-diet ($F0^{CA;+/+}$). These differential methylation patterns are associated with high perinatal mortality in the first generation of pups originating from $F0^{CA;+/+}$ founders ($F1^{CA;+/+}$). In addition, surviving $F1^{CA;+/+}$ offspring showed metabolic abnormalities, such as altered BA homeostasis and glucose intolerance at adult age. The $F1^{CA;+/+}$ males are in turn able to transmit most of these phenotypic traits to the subsequent $F2^{CA;+/+}$ generation. Interestingly, none of these developmental or metabolic abnormalities was observed in progeny born from CA exposed founders deficient for the gene encoding Tgr5 ($F0^{CA;-/-}$). All together these data show that Tgr5 signaling pathways are critical to initiate multigenerational programming of phenotypic traits after paternal exposure to CA.

Results

Paternal exposure to cholic acid affects developmental and metabolic physiology across 2 generations of offspring. We previously demonstrate that pathological level of bile acids alter male fertility *via* Tgr5 in response to adult exposure to a diet supplemented with 0.5% of cholic acid (CA-diet)[14]. Remaining questions are to define if CA-exposure can impair germ cell integrity and if it could contribute to multigenerational programing of diseases in progenies.

For that purpose, adult wild type ($F0^{+/+}$) and *Tgr5* knock-out ($F0^{-/-}$) male founders were exposed to a control diet (CT) or the corresponding diet supplemented with 0.5%-CA (CA) as previously reported[14]. After 3.5 months of exposure, males of each group were bred with unexposed C57BL6/J females generating the experimental F1 offspring (Fig. 1). Consistently with previous report[14], 20% of the males exposed to CA-diet ($F0^{CA;+/+}$) were sterile (Supplemental 1a). Moreover, 30% of $F1^{CA;+/+}$ progeny, originating from fertile $F0^{CA;+/+}$ male founders, died in the first 2 weeks of postnatal life (Fig. 2a). Surviving $F1^{CA;+/+}$ pups showed lower body weight at post-natal day 15 (PND15) compared with $F1^{CT;+/+}$ originating from $F0^{CT;+/+}$ founders (Fig. 2b). This difference was maintained up to adulthood (24 weeks old) (Fig. 2b). Males and females were affected in a similar way (Supplemental 1b,c). Interestingly, no impact of paternal CA exposure was observed in litters originating from Tgr5 knock-out mice ($F1^{CA;-/-}$) compared to $F1^{CT;-/-}$ mice (Fig. 2a,b).

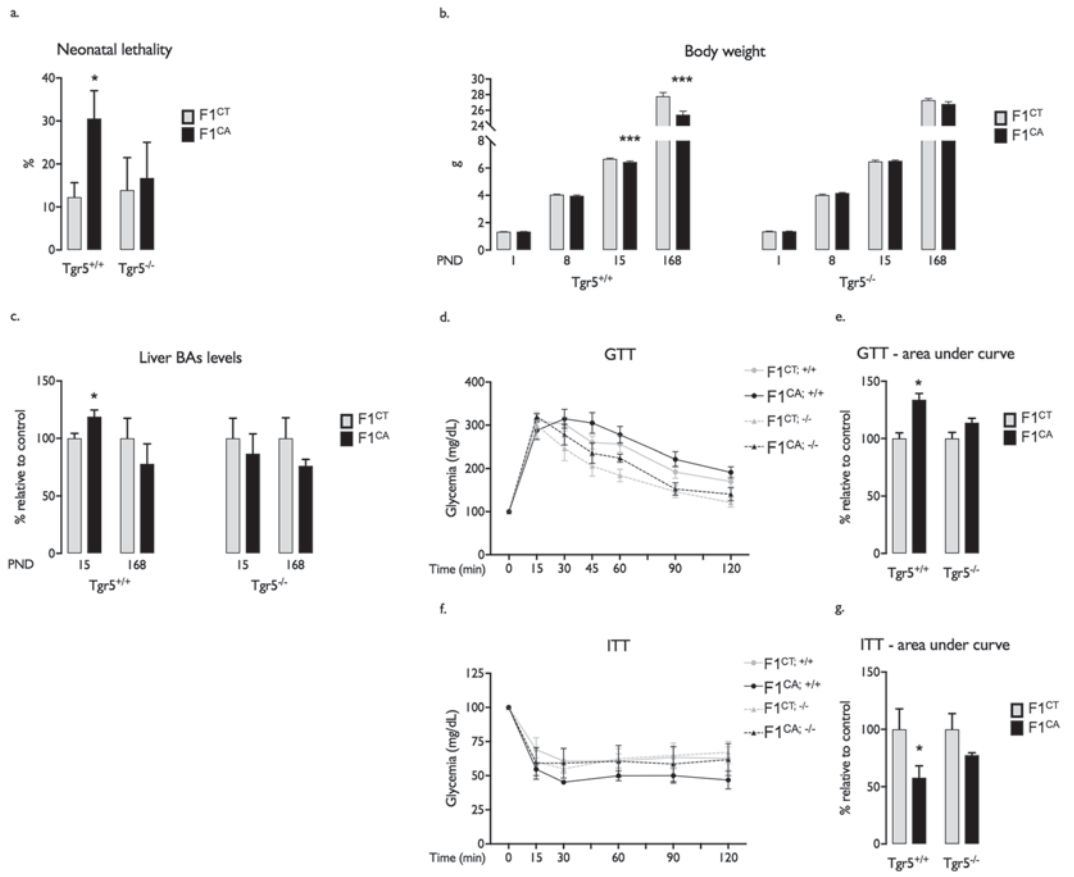


Figure 2. Paternal exposure to CA-diet impacts F1 offspring. (**a**) Percentage of neonatal mortality in F1 litters obtained from $F0^{+/+}$ or $F0^{-/-}$ fathers fed 3.5 months with CT or CA diet. (**b**) Body weight of $F1^{CT;+/+}$, $F1^{CT;-/-}$, $F1^{CA;+/+}$ and $F1^{CA;-/-}$mice at 1, 8, 15 and 168 postnatal days. (**c**) Hepatic bile acid levels in 15-days old and adult $F1^{CT;+/+}$, $F1^{CT;-/-}$, $F1^{CA;+/+}$ and $F1^{CA;-/-}$ mice. (**d**) GTT in adult $F1^{CT;+/+}$, $F1^{CT;-/-}$, $F1^{CA;+/+}$ and $F1^{CA;-/-}$ mice. (**e**) Area under the curve for GTT. (**f**) ITT in adult $F1^{CT;+/+}$, $F1^{CT;-/-}$, $F1^{CA;+/+}$ and $F1^{CA;-/-}$ mice. (**g**) Area under the curve for ITT. Data are expressed as means +/− SEM. In all panels for each group, $n = 10–20$ males from 3 to 5 independent experiments; *significance; $p < 0.05$.

Further analysis at PND15 showed higher hepatic BA levels in $F1^{CA;+/+}$ group compared to $F1^{CT;+/+}$ (Fig. 2c). According to previous studies[15], altered BA homeostasis might contribute to postnatal lethality of $F1^{CA;+/+}$. Again, no change in BA concentrations was observed in offspring originating from Tgr5 knock-out ($F0^{CA;-/-}$) mice exposed to CA diet compared to control $F0^{CT;-/-}$ animals (Fig. 2c).

To determine whether early BA increase in $F1^{CA;+/+}$ offspring was maintained and potentially associated with other metabolic defects at adulthood, we extended our analysis and performed glucose and insulin tolerance tests (GTT, ITT) (Fig. 2d,g). No change in hepatic concentrations of BAs was detected in adult $F1^{CA;+/+}$ males compared to $F1^{CT;+/+}$ males (Fig. 2c). However, adult $F1^{CA;+/+}$ males showed difficulties to restore glucose levels during GTT compared to their respective controls (Fig. 2d,e). Consistently with an impaired glucose tolerance, the $F1^{CA;+/+}$ males showed lower fasting insulin concentrations before and along the GTT protocol (Supplemental 1d) and lower abilities to normalize glycemia when challenged with exogenous insulin (ITT) compared to $F1^{CT;+/+}$ males (Fig. 2f,g). Of note, no significant alterations of glucose metabolism due to paternal CA exposure were observed in $F1^{CA;-/-}$ offspring (Fig. 2d–g).

To gain functional insight into such altered metabolic signature, $F1^{CA;+/+}$ and $F1^{CT;+/+}$ male mice aged of 5 weeks were challenged with a high-fat diet. After 35 days of treatment, $F1^{CA;+/+}$ males showed a higher body weight gain compared to $F1^{CT;+/+}$ (Supplemental Fig. 1e,f).

All together, these results demonstrate that paternal CA exposure increases susceptibility to developmental defects and metabolic disorders.

Paternal CA-exposure of F0 males results in postnatal abnormalities up to the F2 generation. Several evidences in the literature demonstrated that parental exposures could determine offspring physiology across several generations. After establishing perinatal lethality and impaired metabolism in $F1^{CA;+/+}$ males, we raised the question of whether F2 offspring reproduced part of these phenotypic traits in the absence of further exposure. For that purpose, $F1^{+/+}$ males were mated to unexposed C57BL/6 females generating $F2^{CA;+/+}$ or $F2^{CT;+/+}$ offspring (Fig. 1).

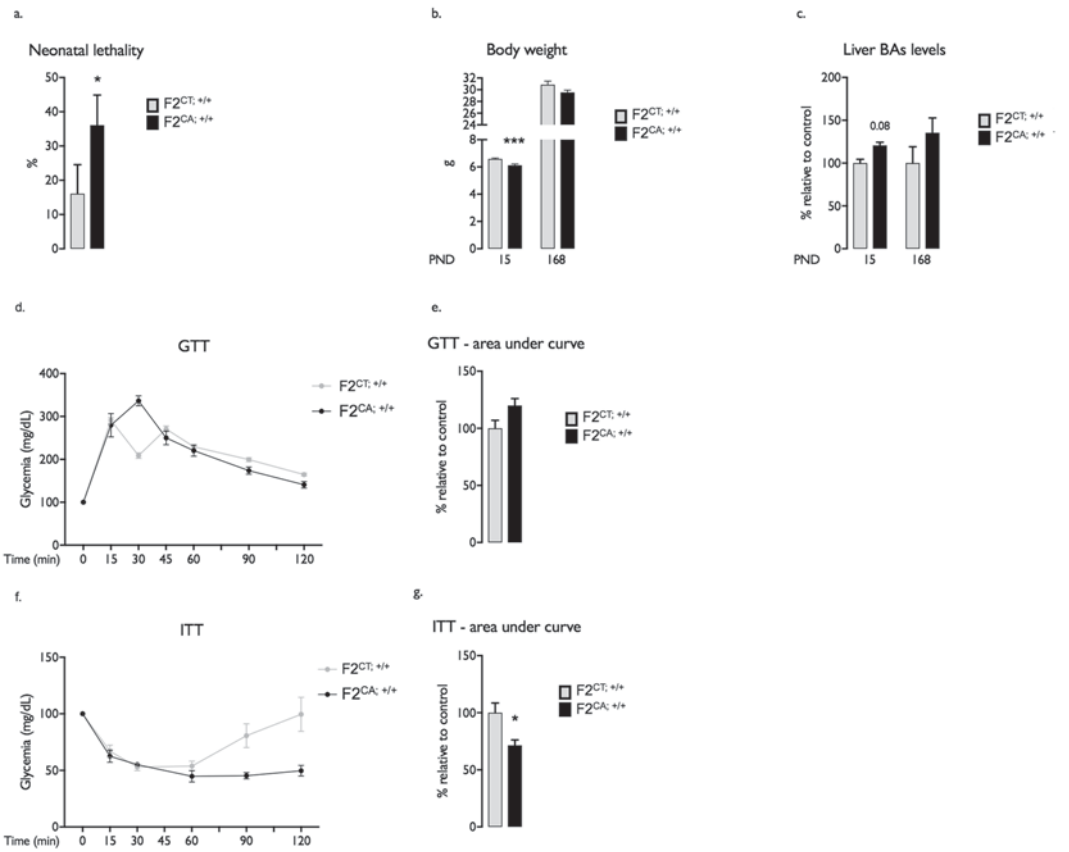


Figure 3. Paternal exposure to CA-diet impacts F2 offspring. (**a**) Percentage of neonatal mortality in $F2^{CA;+/+}$ and $F2^{CT;+/+}$ males. (**b**) Body weight of $F2^{CA;+/+}$ and $F2^{CT;+/+}$ mice at 0, 15,168 postnatal days. (**c**) Hepatic bile acid levels in 15-days old and adult $F2^{CA;+/+}$ and $F2^{CT;+/+}$ mice. (**d**) GTT in adult $F2^{CA;+/+}$ and $F2^{CT;+/+}$ mice. (**e**) Area under the curve for GTT. (**f**) ITT in adult $F2^{CA;+/+}$ and $F2^{CT;+/+}$ mice. (**g**) Area under the curve for ITT. Data are expressed as means +/− SEM. In all panels for each group, $n = 10–20$ males from 3 to 5 independent experiments; *significance; $p < 0.05$.

CA exposure of F0 founders led to postnatal mortality in the corresponding F2 ($F2^{CA;+/+}$) generation similarly to what was observed in the $F1^{CA;+/+}$ offspring (Fig. 3a). At PND15, the surviving $F2^{CA;+/+}$ showed lower body weight (Fig. 3b), associated with a clear but not significant increase in hepatic BA levels compared to the $F2^{CT;+/+}$ males (Fig. 3c). At adulthood, if no difference in glucose tolerance was detected (Fig. 3d,e), $F2^{CA;+/+}$ males showed enhanced sensitivity to exogenous insulin during ITT compared to $F2^{CT;+/+}$ animals (Fig. 3f,g). These results show that paternal CA-exposure resulted in phenotypic abnormalities up to the $F2^{CA;+/+}$ generation.

Breeding of $F0^{-/-}$ males with C57BL/6J females leads to genetic heterogeneity in the following generations. The analysis of these offspring is thus sub-optimal to establish if Tgr5 signaling is involved in the initiation of the multigenerational phenotypes resulting from paternal CA exposure. To encompass this limitation, we used a diet supplemented with oleanolic acid (0.07%-OA), known as a TGR5 agonist[16]. The OA specificity was confirmed using $F0^{-/-}$ males. In $F0^{OA;+/+}$ males, activation of Tgr5 pathways after exposure to OA-diet led to lower sperm count and decreased fertility compared to control males (Supplemental Fig. 2a,b). Similarly to CA-diet, paternal exposure to OA-diet induced perinatal mortality, altered body weight at PND15, and reduced glucose tolerance in adult $F1^{OA;+/+}$ males compared to $F1^{CT;+/+}$ males (Supplemental Fig. 2c–e). Note that OA exposure has no effect on offspring originating from $F0^{-/-}$ male founders (Supplemental Fig. 2). Interestingly, the $F2^{OA;+/+}$ generation showed increased neonatal mortality and lower body weight at PND15 compared to $F2^{CT;+/+}$ pups (Supplemental Fig. 2f,g). Altogether, these last results provide evidences of multi-generational impacts of CA initiated in exposed F0 males by Tgr5 dependent pathways.

CA-exposure alters DNA methylation in $F0^{+/+}$ sperm cells. To understand the molecular mechanisms underlying the initial steps of this new model of multigenerational impacts of ancestral exposure, we next analyzed the effects of CA-diet on germ cell quality with a particular focus on epigenetic integrity.

During the last step of spermatogenesis, namely spermiogenesis, germ cells undergo a global chromatin remodeling characterized by the replacement of most histones by protamines. In elongated spermatids, histone-protamine transition results in a tight compaction of the genome within the nucleus. Interestingly, electronic microscopy on F0 testes sections (Supplemental 3a) clearly showed altered DNA condensation in spermatids from $F0^{CA;+/+}$ males suggesting defects in chromatin composition following CA treatment. However, no alteration in mRNA accumulation of either transition proteins (*Tnp1* & *Tpn2*) or protamines (*Prm1* & *Prm2*)

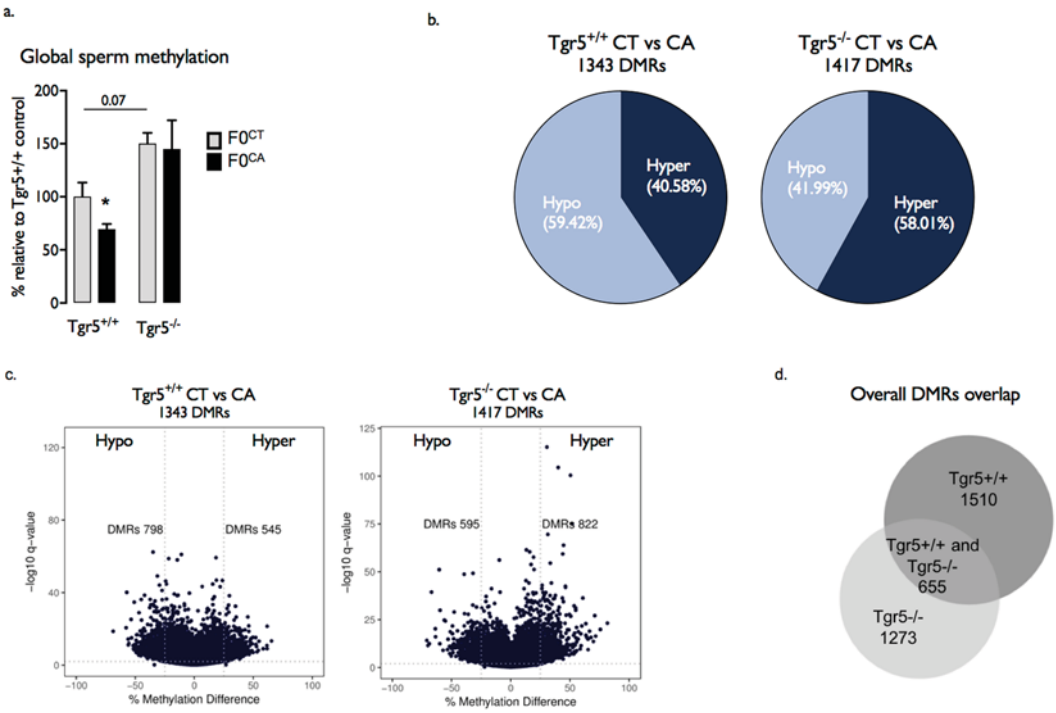


Figure 4. Paternal CA exposure alters global DNA methylation levels in sperm cells. (**a**) Global DNA methylation levels in spermatozoa of $F0^{CT;+/+}$, $F0^{CA;+/+}$; $F0^{CT;-/-}$; and $F0^{CA;-/-}$ mice. (**b**) Pie charts of the relative percentage of hyper- or hypo- DMRs in spermatozoa of $F0^{CT;+/+}$, $F0^{CA;+/+}$; $F0^{CT;-/-}$ and $F0^{CA;-/-}$ mice. (**c**) Volcano plots of comparisons of all DMR assessed in RRBS analysis of spermatozoa from $F0^{CT;+/+}$, $F0^{CA;+/+}$; $F0^{CT-/-}$; and $F0^{CA;-/-}$ mice. (**d**) Representation of specific and common differentially methylated sequences in $F0^{CT;+/+}$, $F0^{CA;+/+}$; $F0^{CT;-/-}$; and $F0^{CA;-/-}$ mice. RRBS was performed on 1 experiment on 3 samples per group. Each sample is a pool of 3 individual mice. For a data are expressed as means +/− SEM. $n = 8–12$ per group from 3 independent experiments. $*p < 0.05$ vs. control diet group.

was observed (Supplemental 3b). In addition, no obvious change in H3 and H4 histones accumulation in mature sperm was detected in $F0^{CA;+/+}$ or $F0^{CA;-/-}$ founders compared respectively to $F0^{CT;+/+}$ or $F0^{CT;-/-}$ male mice (Supplemental 3c). These results suggested that histone-protamine signaling might not be critical to mediate the offspring phenotypes induced by paternal CA exposure.

Besides histone patterns, sperm DNA methylation is known to play a major role in developmental programing of diseases. Interestingly, mature sperm cells from CA exposed founders ($F0^{CA;+/+}$) showed global DNA hypo-methylation compared to those from $F0^{CT;+/+}$ founders (Fig. 4a). In contrast, no global influence of CA exposure on DNA methylation levels in $F0^{CA;-/-}$ sperm cells was observed (Fig. 4a). The interplay between TGR5 signaling pathways and sperm cell genome methylation was further supported by the increased abundance of 5-methyl-Cytosine (5meC) in $F0^{CT;-/-}$ males compared to $F0^{CT;+/+}$ male founders fed a control diet (Fig. 4a).

Conclusions from global DNA methylation analysis has been confirmed and implemented by a reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) approach realized on similar sperm DNA extracts (Fig. 4b,c). DMRs between CA-exposed and control founders were defined as regions containing CpG dinucleotides within a 1000 bp window showing a concordant ≥25% methylation change with a q-value cutoff of 0.01.

In $F0^{CA;+/+}$ sperm cells, 1343 CA-associated DMRs were identified compared to $F0^{CT;+/+}$ group (Fig. 4b,c). The range of differential methylation across these DMRs was 25–68%. Consistent with global hypo-methylation, a majority of 798 hypo-methylated DMRs (59.41% total DMRs) were identified, whereas hyper-methylated DMRs showed 545 occurrences (40.58% total DMRs) (Fig. 4b,c).

Applying the same criteria for calling DMRs, RRBS analysis performed on $F0^{CA;-/-}$ sperm showed 1417 CA-associated DMRs compared to $F0^{CT;-/-}$ sperm cells (Fig. 4b,c) with a range of differential methylation of 25–81%. While $F0^{CA;+/+}$ showed a majority of hypo-methylated DMRs, $F0^{CA;-/-}$ DMRs were mostly hyper-methylated (58.01%) confirming our previous observations on global DNA methylation (Fig. 4b,c).

Functional analysis of RRBS reveals DMRs associated genes relevant with the multigenerational phenotypes induced by paternal CA exposure. To understand how CA-associated methylation changes might have functional significance in the future embryo, we identified all annotated genes that directly overlapped at least one CpG showing 25% of differential methylation (Supplemental Tables 1–8). Focusing on gene boundaries (intron, exon) and their corresponding promoters; differentially methylated CpGs from $F0^{CA;+/+}$ spermatozoa are contained within a total of 2165 annotated genes. In $F0^{CA;-/-}$ spermatozoa, 1928 differentially methylated genes were identified (Fig. 4d).

Interestingly, the majority of differentially methylated genes determined in $F0^{CA;+/+}$ sperm cells (69.74%) did not overlap with the ones observed in $F0^{CA;-/-}$ sperm cells (Fig. 4d). This set of 1510 annotated genes, specific to exposure of $F0^{CA;+/+}$ males, might be of particular interest to explain the molecular basis of the multigenerational phenotypes induced by paternal exposure to CA-diet.

To gain functional insight, these 1510 associated genes, specifically observed on $F0^{CA;+/+}$ sperm cells were analyzed for Biological process over-representation using PANTHER. Among the 7 categories statistically over-represented after applying the Bonferroni correction for multiple testing, 5 were associated with developmental processes. Of note, "embryonic development" presented the highest enrichment fold (+2.45) (Supplemental Fig. 4).

Additional comparisons for common functional annotations pathways were tested using Enrichr. According to the most updated KEGG database, genes associated with differential CpG methylation showed significant overlap with critical metabolic signaling including "insulin secretion" (P-value = 0.0006) and "glycolysis/gluconeogenesis" (P-value = 0.0280) (Supplemental Fig. 4).

Besides enrichment analysis, genes associated with differential CpG methylation only in $F0^{CA;+/+}$ spermatozoa, were considered for their relevance with abnormalities described in offspring from CA-diet exposed males. This *a priori* read out of the RRBS dataset revealed altered methylation patterns associated with *Fgfr4* and *Klotho*, genes encoding two critical regulators of BA homeostasis[17].

Our next interest focused on the specific family of imprinted genes. Imprinted genes are defined by allele specific expression that relies on asymmetric 5meC patterns established on imprinted control region (ICR) during gametogenesis. This set of genes is thus of interest in the context of germ cell DNA methylation changes in response to CA exposure. Out of a list of 84 known imprinted genes, 6 were overlapping differentially methylated CpGs in sperm cells from $F0^{CA;+/+}$ males. Those genes include *Peg10*, *Phlda2*, *Plagl1*, or *Kcnq1*. Interestingly, improper dosage of *Peg10* and *Phlda2* are associated with defects in fetal and placental growth as well as sudden perinatal death in mouse. Of similar interest, *Plagl1* or *Kcnq1* dysregulation are responsible for impaired glucose tolerance associated with insulin secretion defects[18,19].

Altogether, these functional interpretations are consistent with developmental and metabolic abnormalities described in offspring from CA exposed males. This suggests that sperm cells epigenome and more specifically defects in DNA methylation might contribute to the initiation of the phenotypic impacts of CA-diet across multiple generations.

CA associated DMRs in sperm cells are associated with transcriptional deregulation of functionally related genes in the liver of F1 and F2 offspring. We next asked whether differential methylation in F0 sperm cells might prime the embryo to persistent transcriptomic deregulations underlying phenotypic traits shared across F1 and F2 progenies.

As a representative read out of metabolic defects, total RNA from the liver of both PND15 and/or adult offspring were tested for relative abundance using quantitative PCR. We first tested for transcript deregulation of genes associated with differential CpG methylation in sperm cells of CA treated F0 male founders. As similar deregulations between F0 sperm cells and offspring somatic tissue cannot be strictly expected, we also expended our analysis to a set of genes functionally related to those submitted to DNA methylation change in the CA exposed F0 germline.

At PND15, although hepatic transcript levels of *Fgfr4* and *Klotho* were not altered (Supplemental Fig. 5), accumulation of *Cyp46a1* and *Cyp7a1* were increased in $F1^{CA;+/+}$; whereas no effect was observed in $F1^{CA;-/-}$ males compared to $F1^{CT;-/-}$ males (Fig. 5a). Same deregulation was observed in the liver of 15 days old $F2^{CA;+/+}$ progeny originating from CA exposed grandfathers ($F0^{CA;+/+}$) comared to $F2^{CT;+/+}$ males (Fig. 5b). *Cyp46a1* and *Cyp7a1* are encoding for enzymes directly involved in primary BAs synthesis. The functional significance of their transcript deregulation was supported by increased hepatic BAs levels measured in 2 weeks old $F1^{CA;+/+}$ and $F2^{CA;+/+}$ progenies from CA exposed F0 compared to control males (Fig. 2).

Always at PND15, *Kcnq1* an imprinted gene associated with DMRs in F0 sperm cells, showed transcript deregulations in the liver of $F1^{CA;+/+}$ and $F2^{CA;+/+}$ offspring when compared to their respective controls (Fig. 5c,d). In the F1 generation, the decrease in *Kcnq1* was dependent on paternal Tgr5 signaling as $F1^{CA;-/-}$ male transcript levels were not affected compared to $F1^{CT;-/-}$ (Fig. 5c).

In line with defects in glucose homeostasis, adult $F1^{CA;+/+}$ males originated from CA exposed $F0^{CA;+/+}$ founders showed consistent deregulation of *G6Pase* and *Pepck* mRNA accumulations compared with controls (Fig. 5e). No alteration of *G6Pase* and *Pepck* expression was observed in $F1^{CA;-/-}$ males compared to $F1^{CT;-/-}$ males (Fig. 5e). If insulin response was altered in $F2^{CA;+/+}$ males, those individuals did not show any difference in hepatic mRNA accumulations of *G6Pase* and *Pepck* when compared to their respective control group (Fig. 5f). These data suggest that molecular mechanisms specific to each generation underlie common metabolic traits resulting from paternal CA-diet exposure.

***Tgr5* dependent regulation of *Dnmt3b* within the germ cell lineage is a strong candidate to prime the phenotypic impacts of paternal CA exposure across multiple generations.** To understand how Tgr5 signaling pathways affect germ cell DNA methylation, we analyzed testicular abundance of transcripts encoding for DNA-methyltransferases (Dnmts) (Fig. 6a and Supplemental 6). No impact of CA-diet was observed for *Dnmt1*, *Dnmt3a* and *Dnmt3L* (Supplemental 6), whereas a decrease of *Dnmt3b* mRNA accumulation was detected in testis of $F0^{CA;+/+}$ compared to $F0^{CT;+/+}$ founders (Fig. 6a). Of note, *Dnmt3b* mRNA accumulation remained unaffected in testis of $F0^{CA;-/-}$ males compared to their respective controls (Fig. 6b). Interestingly, $F0^{CT;-/-}$ mice showed an increased *Dnmt3b* mRNA accumulation compared to $F0^{CT;+/+}$ founders (Fig. 6b). These results are consistent with previous quantification of global sperm DNA methylation, as well as the RRBS dataset obtained from F0 sperm.

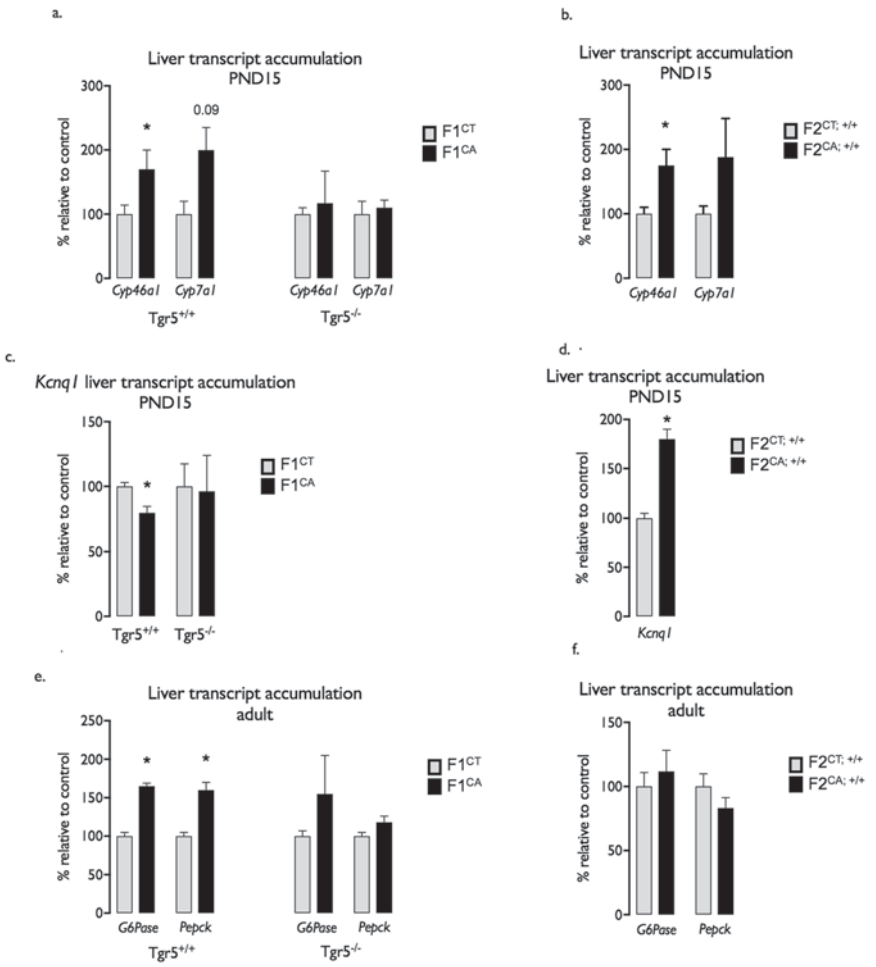


Figure 5. $F1^{CA;+/+}$ males have altered BA metabolism. (**a**) Liver mRNA accumulation of *Cyp46a1* and *Cyp7a1* normalized to *β-actin* mRNA levels in 15-days old $F1^{CT;+/+}$, $F1^{CT;-/-}$, $F1^{CA;+/+}$ and $F1^{CA;-/-}$ mice. (**b**) Liver mRNA accumulation of *Cyp46a1* and *Cyp7a1* normalized to *β-actin* mRNA levels in 15-days old $F2^{CT;+/+}$ and $F2^{CA;+/+}$ mice. (**c**) Liver mRNA accumulation of *Kcnq1* normalized to *β-actin* mRNA levels in 15-days old $F1^{CT;+/+}$, $F1^{CT;-/-}$, $F1^{CA;+/+}$ and $F1^{CA;-/-}$ mice. (**d**) Liver mRNA accumulation of *Kcnq1* normalized to *β-actin* mRNA levels in 15-days old $F2^{CT;+/+}$ and $F2^{CA;+/+}$ mice. (**e**) Liver mRNA accumulation of *G6Pase* and *Pepck* normalized to *β-actin* mRNA levels in adult $F1^{CT;+/+}$, $F1^{CT;-/-}$, $F1^{CA;+/+}$ and $F1^{CA;-/-}$mice. (**f**) Liver mRNA accumulation of *G6Pase* and *Pepck* normalized to *β-actin* mRNA levels in 15-days old $F2^{CT;+/+}$ and $F2^{CA;+/+}$ mice. Data are expressed as means +/− SEM. $n = 8–12$ per group from 3 independent experiments. $*p < 0.05$ vs. control diet group.

Dnmt3b is expressed in different cell types within the testis such as Leydig, Sertoli and germ cells[7,20,21]. To define if the observed deregulation of testicular *Dnmt3b* mRNA accumulation could be correlated with the impacts of CA exposure on DNA methylation levels within germ cell lineage, we performed immunohistochemistry for co-staining of Smad6, a marker of post-meiotic germ cells, and 5-methylcytosine (5meC). Consistently with the observed sperm cell DNA hypo-methylation, $F0^{CA;+/+}$ males showed a lower proportion of seminiferous tubules containing post-meiotic germ cells co-stained for Smad6 and 5meC compared to $F0^{CT;+/+}$ males (Fig. 6c,d). This effect was not observed in the testis of $F0^{CA;-/-}$ when compared to $F0^{CT;-/-}$ group (Fig. 6d).

The use of the spermatogonial cell line GC1-spg allowed demonstrating that Tgr5 signaling pathways control *Dnmt3b* expression within germ cell lineage. Indeed, GC1spg cells transfected with a siRNA directed against Tgr5 showed higher mRNA accumulation of *Dnmt3b* compared to cells transfected with a control siRNA (Fig. 6e). Moreover, treatment of GC1-spg cells with deoxycholic acid (DCA) induced a significant decrease of *Dnmt3b* while transcript accumulation remained stable in cells transfected with a siRNA directed against Tgr5 (Fig. 6f). Those significant transcriptomic changes have been confirmed at the protein level (Fig. 6g). Altogether these results suggest that Tgr5 dependent regulation of Dnmt3b within germ cells can impact sperm DNA methylation and prime the phenotypic impacts of paternal BA exposure across multiple generations.

Discussion

A number of experimental animal models have shown that paternal exposure to metabolic stress can have a significant influence on the susceptibility of future generations to diseases.

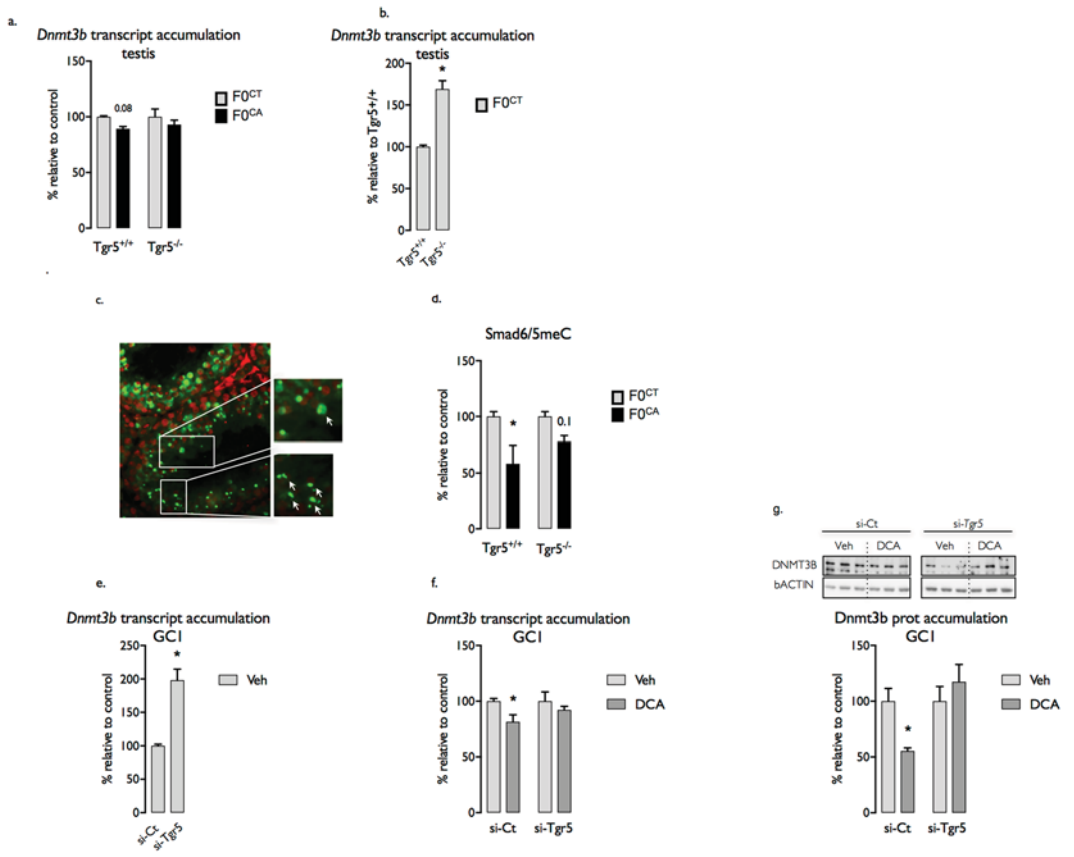


Figure 6. Adult CA-exposure alters male germ cells. (**a**) Testicular mRNA accumulation of *Dnmt3b* normalized to *β-actin* mRNA levels in adult $F0^{CT;+/+}$ and $F0^{CT;-/-}$ male founders. (**b**) Testicular mRNA accumulation of *Dnmt3b* normalized to *β-actin* mRNA levels in adult $F0^{CT;+/+}$; $F0^{CT;-/-}$; $F0^{CA;+/+}$ and $F0^{CA;-/-}$ male founders. (**c**) Immunohistochemistry of Smad6 and 5meC in testis of $F0^{CT;+/+}$; $F0^{CT;-/-}$; $F0^{CA;+/+}$ and $F0^{CA;-/-}$ male founders. (**d**) Quantification of the relative percentage of seminiferous tubules with germ cells co-stained for Smad6 and 5meC in testis of $F0^{CT;+/+}$; $F0^{CT;-/-}$; $F0^{CA;+/+}$ and $F0^{CA;-/-}$ male founders. (**e**) mRNA expression of *Dnmt3b* normalized to *β-actin* levels in GC1spg germ cell lines transfected with siGfp or siTgr5. (**f**) mRNA expression of *Dnmt3b* normalized to *β-actin* levels in GC1spg germ cell lines transfected with siGfp or siTgr5 and exposed to vehicle or DCA during 24 hours. (**g**) DNMT3B protein accumulation normalized to *ACTIN* levels in GC1spg germ cell lines transfected with siGfp or siTgr5 and exposed to vehicle or DCA during 24 hours. Data are expressed as means +/− SEM. $n = 8–15$ per group from 3 independent experiments. In a, b, c and d: *$p < 0.05$ vs. control diet group. In e, f and g: *Difference from the siGfp vehicle group; #difference from the siGfp DCA group. siGfp vehicle-treated cells were fixed at 100% for each siRNA condition.

In the present study, we demonstrate that pathological concentrations of BA are responsible for multigenerational phenotypes (Fig. 7). Two generations of progenies from males exposed to CA-diet show developmental and metabolic abnormalities. These defects are associated with differential DNA methylation in the mature sperm of CA-exposed males. The main contribution of paternal Tgr5 signaling is supported by the fact that progeny originated from $F0^{CA;-/-}$ founders are protected from the adverse effects of paternal exposure to CA-diet. Further explorations suggest that Tgr5 dependent regulation of *Dnmt3b* expression within germ cells may constitute the primary molecular event linking paternal BA exposure to the epigenetic programming of diseases across multiple generations.

Our previous research identifies BAs as reprotoxic molecules affecting sperm number[14]. Testicular defects associated with the phenotype included a loss of cell junctions within the seminiferous epithelium as well as an increased cell death affecting advance stages of spermatogenesis. Those observations were dependent upon the activation of the membrane BA receptor Tgr5 within the germ cell lineage. Indeed, mice presenting a global deletion of $Tgr5^{-/-}$ were protected against fertility damages associated with BA exposure. In this present study, we show that the deletion of Tgr5 also protect progenies to negative phenotypic outcomes induced by paternal CA exposure.

These results were unexpected, as it has been demonstrated that upon CA-supplemented diet, the absence of Tgr5 worsens liver injury creating systemic conditions that are themselves responsible for reproductive abnormalities. Interestingly, hepatic parameters known to impact male fertility such as the Insulin-growth-factor-1 (Igf1), and enzymes responsible for the catabolism of testosterone in hepatocytes, were similarly affected in $F0^{CA;+/+}$ and $F0^{CA;-/-}$ males in response to CA-diet exposure[14]. This is the demonstration that systemic changes

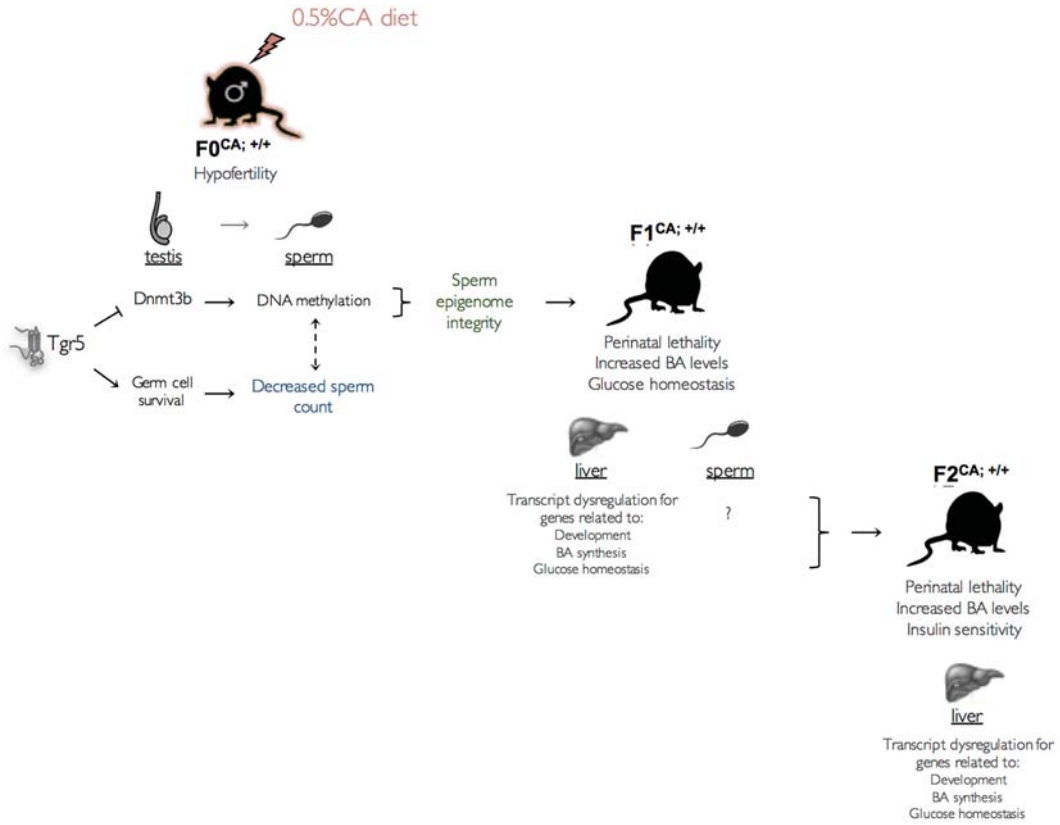


Figure 7. Proposed scheme of the transgenerationnal impacts of paternal CA-diet exposure.

associated with CA treatment in both genetic backgrounds can't explain the reproductive defects, which remained unique to wild-type mice.

We then raised the hypothesis that BA, without systemic intermediates, may act directly within the testis *via* Tgr5 dependent signaling pathways. In this study, the use of the spermatogonial cell line GC1-spg confirmed the activity of Tgr5 for the regulation of *Dnmt3b* expression within the germ cell lineage.

In conclusion and despite the limitations of systemic changes associated with non-tissue-specific gene deletion, Tgr5 knock-out mice appear to be a reliable model to define the impacts of CA-diet on testis physiology. However, genetic heterogeneity of progenies originating from the mating of $F0^{-/-}$ males with wild-type females raised the limitations of our model to explore generational phenotype resulting from paternal BA exposure (in the following generations). We then used alternative strategy allowing genetic consistency while focusing on Tgr5 specificity. Feeding $F0^{+/+}$ and $F0^{-/-}$ males with oleanolic acid, a specific Tgr5 agonist, confirms the critical role of Tgr5 signaling to program phenotypic outcomes up to the second generation.

Adult exposure to CA-diet is known to reduce sperm count and decrease fertility rates. Beside the quantitative impact of BAs on reproductive function, the present study demonstrate that pathological concentrations of BAs are responsible for germ cell epigenetic abnormalities and disease programming on two generations of offspring. The last few years have seen increasing interest in investigating the epigenetic dimension of male fertility defects. Recently, human studies along with experimental model in rodents, describe a strong association between reproductive disorders and sperm epimutations. A good illustration come from recent work showing that sperm collected for the purpose of Assisted Reproductive Technologies (ART) present abnormal chromatin composition as well as altered DNA methylation patterns[22]. In mouse, exposure to endocrine disruptors such as vinclozoline, a fungicide known for its repro-toxic properties, increases spermatogenic cell apoptosis rate and alters sperm DNA methylation[23]. Interestingly, ART or paternal exposures to vinclozolin have both been associated with offspring phenotypes across multiple generations[22]. In this context, the impacts of supra-physiological BA concentrations on sperm epigenome define an original model of paternal inheritance where metabolic compounds can affect offspring.

Three major classes of epigenetic information remain the likeliest candidates to carry paternal information to offspring. Those include cytosine methylation, chromatin structure, and non-coding RNA.

In the present study, electronic microscopy realized on testes sections clearly showed altered DNA condensation of spermatids in response to CA-diet exposure. Several reports link this feature to an alteration of the histone-protamine transition during spermiogenesis that would ultimately lead to abnormal retention of nucleosomes in mature sperm[23,24]. Even if our model of CA exposure is clearly associated to the observation of uncondensed spermatid nuclei, we were not able to detect substantial chromatin change in mature spermatozoa. The elimination of the most affected spermatids prior their release into the epididymis would explain this interesting

discrepancy. Supporting this hypothesis, we previously demonstrate that CA exposure is responsible to spermatid cell death. Further investigations using sensitive approaches must be considered to highlight potential subtle changes in chromatin geography or composition in spermatozoa that survived germ cell selection.

The major epigenetic change detected in sperm in response to CA exposure concern DNA methylation levels. A first approach allowed us to identify a 30% decrease in global 5meC on sperm from $F0^{CA;+/+}$ compared to controls. Interestingly several studies report that global hypo-methylation are correlated with poor pregnancy outcomes in IVF patients[25]. Consistently, reduced sperm DNA methylation is associated with decreased fertility in our model of BA exposure.

Changes in sperm DNA methylation are also known to affect the proper initiation of the transcriptional program of the zygote. As a consequence, paternal DMRs have the potential to interfere with the early processes of cell differentiation and ultimately with the functional determination of embryonic tissues. Sperm DMRs are thus strong candidates to initiate a cascade of molecular alterations increasing susceptibility to diseases in later life.

In our model, changes in sperm DNA methylation induced by CA exposure are associated with high rates of neonatal lethality in the corresponding F1 and F2 progenies. Macroscopic observations of dead newborns reveal a broad range of phenotypic abnormalities. Further experimentations would be useful to characterize the nature of these developmental disorders to understand their origin. Later in life, surviving offspring develop metabolic syndromes associated with increased BA concentrations as well as defect in glucose/insulin homeostasis. Altogether these data demonstrate that differential methylations in the sperm cells from CA exposed males are associated with phenotypic outcomes in two generation of progenies.

Understanding the mechanistic relationship between sperm DMRs and multigenerational phenotypes constitute a real challenge. Many examples in the field demonstrate that differential methylations in sperm might not be strictly maintained in F1 tissues due to the dramatic epigenetic programming required for cell fate determination during development. However, sperm DMRs are expected to influence the expression of gene networks functionally related to those submitted to sperm DNA methylation changes.

Results obtained in the context of CA exposure are consistent with this model. We identified 2160 genes associated with differential CpG methylations in the sperm of $F0^{CA;+/+}$. Among them, 1510 were specific to $F0^{CA;+/+}$ males. Even if the majority of them did not show differences in expression in the liver of the corresponding F1 and F2, enrichment analysis show that sperm differentially methylated genes are functionally relevant with transcriptional changes associated with offspring phenotypes.

In this manuscript we demonstrate that paternal CA exposure can reproduce similar phenotypic traits up to the second generation through the male germline. This new example of transgenerational inheritance prompts us to understand how F1 spermatozoa could in turn carry the memory of ancestral CA exposure. In this study, we focused our interest on sperm DNA methylation. Global 5meC levels were clearly but not statistically decreased in sperm from $F1^{CA;+/+}$ compared to $F1^{CT;+/+}$ males (data not shown). Further analysis would be required to decipher if F1 sperm present similar epigenetic changes than the one observed in F0 germ cells directly exposed to CA diet. Few examples in the literature show that differential methylation can be maintained in the male germline across several generations by escaping the primordial germ cells reprogramming. Another hypothesis would be that the phenotypic traits observed in the first generation of offspring are able to reproduce similar epigenetic alterations on their own germ cells.

The use of Tgr5 knock out mice as well as spermatogonial germ cell *in vitro*, shown that the activation of Tgr5 signaling by BA reduces *Dnmt3b* expression. Previous reports have shown similar deregulations of *Dnmt3b* expression in response to various reprotoxic molecules. In male rat, neonatal exposure to xeno-estrogens leads to decrease Dnmt3b levels in the germ cells leading ultimately to reduce DNA methylation[23]. In our model, Tgr5 dependent regulation of *Dnmt3b* may constitute the primary molecular event linking paternal CA exposure, sperm hypo-methylation and developmental programming of diseases across multiple generations.

Our study provides fundamental findings that may contribute to a better understanding of how paternal exposure to stressors can shape offspring physiology through several generations.

Altered BA homeostasis is the direct consequence of prevalent metabolic diseases affecting our society worldwide. Along with liver failure, intestinal inflammation and obesity are all known to impact BA levels and biochemical composition.

Beside their repro-toxic property, this study identified BAs as critical mediators of transgenerational metabolic diseases impregnation. Our conclusions will highlight important opportunities for prevention and therapeutic intervention in order to slow the growing epidemic of decreased sperm quality and its consequences on metabolic disease programing across generations.

Methods

Animals. Nine-week-old $Tgr5^{+/+}(F0^{+/+})$ and $Tgr5^{-/-}$ $(F0^{-/-})$ mice used have been described elsewhere[14]. The mice used in this study were maintained as a C57BL/6J background and housed in temperature-controlled rooms with 12 h light/dark cycles. Mice had *ad libitum* access to food and water. Nine-week-old mice F0 founders were exposed to the D04 diet (Control) or the D04 diet, supplemented with 0.5% cholic acid (CA-diet) (SAFE, Augy, France) for 4 months. The experimental procedure to study the multi-generational transmission from F0 to F2 is reported in Fig. 1.

This study was conducted in accordance with standards approved by the local Animal Care Committee (Comté d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Auvergne C2E2A; CE07-12 & 08-12).

Electron microscopy. Electron microscopy was performed as previously described[26]. Briefly, samples were set in 2% glutaraldehyde and 0.5% paraformaldehyde in cacodylate buffer at 4 °C for 24 h. Set testes were subsequently postfixed for 1.5 h in buffered osmium tetraoxide at 4 °C and embedded in Epon Araldite (Delta

Microscopies, Ayguesvives, France). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and examined with a Hitachi H-7650 transmission electron microscope (Hitachi Elexience, Verrières-le-Buisson, France).

Cell Culture. GC1-spg cells were used as previously described[14]. GC1-spg cells were transfected with siRNA directed against *Tgr5* or control siRNA. 48 hours after the transfection, cells were treated for 24 hours with vehicle or DCA (10 μM).

Glucose and insulin measurements. Colorimetric assays were performed as recommended by the manufacturer (Glucose RTU, 61269, Biomerieux SA, France). Insulin measurements were performed using an EIA kit (A05105, Bertin Pharma, France).

Glucose tolerance test. Mice were fasted overnight. They were then challenged with glucose (2 g/kg). Blood glucose concentrations were measured at regular time points.

Insulin tolerance test. Mice were fasted for 4 h and then challenged with insulin (1 mU/g) by IP. Blood glucose concentrations were measured at regular time points, and blood samples were collected to determine insulin levels.

Real-time RT-PCR. RNA from testis samples was isolated using Nucleospin RNA L (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). cDNA was synthesized from total RNA with the MMLV reverse transcriptase and random hexamer primers (Promega, Charbonnière-les-Bains, France). The real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed using SYBR green dye (Master mix Plus for SYBR Assay, Eurogentec, Angers, France) to measure duplex DNA formation with the Eppendorf Realplex system. The sequences of primers are the following: Primers were used previously in the following articles[14,27,28] or in Supplemental Table S9. Standard curves were generated with pools of testis cDNA from animals with different genotypes and/or treatments. The results were analyzed using the $\Delta\Delta$ct method.

Spermatozoa purification. The cauda sperm isolation has been designed according to relevant protocols described in the literature. The cauda epididymides were gently squeezed to allow the caudal fluid to ooze out. After 15 minutes incubation at 37 °C, swimming sperm containing in the media were transferred to a new tube. Sperm were collected by centrifugation at 2000 × g for 2 minutes, followed by two 1X PBS wash before freezing down. Sperm sample purity was confirmed by microscopic examination. The purity of the sperm was evaluated at the sacrifice when the sperm cells were collected. The overall percentage of purity was around 95% to 99%.

DNA methylation analysis. DNA was extracted from sperm cells, and global methylation levels were then quantified using an ELISA kit (P-1014B-48, Euromedex).

Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). RRBS was performed by Diagenode. Sequencing on an Illumina HiSeq3000. Quality control of sequencing reads was performed using FastQC. Adapter removal was performed using Trim Galore! version 0.4.1. Reads were then aligned to the reference genome using bismark v0.16 software, followed by methylation calling using the corresponding bismark function. The comparisons between the RRBS data sets were carried out using methylKi, with the mm10 refGene and CpG island annotation from UCSC. Differentially methylated CpGs, and differentially methylated regions (DMRs) were identified (the latter with a window size of 1000 bp, which had been found to include most DMRs). Both differentially methylated CpGs and differentially methylated regions (width 1000 nts) were identified for the data set, with a percent methylation difference cutoff of 25% and a *q*-value of 0.01. The percentages of hypo- and hypermethylated CpGs were plotted on a bar chart per chromosome. Additionally, the differentially methylated CpGs were annotated with different genomic regions, along with CpG island and shore coordinates and their distribution.

Immunohistochemistry. 5 μm paraffin sections of testes fixed with PFA4% solution were performed and mounted on positively charged glass slides (Superfrost plus), deparaffinized, rehydrated, treated for 20 min at 93°–98 °C in 0.01 M citric buffer (pH 6), rinsed in osmosed water (2 × 5 min), and washed (2 × 5 min) in Tris-buffered saline (TBS). Immunohistochemical studies were conducted according to the manufacturer's recommendations, as described earlier[29]. Slides were then counterstained with Hoechst medium (1 mg/mL). The antibodies used were Smad6 (Santa Cruz; sc 6034) and 5meC (Abcam; ab10805).

Western Blot. Proteins were extracted from tissues using lysis buffer (0.4 M NaCl, 20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl2, 0.2 mM EDTA, 0.1% NP-40, 1 × protease inhibitors [Roche Diagnostics]). Antibodies were used in TBS, 0.1% Tween, and 10% milk. The antibodies used are H3 (Santa Cruz; sc 8654) and H4 (Cell Signaling; 2935 S) and DNMT3b (Abcam; ab16049).

Statistics. For statistical analysis, student t-test or ANOVA analysis were performed using the statistical software package SigmaStat 3.0. Data are mean ± SEM. *p* value less than 0.05 was considered significant.

References

1. Skinner, M. K. Environmental stress and epigenetic transgenerational inheritance. *BMC Med* **12**, 153 (2014).
2. Curley, J. P., Mashoodh, R. & Champagne, F. A. Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm Behav* **59**, 306–314 (2011).
3. de Waal, E. *et al.* Primary epimutations introduced during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are corrected by germline-specific epigenetic reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 4163–4168 (2012).
4. Skinner, M. K. & Guerrero-Bosagna, C. Role of CpG deserts in the epigenetic transgenerational inheritance of differential DNA methylation regions. *BMC Genomics* **15**, 692 (2014).

5. Campos, E. I., Stafford, J. M. & Reinberg, D. Epigenetic inheritance: histone bookmarks across generations. *Trends Cell Biol.* https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.004 (2014).
6. Yan, W. Potential roles of noncoding RNAs in environmental epigenetic transgenerational inheritance. *Mol. Cell. Endocrinol.* https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.09.008 (2014).
7. La Salle, S. & Trasler, J. M. Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Dev. Biol.* **296**, 71–82 (2006).
8. Okada, Y. & Yamaguchi, K. Epigenetic modifications and reprogramming in paternal pronucleus: sperm, preimplantation embryo, and beyond. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 1957–1967 (2017).
9. Puri, D., Dhawan, J. & Mishra, R. K. The paternal hidden agenda: Epigenetic inheritance through sperm chromatin. *Epigenetics* **5**, 386–391 (2010).
10. Brunner, A. M., Nanni, P. & Mansuy, I. M. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin* **7**, 2 (2014).
11. Martinot, E. *et al.* Bile acids and their receptors. *Mol. Aspects Med.* https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.006 (2017).
12. Modica, S. *et al.* Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis. *Gastroenterology* **142**, 355–365–4 (2012).
13. Neuschwander-Tetri, B. A. Targeting the FXR nuclear receptor to treat liver disease. *Gastroenterology* **148**, 704–706 (2015).
14. Baptissart, M. *et al.* Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. *Hepatology* **60**, 1054–1065 (2014).
15. Zhang, Y. *et al.* Maternal bile acid transporter deficiency promotes neonatal demise. *Nat Commun* **6** (2015).
16. Sato, H. *et al.* Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from Olea europaea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 793–798 (2007).
17. Fu, T. *et al.* FXR Primes the Liver for Intestinal FGF15 Signaling by Transient Induction of β-Klotho. *Mol. Endocrinol.* **30**, 92–103 (2016).
18. Zhou, X. *et al.* A variation in KCNQ1 gene is associated with repaglinide efficacy on insulin resistance in Chinese Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Sci Rep* **6**, 37293 (2016).
19. van Vliet-Ostaptchouk, J. V. *et al.* Common variants in the type 2 diabetes KCNQ1 gene are associated with impairments in insulin secretion during hyperglycaemic glucose clamp. *PLoS ONE* **7**, e32148 (2012).
20. Sekaran, S. & Jagadeesan, A. In utero exposure to phthalate downregulates critical genes in Leydig cells of F1 male progeny. *J. Cell. Biochem.* **116**, 1466–1477 (2015).
21. Mizukami, T., Fujisawa, M., Kanai, Y., Kurohmaru, M. & Hayashi, Y. Effects of trichostatin a, a histone deacetylase inhibitor, on mouse gonadal development *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* **50**, 227–235 (2004).
22. de Waal, E. *et al.* The cumulative effect of assisted reproduction procedures on placental development and epigenetic perturbations in a mouse model. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6975–6985 (2015).
23. Meunier, L. *et al.* Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and Mcl-1. *Endocrinology* **153**, 1936–1947 (2012).
24. Meyer-Ficca, M. L. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol. Reprod.* **84**, 900–909 (2011).
25. Benchaib, M. *et al.* Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum. Reprod.* **20**, 768–773 (2005).
26. Viennois, E. *et al.* Lxrα regulates the androgen response in prostate epithelium. *Endocrinology* **153**, 3211–3223 (2012).
27. Baptissart, M. *et al.* Bile acid-FXRα pathways regulate male sexual maturation in mice. *Oncotarget*. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7153 (2016).
28. Vega, A. *et al.* Hepatotoxicity induced by neonatal exposure to diethylstilbestrol is maintained throughout adulthood via the nuclear receptor SHP. *Expert Opin. Ther. Targets* **18**, 1367–1376 (2014).
29. Volle, D. H. *et al.* The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3752–3764 (2009).

Acknowledgements

This study was conducted with the assistance of the "Anipath" Platform (GReD). We thank Sandrine Plantade, Khireddine Ouchen and Philippe Mazuel for animal facilities. The study was funded by Inserm, CNRS, Université Clermont Auvergne, Région Auvergne (#R12087CC to DHV), Plan cancer (C14012CS). Volle's team received support by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20–25).

Author Contributions

M.B.; L.S.; H.H.; L.T.; E.M.; A.H.; B.R.; D.H.V.: performed experiments. M.B.; D.H.V.: designed experiments. M.B.; F.C.; C.B.; D.H.V.: wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-018-34863-0.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

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

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 license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license 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 license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2018

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abou Nader, N., Levasseur, A., Zhang, X., Boerboom, D., Nagano, M.C., and Boyer, A. (2019). Yes-associated protein expression in germ cells is dispensable for spermatogenesis in mice. Genesis *57*. https://doi.org/10.1002/dvg.23330.

Adami, H.-O., Bergström, R., Möhner, M., Zatoôski, W., Storm, H., Ekbom, A., Tretli, S., Teppo, L., Ziegler, H., Rahu, M., et al. (1994). Testicular cancer in nine northern european countries. Int. J. Cancer *59*, 33–38. https://doi.org/10.1002/ijc.2910590108.

Adra, N., and Einhorn, L.H. (2017). Testicular cancer update. Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO *15*, 386–396. .

Agger, K., Santoni-Rugiu, E., Holmberg, C., Karlström, O., and Helin, K. (2005). Conditional E2F1 activation in transgenic mice causes testicular atrophy and dysplasia mimicking human CIS. Oncogene *24*, 780–789. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208248.

Ahmed, E.A., Omar, H.M., elghaffar, S.K.A., Ragb, S.M.M., and Nasser, A.Y. (2011). The antioxidant activity of Vitamin C, DPPD and l-cysteine against Cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. Food Chem. Toxicol. *49*, 1115–1121. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.02.002.

Al-Asmakh, M., Stukenborg, J.-B., Reda, A., Anuar, F., Strand, M.-L., Hedin, L., Pettersson, S., and Söder, O. (2014). The Gut Microbiota and Developmental Programming of the Testis in Mice. PLoS ONE *9*, e103809. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103809.

Algood, C.B., Newell, G.R., and Johnson, D.E. (1988). Viral Etiology of Testicular Tumors. J. Urol. *139*, 308–310. https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)42394-9.

Almog, S., Kurnik, D., Shimoni, A., Loebstein, R., Hassoun, E., Gopher, A., Halkin, H., and Nagler, A. (2011). Linearity and Stability of Intravenous Busulfan Pharmacokinetics and the Role of Glutathione in Busulfan Elimination. Biol. Blood Marrow Transplant. *17*, 117–123. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.06.017.

Almstrup, K., Leffers, H., Lothe, R.A., Skakkebæk, N.E., Sonne, S.B., Nielsen, J.E., Meyts, E.R.-D., and Skotheim, R.I. (2007). Improved gene expression signature of testicular carcinoma in situ. Int. J. Androl. *30*, 292–303. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00758.x.

Aloisio, G.M., Nakada, Y., Saatcioglu, H.D., Peña, C.G., Baker, M.D., Tarnawa, E.D., Mukherjee, J., Manjunath, H., Bugde, A., Sengupta, A.L., et al. (2014). PAX7 expression

defines germline stem cells in the adult testis. J. Clin. Invest. *124*, 3929–3944. https://doi.org/10.1172/JCI75943.

Amaravadi, R., Kimmelman, A.C., and White, E. (2016). Recent insights into the function of autophagy in cancer. Genes Dev. *30*, 1913–1930. https://doi.org/10.1101/gad.287524.116.

Anakk, S., Bhosale, M., Schmidt, V.A., Johnson, R.L., Finegold, M.J., and Moore, D.D. (2013). Bile Acids Activate YAP to Promote Liver Carcinogenesis. Cell Rep. *5*, 1060–1069. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.030.

Angulo, C., Rauch, M.C., Droppelmann, A., Reyes, A.M., Slebe, J.C., Delgado-López, F., Guaiquil, V.H., Vera, J.C., and Concha, I.I. (1998). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. J. Cell. Biochem. *71*, 189–203. .

Arai, E., Nakagawa, T., Wakai-Ushijima, S., Fujimoto, H., and Kanai, Y. (2012). DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. Histopathology *60*. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2012.04174.x.

Arda, E., Arikan, G., Akdere, H., Akgul, M., and Yuksel, I. (2020). Predictive and prognostic impact of preoperative complete blood count based systemic inflammatory markers in testicular cancer. Int. Braz. J. Urol. *46*, 216–223. https://doi.org/10.1590/s1677-5538.ibju.2018.0820.

Attaman, J.A., Toth, T.L., Furtado, J., Campos, H., Hauser, R., and Chavarro, Jorge.E. (2012). Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *27*, 1466–1474. https://doi.org/10.1093/humrep/des065.

Azambuja, A.A., Engroff, P., Silva, B.T., Zorzetti, R.C.S., and Morrone, F.B. (2020). Evaluation of nuclear NF-κB, transglutaminase2, and ERCC1 as predictors of platinum resistance in testicular tumors. Int. Braz. J. Urol. *46*, 353–362. https://doi.org/10.1590/s1677-5538.ibju.2019.0011.

Baptissart, M., Vega, A., Martinot, E., Pommier, A.J., Houten, S.M., Marceau, G., Haze, A. de, Baron, S., Schoonjans, K., Lobaccaro, J.-M.A., et al. (2014). Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. Hepatology *60*, 1054–1065. https://doi.org/10.1002/hep.27204.

Baptissart, M., Sèdes, L., Holota, H., Thirouard, L., Martinot, E., de Haze, A., Rouaisnel, B., Caira, F., Beaudoin, C., and Volle, D.H. (2018). Multigenerational impacts of bile exposure are

mediated by TGR5 signaling pathways. Sci. Rep. *8*, 16875. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34863-0.

Bartkova, J., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N.E., Lukas, J., and Bartek, J. (2003). Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. APMIS *111*, 252–266. https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.1110129.x.

Basciani, S., De Luca, G., Dolci, S., Brama, M., Arizzi, M., Mariani, S., Rosano, G., Spera, G., and Gnessi, L. (2008). Platelet-Derived Growth Factor Receptor β-Subtype Regulates Proliferation and Migration of Gonocytes. Endocrinology *149*, 6226–6235. https://doi.org/10.1210/en.2008-0349.

Batta, A.K., Salen, G., Arora, R., Shefer, S., Batta, M., and Person, A. (1990). Side chain conjugation prevents bacterial 7-dehydroxylation of bile acids. J. Biol. Chem. *265*, 10925–10928. .

Bedford, J.M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. Biol. Reprod. *2*, Suppl 2:128-158. .

Bell, D.A., Flotte, T.J., and Bhan, A.K. (1987). Immunohistochemical characterization of seminoma and its inflammatory cell infiltrate. Hum. Pathol. *18*, 511–520. https://doi.org/10.1016/s0046-8177(87)80037-0.

Bendayan, M., Alter, L., Swierkowski-Blanchard, N., Caceres-Sanchez, L., Selva, J., Robin, G., and Boitrelle, F. (2018). Toxiques, mode de vie, environnement : quels impacts sur la fertilité masculine ? Gynécologie Obstétrique Fertil. Sénologie *46*, 47–56. https://doi.org/10.1016/j.gofs.2017.11.003.

Bensalem, A., Murtaza, B., Hichami, A., Khan, A.S., Oulamara, H., Merlen, G., Berrichi, M., Agli, A.-N., Tordjmann, T., and Khan, N.A. (2020). Bile acid receptor TGR5 is critically involved in preference for dietary lipids and obesity. J. Nutr. Biochem. *76*, 108298. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108298.

Bhang, D.H., Kim, B.-J., Kim, B.G., Schadler, K., Baek, K.-H., Kim, Y.H., Hsiao, W., Ding, B.-S., Rafii, S., Weiss, M.J., et al. (2018). Testicular endothelial cells are a critical population in the germline stem cell niche. Nat. Commun. *9*, 4379. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06881-z.

Bidault-Jourdainne, V., Merlen, G., Glénisson, M., Doignon, I., Garcin, I., Péan, N., Boisgard, R., Ursic-Bedoya, J., Serino, M., Ullmer, C., et al. (2020). TGR5 controls bile acid composition and gallbladder function to protect the liver from bile acid overload. JHEP Rep. *3*, 100214. https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100214.

Billig, H., Furuta, I., Rivier, C., Tapanainen, J., Parvinen, M., and Hsueh, A.J. (1995). Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. Endocrinology *136*, 5–12. https://doi.org/10.1210/endo.136.1.7828558.

Birnbaumer, L. (1990). G proteins in signal transduction. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *30*, 675–705. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.30.040190.003331.

Biswal, B.K., Beyrouthy, M.J., Hever-Jardine, M.P., Armstrong, D., Tomlinson, C.R., Christensen, B.C., Marsit, C.J., and Spinella, M.J. (2012). Acute Hypersensitivity of Pluripotent Testicular Cancer-Derived Embryonal Carcinoma to Low-Dose 5-Aza Deoxycytidine Is Associated with Global DNA Damage-Associated p53 Activation, Anti-Pluripotency and DNA Demethylation. PLoS ONE *7*, e53003. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053003.

Blanco-Rodríguez, J., Martínez-García, C., and Porras, A. (2003). Correlation between DNA synthesis in the second, third and fourth generations of spermatogonia and the occurrence of apoptosis in both spermatogonia and spermatocytes. Reprod. Camb. Engl. *126*, 661–668. https://doi.org/10.1530/rep.0.1260661.

Boivin, J., Bunting, L., Collins, J.A., and Nygren, K.G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Hum. Reprod. *22*, 1506–1512. https://doi.org/10.1093/humrep/dem046.

Boldajipour, B., and Raz, E. (2007). What Is Left Behind--Quality Control in Germ Cell Migration. Sci. STKE *2007*, pe16–pe16. https://doi.org/10.1126/stke.3832007pe16.

Booth, D.M., Murphy, J.A., Mukherjee, R., Awais, M., Neoptolemos, J.P., Gerasimenko, O.V., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., Sutton, R., and Criddle, D.N. (2011). Reactive Oxygen Species Induced by Bile Acid Induce Apoptosis and Protect Against Necrosis in Pancreatic Acinar Cells. Gastroenterology *140*, 2116–2125. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.054.

Borgmann-Staudt, A., Rendtorff, R., Reinmuth, S., Hohmann, C., Keil, T., Schuster, F.R., Holter, W., Ehlert, K., Keslova, P., Lawitschka, A., et al. (2012). Fertility after allogeneic

haematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence. Bone Marrow Transplant. *47*, 271–276. https://doi.org/10.1038/bmt.2011.78.

Boscia, F., Passaro, C., Gigantino, V., Perdonà, S., Franco, R., Portella, G., Chieffi, S., and Chieffi, P. (2015). High Levels of Gpr30 Protein in Human Testicular Carcinoma In Situ and Seminomas Correlate with Low Levels of Estrogen Receptor-Beta and Indicate a Switch in Estrogen Responsiveness: GPR30 IN HUMAN CIS AND SEMINOMAS. J. Cell. Physiol. *230*, 1290–1297. https://doi.org/10.1002/jcp.24864.

Boublikova, L., Buchler, T., Stary, J., Abrahamova, J., and Trka, J. (2014). Molecular biology of testicular germ cell tumors: Unique features awaiting clinical application. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *89*, 366–385. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.10.001.

Boukari, K., Meduri, G., Brailly-Tabard, S., Guibourdenche, J., Ciampi, M.L., Massin, N., Martinerie, L., Picard, J.-Y., Rey, R., Lombès, M., et al. (2009). Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Mullerian hormone repression during early human testis development. J. Clin. Endocrinol. Metab. *94*, 1818–1825. https://doi.org/10.1210/jc.2008-1909.

Boursier, J., and Diehl, A.M. (2015). Implication of Gut Microbiota in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. PLOS Pathog. *11*, e1004559. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004559.

Bowles, J., Teasdale, R.P., James, K., and Koopman, P. (2003). Dppa3 is a marker of pluripotency and has a human homologue that is expressed in germ cell tumours. Cytogenet. Genome Res. *101*, 261–265. https://doi.org/10.1159/000074346.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., et al. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science *312*, 596–600. https://doi.org/10.1126/science.1125691.

Braun, R.E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. Nat. Genet. *28*, 10–12. https://doi.org/10.1038/ng0501-10.

Bray, F., Ferlay, J., Devesa, S.S., McGlynn, K.A., and Møller, H. (2006). Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence. Nat. Clin. Pract. Urol. *3*, 532–543. https://doi.org/10.1038/ncpuro0606.

Brinster, R.L., and Avarbock, M.R. (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 11303–11307. https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11303.

Brinster, R.L., and Zimmermann, J.W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 11298–11302. https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11298.

Brosman, S.A. (1979). Testicular tumors in prepubertal children. Urology *13*, 581–588. https://doi.org/10.1016/0090-4295(79)90375-3.

Bucci, L.R., and Meistrich, M.L. (1987). Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. *176*, 259–268. https://doi.org/10.1016/0027-5107(87)90057-1.

Buljubašić, R., Buljubašić, M., Bojanac, A.K., Ulamec, M., Vlahović, M., Ježek, D., Bulić-Jakuš, F., and Sinčić, N. (2018). Epigenetics and testicular germ cell tumors. Gene *661*, 22–33. https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.072.

Cai, Q., Chen, Y., Zhang, D., Pan, J., Xie, Z., Xu, C., Li, S., Zhang, X., Gao, Y., Hou, J., et al. (2020). Estimates of over-time trends in incidence and mortality of testicular cancer from 1990 to 2030. Transl. Androl. Urol. *9*, 182–195. https://doi.org/10.21037/tau.2020.02.22.

Cai, Y., Liu, T., Fang, F., Shen, S., and Xiong, C. (2016). Involvement of ICAM-1 in impaired spermatogenesis after busulfan treatment in mice. Andrologia *48*, 37–44. https://doi.org/10.1111/and.12414.

Camilleri, M., Shin, A., Busciglio, I., Carlson, P., Acosta, A., Bharucha, A.E., Burton, D., Lamsam, J., Lueke, A., Donato, L.J., et al. (2014). Genetic variation in GPBAR1 predisposes to quantitative changes in colonic transit and bile acid excretion. Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol. *307*, G508–G516. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00178.2014.

Cao, W., Tian, W., Hong, J., Li, D., Tavares, R., Noble, L., Moss, S.F., and Resnick, M.B. (2013). Expression of bile acid receptor TGR5 in gastric adenocarcinoma. Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol. *304*, G322–G327. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00263.2012.

Carino, A., Graziosi, L., D'Amore, C., Cipriani, S., Marchianò, S., Marino, E., Zampella, A., Rende, M., Mosci, P., Distrutti, E., et al. (2016). The bile acid receptor GPBAR1 (TGR5) is

expressed in human gastric cancers and promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cell lines. Oncotarget *7*, 61021–61035. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10477.

Carino, A., Biagioli, M., Marchianò, S., Fiorucci, C., Zampella, A., Monti, M.C., Scarpelli, P., Ricci, P., Distrutti, E., and Fiorucci, S. (2019). Ursodeoxycholic acid is a GPBAR1 agonist and resets liver/intestinal FXR signaling in a model of diet-induced dysbiosis and NASH. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids *1864*, 1422–1437. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.07.006.

Carino, A., Graziosi, L., D'Amore, C., Cipriani, S., Marino, E., Zampella, A., Rende, M., Mosci, P., Distrutti, E., Donini, A., et al. The bile acid receptor GPBAR1 (TGR5) is expressed in human gastric cancers and promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cell lines. 15. .

Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. Dev. Cell *12*, 503–514. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.001.

Caron, N., Veilleux, S., and Boissonneault, G. (2001). Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. Mol. Reprod. Dev. *58*, 437–443. https://doi.org/10.1002/1098-2795(20010401)58:4<437::AID-MRD12>3.0.CO;2-Q.

Carrieri, C., Comazzetto, S., Grover, A., Morgan, M., Buness, A., Nerlov, C., and O'Carroll, D. (2017). A transit-amplifying population underpins the efficient regenerative capacity of the testis. J. Exp. Med. *214*, 1631–1641. https://doi.org/10.1084/jem.20161371.

Casaburi, I., Avena, P., Lanzino, M., Sisci, D., Giordano, F., Maris, P., Catalano, S., Morelli, C., and Andò, S. (2012). Chenodeoxycholic acid through a TGR5-dependent CREB signaling activation enhances Cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer cell proliferation. Cell Cycle *11*, 2699–2710. https://doi.org/10.4161/cc.21029.

Castilla-Cortázar, I. (2004). Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: Effect of insulin-like growth factor 1. World J. Gastroenterol. *10*, 2529. https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i17.2529.

Cavallini, G. (2006). Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Asian J. Androl. *8*, 143–157. https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00123.x.

Chan, A.-L., La, H.M., Legrand, J.M.D., Mäkelä, J.-A., Eichenlaub, M., De Seram, M., Ramialison, M., and Hobbs, R.M. (2017). Germline Stem Cell Activity Is Sustained by SALL4-Dependent Silencing of Distinct Tumor Suppressor Genes. Stem Cell Rep. *9*, 956–971. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.08.001.

Chan, F., Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Yang, Q.-E., Bieberich, C.J., Shashikant, C.S., and Oatley, J.M. (2014). Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes. Genes Dev. *28*, 1351–1362. https://doi.org/10.1101/gad.240465.114.

Chang, Y., and Yu, J. (2019). The protective effects of TGR5 against ultraviolet B irradiation in epidermal stem cells. J. Cell. Biochem. *120*, 15038–15044. https://doi.org/10.1002/jcb.28765.

Chang, C., Chen, Y.-T., Yeh, S.-D., Xu, Q., Wang, R.-S., Guillou, F., Lardy, H., and Yeh, S. (2004). Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 6876–6881. https://doi.org/10.1073/pnas.0307306101.

Chang, C., Lee, S.O., Wang, R.-S., Yeh, S., and Chang, T.-M. (2013). Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems: lessons learned from AR-knockout mice lacking AR in selective cells. Biol. Reprod. *89*, 21. https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109132.

Chen, L.-Y., Brown, P.R., Willis, W.B., and Eddy, E.M. (2014). Peritubular myoid cells participate in male mouse spermatogonial stem cell maintenance. Endocrinology *155*, 4964–4974. https://doi.org/10.1210/en.2014-1406.

Chen, L.-Y., Willis, W.D., and Eddy, E.M. (2016a). Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, 1829–1834. https://doi.org/10.1073/pnas.1517994113.

Chen, M.-C., Chen, Y.-L., Wang, T.-W., Hsu, H.-P., and Lai, M.-D. (2016b). Membrane bile acid receptor TGR5 predicts good prognosis in ampullary adenocarcinoma patients with hyperbilirubinemia. Oncol. Rep. *36*, 1997–2008. https://doi.org/10.3892/or.2016.5011.

Chen, Y.-S., Liu, H.-M., and Lee, T.-Y. (2019). Ursodeoxycholic Acid Regulates Hepatic Energy Homeostasis and White Adipose Tissue Macrophages Polarization in Leptin-Deficiency Obese Mice. Cells *8*, 253. https://doi.org/10.3390/cells8030253.

Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2010). The biology of spermatogenesis: the past, present and future. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *365*, 1459–1463. https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0024.

Chevalier, N., Vega, A., Bouskine, A., Siddeek, B., Michiels, J.-F., Chevallier, D., and Fénichel, P. (2012). GPR30, the Non-Classical Membrane G Protein Related Estrogen Receptor, Is Overexpressed in Human Seminoma and Promotes Seminoma Cell Proliferation. PLoS ONE *7*, e34672. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034672.

Chiang, J.Y.L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. J. Lipid Res. *50*, 1955–1966. https://doi.org/10.1194/jlr.R900010-JLR200.

Chiarini-Garcia, H., Hornick, J.R., Griswold, M.D., and Russell, L.D. (2001). Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. Biol. Reprod. *65*, 1179–1185. https://doi.org/10.1095/biolreprod65.4.1179.

Chiarini-Garcia, H., Raymer, A.M., and Russell, L.D. (2003). Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. Reprod. Camb. Engl. *126*, 669–680. https://doi.org/10.1530/rep.0.1260669.

Chung, P., and Warde, P. Testicular cancer: seminoma. Mens Health 38. .

Cipriani, S., Mencarelli, A., Chini, M.G., Distrutti, E., Renga, B., Bifulco, G., Baldelli, F., Donini, A., and Fiorucci, S. (2011). The Bile Acid Receptor GPBAR-1 (TGR5) Modulates Integrity of Intestinal Barrier and Immune Response to Experimental Colitis. PLoS ONE *6*, e25637. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025637.

Clark, A.T., Rodriguez, R.T., Bodnar, M.S., Abeyta, M.J., Cedars, M.I., Turek, P.J., Firpo, M.T., and Reijo Pera, R.A. (2004). Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. Stem Cells Dayt. Ohio *22*, 169–179. https://doi.org/10.1634/stemcells.22-2-169.

Clermont, Y., and Leblond, C.P. (1959). Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, Macacus rhesus. Am. J. Anat. *104*, 237–273. https://doi.org/10.1002/aja.1001040204.

Cohn, B.A., Cirillo, P.M., and Christianson, R.E. (2010). Prenatal DDT Exposure and Testicular Cancer: A Nested Case-Control Study. Arch. Environ. Occup. Health *65*, 127–134. https://doi.org/10.1080/19338241003730887.

Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., and Pandolfi, P.P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. Nat. Genet. *36*, 653–659. https://doi.org/10.1038/ng1367.

Craddock, A.L., Love, M.W., Daniel, R.W., Kirby, L.C., Walters, H.C., Wong, M.H., and Dawson, P.A. (1998). Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol. *274*, G157–G169. https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.1.G157.

Craven, P.A., Pfanstiel, J., and DeRubertis, F.R. (1986). Role of reactive oxygen in bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation. J. Clin. Invest. *77*, 850–859. .

Datta, J., Palmer, M.J., Tanton, C., Gibson, L.J., Jones, K.G., Macdowall, W., Glasier, A., Sonnenberg, P., Field, N., Mercer, C.H., et al. (2016). Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. Hum. Reprod. *31*, 2108–2118. https://doi.org/10.1093/humrep/dew123.

Dawson, P.A., Lan, T., and Rao, A. (2009). Bile acid transporters. J. Lipid Res. *50*, 2340–2357. https://doi.org/10.1194/jlr.R900012-JLR200.

De Felici, M., and Dolci, S. (1991). Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. Dev. Biol. *147*, 281–284. https://doi.org/10.1016/S0012-1606(05)80025-9.

De Gendt, K., and Verhoeven, G. (2012). Tissue- and cell-specific functions of the androgen receptor revealed through conditional knockout models in mice. Mol. Cell. Endocrinol. *352*, 13–25. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.008.

De Gendt, K., Swinnen, J.V., Saunders, P.T.K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lécureuil, C., et al. (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 1327–1332. https://doi.org/10.1073/pnas.0308114100.

De Miguel, M.P., De Boer-Brouwer, M., Paniagua, R., van den Hurk, R., De Rooij, D.G., and Van Dissel-Emiliani, F.M. (1996). Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotropic factor

promote the survival of Sertoli cells and gonocytes in coculture system. Endocrinology *137*, 1885–1893. .

De Rooij, D.G., and Russell, L.D. (2000). All You Wanted to Know About Spermatogonia but Were Afraid to Ask. J. Androl. *21*, 776–798. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03408.x.

Dearnaley, D. (2001). Regular review: Managing testicular cancer. BMJ *322*, 1583–1588. https://doi.org/10.1136/bmj.322.7302.1583.

DeFalco, T., Potter, S.J., Williams, A.V., Waller, B., Kan, M.J., and Capel, B. (2015). Macrophages Contribute to the Spermatogonial Niche in the Adult Testis. Cell Rep. *12*, 1107–1119. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.015.

Dehmlow, H., Alvarez Sánchez, R., Bachmann, S., Bissantz, C., Bliss, F., Conde-Knape, K., Graf, M., Martin, R.E., Obst Sander, U., Raab, S., et al. (2013). Discovery and optimisation of 1-hydroxyimino-3,3-diphenylpropanes, a new class of orally active GPBAR1 (TGR5) agonists. Bioorg. Med. Chem. Lett. *23*, 4627–4632. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.017.

Delbès, G., Levacher, C., Pairault, C., Racine, C., Duquenne, C., Krust, A., and Habert, R. (2004). Estrogen Receptor β-Mediated Inhibition of Male Germ Cell Line Development in Mice by Endogenous Estrogens during Perinatal Life. Endocrinology *145*, 3395–3403. https://doi.org/10.1210/en.2003-1479.

Di Vizio, D., Cito, L., Boccia, A., Chieffi, P., Insabato, L., Pettinato, G., Motti, M.L., Schepis, F., D'Amico, W., Fabiani, F., et al. (2005). Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors. Oncogene *24*, 1882–1894. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208368.

Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M., and Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 13612–13617. https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13612.

Ding, L., Sousa, K.M., Jin, L., Dong, B., Kim, B.-W., Ramirez, R., Xiao, Z., Gu, Y., Yang, Q., Wang, J., et al. (2016). Vertical sleeve gastrectomy activates GPBAR-1/TGR5 to sustain weight

loss, improve fatty liver, and remit insulin resistance in mice: Vertical Sleeve Gastrectomy Activates GPBAR-1/TGR5. Hepatology *64*, 760–773. https://doi.org/10.1002/hep.28689.

Ding, N., Zhang, X., Zhang, X.D., Jing, J., Liu, S.S., Mu, Y.P., Peng, L.L., Yan, Y.J., Xiao, G.M., Bi, X.Y., et al. (2020). Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut microbes. Gut *69*, 1608–1619. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319127.

Donnelly, E.T., McClure, N., and Lewis, S.E.M. (2001). Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. Fertil. Steril. *76*, 892–900. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02834-5.

Durazzo, M. (2006). Alterations of seminal and hormonal parameters: An extrahepatic manifestation of HCV infection. World J. Gastroenterol. *12*, 3073. https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i19.3073.

Dym, M., and Cavicchia, J.C. (1978). Functional morphology of the testis. Biol. Reprod. *18*, 1–15. https://doi.org/10.1095/biolreprod18.1.1.

Eacker, S.M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H.L., Gong, E.-Y., Lee, K., and Braun, R.E. (2008). Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *22*, 623–635. https://doi.org/10.1210/me.2006-0534.

Einhorn, L.H., and Donohue, J. (1977). Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. Ann. Intern. Med. *87*, 293–298. https://doi.org/10.7326/0003-4819-87-3-293.

Ene, C.I., Edwards, L., Riddick, G., Baysan, M., Woolard, K., Kotliarova, S., Lai, C., Belova, G., Cam, M., Walling, J., et al. (2012). Histone Demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a Tumor Suppressor by Regulating p53 Protein Nuclear Stabilization. PLoS ONE *7*, e51407. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051407.

Erice, O., Labiano, I., Arbelaiz, A., Santos-Laso, A., Munoz-Garrido, P., Jimenez-Agüero, R., Olaizola, P., Caro-Maldonado, A., Martín-Martín, N., Carracedo, A., et al. (2018). Differential effects of FXR or TGR5 activation in cholangiocarcinoma progression. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. *1864*, 1335–1344. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.08.016.

Erickson-Lawrence, M., Zabludoff, S.D., and Wright, W.W. (1991). Cyclic protein-2, a secretory product of rat Sertoli cells, is the proenzyme form of cathepsin L. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *5*, 1789–1798. https://doi.org/10.1210/mend-5-12-1789.

Eto, K., Shiotsuki, M., Sakai, T., and Abe, S. (2012). Nociceptin is upregulated by FSH signaling in Sertoli cells in murine testes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *421*, 678–683. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.061.

Eto, K., Shiotsuki, M., and Abe, S. (2013). Nociceptin Induces Rec8 Phosphorylation and Meiosis in Postnatal Murine Testes. Endocrinology *154*, 2891–2899. https://doi.org/10.1210/en.2012-1977.

von Eyben, F.E., Skude, G., Fosså, S.D., Klepp, O., and Børmer, O. (1983). Serum lactate dehydrogenase (S-LDH) and S-LDH isoenzymes in patients with testicular germ cell tumors. Mol. Gen. Genet. MGG *189*, 326–333. https://doi.org/10.1007/BF00337825.

Ezeh, U.I., Turek, P.J., Reijo, R.A., and Clark, A.T. (2005). Human embryonic stem cell genesOCT4, NANOG, STELLAR, andGDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. Cancer *104*, 2255–2265. https://doi.org/10.1002/cncr.21432.

Fainberg, J., and Kashanian, J.A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. F1000Research *8*, 670. https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1.

Falany, C.N., Johnson, M.R., Barnes, S., and Diasio, R.B. (1994). Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. J. Biol. Chem. *269*, 19375–19379. .

Farhana, L., Nangia-Makker, P., Arbit, E., Shango, K., Sarkar, S., Mahmud, H., Hadden, T., Yu, Y., and Majumdar, A.P.N. (2016). Bile acid: a potential inducer of colon cancer stem cells. Stem Cell Res. Ther. *7*. https://doi.org/10.1186/s13287-016-0439-4.

Feng, X., Wu, Y., Zhang, J., Li, J., Zhu, G., Fan, D., Yang, C., and Zhao, L. (2020). Busulfan systemic exposure and its relationship with efficacy and safety in hematopoietic stem cell transplantation in children: a meta-analysis. BMC Pediatr. *20*, 176. https://doi.org/10.1186/s12887-020-02028-6.

Ferlin, A., Arredi, B., and Foresta, C. (2006). Genetic causes of male infertility. Reprod. Toxicol. *22*, 133–141. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.04.016.

Ferlin, A., Dipresa, S., Delbarba, A., Maffezzoni, F., Porcelli, T., Cappelli, C., and Foresta, C. (2019). Contemporary genetics-based diagnostics of male infertility. Expert Rev. Mol. Diagn. *19*, 623–633. https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1633917.

Fernandez-Garcia, I., Ortiz-de-Solorzano, C., and Montuenga, L.M. (2008). Telomeres and Telomerase in Lung Cancer. J. Thorac. Oncol. *3*, 1085–1088. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181886713.

Fijak, M., Bhushan, S., and Meinhardt, A. (2011). Immunoprivileged sites: the testis. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *677*, 459–470. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0_29.

Fix, C., Jordan, C., Cano, P., and Walker, W.H. (2004). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 10919–10924. https://doi.org/10.1073/pnas.0404278101.

Foord, S.M., Bonner, T.I., Neubig, R.R., Rosser, E.M., Pin, J.-P., Davenport, A.P., Spedding, M., and Harmar, A.J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVI. G Protein-Coupled Receptor List. Pharmacol. Rev. *57*, 279–288. https://doi.org/10.1124/pr.57.2.5.

Forman, D., and Møller, H. (1994). Testicular cancer. Cancer Surv. *19–20*, 323–341. .

Francavilla, F., Santucci, R., Barbonetti, A., and Francavilla, S. (2007). Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *12*, 2890–2911. https://doi.org/10.2741/2280.

Franco, R., Boscia, F., Gigantino, V., Marra, L., Esposito, F., Ferrara, D., Pariante, P., Botti, G., Caraglia, M., Minucci, S., et al. (2011). GPR30 is overexpressed in post-puberal testicular germ cell tumors. Cancer Biol. Ther. *11*, 609–613. https://doi.org/10.4161/cbt.11.6.14672.

Gannon, J.R., Emery, B.R., Jenkins, T.G., and Carrell, D.T. (2014). The Sperm Epigenome: Implications for the Embryo. In Genetic Damage in Human Spermatozoa, E. Baldi, and M. Muratori, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 53–66.

Gao, Y., Mruk, D.D., Lui, W., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2016). F5-peptide induces aspermatogenesis by disrupting organization of actin- and microtubule-based cytoskeletons in the testis. Oncotarget *7*, 64203–64220. https://doi.org/10.18632/oncotarget.11887.

Garbuzov, A., Pech, M.F., Hasegawa, K., Sukhwani, M., Zhang, R.J., Orwig, K.E., and Artandi, S.E. (2018). Purification of GFRα1+ and GFRα1– Spermatogonial Stem Cells Reveals a Niche-Dependent Mechanism for Fate Determination. Stem Cell Rep. *10*, 553–567. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.009.

Garcia, T.X., and Hofmann, M.-C. (2013). NOTCH signaling in Sertoli cells regulates gonocyte fate. Cell Cycle *12*, 2538–2545. https://doi.org/10.4161/cc.25627.

Gassei, K., and Orwig, K.E. (2013). SALL4 Expression in Gonocytes and Spermatogonial Clones of Postnatal Mouse Testes. PLoS ONE *8*, e53976. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053976.

Geddes, M., Kangarloo, S.B., Naveed, F., Quinlan, D., Chaudhry, M.A., Stewart, D., Savoie, M.L., Bahlis, N.J., Brown, C., Storek, J., et al. (2008). High Busulfan Exposure Is Associated with Worse Outcomes in a Daily i.v. Busulfan and Fludarabine Allogeneic Transplant Regimen. Biol. Blood Marrow Transplant. *14*, 220–228. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2007.10.028.

Geens, M., De Block, G., Goossens, E., Frederickx, V., Van Steirteghem, A., and Tournaye, H. (2006). Spermatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice. Hum. Reprod. *21*, 390–396. https://doi.org/10.1093/humrep/dei412.

van de Geijn, G.-J.M., Hersmus, R., and Looijenga, L.H.J. (2009). Recent developments in testicular germ cell tumor research. Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev. *87*, 96–113. https://doi.org/10.1002/bdrc.20140.

Gérard, N., Syed, V., and Jégou, B. (1992). Lipopolysaccharide, latex beads and residual bodies are potent activators of Sertoli cell interleukin-1 alpha production. Biochem. Biophys. Res. Commun. *185*, 154–161. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)80969-6.

Giannandrea, F., Gandini, L., Paoli, D., Turci, R., and Figà-Talamanca, I. (2011). Pesticide exposure and serum organochlorine residuals among testicular cancer patients and healthy controls. J. Environ. Sci. Health B *46*, 780–787. https://doi.org/10.1080/03601234.2012.597704.

Gilbert, D., Chandler, I., McIntyre, A., Goddard, N., Gabe, R., Huddart, R., and Shipley, J. (2009). Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents. J. Pathol. *217*, 94–102. https://doi.org/10.1002/path.2436.

Giwercman, A., and Petersen, P.M. (2000). Cancer and male infertility. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *14*, 453–471. https://doi.org/10.1053/beem.2000.0091.

Godet, M., Sabido, O., Gilleron, J., and Durand, P. (2008). Meiotic progression of rat spermatocytes requires mitogen-activated protein kinases of Sertoli cells and close contacts between the germ cells and the Sertoli cells. Dev. Biol. *315*, 173–188. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.12.019.

Godin, I., Deed, R., Cooke, J., Zsebo, K., Dexter, M., and Wylie, C.C. (1991). Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. Nature *352*, 807–809. https://doi.org/10.1038/352807a0.

Grasso, M., Fuso, A., Dovere, L., de Rooij, D.G., Stefanini, M., Boitani, C., and Vicini, E. (2012). Distribution of GFRA1-expressing spermatogonia in adult mouse testis. REPRODUCTION *143*, 325–332. https://doi.org/10.1530/REP-11-0385.

Green, D.M., Kawashima, T., Stovall, M., Leisenring, W., Sklar, C.A., Mertens, A.C., Donaldson, S.S., Byrne, J., and Robison, L.L. (2010). Fertility of Male Survivors of Childhood Cancer: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. J. Clin. Oncol. *28*, 332–339. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.9037.

Griswold, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Semin. Cell Dev. Biol. *9*, 411–416. https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0203.

Grootegoed, J.A., Jansen, R., and Van der Molen, H.J. (1984). The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP production by rat spermatocytes and spermatids. Biochim. Biophys. Acta *767*, 248–256. https://doi.org/10.1016/0005-2728(84)90194-4.

Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., et al. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature *440*, 1199–1203. https://doi.org/10.1038/nature04697.

Guo, G.-Q.G.-Q., and Zheng, G.-C.G.-C. (2004). Hypotheses for the functions of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms. J. Theor. Biol. *229*, 139–146. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.03.010.

Guo, C., Qi, H., Yu, Y., Zhang, Q., Su, J., Yu, D., Huang, W., Chen, W.-D., and Wang, Y.-D. (2015). The G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor Gpbar1 (TGR5) Inhibits Gastric

Inflammation Through Antagonizing NF-κB Signaling Pathway. Front. Pharmacol. *6*. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00287.

Gutekunst, M., Oren, M., Weilbacher, A., Dengler, M.A., Markwardt, C., Thomale, J., Aulitzky, W.E., and van der Kuip, H. (2011). p53 Hypersensitivity Is the Predominant Mechanism of the Unique Responsiveness of Testicular Germ Cell Tumor (TGCT) Cells to Cisplatin. PLoS ONE *6*, e19198. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019198.

Gutekunst, M., Mueller, T., Weilbacher, A., Dengler, M.A., Bedke, J., Kruck, S., Oren, M., Aulitzky, W.E., and van der Kuip, H. (2013). Cisplatin Hypersensitivity of Testicular Germ Cell Tumors Is Determined by High Constitutive Noxa Levels Mediated by Oct-4. Cancer Res. *73*, 1460–1469. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2876.

Haeusler, R.A., Astiarraga, B., Camastra, S., Accili, D., and Ferrannini, E. Human Insulin Resistance Is Associated With Increased Plasma Levels of 12a-Hydroxylated Bile Acids. 8. .

Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na+/bile acid cotransporter. J. Clin. Invest. *93*, 1326–1331. https://doi.org/10.1172/JCI117091.

Han, M.-H., Park, S.-W., Do, H.-J., Chung, H.-J., Song, H., Kim, J.-H., Kim, N.-H., Park, K.-H., and Kim, J.-H. (2016). Growth and Differentiation Factor 3 Is Transcriptionally Regulated by OCT4 in Human Embryonic Carcinoma Cells. Biol. Pharm. Bull. *39*, 1802–1808. https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00299.

Hara, K., Nakagawa, T., Enomoto, H., Suzuki, M., Yamamoto, M., Simons, B.D., and Yoshida, S. (2014). Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. Cell Stem Cell *14*, 658–672. https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.019.

Harach, T., Pols, T.W.H., Nomura, M., Maida, A., Watanabe, M., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2012). TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. Sci. Rep. *2*, 430. https://doi.org/10.1038/srep00430.

Hardell, L., Bavel, B., Lindstrom, G., Eriksson, M., and Carlberg, M. (2006). In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. Int. J. Androl. *29*, 228–234. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00622.x.

Heaney, J.D., Lam, M.-Y.J., Michelson, M.V., and Nadeau, J.H. (2008). Loss of the Transmembrane but not the Soluble Kit Ligand Isoform Increases Testicular Germ Cell Tumor Susceptibility in Mice. Cancer Res. *68*, 5193–5197. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0779.

van der Heijden, G.W., Derijck, A.A.H.A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. Dev. Biol. *298*, 458–469. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.051.

Hentrich, M., and Pfister, D. (2017). HIV-Associated Urogenital Malignancies. Oncol. Res. Treat. *40*, 106–112. https://doi.org/10.1159/000457130.

Hess, R.A., and Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Adv. Exp. Med. Biol. *636*, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1.

Hobbs, R.M., Fagoonee, S., Papa, A., Webster, K., Altruda, F., Nishinakamura, R., Chai, L., and Pandolfi, P.P. (2012). Functional antagonism between Sall4 and Plzf define germline progenitors. Cell Stem Cell *10*, 284–298. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.004.

Hoei-Hansen, C.E., Almstrup, K., Nielsen, J.E., Brask Sonne, S., Graem, N., Skakkebaek, N.E., Leffers, H., and Rajpert-De Meyts, E. (2005). Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. Histopathology *47*, 48–56. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02182.x.

Hofmann, A.F. (1999). Bile acids: the good, the bad, and the ugly. Physiology *14*, 24–29. .

Hofmann, M.-C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. Mol. Cell. Endocrinol. *288*, 95–103. https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.012.

Hofny, E.R.M., Ali, M.E.M., Taha, E.A., Nafeh, H.M., Samir Sayed, D., Abdel-Azeem, H.G., Abdou, E.F., Kamal, G.M., and Mostafa, T. (2011). Semen and hormonal parameters in men with chronic hepatitis C infection. Fertil. Steril. *95*, 2557–2559. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.014.

Holdcraft, R.W., and Braun, R.E. (2004). Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. Dev. Camb. Engl. *131*, 459–467. https://doi.org/10.1242/dev.00957.

Holzik, M.F.L., Rapley, E., Hoekstra, H., Sleijfer, D., Nolte, I., and Sijmons, R. (2004). Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. Lancet Oncol. *5*, 363–371. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01493-7.

Hong, J., Behar, J., Wands, J., Resnick, M., Wang, L.J., DeLellis, R.A., Lambeth, D., Souza, R.F., Spechler, S.J., and Cao, W. (2010). Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma. Gut *59*, 170–180. https://doi.org/10.1136/gut.2009.188375.

Horvath, A., Korde, L., Greene, M.H., Libe, R., Osorio, P., Faucz, F.R., Raffin-Sanson, M.L., Tsang, K.M., Drori-Herishanu, L., Patronas, Y., et al. (2009). Functional Phosphodiesterase 11A Mutations May Modify the Risk of Familial and Bilateral Testicular Germ Cell Tumors. Cancer Res. *69*, 5301–5306. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0884.

Hov, J.R., Keitel, V., Laerdahl, J.K., Spomer, L., Ellinghaus, E., ElSharawy, A., Melum, E., Boberg, K.M., Manke, T., Balschun, T., et al. (2010). Mutational Characterization of the Bile Acid Receptor TGR5 in Primary Sclerosing Cholangitis. PLoS ONE *5*, e12403. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012403.

Hov, J.R., Keitel, V., Schrumpf, E., Häussinger, D., and Karlsen, T.H. (2011). TGR5 Sequence Variation in Primary Sclerosing Cholangitis. Dig. Dis. *29*, 78–84. https://doi.org/10.1159/000324138.

Hsueh, A.J., Dahl, K.D., Vaughan, J., Tucker, E., Rivier, J., Bardin, C.W., and Vale, W. (1987). Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. *84*, 5082–5086. https://doi.org/10.1073/pnas.84.14.5082.

Huang, Y., Yang, W., Liu, H., Duan, J., Zhang, Y., Liu, M., Li, H., Hou, Z., and Wu, K.K. (2012). Effect of high-dose methotrexate chemotherapy on intestinal Bifidobacteria, Lactobacillus and Escherichia coli in children with acute lymphoblastic leukemia. Exp. Biol. Med. Maywood NJ *237*, 305–311. https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011297.

Huang, Y.-H., Chin, C.-C., Ho, H.-N., Chou, C.-K., Shen, C.-N., Kuo, H.-C., Wu, T.-J., Wu, Y.-C., Hung, Y.-C., Chang, C.-C., et al. (2009). Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by IGF-1- dependent pathway. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *23*, 2076–2087. https://doi.org/10.1096/fj.08-121939.

Huhtaniemi, I.T., Tajar, A., Lee, D.M., O'Neill, T.W., Finn, J.D., Bartfai, G., Boonen, S., Casanueva, F.F., Giwercman, A., Han, T.S., et al. (2012). Comparison of serum testosterone and estradiol measurements in 3174 European men using platform immunoassay and mass spectrometry; relevance for the diagnostics in aging men. Eur. J. Endocrinol. *166*, 983–991. https://doi.org/10.1530/EJE-11-1051.

Humbert, L., Maubert, M.A., Wolf, C., Duboc, H., Mahé, M., Farabos, D., Seksik, P., Mallet, J.M., Trugnan, G., Masliah, J., et al. (2012). Bile acid profiling in human biological samples: comparison of extraction procedures and application to normal and cholestatic patients. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. *899*, 135–145. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.015.

Ibrahim, E., Diakonov, I., Arunthavarajah, D., Swift, T., Goodwin, M., McIlvride, S., Nikolova, V., Williamson, C., and Gorelik, J. (2018). Bile acids and their respective conjugates elicit different responses in neonatal cardiomyocytes: role of Gi protein, muscarinic receptors and TGR5. Sci. Rep. *8*, 7110. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25569-4.

Ichikawa, R., Takayama, T., Yoneno, K., Kamada, N., Kitazume, M.T., Higuchi, H., Matsuoka, K., Watanabe, M., Itoh, H., Kanai, T., et al. (2012). Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway: Bile acids regulate dendritic cell differentiation. Immunology *136*, 153–162. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03554.x.

Ikegami, T., Matsuzaki, Y., Al Rashid, M., Ceryak, S., Zhang, Y., and Bouscarel, B. (2006). Enhancement of DNA topoisomerase I inhibitor–induced apoptosis by ursodeoxycholic acid. Mol. Cancer Ther. *5*, 68–79. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0107.

Ishibashi, S., Schwarz, M., Frykman, P.K., Herz, J., and Russell, D.W. (1996). Disruption of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. J. Biol. Chem. *271*, 18017–18023. https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.18017.

Iwamoto, T., Hiraku, Y., Oikawa, S., Mizutani, H., Kojima, M., and Kawanishi, S. (2004). DNA intrastrand cross-link at the 5′-GA-3′ sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. Cancer Sci. *95*, 454–458. .

Jackson, J.H. (1994). Potential molecular mechanisms of oxidant-induced carcinogenesis. Environ. Health Perspect. *102*, 155–157. .

Jacobsen, G.K. (1986). Histogenetic considerations concerning germ cell tumours: Morphological and immunohistochemical comparative investigation of the human embryo and testicular germ cell tumours. Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol. *408*, 509–525. https://doi.org/10.1007/BF00705305.

Jazrawi, R.P., Pazzi, P., Petroni, M.L., Prandini, N., Paul, C., Adam, J.A., Gullini, S., and Northfield, T.C. (1995). Postprandial gallbladder motor function: refilling and turnover of bile in health and in cholelithiasis. Gastroenterology *109*, 582–591. https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90348-8.

Jégou, B. (1995). La cellule de Sertoli: actualisation du concept de cellule nourricière. MS Médecine Sci. Rev. Pap. ISSN 0767-0974 1995 Vol 11 N° 4 P519-27 https://doi.org/10.4267/10608/2241.

Ji, H., Miao, M., Liang, H., Shi, H., Ruan, D., Li, Y., Wang, J., and Yuan, W. (2018). Exposure of environmental Bisphenol A in relation to routine sperm parameters and sperm movement characteristics among fertile men. Sci. Rep. *8*. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35787-5.

Johnson, D.H., Linde, R., Hainsworth, J.D., Vale, W., Rivier, J., Stein, R., Flexner, J., Van Welch, R., and Greco, F.A. (1985). Effect of a luteinizing hormone releasing hormone agonist given during combination chemotherapy on posttherapy fertility in male patients with lymphoma: preliminary observations. Blood *65*, 832–836. .

Juliachs, M., Muñoz, C., Moutinho, C.A., Vidal, A., Condom, E., Esteller, M., Graupera, M., Casanovas, O., Germà, J.R., Villanueva, A., et al. (2014). The PDGFRβ–AKT Pathway Contributes to CDDP-Acquired Resistance in Testicular Germ Cell Tumors. Clin. Cancer Res. *20*, 658–667. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1131.

Jutte, N.H., Grootegoed, J.A., Rommerts, F.F., and van der Molen, H.J. (1981). Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. J. Reprod. Fertil. *62*, 399–405. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0620399.

Kahn, B.E., and Brannigan, R.E. (2017). Obesity and male infertility. Curr. Opin. Urol. *27*, 441–445. https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000417.

Kamischke, A., Kuhlmann, M., Weinbauer, G., Luetjens, M., Yeung, C., Kronholz, H., and Nieschlag, E. (2003). Gonadal protection from radiation by GnRH antagonist or recombinant

human FSH: a controlled trial in a male nonhuman primate (Macaca fascicularis). J. Endocrinol. *179*, 183–194. https://doi.org/10.1677/joe.0.1790183.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Iwano, T., Lee, J., Kazuki, Y., Inoue, K., Miki, H., Takehashi, M., Toyokuni, S., Shinkai, Y., et al. (2005). Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. Dev. Camb. Engl. *132*, 4155–4163. https://doi.org/10.1242/dev.02004.

Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M., Takashima, S., Lee, J., Morimoto, H., Chuma, S., Raducanu, A., Nakatsuji, N., Fässler, R., and Shinohara, T. (2008). Homing of Mouse Spermatogonial Stem Cells to Germline Niche Depends on β1-Integrin. Cell Stem Cell *3*, 533–542. https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.002.

Kang, C.H., Jang, B.G., Kim, D.-W., Chung, D.H., Kim, Y.T., Jheon, S., Sung, S.-W., and Kim, J.H. (2010). The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and βIII-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum- and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection. Lung Cancer *68*, 478–483. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.07.004.

Katsuma, S., Hirasawa, A., and Tsujimoto, G. (2005). Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. *329*, 386–390. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.139.

Kaucher, A.V., Oatley, M.J., and Oatley, J.M. (2012). NEUROG3 Is a Critical Downstream Effector for STAT3-Regulated Differentiation of Mammalian Stem and Progenitor Spermatogonia1. Biol. Reprod. *86*. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097386.

Kawamata, Y. (2003). A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids. J. Biol. Chem. *278*, 9435–9440. https://doi.org/10.1074/jbc.M209706200.

Keitel, V., and Häussinger, D. (2011). TGR5 in the Biliary Tree. Dig. Dis. *29*, 45–47. https://doi.org/10.1159/000324127.

Keitel, V., Reinehr, R., Gatsios, P., Rupprecht, C., Görg, B., Selbach, O., Häussinger, D., and Kubitz, R. (2007). The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. Hepatology *45*, 695–704. https://doi.org/10.1002/hep.21458.

Keitel, V., Donner, M., Winandy, S., Kubitz, R., and Häussinger, D. (2008). Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *372*, 78–84. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.171.

Keitel, V., Ullmer, C., and Häussinger, D. (2010a). The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes. Biol. Chem. *391*, 785–789. https://doi.org/10.1515/BC.2010.077.

Keitel, V., Görg, B., Bidmon, H.J., Zemtsova, I., Spomer, L., Zilles, K., and Häussinger, D. (2010b). The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain. Glia *58*, 1794–1805. https://doi.org/10.1002/glia.21049.

Keitel, V., Reich, M., and Häussinger, D. (2015). TGR5: Pathogenetic Role and/or Therapeutic Target in Fibrosing Cholangitis? Clin. Rev. Allergy Immunol. *48*, 218–225. https://doi.org/10.1007/s12016-014-8443-x.

Keitel, V., Stindt, J., and Häussinger, D. (2019). Bile Acid-Activated Receptors: GPBAR1 (TGR5) and Other G Protein-Coupled Receptors. In Bile Acids and Their Receptors, S. Fiorucci, and E. Distrutti, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 19–49.

Kerr, J.B., and de Kretser, D.M. (1974). Proceedings: The role of the Sertoli cell in phagocytosis of the residual bodies of spermatids. J. Reprod. Fertil. *36*, 439–440. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0360439.

Kersemaekers, A.-M.F., Mayer, F., Molier, M., van Weeren, P.C., Oosterhuis, J.W., Bokemeyer, C., and Looijenga, L.H.J. (2002). Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *20*, 1551–1561. https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.6.1551.

Kiani, S., Valizadeh, B., Hormazdi, B., Samadi, H., Najafi, T., Samini, M., and Dehpour, A.R. (2009). Alteration in male reproductive system in experimental cholestasis: Roles for opioids and nitric oxide overproduction. Eur. J. Pharmacol. *615*, 246–251. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.04.049.

Kim, S., Chun, H., Choi, H., Kim, E., Keum, B., Seo, Y., Jeen, Y., Lee, H., Um, S., and Kim, C. (2018). Ursodeoxycholic acid attenuates 5-fluorouracil-induced mucositis in a rat model. Oncol. Lett. https://doi.org/10.3892/ol.2018.8893.

Kimura, T., Suzuki, A., Fujita, Y., Yomogida, K., Lomeli, H., Asada, N., Ikeuchi, M., Nagy, A., Mak, T.W., and Nakano, T. (2003). Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. Development *130*, 1691–1700. https://doi.org/10.1242/dev.00392.

Kinkead, T., Flores, C., Carboni, A.A., Menon, M., and Seethalakshmi, L. (1992). Short term effects of cis-platinum on male reproduction, fertility and pregnancy outcome. J. Urol. *147*, 201–206. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)37197-5.

Kitadate, Y., Jörg, D.J., Tokue, M., Maruyama, A., Ichikawa, R., Tsuchiya, S., Segi-Nishida, E., Nakagawa, T., Uchida, A., Kimura-Yoshida, C., et al. (2019). Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche. Cell Stem Cell *24*, 79-92.e6. https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.013.

Koga, F., Yoshida, S., Tatokoro, M., Kawakami, S., Fujii, Y., Kumagai, J., Neckers, L., and Kihara, K. (2011). ErbB2 and NFκB Overexpression as Predictors of Chemoradiation Resistance and Putative Targets to Overcome Resistance in Muscle-Invasive Bladder Cancer. PLoS ONE *6*, e27616. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027616.

Kokkinaki, M., Lee, T.-L., He, Z., Jiang, J., Golestaneh, N., Hofmann, M.-C., Chan, W.-Y., and Dym, M. (2009). The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. Biol. Reprod. *80*, 707–717. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073809.

Korkola, J.E., Houldsworth, J., Chadalavada, R.S.V., Olshen, A.B., Dobrzynski, D., Reuter, V.E., Bosl, G.J., and Chaganti, R.S.K. (2006). Down-Regulation of Stem Cell Genes, Including Those in a 200-kb Gene Cluster at 12p13.31, Is Associated with *In vivo* Differentiation of Human Male Germ Cell Tumors. Cancer Res. *66*, 820–827. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2445.

Kortesidis, A. (2005). Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. Blood *105*, 3793–3801. https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4349.

Koster, R., di Pietro, A., Timmer-Bosscha, H., Gibcus, J.H., van den Berg, A., Suurmeijer, A.J., Bischoff, R., Gietema, J.A., and de Jong, S. (2010). Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. J. Clin. Invest. *120*, 3594–3605. https://doi.org/10.1172/JCI41939.

Koster, R., Timmer-Bosscha, H., Bischoff, R., Gietema, J.A., and de Jong, S. (2011). Disruption of the MDM2–p53 interaction strongly potentiates p53-dependent apoptosis in cisplatin-resistant human testicular carcinoma cells via the Fas/FasL pathway. Cell Death Dis. *2*, e148–e148. https://doi.org/10.1038/cddis.2011.33.

Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., and Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 2474–2479. https://doi.org/10.1073/pnas.0510813103.

Kratz, C.P., Han, S.S., Rosenberg, P.S., Berndt, S.I., Burdett, L., Yeager, M., Korde, L.A., Mai, P.L., Pfeiffer, R., and Greene, M.H. (2011). Variants in or near KITLG, BAK1, DMRT1, and TERT-CLPTM1L predispose to familial testicular germ cell tumour. J. Med. Genet. *48*, 473–476. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100001.

Krentz, A.D., Murphy, M.W., Kim, S., Cook, M.S., Capel, B., Zhu, R., Matin, A., Sarver, A.L., Parker, K.L., Griswold, M.D., et al. (2009). The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 22323–22328. https://doi.org/10.1073/pnas.0905431106.

Krishnamurthy, H., Kumar, K.M., Joshi, C.V., Krishnamurthy, H.N., Moudgal, R.N., and Sairam, M.R. (2000). Alterations in sperm characteristics of follicle-stimulating hormone (FSH)-immunized men are similar to those of FSH-deprived infertile male bonnet monkeys. J. Androl. *21*, 316–327. .

Kristensen, D.M., Nielsen, J.E., Skakkebaek, N.E., Graem, N., Jacobsen, G.K., Meyts, E.R.-D., and Leffers, H. (2008). Presumed pluripotency markers UTF-1 and REX-1 are expressed in human adult testes and germ cell neoplasms. Hum. Reprod. *23*, 775–782. https://doi.org/10.1093/humrep/den010.

Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2003). Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *100*, 6487–6492. https://doi.org/10.1073/pnas.0631767100.

Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 16489–16494. https://doi.org/10.1073/pnas.0407063101.

Kumar, D.P., Rajagopal, S., Mahavadi, S., Mirshahi, F., Grider, J.R., Murthy, K.S., and Sanyal, A.J. (2012). Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *427*, 600–605. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.104.

Kumar, D.P., Asgharpour, A., Mirshahi, F., Park, S.H., Liu, S., Imai, Y., Nadler, J.L., Grider, J.R., Murthy, K.S., and Sanyal, A.J. (2016). Activation of Transmembrane Bile Acid Receptor TGR5 Modulates Pancreatic Islet α Cells to Promote Glucose Homeostasis. J. Biol. Chem. *291*, 6626–6640. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.699504.

Kuzmits, R., Schernthaner, G., and Krisch, K. (1987). Serum neuron-specific enolase. A marker for responses to therapy in seminoma. Cancer *60*, 1017–1021. https://doi.org/10.1002/1097-0142(19870901)60:5<1017::aid-cncr2820600516>3.0.co;2-d.

Lajer, H., Daugaard, G., Andersson, A.-M., and Skakkebaek, N.E. (2002). Clinical use of serum TRA-1-60 as tumor marker in patients with germ cell cancer: TRA-1-60 Tumor Marker in Germ Cell Cancer. Int. J. Cancer *100*, 244–246. https://doi.org/10.1002/ijc.10459.

Lake, A.D., Novak, P., Shipkova, P., Aranibar, N., Robertson, D., Reily, M.D., Lu, Z., Lehman-McKeeman, L.D., and Cherrington, N.J. (2013). Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. Toxicol. Appl. Pharmacol. *268*, 132–140. https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.022.

Lamberti, D., and Vicini, E. (2014). Promoter analysis of the gene encoding GDNF in murine Sertoli cells. Mol. Cell. Endocrinol. *394*, 105–114. https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.006.

Lange, P.H., McIntire, K.R., Waldmann, T.A., Hakala, T.R., and Fraley, E.E. (1976). Serum alpha fetoprotein and human chorionic gonadotropin in the diagnosis and management of nonseminomatous germ-cell testicular cancer. N. Engl. J. Med. *295*, 1237–1240. https://doi.org/10.1056/NEJM197611252952207.

Lavoie, B., Balemba, O.B., Godfrey, C., Watson, C.A., Vassileva, G., Corvera, C.U., Nelson, M.T., and Mawe, G.M. (2010). Hydrophobic bile salts inhibit gallbladder smooth muscle function via stimulation of GPBAR1 receptors and activation of K_{ATP} channels: GPBAR1 receptor activation in gallbladder smooth muscle. J. Physiol. *588*, 3295–3305. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.192146.

Law, G.L., and Griswold, M.D. (1994). Activity and form of sulfated glycoprotein 2 (clusterin) from cultured Sertoli cells, testis, and epididymis of the rat. Biol. Reprod. *50*, 669–679. https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.669.

Layman, L.C., and McDonough, P.G. (2000). Mutations of follicle stimulating hormone-beta and its receptor in human and mouse: genotype/phenotype. Mol. Cell. Endocrinol. *161*, 9–17. https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00217-8.

Leduc, F., Maquennehan, V., Nkoma, G.B., and Boissonneault, G. (2008). DNA Damage Response During Chromatin Remodeling in Elongating Spermatids of Mice1. Biol. Reprod. *78*, 324–332. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064162.

Lee, C., Jeong, S., Jang, C., Bae, H., Kim, Y.H., Park, I., Kim, S.K., and Koh, G.Y. (2019). Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation. Science *363*, 644–649. https://doi.org/10.1126/science.aav0173.

Lee, J., Iwai, T., Yokota, T., and Yamashita, M. (2003). Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. J. Cell Sci. *116*, 2781–2790. https://doi.org/10.1242/jcs.00495.

Levi, M., Hasky, N., Stemmer, S.M., Shalgi, R., and Ben-Aharon, I. (2015). Anti-Müllerian Hormone Is a Marker for Chemotherapy-Induced Testicular Toxicity. Endocrinology *156*, 3818–3827. https://doi.org/10.1210/en.2015-1310.

Levi, M., Popovtzer, A., Tzabari, M., Mizrachi, A., Savion, N., Stemmer, S.M., Shalgi, R., and Ben-Aharon, I. (2016). Cetuximab intensifies cisplatin-induced testicular toxicity. Reprod. Biomed. Online *33*, 102–110. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.04.004.

Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., and Swan, S.H. (2017). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. Hum. Reprod. Update *23*, 646–659. https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022.

Li, D., and Cao, W. (2016). Bile acid receptor TGR5, NADPH Oxidase NOX5-S and CREB Mediate Bile Acid-Induced DNA Damage In Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells. Sci. Rep. *6*, 31538. https://doi.org/10.1038/srep31538.

Li, B., He, X., Zhuang, M., Niu, B., Wu, C., Mu, H., Tang, F., Cui, Y., Liu, W., Zhao, B., et al. (2018a). Melatonin Ameliorates Busulfan-Induced Spermatogonial Stem Cell Oxidative

Apoptosis in Mouse Testes. Antioxid. Redox Signal. *28*, 385–400. https://doi.org/10.1089/ars.2016.6792.

Li, H., Papadopoulos, V., Vidic, B., Dym, M., and Culty, M. (1997). Regulation of Rat Testis Gonocyte Proliferation by Platelet-Derived Growth Factor and Estradiol: Identification of Signaling Mechanisms Involved. *138*, 10. .

Li, J.-Y., Pu, M.-T., Hirasawa, R., Li, B.-Z., Huang, Y.-N., Zeng, R., Jing, N.-H., Chen, T., Li, E., Sasaki, H., et al. (2007). Synergistic Function of DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the Methylation of *Oct4* and *Nanog*. Mol. Cell. Biol. *27*, 8748–8759. https://doi.org/10.1128/MCB.01380-07.

Li, M.W.M., Mruk, D.D., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2009). Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging concept of regulation. Cytokine Growth Factor Rev. *20*, 329–338. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.07.007.

Li, Q., Zhang, L., Zu, Y., Liu, T., Zhang, B., and He, W. (2013). Generation of reactive oxygen species by a novel berberine–bile acid analog mediates apoptosis in hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *433*, 432–437. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.104.

Li, T., Holmstrom, S.R., Kir, S., Umetani, M., Schmidt, D.R., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2011). The G Protein-Coupled Bile Acid Receptor, TGR5, Stimulates Gallbladder Filling. Mol. Endocrinol. *25*, 1066–1071. https://doi.org/10.1210/me.2010-0460.

Li, Z., Huang, J., Wang, F., Li, W., Wu, X., Zhao, C., Zhao, J., Wei, H., Wu, Z., Qian, M., et al. (2018b). Dual Targeting of Bile Acid Receptor-1 (TGR5) and Farnesoid X Receptor (FXR) Prevents Estrogen-Dependent Bone Loss in Mice. J. Bone Miner. Res. jbmr.3652. https://doi.org/10.1002/jbmr.3652.

Lin, T., Calkins, J.H., Morris, P.L., Vale, W., and Bardin, C.W. (1989). Regulation of Leydig Cell Function in Primary Culture by Inhibin and Activin*. Endocrinology *125*, 2134–2140. https://doi.org/10.1210/endo-125-4-2134.

Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., and Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. Nat. Cell Biol. *7*, 165–171. https://doi.org/10.1038/ncb1211.

Liu, X., Chen, B., You, W., Xue, S., Qin, H., and Jiang, H. (2018). The membrane bile acid receptor TGR5 drives cell growth and migration via activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway in non-small cell lung cancer. Cancer Lett. *412*, 194–207. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.017.

Lolicato, F., Marino, R., Paronetto, M.P., Pellegrini, M., Dolci, S., Geremia, R., and Grimaldi, P. (2008). Potential role of Nanos3 in maintaining the undifferentiated spermatogonia population. Dev. Biol. *313*, 725–738. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.011.

Lopes, F., Tholeti, P., Adiga, S.K., Anderson, R.A., Mitchell, R.T., and Spears, N. (2020). Chemotherapy induced damage to spermatogonial stem cells in prepubertal mouse in vitro impairs long-term spermatogenesis. Toxicol. Rep. *8*, 114–123. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.12.023.

Loveday, C., Litchfield, K., Proszek, P.Z., Cornish, A.J., Santo, F., Levy, M., Macintyre, G., Holryod, A., Broderick, P., Dudakia, D., et al. (2020). Genomic landscape of platinum resistant and sensitive testicular cancers. Nat. Commun. *11*, 2189. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15768-x.

Lu, D., Rauhauser, A., Li, B., Ren, C., McEnery, K., Zhu, J., Chaki, M., Vadnagara, K., Elhadi, S., Jetten, A.M., et al. (2016). Loss of Glis2/NPHP7 causes kidney epithelial cell senescence and suppresses cyst growth in the Kif3a mouse model of cystic kidney disease. Kidney Int. *89*, 1307–1323. https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.006.

Luu, T.H., Bard, J.-M., Carbonnelle, D., Chaillou, C., Huvelin, J.-M., Bobin-Dubigeon, C., and Nazih, H. (2018). Lithocholic bile acid inhibits lipogenesis and induces apoptosis in breast cancer cells. Cell. Oncol. Dordr. *41*, 13–24. https://doi.org/10.1007/s13402-017-0353-5.

Lyu, D., Tang, N., Wang, J., Zhang, Y., Chang, J., Liu, Z., and Liu, H. (2019). TGR5 agonist INT-777 mitigates inflammatory response in human endometriotic stromal cells: A therapeutic implication for endometriosis. Int. Immunopharmacol. *71*, 93–99. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.044.

Mäkelä, J.-A., and Toppari, J. (2018). Spermatogenic Cell Syncytium. In Encyclopedia of Reproduction, (Elsevier), pp. 124–133.

Makishima, M. (2002). Vitamin D Receptor As an Intestinal Bile Acid Sensor. Science *296*, 1313–1316. https://doi.org/10.1126/science.1070477.

Mališová, L., Kováčová, Z., Koc, M., Kračmerová, J., Štich, V., and Rossmeislová, L. (2013). Ursodeoxycholic Acid but Not Tauroursodeoxycholic Acid Inhibits Proliferation and Differentiation of Human Subcutaneous Adipocytes. PLoS ONE *8*, e82086. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082086.

Marchetti, C., Hamdane, M., Mitchell, V., Mayo, K., Devisme, L., Rigot, J.M., Beauvillain, J.C., Hermand, E., and Defossez, A. (2003). Immunolocalization of inhibin and activin alpha and betaB subunits and expression of corresponding messenger RNAs in the human adult testis. Biol. Reprod. *68*, 230–235. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004424.

Marciani, L., Cox, E.F., Hoad, C.L., Totman, J.J., Costigan, C., Singh, G., Shepherd, V., Chalkley, L., Robinson, M., Ison, R., et al. (2013). Effects of various food ingredients on gall bladder emptying. Eur. J. Clin. Nutr. *67*, 1182–1187. https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.168.

Mark, M., Ghyselinck, N.B., and Chambon, P. (2006). FUNCTION OF RETINOID NUCLEAR RECEPTORS: Lessons from Genetic and Pharmacological Dissections of the Retinoic Acid Signaling Pathway During Mouse Embryogenesis. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *46*, 451–480. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141156.

Marketkar, S., Li, D., Yang, D., and Cao, W. (2017). TGR5 expression in benign, preneoplastic and neoplastic lesions of Barrett's esophagus: Case series and findings. World J. Gastroenterol. *23*, 1338. https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i8.1338.

Marrink, J., Andrews, P.W., Van Brummen, P.J., De Jong, H.J., Sleijfer, D.T.H., Schraffordt Koops, H., and Oosterhuis, J.W. (1991). Tra-1-60: A new serum marker in patients with germ-cell tumors. Int. J. Cancer *49*, 368–372. https://doi.org/10.1002/ijc.2910490309.

Martinot, E., Sèdes, L., Baptissart, M., Holota, H., Rouaisnel, B., Damon-Soubeyrand, C., De Haze, A., Saru, J.-P., Thibault-Carpentier, C., Keime, C., et al. (2017). The Bile Acid Nuclear Receptor FXRα Is a Critical Regulator of Mouse Germ Cell Fate. Stem Cell Rep. *9*, 315–328. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.036.

Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., Nakamura, T., Itadani, H., and Tanaka, K. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). Biochem. Biophys. Res. Commun. *298*, 714–719. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02550-0.

Maruyama, T., Tanaka, K., Suzuki, J., Miyoshi, H., Harada, N., Nakamura, T., Miyamoto, Y., Kanatani, A., and Tamai, Y. (2006). Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice. J. Endocrinol. *191*, 197–205. https://doi.org/10.1677/joe.1.06546.

Masaki, K., Sakai, M., Kuroki, S., Jo, J.-I., Hoshina, K., Fujimori, Y., Oka, K., Amano, T., Yamanaka, T., Tachibana, M., et al. (2018). FGF2 Has Distinct Molecular Functions from GDNF in the Mouse Germline Niche. Stem Cell Rep. *10*, 1782–1792. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.016.

Masters, S.B., Stroud, R.M., and Bourne, H.R. (1986). Family of G protein alpha chains: amphipathic analysis and predicted structure of functional domains. Protein Eng. *1*, 47–54. .

de Mateo, S., Martínez-Heredia, J., Estanyol, J.M., Domínguez-Fandos, D., Domíguez-Fandos, D., Vidal-Taboada, J.M., Ballescà, J.L., and Oliva, R. (2007). Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. Proteomics *7*, 4264–4277. https://doi.org/10.1002/pmic.200700521.

Mather, J.P., Woodruff, T.K., and Krummen, L.A. (1992). Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N *201*, 1–15. https://doi.org/10.3181/00379727-201-43473.

Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1991). Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. Nature *353*, 750–752. https://doi.org/10.1038/353750a0.

McGarr, S.E., Ridlon, J.M., and Hylemon, P.B. (2005). Diet, Anaerobic Bacterial Metabolism, and Colon Cancer. J Clin Gastroenterol *39*, 13. .

McGavigan, A.K., Garibay, D., Henseler, Z.M., Chen, J., Bettaieb, A., Haj, F.G., Ley, R.E., Chouinard, M.L., and Cummings, B.P. (2017). TGR5 contributes to glucoregulatory improvements after vertical sleeve gastrectomy in mice. Gut *66*, 226–234. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309871.

McGlynn, K.A., Quraishi, S.M., Graubard, B.I., Weber, J.-P., Rubertone, M.V., and Erickson, R.L. (2008). Persistent Organochlorine Pesticides and Risk of Testicular Germ Cell Tumors. JNCI J. Natl. Cancer Inst. *100*, 663–671. https://doi.org/10.1093/jnci/djn101.

McGlynn, K.A., Quraishi, S.M., Graubard, B.I., Weber, J.-P., Rubertone, M.V., and Erickson, R.L. (2009). Polychlorinated Biphenyls and Risk of Testicular Germ Cell Tumors. Cancer Res. *69*, 1901–1909. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3935.

McIver, S.C., Roman, S.D., Nixon, B., Loveland, K.L., and McLaughlin, E.A. (2013). The rise of testicular germ cell tumours: the search for causes, risk factors and novel therapeutic targets. F1000Research *2*, 55. https://doi.org/10.12688/f1000research.2-55.v1.

McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. Dev. Biol. *262*, 1–15. https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00214-8.

McLean, D.J., Friel, P.J., Pouchnik, D., and Griswold, M.D. (2002). Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in follicle-stimulating hormone-treated rat Sertoli cells. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *16*, 2780–2792. https://doi.org/10.1210/me.2002-0059.

McLean, D.J., Friel, P.J., Johnston, D.S., and Griswold, M.D. (2003). Characterization of Spermatogonial Stem Cell Maturation and Differentiation in Neonatal Mice1. Biol. Reprod. *69*, 2085–2091. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017020.

McMillin, M., Frampton, G., Tobin, R., Dusio, G., Smith, J., Shin, H., Newell-Rogers, K., Grant, S., and DeMorrow, S. (2015). TGR5 signaling reduces neuroinflammation during hepatic encephalopathy. J. Neurochem. *135*, 565–576. https://doi.org/10.1111/jnc.13243.

Meistrich, M.L., and Shetty, G. (2015). The New Director of “the Spermatogonial Niche”: Introducing the Peritubular Macrophage. Cell Rep. *12*, 1069–1070. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.057.

Meng, X. (2000). Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF. Science *287*, 1489–1493. https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1489.

Meng, J., Holdcraft, R.W., Shima, J.E., Griswold, M.D., and Braun, R.E. (2005). Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 16696–16700. https://doi.org/10.1073/pnas.0506084102.

Miller, S.R., and Cherrington, N.J. (2020). Transepithelial Transport Across the Blood-Testis Barrier. 15. .

Mirhoseini, M., Saki, G., Hemadi, M., Khodadadi, A., and Mohammadi Asl, J. (2014). Melatonin and Testicular Damage in Busulfan Treated Mice. Iran. Red Crescent Med. J. *16*. https://doi.org/10.5812/ircmj.14463.

Mita, M., Price, J.M., and Hall, P.F. (1982). Stimulation by follicle-stimulating hormone of synthesis of lactate by Sertoli cells from rat testis. Endocrinology *110*, 1535–1541. https://doi.org/10.1210/endo-110-5-1535.

Mobraten, K., Haugbro, T., Karlstrom, E., Kleiveland, C.R., and Lea, T. (2015). Activation of the bile acid receptor TGR5 enhances LPS-induced inflammatory responses in a human monocytic cell line. J. Recept. Signal Transduct. *35*, 402–409. https://doi.org/10.3109/10799893.2014.986744.

Møller, H. (1993). Clues to the Aetiology ofTesticular Germ Cell Tumours fromDescriptive Epidemiology. Eur. Urol. *23*, 8–15. https://doi.org/10.1159/000474564.

Monte, M.-J. (2009). Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. World J. Gastroenterol. *15*, 804. https://doi.org/10.3748/wjg.15.804.

Mooradian, A.D., Shamma, A., Salti, I., Cortas, N., and others (1985). Hypophyseal-Gonadal Dysfunction in Men with Non-Alcoholic Liver Cirrhosis. Andrologia *17*, 72–79. .

Morris, I.D., Bardin, C.W., Musto, N.A., Thau, R., and Gunsalus, G.L. (1988). Androgen binding protein in serum, testis and epididymis following treatment with the Leydig cell cytotoxic agent, ethylene dimethanesulphonate. Int. J. Androl. *11*, 153–163. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1988.tb00991.x.

Mostofi, F.K., Spaander, P., Grigor, K., Parkinson, C.M., Shakkebaek, N.E., and Oliver, R.T. (1990). Consensus on pathological classifications of testicular tumours. Prog. Clin. Biol. Res. *357*, 267–276. .

Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocr. Rev. *25*, 747–806. https://doi.org/10.1210/er.2003-0022.

Mruk, D.D., Siu, M.K.Y., Conway, A.M., Lee, N.P.Y., Lau, A.S.N., and Cheng, C.Y. (2003). Role of tissue inhibitor of metalloproteases-1 in junction dynamics in the testis. J. Androl. *24*, 510–523. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02703.x.

Nagano, M.C. (2003). Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. Biol. Reprod. *69*, 701–707. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016352.

Nagathihalli, N.S., Beesetty, Y., Lee, W., Washington, M.K., Chen, X., Lockhart, A.C., and Merchant, N.B. (2014). Novel Mechanistic Insights into Ectodomain Shedding of EGFR Ligands Amphiregulin and TGF- : Impact on Gastrointestinal Cancers Driven by Secondary Bile Acids. Cancer Res. *74*, 2062–2072. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2329.

Nakagawa, T., Sharma, M., Nabeshima, Y. i., Braun, R.E., and Yoshida, S. (2010). Functional Hierarchy and Reversibility Within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment. Science *328*, 62–67. https://doi.org/10.1126/science.1182868.

Nakamura, M., Okinaga, S., and Arai, K. (1984). Metabolism of round spermatids: evidence that lactate is preferred substrate. Am. J. Physiol. *247*, E234-242. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1984.247.2.E234.

Nakayama, Y., Yamamoto, T., and Abé, S.I. (1999). IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. Int. J. Dev. Biol. *43*, 343–347. .

Nava-Castro, K.E., Ramírez-Nieto, R., Méndez-García, L.A., Girón-Pérez, M.I., Segovia-Mendoza, M., Navidad-Murrieta, M.S., and Morales Montor, J. (2019). Environmental Pollution as a Risk Factor in Testicular Tumour Development: Focus on the Interaction between Bisphenol A and the Associated Immune Response. Int. J. Environ. Res. Public. Health *16*, 4113. https://doi.org/10.3390/ijerph16214113.

Noel, E.E., Yeste-Velasco, M., Mao, X., Perry, J., Kudahetti, S.C., Li, N.F., Sharp, S., Chaplin, T., Xue, L., McIntyre, A., et al. (2010). The Association of CCND1 Overexpression and Cisplatin Resistance in Testicular Germ Cell Tumors and Other Cancers. Am. J. Pathol. *176*, 2607–2615. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090780.

Nørgaard-Pedersen, B., Schultz, H.P., Arends, J., Brincker, H., Jacobsen, G.K., Lindeløv, B., Rørth, M., Svennekjær, I.L., and Dateca Study Group (1984). Tumour Markers in Testicular Germ Cell Tumours Five-Year Experience from the DATECA Study 1976–1980. Acta Radiol. Oncol. *23*, 287–294. https://doi.org/10.3109/02841868409136024.

Norlin, M., Andersson, U., Björkhem, I., and Wikvall, K. (2000). Oxysterol 7 alpha-hydroxylase activity by cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A). J. Biol. Chem. *275*, 34046–34053. https://doi.org/10.1074/jbc.M002663200.

Oakberg, E.F. (1956). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. Am. J. Anat. *99*, 391–413. https://doi.org/10.1002/aja.1000990303.

Oatley, J.M., and Brinster, R.L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *24*, 263–286. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175355.

Oatley, J.M., and Brinster, R.L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. Physiol. Rev. *92*, 577–595. https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2011.

Oatley, J.M., Oatley, M.J., Avarbock, M.R., Tobias, J.W., and Brinster, R.L. (2009). Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. Dev. Camb. Engl. *136*, 1191–1199. https://doi.org/10.1242/dev.032243.

Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Racicot, K.E., and Oatley, J.M. (2011). Inhibitor of DNA Binding 4 Is Expressed Selectively by Single Spermatogonia in the Male Germline and Regulates the Self-Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Mice1. Biol. Reprod. *85*, 347–356. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091330.

O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I., and Stanton, P.G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. Spermatogenesis *1*, 14–35. https://doi.org/10.4161/spmg.1.1.14525.

Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., et al. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. Nature *436*, 207–213. https://doi.org/10.1038/nature03813.

Okuma, Y., O'Connor, A.E., Hayashi, T., Loveland, K.L., de Kretser, D.M., and Hedger, M.P. (2006). Regulated production of activin A and inhibin B throughout the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. J. Endocrinol. *190*, 331–340. https://doi.org/10.1677/joe.1.06706.

Okumura, K., Lee, I.P., and Dixon, R.L. (1975). Permeability of selected drugs and chemicals across the blood-testis barrier of the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. *194*, 89–95. .

Olie, R.A., Looijenga, L.H.J., Boerrigter, L., Top, B., Rodenhuis, S., Langeveld, A., Mulder, M.P., and Oosterhuis, J.W. (1995). N- andKRAS mutations in primary testicular germ cell tumors: Incidence and possible biological implications. Genes. Chromosomes Cancer *12*, 110–116. https://doi.org/10.1002/gcc.2870120205.

Oliveira, P.F., Alves, M.G., Rato, L., Silva, J., Sá, R., Barros, A., Sousa, M., Carvalho, R.A., Cavaco, J.E., and Socorro, S. (2011). Influence of 5α-dihydrotestosterone and 17β-estradiol on human Sertoli cells metabolism. Int. J. Androl. *34*, e612-620. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01205.x.

Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H.J. (2003). Current views on the pathogenesis of testicular germ cell tumours and perspectives for future research: Highlights of the 5th Copenhagen Workshop on Carcinoma in situ and Cancer of the Testis. APMIS *111*, 280–289. https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.1110131.x.

Oosterhuis, J.W., and Looijenga, L.H.J. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. Nat. Rev. Cancer *5*, 210–222. https://doi.org/10.1038/nrc1568.

Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Décimo, D., Gansmuller, A., Heyberger, S., Dollé, P., Bronner, S., Lutz, Y., and Chambon, P. (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. J. Cell Biol. *135*, 469–477. https://doi.org/10.1083/jcb.135.2.469.

Pai, R., Tarnawski, A.S., and Tran, T. (2004). Deoxycholic Acid Activates β-Catenin Signaling Pathway and Increases Colon Cell Cancer Growth and Invasiveness. Mol. Biol. Cell *15*, 2156–2163. https://doi.org/10.1091/mbc.E03-12-0894.

Pais, V., Leav, I., Lau, K.-M., Jiang, Z., and Ho, S.-M. (2003). Estrogen receptor-beta expression in human testicular germ cell tumors. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *9*, 4475–4482. .

Pang, C., Lalonde, A., Godfrey, T.E., Que, J., Sun, J., Wu, T., and Zhou, Z. (2017). Bile salt receptor TGR5 is highly expressed in esophageal adenocarcinoma and precancerous lesions with significantly worse overall survival and gender differences. Clin. Exp. Gastroenterol. *Volume 10*, 29–37. https://doi.org/10.2147/CEG.S117842.

Park, In.H., Kim, M.K., and Kim, S.U. (2008). Ursodeoxycholic acid prevents apoptosis of mouse sensory neurons induced by cisplatin by reducing P53 accumulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *377*, 1025–1030. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.014.

Park, J.S., Kim, J., Elghiaty, A., and Ham, W.S. (2018). Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality. Medicine (Baltimore) *97*, e12390. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000012390.

Pathak, P., Liu, H., Boehme, S., Xie, C., Krausz, K.W., Gonzalez, F., and Chiang, J.Y.L. (2017). Farnesoid X receptor induces Takeda G-protein receptor 5 cross-talk to regulate bile acid synthesis and hepatic metabolism. J. Biol. Chem. *292*, 11055–11069. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784322.

Péan, N., Doignon, I., Garcin, I., Besnard, A., Julien, B., Liu, B., Branchereau, S., Spraul, A., Guettier, C., Humbert, L., et al. (2013). The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice: Hepatology. Hepatology *58*, 1451–1460. https://doi.org/10.1002/hep.26463.

Peer, N.R., Law, S.M., Murdoch, B., Goulding, E.H., Eddy, E.M., and Kim, K. (2018). Germ Cell-specific Retinoic Acid Receptor Alpha Functions in Germ Cell Organization, Meiotic Integrity, and Spermatogonia. 32. .

Pellicciari, R., Gioiello, A., Macchiarulo, A., Thomas, C., Rosatelli, E., Natalini, B., Sardella, R., Pruzanski, M., Roda, A., Pastorini, E., et al. (2009). Discovery of 6α-Ethyl-23(*S*)-methylcholic Acid (*S* -EMCA, INT-777) as a Potent and Selective Agonist for the TGR5 Receptor, a Novel Target for Diabesity. J. Med. Chem. *52*, 7958–7961. https://doi.org/10.1021/jm901390p.

Peng, D., Wei, J., Gan, Y., Yang, J., Jiang, X., Kitazawa, R., Xiang, Y., Dai, Y., and Tang, Y. (2019). Testis developmental related gene 1 regulates the chemosensitivity of seminoma TCam-2 cells to cisplatin via autophagy. J. Cell. Mol. Med. *23*, 7773–7784. https://doi.org/10.1111/jcmm.14654.

Pesce, M., Farrace, M.G., Piacentini, M., Dolci, S., and De Felici, M. (1993). Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). Dev. Camb. Engl. *118*, 1089–1094. .

Pierpont, T.M., Lyndaker, A.M., Anderson, C.M., Jin, Q., Moore, E.S., Roden, J.L., Braxton, A., Bagepalli, L., Kataria, N., Hu, H.Z., et al. (2017). Chemotherapy-Induced Depletion of OCT4-Positive Cancer Stem Cells in a Mouse Model of Malignant Testicular Cancer. Cell Rep. *21*, 1896–1909. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.078.

di Pietro, A., Koster, R., Boersma-van Eck, W., Dam, W.A., Mulder, N.H., Gietema, J.A., de Vries, E.G.E., and de Jong, S. (2012). Pro- and anti-apoptotic effects of p53 in cisplatin-treated human testicular cancer are cell context-dependent. Cell Cycle *11*, 4552–4562. https://doi.org/10.4161/cc.22803.

Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003). Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein. Mol. Cell. Biol. *23*, 5354–5365. https://doi.org/10.1128/MCB.23.15.5354-5365.2003.

Poganitsch-Korhonen, M., Masliukaite, I., Nurmio, M., Lähteenmäki, P., van Wely, M., van Pelt, A.M.M., Jahnukainen, K., and Stukenborg, J.-B. (2017). Decreased spermatogonial quantity in prepubertal boys with leukaemia treated with alkylating agents. Leukemia *31*, 1460–1463. https://doi.org/10.1038/leu.2017.76.

Pöllänen, P., Söder, O., and Parvinen, M. (1989). Interleukin-1 alpha stimulation of spermatogonial proliferation in vivo. Reprod. Fertil. Dev. *1*, 85–87. https://doi.org/10.1071/rd9890085.

Pols, T.W.H., Nomura, M., Harach, T., Lo Sasso, G., Oosterveer, M.H., Thomas, C., Rizzo, G., Gioiello, A., Adorini, L., Pellicciari, R., et al. (2011). TGR5 Activation Inhibits Atherosclerosis by Reducing Macrophage Inflammation and Lipid Loading. Cell Metab. *14*, 747–757. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.11.006.

Portincasa, P., Di Ciaula, A., Wang, H.H., Palasciano, G., van Erpecum, K.J., Moschetta, A., and Wang, D.Q.-H. (2008). Coordinate regulation of gallbladder motor function in the gut-liver axis. Hepatol. Baltim. Md *47*, 2112–2126. https://doi.org/10.1002/hep.22204.

Potter, S.J., and DeFalco, T. (2017). Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. Reprod. Camb. Engl. *153*, R151–R162. https://doi.org/10.1530/REP-16-0588.

Potthoff, M.J., Potts, A., He, T., Duarte, J.A.G., Taussig, R., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., and Burgess, S.C. (2013). Colesevelam suppresses hepatic glycogenolysis by TGR5-mediated induction of GLP-1 action in DIO mice. Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol. *304*, G371–G380. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00400.2012.

Print, C.G., and Loveland, K.L. (2000). Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *22*, 423–430. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<423::AID-BIES4>3.0.CO;2-0.

Prinz, P., Hofmann, T., Ahnis, A., Elbelt, U., Goebel-Stengel, M., Klapp, B.F., Rose, M., and Stengel, A. (2015). Plasma bile acids show a positive correlation with body mass index and are negatively associated with cognitive restraint of eating in obese patients. Front. Neurosci. *9*. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00199.

Pui, H.P., and Saga, Y. (2018). NANOS2 acts as an intrinsic regulator of gonocytes-to-spermatogonia transition in the murine testes. Mech. Dev. *149*, 27–40. https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.01.001.

Purdue, M.P., Engel, L.S., Langseth, H., Needham, L.L., Andersen, A., Barr, D.B., Blair, A., Rothman, N., and McGlynn, K.A. (2009). Prediagnostic Serum Concentrations of Organochlorine Compounds and Risk of Testicular Germ Cell Tumors. Environ. Health Perspect. *117*, 1514–1519. https://doi.org/10.1289/ehp.0800359.

Radwan, M., Wielgomas, B., Dziewirska, E., Radwan, P., Kałużny, P., Klimowska, A., Hanke, W., and Jurewicz, J. (2018). Urinary Bisphenol A Levels and Male Fertility. Am. J. Mens Health *12*, 2144–2151. https://doi.org/10.1177/1557988318799163.

Rajpert-De Meyts, E., Bartkova, J., Samson, M., Hoei-Hansen, C.E., Frydelund-Larsen, L., Bartek, J., and Skakkebaek, N.E. (2003). The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. *111*, 267–278; discussion 278-279. https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2003.11101301.x.

Ramalho-Santos, J., Moreno, R.D., Wessel, G.M., Chan, E.K., and Schatten, G. (2001). Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis. Exp. Cell Res. *267*, 45–60. https://doi.org/10.1006/excr.2000.5119.

Rao, J., Yang, C., Yang, S., Lu, H., Hu, Y., Lu, L., Cheng, F., and Wang, X. (2020). Deficiency of TGR5 exacerbates immune-mediated cholestatic hepatic injury by stabilizing the β-catenin destruction complex. Int. Immunol. *32*, 321–334. https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa002.

Rapley, E.A., Crockford, G.P., Teare, D., Biggs, P., Seal, S., Barfoot, R., Edwards, S., Hamoudi, R., Heimdal, K., Fosså, S.D., et al. (2000). Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours. Nat. Genet. *24*, 197–200. https://doi.org/10.1038/72877.

Rapley, E.A., Turnbull, C., Al Olama, A.A., Dermitzakis, E.T., Linger, R., Huddart, R.A., Renwick, A., Hughes, D., Hines, S., Seal, S., et al. (2009). A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. Nat. Genet. *41*, 807–810. https://doi.org/10.1038/ng.394.

Rato, L., Socorro, S., Cavaco, J.E.B., and Oliveira, P.F. (2010). Tubular Fluid Secretion in the Seminiferous Epithelium: Ion Transporters and Aquaporins in Sertoli Cells. J. Membr. Biol. *236*, 215–224. https://doi.org/10.1007/s00232-010-9294-x.

Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Carvalho, R.A., Cavaco, J.E., and Oliveira, P.F. (2012). Metabolic modulation induced by oestradiol and DHT in immature rat Sertoli cells cultured in vitro. Biosci. Rep. *32*, 61–69. https://doi.org/10.1042/BSR20110030.

Reich, M., Deutschmann, K., Sommerfeld, A., Klindt, C., Kluge, S., Kubitz, R., Ullmer, C., Knoefel, W.T., Herebian, D., Mayatepek, E., et al. (2016). TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro. Gut *65*, 487–501. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309458.

Ridlon, J.M., Kang, D.-J., and Hylemon, P.B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. J. Lipid Res. *47*, 241–259. https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200.

Rizzo, G., Passeri, D., De Franco, F., Ciaccioli, G., Donadio, L., Rizzo, G., Orlandi, S., Sadeghpour, B., Wang, X.X., Jiang, T., et al. (2010). Functional Characterization of the Semisynthetic Bile Acid Derivative INT-767, a Dual Farnesoid X Receptor and TGR5 Agonist. Mol. Pharmacol. *78*, 617–630. https://doi.org/10.1124/mol.110.064501.

Robinson, R., and Fritz, I.B. (1981). Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. Biol. Reprod. *24*, 1032–1041. https://doi.org/10.1095/biolreprod24.5.1032.

Rocca, M.S., Di Nisio, A., Marchiori, A., Ghezzi, M., Opocher, G., Foresta, C., and Ferlin, A. (2017). Copy number variations of E2F1: a new genetic risk factor for testicular cancer. Endocr. Relat. Cancer *24*, 119–125. https://doi.org/10.1530/ERC-16-0514.

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. EMBO J. *16*, 2262–2270. https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2262.

Rodvall, Y. (2003). Cancer risk in offspring of male pesticide applicators in agriculture in Sweden. Occup. Environ. Med. *60*, 798–801. https://doi.org/10.1136/oem.60.10.798.

Roelofs, H., Mostert, M.C., Pompe, K., Zafarana, G., van Oorschot, M., van Gurp, R.J.H.L.M., Gillis, A.J.M., Stoop, H., Beverloo, B., Oosterhuis, J.W., et al. (2000). Restricted 12p Amplification and RAS Mutation in Human Germ Cell Tumors of the Adult Testis. Am. J. Pathol. *157*, 1155–1166. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64631-7.

Roger, C., Lambard, S., Bouskine, A., Mograbi, B., Chevallier, D., Nebout, M., Pointis, G., Carreau, S., and Fenichel, P. (2005). Estrogen-induced growth inhibition of human seminoma cells expressing estrogen receptor β and aromatase. J. Mol. Endocrinol. *35*, 191–199. https://doi.org/10.1677/jme.1.01704.

Rolland, M., Le Moal, J., Wagner, V., Royere, D., and De Mouzon, J. (2013). Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26 609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. Hum. Reprod. *28*, 462–470. https://doi.org/10.1093/humrep/des415.

Rooij, D.G., and Kramer, M.P. (1968). Spermatogonial stem cell renewal in the rat, mouse and golden hamster: A study with the alkylating agent Myleran. Z. F►r Zellforsch. Mikrosk. Anat. *92*, 400–405. https://doi.org/10.1007/BF00455597.

de Rooij, D.G. (1998). Stem cells in the testis. Int. J. Exp. Pathol. *79*, 67–80. https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.1998.00057.x.

de Rooij, D.G. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reprod. Camb. Engl. *121*, 347–354. https://doi.org/10.1530/rep.0.1210347.

Roosen-Runge, E.C. (1962). The process of spermatogenesis in mammals. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. *37*, 343–377. https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1962.tb01616.x.

Roosen-Runge, E.C., and Leik, J. (1968). Gonocyte degeneration in the postnatal male rat. Am. J. Anat. *122*, 275–299. https://doi.org/10.1002/aja.1001220208.

Rørth, M., Meyts, E.R.-D., Andersson, L., Dieckmann, K.-P., Fosså, S.D., Grigor, K.M., Hendry, W.F., Herr, H.W., Looijenga, L.H.J., Wolter Oosterhuis, J., et al. (2000). Carcinoma

in situ in the Testis. Scand. J. Urol. Nephrol. *34*, 166–186. https://doi.org/10.1080/00365590050509896.

la Rosa, A.H.-D., Manoharan, M., and Goolam, A.S. (2017). Current Concepts of Epigenetics in Testicular Cancer. Indian J. Surg. Oncol. *8*, 169–174. https://doi.org/10.1007/s13193-016-0593-2.

Rosas-Plaza, X., de Vries, G., Meersma, G.J., Suurmeijer, A.J.H., Gietema, J.A., van Vugt, M.A.T.M., and de Jong, S. (2020). Dual mTORC1/2 Inhibition Sensitizes Testicular Cancer Models to Cisplatin Treatment. Mol. Cancer Ther. *19*, 590–601. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0449.

Rose, K.A., Stapleton, G., Dott, K., Kieny, M.P., Best, R., Schwarz, M., Russell, D.W., Bjorkhem, I., Seckl, J., and Lathe, R. (1997). Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7 -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 -hydroxy pregnenolone. Proc. Natl. Acad. Sci. *94*, 4925–4930. https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.4925.

Rossi, P., Sette, C., Dolci, S., and Geremia, R. (2000). Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. J. Endocrinol. Invest. *23*, 609–615. https://doi.org/10.1007/BF03343784.

Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., García de Herreros, A., and Duñach, M. (1999). Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. J. Biol. Chem. *274*, 36734–36740. https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36734.

Rousseaux, S., Reynoird, N., Escoffier, E., Thevenon, J., Caron, C., and Khochbin, S. (2008). Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. Reprod. Biomed. Online *16*, 492–503. https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60456-7.

Rovo, A., Aljurf, M., Chiodi, S., Spinelli, S., Salooja, N., Sucak, G., Hunter, A., Kim, T.S., Socie, G., van Lint, M.T., et al. (2013). Ongoing graft-versus-host disease is a risk factor for azoospermia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey of the Late Effects Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Haematologica *98*, 339–345. https://doi.org/10.3324/haematol.2012.071944.

Russell, D.W. (2003). The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. Annu. Rev. Biochem. *72*, 137–174. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712.

Russell, L.D., Bartke, A., and Goh, J.C. (1989). Postnatal development of the sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to

tubular fluid secretion and flow. Am. J. Anat. *184*, 179–189. https://doi.org/10.1002/aja.1001840302.

Russell, L.D., Corbin, T.J., Borg, K.E., De França, L.R., Grasso, P., and Bartke, A. (1993). Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. Endocrinology *133*, 2062–2070. https://doi.org/10.1210/endo.133.5.8404654.

Sada, A., Suzuki, A., Suzuki, H., and Saga, Y. (2009). The RNA-Binding Protein NANOS2 Is Required to Maintain Murine Spermatogonial Stem Cells. Science *325*, 1394–1398. https://doi.org/10.1126/science.1172645.

Sadate-Ngatchou, P.I., Pouchnik, D.J., and Griswold, M.D. (2004). Follicle-stimulating hormone induced changes in gene expression of murine testis. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *18*, 2805–2816. https://doi.org/10.1210/me.2003-0203.

Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A. (2003). Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. Nat. Cell Biol. *5*, 427–432. https://doi.org/10.1038/ncb978.

Sasaki, T., Kuboyama, A., Mita, M., Murata, S., Shimizu, M., Inoue, J., Mori, K., and Sato, R. (2018). The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice. J. Biol. Chem. *293*, 10322–10332. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002733.

Sasso-Cerri, E., Oliveira, B., de Santi, F., Beltrame, F.L., Caneguim, B.H., and Cerri, P.S. (2017). The antineoplastic busulphan impairs peritubular and Leydig cells, and vitamin B12 stimulates spermatogonia proliferation and prevents busulphan-induced germ cell death. Biomed. Pharmacother. *95*, 1619–1630. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.131.

Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. Science *296*, 2176–2178. .

Sato, H., Genet, C., Strehle, A., Thomas, C., Lobstein, A., Wagner, A., Mioskowski, C., Auwerx, J., and Saladin, R. (2007). Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from Olea europaea. Biochem. Biophys. Res. Commun. *362*, 793–798. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.130.

Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y., and Ogawa, T. (2011). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. Nature *471*, 504–507. https://doi.org/10.1038/nature09850.

Schliess, F., Foster, N., Görg, B., Reinehr, R., and Häussinger, D. (2004). Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes: Protein Tyrosine Nitration by Hypoosmotic Astrocyte Swelling. Glia *47*, 21–29. https://doi.org/10.1002/glia.20019.

Schmidt, B.A., Rose, A., Steinhoff, C., Strohmeyer, T., Hartmann, M., and Ackermann, R. (2001). Up-Regulation of Cyclin-dependent Kinase 4/Cyclin D2 Expression but Down-Regulation of Cyclin-dependent Kinase 2/Cyclin E in Testicular Germ Cell Tumors. Cancer Res. *61*, 4214–4221. .

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells *4*, 7–25. .

Schrader, M., Burger, A.M., Müller, M., Krause, H., Straub, B., Schostak, M., Schulze, W., Lauke, H., and Miller, K. (2002). The differentiation status of primary gonadal germ cell tumors correlates inversely with telomerase activity and the expression level of the gene encoding the catalytic subunit of telomerase. BMC Cancer *2*, 32. https://doi.org/10.1186/1471-2407-2-32.

Schwarz, M., Lund, E.G., Setchell, K.D.R., Kayden, H.J., Björkhem, I., Herz, J., and Russell, D.W. (1996). Disruption of Cholesterol 7α-Hydroxylase Gene in Mice: 22. .

Scoville, D.W., Kang, H.S., and Jetten, A.M. (2017). GLIS1-3: emerging roles in reprogramming, stem and progenitor cell differentiation and maintenance. Stem Cell Investig. *4*, 80. https://doi.org/10.21037/sci.2017.09.01.

Selvi, I., Ozturk, E., Yikilmaz, T.N., Sarikaya, S., and Basar, H. (2020). Effects of testicular dysgenesis syndrome components on testicular germ cell tumor prognosis and oncological outcomes. Int. Braz. J. Urol. *46*, 725–740. https://doi.org/10.1590/s1677-5538.ibju.2019.0387.

Seward, D.J., Koh, A.S., Boyer, J.L., and Ballatori, N. (2003). Functional Complementation between a Novel Mammalian Polygenic Transport Complex and an Evolutionarily Ancient Organic Solute Transporter, *OST* α- *OST* β. J. Biol. Chem. *278*, 27473–27482. https://doi.org/10.1074/jbc.M301106200.

Seydoux, G., and Braun, R.E. (2006). Pathway to Totipotency: Lessons from Germ Cells. Cell *127*, 891–904. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.016.

Shapiro, E., Huang, H., Masch, R.J., McFadden, D.E., Wu, X.-R., and Ostrer, H. (2005). Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptors alpha and beta in human fetal testis and epididymis. J. Urol. *174*, 1695–1698; discussion 1698. https://doi.org/10.1097/01.ju.0000179540.28209.de.

Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., and Fisher, J.S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reprod. Camb. Engl. *125*, 769–784. https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769.

Shen, H., Shih, J., Hollern, D.P., Wang, L., Bowlby, R., Tickoo, S.K., Thorsson, V., Mungall, A.J., Newton, Y., Hegde, A.M., et al. (2018). Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors. Cell Rep. *23*, 3392–3406. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.039.

Shetty, G., and Meistrich, M.L. (2005). Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 36–39. https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgi002.

Shinohara, T., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (1999). 1- and 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *96*, 5504–5509. https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5504.

Shiraishi, K., and Matsuyama, H. (2012). Local Expression of Epidermal Growth Factor-Like Growth Factors in Human Testis and Its Role in Spermatogenesis. J. Androl. *33*, 66–73. https://doi.org/10.2164/jandrol.110.011981.

Shirakata, Y., Hiradate, Y., Inoue, H., Sato, E., and Tanemura, K. (2014). Histone h4 modification during mouse spermatogenesis. J. Reprod. Dev. *60*, 383. .

Short, M.L., Huang, D., Milkowski, D.M., Short, S., Kunstman, K., Soong, C.J., Chung, K.C., and Jungmann, R.A. (1994). Analysis of the rat lactate dehydrogenase A subunit gene promoter/regulatory region. Biochem. J. *304 (Pt 2)*, 391–398. https://doi.org/10.1042/bj3040391.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. CA. Cancer J. Clin. *69*, 7–34. https://doi.org/10.3322/caac.21551.

Sigurdsson, V., Haga, Y., Takei, H., Mansell, E., Okamatsu-Haga, C., Suzuki, M., Radulovic, V., van der Garde, M., Koide, S., Soboleva, S., et al. (2020). Induction of blood-circulating bile acids supports recovery from myelosuppressive chemotherapy. Blood Adv. *4*, 1833–1843. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000133.

Singh, J., and Handelsman, D.J. (1996). The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. J. Androl. *17*, 382–393. .

Singh, R., Fazal, Z., Corbet, A.K., Bikorimana, E., Rodriguez, J.C., Khan, E.M., Shahid, K., Freemantle, S.J., and Spinella, M.J. (2019). Epigenetic Remodeling through Downregulation of Polycomb Repressive Complex 2 Mediates Chemotherapy Resistance in Testicular Germ Cell Tumors. Cancers *11*, 796. https://doi.org/10.3390/cancers11060796.

Sisakhtnezhad, S., and Heshmati, P. (2018). Comparative analysis of single-cell RNA sequencing data from mouse spermatogonial and mesenchymal stem cells to identify differentially expressed genes and transcriptional regulators of germline cells. J. Cell. Physiol. *233*, 5231–5242. https://doi.org/10.1002/jcp.26303.

Skakkebaek, N.E. (1972). Possible carcinoma-in-situ of the testis. Lancet Lond. Engl. *2*, 516–517. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(72)91909-5.

Skakkebaek, N.-E., Meyts, E.R., and Main, K.M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. APMIS *109*, S22–S30. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2001.tb05770.x.

Skinner, M.K., Tung, P.S., and Fritz, I.B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. J. Cell Biol. *100*, 1941–1947. https://doi.org/10.1083/jcb.100.6.1941.

Skotheim, R.I., Korkmaz, K.S., Klokk, T.I., Abeler, V.M., Korkmaz, C.G., Nesland, J.M., Fosså, S.D., Lothe, R.A., and Saatcioglu, F. (2003). NKX3.1 Expression Is Lost in Testicular Germ Cell Tumors. Am. J. Pathol. *163*, 2149–2154. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63571-7.

Skotheim, R.I., Autio, R., Lind, G.E., Kraggerud, S.M., Andrews, P.W., Monni, O., Kallioniemi, O., and Lothe, R.A. (2006). Novel Genomic Aberrations in Testicular Germ Cell Tumors by Array-CGH, and Associated Gene Expression Changes. Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol. *28*, 315–326. https://doi.org/10.1155/2006/219786.

Slama, R., Hansen, O.K.H., Ducot, B., Bohet, A., Sorensen, D., Giorgis Allemand, L., Eijkemans, M.J.C., Rosetta, L., Thalabard, J.C., Keiding, N., et al. (2012). Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. Hum. Reprod. *27*, 1489–1498. https://doi.org/10.1093/humrep/des070.

Smart, E., Lopes, F., Rice, S., Nagy, B., Anderson, R.A., Mitchell, R.T., and Spears, N. (2018). Chemotherapy drugs cyclophosphamide, cisplatin and doxorubicin induce germ cell loss in an in vitro model of the prepubertal testis. Sci. Rep. *8*. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19761-9.

Sonoda, J., Xie, W., Rosenfeld, J.M., Barwick, J.L., Guzelian, P.S., and Evans, R.M. (2002). Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). Proc. Natl. Acad. Sci. *99*, 13801–13806. https://doi.org/10.1073/pnas.212494599.

Sorrentino, G., Perino, A., Yildiz, E., El Alam, G., Bou Sleiman, M., Gioiello, A., Pellicciari, R., and Schoonjans, K. (2020). Bile Acids Signal via TGR5 to Activate Intestinal Stem Cells and Epithelial Regeneration. Gastroenterology *159*, 956-968.e8. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.067.

Spiller, C.M., and Bowles, J. (2017). Germ cell neoplasia in situ: The precursor cell for invasive germ cell tumors of the testis. Int. J. Biochem. Cell Biol. *86*, 22–25. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.03.004.

Spitz, S. (1948). The histological effects of nitrogen mustards on human tumors and tissues. Cancer *1*, 383–398. https://doi.org/10.1002/1097-0142(194809)1:3<383::aid-cncr2820010304>3.0.co;2-0.

Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., et al. (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. *98*, 3369–3374. https://doi.org/10.1073/pnas.051551698.

Steger, K. (1999). Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. Anat. Embryol. (Berl.) *199*, 471–487. https://doi.org/10.1007/s004290050245.

Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L.A.G., Moreno, F., Dolya, A., Bray, F., Hesseling, P., Shin, H.Y., Stiller, C.A., and IICC-3 contributors (2017). International incidence of

childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. Lancet Oncol. *18*, 719–731. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30186-9.

Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L.A.G., Moreno, F., Dolya, A., Bray, F., Hesseling, P., Shin, H.Y., and Stiller, C.A. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. 13. .

Stellwag, E.J., and Hylemon, P.B. (1979). 7alpha-Dehydroxylation of cholic acid and chenodeoxycholic acid by Clostridium leptum. J. Lipid Res. *20*, 325–333. .

Stukenborg, J.-B., Wistuba, J., Luetjens, C.M., Elhija, M.A., 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. J. Androl. *29*, 312–329. https://doi.org/10.2164/jandrol.107.002857.

Su, J., Zhang, Q., Qi, H., Wu, L., Li, Y., Yu, D., Huang, W., Chen, W.-D., and Wang, Y.-D. (2017). The G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) protects against renal inflammation and renal cancer cell proliferation and migration through antagonizing NF-κB and STAT3 signaling pathways. Oncotarget *8*, 54378–54387. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17533.

Summersgill, B., Osin, P., Lu, Y.-J., Huddart, R., and Shipley, J. (2001). Chromosomal imbalances associated with carcinoma in situ and associated testicular germ cell tumours of adolescents and adults. Br. J. Cancer *85*, 213–219. https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1889.

Sun, H., Kim, P., Jia, P., Park, A.K., Liang, H., and Zhao, Z. (2018a). Distinct telomere length and molecular signatures in seminoma and non-seminoma of testicular germ cell tumor. Brief. Bioinform. *20*, 1502–1512. https://doi.org/10.1093/bib/bby020.

Sun, Z., Kang, J., and Zhang, Y. (2018b). Hepatic veno-occlusive disease related to Gynura segetum: A case report. Medicine (Baltimore) *97*, e0552. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000010552.

Suwanichkul, A., Allander, S.V., Morris, S.L., and Powell, D.R. (1994). Glucocorticoids and insulin regulate expression of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1 through proximal promoter elements. J. Biol. Chem. *269*, 30835–30841. .

Suzuki, H., Sada, A., Yoshida, S., and Saga, Y. (2009). The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific

proteins Nanos2 and Nanos3. Dev. Biol. *336*, 222–231. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.002.

Suzuki, H., Ahn, H.W., Chu, T., Bowden, W., Gassei, K., Orwig, K., and Rajkovic, A. (2012). SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation. Dev. Biol. *361*, 301–312. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.10.027.

Suzuki, S., Diaz, V.D., and Hermann, B.P. (2019). What has single-cell RNA-seq taught us about mammalian spermatogenesis? Biol. Reprod. *101*, 617–634. https://doi.org/10.1093/biolre/ioz088.

Svensson, P.-A., Olsson, M., Andersson-Assarsson, J.C., Taube, M., Pereira, M.J., Froguel, P., and Jacobson, P. (2013). The TGR5 gene is expressed in human subcutaneous adipose tissue and is associated with obesity, weight loss and resting metabolic rate. Biochem. Biophys. Res. Commun. *433*, 563–566. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.031.

Sweeney, T.E., and Morton, J.M. (2014). Metabolic surgery: Action via hormonal milieu changes, changes in bile acids or gut microbiota? A summary of the literature. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. *28*, 727–740. https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.07.016.

Swerdlow, A.J., Higgins, C.D., and Pike, M.C. (1997). Risk of testicular cancer in cohort of boys with cryptorchidism. *314*, 19. .

Sylvester, S.R., and Griswold, M.D. (1994). The testicular iron shuttle: a “nurse” function of the Sertoli cells. J. Androl. *15*, 381–385. .

Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., and Nishimune, Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. Mech. Dev. *113*, 29–39. https://doi.org/10.1016/s0925-4773(02)00004-7.

Tajima, Y., Watanabe, D., Koshimizu, U., Matsuzawa, T., and Nishimune, Y. (1995). Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-alpha stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes. Int. J. Androl. *18*, 8–12. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1995.tb00928.x.

Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Morimoto, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Jijiwa, M., Takahashi, M., Ogura, A., and Shinohara, T. (2015). Functional Differences between GDNF-Dependent and FGF2-Dependent Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal. Stem Cell Rep. *4*, 489–502. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.010.

Talerman, A. (1980). Endodermal sinus (yolk sac) tumor elements in testicular germ-cell tumors in adults: comparison of prospective and retrospective studies. Cancer *46*, 1213–1217. https://doi.org/10.1002/1097-0142(19800901)46:5<1213::aid-cncr2820460522>3.0.co;2-z.

Tandstad, T., and Klepp, O. (2003). Neuron-specific Enolase in Testicular Cancer. Acta Oncol. *42*, 202–206. https://doi.org/10.1080/02841860310010727.

Tarulli, G.A., Stanton, P.G., and Meachem, S.J. (2012). Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? Biol. Reprod. *87*, 13, 1–11. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095091.

Taylor, W.E., Najmabadi, H., Strathearn, M., Jou, N.T., Liebling, M., Rajavashisth, T., Chanani, N., Phung, L., and Bhasin, S. (1996). Human stem cell factor promoter deoxyribonucleic acid sequence and regulation by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in a Sertoli cell line. Endocrinology *137*, 5407–5414. https://doi.org/10.1210/endo.137.12.8940364.

Tegelenbosch, R.A., and de Rooij, D.G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. Mutat. Res. *290*, 193–200. https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90159-d.

Teletin, M., Vernet, N., Yu, J., Klopfenstein, M., Jones, J.W., Féret, B., Kane, M.A., Ghyselinck, N.B., and Mark, M. (2019). Two functionally redundant sources of retinoic acid secure spermatogonia differentiation in the seminiferous epithelium. Development *146*, dev170225. https://doi.org/10.1242/dev.170225.

Tharmalingam, M.D., Matilionyte, G., Wallace, W.H.B., Stukenborg, J.-B., Jahnukainen, K., Oliver, E., Goriely, A., Lane, S., Guo, J., Cairns, B., et al. (2020). Cisplatin and carboplatin result in similar gonadotoxicity in immature human testis with implications for fertility preservation in childhood cancer. BMC Med. *18*. https://doi.org/10.1186/s12916-020-01844-y.

Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Mataki, C., Pruzanski, M., et al. (2009). TGR5-Mediated Bile Acid Sensing Controls Glucose Homeostasis. Cell Metab. *10*, 167–177. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.08.001.

Tian, R., Yang, S., Zhu, Y., Zou, S., Li, P., Wang, J., Zhu, Z., Huang, Y., He, Z., and Li, Z. (2016). VEGF/VEGFR2 Signaling Regulates Germ Cell Proliferation in vitro and Promotes

Mouse Testicular Regeneration in vivo. Cells Tissues Organs *201*, 1–13. https://doi.org/10.1159/000440949.

Tiwari, A., and Maiti, P. (2009). TGR5: an emerging bile acid G-protein-coupled receptor target for the potential treatment of metabolic disorders. Drug Discov. Today *14*, 523–530. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.02.005.

Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H., and Marunouchi, T. (2007). CDH1 Is a Specific Marker for Undifferentiated Spermatogonia in Mouse Testes1. Biol. Reprod. *76*, 130–141. https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053181.

Trautmann, E., Guerquin, M.-J., Duquenne, C., Lahaye, J.-B., Habert, R., and Livera, G. (2008). Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. Cell Cycle *7*, 656–664. https://doi.org/10.4161/cc.7.5.5482.

Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., and Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. Science *301*, 1239–1241. https://doi.org/10.1126/science.1085222.

Turnbull, C., Rapley, E.A., Seal, S., Pernet, D., Renwick, A., Hughes, D., Ricketts, M., Linger, R., Nsengimana, J., Deloukas, P., et al. (2010). Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer. Nat. Genet. *42*, 604–607. https://doi.org/10.1038/ng.607.

Tykwinska, K., Lauster, R., Knaus, P., and Rosowski, M. (2013). Growth and Differentiation Factor 3 Induces Expression of Genes Related to Differentiation in a Model of Cancer Stem Cells and Protects Them from Retinoic Acid-Induced Apoptosis. PLoS ONE *8*, e70612. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070612.

Ullmer, C., Alvarez Sanchez, R., Sprecher, U., Raab, S., Mattei, P., Dehmlow, H., Sewing, S., Iglesias, A., Beauchamp, J., and Conde-Knape, K. (2013). Systemic bile acid sensing by G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1) promotes PYY and GLP-1 release: Mechanism of GPBAR1-mediated PYY/GLP-1 release. Br. J. Pharmacol. *169*, 671–684. https://doi.org/10.1111/bph.12158.

Vaitukaitis, J.L., and Ebersole, E.R. (1976). Evidence for Altered Synthesis of Human Chorionic Gonadotropin in Gestational Trophoblastic Tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *42*, 1048–1055. https://doi.org/10.1210/jcem-42-6-1048.

Vaitukaitis, J.L., Braunstein, G.D., and Ross, G.T. (1972). A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. Am. J. Obstet. Gynecol. *113*, 751–758. https://doi.org/10.1016/0002-9378(72)90553-4.

Vakalopoulos, I., Dimou, P., Anagnostou, I., and Zeginiadou, T. (2015). Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. HORMONES https://doi.org/10.14310/horm.2002.1620.

Van Thiel, D.H., Gavaler, J.S., Zajko, A.B., and Cobb, C.F. (1985). Consequences of complete bile-duct ligation on the pubertal process in the male rat. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. *4*, 616–621. .

Vassileva, G., Golovko, A., Markowitz, L., Abbondanzo, S.J., Zeng, M., Yang, S., Hoos, L., Tetzloff, G., Levitan, D., Murgolo, N.J., et al. (2006). Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation. Biochem. J. *398*, 423–430. https://doi.org/10.1042/BJ20060537.

Vassileva, G., Hu, W., Hoos, L., Tetzloff, G., Yang, S., Liu, L., Kang, L., Davis, H.R., Hedrick, J.A., Lan, H., et al. (2010). Gender-dependent effect of Gpbar1 genetic deletion on the metabolic profiles of diet-induced obese mice. J. Endocrinol. *205*, 225–232. https://doi.org/10.1677/JOE-10-0009.

Västermark, Å., Giwercman, Y.L., Hagströmer, O., De-Meyts, E.R., Eberhard, J., Ståhl, O., Cedermark, G.C., Rastkhani, H., Daugaard, G., Arver, S., et al. (2011). Polymorphic variation in the androgen receptor gene: Association with risk of testicular germ cell cancer and metastatic disease. Eur. J. Cancer *47*, 413–419. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.08.017.

Vawda, A.I., and Davies, A.G. (1986). Effects of cisplatin on the mouse testis. Acta Endocrinol. (Copenh.) *112*, 436–441. https://doi.org/10.1530/acta.0.1120436.

Vega, A., Martinot, E., Baptissart, M., De Haze, A., Vaz, F., Kulik, W., Damon-Soubeyrand, C., Baron, S., Caira, F., and Volle, D.H. (2015). Bile Acid Alters Male Mouse Fertility in Metabolic Syndrome Context. PLoS ONE *10*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139946.

Velazquez-Villegas, L.A., Perino, A., Lemos, V., Zietak, M., Nomura, M., Pols, T.W.H., and Schoonjans, K. (2018). TGR5 signalling promotes mitochondrial fission and beige remodelling of white adipose tissue. Nat. Commun. *9*, 245. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02068-0.

Vergouwen, R.P.F.A., Jacobs, S.G.P.M., Huiskamp, R., Davids, J.A.G., and de Rooij, D.G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. Reproduction *93*, 233–243. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0930233.

Vihko, K.K., Suominen, J.J., and Parvinen, M. (1984). Cellular regulation of plasminogen activator secretion during spermatogenesis. Biol. Reprod. *31*, 383–389. https://doi.org/10.1095/biolreprod31.2.383.

Virtanen, H.E., Jørgensen, N., and Toppari, J. (2017). Semen quality in the 21st century. Nat. Rev. Urol. *14*, 120–130. https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.261.

Wahren, B., Holmgren, P.Å., and Stigbrand, T. (1979). Placental alkaline phosphatase, alphafetoprotein and carcinoembryonic antigen in testicular tumors. Tissue typing by means of cytologic smears. Int. J. Cancer *24*, 749–753. https://doi.org/10.1002/ijc.2910240608.

Waldmann, T.A., and McIntire, K.R. (1974). The use of a radioimmunoassay for alpha-fetoprotein in the diagnosis of malignancy. Cancer *34*, suppl:1510-1515. https://doi.org/10.1002/1097-0142(197410)34:8+<1510::aid-cncr2820340824>3.0.co;2-y.

Wang, Q., Wang, G., Wang, B., and Yang, H. (2018). Activation of TGR5 promotes osteoblastic cell differentiation and mineralization. Biomed. Pharmacother. *108*, 1797–1803. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.093.

Wang, Y.-D., Chen, W.-D., Yu, D., Forman, B.M., and Huang, W. (2011). The G-Protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-κB) in mice. Hepatology *54*, 1421–1432. https://doi.org/10.1002/hep.24525.

Ward, W.S., and Coffey, D.S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol. Reprod. *44*, 569–574. https://doi.org/10.1095/biolreprod44.4.569.

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. (2014). Male infertility in long-term survivors of pediatric cancer: A report from the Childhood Cancer Survivor Study. J. Cancer Surviv. Res. Pract. *8*, 437–447. https://doi.org/10.1007/s11764-014-0354-6.

Watanabe, M., Houten, S.M., Mataki, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. Nature *439*, 484–489. https://doi.org/10.1038/nature04330.

Weber, J.E., Russell, L.D., Wong, V., and Peterson, R.N. (1983). Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli--Sertoli and Sertoli--germ-cell relationships. Am. J. Anat. *167*, 163–179. https://doi.org/10.1002/aja.1001670203.

Weinhard, S., Wiedemann, A., Leheup, B., Dalle, J., Lebon Labich, B., and Pochon, C. (2020). Pubertal outcomes of children transplanted with allogeneic stem cells after myeloablative total body irradiation or busulfan: Influence of age and sex is confirmed, while a role of chronic graft-versus-host disease in delayed puberty onset is revealed. Pediatr. Transplant. *24*. https://doi.org/10.1111/petr.13773.

Weisburger, J.H., Reddy, B.S., Barnes, W.S., and Wynder, E.L. (1983). Bile acids, but not neutral sterols, are tumor promoters in the colon in man and in rodents. Environ. Health Perspect. *50*, 101–107. .

Wermann, H., Stoop, H., Gillis, A.J., Honecker, F., van Gurp, R.J., Ammerpohl, O., Richter, J., Oosterhuis, J.W., Bokemeyer, C., and Looijenga, L.H. (2010). Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance: DNA methylation, differentiation, and resistance in GCTs. J. Pathol. *221*, 433–442. https://doi.org/10.1002/path.2725.

West, J.A., Viswanathan, S.R., Yabuuchi, A., Cunniff, K., Takeuchi, A., Park, I.-H., Sero, J.E., Zhu, H., Perez-Atayde, A., Frazier, A.L., et al. (2009). A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. Nature *460*, 909–913. https://doi.org/10.1038/nature08210.

Western, P.S., Miles, D.C., van den Bergen, J.A., Burton, M., and Sinclair, A.H. (2008). Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells. Stem Cells *26*, 339–347. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0622.

Williams, S.D., Birch, R., Einhorn, L.H., Irwin, L., Greco, F.A., and Loehrer, P.J. (1987). Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. N. Engl. J. Med. *316*, 1435–1440. https://doi.org/10.1056/NEJM198706043162302.

de Wit, R., Roberts, J.T., Wilkinson, P.M., de Mulder, P.H.M., Mead, G.M., Fosså, S.D., Cook, P., de Prijck, L., Stenning, S., and Collette, L. (2001). Equivalence of Three or Four Cycles of Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin Chemotherapy and of a 3- or 5-Day Schedule in Good-Prognosis Germ Cell Cancer: A Randomized Study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council. J. Clin. Oncol. *19*, 1629–1640. https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.6.1629.

Wong, C.-H., and Cheng, C.Y. (2005). Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: a review of recent data. Dev. Biol. *286*, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.001.

Wu, C., Guo, E., Ming, J., Sun, W., Nie, X., Sun, L., Peng, S., Luo, M., Liu, D., Zhang, L., et al. (2020). Radiation-Induced DNMT3B Promotes Radioresistance in Nasopharyngeal Carcinoma through Methylation of p53 and p21. Mol. Ther. - Oncolytics *17*, 306–319. https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.04.007.

Wu, Y.-C., Ling, T.-Y., Lu, S.-H., Kuo, H.-C., Ho, H.-N., Yeh, S.-D., Shen, C.-N., and Huang, Y.-H. (2012). Chemotherapeutic Sensitivity of Testicular Germ Cell Tumors Under Hypoxic Conditions Is Negatively Regulated by SENP1-Controlled Sumoylation of OCT4. Cancer Res. *72*, 4963–4973. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0673.

Xian, Y., Wu, M., Liu, Y., Hao, J., Wu, Y., Liao, X., and Li, G. (2017). Increased Sat2 expression is associated with busulfan-induced testicular Sertoli cell injury. Toxicol. In Vitro *43*, 47–57. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.023.

Xie, W., Radominska-Pandya, A., Shi, Y., Simon, C.M., Nelson, M.C., Ong, E.S., Waxman, D.J., and Evans, R.M. (2001). An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. Proc. Natl. Acad. Sci. *98*, 3375–3380. https://doi.org/10.1073/pnas.051014398.

Xie, Y., Deng, C.-C., Ouyang, B., Lv, L.-Y., Yao, J.-H., Zhang, C., Chen, H.-C., Li, X.-Y., Sun, X.-Z., Deng, C.-H., et al. (2020). Establishing a nonlethal and efficient mouse model of male gonadotoxicity by intraperitoneal busulfan injection. Asian J. Androl. *22*, 184. https://doi.org/10.4103/aja.aja_41_19.

Xiong, W., Wang, H., Wu, H., Chen, Y., and Han, D. (2009). Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. Reprod. Camb. Engl. *137*, 469–479. https://doi.org/10.1530/REP-08-0343.

Xu, X., Zhao, Y., Zhang, M., He, R., Shi, X., Guo, X., Shi, C., Peng, F., Wang, M., Shen, M., et al. (2017). Inhibition of Autophagy by Deguelin Sensitizes Pancreatic Cancer Cells to Doxorubicin. Int. J. Mol. Sci. *18*, 370. https://doi.org/10.3390/ijms18020370.

Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. Nat. Genet. *40*, 1016–1022. https://doi.org/10.1038/ng.186.

Yamamoto, K., Okamoto, A., Isonishi, S., Ochiai, K., and Ohtake, Y. (2001). A Novel Gene, CRR9, Which Was Up-Regulated in CDDP-Resistant Ovarian Tumor Cell Line, Was Associated with Apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *280*, 1148–1154. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4250.

Yan, W., Samson, M., Jégou, B., and Toppari, J. (2000). Bcl-w Forms Complexes with Bax and Bak, and Elevated Ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w Correspond to Spermatogonial and Spermatocyte Apoptosis in the Testis. *14*, 18. .

Yang, H., Zhou, H., Zhuang, L., Auwerx, J., Schoonjans, K., Wang, X., Feng, C., and Lu, L. (2017). Plasma membrane-bound G protein-coupled bile acid receptor attenuates liver ischemia/reperfusion injury via the inhibition of toll-like receptor 4 signaling in mice. Liver Transpl. *23*, 63–74. https://doi.org/10.1002/lt.24628.

Yang, J.I., Yoon, J.-H., Myung, S.J., Gwak, G.-Y., Kim, W., Chung, G.E., Lee, S.H., Lee, S.-M., Kim, C.Y., and Lee, H.-S. (2007). Bile acid-induced TGR5-dependent c-Jun-N terminal kinase activation leads to enhanced caspase 8 activation in hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *361*, 156–161. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.001.

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. Biochem. Biophys. Res. Commun. *491*, 840–847. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.125.

Yasuda, H., Hirata, S., Inoue, K., Mashima, H., Ohnishi, H., and Yoshiba, M. (2007). Involvement of membrane-type bile acid receptor M-BAR/TGR5 in bile acid-induced activation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinases in gastric carcinoma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *354*, 154–159. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.168.

Yefimova, M.G., Sow, A., Fontaine, I., Guilleminot, V., Martinat, N., Crepieux, P., Canepa, S., Maurel, M.-C., Fouchécourt, S., Reiter, E., et al. (2008). Dimeric transferrin inhibits phagocytosis of residual bodies by testicular rat Sertoli cells. Biol. Reprod. *78*, 697–704. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063107.

Ying, S.-Y. (1988). Inhibins, Activins, and Follistatins: Gonadal Proteins Modulating the Secretion of Follicle-Stimulating Hormone. Endocr. Rev. *9*, 267–293. https://doi.org/10.1210/edrv-9-2-267.

Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y., and Nishimune, Y. (2003). Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. Biol. Reprod. *69*, 1303–1307. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.015958.

Yoneno, K., Hisamatsu, T., Shimamura, K., Kamada, N., Ichikawa, R., Kitazume, M.T., Mori, M., Uo, M., Namikawa, Y., Matsuoka, K., et al. (2013). TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by *in vitro* differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. Immunology *139*, 19–29. https://doi.org/10.1111/imm.12045.

Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Suda, T., and Nabeshima, Y.-I. (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. Dev. Biol. *269*, 447–458. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.036.

Yoshida, S., Sukeno, M., and Nabeshima, Y. -i. (2007). A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis. Science *317*, 1722–1726. https://doi.org/10.1126/science.1144885.

Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Fujimoto, T., and Nishikawa, S. (1991). Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. Dev. Camb. Engl. *113*, 689–699. .

Yoshioka, H., McCarrey, J.R., and Yamazaki, Y. (2009). Dynamic Nuclear Organization of Constitutive Heterochromatin During Fetal Male Germ Cell Development in Mice1. Biol. Reprod. *80*, 804–812. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072603.

Yousif, L., Hammer, G.P., Blettner, M., and Zeeb, H. (2013). Testicular cancer and viral infections: A systematic literature review and meta-analysis: Testicular Cancer and Viral Infections. J. Med. Virol. *85*, 2165–2175. https://doi.org/10.1002/jmv.23704.

Yuan, J., Tan, L., Yin, Z., Tao, K., Wang, G., Shi, W., and Gao, J. (2018). GLIS2 redundancy causes chemoresistance and poor prognosis of gastric cancer based on co-expression network analysis. Oncol. Rep. https://doi.org/10.3892/or.2018.6794.

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., and Vanderpoel, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009∗. Fertil. Steril. *92*, 1520–1524. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.009.

Zhang, H., Xu, H., Zhang, C., Tang, Q., and Bi, F. (2021a). Ursodeoxycholic Acid Suppresses The Malignant Progression of Colorectal Cancer Through TGR5-YAP Axis (In Review).

Zhang, J., Wong, C.-H., Xia, W., Mruk, D.D., Lee, N.P.Y., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2005). Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics via changes in protein-protein interactions of the N-cadherin-beta-catenin protein complex which are possibly mediated by c-Src and myotubularin-related protein 2: an in vivo study using an androgen suppression model. Endocrinology *146*, 1268–1284. https://doi.org/10.1210/en.2004-1194.

Zhang, J., Eto, K., Honmyou, A., Nakao, K., Kiyonari, H., and Abé, S. (2011). Neuregulins are essential for spermatogonial proliferation and meiotic initiation in neonatal mouse testis. Development *138*, 3159–3168. https://doi.org/10.1242/dev.062380.

Zhang, T., Oatley, J., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2016a). DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment. PLoS Genet. *12*, e1006293. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006293.

Zhang, T., Oatley, J., Bardwell, V.J., and Zarkower, D. (2016b). DMRT1 Is Required for Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance and Replenishment. PLoS Genet. *12*, e1006293. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006293.

Zhang, T., Sun, P., Geng, Q., Fan, H., Gong, Y., Hu, Y., Shan, L., Sun, Y., Shen, W., and Zhou, Y. (2021b). Disrupted spermatogenesis in a metabolic syndrome model: the role of vitamin A metabolism in the gut–testis axis. Gut gutjnl-2020-323347. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323347.

Zhang, X., Yamamoto, N., Soramoto, S., and Takenaka, I. (2001). Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testes. Arch. Androl. *46*, 43–49. https://doi.org/10.1080/01485010150211146.

Zhang, X., Xia, Q., Wei, R., Song, H., Mi, J., Lin, Z., Yang, Y., Sun, Z., and Zou, K. (2019). Melatonin protects spermatogonia from the stress of chemotherapy and oxidation via eliminating reactive oxidative species. Free Radic. Biol. Med. *137*, 74–86. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.009.

Zhao, R.-Y., He, S.-J., Ma, J.-J., Hu, H., Gong, Y.-P., Wang, Y.-L., Hu, B.-J., Xie, J.-Z., Tu, W.-Z., Huang, Q., et al. (2018). High expression of TGR5 predicts a poor prognosis in patients with pancreatic cancer. Int. J. Clin. Exp. Pathol. *11*, 3567–3574. .

Zhao, Y., Zhang, P., Ge, W., Feng, Y., Li, L., Sun, Z., Zhang, H., and Shen, W. (2020). Alginate oligosaccharides improve germ cell development and testicular microenvironment to rescue busulfan disrupted spermatogenesis. Theranostics *10*, 3308–3324. https://doi.org/10.7150/thno.43189.

Zheng, K., Wu, X., Kaestner, K.H., and Wang, P. (2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. BMC Dev. Biol. *9*, 38. https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-38.

Zhivotovsky, B., and Kroemer, G. (2004). Apoptosis and genomic instability. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 752–762. https://doi.org/10.1038/nrm1443.

Zhong, M. (2010). TGR5 as a therapeutic target for treating obesity. Curr. Top. Med. Chem. *10*, 386–396. .

Zhou, Q., Li, Y., Nie, R., Friel, P., Mitchell, D., Evanoff, R.M., Pouchnik, D., Banasik, B., McCarrey, J.R., Small, C., et al. (2008). Expression of Stimulated by Retinoic Acid Gene 8 (Stra8) and Maturation of Murine Gonocytes and Spermatogonia Induced by Retinoic Acid In Vitro1. Biol. Reprod. *78*, 537–545. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064337.

Znaor, A., Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Laversanne, M., Kuliš, T., Gurney, J., Sarfati, D., McGlynn, K.A., and Bray, F. (2020). Testicular cancer incidence predictions in Europe 2010-2035: A rising burden despite population ageing. Int. J. Cancer *147*, 820–828. https://doi.org/10.1002/ijc.32810.

Zohni, K., Zhang, X., Tan, S.L., Chan, P., and Nagano, M.C. (2012). The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. Hum. Reprod. *27*, 44–53. https://doi.org/10.1093/humrep/der357.

Zorgniotti, A.W., and Sealfon, A.I. (1988). Measurement of intrascrotal temperature in normal and subfertile men. Reproduction *82*, 563–566. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820563.

Zulu, S., and Kenyon, M. (2018). Principles of Conditioning Therapy and Cell Infusion. In The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses, M. Kenyon, and A. Babic, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 89–96.

Zuo, G., Zhang, T., Huang, L., Araujo, C., Peng, J., Travis, Z., Okada, T., Ocak, U., Zhang, G., Tang, J., et al. (2019). Activation of TGR5 with INT-777 attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis via cAMP/PKCε/ALDH2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. Free Radic. Biol. Med. *143*, 441–453. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.002.