



HAL
open science

Impact de l'invalidation du gène codant pour l'indoleamine 2,3-dioxygénase dans la physiologie de l'épididyme chez les mammifères

Aïcha Jrad Lamine

► **To cite this version:**

Aïcha Jrad Lamine. Impact de l'invalidation du gène codant pour l'indoleamine 2,3-dioxygénase dans la physiologie de l'épididyme chez les mammifères. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2012. Français. NNT : 2012CLF22263 . tel-01980043

HAL Id: tel-01980043

<https://theses.hal.science/tel-01980043>

Submitted on 14 Jan 2019

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

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



Université d'Auvergne - Clermont 1
Université Blaise Pascal- Clermont 2



Université Tunis El Manar
Faculté des Sciences de Tunis

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse
En co-tutelle

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique moléculaire

Présentée par :
Aïcha Jrad Lamine

Intitulée :
**Impact de l'invalidation du gène codant pour l'indoleamine
2,3 -dioxygénase dans la physiologie de l'épididyme chez les
mammifères.**

soutenue le 18/09/2012

Devant le Jury :

Mme Amel GAAIED
M. Patrick THONNEAU
Mme Leila KESKES
M. Jean Luc GATTI
Mme Najoua GHARBI
M. Joël DREVET

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directeur de thèse
Co-directeur de thèse

*Equipe : "Mécanismes de l'infertilité post-testiculaire"
Laboratoire GReD CNRS-UMR 6293- INSERM U1103
Clermont Université*

*Unité « Physiologie des Agressions :
Etudes endocriniennes & métaboliques »
Faculté des Sciences de Tunis*

Je dédie ce travail,

A Amin, qui par tout l'amour qu'il me donne, m'a toujours soutenue et m'a encouragée dans tous les projets que j'ai entrepris, aucun mot n'est suffisant pour exprimer toute ma reconnaissance pour tous les sacrifices que tu as réalisés tout au long de ces années de thèse, merci pour ta patience, pour ton écoute, ton positivisme, et surtout merci d'avoir assuré l'éducation de notre fils durant mon absence, merci de m'avoir remonté le moral à chaque fois que je me sentais loin de vous et que vous me manquiez. Merci également d'avoir supporté mon « agréable » caractère surtout ces derniers mois. Quelle chance de t'avoir comme époux, je ne te remercierais jamais assez pour m'avoir permis de vivre cette aventure. J'espère qu'il y en a aura plein d'autres mais ensemble la prochaine fois inchaallah.

A mon petit Leith, merci de m'aimer toujours autant, merci de m'avoir pardonné mon absence et de m'avoir donné la chance de réaliser ce travail. Je suis si fière de toi, à quatre ans et tu as assuré déjà comme un grand!!! Je te promets que la prochaine fois je t'emmènerais avec moi ou j'irai inchaallah.

A mes parents, qui ont cru en moi et qui m'ont toujours encouragé durant tout mon parcours universitaire. Merci de m'avoir toujours soutenue dans mes choix, merci pour votre soutien inconditionnel, pour votre amour et surtout pour votre disponibilité surtout pour mon fils, merci pour votre aide et votre patience tout au long de cette thèse, si j'en suis arrivée là c'est grâce à vous !!!

4ans déjà! Par rapport à une vie c'est très court, mais je n'oublierais jamais cette magnifique expérience que j'ai vécu. Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont croisé mon parcours professionnel ou personnel durant cette période et qui m'ont tant apporté!!

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à Monsieur Patrick THONNEAU et Madame le Professeur Amel GAIED d'avoir accepté d'être rapporteurs et de donner de leur temps pour juger ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Jean Luc GATTI ainsi qu'à Madame le Professeur Leïla KESKES pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Un immense merci au Professeur Joël Drevet, mon co-directeur de thèse, sans qui, ce travail n'aurait jamais pu être mené à terme. Je le remercie de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche « Mécanismes d'infertilité post-testiculaires », de m'avoir accordé sa confiance afin de la mener à bien et surtout merci de m'avoir donné la chance de travailler avec vous et de faire partie de ce projet si captivant qu'est l'IDO. Je le remercie également pour la qualité de son encadrement, sa rigueur scientifique, la pertinence de ses remarques et pour sa disponibilité quotidienne. J'ai été aussi très sensible à ses qualités humaines exceptionnelles d'écoute et de compréhension. Je vous remercie pour tous les efforts que vous avez fournis dans l'élaboration de ce travail et qui a donné toute sa valeur à cette thèse, merci pour votre gentillesse, votre encouragement et votre soutien moral et surtout votre aide sans égal à la recherche de financement afin de m'assurer un séjour dans les meilleures conditions. Quelle chance de t'avoir eu comme directeur de thèse !!!

Je remercie chaleureusement Madame le Professeur Najoua Gharbi, ma co-directrice de thèse d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir accueillie dans son unité « Endocrinologie et Physiologie des Aggressions ». Merci pour votre confiance, pour vos conseils professionnels et personnels. Merci pour vos encouragements qui m'étaient d'un grand appui tout au long de cette thèse, merci également pour votre soutien financier qui m'a permis d'assurer une grande partie de ce travail dans les meilleures conditions. Merci également de m'avoir donné la chance d'essayer la magnifique expérience qu'est l'enseignement.

Merci à tous les membres de l'équipe pour m'avoir aidé chacun à sa façon à l'élaboration de ce travail :

Je remercie particulièrement Madame Joëlle Henry-Berger de m'avoir guidée et suivie, ainsi que pour sa collaboration pendant dans toute la partie expérimentale de cette thèse. Merci également de m'avoir initiée à la culture cellulaire et de m'avoir aidée à me familiariser avec les différentes techniques de la biologie moléculaire. Merci Joëlle pour ton aide et pour ta grande participation dans la correction de ce travail. Je te remercie également pour ta gentillesse et surtout pour tous les conseils pratiques qui m'ont permis d'évoluer tout au long de ces quatre années.

Merci à Christelle Damon-Soubeyrand pour son aide technique si précieuse en histologie. Merci pour ta grande disponibilité, tu as su répondre à toutes mes questions malgré ton emploi du temps si chargé !!! Je te remercie également pour ton soutien moral et surtout pour toutes les bonnes discussions que nous avons eues.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Rémi Cadet pour sa contribution dans la réalisation de ce travail. Je le remercie également pour ses remarques importantes et pour ses conseils, notamment en physiologie. Merci de m'avoir fait découvrir le grand répertoire de la cornemuse. J'ai adoré !!!

Merci au Docteur Fabrice Saez pour ses conseils scientifiques et pratiques. Merci Fabrice pour les petits moments de détente et pour ta bonne humeur quotidienne et surtout pour tes encouragements et ton appui durant tous mes séjours.

Un grand merci au docteur Ayhan Kocer. Merci grand frère pour tes encouragements, pour tous les conseils scientifiques et personnels, merci d'avoir été présent à chaque fois que je craquais au labo. Merci aussi pour ta joie de vivre contagieuse qui m'a été d'un grand support dans mon quotidien tout au long de cette thèse.

Merci à Aurélia, pour tous les conseils scientifiques qu'elle m'a donnés. Merci aussi pour toutes les discussions et les pauses café que nous avons partagées, merci pour les bons moments qu'on a eus entre filles, je te souhaite plein de bonheur pour la suite.

Merci à Anaïs, merci pour ta gentillesse et pour ta compagnie, merci pour ton aide en informatique si précieuse !! Merci également pour les petites pauses culinaires et les sorties du dimanche à la découverte de l'Auvergne, j'aurais aimé continuer avec toi notre aventure de globe-trotteuses. Je te souhaite plein de courage pour ta thèse.

Je tiens aussi à remercier les autres membres de l'équipe présents et passés pour m'avoir aidé à mon arrivée au laboratoire chacun à sa façon et à qui je souhaite plein de courage pour la suite un grand merci à Eléonore et à Ting, Pascal, Patrick, Alain et Françoise.

Une tendre pensée à Emilie Viennois, merci pour les pauses café et les soirées cinéma et resto sympathiques qu'on a partagées.

Une pensée aussi à Pierre Val et Michèle Manin, je les remercie pour leur sympathie et pour leurs conseils scientifiques qui m'ont accompagné tout au long de mon séjour en France.

Merci à tous mes amis Tunisiens que j'ai connus à Clermont-Ferrand, Khoula, Imen, Dalila, Wassim et surtout Aicha et Senda, merci de m'avoir épaulé quand je craquais. Merci Senda pour ta compagnie, pour ta présence et surtout pour les soirées skype chez toi qui m'ont permis de rester connectés aux miens !!! Bon courage pour la suite. Merci Aicha pour ton appui et tes encouragements. Merci aussi aux deux Houssam pour leur joie de vivre et leur compagnie et merci surtout pour m'avoir fait découvrir les saveurs égyptiennes et libanaises.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de mon équipe Tunisienne :

Un grand merci à Madame le Professeur Saloua Fâzaa pour ses encouragements et ses grandes qualités humaines et scientifiques. Merci pour m'avoir donné la chance de goûter à cette belle expérience qu'est l'enseignement.

A Monsieur Abdelhamid Msellemi, merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et surtout merci pour votre grande implication, notamment côté administratif, qui a permis de faciliter mes séjours et mes déplacements en France tout au long de cette thèse.

Merci à Ines et à Montasser pour votre soutien moral, pour vos encouragements, votre aide et surtout votre bonne humeur durant toute cette thèse, merci à Alya, à Slimen, à Hanane et à Narjes.

Une grande pensée à Madame le Professeur Omkoulthoum Ben Hassine pour sa participation dans l'édification de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères aux autres membres de ma famille :

A ma sœur Nesrine et mon frère Mehdi, merci pour votre écoute, pour votre soutien constant et pour vos encouragements tout au long de cette thèse.

A mes beaux parents, merci d'avoir été présents et de m'avoir aidé toute au long de cette thèse, merci pour votre disponibilité et votre amour qui m'ont été d'un grand renfort dans la réalisation de ce travail. Merci d'avoir pris soin de mon fils durant mon absence.

A mon beau frère Elyes, merci pour tous les efforts que tu as fourni afin de me permettre de réaliser cette thèse, c'est grâce à toi que j'ai pu avoir la chance de travailler sur ce projet, merci pour tes encouragements et tes conseils si précieux. Merci également pour ton accueil chaleureux et pour les agréables randonnées et escapades que tu m'a fait partager, j'ai adoré !!!

A ma belle-sœur Wafa, merci de m'avoir aidé et encouragée tout au long de cette thèse, merci pour tous tes conseils scientifiques et professionnels. Merci également de m'avoir tenu compagnie par tes appels quotidiens qui me réchauffaient le cœur et qui me tranquillisaient à chaque fois que je décidais de lâcher et de rentrer retrouver mon fils, merci pour ton grand soutien moral. Je te remercie aussi pour les week-ends découvertes et détente que j'ai passés avec vous,

A ma belle sœur Roya, merci pour tes encouragements et ton soutien durant toute cette thèse. Merci pour tes conseils professionnels et personnels. Merci pour ta bonne humeur et ta joie de vivre.

Merci du fond du cœur à toute la petite famille Bouzgarrou , Chedly, Sonia et Sirine, ma famille d'accueil. Vous m'étiez d'un grand soutien moral tout au long de cette thèse, merci, de m'avoir hébergée chez vous. Merci Chedly pour tous les conseils professionnels, merci de m'avoir fait découvrir Clermont et ses alentours. Merci Sonia pour ton écoute, merci de m'avoir épaulée à chaque fois que je craquais, de m'avoir aidé à gérer et supporter l'éloignement de mon fils et surtout merci pour l'ambiance tunisienne qui m'a permis de surmonter les nombreuses difficultés que j'ai eu tout au long de mes séjours en France loin de ma famille.

Enfin je tiens à remercier tous les organismes qui ont participé à financer cette thèse : le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique Tunisien, l'unité Endocrinologie et physiologie des agressions métaboliques et endocriniennes à la faculté des Sciences de Tunis, la société d'andrologie de langue française SALF, l'école doctorale des Sciences de la vie à la Faculté des Sciences de Tunis et à l'UFR Sciences et Technologies, Clermont –Ferrand et enfin le Conseil Régional de Puy de Dôme, France.

*Ce n'est pas parce que les choses nous semblent inaccessibles,
que nous n'osons pas;
C'est parce que nous n'osons pas, qu'elles nous semblent inaccessibles.*

Sénèque

Sommaire

Abréviations

Résumé

Introduction 1

Etude bibliographique 4

I. La production de gamètes mâles féconds.....	5
1. La spermatogenèse.....	5
a. La phase proliférative.....	6
b. La phase méiotique.....	6
c. La spermiogenèse.....	6
▪ La tête spermatique.....	7
▪ La pièce intermédiaire et le flagelle.....	7
2. La maturation épидидymaire des spermatozoïdes.....	8
a. Structure de l'épididyme.....	9
b. Histologie de l'épididyme.....	10
c. Le compartiment luminal.....	12
d. Les sécrétions épидидymaires.....	13
e. Les rôles de l'épididyme.....	15
▪ Le transport et stockage des spermatozoïdes.....	15
▪ La maturation des spermatozoïdes.....	15
▪ La protection des spermatozoïdes.....	20
f. La barrière hémato-épидидymaire (BHE).....	21
g. Les cellules de l'immunité dans l'épididyme.....	21
h. L'épididyme : un site de privilège immun.....	25
3. L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO).....	30
a. IDO et le métabolisme du tryptophane.....	32
b. La régulation de l'expression d'IDO.....	35
▪ Les inducteurs d'IDO.....	35
▪ Les inhibiteurs d'IDO.....	38
c. Structure et propriétés catalytiques d'IDO.....	40
d. Rôles associés à l'activité IDO.....	41
▪ Rôle antiprolifératif.....	41
▪ IDO un contrôleur de la réponse immune adaptative.....	42

Transition vers les travaux de thèse..... 52

Matériels et méthodes 55

I. Modèle animal.....	56
II. Mesures de constantes physiologiques –traitements.....	56
1. Mesures de constantes physiologiques.....	56
2. Test de fertilité.....	56
3. Blocage de la spermatogénèse.....	56
4. Prélèvements des organes, préparation de plasma, collecte des spermatozoïdes.....	57
a. Organes.....	57
b. Plasma.....	57
c. Spermatozoïdes.....	57
III. Analyses tissulaires.....	58
1. Préparation des tissus.....	58

a.	Fixation.....	58
b.	Déshydratation et inclusion	58
c.	Coupes histologiques.....	58
2.	Coloration Trichrome de Masson Goldner.....	59
3.	Coloration Héamatoxyline-éosine	59
4.	Immunohistochimie sur coupe d'épididyme.....	60
5.	Immunofluorescence sur coupe d'épididyme.....	61
6.	Analyse structurale des épидидymes par microscopie électronique	61
7.	Cytométrie de flux.....	62
a.	Préparation des cellules stromales de tissu adipeux.....	62
b.	Préparation des cellules de tête d'épididyme	63
c.	Analyse des cellules par cytométrie de flux	63
8.	Culture organotypique d'épididyme.....	64
a.	Culture des organes.....	64
b.	Incorporation de méthionine [³⁵ S]	64
IV.	Analyses cytologiques.....	65
1.	Préparation des spermatozoïdes	65
2.	Test de viabilité.....	65
3.	Estimation de la présence de leucocytes dans le fluide séminal	66
4.	Coloration de Shorr	66
5.	Immunofluorescence sur spermatozoïdes.....	67
V.	Analyses transcriptionnelles	67
1.	Extraction des ARN totaux.....	67
2.	Réverse transcription.....	68
3.	PCR.....	68
4.	QPCR.....	68
VI.	Analyses protéiques.....	69
1.	Extraction des protéines	69
2.	Western blot.....	69
3.	Mesure de l'activité du protéasome	70
4.	Dosage des cytokines par Cytokine Array	71
VI.	Analyses métaboliques	71
1.	Céramides,cholestérol et sphingomyéline	71
2.	Kynurénines	72
VII.	Analyses statistiques.....	73
	Résultats	74
I.	Expression de l'enzyme IDO1 dans l'épididyme de souris sauvages et de souris KO.....	75
1.	La protéine IDO1	75
2.	Les transcrits d'IDO1	75
3.	Expression des autres enzymes du catabolisme du tryptophane dans l'épididyme murin des animaux sauvages et chez les KO	76
II.	Evaluation de la voie des kynurénines chez les animaux sauvages et les animaux <i>Ido1</i> ^{-/-}	77
1.	Expression des enzymes de la voie des kynurénines.....	77
2.	Accumulation des métabolites de la voie des kynurénines dans l'épididyme ...	77
a.	Chez les animaux sauvages	77
b.	Chez les animaux <i>Ido1</i> ^{-/-}	79

III. Influence de la perte d'activité d'IDO1 sur les autres voies d'utilisation du tryptophane dans l'épididyme des souris <i>Ido1</i> ^{-/-}	79
1. Les voies de production de l'acide indoxylacétique et de la sérotonine/mélatonine.....	79
2. La synthèse protéique	80
IV. Influence de la perte d'activité d'IDO1 sur l'état inflammatoire du tissu épидидymaire	83
1. Le ratio Kynurénine/Tryptophane	83
2. Analyse de l'état inflammatoire du tissu épидидymaire dans le fond sauvage et <i>Ido1</i> ^{-/-}	84
a. Les cytokines classiques de l'inflammation	84
▪ Activation de la voie TNF.....	85
○ Activation de NF-κB	85
○ Activation de la voie des céramides.....	86
b. Les autres chémokines et cytokines inflammatoires	86
c. Modification de l'équilibre Th17/Treg.....	88
d. Modification de l'équilibre Th1/Th2	89
e. Autres signes inflammatoires dans les têtes d'épididyme des animaux <i>Ido1</i> ^{-/-}	90
▪ Elévation de la leptine périphérique.....	90
▪ Distorsion du ratio Oméga6/Oméga3.....	90
▪ Perte ciblée du tissu adipeux péri-épидидymaire chez les animaux KO pour <i>Ido1</i> ^{-/-}	92
3. Les kynurénines dans l'épididyme et au niveau des spermatozoïdes.....	94
a. L'acide kynurénique (KA) et la 3-hydroxykynurénine (HK) dans l'épithélium épидидymaire	94
▪ KA.....	94
▪ HK	95
b. L'acide kynurénique (KA) et la 3-hydroxykynurénine (HK) sur le spermatozoïde murin	96
▪ KA.....	96
▪ HK	96
c. Approches préliminaires dans l'identification de protéines spermatiques modifiées par kynurénilation	96
V. L'invalidation d'IDO1 a-t-elle un impact sur la fertilité des animaux et sur les paramètres spermatiques ?	97
1. Fertilité des mâles <i>Ido1</i> ^{-/-}	97
2. Paramètres spermatiques des mâles <i>Ido1</i> ^{-/-}	98
Discussion	102
I. IDO1 et les métabolites résultant de l'activité IDO1 dans l'épididyme des souris sauvages et des souris KO pour IDO1	103
1. Les enzymes de dégradation du tryptophane dans l'épididyme murin	103
2. Les métabolites issus de la dégradation du tryptophane par IDO1 dans l'épididyme de souris sauvages et KO.....	104
II. Rôles potentiels des kynurénines dans la physiologie de l'épididyme et des gamètes mâles.....	106
1. Modulateurs de l'immunité.....	106

2. Modificateurs post-traductionnels de protéines.....	107
3. Découpleurs mitochondriaux	108
4. KA : un antagoniste de la signalisation glutamatergique	109
III. IDO1 : un modulateur de l'état inflammatoire et de l'installation d'un état d'immunos tolérance dans la tête de l'épididyme	109
1. La perte de l'IDO1 dans l'épididyme modifie les balances des sous-populations T (Th1/Th2/Th17/Treg)	114
a. Déplacement de l'équilibre Th17/Treg.....	116
b. Déplacement de l'équilibre Th1/Th2 vers une réponse de type Th1....	116
c. Quelques pistes pour expliquer le nouvel équilibre Inflammation/ Immuno-tolérance atteint par le tissu épидидymaire des animaux KO pour IDO1.....	118
IV. L'invalidation d'IDO1 ne perturbe pas la fertilité des animaux mais diminue la qualité de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes	121
Conclusions & perspectives	124
Références bibliographiques	128
Annexes.....	160

Abréviations

1-MT	1-méthyltryptophane
5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid
5-HT	Sérotonine
ACTH	Adrenocorticotrophic hormone
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APCS	Cellules présentatrices d'antigène
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hématoencéphalique
Bmp	Bone morphogenetic proteins
BSA	Bovine serum albumin
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Cox 2	Cyclooxygenase 2
CpG-ODNs	unmethylated cytidyl guanosyl
DAB	diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritic cell
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium F12
DMSO	DiMéthylSulfOnate
eDC	Epididymal Dendritic Cells
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
Fas-lig	Fas -Ligand
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FOXP3	Forkhead box P3
GAS	Gamma-interferon activation sequences
GATA-3	Facteur de transcription GATA-3
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-SCF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GPCR	récepteurs couplés aux protéines G
HK	3-hydroxy-kynurénine
IDO	Indoléamine 2,3-dioxygénase
ITS	insuline transferrine sélénium
IFN	Interféron
I-κB	Inhibitor of Nuclear factor kappa B
IL-n	Interleukine-n
INF-γ	IFN gamma
IRF-1	IFN-regulatory factor-1
ISS-ODN	synthetic immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide
ISRE	Interferon-stimulated response elements
ITAC	Interferon-inducible T cell α-chemoattractant
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KAT	kynurénine aminotransférase II
KA	Acide kynurenique
KO	Knock Out
KMO	kynurénine-3-monooxygénase
KYN	L-Kynurénine
KYNA	acide kynurénique

LAT-1	L-type amino acid transporter 1
LC-ESI-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LNAAs	Large neutral amino acids
LPS	Lipopolysaccharide bactérien
L-Trp	L-tryptophane
MCP	Protéine chimiotactique des monocytes
MIG	Monokine induite par l'interféron- γ
MIP	Proteine inflammatoire des macrophages
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NaMN	Acide nicotinique mononucléotide
NDMA	N-méthyl D-aspartate
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NK	natural killer
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffer Saline
PFA	Paraformaldéhyde
PGE2	prostaglandines E2
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
Q-PCR	Quantitative-Polymerase Chain Reaction
QUIN	Acide quinolinique
RANTES	Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
RORγ	RAR-related orphan receptor gamma
RORc	RAR-related orphan receptor c
rpm	rotation en tour par minute
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
SOCS3	suppressor-of-cytokine signaling 3
SOD	SuperOxyde Dismutase
STAT	signal transducer and activator of transcription
SVF	Sérum de Veau Foetal
T^{CD8+}	cellules T cytotoxiques
TAE	Tampon Tris, Acétate, EDTA
TARC	Thymus and Activation-Regulated Chemokine
Tbet	Facteur de transcription Tbet
TBS	Tris Buffer Saline
T^{CD3+DN}	Cellule T CD ³⁺ double négatives
TCA3	T-cell activation gene 3
TDO	tryptophane 2-3-dioxygénase
TGF	transforming growth factors
TGFβ	transforming growth factor beta
Th	Cellules T helpers
TEMED	N,N,N',N'-TEtraMéthylEthyleneDiamine
TLR	Toll-like receptors
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFbp	TNF binding protein

TNF-α	facteur de nécrose tumoral alpha
Treg	Lymphocytes T régulateurs
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WT	Wild Type

Résumé

Chez les mammifères, IDO1, une enzyme induite dans les situations inflammatoires, joue des rôles multiples et complexes dans le cadre des réponses immunes innées et acquises. De façon intéressante, IDO1 est constitutivement exprimée par l'épithélium épидидymaire où il est envisagé qu'elle participe à l'installation d'une situation d'immunotolérance vis à vis des spermatozoïdes lesquels constituent un « challenge » immunologique pour le mâle qui les fabrique. Afin d'aborder le(les) rôle(s) joué(s) par IDO1 et ses produits d'activité (ie. les kynurénines) dans la physiologie de l'épididyme et, plus largement, dans la fonction de reproduction, le travail présenté dans ce manuscrit décrit les résultats acquis sur le modèle murin *Ido1*^{-/-} en termes de phénotypes épидидymaires, spermatiques ainsi qu'en terme d'impact sur la fertilité des animaux KO. Les données présentées suggèrent qu'IDO1 est effectivement un acteur immunosuppresseur dans l'épithélium épидидymaire contribuant au privilège immun accordé par ce territoire aux gamètes mâles. L'absence d'IDO1 génère au sein de l'épididyme des perturbations d'ordre inflammatoire néanmoins corrigées par diverses réponses qui préservent l'équilibre immun et fonctionnel du tissu. Ce travail met en outre en évidence que certaines kynurénines sont particulièrement représentées dans l'épididyme et au niveau des gamètes mâles où elles pourraient jouer des rôles variés.

In mammals, IDO1 is induced in inflammatory situations and plays multiple and complicated roles in the modulation of both innate and adaptative immune responses. Interestingly, IDO1 is constitutively expressed by the epididymal epithelium where it is envisaged that it participates in the set up of an immunotolerant environment in order to down-regulate auto immune-responses against spermatozoa. To decipher the roles played by IDO1 in the physiology of the epididymis and consequently in the male reproductive function, we show in this thesis report data obtained on the IDO1 knock-out mouse model. Data collected suggest that indeed IDO1 is an immunomodulatory player in the epididymis epithelium where it contributes to the immunotolerogenic context towards spermatozoa. When absent (ie. in the *Ido1*^{-/-} genetic background) it specifically increases epididymal inflammation and triggers various tissue responses that aim at restoring the immune equilibrium. In addition, the work presented here shows that some kynurenines are particularly well represented in the epididymal epithelium as well as on spermatozoa where they could play important roles.

Introduction

Elaboré au sein du testicule à la maturité sexuelle, c'est à dire chez les mammifères bien après l'établissement du répertoire immun de l'individu qui permet de discriminer le soi du non soi, le spermatozoïde constitue un « challenge » immunologique pour le mâle qui les produit. Ainsi, une situation de privilège immun ou tolérance immune doit être établie au niveau de la gonade mâle et dans les organes sexuels annexes (tubules collecteurs et excréteurs) de façon à ce que les gamètes mâles ne puissent conduire à l'engagement d'une réponse auto-immune. La capacité des gamètes mâles à échapper au système immunitaire de l'hôte associée à l'observation que l'inflammation systémique est inhibitrice de la fonction reproductrice mâle sont deux situations étonnantes et particulières de la fonction de reproduction mâle. Comprendre les bases de ces phénomènes est particulièrement important en physiologie de la reproduction des mammifères.

Les stratégies mises en œuvre au sein du testicule et de l'épididyme pour assurer cette anergie de la réponse immune vis à vis des gamètes mâles ne sont pas identiques. L'environnement immunologique et l'organisation de l'épithélium séminifère sont très différents de ceux de l'épididyme. Par exemple, en comparaison avec le cloisonnement efficace du aux nombreuses jonctions serrées qui verrouillent l'épithélium Sertolien, l'épithélium épидидymaire est beaucoup plus perméable (voir plus loin). Une preuve de cette perméabilité plus importante est donnée par le fait que l'on observe fréquemment des cellules immunitaires dans l'épithélium épидидymaire, voire même dans la lumière du tubule épидидymaire. De la même façon, l'épididyme n'est pas un territoire dans lequel des greffes allogéniques survivent longtemps alors que cette situation de privilège immun existe dans le testicule. Ainsi, la tolérance immune qui existe au sein de l'épididyme vis à vis des gamètes est sans doute plus fragile que celle existant au sein du testicule. L'apparition fréquente d'anticorps anti-spermatozoïdes suite à des altérations de l'épithélium épидидymaire, comme cela peut-être le cas après une vasectomie prolongée, témoigne aussi de cette situation de tolérance immune plus fragile de l'épididyme vis à vis des spermatozoïdes. Les observations cliniques sont elles aussi en accord avec cette idée que la réponse immune est contrôlée différemment dans l'épididyme et le testicule puisque les épидидymites (inflammation de l'épididyme) sont largement plus fréquentes que les orchites (inflammation du testicule).

Dans ce travail nous allons dans une première partie bibliographique rappeler au lecteur les bases de la spermatogenèse testiculaire et, surtout, de la maturation post-testiculaire des gamètes essentiellement assurée lors du transit épидидymaire. Un accent sera donné à l'organisation anatomique et structurale des territoires testiculaires et épидидymaires en liaison avec la compartimentalisation de la production, de la maturation fonctionnelle et du stockage des gamètes mâles. L'étude bibliographique sera ensuite concentrée sur un acteur particulier, objet des travaux de thèse qui m'ont été confiés. Cet acteur, une enzyme de l'inflammation connue sous le nom d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) s'est révélée ces dernières années, dans d'autres contextes, comme un élément important dans la modulation de la réponse immune innée et adaptative. Plus particulièrement, l'activité IDO est associée à l'immunosuppression et son expression est remarquée dans les situations d'immuno-privilège et d'immunotolérance telles que l'implantation et le non rejet du fœtus allogénique. Dès 1980, il avait été rapporté que l'activité IDO était particulièrement forte dans l'épididyme des mammifères. Depuis cette observation initiale, aucun travail n'avait approfondi les rôles joués par IDO dans la physiologie de ce territoire et plus largement dans la fonction de reproduction mâle.

Etude
bibliographique

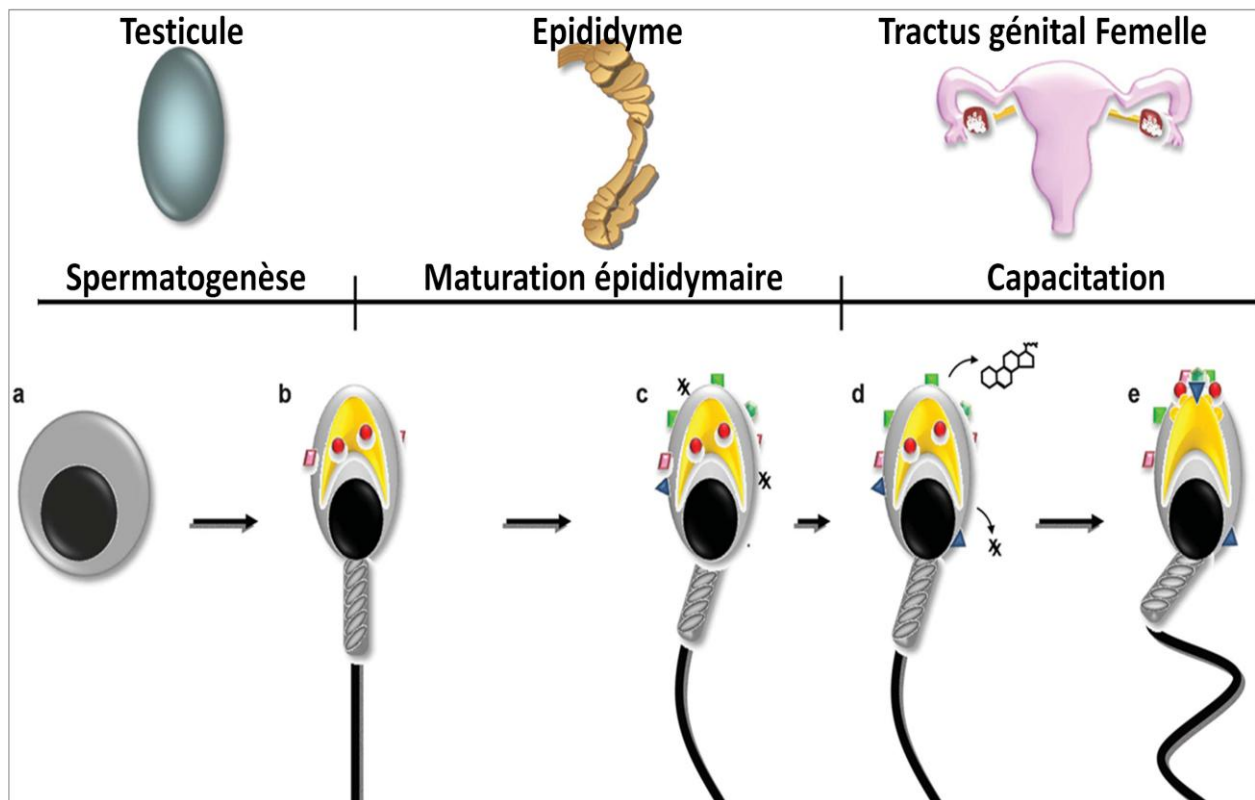


Figure B1: Les différentes étapes de la maturation des gamètes mâles
 (d'après Reid *et al.*,2011).

a: spermatogonie, b: spermatozoïde morphologiquement mature, c : durant le transit épидидymaire, un remodelage de la surface du spermatozoïde a lieu, incluant une modification de ses protéines de surface. , d : pendant le début de la capacitation : deux évènements majeurs à la surface du spermatozoïde ont lieu : l'efflux de cholestérol et l'élimination d'autres molécules comme les DFs (X), e : pendant la deuxième phase de capacitation, d'autres modifications de lipides ont lieu incluant aussi la mise en place de récepteurs moléculaires à la surface du spermatozoïde, nécessaires pour l'interaction avec la ZP plus tard pendant la fécondation.

DF: facteur de décapacitation, ZP: zone pellucide

I. La production de gamètes mâles féconds

Les spermatozoïdes sont des cellules haploïdes produites dans les gonades mâles ou testicules. Ils transitent ensuite dans les voies génitales mâles, où ils sont stockés. A l'éjaculation, ils reçoivent les sécrétions des glandes mâles annexes (vésicules séminales et prostate) et remontent les voies génitales femelles pour aller féconder un ovule dans le tiers supérieur des trompes utérines. Avant d'arriver à cette dernière étape de fécondation qui assure la pérennité des espèces, les gamètes mâles sont soumis à plusieurs phases de maturation pendant leur « vie » post-testiculaire d'abord chez le mâle puis chez la femelle. Ces modifications post-testiculaires des gamètes mâles leur conféreront leur « pouvoir fécondant » que l'on peut résumer à leur aptitude à se mouvoir, à reconnaître et à pénétrer le gamète femelle. L'ensemble de ces processus de maturation post-testiculaire est divisé en deux volets : le volet mâle, représenté essentiellement par les événements de la maturation épидидymaire et, à l'éjaculation, par l'apport des sécrétions séminales et prostatiques ; le volet femelle, représenté par les événements de la capacitation et de la réaction acrosomique (voir figure B1).

Etant donné que mon étude est consacrée à l'épididyme mon propos introductif sera limité au volet mâle de la production et de la maturation gamétique.

1. La spermatogenèse

La spermatogenèse est l'ensemble des phénomènes qui, des spermatogonies, cellules souches diploïdes, aboutissent aux spermatozoïdes, gamètes mâles haploïdes (Dadoune & Demoulin, 2001). La spermatogenèse a lieu dans les tubes séminifères du testicule. Elle débute à la puberté, dure 74 jours et produit plus de 100 millions de spermatozoïdes par jour et par testicule chez l'homme (à titre d'exemple). Chez les mammifères, la spermatogenèse comprend trois phases (figure B2) :

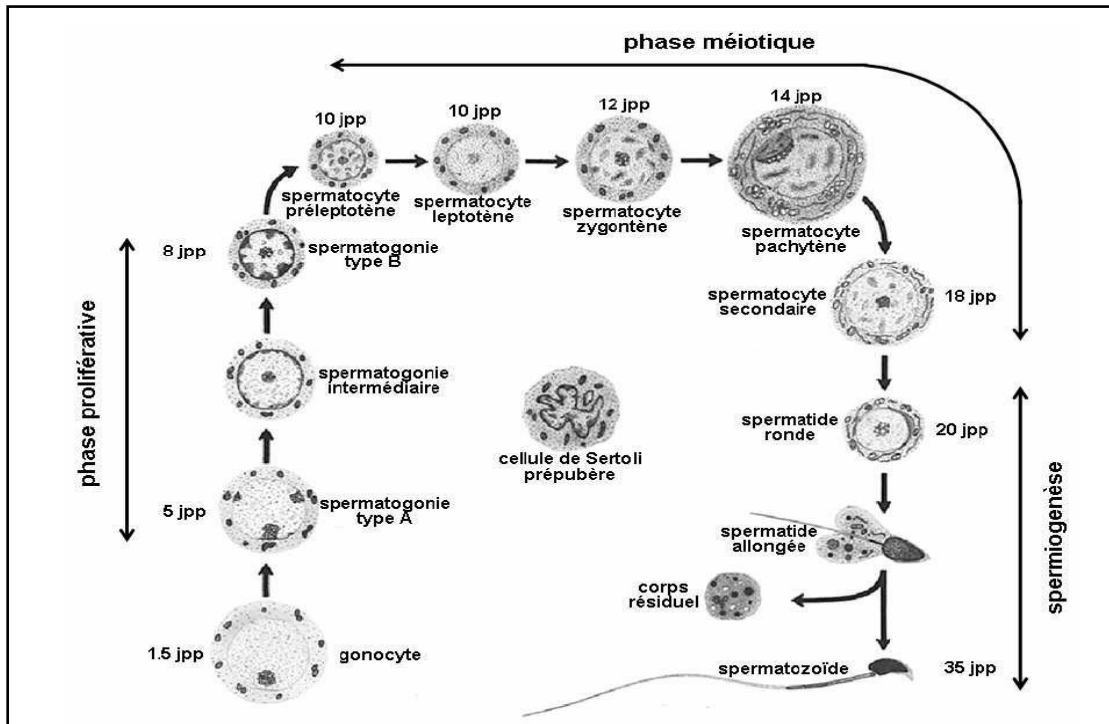


Figure B2 : Les différentes phases de la spermatogénèse
(d'après de Rooij *et al.*, 2001).

Jpp : âge en jours post partum

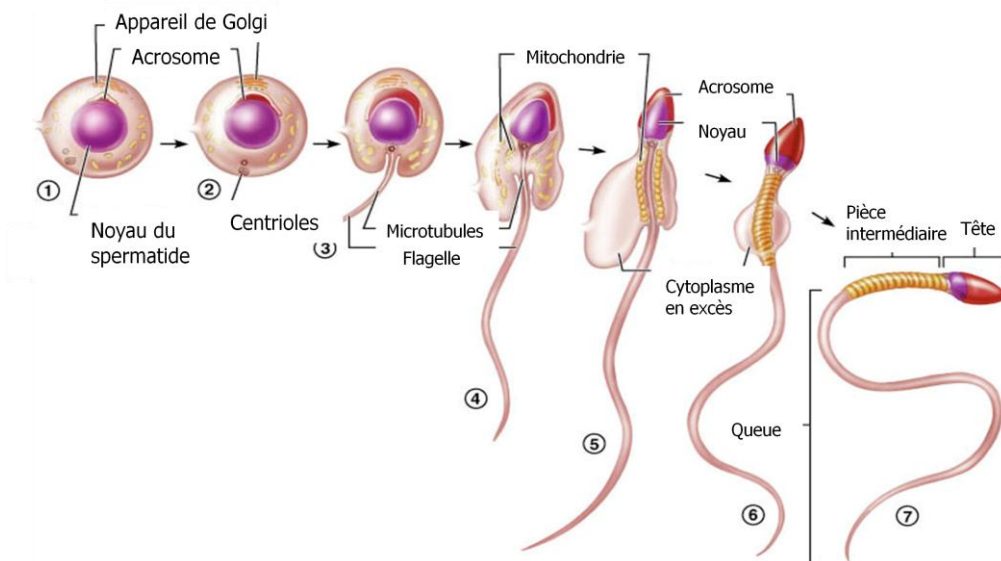


Figure B3 : Les différentes étapes de la spermiogénèse.

a. La phase proliférative

Les spermatogonies, cellules embryonnaires sont localisées le long de la membrane basale du tube séminifère. Un certain nombre de spermatogonies (de type A) se divisent par mitose et contribuent ainsi au renouvellement continu de l'épithélium séminifère. Une partie de ces cellules cesse de se multiplier et se différencie en spermatogonies de type B. La division mitotique finale des spermatogonies de type B donne naissance aux spermatocytes primaires.

b. La phase méiotique

Le passage de $2n$ à n chromosomes se produit au cours de cette phase. Les spermatocytes primaires se divisent en spermatocytes secondaires, qui se différencient en spermatides haploïdes par deux divisions méiotiques successives : une division réductionnelle et une division équationnelle, à l'issue de laquelle on obtient quatre cellules filles à n chromosomes.

c. La spermiogenèse

Au cours de cette phase de cytodifférenciation, les spermatides vont se transformer en spermatozoïdes (figure B3). Ce processus complexe implique plusieurs changements morphologiques comme la formation d'un flagelle qui autorisera la mobilité, l'élimination de l'excès de cytoplasme des spermatides par phagocytose *via* la cellule de Sertoli, la réorganisation des organites cytoplasmiques tels que : la condensation du noyau spermatique, le rassemblement d'une partie des vésicules de l'appareil de Golgi pour former l'acrosome qui contient des enzymes protéolytiques nécessaires aux spermatozoïdes lors de l'interaction avec l'ovule, et le regroupement des mitochondries au niveau de la pièce intermédiaire. Au cours de ce processus, la tête des spermatides fait face au compartiment basal de l'épithélium séminifère. La dernière étape dite de spermiation consiste à la translocation des spermatides de la surface de l'épithélium vers la lumière du tube séminifère.

Ainsi, à la sortie des testicules, les spermatozoïdes sont des cellules haploïdes hautement différenciées et polarisées. Ils sont arbitrairement constitués de 3 régions distinctes: la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle (figure B4).

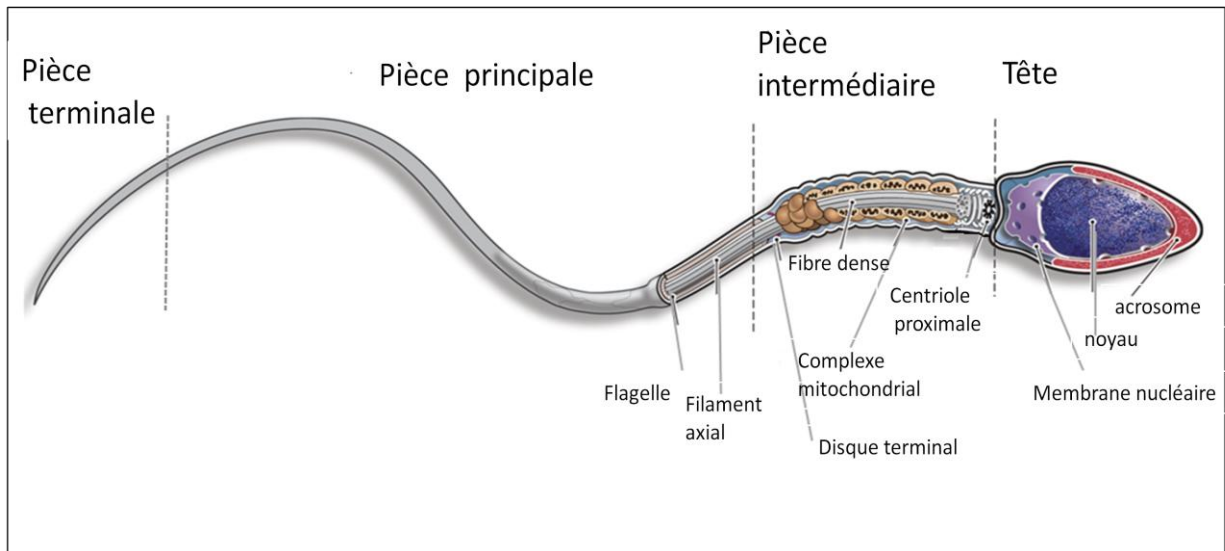


Figure B4 : Structure d'un spermatozoïde

(d'après Du Plessis *et al.*, 2010).

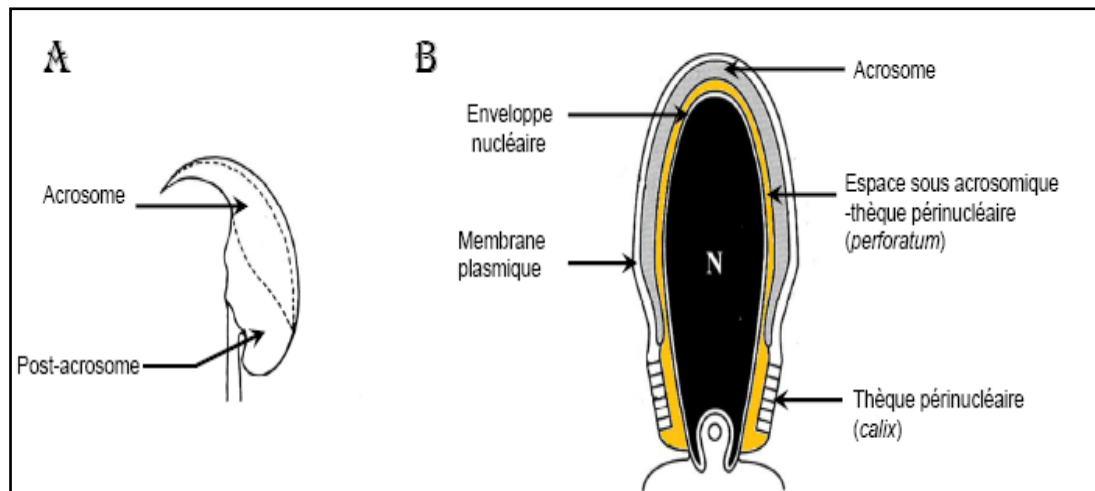


Figure B5 : Dessin de la tête d'un spermatozoïde de souris

(D'après Toshimori K & Ito, 2003).

A : Dessin en vue externe

B : Dessin de la coupe longitudinale de la tête, N : Noyau

▪ La tête spermatique

La forme de la tête spermatique est très variable d'une espèce à l'autre. Elle est aplatie et effilée chez l'homme alors que chez la souris elle est courbée et crochue (figure B5). Cependant, elle comprend toujours un noyau haploïde où l'ADN est fortement condensé. Le cytoplasme est très peu présent et l'essentiel de l'espace est occupé par le noyau et l'acrosome. Le noyau dense a vu sa taille considérablement diminuée (1/10ème de la taille d'un noyau d'une cellule somatique) au cours de la spermiogenèse par le remplacement des histones nucléosomales par de petites protéines basiques, les protamines. Ces protamines, sont riches en résidus arginine et cystéine. Ces dernières portent des groupements thiols qui secondairement, dans la phase post-testiculaire de la maturation des spermatozoïdes (lors de la descente épидидymaire) vont participer à la compaction accrue du noyau spermatique et à son verrouillage dans un état condensé par pontage disulfure (Noblanc *et al.*, 2011).

L'acrosome est une vésicule d'origine golgienne limitée par une membrane. A l'avant, la membrane « externe » de l'acrosome est accolée à la membrane plasmique et à l'arrière, la membrane « interne » de l'acrosome épouse le noyau. Son contenu est riche en enzymes protéolytiques (type hyaluronidase...) qui seront libérées lors de la réaction acrosomique (figure B6) et contribueront à faciliter la progression du gamète mâle au travers des matrices extracellulaires qui entourent les cellules de la *corona radiata* et au sein de la zone pellucide qui enveloppe l'ovule (figure B7).

▪ La pièce intermédiaire et le flagelle

Le flagelle est la structure locomotrice du gamète mâle qui permet d'amener le contenu chromosomique paternel jusqu'au gamète femelle. Il est constitué de 3 parties : les pièces dites, respectivement, intermédiaire, principale et terminale. La pièce intermédiaire correspond à la jonction entre la tête spermatique et le flagelle. Elle comprend les centrioles dont un qui s'est transformé en corpscule basal pendant la spermiogenèse et a donné naissance à l'axe flagellaire ou axonème entouré d'une gaine protéique fibreuse. Le complexe mitochondrial est disposé en manchon autour de l'axonème. Il assurera une production importante d'ATP utilisé pour les battements flagellaires lorsque les conditions de pH, de concentration en substrat énergétique et, à

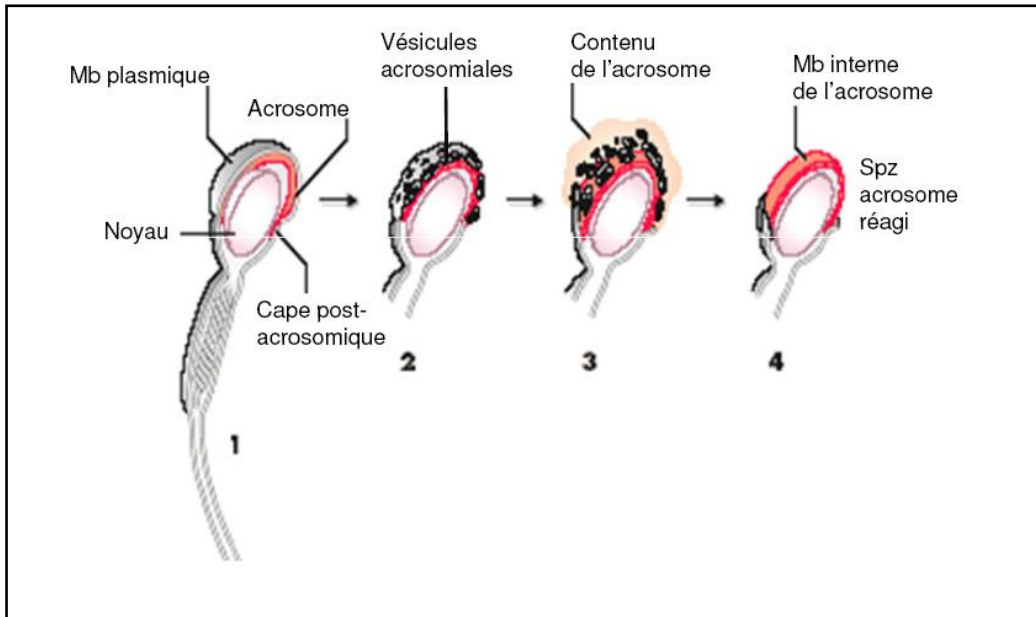


Figure B6 : Réaction acrosomique.

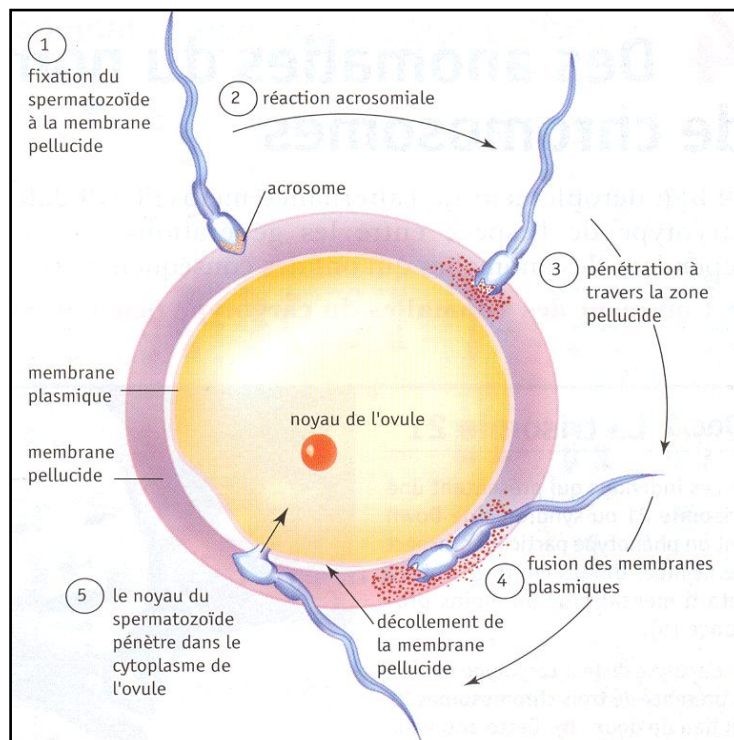


Figure B7 : Les différentes étapes de la fécondation.

l'éjaculation, après dilution par l'apport des sécrétions des vésicules séminales et de la prostate de protéines « immobilisantes » rendront possibles les mouvements flagellaires. La pièce principale qui correspond à la partie la plus longue du flagelle comprend l'axonème et la gaine conjonctive fibreuse alors que dans la pièce terminale seul l'axomème est présent sous la membrane plasmique.

2. La maturation épидидymaire des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes lorsqu'ils quittent le testicule sont différenciés mais immobiles et fonctionnellement immatures : c'est à dire qu'ils sont incapables d'exprimer leur mobilité, de reconnaître et de féconder un ovule (Austin, 1951). *Via* le *rete testis* et les canaux efférents ils gagnent le tubule épидидymaire dans la lumière duquel ils progressent grâce à l'écoulement du fluide et aux contractions spontanées et rythmiques des cellules musculaires lisses entourant le tubule (figure B8). L'acquisition d'une motilité rectiligne et du pouvoir fécondant (capacité à reconnaître et à pénétrer un ovule) des spermatozoïdes, va progressivement augmenter à la suite d'un ensemble de modifications séquentielles auxquelles ils seront soumis au cours de leur descente dans la lumière du tubule épидидymaire. Ce processus de maturation post-testiculaire des gamètes n'est pas un processus cellule-autonome en ce sens que les spermatozoïdes ne sont pas acteurs dans ces modifications, ils les subissent. En effet, à la sortie du testicule le spermatozoïde est une cellule haploïde dont l'ADN est très compacté et qui de fait est transcriptionnellement inactive. La synthèse protéique est elle-même très réduite (sinon absente) dans cette cellule puisque l'essentiel du cytoplasme et de la machinerie traductionnelle a été évacué à la spermiation.

C'est donc l'environnement dans lequel ils évoluent (ie : les composants du fluide présents dans la lumière de l'épididyme) qui est à l'origine de l'ensemble des modifications gamétiques qui accompagnent cette maturation post-testiculaire des spermatozoïdes. La composition du fluide est la résultante des activités de sécrétion et de réabsorption de l'épithélium épидидymaire.

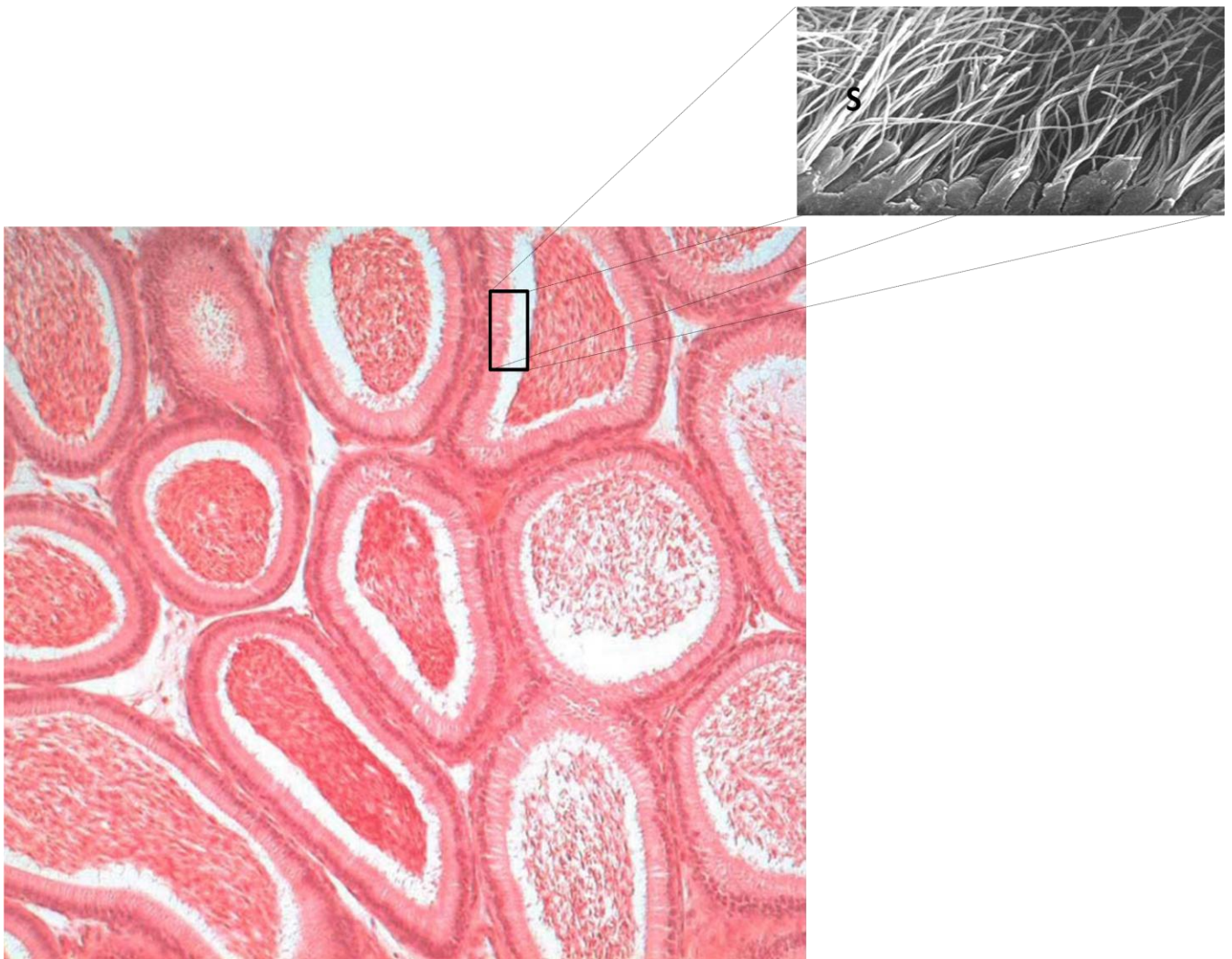


Figure B8 : Section transversale montrant l'épithélium prismatique qui borde le conduit épididymaire spiralé.

La lumière est remplie de spermatozoïdes. A la périphérie, les tubules sont bordés par une assise de cellules musculaires lisses, qui joue un rôle important dans le déplacement des spermatozoïdes le long de l'épididyme.

L'objet propre de cette étude ne porte pas sur les événements de la maturation épидидymaire, néanmoins s'agissant du tissu que nous analysons en relation avec l'activité IDO, le lecteur trouvera ci-dessous une présentation de l'anatomie et de la cytologie de ce tissu ainsi qu'une présentation non-exhaustive des grandes fonctions associées à l'épididyme dans le processus complexe de la maturation post-testiculaire des gamètes mâles.

a. Structure de l'épididyme

L'épididyme, est un long et unique canal contourné accolé au testicule et reliant les canaux efférents au canal déférent (figure B9). Chez les mammifères, il est de longueur variable selon les espèces (1m chez la souris, 5m chez l'homme, il peut atteindre 60m chez le verrat et l'étalon). Cet organe est un dérivé Wolfien pour sa plus grande part à l'exception de la partie la plus proximale qui dérive du mésoderme mésonéphrétique et ainsi a une origine embryonnaire commune avec le rein, d'où certaines analogies de fonctionnement qui laissent supposer que dans sa région antérieure ce tissu pourrait jouer un rôle dans la réabsorption et la filtration du fluide à l'image d'un rein délocalisé.

Le tubule épидидymaire a été arbitrairement divisé en trois régions anatomiques et fonctionnelles distinctes: la tête (*caput*) ou région proximale, reliée au hile du testicule par les canaux efférents et le *rete testis* ; le corps (*corpus*) ou partie médiane et la queue (*cauda*) ou région distale connectée au canal déférent (Abe *et al.*, 1983 ; Abou-Haila & Fain-Maurel, 1984 ; Hamilton, 1990). En raison de la présence de cloisons conjonctives (ou septa, Takano, 1980) le long tube de l'épididyme peut être subdivisé en segments en nombre variable selon les espèces (Abe *et al.*, 1980 ; Abou-Haila & Fain-Maurel, 1984). Plus précisément, chez la souris, la tête de l'épididyme est constituée de cinq segments, tandis que le corps et la queue de l'épididyme peuvent être respectivement subdivisés en deux et trois segments (figure B10), lesquels diffèrent par les caractéristiques cytologiques et histochimiques des cellules qui les composent (Abou-Haila & Fain-Maurel, 1984). A cette régionalisation/métamérisation anatomique, correspond une régionalisation fonctionnelle marquée par le fait que chacun de ces

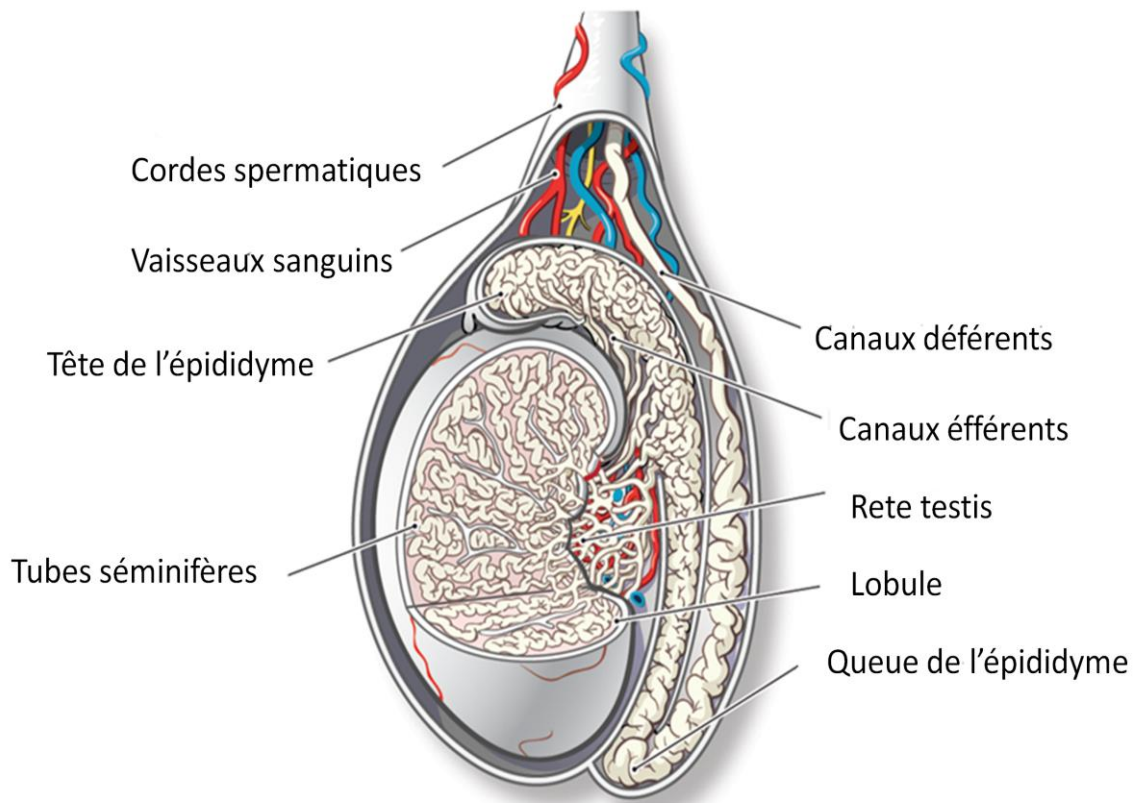


Figure B9 : Les voies testiculaires et extratesticulaires.

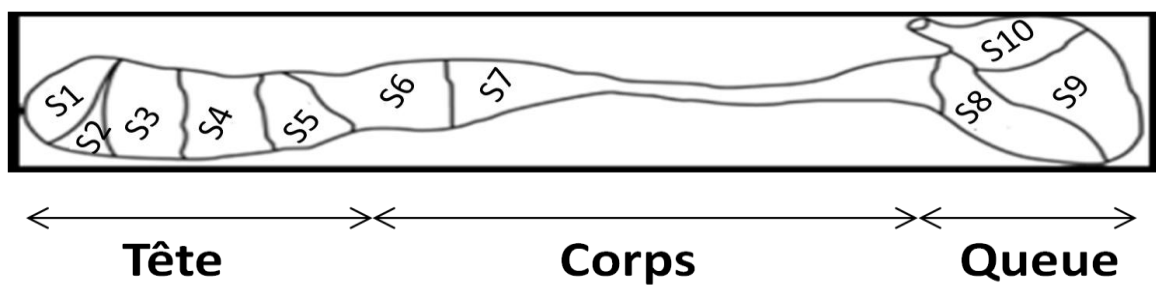


Figure B10 : Représentation schématique d'un épидидyme murin adulte présentant l'organisation anatomique des différents segments.

segments n'exprime pas les mêmes gènes et protéines (Cornwall *et al.*, 2002 ; Johnston *et al.*, 2005 ; figure B11).

b.Histologie de l'épididyme

L'épithélium épididymaire est un épithélium pseudo-stratifié cylindrique. Il est entouré d'un tissu conjonctif contenant des terminaisons nerveuses et des capillaires sanguins (Robaire & Hermo, 1988). Le tubule épididymaire est bordé de cellules musculaires lisses qui, par leurs contractions péristaltiques régulières contrôlées par les fibres nerveuses, permettent le transit des spermatozoïdes de la tête vers la queue de l'épididyme (Setchell *et al.*, 1994). L'épithélium composite est constitué de plusieurs types cellulaires présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles très variées de la région proximale à la région distale du canal épididymaire (Soranzo *et al.*, 1982, figure B12).

▪ Les cellules principales

Ce sont les cellules les plus nombreuses, elles représentent de 65 à 80% de la population des cellules épithéliales épididymaires. Les cellules principales ont une organisation typique de cellules épithéliales columnnaires sécrétrices avec un noyau irrégulier situé en position basale et un réticulum endoplasmique ainsi que des vésicules post-réticulum et post-golgiennes développées (Soranzo *et al.*, 1982) surtout dans la région proximale ou *caput* de l'épididyme. Plus bas dans le tubule épididymaire, leur aspect change (Herme & Robaire, 2002). En particulier, chez la souris, la hauteur de ces cellules diminue fortement de la tête vers la queue de l'épididyme, tout comme le nombre des microvillosités qui tapissent leur pôle apical (Abe *et al.*, 1983). Elles sont très actives quant au transport, à la sécrétion et à l'absorption de petites particules et de protéines jouant un rôle important non seulement dans la maturation épididymaire des spermatozoïdes (Herme & Robaire, 2002) mais aussi dans la nécessaire tolérance immune qui doit être maintenue vis à vis des gamètes mâles en participant à ce qu'on appelle, la barrière hémato-épididymaire (Seiler *et al.*, 2000) qui sera développée plus avant ci-dessous. La lame basale sur laquelle repose ces cellules joue aussi un rôle de barrière physiologique avec le compartiment vasculaire. Cette lame basale intervient

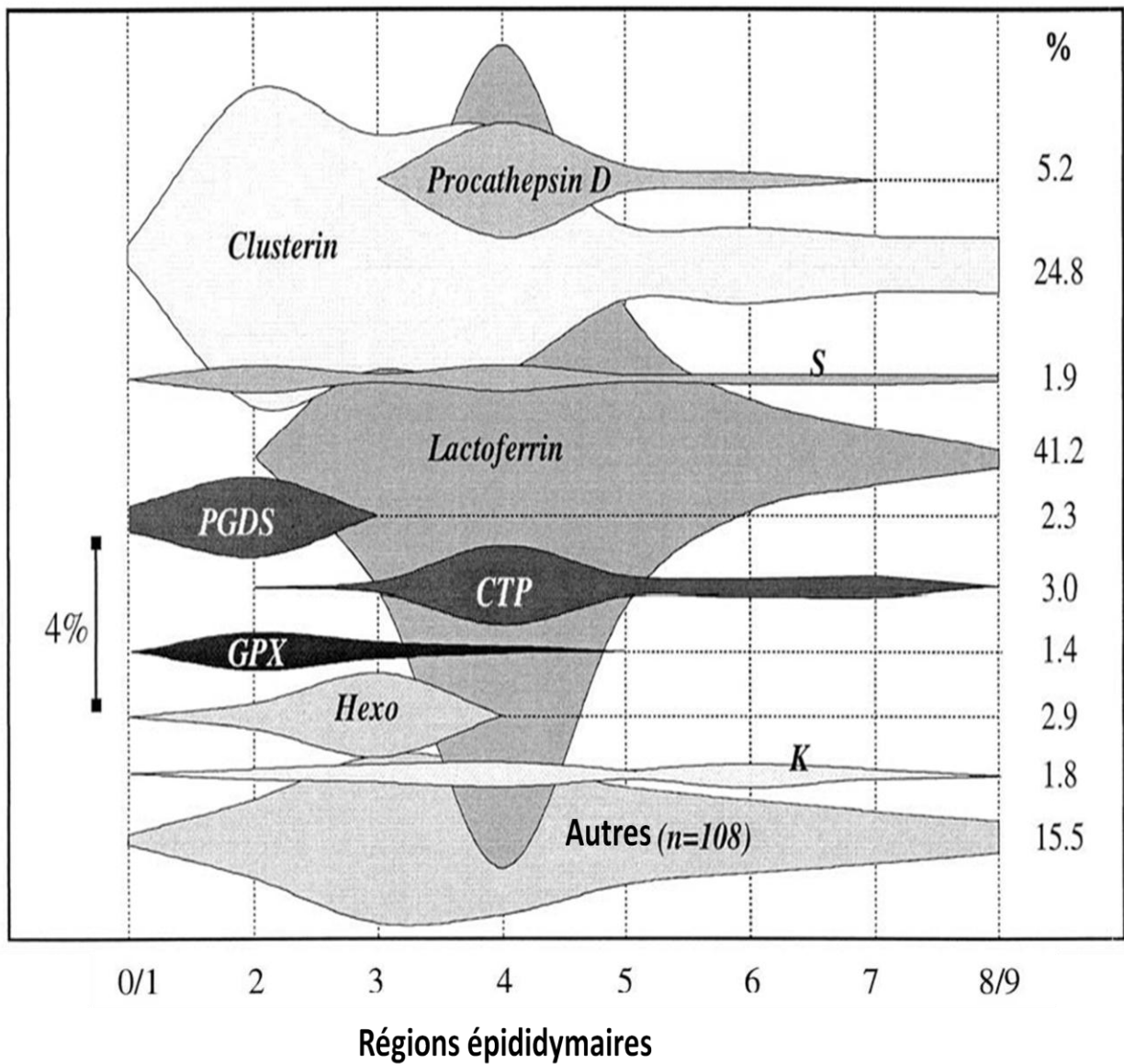


Figure B11 : Schéma de la distribution régionalisée des sécrétions protéiques majeures dans l'épididyme chez l'étalon

(d'après Fouchécourt *et al.*,2000).

également dans la détermination de la polarité, de la différenciation des cellules épithéliales et dans les processus de réparation tissulaire (Robaire *et al.*, 2003).

- **Les cellules apicales**

Ce sont des cellules à l'aspect triangulaire dont le noyau est situé vers la membrane apicale de l'épithélium (voir figure B12). Il n'est pas clair si ces cellules atteignent la région basale du tubule épидидymaire, d'où leur appellation. Elles sont caractérisées par un cytoplasme dense, très riche en mitochondries, des microvillosités rares et courtes et des lysosomes contenant entre autre de l'anhydrase carbonique impliquée dans la sécrétion des ions H⁺ et la réabsorption des bicarbonates (HCO₃⁻). Ces cellules expriment aussi la glutathion S-transférase μ , (GST μ) qui est devenue ainsi un marqueur spécifique de ce type cellulaire (Vernet *et al.*, 2004). Les cellules apicales seraient responsables de l'acidification du fluide épидидymaire (Martinez-Garcia *et al.*, 1995). Elles seraient aussi capables d'endocyter des substances contenues dans la lumière du tubule épидидymaire (Hermo & Robaire, 2002). Dans des situations pro-inflammatoires, il a été observé que le nombre de ces cellules augmente (Vernet *et al.*, 2004), particulièrement dans la région proximale de la tête de l'épididyme (segments 2 et 3). Cette multiplication du nombre de cellules apicales en situation pro-inflammatoire serait aussi accompagnée de la protrusion de ces cellules dans la lumière du tubule épидидymaire (Vernet *et al.*, 2004). Il n'est pas clair si ces phénomènes qui touchent les cellules apicales servent des processus anti-inflammatoires locaux.

- **Les cellules claires**

Ce sont de grandes cellules prismatiques (Soranzo *et al.*, 1982). Elles contiennent de nombreuses vésicules claires de tailles diverses dans leur cytoplasme apical, des lysosomes dans le cytoplasme médian et de nombreuses inclusions lipidiques dans le cytoplasme basal (Robaire & Hermo, 1988). On les rencontrent surtout dans le corps et la queue de l'épididyme (Soranzo *et al.*, 1982). Elles présentent une forte capacité d'endocytose (Olson & Hinton, 1985 ; Robaire & Viger, 1995) et seraient impliquées dans l'absorption de certains composants du fluide épидидymaire (Beaulieu *et al.*, 2004) mais également dans la régulation du pH luminal de l'épididyme (Kujala *et al.*, 2007).

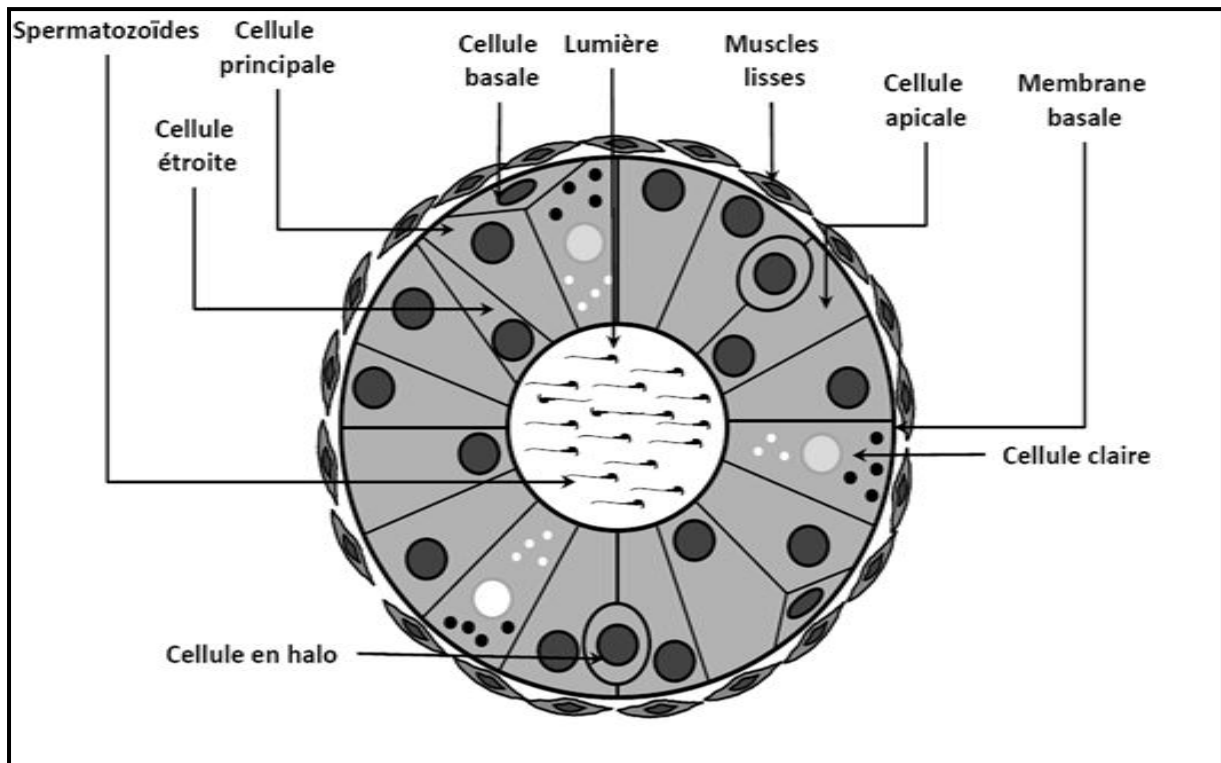


Figure B12 : Représentation schématique d'une coupe transversale de canal épididymaire présentant l'organisation anatomique et les différents types cellulaires.

▪ Les cellules basales

Peu nombreuses, elles constituent 10 à 15% de la population des cellules épithéliales sous l'épithélium (Robaire & Viger, 1995). Elles ont une forme hémisphérique et contrairement aux cellules principales, elles n'atteignent probablement pas la lumière de l'épididyme. La fonction de ces cellules basales n'est pas encore bien établie. Un rôle de cellules souches de l'épithélium épидидymaire leur avait été initialement attribué cependant il ne semble pas qu'elles fonctionnent comme tel dans ce tissu où le taux de renouvellement cellulaire est particulièrement faible. Il a aussi été suggéré qu'elles seraient impliquées dans la détoxification et la résistance aux radicaux libres (Veri *et al.*, 1994). Il a par ailleurs été proposé que ces cellules pourraient être impliquées dans la protection immune des spermatozoïdes en participant à la barrière hémato-épididymaire (voir pour revue: Cooper, 1998). Enfin, il a plus récemment été montré que ces cellules, de la même façon que les cellules apicales et les cellules étroites (voir ci-dessous), sont capables de produire des cytokines qui influenceraient le devenir des spermatozoïdes normaux et malformés en les sensibilisant ou non à la spermio-phagie (Li *et al.*, 2010).

▪ Les cellules en halo

Les cellules en halo sont de petites cellules rondes présentes tout au long du canal épидидymaire, généralement situées à la base de l'épithélium (Hermo & Robaire, 2002). Elles ont été assimilées à des lymphocytes intra-épithéliaux ou à des monocytes résidents (Hoffer *et al.*, 1973 ; Serre & Robaire, 1999). Ces cellules seraient ainsi impliquées dans la réponse immune innée de l'épididyme (Robaire & Hermo, 1998).

c. Le compartiment luminal

Pour rejoindre le système éjaculateur depuis les gonades mâles, les spermatozoïdes descendent le tubule épидидymaire, où ils vont acquérir progressivement leur mobilité et leur capacité fécondante. Les cellules épithéliales qui bordent le tubule épидидymaire vont contribuer à créer un microenvironnement luminal optimal pour la maturation et le stockage des spermatozoïdes : le fluide épидидymaire. La composition de ce fluide est très complexe (principalement des ions, de petites

molécules organiques et diverses macromolécules). Les ions (H^+ , Na^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , Zn^{2+}) et les petites molécules organiques (carnitine, glycerylphosphorylcholine, inositol, glutamate, taurine, hypotaurine....) y sont très abondants. En raison d'une forte régionalisation tissulaire et cellulaire des activités de synthèse, de sécrétion et de réabsorption des cellules épithéliales, la composition du fluide épидидymaire est segment-spécifique et donc constamment et progressivement modifiée tout au long de l'organe (Kirchhoff, 1999). Ainsi les spermatozoïdes au cours de leur descente dans le tubule épидидymaire vont rencontrer un environnement unique et spécifique à chaque région, voire à chaque segment (Olson *et al.*, 2002 ; Johnston *et al.*, 2005).

d. Les sécrétions épидидymaires

L'analyse des protéines lumenales a montré que la composition protéique du fluide est en constante évolution tout au long de l'épididyme. Chez la plupart des mammifères, les protéines épидидymaires sont différentes des protéines du sang et des testicules. La majorité des protéines du fluide testiculaire qui entrent dans l'épididyme, disparaissent du fluide rapidement dès la tête antérieure ou plus lentement dans les segments médians ou distaux de la tête. Elles sont soit dégradées par des enzymes protéolytiques lumenales, soit spécifiquement réabsorbées.

Dans le fluide épидидymaire, 200 à 300 protéines ont été détectées et caractérisées dans plusieurs modèles de mammifères (homme, souris, rat, verdat, taureau, bélier, étalon..). Quantitativement, la tête de l'épididyme est responsable de la majorité des sécrétions épидидymaires (Syntin *et al.*, 1996). A titre d'exemple, chez le verdat, la sécrétion protéique dans la tête, le corps et la queue représente respectivement 83%, 16%, et 1% de la totalité des sécrétions épидидymaires (Dacheux *et al.*, 2003). De même, chez l'étalon, la tête de l'épididyme est responsable de 73% des sécrétions épидидymaires totales (Fouchecourt *et al.*, 2000). L'épithélium épидидymaire, selon les mammifères qui ont été testés, sécrète globalement les mêmes protéines. Il n'y a pas dès lors de sécrétion épидидymaire qui soit espèce-spécifique. Cependant, d'une espèce à l'autre, ce sont les proportions relatives de ces protéines sécrétées qui varient et aussi la régionalisation de leur expression au sein du tubule qui n'est pas toujours

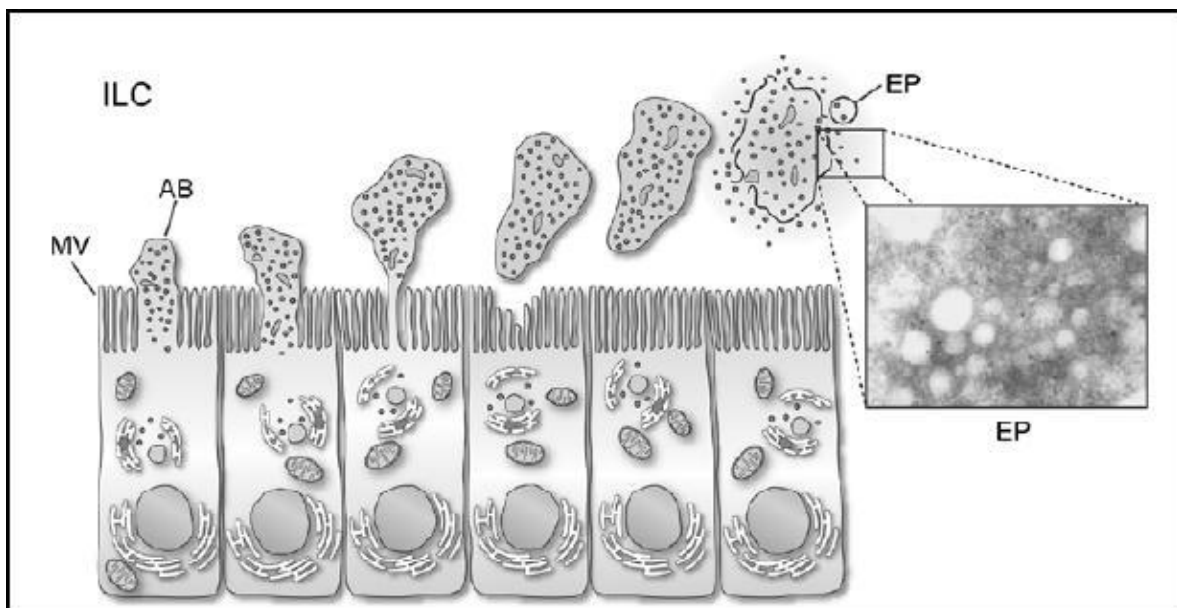


Figure B13 : Représentation schématique de sécrétions apocriines dans les cellules principales de l'épididyme.

L'encart présente une photo d'épididymosomes en microscopie électronique. AB, protrusions apicales; EP, épididymosomes; ILC, compartiment intraluminal; MV, microvillosités. (Sullivan *et al.*, 2007).

conservée. Quelques protéines représentent, en masse, la majorité des sécrétions protéiques. En guise d'exemples, sur les 250 protéines du fluide épидидymaire identifiées chez l'étalon, 18 d'entre elles représentent plus de 92% de l'activité sécrétrice épидидymaire. Parmi ce petit nombre de protéines abondantes, deux protéines, la lactoferrine et la clusterine représentent à elles seules 66% des sécrétions protéiques (41% pour la lactoferrine et 25% pour la clusterine) [Fouchecourt *et al.*, 2000]. Dans une situation très identique, chez le bélier et le verrat, 70% de l'activité de sécrétion de l'épididyme est dévolue à quatre protéines : la clusterine, la lactoferrine, la GPx5 (glutathion peroxydase 5) et la PDGS (prostaglandine D2 synthase) [Dacheux *et al.*, 2003].

Certaines protéines de sécrétion épидидymaire sont réabsorbées aussitôt qu'elles sont sécrétées comme c'est le cas pour les isoformes de la clusterine chez le cheval. Par contre, chez plusieurs espèces, beaucoup de protéines sécrétées par l'épithélium épидидymaire restent présentes dans la lumière du tubule tout le long de l'organe, comme la PDGS et la GPx5 (Dacheux *et al.*, 2003). D'autres protéines voient leur concentration luminale augmenter au cours du transit épидидymaire comme c'est le cas pour la carnitine, une molécule organique intervenant dans le métabolisme des lipides. L'inositol, un autre substrat énergétique du gamète mâle, voit de même sa concentration multipliée par 10 dans le fluide épидидymaire entre la tête et la queue de l'épididyme chez le rat (voir pour revue : Cyr *et al.*, 2002).

Une autre particularité de la sécrétion protéique épидидymaire vient de la sécrétion de protéines ne possédant pas de signal peptidique *via* des processus de sécrétions apocrines. Ces protéines sont localisées dans des vésiculosomes/exosomes ou aposomes appelés épидидyosomes dans l'épididyme (figure B13). Ces épидидyosomes sont libérés dans la lumière par les cellules épithéliales épидидymaires (Hermo & Jacks, 2002 ; Rejraji *et al.*, 2002; Saez *et al.*, 2003). L'intérêt de ces vésicules, outre le fait qu'elles permettent la sécrétion de protéines ne possédant pas de signal peptidique, pourrait être de protéger les protéines d'une éventuelle dégradation enzymatique par le fluide épидидymaire (Rejraji *et al.*, 2002). Il a été montré que certaines de ces protéines contenues ou portées par les épидидyosomes pouvaient être retrouvées associées aux spermatozoïdes en transit suggérant que ces vésiculosomes pourraient participer à la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes (Frenette *et al.*, 2002). Des échanges de

lipides (cholestérol et phospholipides) ont aussi été suspectés entre les spermatozoïdes et les épидидымосomes durant la maturation épидидымаire (Rejraji *et al.*, 2006).

e. Les rôles de l'épididyme

L'épididyme est essentiel dans la fonction de reproduction. Il assure par les activités spécifiques de son épithélium la maturation, le transport et le stockage des gamètes mâles mais aussi leur protection et leur survie.

▪ Le transport et stockage des spermatozoïdes

Chez l'homme, la durée de transit des spermatozoïdes dans l'épididyme est de l'ordre de 12 jours (9 à 10 jours chez la souris). La progression des gamètes mâles dans le tubule épидидымаire est sous la dépendance du flux mécanique créé par l'entrée du fluide testiculaire à l'origine d'une pression intra-luminale qui décroît de la tête vers la queue de l'épididyme. Les contractions péristaltiques des fibres musculaires lisses entourant l'épithélium épидидымаire, et les mouvements des stéréocils portés par les cellules épithéliales assurent la progression des spermatozoïdes (Robaire & Hermo, 1998) qui eux sont immotiles. L'immobilité des spermatozoïdes dans le compartiment de l'épididyme est due à l'immaturité de leur équipement mitochondrial (dans les régions proximales du tubule), la faible tension intraluminaire en oxygène et au fait que le pH et la disponibilité en substrat énergétique ne sont pas à l'optimum. De plus, l'immobilité des spermatozoïdes épидидымаires est en outre renforcée par des sécrétions épидидымаires telle que l'immobiline, qui bloque le spermatozoïde dans un état quiescent. Le stockage des spermatozoïdes s'effectue dans la partie distale ou queue de l'épididyme entre deux éjaculations.

▪ La maturation des spermatozoïdes

La maturation des spermatozoïdes est l'ensemble des modifications morphologiques, biochimiques et fonctionnelles que subissent les spermatozoïdes au cours de leur passage dans l'épididyme, leur conférant la mobilité et le pouvoir fécondant. Ces modifications sont le résultat d'une constante interaction, tout le long de

l'épididyme entre les spermatozoïdes immatures, le fluide luminal et les cellules épithéliales.

Une fois encore le propos n'est pas d'être exhaustif dans cette introduction quant aux fonctions de l'épididyme mais de donner au lecteur un aperçu des activités essentielles exercées par l'épididyme dans la génération de gamètes mâles fonctionnels. Ainsi quelques grands aspects clefs de cette maturation épидидymaire seront présentés ci-dessous.

○ **Régulation du volume du spermatozoïde**

Les différentes sécrétions d'osmolytes et surtout les événements de réabsorption de l'épithélium épидидymaire font de la lumière de l'épididyme un milieu hypertonique par rapport au spermatozoïde. La réabsorption de l'eau associée au mouvement des ions (réabsorption de Na⁺ et Cl⁻, sécrétion d'ions K⁺ et phosphates) aboutit à une diminution d'un facteur 10 du rapport Na⁺/K⁺ dans le fluide, entre la tête et la queue de l'épididyme. Chez la souris, l'osmolarité du fluide épидидymaire est ainsi de 415mmol/kg, alors que l'osmolarité spermatique est d'environ 290mmol/kg (Cooper & Yeung, 2003). Cette situation entraîne des pertes aqueuses à l'origine d'une diminution de volume du spermatozoïde, principalement marquée par une réduction de la taille de la tête spermatique. Grâce aux électrolytes sécrétés par l'épithélium épидидymaire, le fluide permet aux spermatozoïdes d'éviter la déshydratation (Cooper & Yeung, 2003). Cette acquisition par le spermatozoïde de la capacité à réguler son volume est indispensable au pouvoir fécondant. En effet, une relation directe a été démontrée entre le volume de la tête des spermatozoïdes et leur mobilité rectiligne (Cooper & Yeung, 2003).

○ **Compaction nucléaire par pontage disulfure**

Un autre aspect important de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes est l'accentuation de la compaction du noyau spermatique. Initiée durant la phase finale de la spermatogenèse testiculaire *via* le remplacement des histones par les protamines, la condensation du noyau spermatique est poursuivie durant le trajet épидидymaire par une intense activité de pontage disulfure inter-protamines et intra-protamines au

niveau des nombreux résidus cystéines portés par ces protéines nucléaires. Cette activité thiol-peroxydase/disulfide isomerase est assurée par un variant spermatique de la glutathion peroxydase 4, la snGPx4 (sperm nucleus GPx4) localisée dans le noyau spermatique associée aux protamines (Tramer *et al.*, 1998 ; Conrad *et al.* 2005). L'environnement luminal de l'épididyme proximal fourni le contexte pro-oxydant nécessaire pour que cette activité de pontage disulfure ait lieu. Cette situation est assez paradoxale car le gamète mâle est particulièrement sensible au stress oxydant (l'attaque radicalaire). Cette sensibilité vis à vis de l'attaque radicalaire est due à la composition lipidique particulière de la membrane plasmique, riche en acides gras polyinsaturés, cibles de choix des espèces oxygénées réactives (EOR). Cette sensibilité vis à vis du stress oxydant est aussi due au caractère quiescent de cette cellule qui ne peut engager de réponse de défense (type réponse de stress *via* la transcription de gènes de défense). Par ailleurs, ayant éliminé la majeure partie de son cytoplasme le spermatozoïde possède un « pool » limité d'enzymes cytoplasmiques ou de métabolites impliqués dans des actions anti-oxydantes. C'est donc le fluide épидидymaire qui assure la protection des spermatozoïdes contre les dommages oxydants et qui, indirectement, contrôle le niveau de compaction du noyau spermatique en définissant le statut redox du fluide (pour une revue de la question voir Noblanc *et al.*, 2011).

Cette compaction accrue du noyau spermatique sert deux finalités : 1) participer à la réduction générale de la taille de la tête de la cellule et, ainsi, contribuer à l'acquisition de la mobilité rectiligne optimale lors des mouvements flagellaires ; 2) assurer la protection de l'intégrité du matériel nucléaire paternel contre des éventuels effets mutagéniques en limitant l'accès aux agresseurs potentiels qu'ils soient d'origine physique (radiations ionisantes par exemple) ou chimique (agents intercalants...). Le degré de protamination n'est pas identique chez tous les vertébrés, ni au sein des mammifères. A titre d'exemple, il apparaît que 2% du noyau spermatique chez la souris est toujours associé à des histones dans un agencement nucléosomal. Chez l'homme, jusqu'à 15% du noyau spermatique serait toujours lié à des histones dans un assemblage nucléosomal (Pittoggi *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 2008).

○ **Modifications de l'acrosome**

L'acrosome se développe pendant la spermiogenèse. Toutefois, des changements dans la forme de l'acrosome sont observés chez plusieurs espèces au cours du transit épидидymaire (Scarlett et *al.*, 2001). Le remodelage de l'acrosome dans l'épididyme implique une réduction de sa taille, une altération de sa forme, et un changement dans le contenu de la vésicule acrosomique.

○ **Modifications à l'échelle moléculaire**

A coté de ces modifications morphologiques du gamète et de ses éléments structuraux principaux (acrosome, noyau,...) la descente épидидymaire s'accompagne d'une multitude de changements plus minimes qui affectent la représentation qualitative et quantitative de pratiquement tous les constituants organiques de la cellule : protéines, sucres et lipides.

- **Protéines**

Lors du transit épидидymaire la membrane plasmique du spermatozoïde subit un remaniement important de sa composition protéique. Le nombre et la nature des modifications qui affectent les protéines spermatiques sont très divers. Majoritairement, mais pas uniquement, les modifications touchent les protéines de surface du gamète enchassées dans la membrane plasmique. De même, majoritairement c'est au niveau de la tête spermatique que l'on observera le plus de changements. Cependant, même si cela est dans une moindre mesure, les autres compartiments du spermatozoïde (pièce intermédiaire, flagelle) sont aussi concernés.

Brièvement, on assistera à différents phénomènes qui peuvent être résumés de la façon suivante :

- addition de nouvelles protéines sur le gamète,
- élimination de protéines spermatiques,
- modifications de protéines déjà présentes sur le gamète,
- re-localisations de protéines membranaires dans des sous-domaines particuliers.

Concernant les modifications de protéines spermatiques, l'éventail des changements observés est lui aussi très important. Certaines protéines vont être la cible d'événements de protéolyse ménagée, faisant par exemple apparaître des domaines fonctionnels (ie. sites de fixation de ligands). On assistera aussi sur plusieurs protéines à un large éventail de modifications biochimiques post-traductionnelles (pontage disulfure, glycosylation/dé-glycosylation, phosphorylation/déphosphorylation, oxydation, hydrolyse, sulfatation, sumoylation, ubiquitination, kynurénnylation, crotonylation, ...).

En guise d'exemples d'ajout de protéines aux gamètes durant le transit épидидymaire, AEG-1 (acidic epididymal glycoprotein 1) ou encore CRISP-1 (cysteine-rich secretory protein 1) sont des glycoprotéines acquises par le spermatozoïde lors de la maturation épидидymaire (Rochwerger & Cuasnicu, 1992).

- **Sucres**

En ce qui concerne les sucres, pour la plupart associés aux glycoprotéines membranaires du spermatozoïde, un jeu éminemment complexe de réactions de glycosylation et de déglycosylation lors de la descente épидидymaire des spermatozoïdes modifie le nombre, la longueur et la représentation en sucres simples sur les extensions sucrées portées par les glycoprotéines de surface.

A cet effet, l'épithélium épидидymaire exprime et sécrète des glycosidases, et des glycosyltransférases (Tulsiani, 2006). L'éventail des modifications des sucres portés par les protéines spermatiques au cours de la descente épидидymaire est loin d'être connu et cet aspect reste une « boîte noire » dans la physiologie du spermatozoïde. C'est pourtant un aspect important puisque les sucres portés par les protéines membranaires jouent des rôles majeurs dans les phénomènes d'interaction protéine/protéine et dans les phénomènes d'interactions cellulaires.

- **Lipides**

Au cours du transit épидидymaire, la composition lipidique du spermatozoïde est modifiée. Les spermatozoïdes perdent 40% de leurs phospholipides (Jones *et al.*, 1998). Ces derniers sont éliminés par des phospholipases C ou A2 qui sont endogènes ou proviennent du fluide.

La diminution concerne les phosphatidyléthanamines, les phosphatidylsérines, les sphingomyélines alors que les phosphatidylcholines augmentent (Haidl & Opper, 1997). Ces modifications augmentent la fluidité de la membrane mais diminuent sa stabilité. Néanmoins, elles sont nécessaires aux étapes suivantes telles que la capacitation, la réaction acrosomique et la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte (Hall *et al.*, 1991). L'efflux de cholestérol augmente également la fluidité et la perméabilité membranaire permettant l'influx d'ions calciques et l'activation des signaux de transduction préparant à la capacitation (Visconti *et al.*, 1999). De plus, la saturation des acides gras (AG) membranaires diminue (Avelano *et al.*, 1992). La proportion des acides gras polyinsaturés (AGPI) est ainsi augmentée lors de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes. Les mécanismes impliqués dans le remodelage de la composition lipidique sont peu connus. L'épithélium épидидymaire est responsable d'une partie de ces modifications en permettant des flux (influx, efflux) particuliers de lipides entre le compartiment luminal, l'épithélium lui-même et le tissu intertubulaire (Ouvrier *et al.*, 2009 ; Ouvrier *et al.*, 2011). Les épидидyosomes dont la composition lipidique varie d'une façon anti-parallèle à celle des spermatozoïdes durant la descente épидидymaire sont aussi probablement des acteurs de ces modifications du profil lipidique des gamètes mâles (Rejraji *et al.*, 2006).

▪ La protection des spermatozoïdes

Comme évoqué plus haut, les spermatozoïdes sont des cellules fragiles. Dénuées d'activités transcriptionnelles, elles ne peuvent engager de réponses de stress. De plus, ayant perdu à la spermiation l'essentiel de leur cytoplasme (phagocyté par la cellule de Sertoli), les spermatozoïdes ne possèdent plus les réserves cytoplasmiques en enzymes cytosoliques qui pourraient leur permettre de faire face aux situations de stress. C'est donc l'environnement luminal épидидymaire, c'est à dire essentiellement le fluide, qui doit fournir les éléments de cette protection.

Par ailleurs, l'épидидyme doit assurer la protection des spermatozoïdes vis à vis de l'inflammation aigüe qui peut par exemple accompagner les éventuels états infectieux (infections rétrogrades du tractus génital mâle) tout en protégeant les gamètes mâles de la réponse immune adaptative puisque comme nous l'avons mentionné en introduction

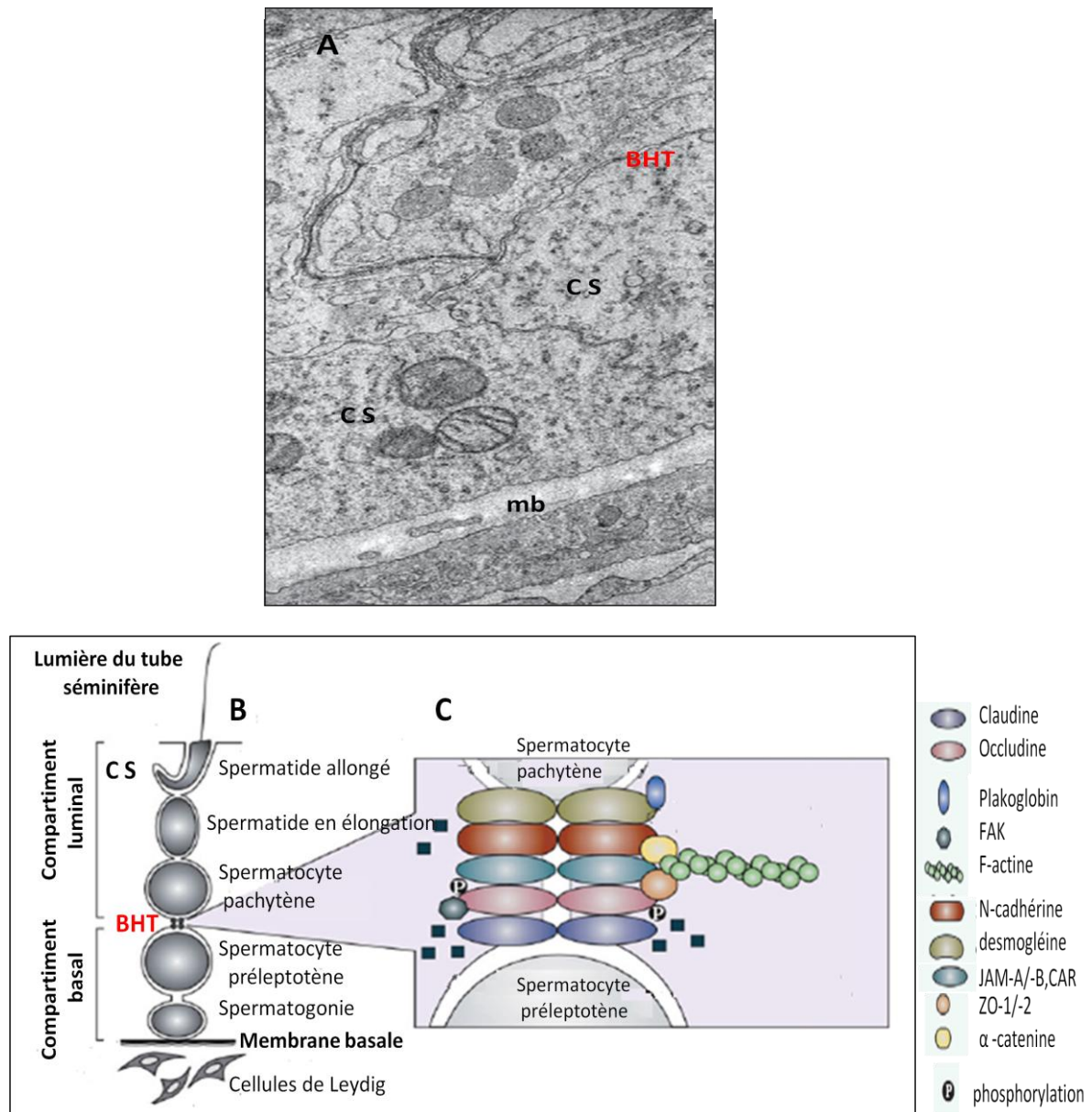


Figure B14: Organisation de la barrière hématotesticulaire (BHT)

(Modifié d'après Mruk & Cheng, 2010).

A : une portion de l'épithélium séminifère d'un testicule de rat adulte en microscopie électronique montrant la barrière hématotesticulaire (BHT), CS : compartiment sertolien, mb : membrane basale.

B : représentation schématique d'une section de l'épithélium séminifère au stade VII du cycle germinale, montrant les différentes cellules germinales. Après les spermatogonies, en direction de la lumière, les cellules de Sertoli sont reliées les unes aux autres par des jonctions serrées (tight junction). Ces jonctions constituent la barrière hémato-testiculaire (BHT) qui divise l'épithélium séminifère en deux compartiments : compartiment basal et compartiment luminal, CS : compartiment sertolien.

C : représentation schématique des jonctions serrées qui constitue la BHT au stade VII du cycle de l'épithélium séminifère, FAK : focal adhesion kinase, ZO : zonula occludens, JAM : junction adhesion molecule, CAR : coxsackie and adenovirus receptor.

les spermatozoïdes sont maintenus dans une situation de tolérance immune vis à vis de la réponse immune systémique.

f. La barrière hémato-épididymaire (BHE)

Un élément important de la protection des gamètes est constitué par l'organisation même du tubule épидидymaire et l'isolement relatif des gamètes au sein de la lumière de ce tubule. Cette organisation particulière en tubule dans lequel les gamètes sont enfermés sous un épithélium composite plus ou moins hétérogène, lui-même entouré par des cellules pérítubulaires et un tissu interstitiel ou conjonctif irrigué, est d'ailleurs celle que l'on retrouve pratiquement tout le long du tractus génital mâle. Néanmoins, lorsque l'on compare plus précisément le contexte du tubule séminifère et le contexte du tubule épидидymaire, on se rend compte que les similarités d'organisation ne sont que superficielles. En effet, l'épithélium séminifère est constitué d'un seul type cellulaire somatique, les cellules de Sertoli, qui entretiennent dans l'épaisseur de cet épithélium, la population des cellules germinales en différenciation et prolifération. Les cellules de Sertoli sont verrouillées entres-elles au niveau de leur région basale par des jonctions serrées et la présence d'une membrane et d'un cytosquelette spécialisés (figure B14) constituant la barrière hémato-testiculaire (BHT) [Dym & Fawcett, 1970 ; Setchell *et al.*, 1969, Skinner *et al.*, 1985].

La fonction de cette barrière est d'empêcher tout trafic cellulaire et moléculaire par les espaces extracellulaires adjacents aux cellules de Sertoli. L'étanchéité de cette barrière est attestée par le fait qu'il est très rare de trouver des cellules de l'immunité au sein de cet épithélium en situation physiologique non pathologique.

L'épithélium épидидymaire est quant à lui constitué, on l'a vu plus haut, d'un ensemble de cellules (principales, apicales, basales, claires, en halo et étroites). Les cellules principales et apicales, dans une organisation classique de la plupart des épithélia, sont verrouillées entre-elles au niveau de leurs régions apico-latérales par la présence de jonctions serrées (figure B15) (Hoffer & Hinton, 1984, Cyr *et al.*, 2002). Le nombre et la complexité structurale de ces jonctions serrées est variable tout au long de

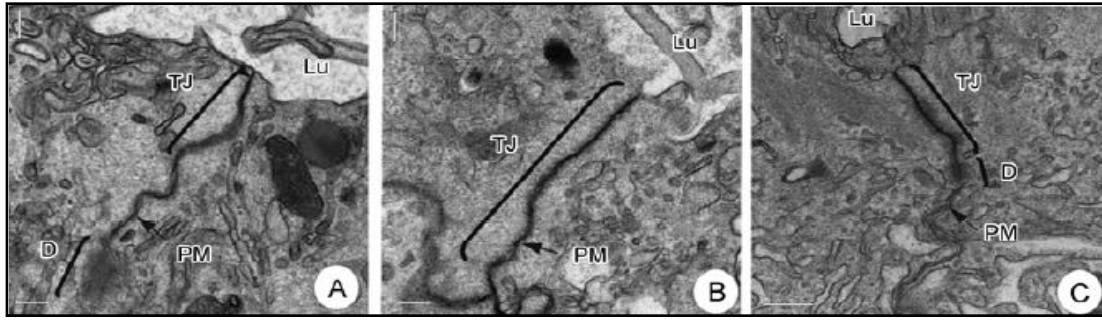


Figure B15: Localisation des jonctions serrées apicales dans l'épididyme humain en microscopie électronique (Cyr *et al.*, 2007).

A : Au niveau de la tête, B : dans le corps et C : dans la queue de l'épididyme. D : desmosome, Lu : lumière, TJ : tight Junction ou jonction serrées, PM : membrane plasmique latérale, échelle : 0,5 μ m.

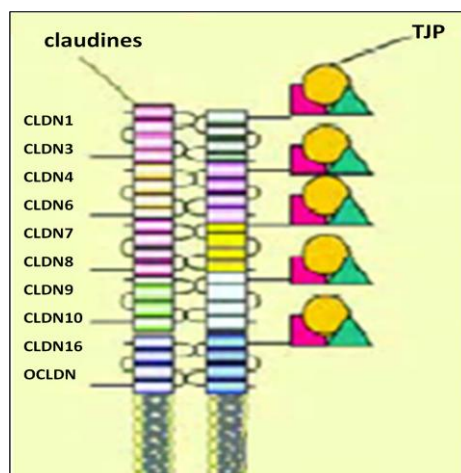
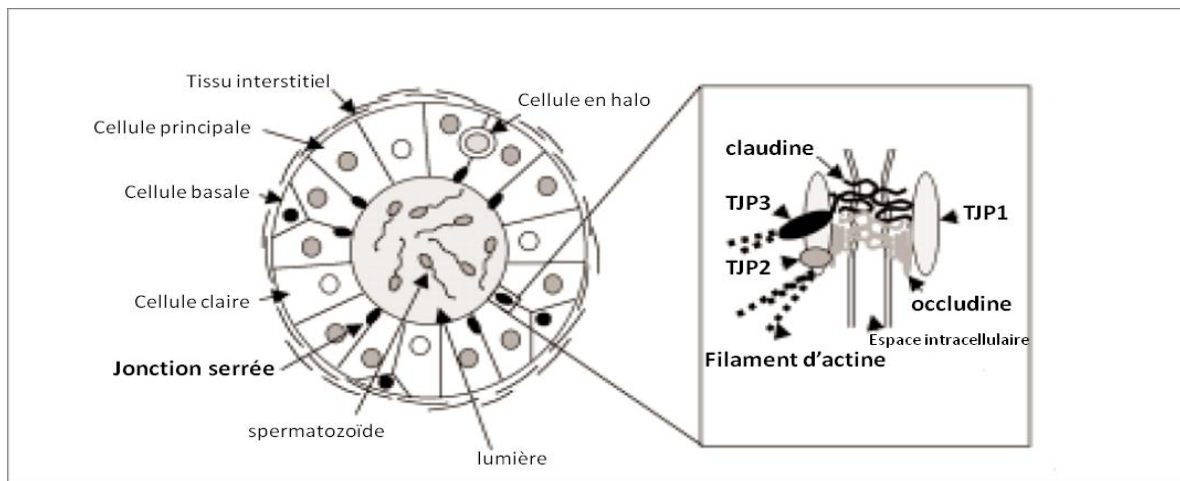


Figure B16 : Représentation schématique de l'assemblage des jonctions serrées dans l'épididyme de rat (Cyr *et al.*, 2007).

Les jonctions serrées au sein de l'épididyme sont composées principalement de protéines de jonctions transmembranaires claudines (CLDN), d'occludines (OCLDN) et de protéines TJP "tight junctional protein". Les TJP s'associent avec les claudines et les occludines pour la formation des jonctions serrées et agissent à la fois comme une ancre au cytosquelette et comme intermédiaire de voie de transduction.

l'épididyme (Suzuki & Nagano, 1978), mais d'une façon générale elles apparaissent moins spécialisées que celles trouvées entre les cellules de Sertoli (Cyr *et al.*, 1995 ; Friend & Gilula, 1972 ; Hinton & Palladino, 1995, figures B15 et B16). Chez le rat, les jonctions serrées sont très abondantes au niveau du segment initial comparé aux autres régions épидидymaires (Cyr *et al.*, 1995). La mise en place de cette barrière est tardive puisqu'elle démarre pendant le développement embryonnaire et se poursuit après la naissance juste avant l'entrée des spermatozoïdes dans l'épididyme. Chez le rat, la barrière hémato-épididymaire n'est totalement fonctionnelle qu'entre le 18^{ème} et 21^{ème} jour de développement post-natal (Agarwal & Hoffer, 1989). Les facteurs régulant la formation et le maintien de cette barrière restent à ce jour peu connus. Il a été supposé qu'elle serait régulée par un ou plusieurs facteurs testiculaires (Nagano & Suzuki, 1976). La barrière hémato-épididymaire (BHE) est cruciale pour la protection des spermatozoïdes contre une réponse autoimmune (Robaire & Hermo, 1988).

Par ailleurs, la BHE participe à la création et au maintien du microenvironnement luminal particulier, essentiel pour la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes (Hinton, 1983 ; Robaire & Hermo, 1988 et pour une revue plus récente voir : Cyr *et al.*, 2002). L'étanchéité de cette barrière hémato épидидymaire est moindre que pour la BHT comme en témoigne le fait qu'il est fréquent d'observer des cellules de l'immunité infiltrées dans l'épithélium épидидymaire et aussi au niveau de la lumière du tubule (Ritchie *et al.*, 1984 ; Wang & Hosltein, 1983).

A cause de ces caractéristiques, l'on peut s'attendre à ce que le contrôle de l'immunité au sein de l'épididyme soit apparenté à ce que l'on rencontre dans les autres tissus organisés similairement, comme par exemple dans l'intestin, où l'immunité-muqueuse occupe une place importante (Beagley *et al.*, 1998).

g. Les cellules de l'immunité dans l'épididyme

Comme évoqué déjà ci-dessus et, contrairement à la situation testiculaire, on observe fréquemment la présence de macrophages et de lymphocytes à la fois dans l'épithélium épидидymaire et dans le tissu interstitiel. Cette situation très différente entre ces deux compartiments clairement illustre que les environnements immuns testiculaires et épидидymaires sont plutôt différents. La présence de leucocytes au sein

de l'épithélium épидидymaire, de même que dans la lumière du tubule épидидymaire, témoigne que cette notion de BHE (c'est à dire de séparation physique entre les antigènes spermatiques et les cellules de l'immunité) est beaucoup moins solide dans l'épididyme qu'elle ne l'est dans le testicule.

Les leucocytes sont retrouvés dans toutes les régions de l'épididyme (tête/corps/queue). Cependant, il semble qu'ils soient plus nombreux au sein de la tête de l'épididyme comparativement aux régions plus distales (Flickinger *et al.*, 1997 ; Nashan *et al.*, 1989 ; Seiler *et al.*, 1999). Le nombre de ces leucocytes dans la tête de l'épididyme semble en outre augmenter au cours du vieillissement (Serre & Robaire, 1999). Dans l'épithélium épидидymaire on s'accorde à dire que les cellules dites en « halo » sont des cellules de l'immunité (Dym & Romrell, 1975 ; Flickinger *et al.*, 1997 ; Hooper *et al.*, 1985 ; Nashan *et al.*, 1989 ; Richie *et al.*, 1984 ; Serre & Robaire, 1999 ; Wang & Holstein, 1983).

▪ Les macrophages épидидymaires

Les macrophages sont les leucocytes les plus représentés dans le tissu intertubulaire. Les macrophages, dans ce tissu interstitiel, expriment les antigènes du complément de classe II alors que pour ceux présents dans l'épithélium épидидymaire ce n'est pas le cas (Nashan *et al.*, 1990).

Concernant les macrophages présents dans la lumière du tubule épидидymaire, il a été spéculé qu'ils pourraient être responsables de la phagocytose des spermatozoïdes vieillissants et de ceux en excès (Cooper *et al.*, 2002). Des études ont aussi suggéré que les cellules basales de l'épithélium épидидymaire exhibent des propriétés structurales et antigéniques typiques de macrophages (Yeung *et al.*, 1994 ; Seiler *et al.*, 1999). Elles pourraient ainsi être apparentées à des macrophages résidents et participer à la régulation de la réponse immune dans l'épididyme (Seiler *et al.*, 2000). De façon intrigante, il a été rapporté que le nombre de ces cellules basales exprimant des marqueurs spécifiques des macrophages est, chez la souris, augmenté en présence de spermatozoïdes endommagés (Seiler *et al.*, 1999 ; Seiler *et al.*, 2000).

- **Des cellules dendritiques interdigitées dans l'épithélium épидидymaire**

Des travaux très récents (Da Silva *et al.*, 2011) ont révélé la présence d'un réseau dense de cellules dendritiques au niveau de la région basale du tubule épидидymaire chez la souris. Ces cellules émettent des projections cytoplasmiques entre les cellules principales et atteignent ainsi le compartiment luminal. Elles semblent plus abondantes dans les régions proximales de l'épididyme mais sont présentes néanmoins tout le long du tubule. Ces cellules dendritiques intra-épithéliales épидидymaires expriment les molécules du CMH et sont capables au moins *in vitro* de présenter activement des antigènes exogènes (Da Silva *et al.*, 2011). Cette découverte récente est capitale en ce sens qu'elle témoigne pour la première fois que l'épithélium épидидymaire pourrait-être doué d'une activité de présentation antigénique, ce qui n'avait pas été rapporté jusque là. De façon intéressante ces cellules dendritiques intra-épithéliales sont de même nature (même sous-type de cellules dendritiques interdigitées, CDI) que celles trouvées au sein de l'épithélium intestinal. Etant donné leur localisation en région basale du tubule épидидymaire, comme les cellules basales, il n'est pas encore clair si l'on parle du même type cellulaire ou de deux types cellulaires distincts.

- **Les lymphocytes au sein de l'épididyme**

Analyser la localisation et la distribution des cellules T dans l'épididyme a été difficile par le fait que les antigènes CD4 et CD8 sont aussi exprimés par les macrophages et les monocytes chez le rat et chez l'homme (Crocker *et al.*, 1987 ; Gibbings *et al.*, 2007). Cependant, chez la souris où ces marqueurs de surface sont distribués de façon plus cellule-spécifique il ressort que l'on trouve plus de lymphocytes T^{CD4+} (T helper et T régulateur) que de T^{CD8+} (T cytotoxique) dans le tissu interstitiel alors que les lymphocytes intraépithéliaux sont principalement des cellules T^{CD8+} ce qui est une caractéristique commune des épithélia muqueux (Yakirevich *et al.*, 2002). Ceci semble être aussi le cas chez le rat et chez l'homme (Flickinger *et al.*, 1997 ; Nashan *et al.*, 1989 ; Ritchie *et al.*, 1984 ; Yakirevich *et al.*, 2002). Les macrophages intraépithéliaux et les cellules T^{CD8+} auraient un rôle important dans la protection contre les infections de

l'épididyme. En effet, une injection d'*Escherichia coli* dans l'épididyme d'une souris adulte *via* les canaux déférents provoque une augmentation des macrophages, des LT^{CD8+} et une augmentation de l'activité interstitielle épидидymaire de la zone pérítubulaire et de l'épithélium (Nashan *et al.*, 1993).

h. L'épididyme : un site de privilège immun

Comme évoqué déjà plus haut, le tractus génital mâle doit maintenir les gamètes à l'abri de réponses auto-immunes puisque ceux-ci sont synthétisés bien après l'établissement du répertoire immun de l'individu, dans un compartiment qui est à l'écart de la réponse immune systémique et qu'ils affichent des protéines spermatiques uniques à leur lignage donc potentiellement antigéniques et immunogéniques pour l'individu. Les mécanismes par lesquels cette situation de tolérance immune est réalisée au sein du tractus génital mâle sont peu étudiés mais quelques éléments de réponse sont néanmoins disponibles. Ceux-ci dévoilent une fois encore que la situation de privilège immun réalisée au sein de la gonade mâle est différente de celle qui est réalisée dans les glandes annexes.

▪ La situation dans le testicule

Les expériences de greffes ont démontré que le tissu interstitiel testiculaire autorise, et ce même pour des temps très longs, la survie de greffes allogéniques et xénogéniques. Ainsi ce compartiment est à l'abri des réponses immunes classiques qui conduiraient dans tout autre contexte au rejet des greffons. Pour autant, le tissu testiculaire possède un drainage lymphatique vers des ganglions périphériques, et il contient des populations non négligeables de cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques interdigitées) et de cellules T (Fergusson *et al.*, 1977 ; Head *et al.*, 1983 ; Head *et al.*, 1985 ; Whitmore & Gittes, 1978). Mis à part l'organisation tissulaire particulière que l'on a vu précédemment, les mécanismes par lesquels cette situation de privilège immun est établie dans le testicule sont encore peu clairs mais il est évident qu'ils impliquent des régulations de l'immunité locale qui sont propres au testicule (Hedger, 2007 ; Meinhardt & Hedger, 2011 ; Hedger, 2011). La

clinique vient aussi en support de ce constat puisque les inflammations/infections du tissu testiculaire (ie : orchites) sont peu fréquentes reflétant là aussi que le territoire testiculaire est bien protégé face aux situations infectieuses et inflammatoires.

De façon à comprendre comment cette situation de privilège immunologique testiculaire peut être établie il est nécessaire de rappeler comment l'immunité adaptative (suite à la présentation antigénique) est régulée chez les mammifères. La discrimination des antigènes du soi versus ceux du non soi repose sur la notion d'induction de la tolérance immune. Un premier étage de cet état de tolérance au soi est réalisé au niveau des organes hématopoïétiques primaires (moelle osseuse et thymus) dans lesquels les cellules B ou T autoréactives (c'est à dire capables de reconnaître des antigènes du soi) sont exclues du répertoire immun de l'individu (Kappler *et al.*, 1987 ; Liston *et al.*, 2003 ; Nossal, 1994). Cette tolérance centrale est établie avant la naissance et autour de la période périnatale pour beaucoup d'espèces de mammifères et, de ce fait, intervient bien avant l'apparition des antigènes spécifiques de la lignée germinale mâle. Un second étage de la tolérance au soi évoqué sous le terme de « tolérance périphérique » est établi tout le long de la vie de l'individu par de constantes interactions entre les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules T dans un environnement dit « tolérogénique ».

Cet environnement « tolérogénique » peut être assuré de plusieurs façon, non univoques : soit dans un contexte où certains signaux de co-stimulation nécessaires pour l'activation des cellules T sont absents, ou/et dans un contexte où des cytokines suppressives jugulent la réponse immune classique, ou/et dans un contexte où certaines sous-classes de leucocytes jouent des rôles immunosuppresseurs. Ces situations de « tolérance immune » conduisent alors à des réponses très diverses allant de la destruction des cellules T sélectionnées par les antigènes ou/et à la génération de sous-classes de cellules T immunosuppresseurs ou cellules T régulatrices (Treg) [Gilliet *et al.*, 2002 ; Toda & Piccirillo, 2006]. Par ailleurs, la réponse immune engagée dans ces situations tolérogéniques peut elle-même être modulée et l'équilibre de la réponse dite Th1 (immunité à médiation cellulaire agressive classiquement engagée dans les réponses de rejet de greffes allogéniques ou xénogéniques) *versus* la réponse Th2 (immunité à médiation humorale qui repose sur la génération d'anticorps tout en réduisant l'immunité à médiation cellulaire) peut être altéré. En général, les cellules Th2

et les macrophages de type M2 ont été associés aux situations de privilège immun et de tolérance immune dans différents contextes (Cobbold & Waldmann, 1998 ; Martinez *et al.*, 2008 ; Stein-Streilein & Streilein, 2002).

Ainsi la tolérance périphérique testiculaire acquise vis à vis des antigènes spermatiques repose probablement sur les mécanismes évoqués ci-dessus. La présence de cellules dendritiques présentatrices d'antigènes et de macrophages activés de type M2 dans le tissu interstitiel suggère que localement on peut avoir de la présentation antigénique. Head et collaborateurs (Head *et al.*, 2003) ont cependant montré que cette présentation restait confinée au tissu testiculaire et qu'elle n'engageait pas de réponse immune systémique contre les antigènes présentés. Un constat identique a été fait par plusieurs auteurs suite à l'observation que l'introduction d'allo-antigènes dans le tissu testiculaire supprime les réponses immunes périphériques contre ces mêmes antigènes (Ditzian-Kadanoff, 1999 ; Li *et al.*, 1997 ; Veräjänkora *et al.*, 2002). Cette notion de suppression locale de la réponse immune dans le testicule a été étayée plus récemment par l'observation d'une suppression de la réponse immune cellulaire et/ou humorale face à un antigène donné dans un modèle murin transgénique dans lequel cet antigène a été spécifiquement exprimé dans les spermatides (Krawetz *et al.*, 2009).

Cette observation illustre que les antigènes spermatiques sont probablement présentés et qu'une suppression de la réponse immune par les moyens évoqués plus haut a lieu au sein du testicule pour conduire à la situation d'immunotolérance. En accord avec cette notion d'immunosuppression locale il a été rapporté très récemment que les sous-classes de cellules T régulatrices (Treg) et de cellules NK immunorégulatrices sont particulièrement bien représentées dans le testicule (Hedger, 2011). De même, en accord avec cette situation particulière de privilège immun dans le testicule, des groupes ont rapporté que les cellules T à mémoire et les cellules T activées sont détruites lorsqu'elles entrent dans l'environnement du testicule (Dai *et al.*, 2005 ; Nasr *et al.*, 2005) inhibant ainsi toute possibilité de réponse adaptative. Le rôle important pouvant être joué par les cellules T régulatrices dans l'établissement de la tolérance immune au sein du testicule est par ailleurs souligné en clinique par l'observation de réponses auto-immunes testiculaires accrues dans un contexte où les

fonctions de ces cellules Treg sont défectueuses, comme c'est le cas dans les syndromes de polyendocrinopathies de type 2 (ASP2 ; Kriegel *et al.*, 2004).

○ **Les cellules de Sertoli ont des fonctions immunosuppressives**

Plusieurs études ont mis en avant que les cellules de Sertoli exercent des actions immunomodulatrices et immunosuppressives qui passent essentiellement par l'expression de molécules immunomodulatrices et/ou immunosuppressives. Par exemple, les cellules de Sertoli peuvent induire l'apoptose des cellules T *via* l'expression du ligand de Fas (FASL) ou de l'antigène CD274 (B7-H1) un régulateur négatif du signal de co-stimulation nécessaire à l'activation de la cellule T (Bellgrau *et al.*, 1995 ; Dal Secco *et al.*, 2008). Les cellules de Sertoli sont connues pour produire par ailleurs des inhibiteurs du complément, lequel est un acteur majeur de l'inflammation (Lee *et al.*, 2007). Les cellules de Sertoli sécrètent aussi des inhibiteurs du granzyme B produit par les lymphocytes T^{CD8+} dans le cadre de la réaction de cytotoxicité (Bladergroen *et al.*, 2001 ; Sipione *et al.*, 2006). Enfin, les cellules de Sertoli produisent plusieurs cytokines immunosuppressives telles que celles de la famille du TGF β (Activin A et TGF β 1) [Suarez-Pinzon *et al.*, 2000] et l'interleukine 10 (IL10) [O'Bryan *et al.*, 2005 ; Rival *et al.*, 2007 ; Watanabe *et al.*, 2005).

D'autres mécanismes immunomodulateurs ont été évoqués comme participant à la situation particulière du testicule comme par exemple : l'expression de molécules du CMH atypiques de type HLA-G et HLA-E qui inhibent l'activation des cellules T et des cellules NK (Fiszer *et al.*, 1997 ; Ryan *et al.*, 2002 ; Slukvin *et al.*, 1999), les rôles joués par certains intermédiaires lipidiques (prostanoïdes et tromboxanes) à action anti-inflammatoire (Winnall *et al.*, 2007 ; Hata & Breyer, 2004 ; Foulds *et al.*, 2008), et l'homéostasie du cholestérol *via* la voie des liver-X-receptors étant donné que lorsque ces récepteurs nucléaires sont invalidés chez la souris ils conduisent à des phénotypes testiculaires (et aussi épидидymaires) de type inflammatoires (Volle *et al.*, 2007 ; Ouvrier *et al.*, 2011). Enfin, parmi les autres acteurs participant certainement à l'immunomodulation dans le testicule on peut citer le rôle joué par l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) puisque dans une étude récente (Fallarino *et al.*, 2009), il a été montré que lorsque l'on bloque l'activité de cette enzyme dans un modèle de co-

transplantation de cellules de Sertoli porcine chez la souris on annule l'effet d'immunotolérance conféré par les cellules de Sertoli.IDO et ses produits d'activité (ie. les kynurénines) sont connus pour inhiber l'immunité à médiation cellulaire (basée sur l'engagement des cellules T inflammatoires) et favoriser la prolifération et l'activation des cellules T régulatrices.

▪ La situation dans l'épididyme

En ce qui concerne le territoire de l'épididyme, les données de la littérature sont encore plus parcellaires. Peu de données existent quant à la survie de greffes allogéniques dans ce territoire et les résultats sont incohérents (Kazeem , 1988). Il est par contre clair que l'épididyme est particulièrement plus concerné que le testicule par l'inflammation et qu'il est beaucoup plus fréquemment le siège d'événements d'infiltrations leucocytaires (de lymphocytes et de polynucléaires neutrophiles) qui accompagnent les épisodes infectieux et inflammatoires (Itoh *et al.*, 1995 ; Itoh *et al.*, 1999a ; Itoh *et al.*, 1999b).

Une hypothèse avancée est que la régulation des réponses immunes et donc la « tolérance immune » épидидymaire pourrait-être sous influence testiculaire. Cette idée a émergé suite à l'observation en clinique que chez les patients présentant une azoospermie obstructive ou, chez les patients ABCD (Absence Bilatérale Congénitale des Canaux Déférents), ou encore chez les hommes vasectomisés, l'apparition d'anticorps anti-spermatozoïdes et la concentration en ces anticorps augmentent plus la lésion obstructive est éloignée du testicule (de Kretser *et al.*, 1998). Cette observation laisse supposer que l'épididyme pourrait-être sous un champ d'influence testiculaire en ce qui concerne la réponse immune. Le fait que c'est au niveau de l'épididyme proximal que l'on trouve la plus forte concentration de leucocytes (Seiler *et al.*, 2009) et la plus forte représentation en cellules dendritiques (Da Silva *et al.*, 2011) pourrait aussi être interprété comme le résultat d'une influence testiculaire qui décroît plus on descend dans l'épididyme. Sans minimiser le contrôle lumicrine réel que le testicule exerce sur l'épididyme, une autre hypothèse peut être émise face à ces observations. L'arrivée des gamètes dans la lumière de l'épididyme dont on a vu qu'elle est moins cloisonnée que la lumière du tubule séminifère vis à vis de la voie systémique pourrait constituer un

challenge immunologique conduisant à une présentation d'antigènes spermatiques et la mise en œuvre de mécanismes immunomodulateurs locaux pour induire la nécessaire situation de tolérance immune. L'épididyme dans cette seconde hypothèse se révélant être plus actif dans le maintien de la situation de privilège immunitaire que dans la première hypothèse.

La présence de macrophages intraépithéliaux associée à la mise en évidence très récente de cellules dendritiques dans l'épithélium épididymaire murin (Da Silva et al., 2011) supportent l'idée que, à l'image de ce qui existe dans le testicule, c'est par le biais d'une présentation antigénique contrôlée que la situation de tolérance immunitaire vis à vis des gamètes est réalisée ou/et maintenue dans l'épididyme.

Concernant les mécanismes moléculaires immunomodulateurs mis en jeu dans l'épididyme, la littérature est pratiquement réduite à néant. La cytokine immunomodulatrice TGF β 1 a été mise en évidence dans les cellules principales et apicales de l'épididyme du singe marmoset (Baumgardner *et al.*, 1999) où elle pourrait exercer son rôle immunosuppresseur.

Plus significatif, est l'intense activité de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) associée depuis les années 1980 au territoire épididymaire (Yoshida *et al.*, 1980 ; Takahashi *et al.*, 1980) qui a fait de ce tissu un tissu de référence pour l'activité IDO. Une autre des caractéristiques de l'expression épididymaire d'IDO est le fait qu'elle est constitutive et donc, indépendante des cytokines inflammatoires (Interféron gamma=INF- γ et TNF alpha=TNF- α) qui sont généralement ses principaux inducteurs dans les autres tissus dans les situations inflammatoires et infectieuses (Mellor *et al.*, 2004).

3. L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO)

L'indoleamine 2,3-dioxygénase ou IDO est une hémoprotéine, qui assure la conversion du Tryptophane (Trp) en formyl-L-kynurénine en catalysant le clivage oxydatif du noyau indole du Trp (Yamamoto & Hayaishi, 1967). IDO est une hémoprotéine atypique en ce sens qu'elle ne présente aucune similarité ou identité

structurale ou catalytique avec les autres protéines contenant un groupement hème comme l'hémoglobine, la myoglobine et le cytochrome P-450.

Contrairement à la Tryptophane 2,3-dioxygénase ou TDO (enzyme sœur d'IDO qui possède une activité de même nature) qui ne réagit qu'avec le L-Trp, l'IDO n'est pas spécifique du L-Trp, mais, possède un large spectre d'activité (Hirata *et al.*, 1975). En effet, elle est capable de métaboliser le D-Trp ainsi que d'autres indoleamines comme la tryptamine et la sérotonine qui ont aussi comme point de départ de leur synthèse le tryptophane (Shimizu *et al.*, 1978 ; Thomas & Stocker ,1999). En ce qui concerne la distribution tissulaire, TDO est connue pour être majoritairement exprimée dans les cellules hépatiques alors qu'IDO est plus ubiquiste. Chez les mammifères, IDO est exprimée de façon basale au niveau de plusieurs tissus dont : le colon, la rate, les reins, l'estomac, le poumon et le cerveau (Hayaishi *et al.*, 1975). IDO est exprimée constitutivement à un niveau basal dans les environnements immuns comme les ganglions lymphatiques, le thymus et dans quelques lignées de cellules dendritiques (Takikawa *et al.*, 1986 ; Mellor *et al.*, 2003), mais aussi, dans certains épithelia muqueux tels que celui du placenta et de l'intestin.

IDO a été détectée dans les cellules géantes trophoblastiques humaines au niveau de la barrière materno-fœtale (Honig *et al.*, 2004) et dans les cellules trophoblastiques fœtales chez la souris (Baban *et al.*, 2004). Enfin, comme déjà évoqué plus haut, IDO est fortement exprimée et de façon constitutive au niveau de l'épididyme (Britan *et al.*, 2006). IDO est une enzyme inductible et il a été rapporté que l'activité d'IDO est induite en réponse à l'inflammation dans les cellules de l'immunité innée telles que les cellules dendritiques (Burudi *et al.*, 2002), les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles (Bozza *et al.*, 2005), les éosinophiles (Odemuya *et al.*, 2002).

Plus récemment, une autre enzyme a été découverte, impliquée dans la première étape de dégradation du tryptophane (Ball *et al.*, 2007 ; Metz *et al.*, 2007). Possédant 43% de similarité au niveau de la chaîne peptidique avec IDO, cette enzyme a été appelée IDO2 ou IDO-like protein (INDOL). Le gène codant pour IDO2 est situé sur le même chromosome que celui codant pour IDO et très proche de ce dernier. Ils partagent certains éléments de promoteurs suggérant un fonctionnement coordonné. IDO2 possède la même activité enzymatique qu'IDO (que l'on dénommera arbitrairement maintenant IDO1). Elle peut cataboliser les mêmes substrats mais avec cependant une

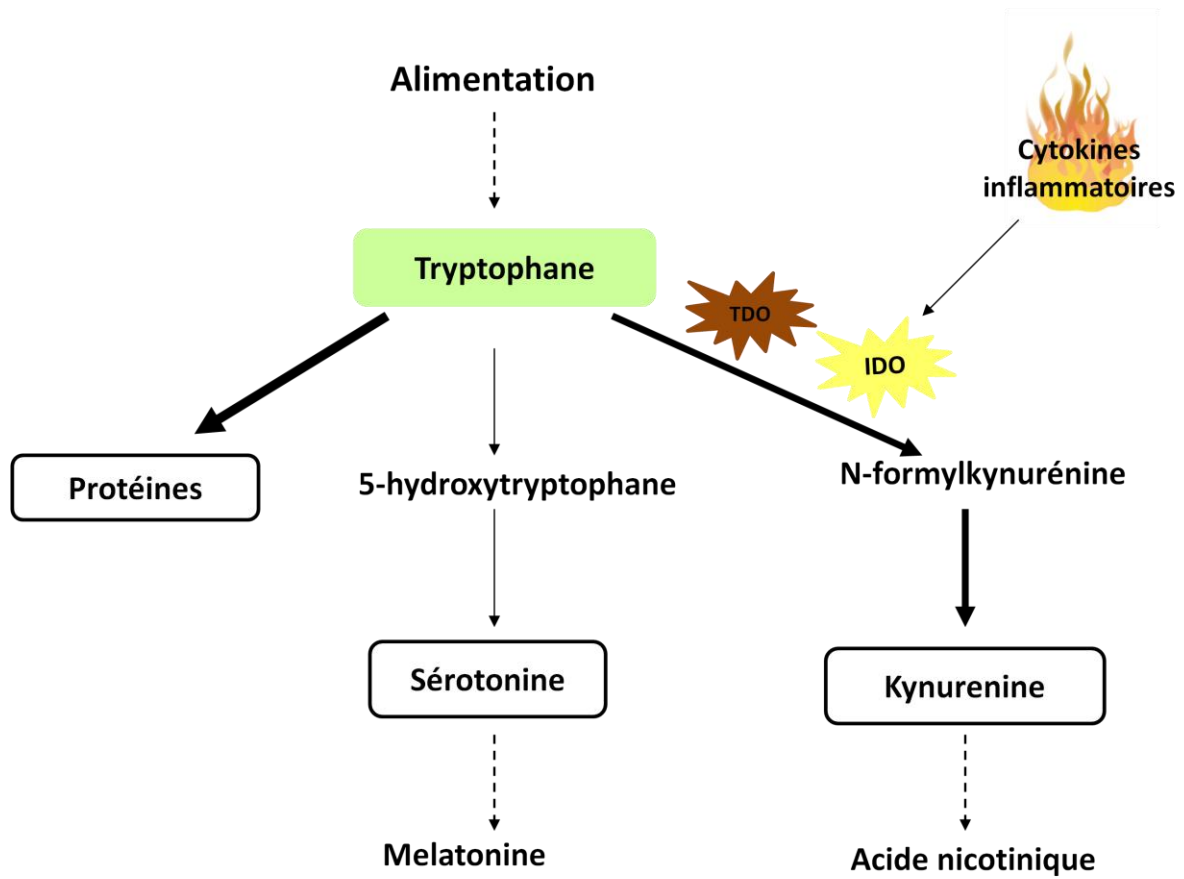


Figure B17 : Les différentes voies de catabolisme du tryptophane.

IDO: Indoléamine 2,3 dioxygénase ; TDO :Tryptophane 2,3 dioxygénase.

moindre efficacité. IDO2 est exprimée majoritairement dans le rein, le tractus génital mâle et femelle ainsi que dans les poumons. Son rôle physiologique n'est pas encore bien élucidé (Ball *et al.*, 2009 ; Auslin *et al.*, 2010).

Ainsi, IDO est codée par deux gènes situés sur le chromosome 8 chez l'homme et la souris (Burkin *et al.*, 1993). Le gène codant pour IDO1 contient 10 exons répartis sur 15kb de séquences (Suzuki *et al.*, 2003). Chez le rat et la souris, le gène d'IDO1 code pour une protéine de 407 acides aminés dont le poids moléculaire est de 43 KDa (Habara-Ohkubo *et al.*, 1991). Chez l'homme, la protéine IDO1 comporte 403 acides aminés et a un poids moléculaire de 45 KDa (Tone *et al.*, 1990). L'IDO1 humaine présente, respectivement, 57% et 58% d'homologie avec l'IDO1 de souris et du rat ce qui laisse supposer que ce gène a été largement conservé au cours de l'évolution (Suzuki *et al.*, 2003).

a. IDO et le métabolisme du tryptophane

Le tryptophane (Trp) est le moins abondant des acides aminés essentiels chez les mammifères. Bien qu'il ne représente que seulement 1% des 20 acides aminés constituant les protéines, plus de 95% de la concentration de Trp ingéré est utilisée pour la synthèse des protéines, le reste étant utilisé dans d'autres processus physiologiques. Le Trp circulant dans le sang provient essentiellement de l'alimentation mais aussi du clivage/recyclage protéique par le mécanisme du « turnover » protéique (Brown, 1996). La majeure partie du Trp sérique (50 à 80%) est liée à l'albumine tandis que le reste circule sous une forme libre (McMenamy & Oncley, 1958). Seule la fraction libre du Trp peut traverser la barrière hémato-encéphalique grâce à un transporteur actif, le L-type amino-acid-transporter-1 (LAT-1), présent sur la membrane de certaines populations cellulaires, principalement les cellules endothéliales (Curzon, 1996 ; Russo *et al.*, 2003). En dehors de son utilisation dans la biosynthèse des protéines, le tryptophane est le précurseur d'autres composés importants comme la sérotonine, la mélatonine (figure B17), l'acide indoxyl-acétique et les kynurénines. Seule une faible concentration du Trp (1%) est utilisée pour la synthèse de la sérotonine. Quantitativement, la seconde voie d'utilisation du Trp, après la synthèse protéique est la

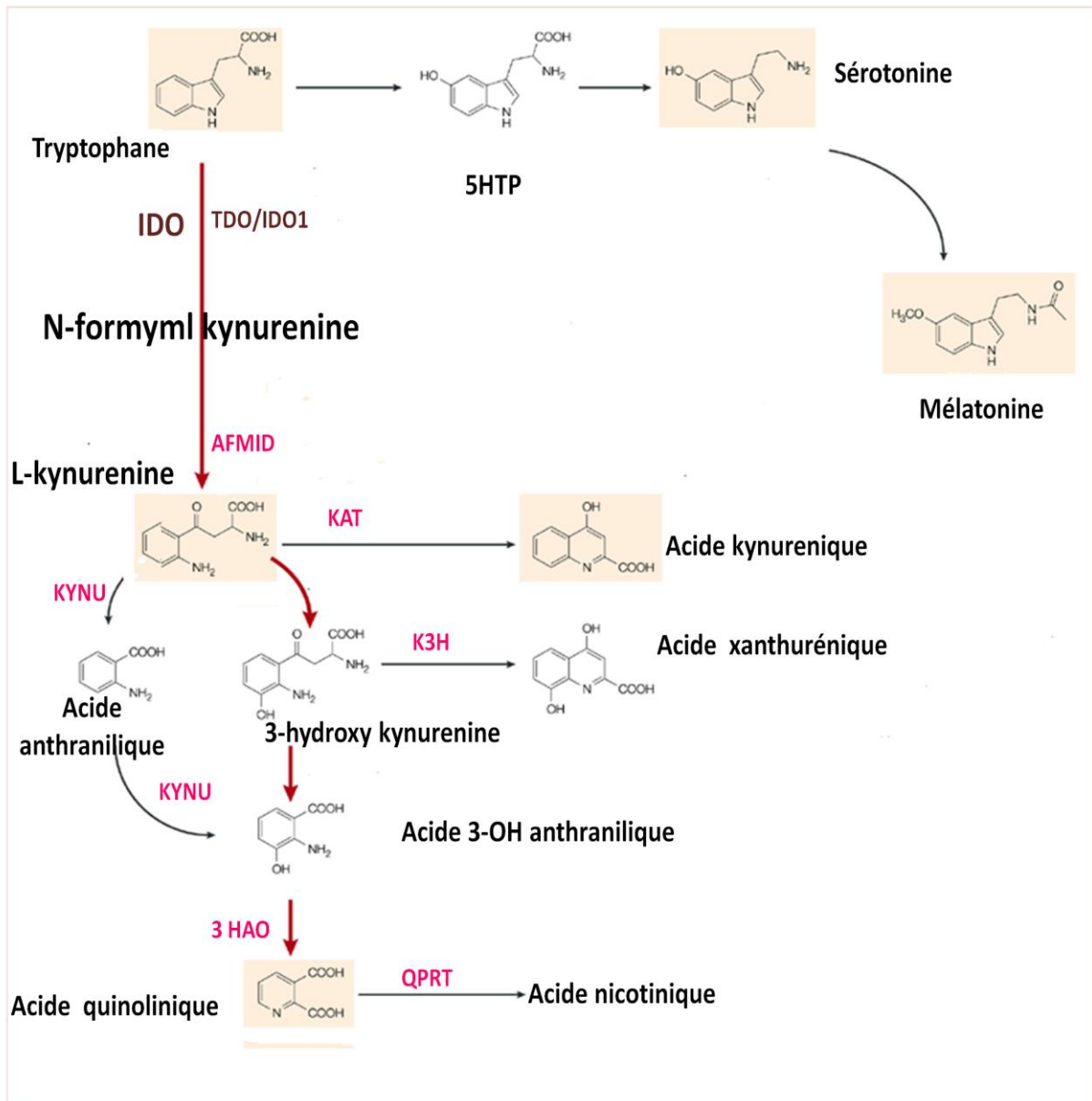


Figure B18: Voie de synthèse des kynurenines.

AFMID: kynurenine formaminase, KYNU: kynuréninase, KAT: kynurenine amino transferase, K3H: kynurenine 3-hydroxylase, 3HAO:3hydroxy amino oxidase, QPRT: Quinolate phosphoribosyltransférase.

voie de biosynthèse d'une variété de métabolites, dérivés indoles, appelés collectivement les kynurénines (Salter *et al.*, 1989).

▪ La voie de la synthèse de la sérotonine

La sérotonine est un neurotransmetteur impliqué dans la régulation de la plupart des grandes fonctions de l'organisme telles que la régulation du cycle veille-sommeil, la thermorégulation, les comportements alimentaires (effet anorexigène) ainsi que sexuels, les états émotionnels tels que l'humeur (action antidépressive) et l'anxiété, la nociception et les contrôles moteurs (Lucki, 1998). La biosynthèse de la sérotonine (5-HT) à partir de son précurseur le L-tryptophane est réalisée en 2 étapes distinctes (Boadle-Biber, 1993).

La première étape consiste à l'hydroxylation du Trp en 5-hydroxytryptophane (5-HTP). Cette réaction est catalysée par la tryptophane-5-hydroxylase (Lovenberg *et al.*, 1967). Le 5-HTP est ensuite décarboxylé en 5-HT par la L-amino-décarboxylase (Henry & Bowsher, 1986 ; figure B18).

▪ La voie de la synthèse des kynurénines

La voie des kynurénines (voir figure R6 dans la section « résultats ») est la voie majoritaire du métabolisme non protéique du Trp (Takikawa *et al.*, 1986) par l'intermédiaire de la tryptophane 2-3-dioxygénase (TDO) et de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Schwarcz & Du, 1991; Stone, 1993). La première étape de cette dégradation permet la formation de la N-formylkynurénine convertie ensuite en L-kynurénine (KYNU), précurseur de l'acide nicotinique ainsi que de l'acide xanthurénique (Grohmann *et al.*, 2003; Schwarcz & Du, 1991). Cette conversion se fait par l'intermédiaire de la kynurénine formamidase (AFMID) qui va déformyler la N-formylkynurénine en L-kynurénine. La kynurénine-3-monooxygénase (KMO) convertit la kynurénine en radicaux libres neurotoxiques producteurs de 3-hydroxykynurénine (3-OH KYN ou HK) qui pourra être ensuite métabolisée en acide quinolinique (QUIN) excitotoxique. L'acide quinolinique va ensuite être pris en charge par l'acide

quinolinique phosphoribosyltransférase (NadC) pour conduire à la formation de l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN). La kynurénine aminotransférase II (KAT) métabolise la kynurénine en acide kynurénique (KYNA ou KA), un composé neuroprotecteur du fait de ses propriétés antagonistes des récepteurs glutamate NMDA mais aussi alpha-7 nicotinergique et AMPA (Connor *et al.*, 2008). Au terme de la voie principale des kynurénines, l'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) formé est ensuite pris en charge par différentes enzymes pour conduire à la formation du nicotinamide adéninedinucléotide ou NAD, coenzyme ubiquitaire, impliqué dans un grand nombre de réactions cellulaires, en particulier, la synthèse d'adénosine triphosphate ATP. La voie principale de la cascade des kynurénines est ainsi une voie importante du recyclage du NAD intracellulaire.

A cause des activités neuroexcitatives ou neuroprotectrices des kynurénines (KA, HK et QUIN), un intérêt certain a été donné ces dernières années à l'activité IDO dans le système nerveux central. En effet, HK augmente l'activité des monoamines oxydases et de ce fait pourrait être impliquée dans le développement des troubles de l'humeur en diminuant indirectement les taux de 5-HT et donc la synthèse de sérotonine. Une production élevée de QUIN ou de HK a été observée dans de nombreuses pathologies neurovégétatives à composante inflammatoire (Ogawa *et al.*, 1992; Reynolds & Pearson, 1989). Il a été également montré que les cerveaux des patients atteints de maladie d'Alzheimer présentent un métabolisme des kynurénines élevé. Le blocage des récepteurs NMDA par KA pourrait ainsi être responsable de l'altération de la mémoire, de l'apprentissage et de la cognition chez les patients atteints d'Alzheimer (Baran *et al.*, 1999).

Etant donné :

-la distribution tissulaire d'IDO (au niveau des voies de pénétrations d'antigènes que représentent les épithélia muqueux et dans les sites où une situation de privilège immun est installée) ;

-la distribution cellulaire d'IDO (dans les cellules de l'immunité, cellules dendritiques et macrophages...) et,

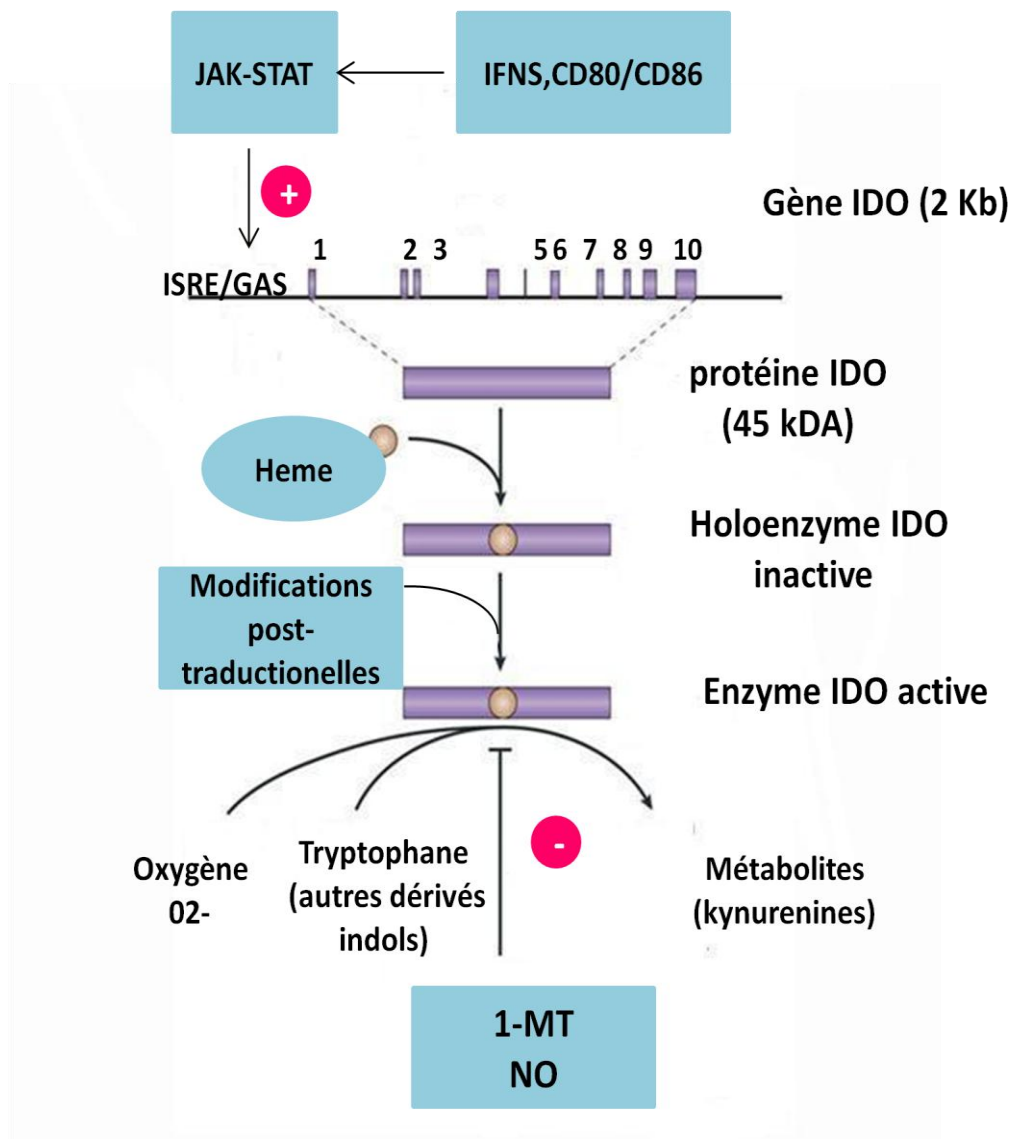


Figure B19 : Génétique et régulation de l'IDO.

1-MT :1-méthyle tryptophane,NO :l'oxyde nitrique.

-en tenant compte du caractère inductible d'IDO par les cytokines inflammatoires dans ces localisations, les recherches se sont aussi concentrées sur le rôle d'IDO dans la réponse immune.

b. La régulation de l'expression d'IDO

▪ Les inducteurs d'IDO

La transcription d'IDO est connue pour être finement régulée par les cytokines inflammatoires et les lipopolysaccharides (LPS) [Mellor & Munn, 2004 ; figure B19].

○ Induction par l'IFN gamma (IFN- γ)

L'IFN gamma (INF- γ) est une cytokine inflammatoire pléiotrope appartenant à la famille des interférons de type II, elle est exclusivement produite par certaines cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes T, les cellules NK et les macrophages (Young, 1996). Cette cytokine est impliquée dans l'hématopoïèse, dans la différenciation des cellules T, dans l'induction des réponses immunes inflammatoires et possède plusieurs fonctions antimicrobiennes, antitumorales et antiprolifératives. C'est l'un des principaux inducteurs d'IDO1 *in vivo* et *in vitro*. De nombreux types cellulaires dont certaines cellules de la lignée myéloïde, les cellules dendritiques, les macrophages activés, les cellules présentatrices d'antigène (CPA), les fibroblastes, les cellules endothéliales mais également de nombreuses cellules tumorales, expriment IDO1 après stimulation par l'INF- γ . Durant l'inflammation, il a été montré que la voie de l'INF- γ est essentielle pour la surexpression d'IDO1 (Mellor & Munn, 2004 ; Wang, 2007). La preuve du caractère inductible d'IDO1 *in vivo* par l'INF- γ est venue de l'observation que les souris déficientes pour l'INF- γ sont incapables d'exprimer IDO1 lors d'une infection (Silva *et al.*, 2002). De façon attendue suite à cette observation, il a été montré que les promoteurs des gènes IDO1 murins et humains possèdent de nombreux éléments de réponse aux interférons de type I (INF- α/β) et de type II (INF- γ) [Dai & Gupta, 1990b]. Deux séquences ISRE (Interferon-Stimulated Response Elements), ISRE-1 et ISRE-2 (Gribaudo *et al.*, 1987; Cohen *et al.*, 1988) séparées l'une de l'autre par deux séquences

GAS (Gamma-interferon Activation Sequences) ont ainsi été identifiées (Chon *et al.*, 1995). La présence de ces deux éléments ISRE ainsi que la coopération des séquences ISRE-1 et GAS-2 seraient nécessaires pour l'induction maximale du promoteur d'*Ido1* (Chon *et al.*, 1996). L'activation de ce promoteur est contrôlée par la collaboration de deux signaux de transduction: IRF-1 (Interferon regulatory factor-1) et STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription-1) [Sotero-Esteva *et al.*, 2000]. Les interférons de type I (INF- α/β) peuvent également induire IDO1 cependant plus faiblement que ne le fait l'INF- γ (Konan & Taylor., 2007). Cette faible activité a été attribuée à la formation d'un complexe instable entre le signal de transduction, l'INF- α *stimulated gene factor 3* et la séquence ISRE du promoteur *Ido1* (Hassanain *et al.*, 1993).

○ **Induction par le TNF-alpha et les interleukines**

D'autres cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β et le facteur de nécrose tumoral TNF- α agissent en synergie avec l'INF- γ pour activer l'expression d'IDO1 *in vitro* (Robinson *et al.*, 2003). En effet, des études ont montré que l'activation d'*Ido1* au niveau de la microglie est induite par la coopération de l'INF- γ et du TNF- α (Kwidzinski *et al.*, 2005). Le TNF- α est principalement produit par les macrophages et il est connu pour ses puissants effets inflammatoires ainsi que pour son rôle comme médiateur endogène central du choc toxique (Dayer *et al.*, 1985). Le TNF- α peut induire l'expression, *in vitro*, d'*Ido1* seul ou en coopération avec d'autres interleukines comme l'IL-1 β et l'IL-6 (Robinson *et al.*, 2006). Il a aussi été démontré que d'autres interleukines comme l'IL-2 et l'IL-12 peuvent augmenter l'expression d'*Ido1* indirectement *via* un mécanisme dépendant de l'INF- γ (Carlin *et al.*, 1987 ; Yu *et al.*, 1996). Dans des lignées cellulaires humaines d'ostéosarcome l'action combinée des interleukines IL-12 et IL-18, induit l'expression d'*Ido1* par un mécanisme cette fois-ci indépendant de l'INF- γ (Liebau *et al.*, 2002). Enfin, les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 ont été trouvées impliquées dans le contrôle de l'expression d'*Ido1* en opposant les effets de l'INF- γ dans différents types cellulaires (Chaves *et al.*, 2001 ; Yadav *et al.*, 2007).

- **Induction par le LPS**

Le lipopolysaccharide bactérien (LPS) est une endotoxine, composant majeur du feuillet le plus externe de la paroi des bactéries à Gram négatif. Classiquement utilisé comme modèle expérimental d'inflammation, le LPS reproduit les effets d'une infection bactérienne en induisant une production massive mais transitoire de cytokines périphériques et cérébrales. Le LPS a été montré comme un puissant inducteur d'IDO1 (Yoshida *et al.*, 1981). En effet, l'administration du LPS induit la stimulation de l'activité de l'IDO1 pulmonaire *in vitro* (Yoshida *et al.*, 1979) ainsi que son activité cérébrale et périphérique *in vivo* (Moreau *et al.*, 2005). Cette activation enzymatique d'IDO1 est accompagnée du développement d'un comportement de type dépressif (O'Connor *et al.*, 2008). Il a été aussi rapporté, que la stimulation de l'IDO1 en réponse au LPS, *in vivo*, dépend de l'activation du système immunitaire *via* l'INF- γ , le TNF- α et les TLRs ou *Toll Like Receptors* (Fujigaki *et al.*, 2001 ; Hayashi *et al.*, 2004).

- **Autres inducteurs**

A part les inducteurs cités ci-dessus, qui stimulent fortement l'expression de l'IDO au cours de la réponse immunitaire et de l'inflammation, d'autres molécules appartenant ou non à l'immunité peuvent également agir sur l'activité d'IDO. Parmi ces molécules, le CTLA4, protéine membranaire soluble des lymphocytes T cytotoxiques, est la plus citée (Fallarino *et al.*, 2004). Le CTLA4 est un régulateur négatif de la prolifération des cellules T (Sun *et al.*, 2008). La forme soluble du CTLA4, le CTLA4-Ig, est capable d'induire l'expression d'IDO (Grohmann *et al.*, 2002). Les Tregs *via* le CTLA4 peuvent, de même, déclencher l'expression d'IDO, *in vitro*, dans les cellules dendritiques (Fallarino *et al.*, 2003). Cette stimulation s'effectue à travers la ligation des CTLA4, exprimés à la surface des Tregs, à la protéine B7-1 et/ou B7-2 située sur les cellules dendritiques (Grohmann *et al.*, 2002).

D'autres molécules, comme SOCS3 (suppressor of cytokin signalling 3) et Bin1 ont aussi été rapportées comme induisant IDO. Bin 1 serait impliquée dans le contrôle de l'expression du gène codant pour IDO (Mellor *et al.*, 2005). En effet, l'activation du promoteur d'*Ido1* nécessite STAT1 et NF- κ B, qui peuvent être influencés en partie par

Bin 1 (Muller *et al.*, 2001) puisque Bin 1 module le trafic subcellulaire de STAT1 et NF- κ B (Muller *et al.*, 2004 ; Bild *et al.*, 2002). De plus, des études ont prouvé que l'ADN bactérien et que des ADN synthétiques comme les ISS-ODN (synthetic immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotides) sont capables d'induire IDO *in vivo* comme *in vitro* (Grohmann *et al.*, 2003 ; Mellor & Munn., 2004). Cette induction se produit par l'intermédiaire de la protéine membranaire TLR9 (*Toll-like receptor 9*) exprimée dans les cellules B, dans les macrophages et dans les cellules dendritiques et qui fixe les CpG-ODNs (unmethylated cytidyl guanosyl) présents dans le génome viral ou bactérien. Cette liaison va stimuler la production d'INF- γ et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Krieg *et al.*, 2006). Les CpG-ODNs sont des agents immunostimulants puissants utilisés en clinique comme par exemple chez les patients souffrant de cancer des poumons (Leichmann *et al.*, 2005). Leur administration entraîne la diminution de l'expression d'IDO par les cellules tumorales qui utilisent cette dernière pour créer une situation d'immunosuppression et donc une situation d'échappement à la surveillance immune anti-tumorale (Mellor *et al.*, 2005 ; Wingender *et al.*, 2006).

La cyclooxygénase 2 ou COX 2, induite dans les macrophages activés et dans d'autres cellules au niveau des sites inflammatoires est aussi considérée comme inductrice de l'expression d'IDO. Cette induction est réalisée *via* la production de molécules pro-inflammatoires telle que la prostaglandine PGE2 qui relaie le rôle de COX2 dans la suppression immunitaire (Katz *et al.*, 2008). En effet, il a été montré que PGE2 induit l'expression de l'ARNm d'IDO (Von Bergwelt *et al.*, 2006 ; Pucetti *et al.*, 2007). Des études *in vitro* ont par ailleurs démontré que les glucocorticoïdes augmentent l'activité d'IDO par un mécanisme dépendant de l'INF- γ (Turck *et al.*, 2005).

Enfin, les hormones, comme la prolactine (Kawaguchi *et al.*, 2008) et les œstrogènes (Xiao *et al.*, 2004) peuvent aussi amplifier l'activation de l'IDO *via* l'induction des cytokines.

- **Les inhibiteurs d'IDO**

- **Les inhibiteurs compétitifs**

L'inhibiteur le plus connu d'IDO est le 1-méthyltryptophane (1MT), il existe sous deux isomères : L-1MT et D-1MT. La combinaison des deux isomères à de fortes

concentrations bloque l'activité d'IDO (Agougou *et al.*, 2006). L'isomère L-1MT est plus puissant que le D-1MT dans le blocage de l'activité enzymatique (63% et 12% d'inhibition, respectivement) [Peterson *et al.*, 1994]. Parmi les effets inhibiteurs du 1MT sur IDO, on peut noter l'augmentation des réponses des cellules T contre les antigènes tumoraux et les auto-antigènes *in vivo* (Grohmann *et al.*, 2001 ; Muller & Scherle, 2006 ; Hou *et al.*, 2007). Des développements cliniques sont envisagés puisque l'administration de 1MT peut à la fois stimuler les réponses T contre les antigènes tumoraux et inhiber l'activité IDO des cellules cancéreuses.

Les cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF β 1 (transforming growth factor beta1) et l'IL-4 sont connues pour inhiber à la fois l'activité et l'expression d'IDO au sein des monocytes et des fibroblastes humains (Musso *et al.*, 1994 ; Yuan *et al.*, 1998).

L'oxyde nitrique (NO), produit à partir du L-Arginine, est capable d'inhiber l'activité enzymatique d'IDO en bloquant le groupe prosthétique de l'hème (Alberti-Giani *et al.*, 1997 ; Aitken *et al.*, 2004). Une régulation croisée existe ainsi entre la production de NO par l'oxyde nitrique synthase (NOS) et IDO.

De nombreuses autres substances peuvent inhiber IDO indirectement en bloquant, *in vitro*, la dégradation du tryptophane. Parmi ces molécules, on peut citer l'acide acetylsalicylique (aspirine), les vitamines C et E (Winkler *et al.*, 2007), le sulfate de sodium E221, l'acide sorbique E200 (Winkler *et al.*, 2006a). Des extraits de plantes peuvent également freiner la dégradation du tryptophane par IDO en inhibant la production de l'INF γ (Winkler *et al.*, 2005a et b) comme la phytoalexine Brassinin (Gaspari *et al.*, 2006) et le resvératrol (Wirleitner *et al.*, 2005).

○ **Les inhibiteurs non compétitifs**

Parmi les premiers inhibiteurs non compétitifs décrits dans la littérature on peut citer les dérivés b-carboline (Sono & Cady, 1989). D'autres composés agissant comme inhibiteur d'IDO ont été rapportés comme le phenyl-imidazole et la brassilexin, Les dérivés naphtoquinone et la vitamine K3 (ménadione 32) (Sono & Cady, 1989 ; Kumar *et al.*, 2008). L'exiguamine A, un alcaloïde de l'éponge marine *Neopetrosia exigua*, est un

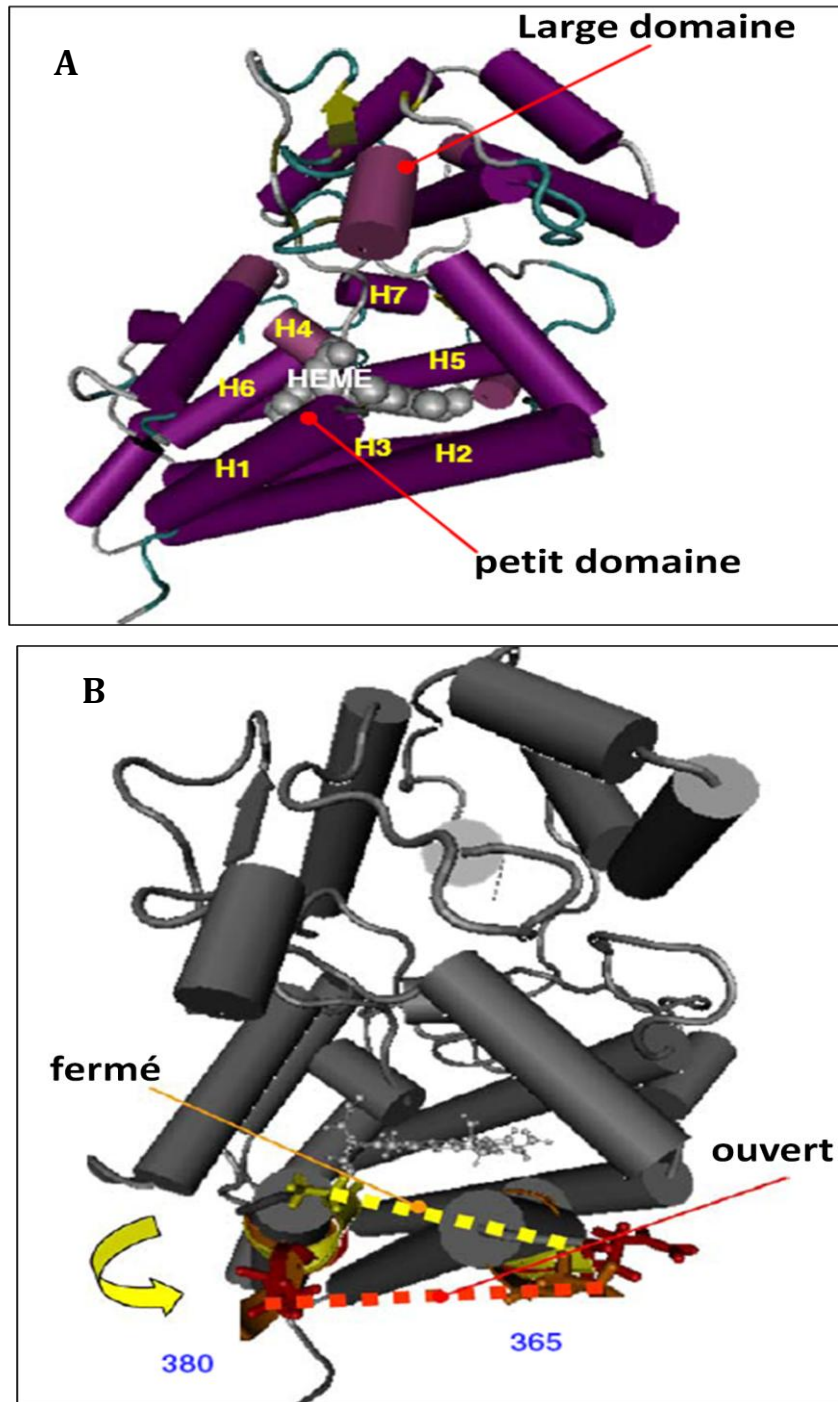


Figure B20: Structure d'IDO

(d'après Macchiarulo *et al.*, 2009).

A : la structure cristalline de la forme inactive d'IDO

B : la boucle flexible (résidus 360-380) bordant l'accès au site catalytique de l'IDO. Le changement de la conformation ouverte (en jaune) et fermée (en rouge) de la boucle est impliqué dans le contrôle de la liaison du substrat et du produit au site catalytique d'IDO.

produit naturel marin, également connu comme un puissant inhibiteur d'IDO (Brastianos *et al.*, 2006).

c. **Structure et propriétés catalytiques d'IDO**

Les études cristallographiques ont montré que l'enzyme est formé de deux domaines (Sugimoto *et al.*, 2006), un petit domaine et un large domaine. Le petit domaine est constitué de 9 hélices α et de deux feuillets β tandis que le large domaine est composé de 15 hélices α et du site catalytique contenant un résidu His 346 actif et le groupement hème.

Un grand nombre d'interactions impliquant des ponts disulfures, des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes stabilisent la structure de l'enzyme entre les deux domaines. Le site catalytique est bordé d'une boucle flexible d'une vingtaine d'acides aminés définissant une chaîne tournante parallèle au plan de l'hème (figure B20). Des analyses biochimiques ont montré que chaque boucle a un rôle dans le contrôle de la liaison du substrat et du produit au site catalytique d'IDO (Macchiarulo *et al.*, 2007). Le site catalytique de l'hème constitue le site de liaison distal où le substrat se fixe, il est composé de résidus appartenant aux deux domaines (le petit et le large) et à la boucle flexible au niveau des résidus 260-265 connectant les deux domaines. Le site catalytique d'IDO est dépourvu de résidus polarisés exceptée la Ser167, cependant, ce résidu n'est impliqué ni dans l'activité catalytique ni dans la reconnaissance du substrat (Chauhan *et al.*, 2008).

A ce jour, les mécanismes d'activation d'IDO sont peu connus, et sont encore en cours d'investigation. Sono *et al.* (1996) ont proposé un modèle d'activation catalytique d'IDO. La première étape passerait par la réduction de la forme ferrique IDO-Fe(III) vers la forme ferreuse IDO-Fe(II) par fixation de l'atome d'oxygène de l'anion superoxyde O_2^- , le donneur d'électron, pour former le complexe binaire IDO-Fe(III)/superoxyde qui représente la forme active d'IDO. La forme réduite d'IDO, déjà activée par la fixation de O_2^- , peut ensuite fixer le L-Trp pour former le complexe tertiaire Fe(II)/oxygen/L-Trp. Hayaishi *et al.* (1977) ont les premiers mis en évidence le rôle crucial joué par l'anion

superoxyde en démontrant que l'activation d'IDO est rapidement inhibée en présence de la superoxyde dismutase (Hirata & Hayaishi, 1975 ; Hirata *et al.*, 1977; Sono *et al.*, 1980).

La mononucléotide flavine réduite et la biophtérine ont cependant été suggérées depuis comme étant de possibles donneurs d'électron alternatifs pour l'IDO au moins *in vitro* (Ozaki *et al.*, 1986, 1987). Des études plus récentes ont par ailleurs montré que le cytochrome b5 et la cytochrome b5 réductase sont des acteurs indispensables dans le maintien de l'activité d'IDO humaine *in vivo* (Maghzal *et al.*, 2008). En effet, le cytochrome b5, en particulier, peut favoriser la formation d'un complexe transitoire de transfert protéine-électron (Bendall, 1996) avec IDO pour accomplir la réduction de la forme ferrique vers la forme active ferreuse.

d. Rôles associés à l'activité IDO

▪ Rôle antiprolifératif

A l'image des mammifères pour qui le Trp est un acide aminé essentiel de nombreux autres organismes sont dépendants du tryptophane. C'est ainsi qu'il a été montré que beaucoup de pathogènes (protozoaires, bactéries, virus) sont sensibles à la déplétion en cet acide aminé *in vitro*, qui freine leur prolifération dans les cellules humaines. Par exemple, les microorganismes tels que les mycobactéries, les entérocoques, les streptocoques du groupe B et plusieurs variétés de virus dont le HIV, le cytomégalovirus, et le virus de l'herpès sont sensibles à la privation en Trp (Mellor & Munn, 2004 ; MacKenzie *et al.*, 2007 ; Zamanakou *et al.*, 2007). La déplétion en tryptophane provoque aussi l'inhibition de la prolifération des parasites intracellulaires comme *Chlamydia trachomatis* (Nettelbrecker *et al.*, 1998) et *Toxoplasma gondii* (Pfefferkon *et al.*, 1984 ; Dauerbeuer *et al.*, 1999). En parallèle, il a été noté une augmentation de la dégradation du tryptophane *in vivo* dans plusieurs maladies infectieuses humaines (Murray, 2003). A titre d'exemple, chez la souris, l'activité enzymatique de l'IDO pulmonaire est fortement stimulée lors d'une injection de LPS ou au cours d'une infection par le virus de la grippe, entraînant une déplétion massive en Trp (Yoshida & Hayaishi, 1978; Yoshida *et al.*, 1979). En 1986, Pfefferkorn *et al.* ont

suggéré que les effets antiprolifératifs de l'IFN- γ passeraient par l'activation de l'IDO. Le rôle antiprolifératif d'IDO a été plus particulièrement élucidé par Feng & Taylor en 1989 quand ils ont remarqué que la prolifération d'une lignée cellulaire tumorale augmentait de façon corollée à une réduction de l'activité IDO. Cette observation a démontré l'existence d'une corrélation entre l'induction d'IDO par l'IFN- γ et les effets antiprolifératifs induits par cette cytokine.

Ainsi, la stimulation de l'activité de l'IDO qui accompagne la réponse inflammatoire, première phase de la réponse immune, en diminuant sur le site la disponibilité en Trp limiterait la synthèse protéique et la division cellulaire des pathogènes, donc leur croissance et leur prolifération (King & Thomas, 2007; Mellor & Munn, 2003). D'où, l'un des premiers rôles attribué à IDO, est son action dans l'immunité innée (Taylor & Feng, 1991). L'activité IDO a dès lors été considérée comme une des premières étapes de la défense contre l'invasion des pathogènes (Thomas & Stocker, 1999) dans la réponse immune naturelle.

- **IDO un contrôleur de la réponse immune adaptative**

Il est apparu rapidement que le rôle d'IDO n'était pas cantonné à la défense primaire mais qu'il s'étendait bien au delà lors de l'engagement de la réponse immune adaptative.

- ***Rappels sur la réponse immune adaptative***

Les principaux acteurs de l'immunité adaptative sont les lymphocytes T et B qui expriment des récepteurs spécifiques aux antigènes : le récepteur des cellules T ou (TCR) et le récepteur des cellules B ou (BCR). Alors que les lymphocytes B reconnaissent directement les déterminants antigéniques (épitopes) sur les antigènes, les lymphocytes T reconnaissent les antigènes lorsqu'ils sont présentés sous forme de peptides antigéniques associés aux molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) professionnelles (les monocytes-macrophages) qui sont capables de délivrer les signaux de co-stimulation nécessaires pour l'activation de la réponse T (Kourilsky *et al.*, 1989) ou/et *via*

l'intermédiaire des cellules dendritiques interdigitées. On distingue deux classes de lymphocytes T en fonction du marqueur de surface CD4 ou CD8 qu'ils expriment : les lymphocytes T^{CD4+} ou les lymphocytes T^{CD8+}.

Selon, le pathogène, sa localisation intracellulaire ou extracellulaire, le site de présentation, la réponse T conduira à l'activation préférentielle des lymphocytes T^{CD4+} ou T-helper qui assureront d'une part la réponse inflammatoire et d'autre part l'immunité à médiation humorale (stimulation de la production d'anticorps par les LB) ou des lymphocytes T^{CD8+} qui assureront l'immunité à médiation cellulaire basée sur la réponse T cytotoxique. Au cours de la réponse inflammatoire, la différenciation et la prolifération des lymphocytes T^{CD4+} naïfs est une étape cruciale qui initie la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes T empruntent différentes voies de différenciation selon le pathogène ou le contexte dans lequel se fait la présentation antigénique. D'un point de vue fonctionnel, cela se traduira par des aptitudes différentes de ces sous-populations T^{CD4+} différenciées à produire des cytokines et ainsi à dialoguer avec les autres types cellulaires acteurs de la réponse immune. Le dogme classique proposait ces dernières années que c'était l'équilibre entre les deux sous-populations T-helper dites Th1 et Th2 qui déterminait la nature de la réponse immune. La lignée Th1 est prépondérante dans les réponses contre les pathogènes intracellulaires (virus, bactéries intracellulaires...) et dans l'immunité à médiation cellulaire. Le profil de sécrétion cytokinique est de type pro-inflammatoire (IL-2, IFN- γ , TNF- α , lymphotoxine ou TNF- β ...). L'IFN- γ est la cytokine Th1 par excellence. En effet, la signalisation induite en aval de son récepteur va permettre d'activer *via* la voie STAT1 le facteur de transcription T-bet requis pour la polarisation Th1 (Afkarian *et al.*, 2002). Les cellules Th1 agissent notamment sur les CPA en augmentant leur capacité de phagocytose, leur production de médiateurs pro-inflammatoires ainsi que leur aptitude à présenter et à activer des lymphocytes T naïfs. L'IL-12 est essentielle au développement, à la prolifération et à l'expression génique des lymphocytes Th1. Elle est typiquement sécrétée par des cellules dendritiques activées *via* leur TLR (*Toll Like Receptor*) exposés à des ligands tels que le LPS bactérien ou des motifs CpG (Reiner, 2007). L'IL-12 peut-être également sécrétée par des cellules dendritiques et des macrophages en réponse à un parasitisme par des procaryotes ou des eucaryotes intracellulaires ainsi que par certains virus (Hsieh *et al.* 1993).

Le rôle de l'IL-12 dans le développement de la réponse Th1 est renforcé par son action répressive sur l'expression du facteur de transcription GATA-3, le régulateur clé du développement Th2 (Ouyang *et al.*, 1998). Ainsi, la réponse Th1 réprime la réponse Th2.

Les lymphocytes Th2 quant à eux sont impliqués dans les réponses contre les pathogènes extracellulaires et dans l'immunité à médiation humorale. Leur profil de sécrétion de cytokines est le suivant : IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. L'IL-4 est la cytokine qui va permettre l'engagement des T naïfs vers un phénotype Th2. La principale source d'IL-4 semble être les lymphocytes T^{CD4+} eux-mêmes, mais elle peut être également produite par les mastocytes, les basophiles et les cellules NKT (*Natural Killer T cell*) (Le Gros *et al.*, 1990; Noben-Trauth *et al.*, 2000). La signalisation induite par l'IL-4 promeut *via* STAT6 la transcription de gènes spécifiques du lignage Th2, dont le facteur de transcription clé dans la polarisation Th2 : GATA-3 (équivalent de T-bet pour les Th1). En combinaison avec l'IL-10, l'IL-4 et l'IL-13, ces cytokines auront un effet inhibiteur sur les réponses pro-inflammatoires.

Ainsi ces deux populations de cellules Th (Th1 et Th2) vont par leur sécrétion de cytokines s'inhiber mutuellement favorisant ainsi leur propre développement (O'Garra, 1998).

Plus récemment, de nouvelles sous-populations de lymphocytes T^{CD4+} ont été caractérisées au cours des réponses immunes et le dogme Th1 *versus* Th2 a été étendu pour inclure ces nouvelles populations de cellules T. Brièvement, deux nouvelles sous-populations de cellules T^{CD4+} sont apparues comme des régulateurs importants de l'engagement de la réponse immune, ce sont les cellules Th17 (du nom de la cytokine prépondérante que ce dernier sous-lignage T produit, l'IL-17 ; Harrington *et al.*, 2005) et les cellules T-régulatrices ou Treg. Le sous lignage Th17 est caractérisé par sa production d'IL-17 et par sa participation active dans l'immunité antimicrobienne gastrointestinale. Les Th17 sont aussi impliqués dans des pathologies autoimmunes ou inflammatoires chroniques. Les facteurs nécessaires à la différenciation et à la prolifération de cette sous-population à partir de cellules T^{CD4+} naïves impliquerait la production par les cellules dendritiques de TGF- β et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-23 (Volpe *et al.*, 2008).

Le facteur de transcription clé de l'engagement vers la voie Th17 est le facteur de transcription RORc (aussi appelé ROR γ t). Les lymphocytes T-régulateurs ou Tregs sont quant à eux impliqués dans la régulation de la réponse immune et l'induction des mécanismes de tolérance périphérique (Cottrez & Groux., 2004). L'identification des cellules Treg repose sur l'expression d'antigènes de surface (CD4⁺CD25⁺), sur leur production d'IL-10 et/ou de TGF β , et sur l'expression du facteur de transcription FOXP3. Les cellules Tregs expriment, quand elles sont activées, le marqueur de surface CD25 et le facteur de transcription FOXP3, facteur induit par TGF β (figure B22). FOXP3 appartient à la famille des facteurs de transcription possédant un domaine « *winged helix-forkhead* » ou (*Forkhead box = Fox*) de liaison à l'ADN. Sa surexpression dans les cellules T-naïves va les convertir en un phénotype Treg et l'expression continue de cette protéine serait critique pour maintenir l'activité suppressive des Treg (Fontenot & Rudensky, 2005 ; Zheng & Rudensky, 2007).

Les lymphocytes Treg sont activés soit classiquement par les cellules dendritiques (CD) lors d'une présentation antigénique (Deslee *et al.*, 2004) et les mécanismes qui aboutissent à leur activation sont alors directement liés au contexte de la présentation (production de cytokines par les CD, engagement de certains co-récepteurs), soit directement lors de l'interaction avec des récepteurs exprimés par les cellules endothéliales ou par d'autres lymphocytes T (Khayyamian *et al.*, 2002). Activés, les Treg peuvent alors à leur tour exercer un effet sur les CD et modifier les conditions de la présentation antigénique aux lymphocytes T. Par exemple, le CTLA-4, exprimé à la surface des Treg, peut interagir avec les molécules membranaires CD80 et CD86 à la surface des CD permettant la transmission d'un signal de co-stimulation aux Treg, nécessaire à la mise en place de leur activité suppressive (Miyara & Sakaguchi 2007). Les Treg^{CTLA-4+} induiront l'expression d'IDO par les CD et ces dernières supprimeront l'activation des cellules T en réduisant la disponibilité en tryptophane (Fallarino *et al.* 2003, Grohmann *et al.* 2003; Mellor & Munn, 2004).

Th17 et Treg s'inscrivent donc dans un nouvel équilibre au sein de ces sous-populations de cellules T, puisque *via* la production des cytokines immunosuppressives TGF- β et IL-10, les Treg limitent la prolifération des cellules Th17 et freinent donc, de

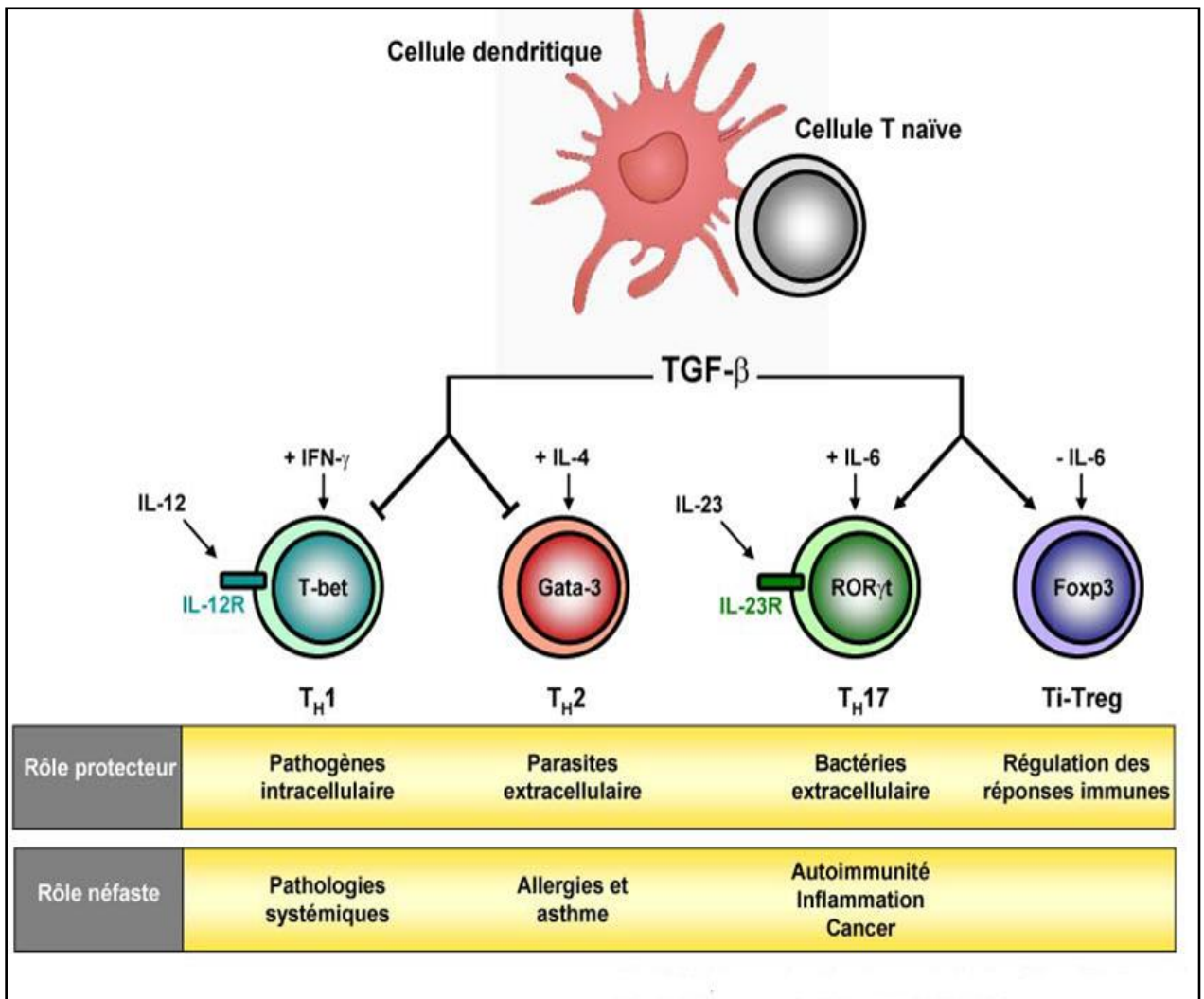


Figure B21 : La différenciation des lymphocytes

(d'après Reiner,SL, 2007).

fait, la réponse inflammatoire de type Th1/Th2 qui est stimulée par les Th17. A l'inverse, les Th17 freine la prolifération des Treg *via* l'IL-17.

○ ***IDO un acteur de ce nouvel équilibre Treg/Th17/Th1/Th2***

IDO est rapidement apparue comme un régulateur important de ce nouveau paradigme de la différenciation des sous populations T^{CD4+}. En effet, IDO et ses produits d'activités selon la voie des kynurénines, sont à l'origine de plusieurs effets immunomodulateurs qui convergent vers l'immuno-suppression et la tolérance immune.

Comme on l'a vu plus haut, l'activité d'IDO réduit en intra-cellulaire comme en extra-cellulaire la disponibilité en tryptophane bloquant ainsi la synthèse protéique et la prolifération cellulaire. Munn et *al.*, (1999), ont montré que les cellules T naïves humaines et murines sont particulièrement sensibles à cette déplétion locale en Trp et que leur prolifération, qui fait suite à leur activation, est limitée par arrêt du cycle cellulaire au stade G0 de la phase S de transition. L'arrêt du cycle à ce stade induit l'anergie, la déviation immune et l'ignorance des cellules T, favorise la génération des Tregs et provoque l'apoptose des cellules T (Mellor & Munn., 2003). En 2005, Munn et *al.* ont identifié que la kinase GCN2, une kinase de réponse au stress, est activée par l'augmentation de la concentration intracellulaire en ARNt non chargés en réponse à un apport insuffisant en acides aminés essentiels. L'activation de la voie GCN2 dans les cellules T initie une réponse de stress qui induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (figure B21). Ainsi IDO, qui dans la première phase de la réponse immune naturelle, limite la prolifération des pathogènes peut également, dans le cadre de la réponse immune adaptative freiner l'engagement de la réponse T (figure B22). Cette modulation à la baisse de la réponse T par l'activité IDO est vue comme un garde fou qui protège les sites inflammatoires de l'agressivité de la réponse T.

Il existe d'autres situations physiologiques ou physiopathologiques dans lesquelles l'activité d'IDO va jouer un rôle important. Ce rôle peut-être positif dans le cadre de la tolérance fœto-maternelle, lors de la modulation des réponses anti-infectieuses ou durant la transplantation allogénique mais il peut être également néfaste comme c'est le cas dans le cadre de l'immunosurveillance anti-tumorale.

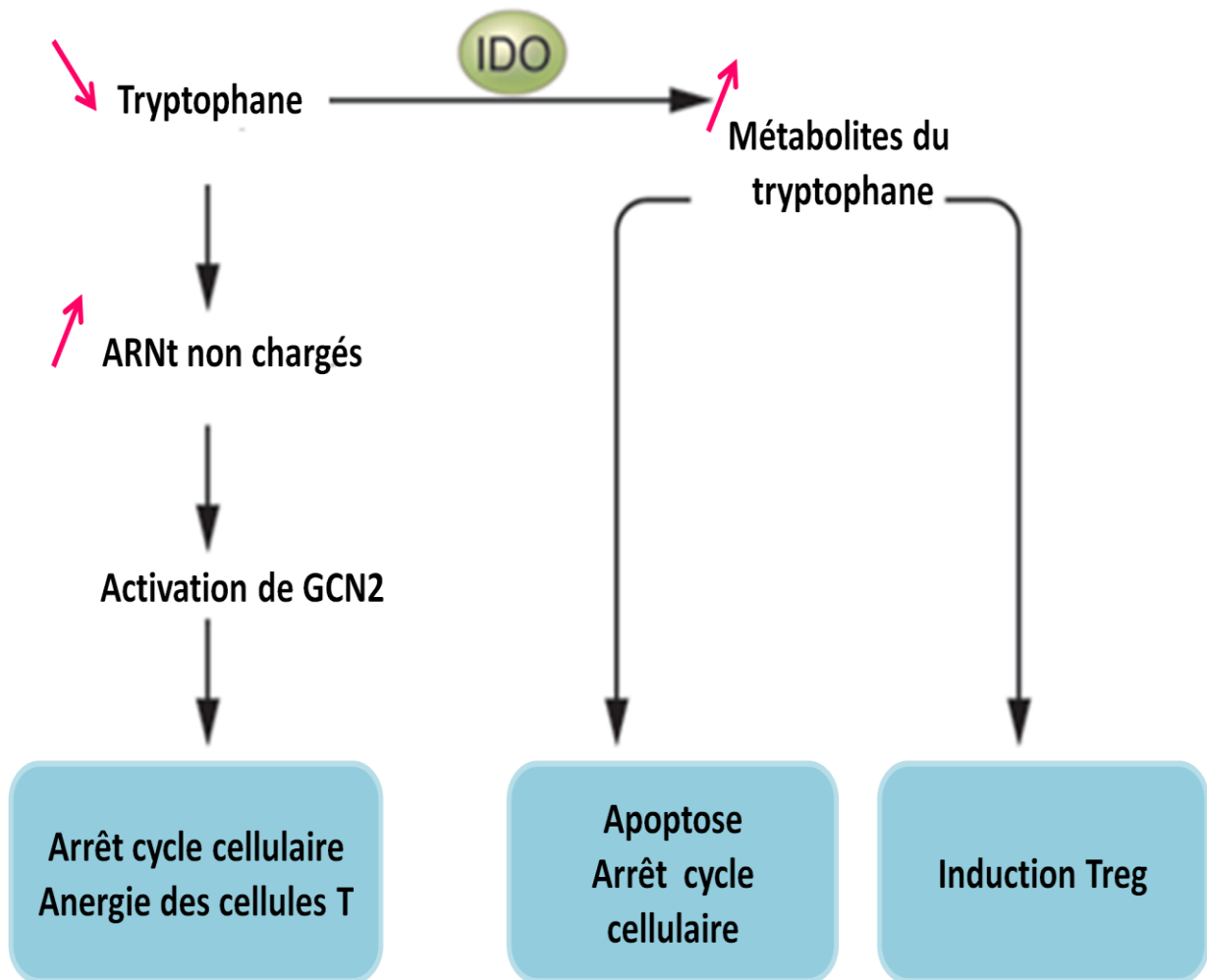


Figure B22 : Effets immunosuppresseurs d'IDO.

○ **Rôle immunosuppresseur d'IDO lors des greffes**

Le rejet des greffes fait intervenir de nombreux agents, effecteurs cellulaires et humoraux, ainsi que d'importants mécanismes régulateurs qui modulent le cours de la réaction de rejet en l'amplifiant ou, au contraire, en la déprimant. Pour cela, des efforts considérables ont été déployés pour prévenir les phénomènes immunologiques de rejet, afin de prolonger la survie des greffes de tissus et d'organes. L'immunosuppression, pratiquée de manière courante en clinique de transplantation, fait appel à des stratégies de plus en plus développées dont le but est de déprimer de manière globale l'immunité du receveur, afin d'éviter toute réaction avec le greffon. Les allogreffes de foie sont, contrairement à la plupart des organes, naturellement tolérées par l'organisme receveur et ceci sans l'administration d'immunosuppresseurs. Chez le rat, il a été montré que les hépatocytes seraient responsables de cette immunotolérance en favorisant une réponse de type Th2 (Yoo-Ott *et al.*, 2000). L'administration de 1-méthyltryptophane à des souris ayant subi une allogreffe de foie provoque le rejet du greffon, ainsi qu'une nécrose massive des hépatocytes (Miki *et al.*, 2001). Il a été aussi montré que lors d'une greffe d'îlots pancréatiques, seuls les îlots génétiquement modifiés pour exprimer IDO ne sont pas rejetés. Cette protection serait attribuée à une forte déplétion en Trp au niveau du site de transplantation, inhibant de ce fait la prolifération des cellules T (Alexander *et al.*, 2002). En parallèle, et dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, il a été montré qu'une population de lymphocytes T régulateurs allospécifiques est capable d'assurer un état de tolérance à long terme vis-à-vis du transplant. Cette population cellulaire va *via* la production d'IFN- γ induire l'expression d'IDO dans les cellules endothéliales du cœur greffé, permettant d'installer localement un environnement tolérogène favorisant ainsi l'acceptation de l'allogreffe (Guillonnet *et al.*, 2007). Depuis ces constats, l'activité IDO est considérée comme indispensable dans le mécanisme de suppression des rejets de greffe (pour revue voir : Morelli & Thomson, 2007).

○ **Rôle immunosuppresseur d'IDO lors de la gestation**

La grossesse pourrait sur un plan immunologique se décrire comme une greffe semi-allogénique naturelle. En effet, durant la phase de gestation du fœtus, le système

immunitaire maternel doit s'adapter et relever un « challenge » important pour pouvoir tolérer la présence de non-soi dans l'organisme, ce non-soi correspondant aux alloantigènes paternels (Tafuriet *et al.*, 1995). Pour expliquer le mécanisme de survie du fœtus face aux agressions du système immunitaire maternel, trois hypothèses principales ont été mises en avant :

- tout d'abord l'existence d'une barrière anatomique sélective entre la mère et le fœtus : la barrière transplacentaire,
- une immaturité antigénique fœtale,
- ou encore, une tolérance immunologique de la mère (Medawar, 1953).

La dernière hypothèse semble être la plus plausible. En effet, chez la souris, on a noté une importante altération de la réponse des cellules T maternelles (Zhou & Mellor, 1998) pendant l'implantation et au cours de la gestation. Cette altération serait le résultat de l'activation de l'IDO et plus particulièrement des macrophages exprimant l'IDO, qui vont inhiber la prolifération des cellules T en réduisant rapidement les taux de Trp environnants (Munn & Armstrong, 1993; Munn *et al.*, 1999). Ainsi, il a été observé que lors de la gestation, les concentrations périphériques en Trp sont fortement réduites (Schröcksnadel *et al.*, 1996) et que l'expression de l'IDO est augmentée dans le placenta et à l'interface materno-fœtale (Kamimura *et al.*, 1991). Cette expression d'IDO serait indispensable au bon déroulement de la grossesse puisque l'administration d'un antagoniste de l'IDO, le 1-méthyltryptophane (1-MT), à des souris gestantes provoque l'avortement suite à un rejet immunologique du fœtus (Munn *et al.*, 1998).

En accord avec cette participation d'IDO à l'immunosuppression locale, durant la période physiologique de la grossesse, il y a de manière alloantigène-indépendante une expansion systémique du pool périphérique de Treg maternels circulants. Leur fonction, en plus de supprimer les réponses autoimmunes, consiste à inhiber les réponses allogéniques dirigées contre le fœtus. Cette fonction protectrice des Treg durant la grossesse serait due à l'induction d'IDO par les Treg au niveau des cellules trophoblastiques et des CPA (Aluvihare *et al.*, 2004). Ainsi, IDO serait impliquée dans la suppression locale de l'activité des cellules T maternelles en catabolisant le Trp essentiel à la prolifération des cellules immunitaires. Ce mécanisme vise à protéger le fœtus des

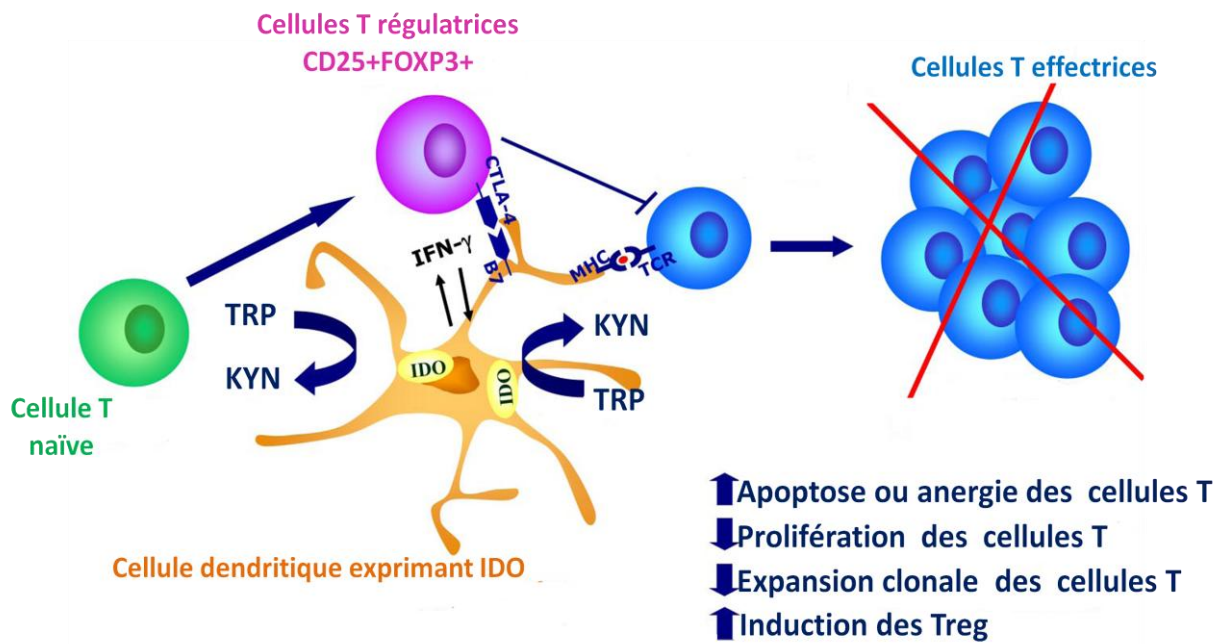


Figure B23: Induction d'IDO dans les cellules dendritiques

(d'après Curti et al., 2009).

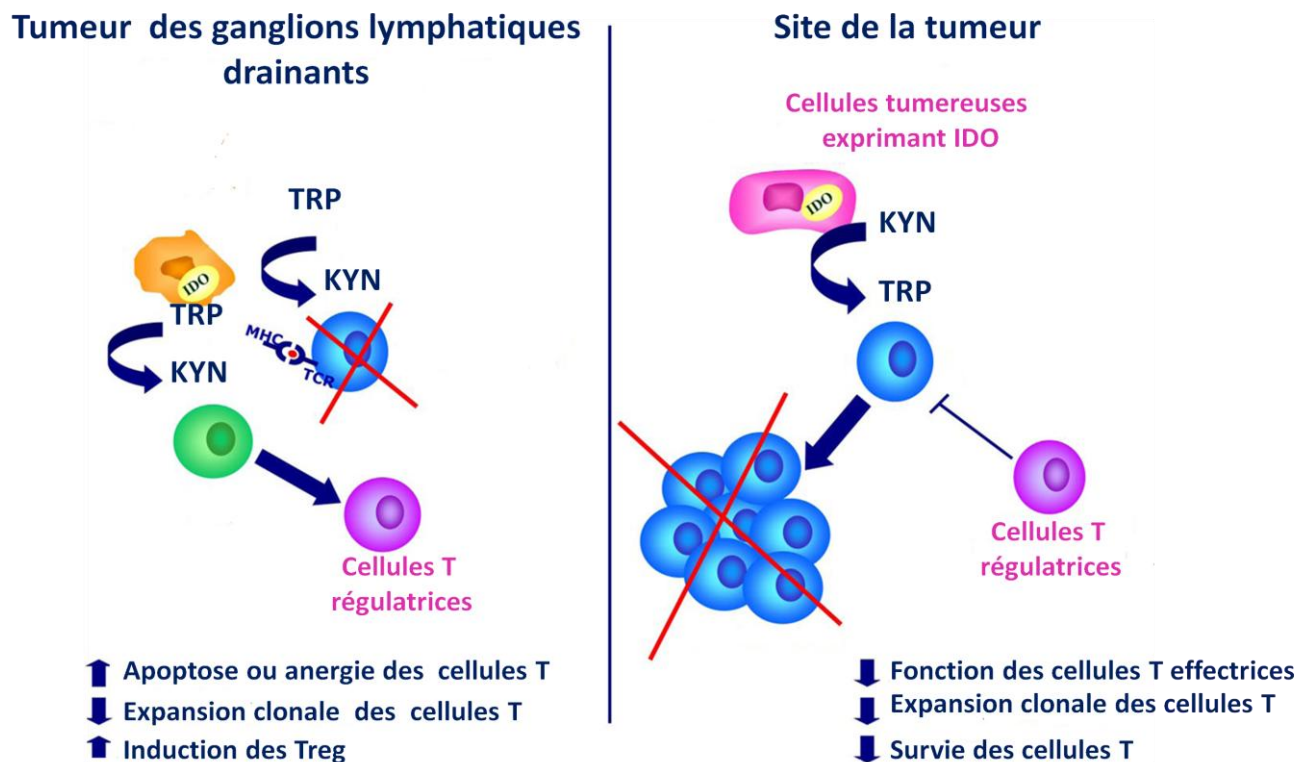


Figure B24: IDO et immunosuppression dans le cancer

(d'après Curti et al., 2009).

cytokines responsables de son rejet au cours des premiers temps de gestation (pour revue voir : Saito *et al.*, 2007).

○ **Rôle immunosuppresseur d'IDO pendant le développement des tumeurs**

A l'instar de toute réaction immunitaire, la réponse antitumorale est associée à la présence d'anticorps et à l'activation de cellules T auxiliaires et cytotoxiques spécifiques des antigènes tumoraux. En effet, les cellules tumorales expriment des antigènes à leur surface qui peuvent susciter des réponses humorales et cellulaires susceptibles d'aboutir à l'éradication ou « rejet » de la tumeur. Il est désormais assez bien établi, qu'en matière d'immunité antitumorale, c'est essentiellement la réponse cellulaire T cytotoxique spécifique des antigènes tumoraux et non pas la réponse humorale, qui joue un rôle protecteur. Cependant, dans de nombreux cas, la réponse immunitaire antitumorale ne s'exprime pas comme elle le devrait, car les cellules tumorales développent des mécanismes qui leur permettent d'échapper à la réponse immunitaire notamment en générant un micro-environnement suppresseur grâce à la production de cytokines aux propriétés immunosuppressives comme l'IL-10 (Salazar-Onfray, 1999; Curiel, 2007) et le TGF β (Li *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Toutefois, il semblerait que l'obstacle majeur à l'immunosurveillance antitumorale et à la mise en place de stratégies d'immunothérapies anti-tumorale efficaces soit du à l'immunosuppression réalisée par les Tregs (Zou, 2006). En effet, les Tregs induits *via* l'activité d'IDO des cellules tumorales, infiltrent massivement les tumeurs solides et leur nombre est considérablement augmenté au niveau des ganglions lymphatiques drainant ces sites tumoraux.

Dans un premier temps, il avait été suggéré que l'IDO pourrait inhiber la prolifération tumorale du fait de son activité anti-proliférative. La forte activité enzymatique IDO mesurée au sein de poumons humains présentant des tumeurs malignes (Yasui *et al.*, 1986), a permis de supposer que la déplétion en Trp induite par l'IDO activée, pourrait être un des mécanismes de l'activité antitumorale de l'organisme (Takikawa *et al.*, 1988; Ozaki *et al.*, 1988; de la Maza & Peterson, 1988; Feng & Taylor, 1989).

Contrairement aux cellules hôtes, des cellules tumorales transplantées expriment fortement l'IDO (Yoshida *et al.*, 1988). Ainsi, il a été proposé que l'IFN- γ libéré par les

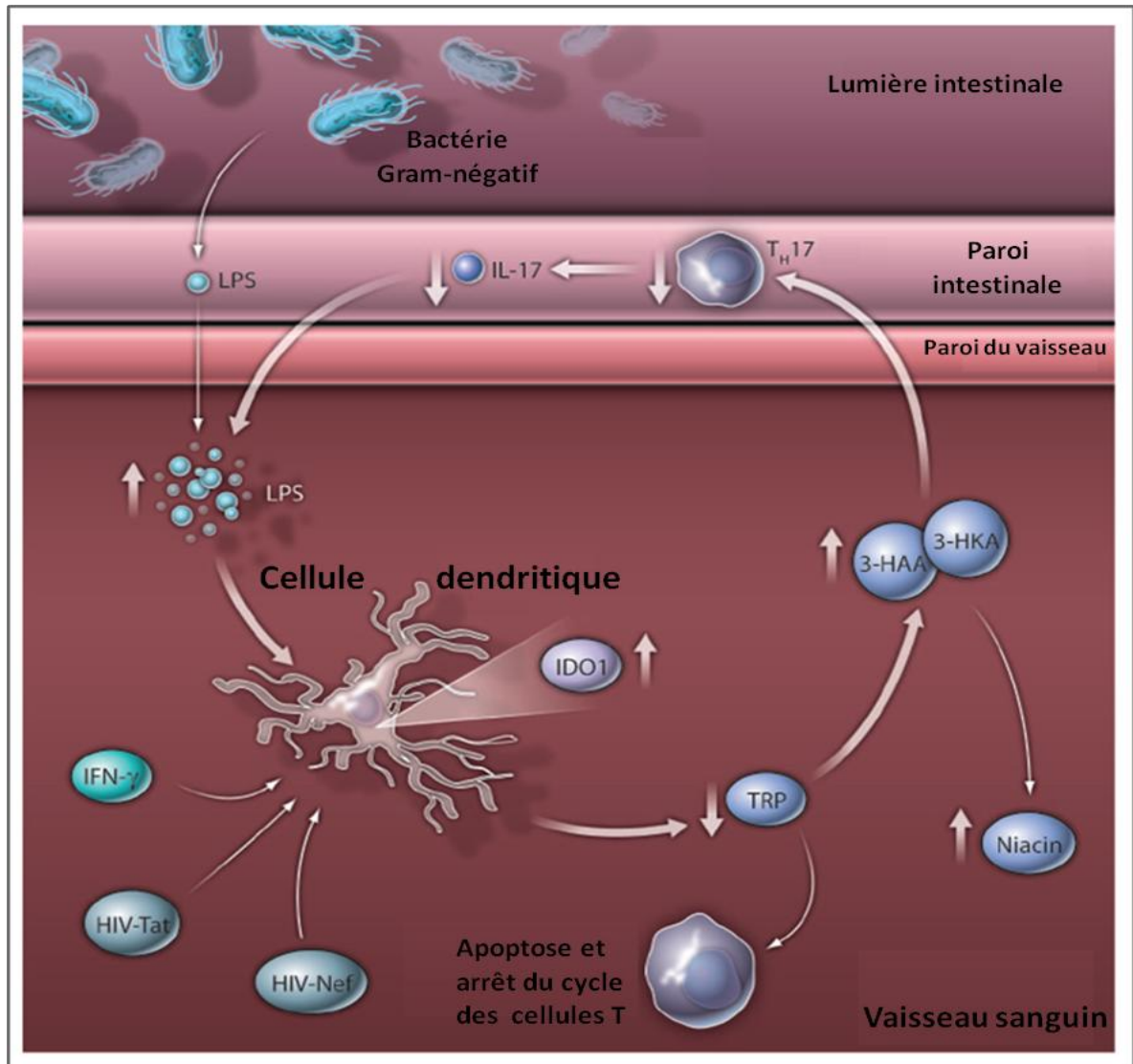


Figure B25 : Cycle d'activation de l'oxydation du tryptophane dans l'infection par le VIH (d'après Murray, 2010).

La première étape du cycle d'activation est initiée dans les cellules dendritiques et d'autres tissus via l'activité up régulée d'IDO, qui est induite par l'IFN γ et les antigènes du VIH (HIV-Tat, HIV-Nef). Cette surexpression provoque une réduction du tryptophane disponible et une augmentation des concentrations de 3-HAA et 3-HK qui serait responsable de la diminution des concentrations des cellules Th17 dans la paroi intestinale. La diminution des concentrations locales de l'IL-17 et des cellules Th17 dans la lumière intestinale réduit la capacité du corps à prévenir la translocation du LPS depuis la bactérie Gram-négatif et son entrée dans la circulation sanguine. Les très fortes concentrations anormales du LPS vont ainsi contribuer à promouvoir l'oxydation du tryptophane via IDO. Parmi les autres effets de la réduction du tryptophane, la dérégulation des lymphocytes T et l'augmentation des concentrations de la niacine.

monocytes infiltrant la tumeur serait responsable de l'activation de l'IDO par les cellules tumorales induisant le rejet de la tumeur du fait d'une déplétion en Trp au voisinage de cette dernière (Takikawa *et al.*, 1990). Cependant, cette hypothèse étant controversée, une hypothèse alternative a été proposée selon laquelle, les cellules tumorales attireraient des cellules présentatrices d'antigène exprimant l'IDO, tels que les macrophages ou les cellules dendritiques (figure B23), afin de se protéger de la réponse immunitaire médiée par les cellules T (pour revue voir : Munn & Mellor, 2007). De la sorte, l'IDO contribuerait à l'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire en bloquant localement la prolifération des cellules T (Friberg *et al.*, 2002; Uyttenhove *et al.*, 2003, Sedlmayr, 2007 ; Zamanakou *et al.*, 2007, figure B24) et jouerait ainsi un rôle dans l'évasion immune des tumeurs (Muller & Prendergast, 2007; Katz *et al.*, 2008, Mellor *et al.*, 2008). Ainsi, et afin d'amplifier la réponse immunitaire anti-tumorale des patients atteints de cancer, l'administration d'inhibiteurs de l'IDO pourrait être envisagée comme nouvelle stratégie immunothérapeutique.

○ **Rôle immunosuppresseur durant l'infection**

IDO était initialement connue pour son activité antimicrobienne. En effet, le rôle joué par cette enzyme était centré sur les effets antiprolifératifs induit par la déplétion du tryptophane chez l'hôte (Yoshida *et al.*, 1981). Ainsi, lors d'une infection et dans un contexte cytokinique inflammatoire, l'activité de l'IDO est augmentée, de manière à créer une déplétion locale en Trp, entraînant une inhibition de la croissance du pathogène.

A titre d'exemple, cette réponse se produit dans les infections chroniques virales comme l'hépatite C durant laquelle des niveaux élevés d'IDO dans le foie ont été observés (Larrea *et al.*, 2007).

Par exemple, de faibles concentrations en Trp ont été associées à une production élevée de kynurénines, en particulier QUIN et HK dans les infections par le virus de la poliomyélite (Heyes *et al.*, 1992), le VIH (Heyes *et al.*, 1989, figure B25), la malaria cérébrale (Sanni *et al.*, 1998), ainsi que dans d'autres infections du système nerveux central (Heyes *et al.*, 1996). Cependant, comme dans le cas des cellules tumorales, les microbes expriment aussi IDO et exploitent l'environnement conditionné par IDO pour

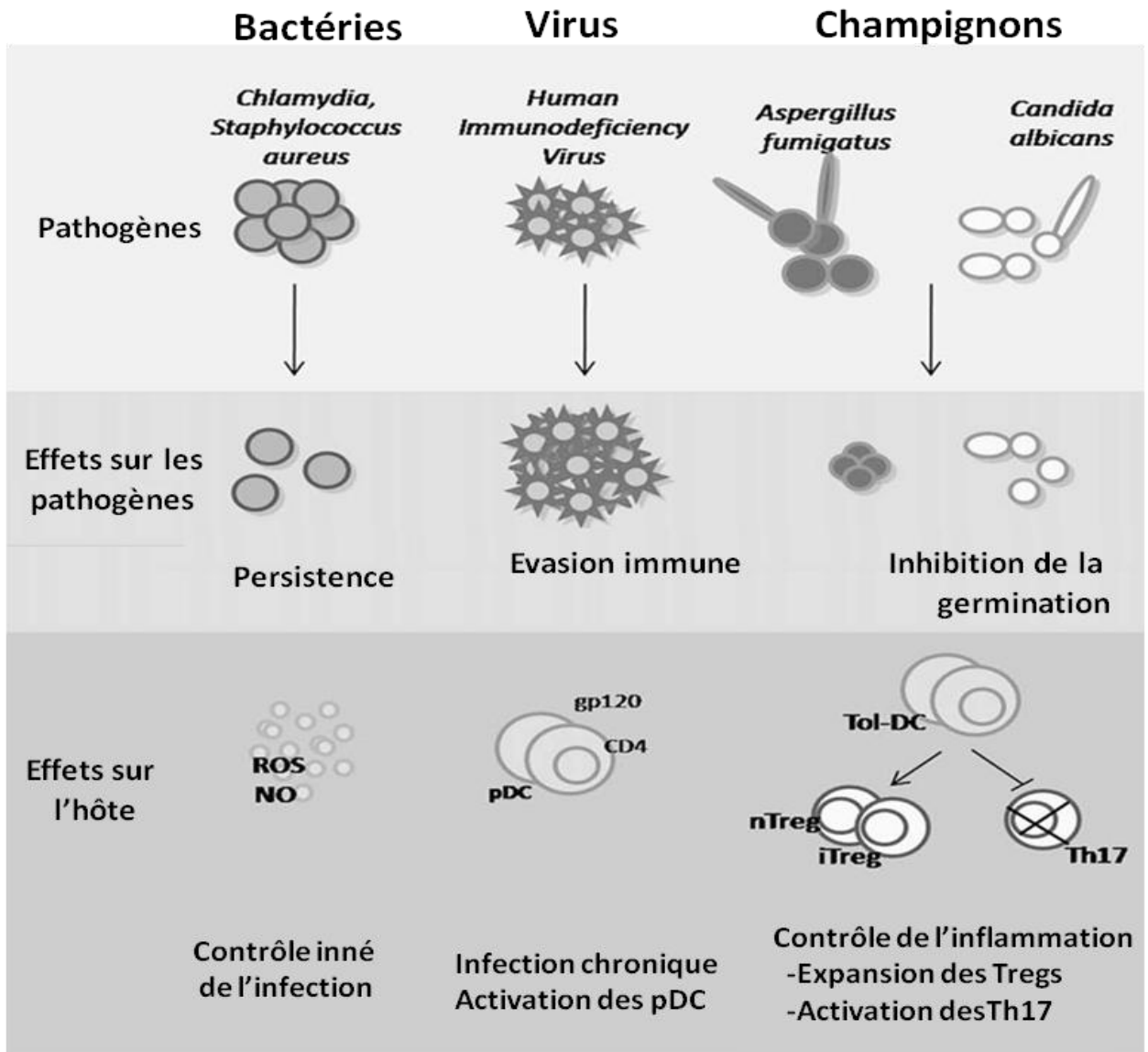


Figure B26 : Multiples effets de l'activité d'IDO dans les infections

(d'après Zelante *et al.*,2009).

s'évader de leurs propres mécanismes de défense (Popov *et al.*, 2008). Ainsi, lors des infections, l'hyperactivation de l'IDO dans les populations des cellules dendritiques va favoriser la prolifération des cellules Tregs (Pucetti *et al.*, 2007). Cette accumulation des cellules Tregs et l'augmentation de l'IDO au niveau des sites de la réplication virale massive, comme l'intestin et la rate, peuvent jouer un grand rôle dans le maintien d'un environnement favorable par exemple pour la résistance du VIH. La même réponse se produit aussi lors des infections fongiques, l'IDO renforçant l'infection et les pathologies inflammatoires associées, en diminuant toute résistance à l'infection. Ainsi, le rôle de l'IDO dans l'immunorégulation lors des infections est complexe (voir figure B26): elle agirait comme un exécutif de la phase effectrice des Tregs inflammatoires et comme un inducteur de Tregs tolérogéniques (pour revue voir : Zelante *et al.*, 2009).

Transition vers
les travaux de
thèse

Dès les années 80, il a été montré qu'IDO est fortement exprimée dans les extraits protéiques de l'épididyme des mammifères (Yoshida *et al.*, 1980). Contrairement aux autres tissus qui expriment IDO à un niveau basal (intestin, poumon... par exemple) et où l'expression de l'IDO est induite par la cytokine inflammatoire INF- γ , l'expression d'IDO dans l'épididyme est constitutive et indépendante de la stimulation par l'INF- γ . En effet, des souris transgéniques déficientes pour l'INF- γ expriment IDO au niveau de l'épididyme de la même manière que les animaux sauvages (Takikawa *et al.*, 1999). Cette expression constitutive et forte d'IDO dans l'épididyme est par ailleurs régionalisée. Au niveau de l'épididyme murin, l'expression d'IDO1 est restreinte à la région de la tête (caput epididymis) à l'exception du segment initial (S1). Au niveau cellulaire, IDO est exprimée par deux types de cellules de l'épithélium épидидymaire (cellules apicales et principales) mais n'est pas détectée dans le compartiment luminal de la tête de l'épididyme ni dans les spermatozoïdes (Britan *et al.*, 2006 ; Tone *et al.*, 2007).

Jusqu'à ce jour, l'expression particulière d'IDO dans l'épididyme des mammifères n'a pas été explorée plus avant. Quelques hypothèses ont été émises pour expliquer cette expression et les rôles potentiellement joués par cet enzyme dans le territoire épидидymaire en se basant soit sur les caractéristiques du fonctionnement de l'enzyme, soit sur les rôles conférés à IDO dans d'autres tissus et d'autres situations.

Ainsi sur la base qu'IDO est une hème-oxygénase qui consomme de l'anion superoxyde lors de son activité, il a été proposé qu'IDO pouvait-être un élément de l'arsenal des enzymes antioxydantes de ce territoire par ailleurs impliqué dans une régulation très fine des espèces oxygénées réactives en raison des effets délétères que ces dernières peuvent exercer sur les fragiles gamètes mâles en transit (voir pour revue : Noblanc *et al.*, 2011). IDO en tant qu'acteur antioxydant *per se* n'est pas très convaincante car en présence de fer et d'oxygène l'activité d'IDO génère autant d'anion superoxyde qu'elle n'en consomme. Cependant, IDO *via* ses produits d'activités (ie. les kynurénines) peut influencer la balance antioxydante du tissu épидидymaire car certaines kynurénines sont douées de propriétés anti-oxydantes alors que d'autres sont plutôt pro-oxydantes (Vernet *et al.*, 2004 ; Britan *et al.*, 2006). Il a été aussi proposé que c'est la biodisponibilité en tryptophane, le substrat d'IDO, qui pouvait expliquer l'intense activité IDO enregistrée dans l'épididyme des mammifères. Cette hypothèse a trouvé son origine suite à la

publication que la concentration en Trp dans les extraits de têtes d'épididyme de rat était anormalement élevée comparativement à tout autre tissu ou fluide biologique (Hinton, 1990). Cependant, plus récemment il a été montré que l'activité IDO n'était pas dépendante de la disponibilité en Trp.

Il a de même été proposé que c'est à cause de la concentration locale élevée de l'épididyme en sérotonine qu'IDO pouvait être fortement et constitutivement exprimé dans ce territoire. En effet, contrairement à TDO (l'enzyme sœur d'IDO préférentiellement hépatique) qui ne prend en charge que le Trp, IDO peut métaboliser d'autres dérivés indoles tel que, la sérotonine. IDO dans l'épididyme serait alors un acteur de la régulation sérotoninergique, dont on sait qu'elle est impliquée dans les mouvements ioniques et aqueux au niveau de l'épithélium épiddidymaire, du fluide épiddidymaire et des membranes du spermatozoïde, participant ainsi aux phénomènes de régulation de la taille et du volume des gamètes (Singh *et al.*, 1987 ; Britan *et al.*, 2006).

Enfin, et plus convaincant à nos yeux, il a été proposé que l'expression d'IDO forte et constitutive dans le territoire épiddidymaire était à relier aux rôles immunomodulateurs associés à l'activité d'IDO (voir introduction bibliographique). Ainsi IDO dans l'épididyme pourrait être un acteur de la régulation du statut immun de ce tissu en relation avec la nécessité de maintenir une situation d'immunotolérance (déjà établie au niveau du testicule) vis à vis des spermatozoïdes tout en protégeant ces derniers et l'environnement épiddidymaire des situations infectieuses et inflammatoires.

Dans le but d'explorer plus précisément les fonctions d'IDO dans le territoire épiddidymaire nous avons entrepris de caractériser l'impact de l'ablation d'IDO dans la souche de souris mutante (*Ido1*^{-/-}; Baban *et al.*, 2004) développée par le groupe de Andrew L. Mellor et de David H. Munn (Immunotherapy Center and Department of Pediatrics and Medicine, Medical College of Georgia, Augusta, Georgia, USA).

Les souris *Ido1*^{-/-} ont été exportées au laboratoire et acclimatées dans notre animalerie depuis 2008. Le travail de recherche qui m'a été confié a consisté en la caractérisation des phénotypes épiddidymaires et spermatiques générés par la perte de l'expression d'IDO1 ainsi que l'éventuel impact sur la fertilité des animaux mâles.

Matériels et
méthodes

I. Modèle animal

Des souris sauvages BALB/c et homozygotes pour la délétion du gène produisant l'indoleamine 2,3 dioxygénase (*Ido1^{-/-}*) ont été utilisées tout au long de cette étude. Les souris ont été logées dans des conditions environnementales contrôlées (température 22°C, avec une alternance jour/nuit de 12 heures). Elles ont été nourries avec un régime basique (Global diet, 2016, Harlan, Gannat, France) distribué à volonté, avec un accès libre à l'eau.

II. Mesures de constantes physiologiques –traitements

1. Mesures de constantes physiologiques

Tous les animaux utilisés dans nos expériences sont pesés et mesurés. Leur index de masse corporelle (IMC) est déterminé selon la formule masse/taille².

2 .Test de fertilité

Pour ces tests, des souris femelles BALB/c de 3 mois, dont la fertilité a été contrôlée, sont synchronisées. Pour cela, deux femelles/mâle sont placées pendant 48h dans une cage qui a, au préalable, accueillie pendant 72h le mâle utilisé pour la reproduction. Puis passé ce délai, le mâle est mis avec les femelles pour une période de 7 jours. Les femelles sont ensuite placées dans des cages individuelles pour les 14 jours de gestation restants. Le nombre de petits par portée est comptabilisé. Pour cette analyse 5 mâles de chaque génotype ont été utilisés et testé à l'âge de 6 mois et 12 mois.

3. Blocage de la spermatogénèse

Afin d'étudier l'ontogénèse d'IDO1 et sa relation avec l'arrivée des spermatozoïdes dans l'épididyme, un blocage de la spermatogénèse par un traitement au Busulfan (1,4-butanediol dimethanesulfonate) (Sigma-Aldrich) a été réalisé. Une solution de Busulfan (à 35 mg/kg) est préparée dans du diméthyl sulfoxyde (50%). Il est

Avertine

Solution mère 50X	10 grs 2 ,2,2 Tribromoéthanol dans 50 ml Alcool Amylique
Solution mère 1X	1ml solution mère 49ml PBS 1X ou sérum physiologique

Figure M1 : Composition des solutions d'Avertine utilisées pour l'anesthésie des animaux.

inoculé par injection intra-péritonéale aux animaux en deux injections effectuées à 15 et 22 jours post natal. Les animaux sont ensuite sacrifiés 30 jours après la naissance et leurs épididymes prélevés.

4. Prélèvements des organes, préparation de plasma, collecte des spermatozoïdes

a. Organes

Après inhalation de CO₂, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les tissus prélevés (épididymes, testicules, les tissus adipeux péri-épididymaire et inguinal) sont pesés utilisés immédiatement ou conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

b. Plasma

Pour certaines études nécessitant du plasma, un prélèvement de sang en intracardiaque est réalisé sur des animaux préalablement anesthésiés à l'Avertine (figure M1) (0.015 ml / g d'animal). Le sang est collecté dans des tubes héparinés puis centrifugé à 500 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le plasma (couche supérieure) est placé dans un tube neuf et congelé à -80°C jusqu'à son utilisation.

c. Spermatozoïdes

Les deux queues d'épididyme prélevées sont placées dans du milieu M2 (Sigma) pour permettre la survie des spermatozoïdes. Elles sont ensuite dilacérées à l'aide d'une aiguille dans une cupule en verre en présence de M2. Après une incubation de 10 minutes à 37°C les spermatozoïdes, alors dispersés dans le milieu, sont récupérés et comptés.

Pas	Station	Réactif	N° Réactif	Agitation	Temps (min)
1	1	Histoclear	40	1	15
2	2	Histoclear	40	1	15
3	3	ETOH 100°	33	1	1
4	4	ETOH 95°	34	1	1
5	5	ETOH 70°	35	1	1
6	9	H2O courante	15	1	1
7	7	Hématoxyline	37	1	3
8	9	H2O courante	15	1	5
9	10	Fuschine	41	1	5
10	8	H2O acétique	44	2	1
11	11	Orange G	42	1	00 :20
12	12	H2O acétique	44	2	1
13	13	Vert lumière	43	1	10
14	14	H2O acétique	44	2	1
15	5	ETOH 70°	35	1	00 :30
16	4	ETOH 95°	34	1	00 :30
17	15	ETOH 100°	33	1	5
18	16	Butanol	45	1	5
19	17	Histoclear	40	1	5

Tableau M1 : Programme pour coloration Trichrome de Masson Goldner sur le robot colorateur.

Fushine acide ponceau	Fushine acide 0,033% Ponceau 0,066% (m/v) Acide acétique 0,2%(v/v)
Orange G-molybdique	Orange G-molybdique 0,1%(m/v) Acide phosphomolybdique 1%(m/v)
Vert lumière acétique	Vert lumière 0,1% (m/v) Acide acétique 2%(v/v)

Figure M2 : Composition des différentes solutions utilisées pour la coloration Trichrome de Masson Goldner.

II. Analyses tissulaires

1. Préparation des tissus

a. Fixation

Les tissus prélevés (tissus adipeux péri-épididymaire et/ou les deux épididymes) sont plongés immédiatement dans 4% de paraformaldéhyde (PFA, Sigma Aldrich) et laissés pour fixation durant la nuit qui a suivi le prélèvement. Cette étape est nécessaire pour préserver l'intégrité chimique. Les queues sont congelées en vue d'une utilisation ultérieure ou utilisées pour récupérer les spermatozoïdes et le fluide qu'elles contiennent.

b. Déshydratation et inclusion

Le lendemain, les tissus sont rincés dans trois bains différents de PBS afin d'éliminer l'excès de PFA, puis transférés dans de l'éthanol 70° afin de commencer la déshydratation. Les opérations suivantes sont effectuées par un automate d'histologie, le STP 120 (MICROM) : déshydratation (un bain d'éthanol 95°, puis deux bains éthanol 100°), suivie de deux bains d'Histoclear, imprégnation (deux bains de paraffine). Les têtes d'épididymes sont ensuite incluses dans une cassette de paraffine avec une orientation qui permettra une observation désirée après la coupe.

c. Coupes histologiques

Les cassettes sont déposées, au préalable, sur de la glace afin de durcir le bloc de paraffine, ce qui facilite et améliore la coupe. Des coupes d'une épaisseur de 5 à 7 μm sont réalisées au microtome (HM 340 E, MICROM), puis celles-ci sont déposées sur des lames traitées (Superfrost Plus, Menzel Gmbh, Saarbrückener, Germany) sur lesquelles, a été préalablement étalée une goutte d'eau distillée. Les lames ont ensuite été placées quelques minutes sur une plaque chauffante (50°C) afin de permettre un meilleur étalement de la coupe. Le surplus d'eau est éliminé et les lames sont mises à sécher toute la nuit puis stockées jusqu'à leur utilisation.

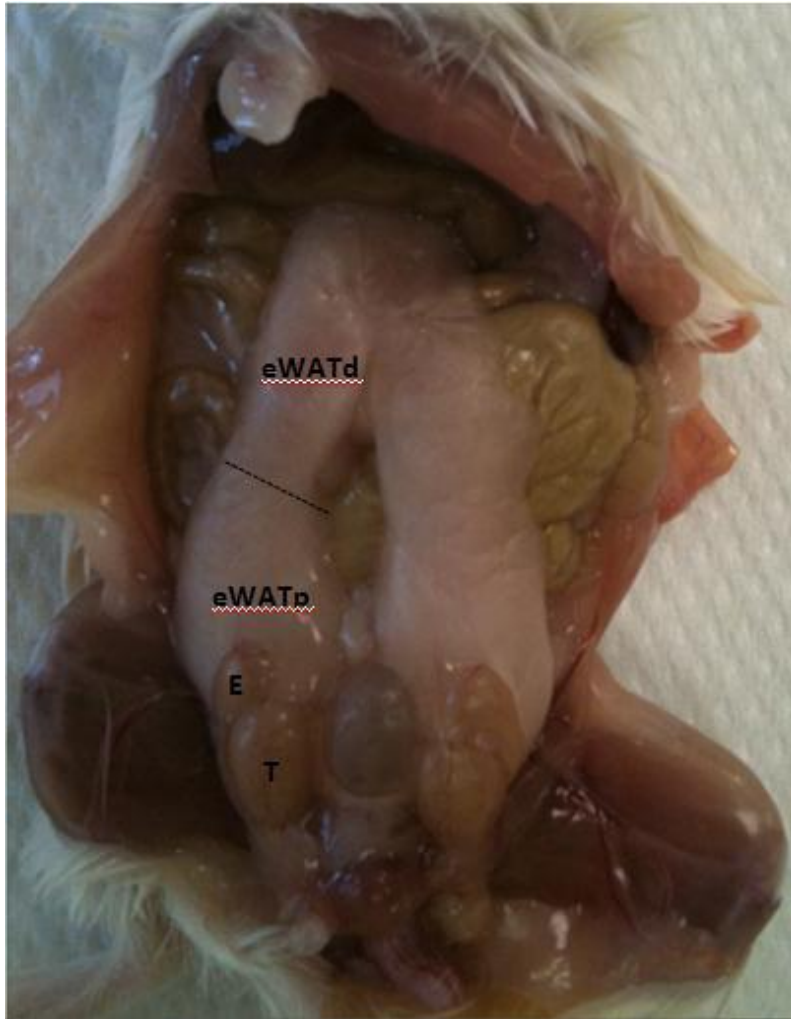


Figure M3 : Photographie de la cavité abdominale d'une souris BALBc.
(T) testicule, (E) Tête épидидyme, (eWATp) tissu adipeux péri-épididymaire proximal,
(eWATd) tissu adipeux péri-épididymaire distal.

2. Coloration Trichrome de Masson Goldner

Dans un premier temps les coupes d'épididyme sont déparaffinées à l'aide de 2 bains d'histoclear (National Diagnostic, Atlanta, USA) de 15 minutes chacun. Cette étape est suivie de la réhydratation progressive de l'organe dans des bains d'éthanol de degrés décroissants : 100°, 95° et 70° durant 1 minute chacun. Le déparaffinage, la réhydratation et la coloration sont réalisés avec l'automate d'histologie HMS70 (MICROM) selon le programme indiqué dans le Tableau M1. Il s'agit de bains de coloration successifs dans des solutions colorantes dont la composition est décrite en figure M2. La procédure comprend 2 étapes de déparaffinage (étapes 1-2), trois étapes de réhydratation (étapes 3-5), 4 colorations successives avec les colorants suivants : Hématoxyline de Mayer (coloration des noyaux), Fuschine (coloration du cytoplasme), Orange G molybdique (coloration plus brillante des composés acidophiles), Vert lumière (coloration des fibres du tissu conjonctif). Les tissus sont ensuite déshydratés par une succession de bains d'éthanol (étapes 15-17). Ils sont ensuite placés dans du butanol puis dans de l'histoclear (étape 18-19) avant un montage permanent avec une lamelle réalisé à l'aide du Cytoseal 60 (Richard Allan Scientific, Washington, USA).

3. Coloration Hématoxyline - Eosine

Cette coloration a été réalisée sur le tissu adipeux peri-épididymaire proximal et distal (Figure M3). Tout comme pour la coloration précédente, les coupes de tissus adipeux sont traitées avec le robot d'histologie selon le programme indiqué dans le Tableau M2. Après déparaffinage et réhydratation (étape 1-5) les coupes sont colorées à l'aide de deux colorants (étapes 7-10) : l'hématoxyline de Mayer (coloration bleu noir des noyaux), l'éosine (coloration rose des cytoplasmes acidophiles). Une fois la coloration terminée les coupes sont déshydratées (étapes 11-13), traitées au butanol et à l'histoclear (étapes 16-17) avant un montage permanent avec une lamelle à l'aide du cytoseal. La composition de ces solutions colorantes est donnée dans la figure M4. La taille des cellules a été mesurée avec le logiciel AxioVision (Leica).

Pas	Station	Réactif	N° Réactif	Agitation	Temps (min)
1	1	Histoclear	40	1	15
2	2	Histoclear	40	1	15
3	3	ETOH 100°	33	1	1
4	4	ETOH 95°	34	1	1
5	5	ETOH 70°	35	1	1
6	9	H2O courante	15	1	1
7	7	Hématoxyline	37	1	4
8	9	H2O courante	15	1	4
9	8	Eosine	38	1	00 :30
10	9	H2O courante	15	1	2
11	4	ETOH 70°	35	1	00 :30
12	4	ETOH 95°	34	1	00 :30
13	15	ETOH 100°	33	1	5
14	16	Butanol	45	1	5
15	17	Histoclear	40	1	5

Tableau M2 : Programme pour coloration Hématoxyline-Eosine sur le robot colorateur.

L'hématoxyline de Mayer's	(Microm,ref F/C0303)
Eosine à 1%	(Eosine 225 pour histologie, Réactifs Ral, ref 312730-01000)

Figure M4 : Composition des différentes solutions utilisées pour la coloration Hématoxyline-Eosine.

Pas	Station	Réactif	N° Réactif	Agitation	Temps (min)
1	1	Histoclear	40	1	15
2	2	Histoclear	40	1	15
3	3	ETOH 100°	33	1	1
4	4	ETOH 95°	34	1	1
5	5	ETOH 70°	35	1	1
6	9	H2O courante	15	1	1

Tableau M3 : Programme pour le déparaffinage des coupes avant immunohistochimie sur le robot colorateur.

4. Immunohistochimie sur coupe d'épididyme

Les coupes de tissus épидидymaires sont d'abord réhydratées à l'aide du robot d'histologie selon le programme indiqué dans le Tableau M3. Puis elles sont recouvertes, pendant 30 minutes, d'une solution à 0.3 % de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, Sigma Ref H1009) afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Après un lavage de 5 minutes dans du PBS 1X (NaCl 137mM ;KCl 26,8 mM ;Na₂HPO₄ 7mM ; KH₂PO₄, 17,6 mM) sous agitation douce, elles sont ensuite incubées 1h dans une chambre humide recouvertes d'une solution de saturation (PBS 1X contenant de la BSA 1%). Le contact avec l'anticorps primaire est effectué en chambre humide à 4°C pendant une nuit, dans la solution de saturation. L'anticorps anti-IDO1 utilisé sur les coupes d'épididyme a été généré chez le lapin et est utilisé en immunohistochimie au 1/800^e dans du PBS-BSA 0.1%. Pour chacune des lames, un contrôle sans anticorps primaire, mais avec du tampon de saturation est réalisé. Avant le contact avec l'anticorps secondaire, les coupes sont lavées 5 minutes sous agitation douce dans du PBS 1X. L'anticorps secondaire anti- Ig de lapin biotinylé¹ est dilué au 1/500^e dans du PBS-BSA 0.1% et appliqué sur les coupes pendant 1h en chambre humide et à la température ambiante (20-25°C). Après 2 lavages sous agitation douce, une étape de 30 minutes d'amplification est réalisée à l'aide de streptavidine conjuguée à la peroxydase ² diluée au 1/500^e dans du PBS 1X. Après un lavage de 5 minutes dans du PBS 1X, le marquage est mis en évidence avec un kit de révélation de la peroxydase en 2 minutes (Novared, ref SK-4800, Vector). Après un lavage dans de l'eau pour stopper la réaction, un montage des lames avec une lamelle est réalisé à l'aide de PBS-Glycérol 50 % (V/V) puis celles-ci sont luttées au vernis.

Les lames obtenues en Immunohistochimie comme pour les simples colorations, sont observées avec un microscope Zeiss et le logiciel Axio VisionRel.4.6 (Zeiss, Le Pecq, France).

¹ Ref 111-065-003, Jackson Immunoresearch

² Jackson Immunoresearch Ref 016-030-084 (interchim)

Immunohistochimie sur Tissus	Acide kynureninique	3-hydroxykynurenine
Inhibition des peroxydases endogènes	H ₂ O ₂ 0,3%	Non
Perméabilisation	Non	PBS Triton 0,1%
Saturation	PBS-NGS 1,5% Triton 0,1%	PBS NGS 1,5%
Anticorps primaire	Anti KYNA au 1/4000 ^{ème} Germabio APO62 fait chez le lapin (Anticorps polyclonaux)	Anti 3-OHK au 1/500 ^{ème} Novus NB100-597 fait chez la souris (Anticorps monoclonaux)
Anticorps secondaire	Anti lapin biotinylé au 1/500 ^{ème} Jackson immunoresearch, ref 111-065-003 fait chez la chèvre	Ant souris couplé à l'alexa 488 au 1/1000 ^{ème} Invitrogen, A11017 fait chez la chèvre
Amplification	oui	Non
Marquage Hoechst	Hoechst au 1/1000 ^{ème} dans du PBS	Hoechst au 1/1000 ^{ème} dans du PBS
Marquage Mitotracker	Non	Non

Tableau M4 : Dilutions et propriétés d'utilisation des anticorps en immunohistochimie sur tissu (tête d'épididyme).

5. Immunofluorescence sur coupe d'épididyme

Pour cette étude nous utilisons soit des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre l'acide kynurénique (KA) couplés à de la BSA (Gemabio), soit un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la 3-Hydroxy-Kynurénine (HK) (Novus).

Pour l'immunofluorescence, les premières étapes sont similaires à celles présentés pour l'immunohistochimie. Les conditions expérimentales sont synthétisées dans le Tableau M4. On notera que la composition du tampon de saturation varie selon l'anticorps primaire ainsi que l'étape d'amplification du signal (Tableau M4). Après une saturation d'une heure à la température ambiante en chambre humide, les différents anticorps primaires sont déposés, à une concentration spécifique selon l'anticorps (Tableau M4). Ils sont laissés en contact avec les coupes la nuit à 4°C dans une chambre humide. Pour chacune des lames, un contrôle sans anticorps primaire, mais avec du tampon de saturation est réalisé. Le lendemain, après deux lavages de 5 minutes au PBS 1X, l'anticorps secondaire correspondant a été appliqué (Tableau M4). Dans certains cas, une amplification a été réalisée (Tableau M4). Les anticorps secondaires sont révélés grâce au TSA Alexa 488. Afin de visualiser les noyaux, un marquage de 5 minutes à température ambiante avec du Hoechst est réalisé. Celui-ci marque l'ADN et émet de la fluorescence bleue quand il est soumis à un rayonnement de 350nm. L'observation est faite avec un microscope Zeiss Axio Plan 2, et les images sont traitées avec le logiciel Axiovision LE.

6. Analyse structurale des épididymes par microscopie électronique

Dès son prélèvement, le tissu est placé dans un tube de 2 ml et incubé pendant 72h dans 1,5ml de fixateur (figure M5). A la fin de cette incubation le tissu est transféré dans un tube propre de 1.5ml et lavé avec 500µl du mélange (1 volume tampon cacodylate / 1 volume rouge de Ruthénium / 1 volume d'eau distillée). Après avoir ôté le liquide du tube, une étape de post-fixation est nécessaire. On incube alors les tissus avec 500µl d'un mélange de tétraoxyde d'osmium (OsO₄) 1% en tampon cacodylate 0,07 M pendant 1h. Le tétraoxyde d'osmium imperméabilise les membranes cellulaires en réagissant

Fixateur : (pour la Polymérisation de protéines)

-Glutaraldéhyde 1,2%

- Tampon cacodylate 0,07M ph 7,4

-Rouge de Ruthénium 0,05%

Préparé à partir d'un mélange V/V/V de

1-Glutaraldéhyde 3,6	(glutaraldéhyde 25% au frigo,dilution 1/7 l'eau)
2-Tampon cacodylate 0,2M ph 7,4	(sodium cacodylate,M=214,05 ;2,14g pour 50ml)
3-Rouge de Ruthénium	(rouge de Ruthénium : 9mg pour 6ml d'eau)

Figure M5: Solutions utilisées pour la préparation des cellules pour la microscopie électronique.

avec la bicouche phospholipidique. Le mélange est ensuite éliminé. Une étape de déshydratation est réalisée dans quatre bains successifs d'alcools 50 % (3x10mn), 70% (3x15mn), 96 % (3x20mn) et 100%(3x20mn) puis dans un bain d'oxyde de propylène (3 x 20 minutes). Ce dernier est un solvant de la résine d'inclusion. On laisse les tubes ouverts pour que l'oxyde de propylène s'évapore. Les tissus sont mis en contact avec 500 µl d'un mélange de résine Epon et d'oxyde de propylène pendant une nuit. On laisse de nouveau les tubes ouverts pour que l'oxyde de propylène s'évapore. Le lendemain, les tissus sont transférés dans des tubes contenant 200µl de résine Epon pure pour l'imprégnation (2x3h). L'inclusion est réalisée avec 200µl de résine Epon pure et les tissus qui sont toujours dans des tubes de 1,5ml sont polymérisés pendant 72 heures à 60°C. Enfin, des coupes semi-fines de 0.65µm et des coupes ultra-fines de 90nm sont effectuées sur les tissus. Les observations sont effectuées sur un microscope électronique Geod électron.

7. Cytométrie de flux

a. Préparation des cellules stromales de tissu adipeux (d'après Hauner H *et al.*, 1989)

Le tissu adipeux péri-épididymaire est prélevé en prenant soin d'éliminer au maximum le tissu fibreux et les vaisseaux sanguins. Il est placé dans du DMEM/F12 dans la glace pour le transport de l'animalerie au laboratoire. Il est ensuite rincé plusieurs fois dans du PBS pour éliminer le sang. Le tissu est découpé en petits fragments placés dans du tampon KRB complet (figure M6) contenant de la collagénase à raison de 1ml de KRB complet /250mg de tissu.

Après une incubation de 45 min sous agitation douce (sur roue 60 cycles/min) à 37°C, le lysat est filtré sur un filtre de nylon (250µm). Dans les cas de digestion incomplète, une étape optionnelle de digestion / filtration dans les mêmes conditions est ajoutée. Les lysats sont ensuite rassemblés et centrifugés 10 minutes à 200g à température ambiante. Le culot est ensuite repris dans 1.5 ml de tampon de lyse (figure M5) et incubé pendant 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé à 750g pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant le culot est lavé deux fois

<p>Tampon <i>KRB</i> complet</p> <p>Krebs-Ringer Bicarbonate buffer (Sigmaaldrich) 20mM Hepes 1,5 mg collagénase et 20 mg/ml de BSA</p> <p>Tampon Lyse érythrocytes</p> <p>Tris HCl 17Mm ph 7,4 NH4Cl 144 mM</p> <p>Milieu Hanks complet</p> <p>Milieu Hanks (sigmaaaldrich)</p> <p>Ajout extemporanément de</p> <p style="padding-left: 150px;">1,25 mM CaCL2</p> <p style="padding-left: 150px;">0,4 mM MG SO4</p> <p style="padding-left: 150px;">1mg/ml de collagénase Xla (146UI/mg)</p>
--

Figure M6: Composition des tampons utilisés pour la préparation des cellules pour la cytométrie de flux.

Types cellulaires	Ac-Fluo	Dilution	Filtres	excitation	émission
Lymphocytes T	CD4 FITC	1/20	FL1	490	543
	CD3 PE		FL2	565	578
Lymphocytes B	CD8 PerCP		FL3	488	675
	CD19 APC		FL4	642	660

Tableau M6 : Conditions d'utilisation des marqueurs de surface des cellules lymphocytaires (D'après fiches techniques des réactifs Miltenyi Biotec).

dans du PBS 1X contenant 0.5% de BSA et 2.5mM d'EDTA. Les cellules sont ensuite reprises dans ce même tampon.

b. Préparation des cellules de tête d'épididyme

Le protocole utilisé est modifié d'après Araki et al (2002). Les têtes d'épididymes sont prélevées comme indiqué précédemment en prenant soin d'éliminer le plus possible de vaisseaux et de tissu adipeux et sont placées dans du PBS dépourvu de Ca^{2+} et de Mg^{2+} . Après, une élimination du tissu conjonctif qui entoure les tubules de l'épididyme le tissu est haché dans du PBS dépourvu de Ca^{2+} et de Mg^{2+} dans des cupules en verre. Afin de permettre la diffusion des spermatozoïdes dans le milieu on place la cupule pendant 10 min dans une étuve à 37°C. Les spermatozoïdes et le milieu sont écartés et les têtes d'épididyme hachées dans du PBS 1X et lavées 3 fois avec du PBS afin d'éliminer le maximum de spermatozoïdes. Le tissu est ensuite placé dans une solution de trypsine/EDTA (0.25%) à raison de 1ml de trypsine³ pour 5 mg de tissu. Il est soumis à une incubation de 30 minutes à 32°C sous agitation sur roue (60 cycles/min) puis est centrifugé à 800g pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans du milieu Hanks complet (figure M5) à raison de 1ml pour 5mg de tissu. Le culot est incubé dans ce milieu pendant 40 à 60 minutes à 32° sous agitation douce. Ce lysat est ensuite centrifugé à 500g pendant 5 minutes à température ambiante. Après élimination du surnageant, les cellules sont reprises dans du PBS 1X contenant 0.5% de BSA et 2.5mM d'EDTA et comptées.

c. Analyses des cellules par cytométrie de flux

Le laser du cytomètre produit une lumière monochromatique qui excite spécifiquement un fluorochrome à une longueur d'onde λ donnée. De nombreux fluorochromes peuvent être excités à différentes longueurs d'onde, permettant l'étude de plusieurs paramètres cellulaires simultanément. Les cellules stromales du tissu adipeux et les cellules de la tête d'épididyme sont diluées dans 250 μl pour obtenir une

³ Cette étape permet de déstructurer le tissu afin de permettre une meilleure efficacité de la collagénase par la suite

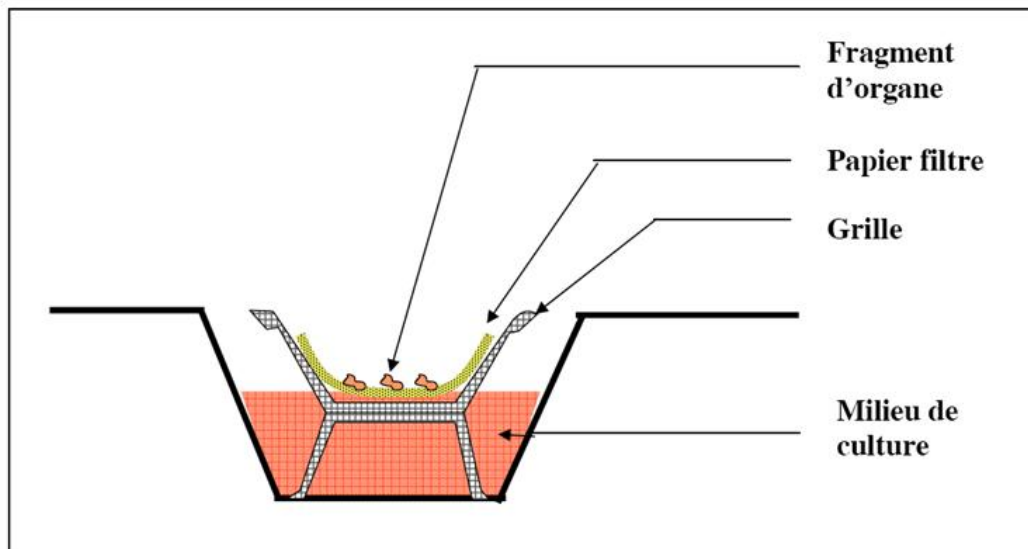


Figure M7: Montage expérimental pour les cultures organotypiques.

concentration finale de $1 \text{ à } 5 \cdot 10^6$ cellules pour $100 \mu\text{l}$ de tampon PBS 1X contenant 0.5% de BSA et 2mM EDTA. Les cellules sont ensuite incubées à 4°C pendant 10 min avec les différents anticorps couplés aux fluorochromes correspondant aux marqueurs de surface des cellules lymphocytaires (Tableau M6). Pour chaque échantillon, 10 000 événements sont comptés. Après passage au cytomètre de flux, les données sont analysées à l'aide du logiciel BD CellQuest Pro logiciel (Becton Dickinson).

8. Culture organotypique d'épididyme

a. Culture des organes

Des têtes d'épididyme, prélevées stérilement sur des souris appartenant aux deux lignées *Ido1^{-/-}* et *Balb/c* sont trempées dans un bain de Bétadine®, puis dans trois bains de tampon phosphate PBS 1X supplémenté en antibiotiques (streptomycine $50 \mu\text{g/ml}$, pénicilline 100 u/ml) (Sigma). Elles sont ensuite coupées en fragments de 1 mm^3 environ avant la mise en culture (Lefrancois *et al*, 1993). Les expériences de culture sont réalisées sur milieu DMEM-F12 (Gibco) enrichi en antibiotiques (streptomycine $50 \mu\text{g/ml}$, pénicilline 100 u/ml), en insuline transferrine sélénium (ITS) (Gibco), et en sérum de veau fœtal (SVF) déstéroïdé 2% dans des plaques douze puits. Lors de l'expérience préliminaire, des quantités variables de dihydrotestostérone (DHT) (Sigma) ont été ajoutées au milieu, par la suite la concentration adoptée a été de 10^{-6} M . Les cultures organotypiques sont effectuées sur une grille (Figure M7), les fragments d'organe étant séparés de la grille par un papier filtre, et conservées à l'étuve à 35°C sous atmosphère enrichie en dioxyde de carbone (CO_2 5%). Les milieux de culture sont changés tous les deux jours.

b. Incorporation de méthionine [^{35}S]

Le milieu de culture est éliminé et remplacé par du milieu DMEM-F12 sans méthionine (Gibco) enrichi en antibiotiques (streptomycine $50 \mu\text{g/ml}$, pénicilline 100 u/ml), en insuline-transferrine-sélénium (ITS) et en sérum de veau fœtal (SVF) déstéroïdé 2%, supplémenté en L-Glutamine (36 mg/l) (Sigma), en L-Cystine

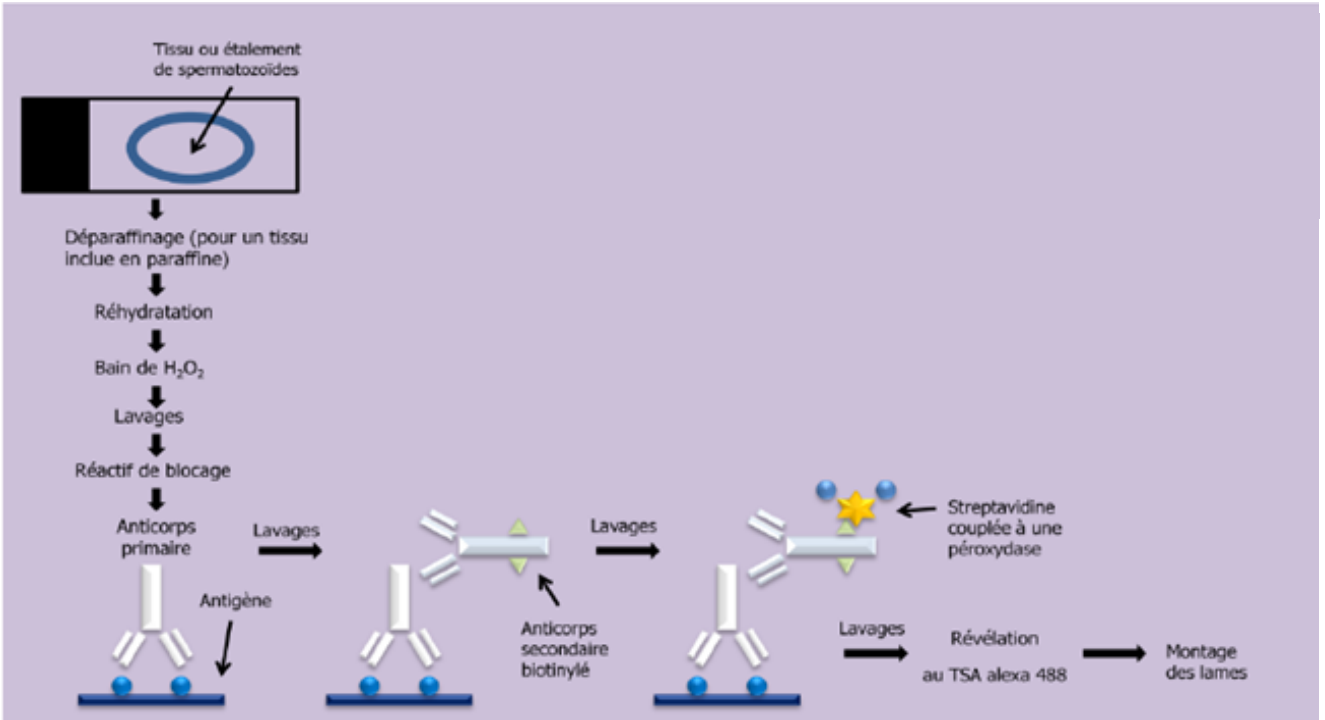


Figure M8 : schéma du protocole d'immunofluorescence sur spermatozoïdes ou coupe d'épididyme.

(31,29mg/l) (Sigma), en L-Cystéine (17,56mg/l) (Sigma) et avec 100 μ Ci de méthionine [³⁵S] (Perkin Elmer). L'incubation se poursuit pendant deux à trois heures à 35°C sous atmosphère enrichie en CO₂ (5%). Après l'incubation, le milieu est éliminé, les tissus sont prélevés, puis broyés dans du tampon C. L'incorporation de la méthionine [³⁵S] est déterminée par précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA) 20% et par filtrage à l'aide d'un filtre GF/A (Whatman). La mesure de la radioactivité a été réalisée à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman LS6000TA).

II. Analyses cytologiques

1. Préparation des spermatozoïdes

Le comptage des spermatozoïdes, est réalisé en cellule de Malassez, après qu'ils aient été dilués au 1/50ème dans du milieu M2. Ce dernier est ensuite éliminé par centrifugation à 300g durant 5 minutes et le culot repris dans du PBS 1X de façon à avoir par la suite 50 000 spermatozoïdes pour l'étalement par lame. Après un séchage d'une heure et demi, les spermatozoïdes sont fixés au paraformaldéhyde 4% (V/V) durant 15 minutes puis lavés trois fois au PBS 1X. Les étalements sont enfin laissés à sécher durant deux heures et conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation en présence de sachets contenant des agents dessiccants.

2. Test de viabilité

Un volume de 20 μ l de la suspension des spermatozoïdes est mélangé avec 20 μ l d'éosine puis agité pendant 30 secondes. On ajoute ensuite à ce mélange 30 μ l de nigrosine puis on agite de nouveau. A l'aide d'une lame, on réalise un frottis à partir de quelques microlitres sur une lame et on laisse sécher à l'air pendant 5 minutes. On observe au microscope. Les spermatozoïdes morts sont colorés en rose et les spermatozoïdes vivants en blanc.

Immunohistochimie sur spermatozoïdes	Acide kynurenique	3-hydroxykynurenine
Inhibition des peroxydases endogènes	H ₂ O ₂ 0,3%	Non
Perméabilisation	Non	PBS Triton 0,1%
Saturation	PBS-NGS 1,5% Triton 0,1%	PBS NGS 1,5%
Anticorps primaire	Anti KYNA au 1/2000 ^{ème} Germacbio APO62 fait chez le lapin (Anticorps polyclonaux)	Anti 3-OHK au 1/500 ^{ème} Novus NB100-597 fait chez la souris (Anticorps monoclonaux)
Anticorps secondaire	Anti lapin biotinylé au 1/500 ^{ème} Jackson immunoresearch, ref 111-065-003 fait chez la chèvre	Ant souris couplé à l'alexa 488 au 1/1000 ^{ème} Invitrogen, A11017 fait chez la chèvre
Amplification	Oui	Non
Marquage Hoechst	Hoechst au 1/1000 ^{ème} dans du PBS	Hoechst au 1/1000 ^{ème} dans du PBS
Marquage Mitotracker	Non	Mitotracker au 1/5000 ^{ème}

Tableau M7: Dilutions et propriétés d'utilisation des anticorps en Immunofluorescence sur spermatozoïdes.

3. Estimation de la présence de leucocytes dans le fluide séminal

La recherche et la numération des leucocytes dans le fluide séminal de la queue sont évaluées par le kit commercial Leucoscreen TM kit (FertiPro NV, Belgium). La technique est basée sur la réaction à la peroxydase. Cette dernière va colorer en rouge brun les globules blancs présent dans le fluide. Le protocole consiste à préparer une solution de travail dans un tube test, à partir de solution de diaminobenzidine (DAB) et d'une goutte de peroxydase (fournis dans le kit). Dans un tube, on ajoute à cette solution, 20 µl d'échantillon frais (le fluide séminal) puis une goutte de solution réactive (fourni avec le kit). On place 10 µl de ce mélange entre lame et lamelle pour observation au microscope et comptage.

On compte les cellules brunes et les spermatozoïdes présents dans le même champ d'observation. La proportion de leucocytes observée est rapportée au nombre total des spermatozoïdes observés.

4. Coloration de Shorr

La coloration de Shorr est utilisée pour mettre en évidence des anomalies morphologiques des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes (80 000/lame) sont étalés délicatement puis séchés à l'air pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite passées à l'éthanol 70° pendant 1 minute, puis rincées 2 minutes à l'eau courante. A la suite de ces étapes, les spermatozoïdes sont colorés durant 3 minutes à l'hématoxyline de Mayer (Sigma) et l'excès de colorant est éliminé par un lavage de 3 minutes à l'eau courante.

Après deux passages d'une minute dans l'éthanol à 70°, puis à 95°, les lames sont ensuite placées dans le colorant de Shorr (Merck) pendant 1 minute. Plusieurs bains successifs d'une minute chacun sont effectués : un dans de l'éthanol 95°, deux dans de l'éthanol 100°, et enfin un dans de l'xylène. Le montage est réalisé avec 3 gouttes de Cytoseal 60. Puis, une lamelle préalablement trempée dans l'histoclear est déposée en évitant la formation de bulles. L'observation est réalisée au microscope Zeiss Axio Plan 2. Les morphologies normales et anormales sont comptabilisées.

Cdt° PCR x1	
cDNA	0,75 µl
Oligo5'	0,5 µl
Oligo3'	0,5 µl
dNTP	0,5 µl
Tampon 5X	4 µl
MgCl2	2 µl
TAQ	0,1
H2O	11,65µl
QSP20µl	20 µl

Tableau M8 : Conditions réactionnelles pour la RT-PCR.

5. Immunofluorescence sur spermatozoïdes

Les lames comportant l'étalement de spermatozoïdes sont dans un premier temps réhydratées durant 5 min dans du PBS 1X. Puis les spermatozoïdes sont perméabilisés ou non afin de faciliter l'accès de l'anticorps à l'antigène. Les peroxydases endogènes sont ou non inhibées selon les anticorps primaires et si une amplification doit être effectuée. Après deux lavages en PBS 1X, les lames sont incubées avec un tampon de saturation qui diffère selon la molécule marquée. L'anticorps primaire est déposé et incubé une nuit à 4°C en chambre humide. Après lavage, l'anticorps secondaire correspondant est appliqué pendant 1 heure en chambre humide à température ambiante. Dans certains cas, une amplification similaire à celle effectuée sur les tissus est réalisée avant la révélation. Afin de visualiser les noyaux, un marquage avec le Hoechst, est effectué.

Dans certains cas, un marquage au Mitotracker permet d'observer la localisation des mitochondries dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde. Le détail des différentes spécificités du protocole pour chaque anticorps est donné dans le Tableau M7. Après avoir été montées en PBS/Glycérol et luttées, les lames sont observées à l'aide d'un microscope Zeiss Axio Plan 2. Certaines d'entre elles sont observées au microscope confocal (LSM 510). Les images ont été traitées avec les logiciels Axiovision LE et/ou Image J.

V. Analyses Transcriptionnelles

1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide de kit de purification Nucleospin RNAII (Macherey Nalgene). Les tissus sont broyés dans du tampon RA1 (500µl) en présence de billes d'acier inoxydable dans un broyeur de tissus (Tissue lyser, Qiagen) pendant 3 cycles de 30 secondes. Puis le broyat est soumis au protocole indiqué par le fournisseur du kit (Machery-Nagel). Les ARNs sont élués dans 30-50 µl de tampon d'éluion et 2µl sont utilisés pour leur dosage au Nanodrop (Thermo Scientific) et leur qualité est évaluée grâce au rapport DO_{260} / DO_{280} .

Transcrit	Amorce sens (5' ->3')	Amorces antisens (5' ->3')	TM	produit
IDO1 Transcrit 1	GGGGGTCAGTGGAGTAGACA	GCAGATTTCTAGCCACAAGGA	60°C	173bp
IDO1 Transcrit 2	TGCCTGGTTTTGAGGTTTTTC	GCAGATTTCTAGCCACAAGGA	58°C	246bp
Indol	CCTCATCCCTCCTTCCTTTC	GGAGCAATTGCCTGGTATGT	57°C	218bp
TDO	TGAATGCGCAAGAACTTCAG	TTCCAGAACAGAACTGCT	58°C	244bp
COX1	CATGGCTGGCCTAGAACTCACT	AAGGCAGAGAGCAGTTGCATC T	63°C	72bp
COX2	CCAGCACTTCACCCATCAGTT	ACCCAGGTCCYCGCTTATGA	63°C	52bp
RORc	AGCAGTGTAATGTGGCCTAC	GCACTTCTGCATGTAGACTG	57°C	179bp
T-bet	GTTCCCATTCCTGTCTTTC	CCTTGTTGTTGGTGAGCTT	55°C	247bp
FoxP3	CCCAGGAAAAGACAGCAACCTT	TTCTCACAACCAGGCCACTTG	59°C	88bp
Gata3	ACGGAAGAGGTGGACGTACT	GTGGTGGATGGACGTCTTG	58°C	247bp
Kat3	AAAAGATGAATCTGGGAGTTGG	GGTTTGGGCAGAAAAGACATC	59°C	198bp
Afmid	CCGCAGTGTCTGTTTTCAAC	CTATGAGGGGCTCCAGGTC	60°C	200bp
Kynu	CTTGGCTTCAACCGAAA	CAAAGCATTTCATTAGAGCTAT TTCTT	55°C	200bp
K3h	TTCAATAAGCAGAGAAAACCTTA AACAA	TCACACCCTACAACAAGGTCA	56°C	199bp
Cyclophilin	GGAGATGGCACAGGAGGAA	GCCCGTAGTGCTTCAGCTT	58°C	75bp
Gapdh	GAAGACTGTGGATGGCCCCTC	GTTGAGGGCAATGCCAGCCCC	58°C	343bp

Tableau M9 : Amorces utilisées pour les RT-PCR et la QPCR.

2. Réverse transcription

Elle est réalisée sur 2 µg d'ARN en présence de 0,5µg d'amorce hexamérique aléatoire (Promega) et d'eau distillée dans un volume final de 10 µl. Après 5 minutes d'incubation à 70°C, la réaction est placée à 4°C pendant 5 minutes. Puis, un mélange composé de dNTP 5mM (Proméga), de tampon 1X, de MgCl₂ 2,5 mM, de transcriptase inverse à 1U/µl (Proméga), de RNasine 0,5U/µl (Proméga) est ajouté dans un volume final de 40µl. La réaction s'effectue ensuite par des incubations successives du milieu réactionnel : d'abord 5 minutes à température ambiante, puis une heure à 42°C, et enfin 15 minutes à 70°C.

3. PCR

Toutes les PCR sont réalisées à l'aide d' 1 unité de Taq DNA polymérase (Promega Gotaq) en présence de 20 pmole de chacune des amorces (Tableau M8), de 2mM de MgCl₂ et de 2 µl d'ADNc dans un volume final de 50µl. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Le Pecq, France) selon les conditions suivantes : une première incubation de 5 minutes à 95°C, puis selon les cas de 25 à 35 cycles comportant 3 étapes : une dénaturation de 30 secondes à 94°C, une hybridation d'une minute à la température d'hybridation de l'amorce (T_m), et une polymérisation de 2 minutes à 72°C, et enfin pour terminer une élongation de 10 minutes à 72°C. Les séquences des amorces, leur T_m et la taille du produit d'amplification sont reportés dans le Tableau M9. Après cette amplification, 15 µl de chaque échantillon sont déposés sur un gel d'agarose 1,5% (m/v) (Euromedex).

Les signaux sont observés sur un banc UV. Dans les cas de RT-PCR semi quantitative, les quantifications sont réalisées à l'aide de la mesure de la Densité Optique avec le logiciel Quantity-One (Biorad).

4. QPCR

Les quantifications qui sont réalisées dans ce travail sont obtenues par quantification relative. Pour cela un Mix Universel des différents ADNc qui doivent être quantifiés est

A	Gel de séparation	Tris-HCL	375mM, Ph 8,3
		Acrylamide	12%
		Persulfate d'ammonium	0,05%
		TEMED	0,05%
	Gel de Concentration	Tris-HCL	125mM, Ph 6,8
		Acrylamide	4,5%
		Persulfate d'ammonium	0,05%
		TEMED	0,05%
	Tampon de migration	Tris-HCL	124mM, Ph 8,3
		Glycine	960 mM
Sodium Dodécyl Sulfate		0,05%	
B	Tampon de transfert	Tris-HCL	25 mM, Ph 8,3
		Glycine	192
		Sodium Dodécyl Sulfate	20%
C	TBS 10X	Tris-HCl, pH 7,4	Tris-HCl, pH 7,4
		NaCl	NaCl

Figure M9 : Composition des différentes solutions utilisées pour réaliser l'analyse électrophorétique des échantillons protéiques (A), leur transfert sur membrane (B) et l'immunodétection (C).

réalisé dans des proportions équimolaire. Une gamme étalon est réalisée à partir de ce Mix Universel avec des dilutions successives au 1/20^e, 1/40^e, 1/80^e, 1/160^e, et 1/320^e. Les ADNc obtenus après la RT-PCR sont dilués au 1/25^e. Ils sont déposés, en double, ainsi que chacun des points de la gamme étalon dans une plaque de 96 puits à l'aide du robot epMotion (Eppendorf) à raison de 2 µl par puits (Biorad). Un mélange comprenant 18 µl de IQ™ SYBR^R Green Supermix Biorad (Taq polymérase, fluorescéine, et SYBR^R Green), 0,3pmol de chacune des amorces et 10µl d'eau distillée sont ajoutés. La Q-PCR est réalisée dans un appareil Eppendorf aux températures d'hybridation indiquées (Tableau M9). Le taux de transcrits de chaque ARNm d'intérêt est quantifié par rapport à celui de la cyclophiline A utilisé comme transcrit de référence. La quantification relative et l'analyse statistique sont calculées à l'aide du logiciel REST (Qiagen).

V. Analyses protéiques

1. Extraction des protéines

Les tissus encore congelés sont placés dans 300µl de tampon d'extraction PhosphoSafe™ (Merck) complété avec un cocktail d'antiprotéases (Complete Mini, Roche diagnostic) froid et broyés avec le broyeur de tissus en présence de bille d'acier inoxydable (3 cycles de 30 secondes). L'homogénat est ensuite centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants protéiques sont dosés par la technique de Bradford (Biorad) en utilisant une gamme étalon d'albumine bovine. Les extraits sont ensuite stockés à -20°C.

2. Western blot

Toutes les compositions des tampons utilisés pour cette expérience sont détaillées sur la figure M8. Les protéines sont dénaturées par incubation avec le tampon Laemmli 1X à 100°C durant 5 minutes. Puis les échantillons protéiques (30µg) sont déposés sur un gel SDS-PAGE 12% (v/v). L'électrophorèse est réalisée pendant 1 heure

Anticorps	Type	Fournisseur/Ref		PM	Dilution	Anticorps secondaires	Commentaires
Beclin 1	P	Cell Signaling	3738	60 kDa	1/1000e	rabbit	
GAPDH	M	Novus	NB300-221	30&40 kDa	1/2500e	mouse	
mTOR	P	Cell Signaling	2971	289 kDa	1/1000e	rabbit	
mTOR-P	P	Cell Signaling	2971	289 kDa	1/1000e	rabbit	
p70S6 kinase	P	Cell Signaling	9202	70-85 kDa	1/1000e	rabbit	
p70S6 béta phospho T389	P	Abcam	Ab 60948	70-85 kDa	1/1000e	rabbit	
Phospho smad 2/3 (Ser 423/425)	P	Santa Cruz	Sc-11769R	55-60 kDa	1/1000e	rabbit	
Phospho-STATs sampler kit	P	Cell Signaling	9351	90kDa	1/1000e	rabbit	Contient : STAT1, STAT3, STAT5, STAT6 phosphorylées
STATs sampler kit	P	Cell Signaling	9939	90kDa	1/2000e	rabbit	Contient : STAT1, STAT3, STAT5, STAT6
Anti-kynurenic acid	P	Germacbio	APO62		1/1000e	rabbit	
Anti-Ig Rabbit HRP	P	Paris			1/5000e		
Anti-Ig Mouse HRP	P	Paris			1/5000e		

Tableau M10 : Différents anticorps,spécificité et dilutions expérimentales utilisées en Western -Blot (P : polyclonal, M : Monoclonal).

en présence de tampon de migration 1X sous un courant de 60mA et 200V. Les protéines présentes sur le gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Bioscience, Orsay, France) à l'aide du tampon de transfert 1X durant 1 heure à 250mA et 100V. Elles sont visualisées à l'aide d'une coloration au rougeponceau puis les membranes peuvent être stockées à 4°C avant leur utilisation. Les membranes sont placées dans une solution de lavage : TBS 1X, Tween 20 à 0,1% (v/v) (Sigma) pendant 5 minutes afin d'éliminer le rougeponceau. Puis elles sont saturées à l'aide de la solution de lavage supplémentée par 0.6 % (m/v) de gélatine pendant au moins 2 heures. L'anticorps primaire est dilué dans la solution de saturation suivant le facteur de dilution précisé dans le Tableau M10. Il est ensuite mis au contact des membranes durant toute la nuit sous agitation douce à 4°C.

Après trois lavages de 5 minutes, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase (anti IgG HRP, Paris) dilué au 1/5000^e dans la solution de saturation pendant 1 heure à température ambiante. Enfin, elles sont lavées 4 fois 5 minutes.

La révélation est réalisée avec le kit ECL (Western Blotting Detection Amersham-Pharmacia) grâce à un film autoradiographique. Les intensités des signaux sont ensuite quantifiées grâce au logiciel Quantity-One (Biorad).

3. Mesure de l'activité du protéasome

Pour évaluer l'activité du protéasome, nous avons mesuré les activités peptidasique majeures du protéasome. Pour cela, des échantillons de tête d'épididyme de souris sauvages et de souris *Ido1*^{-/-} sont homogénéisés dans 10 volumes de tampon Tris-HCl glacé (50mM pH 7.5). Les protéasomes sont ensuite isolés par trois centrifugations séquentielles et les activités chymotrypsin-like, trypsin-like et peptidyl-glutamyl peptide hydrolyzing (PGPH) sont déterminées en mesurant l'accumulation du produit de l'hydrolyse de différents substrats fluorogènes correspondants (voir Jrad-Lamine et *al.*, 2011). Les activités du protéasome sont mesurées en calculant la différence entre les unités de fluorescence arbitraires enregistrées dans le milieu réactionnel. L'accumulation des protéines polyubiquitinées dans les échantillons des

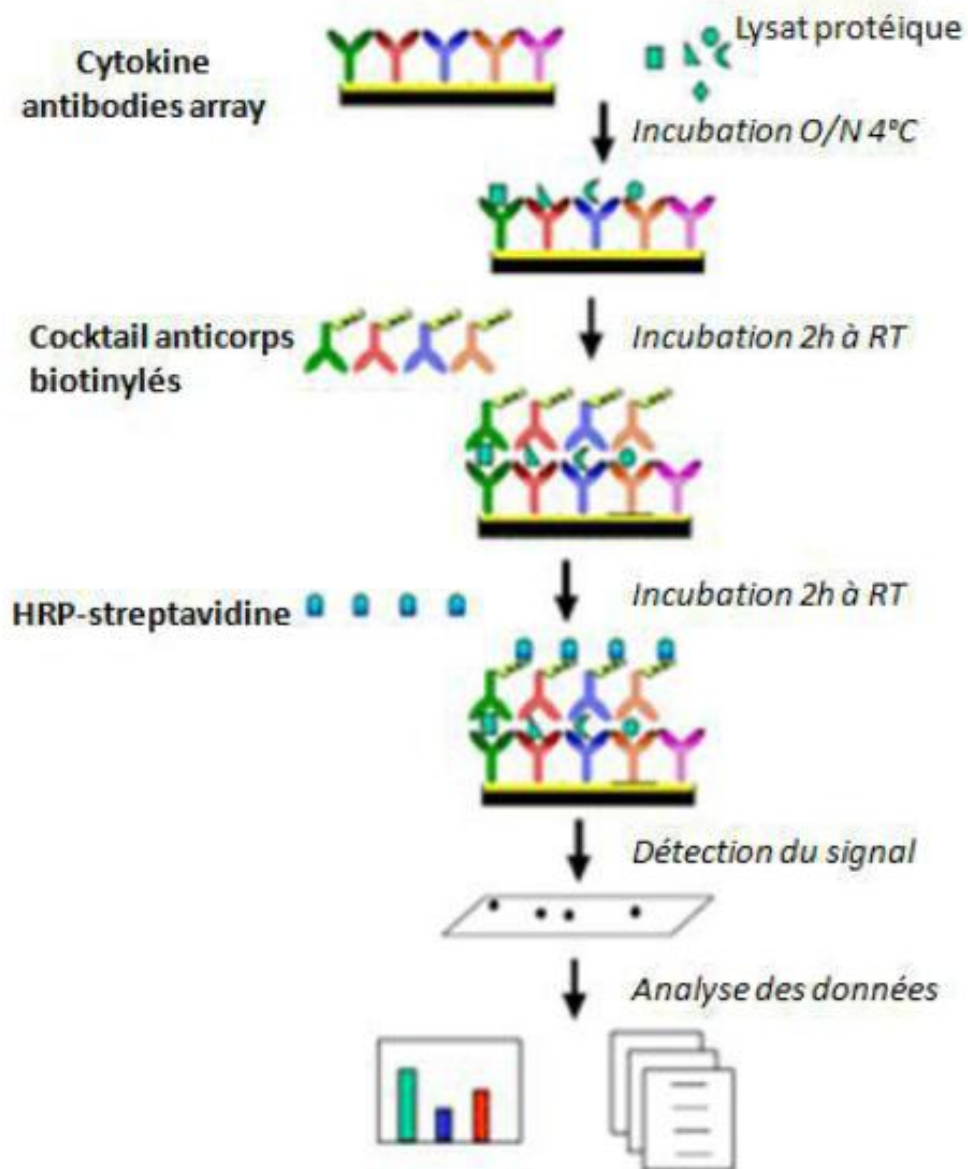


Figure M10 : Schéma d'un protocole d'utilisation d'un cytokine array.

têtes de l'épididyme des souris sauvages et des souris *Ido1*^{-/-} a été aussi évaluée par Western Blot en utilisant l'anticorps FK1 (KCOM), anticorps qui reconnaît la chaîne de polyubiquitine. Ces mesures ont été obtenues en collaboration avec l'équipe du Dr. Combaret (INRA de Theix, Clermont Ferrand).

4. Dosage des cytokines par CytokineArray™ (Raybiotech)

Ce dosage est réalisé par une technique similaire au Western-Blot. Le « CytokineArray » est une membrane sur laquelle sont spottés des anticorps dirigés contre des cytokines de souris « mouse inflammation antibody arrays » (Figure M10). Ce système permet la détection et la quantification simultanée de plusieurs cytokines-et chémokines dans un échantillon biologique. Dans notre cas nous avons testé : Leptine, MCP, Fas-lig, G-CSF, GM-CSF, INF γ , IL-10, IL-13, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-6, IL-17, IL-8, IL-9, TNF α , SDF-1, TGF β , TMP-1 et MIP-1. Après avoir saturé les membranes pendant 1 heure à température ambiante dans le tampon de saturation fourni avec le kit, 250 μ g de protéines totales plasmatiques ou épидидymaires sont incubées une nuit à 4°C sous agitation douce. A la fin de cette incubation les membranes sont lavées trois fois (en TBS 1X-Tween 0.1 %) puis mises en contact avec un cocktail d'anticorps biotinylés anti-cytokines pendant 1h à la température ambiante. Les membranes sont lavées 3 fois avant d'être placées dans une solution contenant de la streptavidine couplée HRP. Après avoir été lavée de nouveau 3 fois la réaction est révélée par un système de chimioluminescence sur film autoradiographique. La densité optique des spots est mesurée et quantifiée à l'aide du logiciel Quantity One, Biorad .

VI. Analyses métabolomiques

1. Céramides, cholestérol et sphingomyéline

Le dosage des céramides, de la sphingomyéline, du cholestérol dans le plasma et dans des extraits épидидymaires des animaux *KO* et sauvages ont été réalisés en collaboration avec le plateau technique de lipidomique de l'institut Claude de Préal à

Toulouse. Les tissus sont homogénéisés dans une solution de méthanol/EGTA 5 mM (2:1 v/v) avec l'appareil FAST-PREP (MP Biochemicals) et un aliquot est utilisé pour la quantification des protéines totales. Les lipides totaux sont extraits selon le protocole de Bligh and Dyer, 1959 dans un mélange de chloroforme/méthanol/EGTA 5 mM (2.5:2.5:2.1, v/v/v) en présence de standards [stigmastérol (18 mg) et céramide-NC15 (2 mg)], préparés selon Vieu *et al.*, (2002). La phase lipidique est séchée sous un flux d'azote et les extraits lipidiques sont soumis à un traitement alcalin (dans 1 ml d'une solution méthanolique-NaOH 0.6 N) puis ils subissent une silylation dans du BSTFA (1% TMSCl)/acétonitrile (1:1, v/v)) (Vieu *et al.*, 2002). Le mélange (5ml) est ensuite analysé directement en chromatographie liquide en phase gazeuse sur colonne capillaire RESTEK RTX 50 (30 m \times 0.32 mm in diamètre, 0.1 mm d'épaisseur de film, 4890 Hewlett Packard system). La température de l'étuve est programmée de 195°C à 310°C et un gradient de 3.5°C par minute sous une pression d'hydrogène de 0.5 bar est appliqué. L'injection est réalisée à 310°C et la détection à 340°C. La sphingomyéline et la céramide sont séparées selon le nombre de carbones et l'insaturation de la fonction amide liée à la chaîne carbonée. La quantification est réalisée conformément aux étalons internes. La quantité de sphingomyéline, C16, C18, C22 et C24 ou de céramides correspondent à la somme des espèces moléculaires ayant ce nombre de carbone dans la chaîne latérale, indépendamment de l'insaturation. Les résultats sont exprimés en nmole par mg de protéine.

2. Kynurénines

Les dosages du tryptophane et des différentes kynurenines ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr D. Fuchs (Vienne, Autriche). La technique utilisée est une chromatographie HPLC en phase réverse (AB SCIEX, Foster City, CA) couplée à un spectromètre de masse de type LC-ESI-MS/MS (Agilent Technologies, SantaClara, CA, USA). Pour la chromatographie un gradient linéaire est réalisé entre de l'acide formique 0.1% et de l'acétonitrile et 10 μ l de chaque fraction sont analysés dans le spectromètre QTrap en mode positif. Des courbes de calibration avec chaque composé à doser (Trp, kynurénine (KYN), acide kynurénique (KA), 3-hydroxykynurenine (HK), acide

xanthurenique (XA), acide anthranilique (AA), acide 3- hydroxyanthranilique (HAA), acide indole-3-acétique (IAA), mélatonine et sérotonine (Sigma- Aldrich) sont réalisées pour la quantification.

VII. Analyses statistiques

Pour les analyses statistiques, un test *t* de Student ou selon le cas un *Anova2* ou encore des tests non paramétriques *Kruskal-Wallis* et *Mann-Whitney* sont effectués pour déterminer si les différences observées entre chaque groupe sont significatives. Elles sont perçues comme telles lorsque la valeur de *p* est inférieure à 0,05.

Résultats

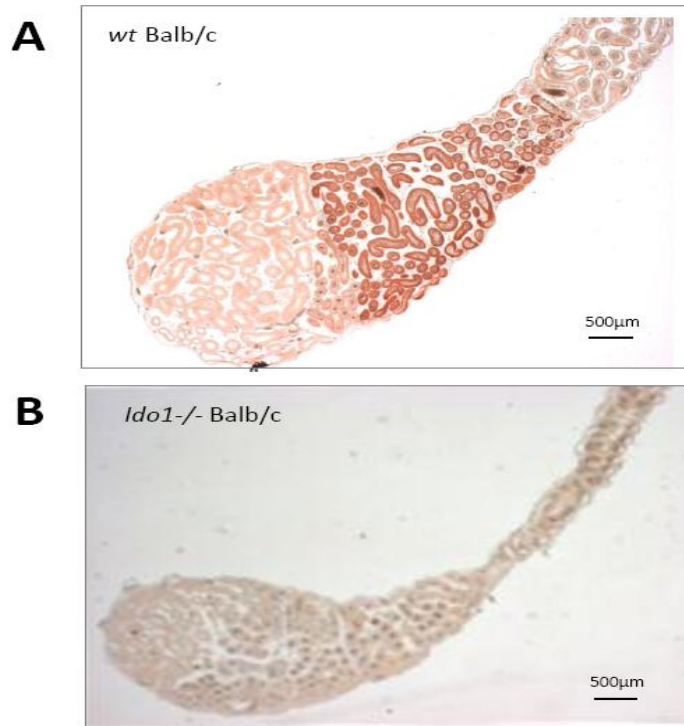


Figure R1 : Immunohistochimie représentatives de la détection d'IDO1 sur des coupes en paraffine de tête d'épididyme de souris sauvage (A) et de souris KO pour IDO1 (B).

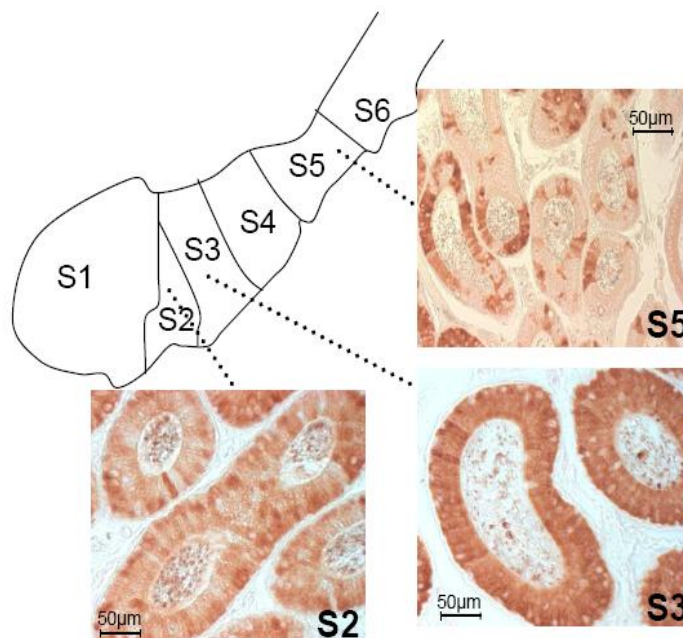


Figure R2 : Photographies d'immunohistochimie représentative de la détection d'IDO1 sur des coupes en paraffine dans les différents segments S2, S3 et S5 de la tête d'épididyme de souris sauvage.

I. Expression de l'enzyme IDO1 dans l'épididyme de souris sauvages et de souris KO *Ido1*^{-/-}

1. La protéine IDO1

L'analyse immunocytochimique (voir Fig. R1) confirme qu'IDO1 est exprimée dans l'épididyme de souris sauvages (souche BALB/c) postérieurement au segment initial (S1) de la tête de l'épididyme. Cette expression démarre à partir du segment 2 (S2), est maximale dès le segment 3 (S3) et s'atténue ensuite après le segment le plus distal de la tête de l'épididyme (segment 5). On note une expression mosaïque dans l'épithélium épидидymaire, puisque toutes les cellules sur un même plan de section ne sont pas marquées de façon uniforme (voir détail sur Fig. R2). IDO1 a une localisation cytoplasmique dans les cellules épithéliales de ces segments (cellules principales et cellules apicales) et n'est pas détectée dans la lumière du tubule épидидymaire. IDO1 n'est donc pas une protéine abondamment sécrétée par l'épithélium épидидymaire.

2. Les transcrits d'IDO1

Deux transcrits sont connus pour l'enzyme IDO1, respectivement dénommées IDO1-T1 et IDO1-T2. La figure R3 montre que ces deux transcrits sont exprimés dans la tête de l'épididyme des animaux sauvages et que ces deux transcrits ne sont plus détectés chez les animaux KO pour IDO1. L'accumulation des deux transcrits augmente durant l'ontogenèse post-natale et atteint un maximum autour de la maturité sexuelle (autour de 30 jours, voir Fig. R4). Afin de vérifier si l'arrivée des spermatozoïdes dans l'épididyme à la maturité sexuelle conditionne l'expression d'IDO1, nous avons inhibé la spermatogenèse par le traitement de souris sauvages mâles âgées de 20 jours par le busulfan. Ce dernier bloque la méiose des cellules germinales sans affecter l'activité sécrétoire des cellules de Sertoli. Nous avons constaté que le traitement au busulfan diminue significativement l'accumulation des transcrits d'IDO1 à 30 jours comparé aux animaux contrôles traités par le DMSO et aux animaux contrôles non traités (Fig. R5)

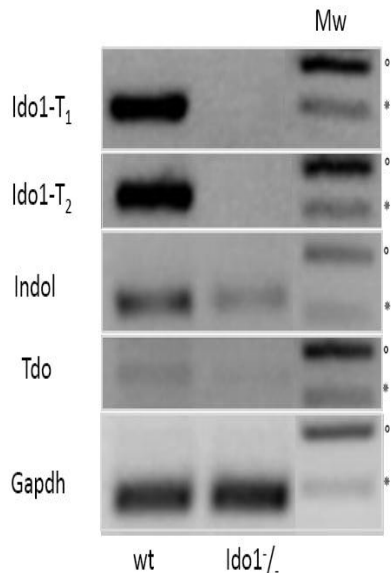


Figure R3 : Evaluation par RT-PCR semi-quantitative de l'abondance des transcrits 1 et 2 d'IDO1, (Ido1-T₁ et Ido1-T₂), de l'INDOL et de TDO dans la tête d'épididyme de souris sauvage (WT) et de souris KO pour IDO1 (Ido1^{-/-}).

Les symboles dans la marge droite identifient les bandes à 400 pb (°) et à 200 pb (*) du marqueur de poids moléculaire utilisé comme référence.

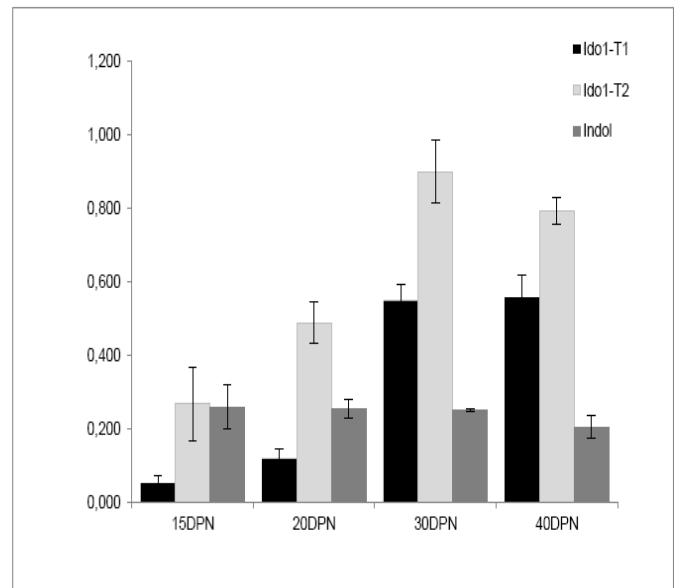


Figure R4 : Evaluation par RT-PCR semi-quantitative de l'abondance des transcrits 1 et 2 d'IDO1, (Ido1-T₁ et Ido1-T₂) et de l'INDOL dans la tête d'épididyme de souris sauvage (WT) au cours de l'ontogenèse post-natale de l'épididyme à 15, 20, 30 et 40 jours. Souris mâles âgées de 6 mois, n=3. Le niveau de transcrits donné sur l'axe des ordonnées est présenté en unité arbitraire normalisée par la mesure de l'expression d'un gène de ménage (GAPDH).

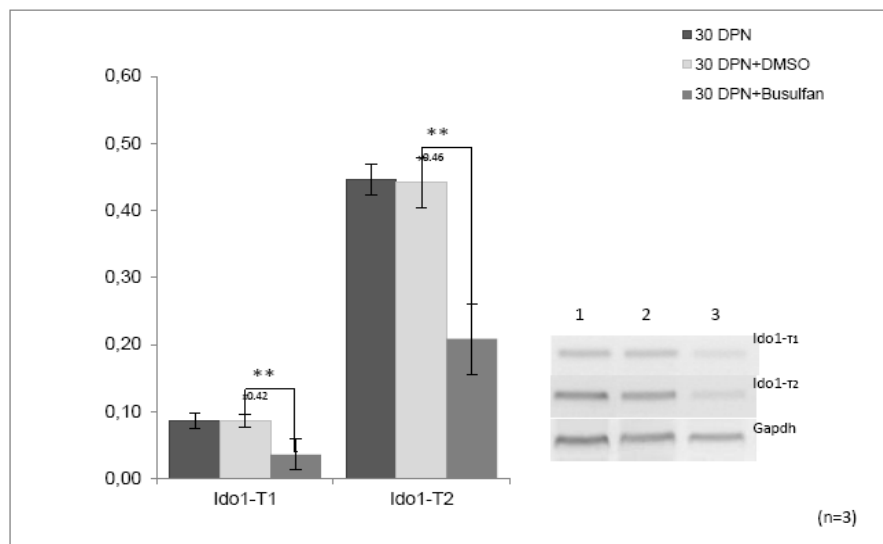


Figure R5 : Evaluation par RT-PCR semi-quantitative de l'abondance des transcrits 1 et 2 d'IDO1, (Ido1-T₁ et Ido1-T₂) et de l'INDOL dans la tête d'épididyme de souris sauvages (WT) au cours de l'ontogenèse post-natale de l'épididyme à 15, 20, 30 et 40 jours. Souris mâles âgées de 6 mois, n=3. Le niveau de transcrits donné sur l'axe des ordonnées est présenté en unité arbitraire normalisée par la mesure de l'expression d'un gène de ménage (GAPDH).

suggérant ainsi que l'expression d'IDO1 est associée à l'arrivée des gamètes mâles dans le tubule épидидymaire.

3. Expression des autres enzymes du catabolisme du tryptophane dans l'épididyme murin des animaux sauvages et chez les KO

Les enzymes catabolisant le tryptophane comme, l'enzyme sœur d'IDO1, l'INDOL, (aussi nommée IDO2, Baban et *al.*, 2004), issue d'un événement de duplication du gène IDO1, et la tryptophane 2,3-deshydrogénase (TDO, Britan et *al.*, 2006) sont aussi exprimées dans la tête de l'épididyme murin mais à des niveaux plus faibles qu'IDO1 (voir Fig. R3). Chez les animaux KO pour IDO1, l'absence d'expression d'IDO1 n'est pas compensée transcriptionnellement par l'augmentation de l'accumulation des transcrits TDO et INDOL. En accord avec les observations rapportées par Baban et *al.*, (2004), on peut remarquer que l'expression de l'INDOL semble être même moins importante chez les animaux KO pour IDO1. Cet effet a été attribué à la proximité des gènes IDO1 et INDOL dans le génome murin et à leur association fonctionnelle. En effet, IDO1 et INDOL partagent des séquences régulatrices communes et il a été montré que la construction *Ido1* mutée induit une dérégulation de l'expression de INDOL (Baban et *al.*, 2004). En conclusion, nous montrons ici que TDO et INDOL ne compensent pas transcriptionnellement la perte d'expression d'IDO1 chez les animaux mutés. Des travaux antérieurs (Britan et *al.*, 2006) avaient par ailleurs montré que la protéine TDO est localisée, dans l'épididyme murin, au niveau des cellules musculaires lisses pérítubulaires ainsi qu'au niveau des gamètes dans la lumière du tubule. En accord avec cette localisation spermatique, l'expression testiculaire de TDO et sa localisation aux spermatides allongées avaient pu être mises en évidence (Britan et *al.*, 2006). TDO n'est donc pas exprimée par l'épithélium épидидymaire.

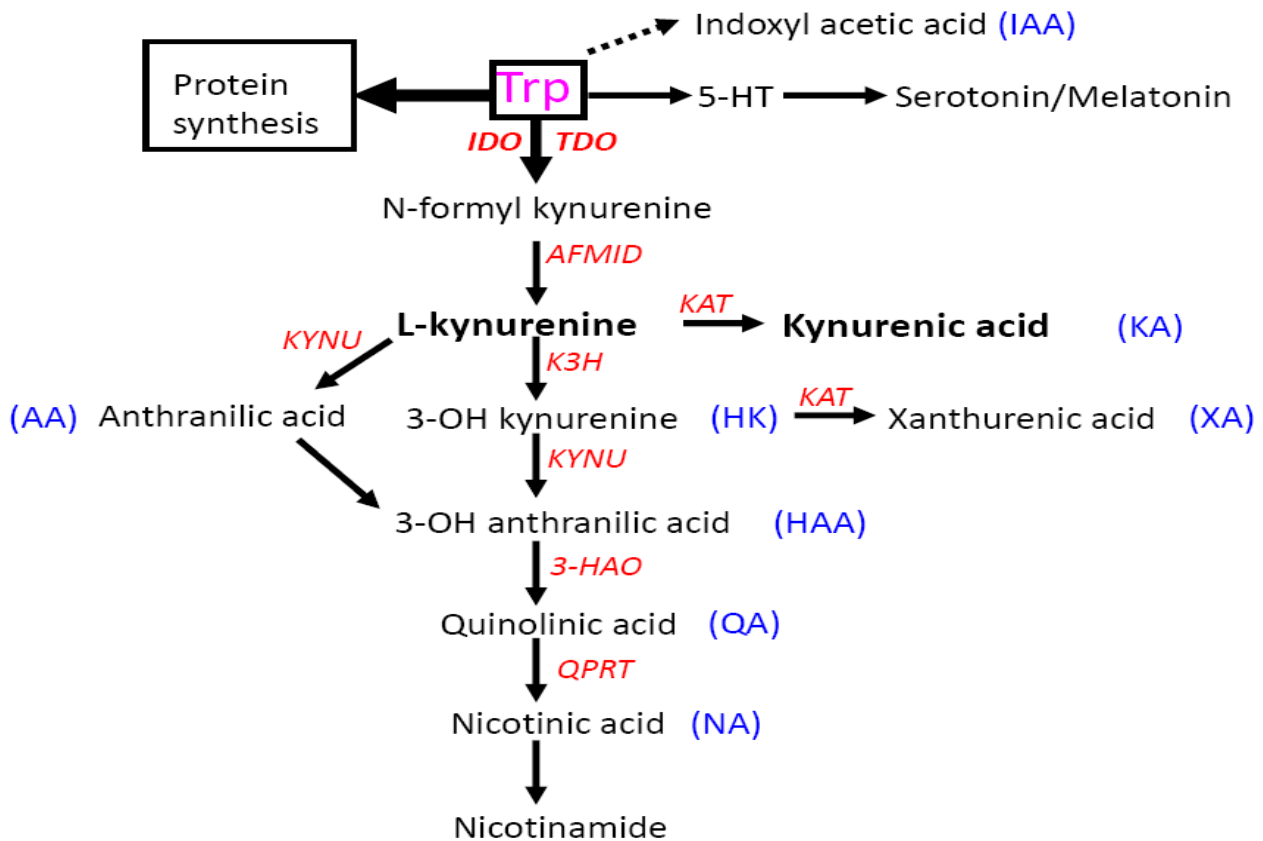


Figure R6 : Représentation schématique de la voie du catabolisme intracellulaire du tryptophane (Trp).

Brièvement, dans les cellules de mammifères le Trp est essentiellement utilisé pour la synthèse protéique. Dans une seconde voie d'utilisation le Trp rentre dans la synthèse des Kynurénines. La voie de synthèse des kynurénines donne naissance à divers métabolites (N-formyl kynurénine, L-kynurénine, acide kynurénique [KA], acide anthranilique [AA], 3-hydroxy kynurénine [HK], acide xanthurénique [XA], acide 3-hydroxy-anthranilique [HAA], acide quinolinique [QA], acide nicotinique [NA] et nicotinamides) en fonction de l'expression dans le tissu concerné des différentes enzymes (indiquées en rouge) intermédiaires dans la synthèse de ces composés. En dehors de la voie des kynurénines, le Trp est aussi le précurseur de la sérotonine et de la mélatonine. Enfin, une très faible proportion du Trp intracellulaire est utilisé pour produire des dérivés indoles tel que l'acide indoxyl-acétique [IAA]. Les noms étendus des enzymes sont: AFMID=formaminase, KAT aussi appelée (AADAT)=kynurénine amino transférase, KYN=kynuréninase, K3H aussi appelée KMO=kynurénine 3-hydroxylase et, 3HAO=3-hydroxy amino oxidase.

II. Evaluation de la voie des kynurénines chez les animaux sauvages et les animaux *Ido1*^{-/-}

1. Expression des enzymes de la voie des kynurénines

IDO1 est la première enzyme de la voie des kynurénines (voir Fig. R6) qui transforme le tryptophane en N-formyl kynurénine. Cet intermédiaire est ensuite métabolisé en différents produits selon la présence/absence des enzymes de la voie des kynurénines. De façon à évaluer cette voie des kynurénines dans l'épididyme murin nous avons quantifié l'expression des 4 premières enzymes de cette voie à l'aide d'une RT-PCR semi-quantitative dans les extraits d'ARN totaux des tissus de têtes d'épididyme (Fig R7). Il ressort de cette analyse que la tête de l'épididyme murin exprime les principales enzymes de la voie des kynurénines. Une rapide comparaison semi-quantitative des différentes amplifications révèle que l'arylformamidase (AFMID) et la kynurénine aminotransférase (KAT3) sont les enzymes les plus exprimées dans la tête de l'épididyme des souris sauvages. La kynuréninase (KYNase) et la kynurénine 3-hydroxylase (K3H) sont quant à elles exprimées à des niveaux plus faibles.

2. Accumulation des métabolites de la voie des kynurénines dans l'épididyme

a. Chez les animaux sauvages

La LC-ESI-MS/MS (voir Matériels & Méthodes) a été utilisée pour mesurer la concentration en tryptophane et dans les différents métabolites du tryptophane des extraits de têtes d'épididyme ainsi que dans les plasmas des animaux sauvages *wt* et des animaux *Ido1*^{-/-} (Tableau I et Fig. R8).

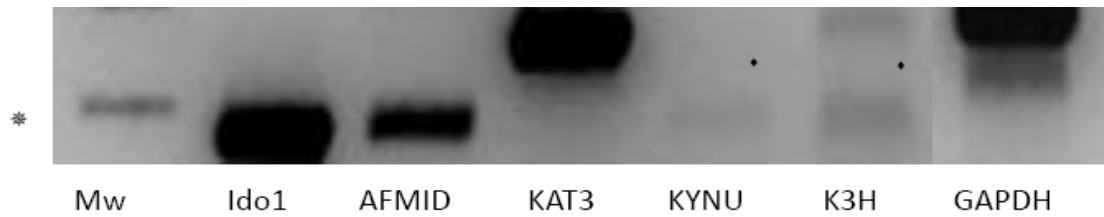


Figure R7 : Evaluation par RT-PCR semi-quantitative de l'abondance des transcrits des premières enzymes de la voie des kynurénines (AFMID, KAT3, KYNU et K3H) dans la tête d'épididyme de souris sauvage adulte (6 mois) par comparaison avec l'abondance des transcrits d'IDO1 et d'un gène de ménage (GAPDH). Les symboles dans la marge gauche identifient les bandes à 400 pb (°) et à 200 pb (*) du marqueur de poids moléculaire utilisé comme référence.

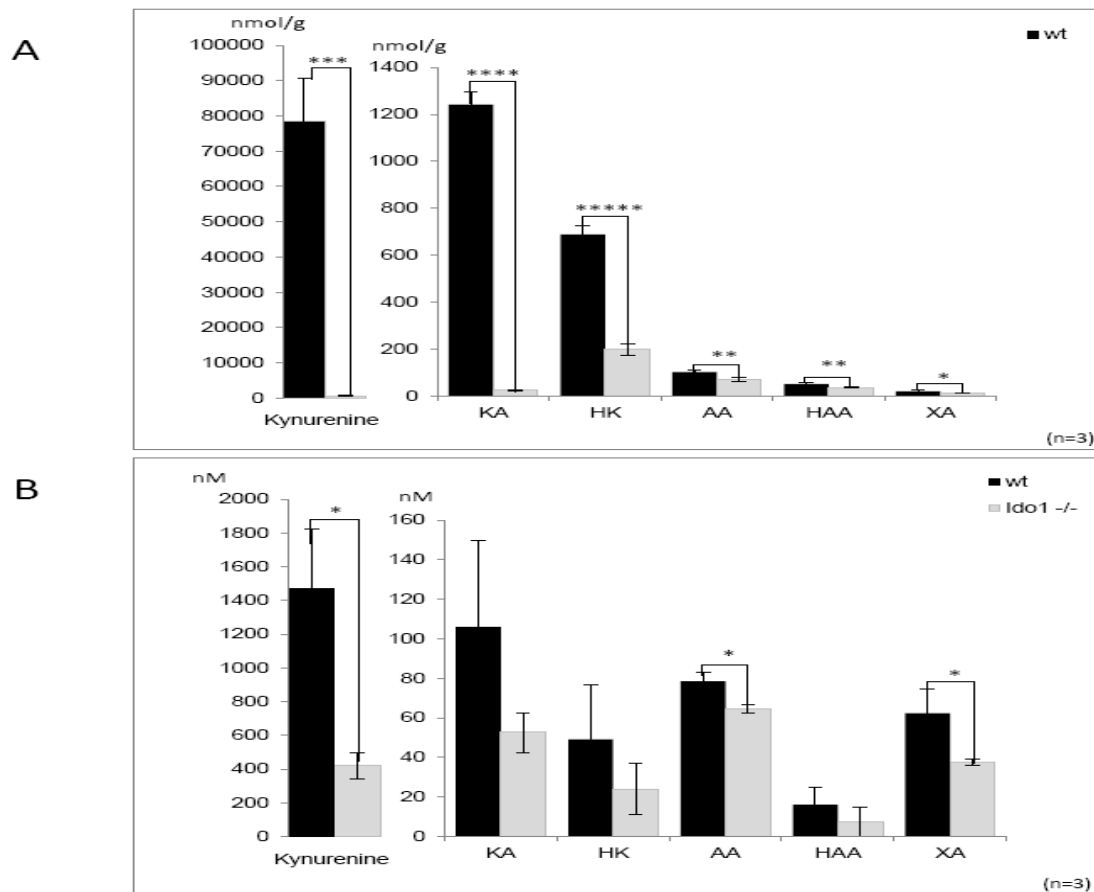


Figure R8 : Histogrammes présentant les concentrations en Trp et en métabolites de la voie des kynurénines dans des extraits tissulaires de têtes d'épididyme (A) et dans le plasma (B) de souris sauvages et KO pour IDO1. KA = acide kynurénique, KH=acide hydroxykynurénique, AA=acide anthranilique, HAA=acide hydroxyanthranilique; XA=acide xanthurénique. * p<0,05; **p<0,01; ***p<0.001; ****p<0,0001; *****p<0,00001.

Caput Epididymis		Trp	Kyn	KA	HK	AA	HAA	XA
WT	Mean	70.91	80547.23	1241.21	688.91	103.18	52.89	20.62
	SEM	1.14	12704.51	54.51	37.40	7.05	4.12	6.02
Ido1 ^{-/-}	Mean	174.03	680.06	25.30	198.17	70.14	36.98	12.87
	SEM	9.33	60.38	0.66	24.70	9.39	2.10	1.13
	Ratio	+2.45	-118.44	-49.06	-3.48	-1.47	-1.43	-1.60
plasma								
WT	Mean	50.68	1467.65	105.98	49.05	78.43	24.09	62.38
	SEM	7.82	356.11	43.52	27.52	4.58	4.97	12.40
Ido1 ^{-/-}	Mean	53.66	420.73	52.60	24.01	64.28	18.57	37.36
	SEM	10.15	79.65	9.99	13.17	2.15	2.91	1.60
	Ratio	+1.06	-3.49	-2.01	-2.04	-1.22	-1.30	-1.67

Tableau I : Quantification du Trp et des métabolites de la voie des kynurénines (par spectrométrie de masse) dans les têtes d'épididyme et les plasmas des animaux sauvages et KO pour IDO1.

Contrairement à des rapports antérieurs (concernant le rat cependant) qui avançaient que la concentration en tryptophane dans l'épididyme était particulièrement élevée (Hinton, 1980), dans l'épididyme murin la concentration en tryptophane n'est pas excessivement supérieure à celle enregistrée dans la circulation. En accord avec l'expression constitutive d'*Ido1* dans la tête de l'épididyme chez la souris, la L-kynurénine a été trouvée très abondante dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux sauvages. La concentration en L-kynurénine trouvée dans l'épididyme dépasse très largement la concentration en ce métabolite dans le plasma. En ce qui concerne les dérivés de la L-kynurénine, l'acide kynurénique (KA) et l'hydroxy-kynurénine (HK) sont, respectivement, la deuxième et la troisième kynurénines les plus abondantes dans la tête de l'épididyme des animaux sauvages. Là encore, les concentrations épидидymaires en ces deux métabolites dépassent largement les concentrations plasmatiques. Il est à noter que ces résultats sont en accord avec le fait que les enzymes qui conduisent à ces métabolites (AFMID et KAT3) sont les enzymes les plus exprimées dans l'épididyme murin (voir paragraphe ci-dessus).

L'acide anthranilique (AA), l'acide hydroxyanthranilique (HAA) et l'acide xanthurénique (XA) sont aussi présents dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux sauvages mais à des concentrations faibles et similaires à celles enregistrées dans les plasmas. Les concentrations en acide quinolinique (QA) et en acide nicotinique (NA) dans les extraits

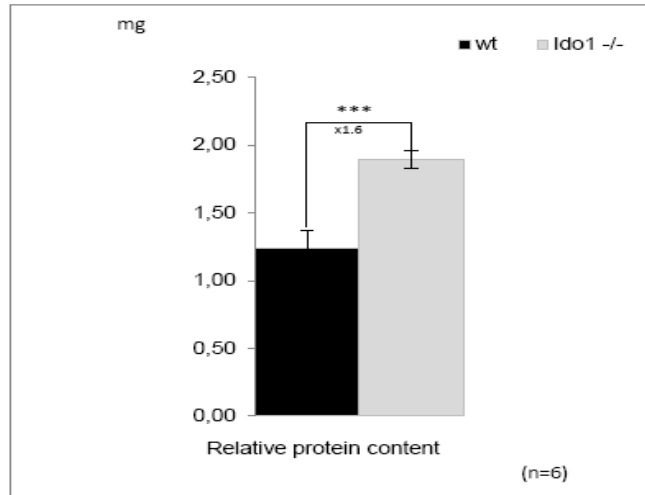


Figure R9 : Histogrammes présentant les concentrations relatives en protéines dans les extraits de têtes d'épididyme de souris sauvages et de souris KO pour IDO1. Souris mâles âgées de 6 mois. Les poids moyens des têtes d'épididymes utilisées n'ont pas été trouvés statistiquement différents entre les animaux sauvages et les animaux KO pour IDO1 (20,17+/-0,87 mg versus 19,37+/-1,87 mg). *** $P \leq 0.001$.

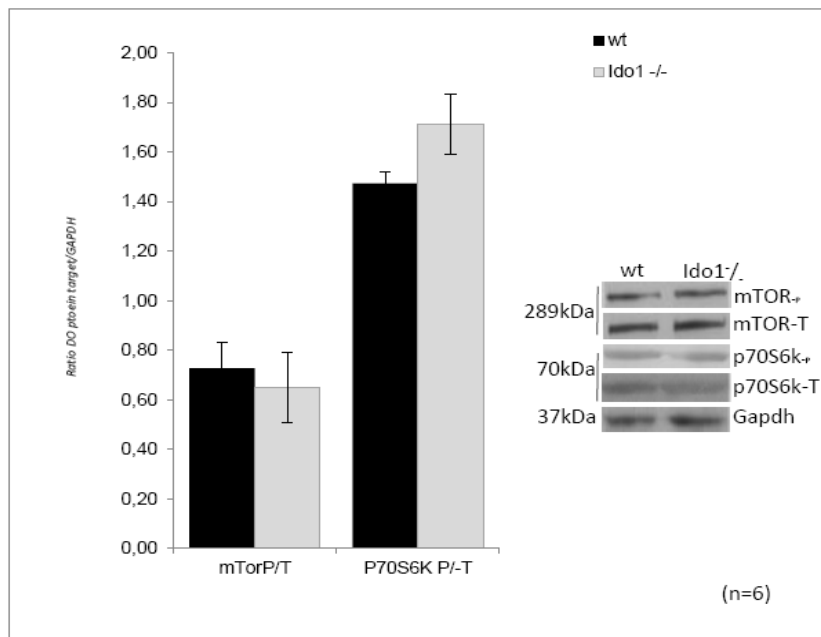


Figure R10 : Western blot représentatif montrant le niveau de protéine (mTOR-T) et de protéine mTOR phosphorylée (mTOR-P) ainsi que du couple p70S6K total (p70S6K-T) /p70S6K phosphorylée (p70S6K-P). L'immunodétection de la GAPDH a été utilisé comme standard interne. L'histogramme à gauche montre le ratio mTOR-T/mTOR-P ainsi que p70S6K-T/p70S6K-P trouvés dans les extraits de têtes d'épididyme de souris sauvages et de souris KO pour IDO1. Aucune variation significative n'a été observée.

de tête d'épididyme et dans les plasmas sont en dessous des limites de détection de la méthode MS/MS employée révélant que ces espèces sont peu représentées dans l'épididyme des souris sauvages (non illustré).

b. Chez les animaux *Ido1*^{-/-}

Des mesures identiques du tryptophane et de ses métabolites ont été réalisées chez les animaux *Ido1*^{-/-}. La perte de l'activité IDO1 s'accompagne d'une élévation de la concentration en Trp (x 2,5) dans les extraits épидидymaires alors que cela n'est pas le cas dans les plasmas (voir tableau I). Pour ce qui concerne les kynurénines, comme le montre les valeurs dans le tableau I et la figure 8A, on enregistre une chute importante des niveaux de L-KYN (>100 x moins) ainsi que de KA (50 x moins) dans la tête de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}.

Ces résultats démontrent qu'IDO1 est l'enzyme principale de transformation du tryptophane dans l'épididyme murin. Comme le suggérait l'absence de compensation transcriptionnelle des autres enzymes qui utilisent le Trp (TDO et INDOL) dans le fond *Ido1*^{-/-} (voir ci-dessus), on note qu'il n'y a pas non plus, dans l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}, de compensation traductionnelle ou d'intervention d'autres enzymes pour produire les différentes kynurénines épидидymaires.

Ainsi, en absence d'IDO1 les concentrations en kynurénines s'effondrent dans l'épididyme murin.

III. Influence de la perte d'activité d'IDO1 sur les autres voies d'utilisation du tryptophane dans l'épididyme des souris *Ido1*^{-/-}

1. Les voies de production de l'acide indoxylacétique et de la sérotonine/mélatonine

Nous avons vu ci-dessus que l'absence d'expression d'IDO1 provoque une augmentation d'environ 2.5 fois de la concentration en tryptophane libre dans la tête de l'épididyme. En dehors de la voie des kynurénines, le Trp intracellulaire peut être utilisé pour la génération d'autres dérivés comme l'acide indoxylacétique, (IAA), la sérotonine et la mélatonine (voir fig R6). Nous nous sommes donc demandé si en absence de

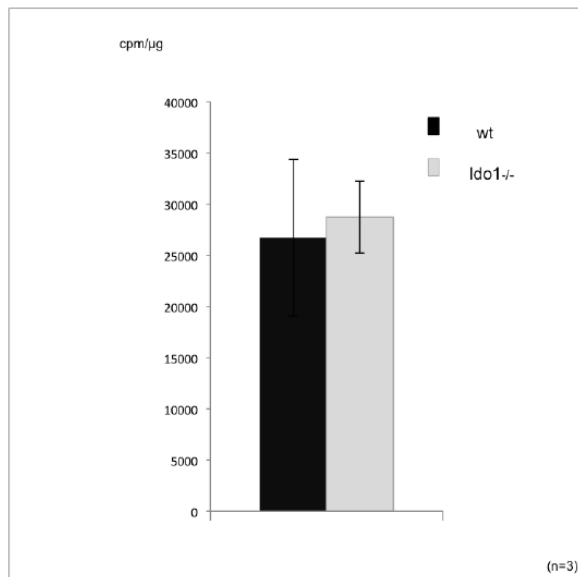


Figure R11 : Evaluation de la synthèse protéique dans les épидидymes de souris sauvages (WT) et KO pour IDO1 (*Ido1*^{-/-}) par incorporation de méthionine-S35 en cultures organotypiques.

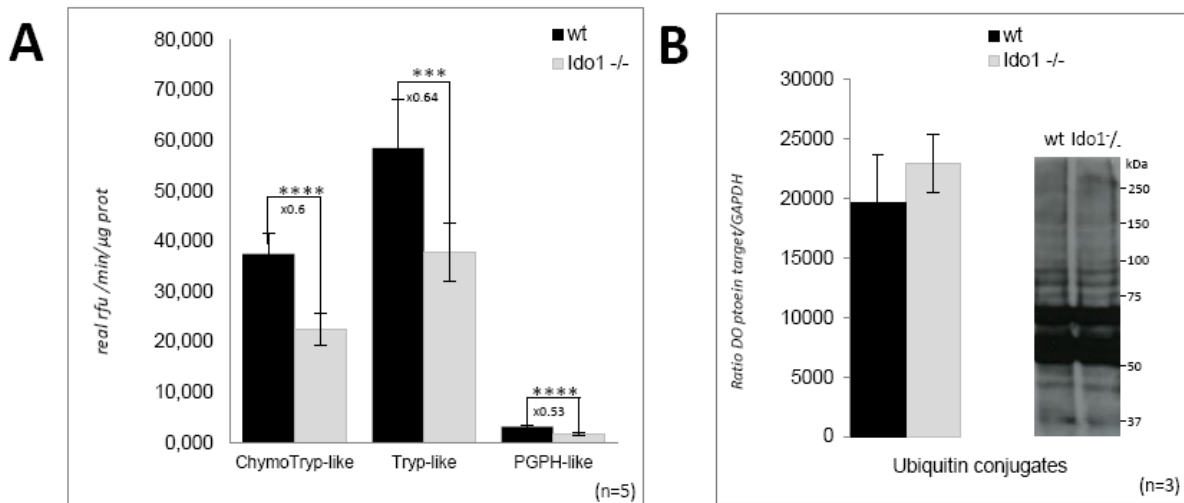


Figure R12 : Evaluation de l'activité du système de dégradation protéique cellulaire protéasome/ubiquitine-dépendant. **A**: Histogramme présentant les mesures des activités peptidasiques chymotrypsine-like, trypsine-like et PGPH-like du protéasome dans les extraits protéiques de têtes d'épididyme de souris sauvages (WT) et KO pour IDO1 (*Ido1*^{-/-}). **B**: Histogramme présentant le niveau de protéines poly-ubiquitinylées trouvées dans les extraits protéiques de têtes d'épididyme de souris sauvages (WT) et ko pour IDO1 (*Ido1*^{-/-}). *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$.

fonctionnement de la voie des kynurénines, on enregistrait, dans la tête de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}, des différences dans le fonctionnement des autres voies d'utilisation du tryptophane. Comme il est illustré dans le tableau II, l'augmentation de la concentration en Trp dans les extraits de tête d'épididyme n'a pas d'impact significatif sur l'abondance de l'IAA.

Caput Epididymis		IAA	Serotonin	Meltonine
WT	Mean	133.75	1708.40	9.80
	SEM	9.18	355.20	0.69
Ido1 ^{-/-}	Mean	140.92	2382.83	11.07
	SEM	16.90	641.70	0.53
	Ratio	+1.05	+1.39	+1.13

Tableau II : dosage des métabolites des voies annexes d'utilisation du Trp par spectrométrie de masse MS/MS. Données en Nmol/g, +/- SEM. (n=3).

En ce qui concerne la voie de la sérotonine, nous avons enregistré une augmentation significative de la concentration en sérotonine dans les extraits épидидymaires des animaux *Ido1*^{-/-} qui n'est pas accompagnée d'une augmentation significative de la concentration en mélatonine.

2. La synthèse protéique

Dans toute cellule, la voie majeure d'utilisation des acides aminés est la synthèse protéique (voir fig. R6). Le Trp est l'acide aminé essentiel le moins représenté dans la plupart des tissus et donc, de fait, souvent l'acide aminé limitant dans la synthèse protéique. Nous nous sommes donc demandé si l'augmentation de la concentration en Trp dans les extraits de tête d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} n'était pas suivie d'une augmentation de la synthèse protéique.

Une première approche simple pour évaluer l'activité de synthèse protéique des tissus épидидymaires a consisté à évaluer les contenus en protéines de têtes d'épididyme d'animaux sauvages et d'animaux *Ido1*^{-/-}. Nous avons ainsi observé que, corrigées du poids de l'organe, les quantités de protéines des têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} sont significativement plus élevées comparées aux animaux contrôles (Fig. R9). Cette

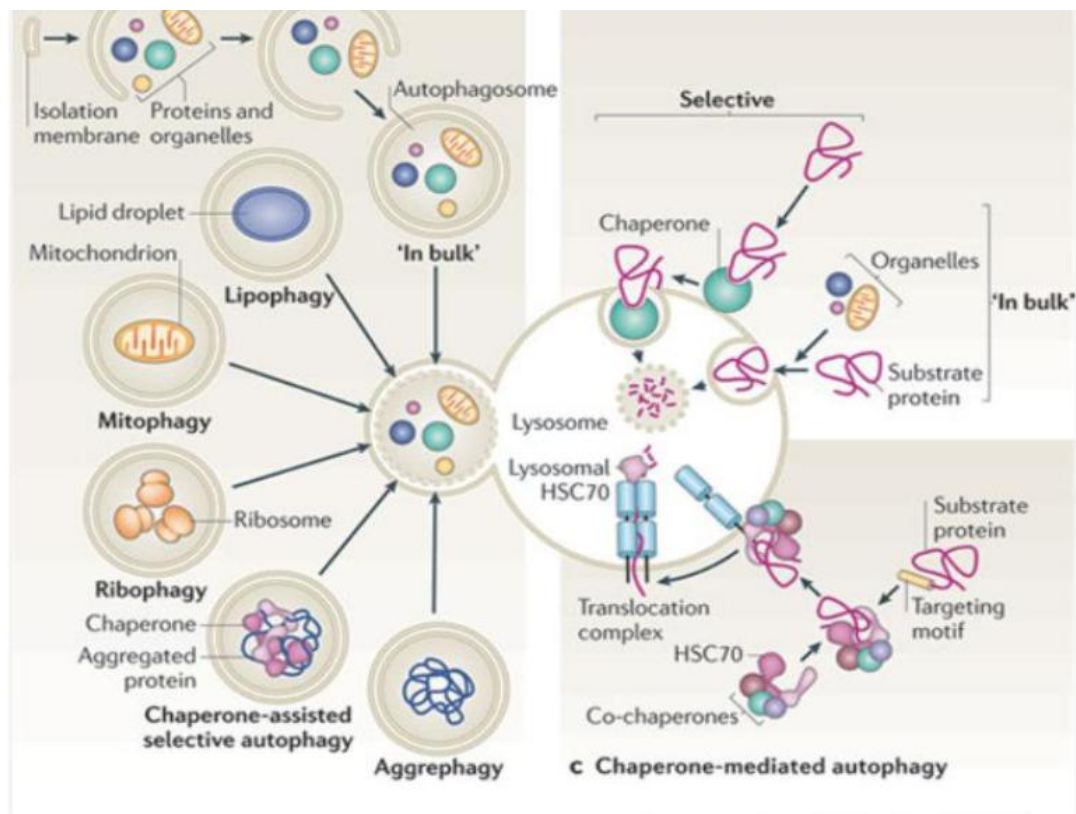


Figure R13 : Présentation schématique des différents aspects des voies de la dégradation protéique intracellulaire selon la voie lysosomale (D'après Cuervo *et al*, 2011).

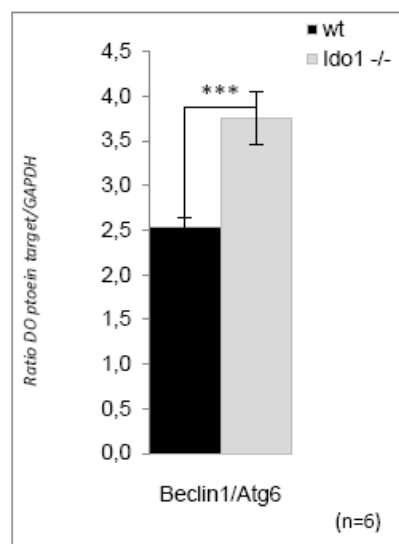


Figure R14: Histogramme présentant une évaluation de la quantité de protéine Beclin1/ATG6, un marqueur précoce de la voie autophagique trouvée par western-blot dans les extraits protéiques de têtes d'épididyme de souris sauvages (WT) et KO pour IDO1 (*Ido1*^{-/-}). Souris mâles âgées de 6 mois. *** $P \leq 0.001$

augmentation du contenu protéique n'est pas due à un élargissement/accroissement de la tête d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} car les poids moyens des tissus ne sont pas statistiquement différents chez les animaux *Ido1*^{-/-} versus les animaux sauvages (non illustré).

Des approches histologiques (marquage nucléaire au DAPI) et immunocytochimiques *via* l'utilisation d'anticorps anti-marqueurs de prolifération cellulaire (Ki67 ou/et PCNA) ont été réalisées et ont confirmé que l'augmentation de la quantité de protéines dans les têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} n'est pas due non plus à un accroissement du contenu cellulaire ou de la prolifération cellulaire (non illustré). Dans une seconde approche plus moléculaire nous avons cherché à évaluer si le surplus de Trp disponible dans les tissus épидидymaires des animaux *Ido1*^{-/-} pouvait conduire à la stimulation de la synthèse protéique dans les épидидymes des animaux *Ido1*^{-/-} versus les animaux sauvages.

La voie mTOR/p70S6 Kinase (p70S6K) qui est stimulée (par phosphorylation) lors d'une biodisponibilité accrue en acides aminés (Avruch et *al.*, 2001 ; Kimball, 2001 ; Nobukuni et *al.*, 2005) a ainsi été mesurée dans les extraits épидидymaires *via* l'utilisation d'anticorps anti-mTOR phosphorylée et anti-p70S6K phosphorylée, une cible directe de mTOR. Nous montrons dans la figure R10, que ni la phosphorylation de mTOR, ni celle de la p70S6K ne changent dans les extraits épидидymaires de têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} comparés aux animaux sauvages. Ces résultats suggèrent que la synthèse protéique n'est pas augmentée dans les têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} malgré une biodisponibilité accrue en tryptophane.

Afin de confirmer d'une manière différente que l'augmentation de la synthèse protéique n'est pas responsable de l'élévation du contenu protéique enregistré dans les têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}, nous avons effectué des essais d'incorporation de méthionine-[³⁵S] en cultures organotypiques de têtes d'épididyme d'animaux sauvages et d'animaux *Ido1*^{-/-}. Les données présentées dans la figure R11 montrent que le taux d'incorporation du traceur n'est statistiquement pas différent entre les animaux sauvages et les animaux *Ido1*^{-/-}.

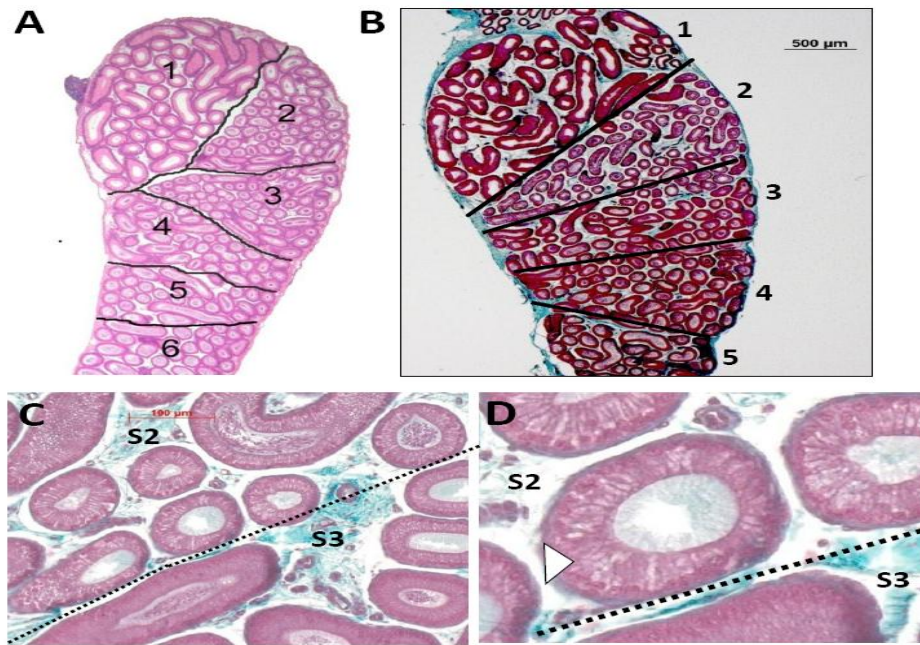


Figure R15: L'absence d'IDO1 provoque l'apparition d'un phénotype tissulaire localisé dans le segment 2 de la tête de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 (panneau B). A plus fort grossissement (x 20 et x 40, panneaux C et D, respectivement) on remarque l'abondance de vésicules intracellulaires de faible réfringence dans l'épithélium des tubules du segment 2. Le trait pointillé marque la présence de la cloison conjonctive ou septum qui sépare le segment 2 du segment 3. La tête de flèche ouverte souligne le phénotype. Les sections présentées correspondent à des sections de têtes d'épididyme de souris sauvages (WT en A) et KO pour IDO1 (*Ido1*^{-/-}, de B à D) de souris mâles âgés de 6 mois.

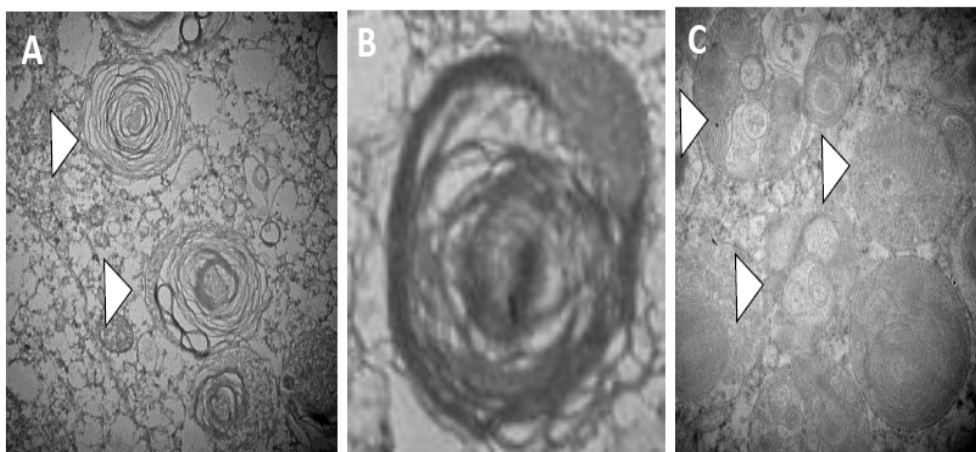


Figure R16: L'absence d'IDO1 provoque l'apparition d'un phénotype tissulaire localisé dans le segment 2 de la tête de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 ayant les caractéristiques de manifestations autophagiques. Les panneaux A à C correspondent à des photographies de microscopie électronique à transmission (grossissement: X 40.000 en A, x 50.000 en B et x 15.000 en C) montrant des structures multi-lamellaires (en A et B) et pluri-vésiculaires (en C) typiques identifiés classiquement dans le cytoplasme de cellules en processus d'autophagie. Les photographies présentées correspondent à des

Le contenu en protéines cellulaires ou tissulaires est le résultat d'une balance entre la synthèse protéique et la dégradation protéique. Puisque la synthèse protéique ne semble pas être augmentée dans les têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} nous avons alors cherché à savoir si l'augmentation du contenu en protéines observée dans les têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} ne pouvait pas être due, *a contrario*, à une baisse des événements de dégradation protéique. Les deux voies cellulaires majeures responsables de la dégradation protéique sont représentées par le système ubiquitine/protéasome et l'activité du compartiment lysosomal. En premier lieu, nous avons évalué l'activité du système ubiquitine/protéasome dans les échantillons de têtes d'épididyme *via* la mesure des activités enzymatiques associées au protéasome 26S.

Comme le montre les résultats présentés figure R12A, les activités chymotrypsine-like, trypsine-like et peptidyl-glutamyl peptide hydrolase (PGPH) sont diminuées de façon très significative (environ 40% chacune, $P < 0.001$) dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} comparés aux animaux sauvages. Cette diminution de l'activité du protéasome n'est pas accompagnée d'une diminution de l'ubiquitylation puisque les quantités de conjugués polyubiquitynilés restent inchangées dans les échantillons de tête d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} par rapport aux échantillons des animaux sauvages (fig. R12B).

Dans certains types cellulaires, la voie lysosomale peut compenser la dégradation protéique ubiquitine/protéasome-dépendante lorsque celle-ci fait défaut. Nous nous sommes donc demandé si dans notre contexte KO, la voie lysosomale ne serait pas activée afin de compenser un protéasome déficient dans la tête de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}. La voie lysosomale est complexe, elle inclut la macro-autophagie, la micro-autophagie et la « chaperone-mediated »-autophagie (fig. R13). Dans la figure R14, nous montrons que des processus autophagiques sont déclenchés dans la tête de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} car une des protéines précoce de l'autophagie, la protéine béclin-1/ATG6 (pour early AuTophagy-related ; ATG genes ; Cao & Klionsky, 2007), est trouvée surexprimée dans la tête de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} comparés aux animaux sauvages. L'autophagie endosomale ou lysosomale est le plus souvent accompagnée de modifications cellulaires. Nous avons alors utilisé la

	CAPUT	PLASMA	
	KYN/Trp	KYN/Trp	<i>caput vs plasma</i>
<i>WT</i>	1.14	0.03	38
<i>Ido^{-/-}</i>	0.004	0.008	0.5
<i>Ido^{-/-} vs WT</i>	-285	-3.75	

Figure R17: Evolution du ratio kynurénine/tryptophane (ratio K/T) un indicateur de l'inflammation et de l'engagement d'une réponse immunosuppressive dans les extraits de têtes d'épididyme et dans les plasmas de souris WT et KO pour IDO1. Souris âgées de 6 mois.

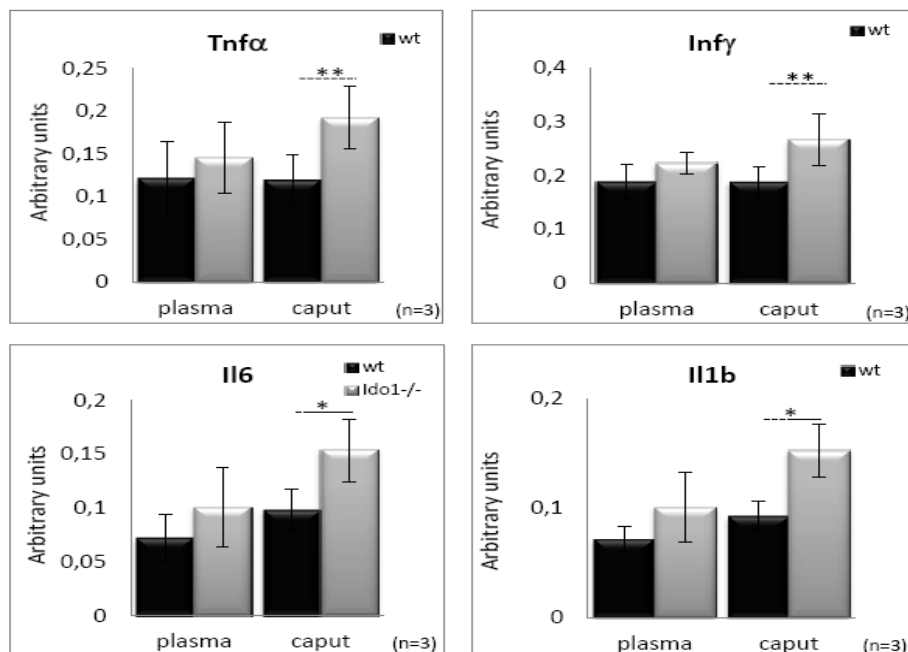


Figure R18: Evolution des concentrations en cytokines inflammatoires (TNF- α , INF- γ , IL-6 et IL-1 β) dans les extraits de têtes d'épididyme et dans les plasmas de souris WT et KO pour IDO1. Souris âgées de 6 mois. Immuno-Elisa réalisés *via* un cytokine/chemokine antibody array commercial (RayBiotech, Inc). *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01.

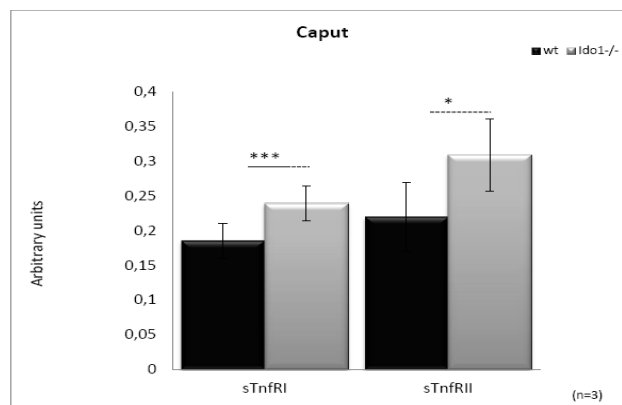


Figure R19: Evolution des concentrations en récepteurs solubles sTnfR1 et sTnfR2 dans les extraits de têtes d'épididyme de souris WT et KO pour IDO1. Souris âgées de 6 mois. Immuno-Elisa réalisés *via* un cytokine/chemokine antibody array commercial (RayBiotech, Inc). *P ≤ 0.05; ***P ≤ 0.001.

microscopie photonique et la microscopie électronique pour comparer les tissus de têtes d'épididyme d'animaux sauvages et d'animaux *Ido1*^{-/-}. Comme le montre la figure R16 (A-D), l'absence d'IDO1 conduit à l'apparition d'un phénotype localisé au niveau du segment 2 de la tête de l'épididyme des animaux KO. Ce phénotype tissulaire est caractérisé par la présence de larges vésicules intra-cytoplasmiques qui ne sont pas ou peu visibles dans les autres sections de la tête de l'épididyme. La microscopie électronique à transmission réalisée sur le segment S2 de la tête de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} (fig R16 A-C) révèle un taux plus élevé de corps multi-lamellaires et multi-vésiculaires comparé à des sections similaires chez les animaux sauvages. De telles structures subcellulaires sont connues comme des marques de processus autophagiques (Hariri et al., 2000).

Ainsi, l'absence d'expression et d'activité IDO1 dans la tête de l'épididyme des souris *Ido1*^{-/-} conduit à :

- un effondrement de la concentration en kynurénines dans le tissu épидидymaire,
- une réponse de stress du tissu épидидymaire basée sur une baisse très significative de l'activité du protéasome et un engagement de l'autophagie.

IV. Influence de la perte d'activité d'IDO1 sur l'état inflammatoire du tissu épидидymaire

1. Le ratio Kynurénine/Tryptophane

Le ratio KYN/TRP (K/T) est couramment utilisé pour évaluer l'activité IDO et, par extension, le statut inflammatoire ou/et immunosuppresseur d'un tissu ou d'un fluide biologique (Schröcksnadel et al., 2006). La figure R17 montre que le ratio K/T dans la tête de l'épididyme est 38 fois plus élevé qu'il ne l'est dans le plasma des mêmes animaux dans le fond sauvage. Ce niveau de ratio K/T est typique de ce que l'on peut enregistrer dans certains tissus ou types cellulaires en situations inflammatoires/infectieuses. Cette observation suggère donc que la tête de l'épididyme des animaux sauvages est dans un état inflammatoire (ou immunosuppresseur) particulier

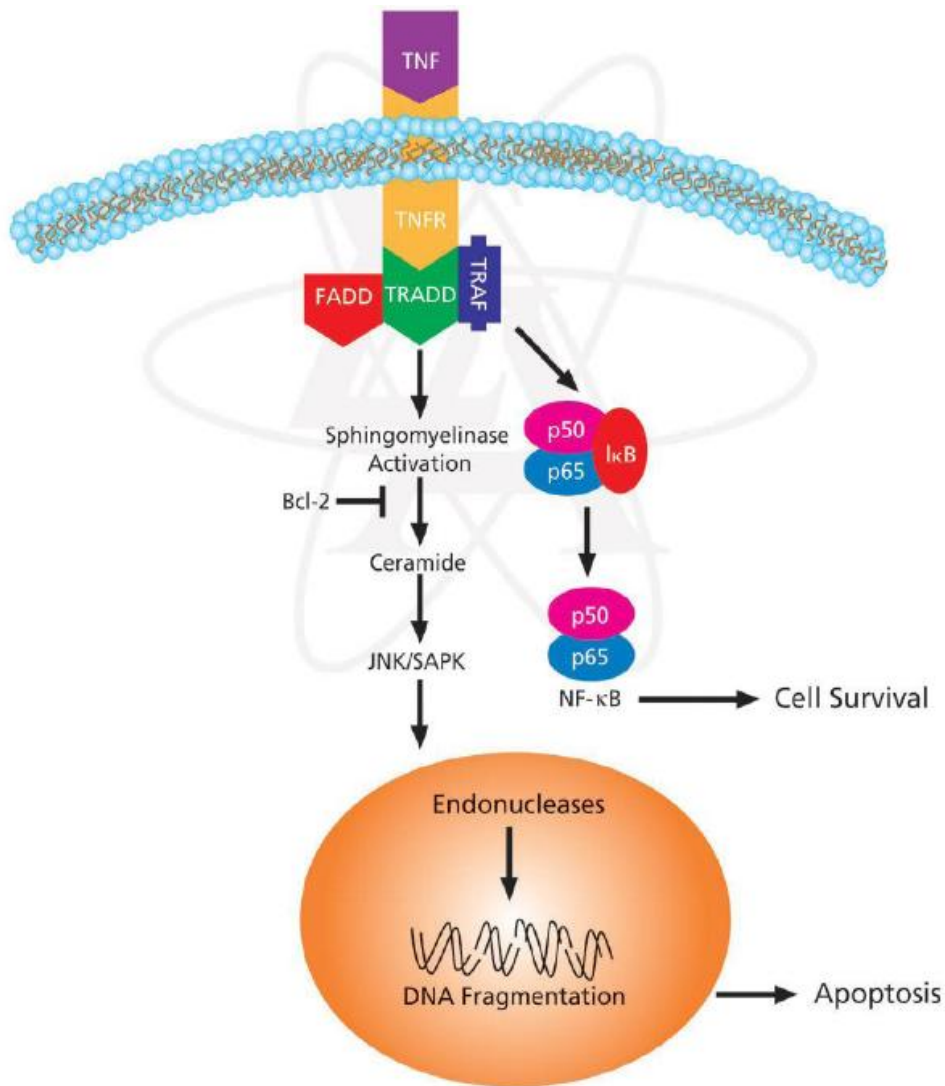


Figure R20 : La voie d'activation du TNF.

Quand le TNF se lie à son récepteur (TNFR) il provoque des signaux de régulation de la croissance cellulaire. TNF est mitogénique dans les cellules normales, cependant, TNF peut aussi initier un programme apoptotique dans les cellules transformées conduisant à la fragmentation de l'ADN et à la cytolysse. Des études fonctionnelles ont identifié une région conservée dans le récepteur au TNF, appelée le domaine de mort, impliquée dans une interaction protéine/protéine qui est nécessaire pour transmettre le signal apoptotique. La voie de survie induite par le TNF est, quant à elle, contrôlée par le facteur de transcription NF- κ B.

L'activation de NF- κ B se fait *via* la phosphorylation de I κ B sur les résidus Ser32 et Ser36, résultant en la dissociation et la re-localisation nucléaire de la forme active de NF- κ B. Des études récentes ont montré que des cellules dans lesquelles la voie de NF- κ B est bloquée sont plus prône à rentrer en apoptose en réponse au TNF. Ainsi, la disponibilité en NF- κ B peut jouer un rôle important dans la capacité qu'a le TNF à agir comme un inducteur d'apoptose et un agent anti-tumoral (D'après, Plumpe *et al.*, 2000 ; Pimentel-Muinos & Seed, 1999 ; Schwandner *et al.* ; 1998).

TNFR :TNF Receptor, TRADD:Tumor necrosis factor receptor type1, FADD: Fas-Associated protein with Death Domain, TRAF :TNF receptor associated factor, JNK: c-Jun N-terminel kinase, SAPK :stress -activated protein kinase,

mais physiologique. Chez les animaux *Ido1*^{-/-}, la situation est presque totalement inversée puisque le ratio K/T de la tête de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} n'est pas très différent du ratio K/T enregistré dans le plasma de ces mêmes animaux (0,004 versus 0,008). Ainsi, la perte d'activité IDO1 et la perte associée de production de kynurénines dans la tête de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} a grandement (x 285) déplacé l'équilibre inflammatoire particulier de l'épididyme. Dans le plasma, probablement à cause des activités redondantes de l'INDOL et de la TDO hépatique, la perte d'IDO1 ne modifie que très peu le ratio K/T comparativement à l'épididyme.

2. Analyse de l'état inflammatoire du tissu épидидymaire dans le fond sauvage et *Ido1*^{-/-}

a. Les cytokines classiques de l'inflammation

Pour évaluer le statut inflammatoire de la tête de l'épididyme chez les animaux sauvages et les animaux *Ido1*^{-/-}, nous avons mesuré dans les extraits épидидymaires et dans les plasmas des animaux *Ido1*^{-/-} et des animaux sauvages le profil d'expression de différentes cytokines/chémokines inflammatoires en utilisant des « antibody cytokines /chemokines array » commerciaux (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA). Ces derniers autorisent des mesures qui ont le niveau de précision de tests ELISA. La figure R18 montre clairement que la perte d'IDO1 modifie l'équilibre inflammatoire du tissu épидидymaire puisque celle-ci s'accompagne d'une élévation significative des cytokines pro-inflammatoires classiques (TNF- α , INF γ , IL-6 et IL-1 β).

Cette situation est particulière à l'épididyme puisque la perte d'IDO1 n'est pas suivie de l'élévation systémique de ces mêmes marqueurs. IDO1 participe donc à l'équilibre inflammatoire du tissu épидидymaire en exerçant un effet anti-inflammatoire et/ou immunosuppresseif. Cet état plus inflammatoire des têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 est aussi avéré par l'observation que les concentrations en récepteurs solubles au TNF (sTNF-R1 et sTNF-R2) sont plus abondantes dans les extraits épидидymaires des animaux KO comparés aux animaux sauvages (fig. R19). De façon classique, dans le cadre d'une réponse anti-inflammatoire ces formes solubles du récepteur au TNF sont surexprimées pour limiter l'inflammation induite par le TNF.

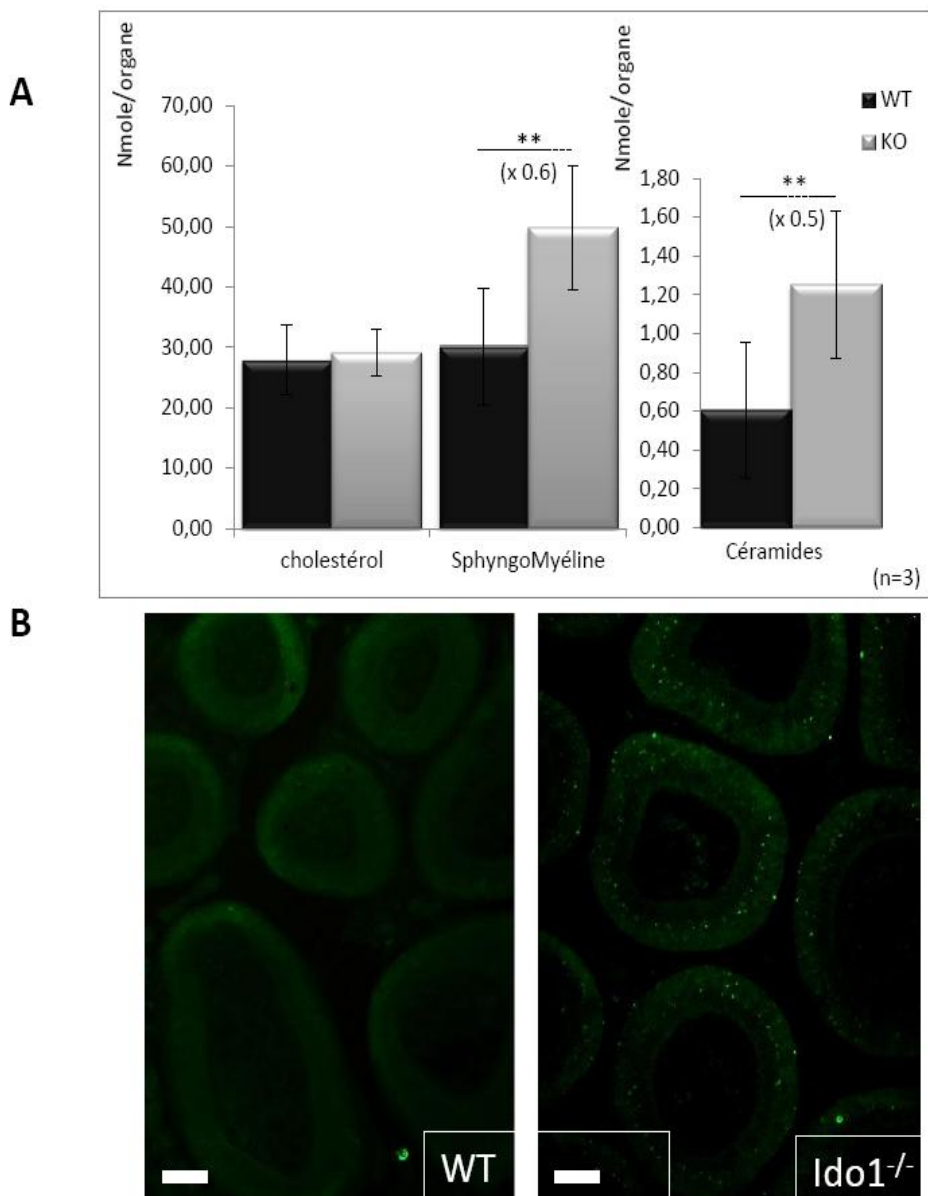


Figure R21 : Voie d'activation du TNF.

A: Evaluation du contenu en sphingomyélines et céramides dans des extraits de têtes d'épididyme de souris mâles âgés de 6 mois sauvages ou KO pour IDO1. Les données sont présentées en nanomole/organe corrigées du poids de l'organe. Une évaluation de la quantité de cholestérol présente dans les échantillons est donnée comme standard interne. Les animaux KO pour IDO1 montrent une augmentation significative des céramides totaux et des sphingomyélines totales retrouvées dans les espèces moléculaires majeures (essentiellement C16 et C24, communication F. Terçé, plateau de lipidomique de Toulouse). $**P \leq 0.01$. **B:** Photographies d'immunofluorescences représentatives obtenues avec un anticorps anti-caspase 3 conjugué au FITC montrant que les cellules du segment 2 de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 sont engagées dans un processus apoptotique.

- **Activation de la voie TNF**

Classiquement, TNF *via* son récepteur TNFR induit des signaux régulateurs de la croissance cellulaire. Dans les cellules normales TNF est normalement mitogénique, cependant le TNF peut aussi initier un programme de mort cellulaire (apoptose) dans les cellules conduisant à la fragmentation de l'ADN nucléaire et à la cytolyse. Comme illustré dans la figure R20, la voie apoptotique met en œuvre la voie de signalisation des sphingolipides/céramides alors que la voie de survie passe par la translocation nucléaire du facteur NF- κ B. NF- κ B est un facteur de transcription, présent à l'état basal dans le cytoplasme de toutes les cellules. Il est capable de migrer rapidement dans le noyau cellulaire après activation de la cellule par des stimuli inflammatoires, infectieux, physiques ou chimiques. Lors de sa translocation nucléaire, NF- κ B se fixe sur l'ADN et induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la production de cytokines, chémokines et de molécules d'adhésion cellulaire participant ainsi à l'entretien de la réponse inflammatoire (voir pour revue : Lawrence, 2009).

- **Activation de NF- κ B**

Afin d'évaluer si la voie NF- κ B est activée dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1, nous avons tenté de mesurer deux paramètres, l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et la phosphorylation de son ancre cytoplasmique I- κ B qui autorise la translocation nucléaire de NF- κ B et l'activation de ses gènes cibles. Nous avons trouvé aucune différence dans l'accumulation des transcrits NF- κ B dans les extraits épидидymaires des animaux KO pour IDO1 comparés aux animaux sauvages (non illustré). Concernant la phosphorylation de I- κ B, à ce jour les différents anticorps que nous avons testé n'ont pas donné de résultat satisfaisant, si bien que nous ne sommes pas en mesure de dire à ce jour si la voie NF- κ B est stimulée dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 comparés aux animaux sauvages. Cependant, nous avons montré ci-dessus qu'un nombre important de gènes cibles de la stimulation inflammatoire de NF- κ B sont effectivement up-régulés dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1.

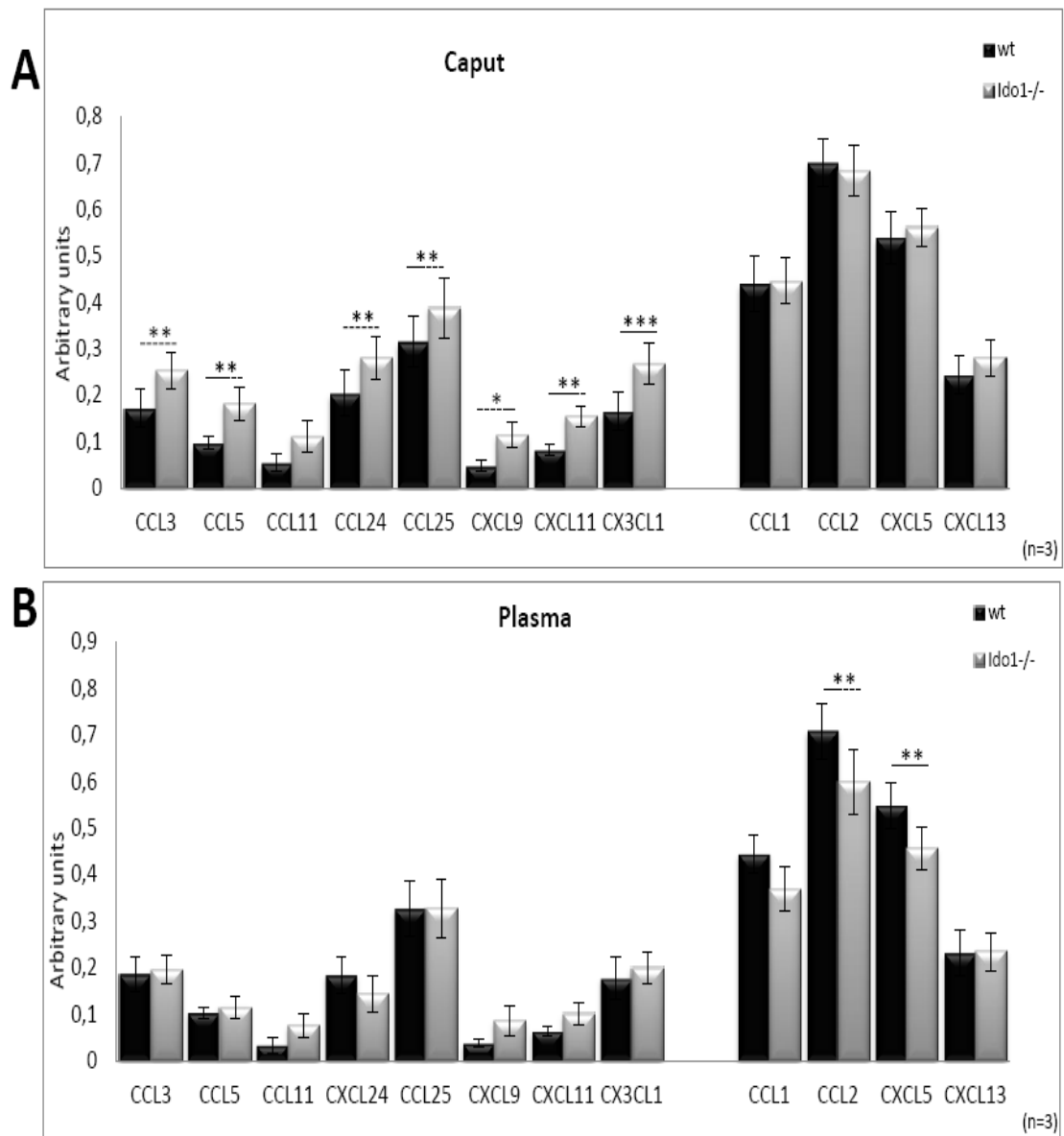


Figure R22: Evolution des concentrations de plusieurs chémokines inflammatoires dans les extraits de têtes d'épididyme (A, Caput) et dans les plasmas (B) de souris WT et KO pour IDO1. Souris âgées de 6 mois. Immuno-Elisa réalisés *via* un cytokine/chemokine antibody array commercial (RayBiotech, Inc). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

○ **Activation de la voie des céramides**

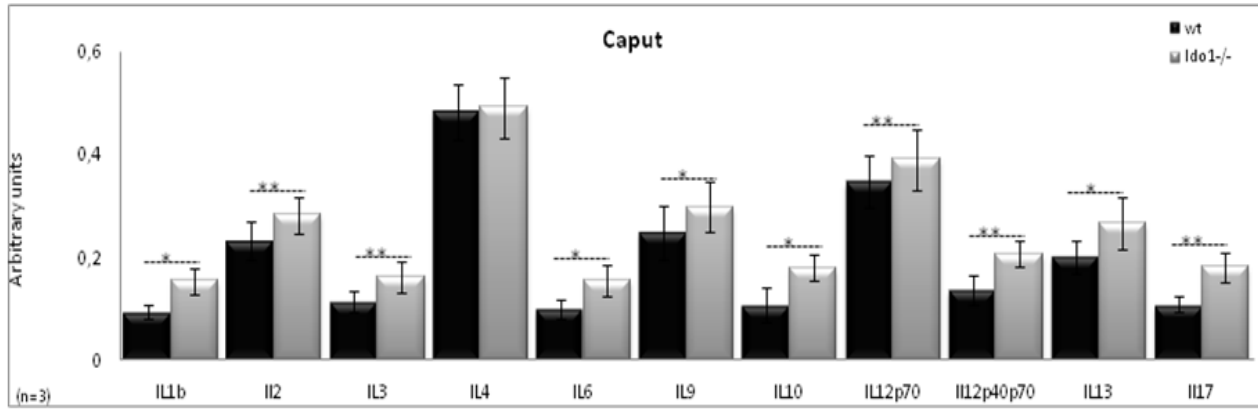
L'activation de la voie des sphingolipides/céramides est un autre indicateur classique de l'installation d'un état inflammatoire induit par le TNF. En effet, comme évoqué ci-dessus, la voie de signalisation intracellulaire de la cytokine inflammatoire TNF α conduit à l'activation de la sphingomyélinase et à la production de céramides intracellulaires qui sont des intermédiaires dans la signalisation apoptotique (voir fig R20). Nous montrons dans la figure R21A que les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 contiennent significativement plus de sphingolipides et de céramides (surtout dans les séries C16 et C24, communication F. Terçé, Plateau de Lipidomique de Toulouse) que les extraits de têtes d'épididyme des animaux sauvages suggérant que la voie des sphingolipides/céramides est effectivement stimulée comme c'est le cas classiquement en situations inflammatoires. En accord avec cette observation, nous montrons par ailleurs dans la figure R21B que le segment 2 de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 est plus réactif envers un anticorps anti-caspase 3 que la même région chez des animaux contrôles sauvages témoignant de l'activation de processus apoptotiques TNF-induits dans l'épithélium épидидymaire de ces animaux *Ido1*^{-/-}.

b. Les autres chémokines et cytokines inflammatoires

De façon à évaluer plus finement le profil inflammatoire du tissu épидидymaire des animaux *Ido1*^{-/-}, nous avons mesuré dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 et sauvages ainsi que dans les plasmas de ces mêmes animaux, les concentrations de plusieurs chémokines/cytokines associées à la réponse immune.

Nous montrons dans la figure R22A qu'une grande majorité des chémokines évaluées incluant CCL3 (MIP1 α), CCL5 (RANTES), CCL11 (Eotaxin1), CCL24 (Eotaxin2), CCL25 (Teck), CXCL1 (Gro/Kc), CXCL9 (MIG), CXCL11 (ITAC), CXCL12 (SDF-1) et CX3CL1 (Fractalkin) sont statistiquement significativement plus représentées dans les têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} comparées aux animaux sauvages. Les concentrations de quelques chémokines, nommément CCL1 (TCA3), CCL2 (MCP1), CXCL5 (LIX) et CXCL13 (BLC), restent cependant inchangée entre le fond KO et le fond

A



B

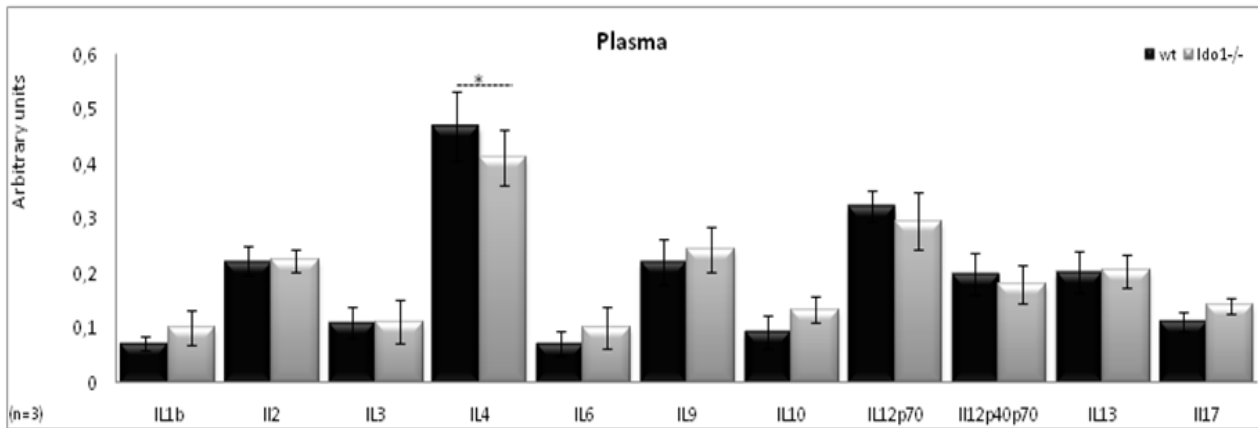


Figure R23: Evolution des concentrations de plusieurs interleukines inflammatoires dans les extraits de têtes d'épididyme (A, Caput) et dans les plasmas (B) de souris WT et KO pour IDO1. Souris âgées de 6 mois. Immuno-Elisa réalisés *via* un cytokine/chemokine antibody array commercial (RayBiotech, Inc). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

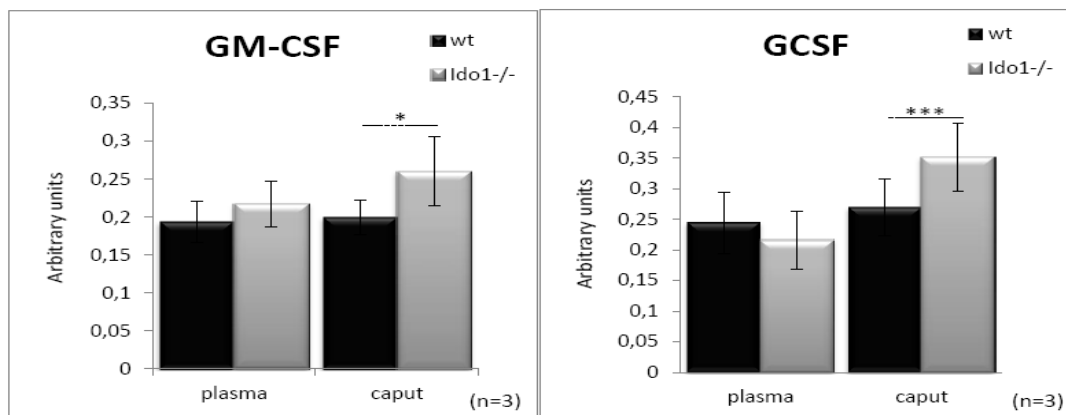


Figure R24: Evolution des concentrations en facteurs de stimulation des colonies leucocytaires GM-CSF et G-CSF dans les extraits de têtes d'épididyme et dans les plasmas de souris WT et KO pour IDO1. Souris âgées de 6 mois. Immuno-Elisa réalisés *via* un cytokine/chemokine antibody array commercial (RayBiotech, Inc). * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$.

sauvage attestant de la spécificité de la réponse. En parallèle, témoignant à nouveau de la spécificité tissulaire de cette réponse inflammatoire restreinte au tissu épидидymaire, nous montrons qu'aucune des chémokines trouvées plus abondantes dans les tissus épидидymaire des animaux KO ne le sont dans les plasmas correspondants (voir fig R22B). Seules les chémokines CCL2 (MCP1) et CXCL5(LiX) dont les concentrations n'étaient pas modifiée de façon significative dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1, est trouvée plus abondante dans les plasmas correspondants. En complément de cette évaluation des chémokines inflammatoires la figure R23 montre la quantification d'un ensemble d'interleukines qui accompagnent et permettent de qualifier la réponse immune inflammatoire engagée par le tissu. En plus des interleukines classiques de l'inflammation, IL-1 β et IL-6, que nous avons trouvé plus abondantes dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}, nous montrons dans la figure R23 que ces mêmes extraits présentent des concentrations significativement plus élevées en IL-2, IL-3, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-12p40p70, IL-13 et IL-17. Seule, parmi les interleukines évaluées, l'IL4 n'est statistiquement pas trouvée différente dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} comparés aux animaux sauvages. Comme c'était le cas ci-dessus pour les chémokines inflammatoires, les concentrations plasmatiques de ces interleukines ne sont pas modifiées entre le fond KO et le fond sauvage, à l'exception de l'IL-4 qui dans le plasma des animaux KO est statistiquement plus abondante que dans le plasma des animaux sauvages.

Cette observation, une fois de plus, souligne le comportement particulier du territoire épидидymaire en terme de réponse immune. Les concentrations accrues de ces lymphokines variées dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}, suggèrent qu'une réponse immune cellule T dépendante est engagée dans le territoire épидидymaire des animaux KO.

Cette conclusion est par ailleurs renforcée par l'observation figure R24 que les facteurs de stimulation des colonies leucocytaires GM-CSF (produit par les cellules T) et G-CSF(produit par les cellules dendritiques et les cellules T et régulant l'équilibre Th1/Th2) sont significativement augmentées et ce, uniquement dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1.

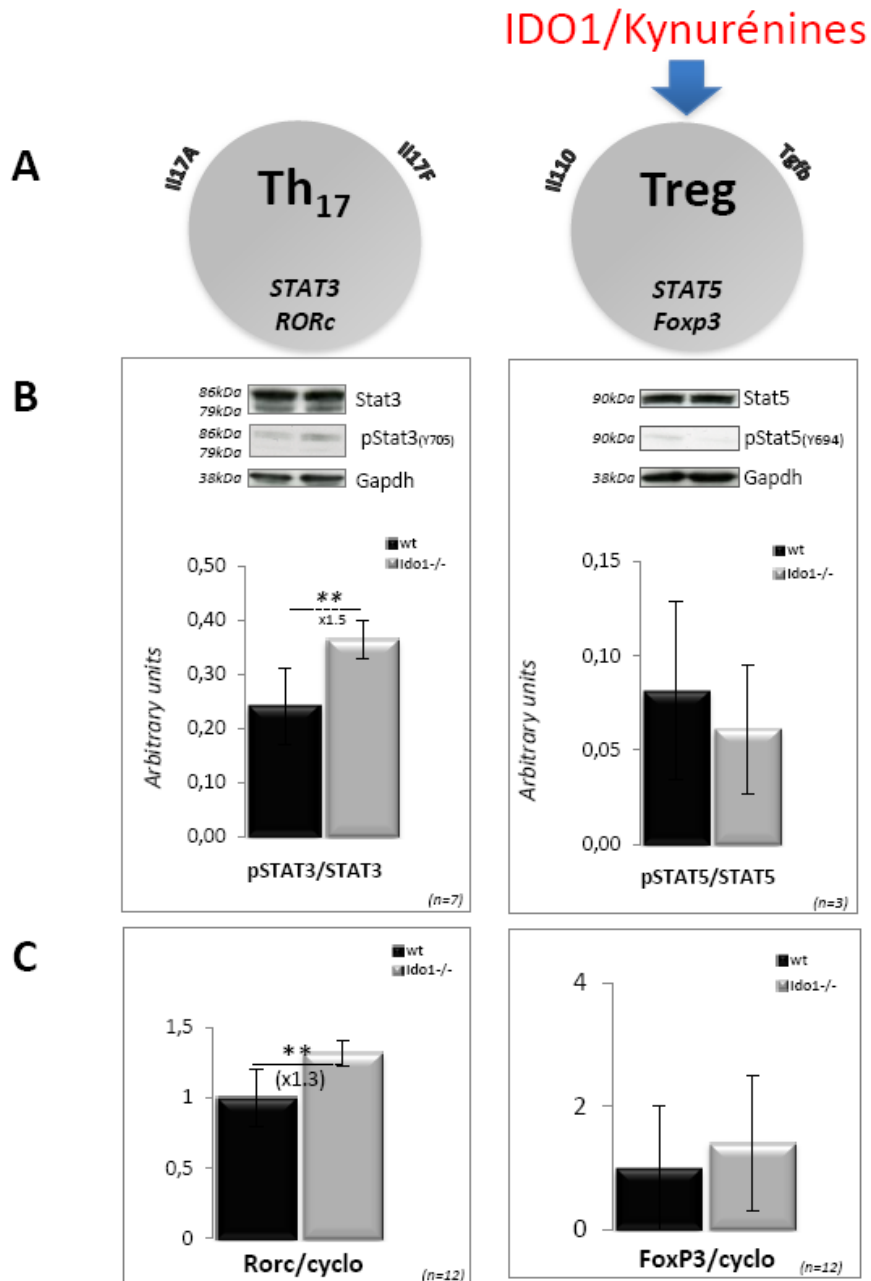


Figure R25: La différenciation du sous-lignage inflammatoire Th17 est stimulée dans les extraits de têtes d'épididyme de souris KO pour IDO1 comparées aux souris sauvages.

A: La différenciation du sous-lignages Th17 à partir de cellules T naïves implique la voie de signalisation de STAT3 et le facteur de transcription RORc alors que la différenciation du sous-lignage T-reg implique la voie de signalisation de STAT5 et le facteur de transcription FoxP3. IDO1 et les kynurénines résultantes de l'activité IDO sont des activateurs du sous-lignage T régulateur **B:** Histogrammes présentant respectivement le résultat de western blots (des western-blot représentatifs sont présentés en inserts) dans lesquels l'état de phosphorylation de STAT5 ou de STAT3 a été évalué dans des extraits de têtes d'épididyme de souris sauvages (WT) et de souris KO pour IDO1 (*Ido1*^{-/-}). **C:** Histogramme présentant l'évaluation par QRT-PCR de la concentration en facteurs de transcription RORc et FoxP3 relativement à l'expression de la cyclophyline dans des extraits de têtes d'épididyme de souris sauvages (WT) et de souris KO pour IDO1 (*Ido1*^{-/-}). ***P* ≤ 0.01.

Le fait que les concentrations des lymphokines inflammatoires TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL6 et IL-17 soient augmentées alors que l'IL-4 n'est pas mobilisée suggère que le tissu est plutôt engagé vers une réponse T inflammatoire de type Th1 (voir discussion).

c. **Modification de l'équilibre Th17/Treg**

Comme mentionné dans l'introduction bibliographique IDO est connue pour exercer son effet immunosuppresseur en favorisant, à partir de cellules T naïves stimulées lors d'événements de présentation antigéniques par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) la différenciation du sous-lignage T-régulateur (Treg) à l'origine de la production de cytokines immunosuppressives telle que l'IL-10 et le facteur de croissance immunomodulateur TGF β 1. Cette induction de la différenciation des Treg se fait au détriment des cellules T inflammatoires et en particulier du sous répertoire Th17 qui de son côté exerce des effets paracrines sur l'équilibre classique Th1/Th2. Ainsi l'équilibre Th17/Treg est devenu ces dernières années le nouveau paradigme de la réponse immune T-dépendante. Ces deux sous-populations T exercent *via* leurs lymphokines respectives des effets paracrines antagonistes réciproques dans lesquels l'IL-10, la cytokine majeure des Treg exerce un effet négatif sur la différenciation des Th17, alors que l'IL-17, la cytokine majeure des Th17, exerce un effet négatif sur la différenciation des Treg. IDO et ses produits d'activités (i.e. les kynurénines) en déplaçant l'équilibre Th17/Treg vers les Treg, participent ainsi à l'installation de l'immunosuppression et à la tolérance immune en diminuant la population Th17 inflammatoire.

De façon à évaluer si la perte d'IDO1 dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} pouvait modifier l'équilibre de ces deux sous-populations T, nous avons mesuré en PCR quantitative l'expression des deux facteurs de transcription clés (ROR γ c et FOXP3) dans l'engagement des cellules T naïves vers les voies de différenciation Th17 et Treg ainsi que l'activation des voies de signalisation STAT spécifiques à ces schémas de différenciation des sous populations T. Nous montrons dans la figure R25 que la perte d'IDO1 s'accompagne d'une augmentation significative de l'expression

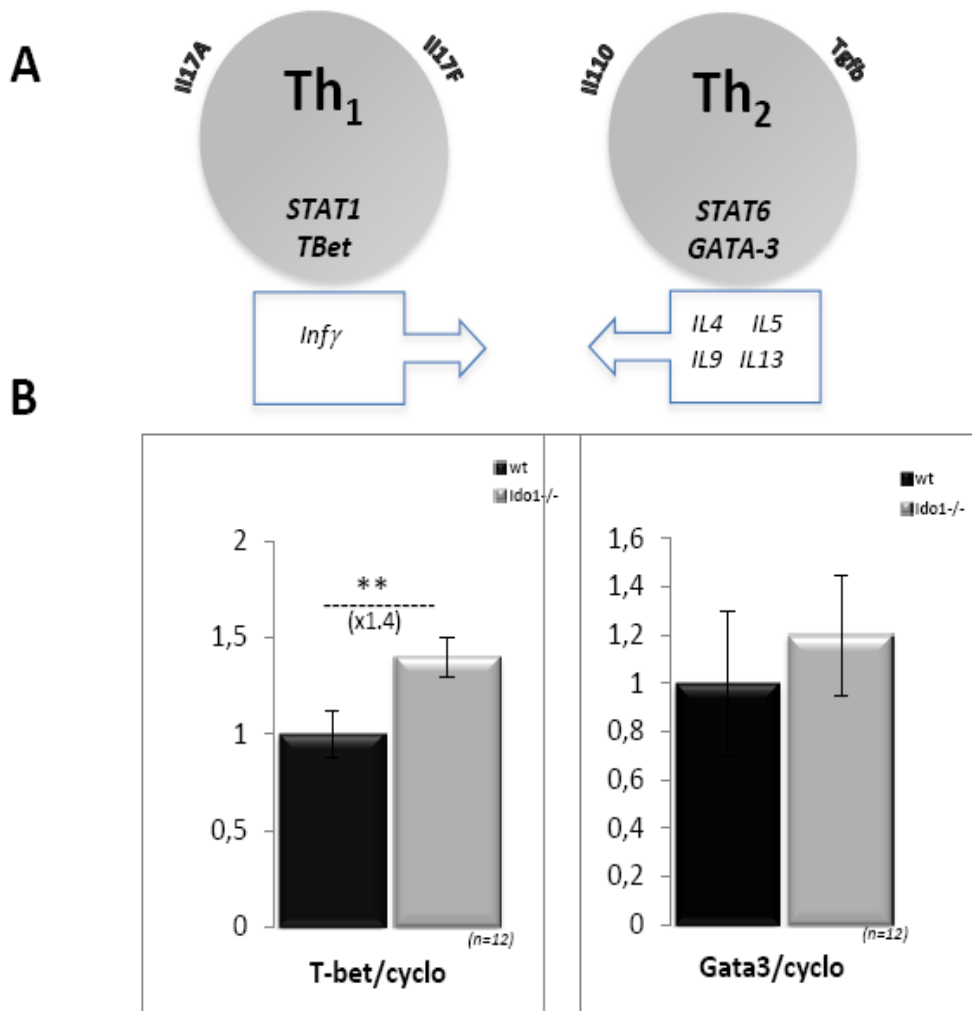


Figure R26: La différenciation du sous-lignage inflammatoire Th1 est stimulée dans les extraits de têtes d'épididyme de souris KO pour IDO1 comparées aux souris sauvages.

A: La différenciation du sous-lignages Th1 à partir de cellules T naïves implique la voie de signalisation de STAT1 et le facteur de transcription TBet alors que la différenciation du sous-lignage Th2 implique la voie de signalisation de STAT6 et le facteur de transcription GATA-3. **B:** Histogramme présentant l'évaluation par QRT-PCR de la concentration en facteurs de transcription TBet et GATA-3 relativement à l'expression de la cyclophiline dans des extraits de têtes d'épididyme de souris sauvages (WT) et de souris KO pour IDO1 (*Ido1*^{-/-}). ***P* ≤ 0.01.

épididymaire du facteur de transcription RORc, le facteur clé de la différenciation des Th17, qui est corrélée à l'activation de la voie de signalisation correspondante STAT3. Concernant la différenciation des Treg, nous n'avons pas enregistré de différences statistiquement notables ni dans le niveau d'activation de la voie STAT5, ni dans le niveau d'expression de FOXP3 entre les têtes d'épididyme des animaux KO comparés aux animaux sauvages. Ainsi, comme conceptuellement attendu étant donné l'effet inducteur connu d'IDO et de ses produits d'activité sur la différenciation des Treg, la perte d'expression d'IDO1 dans la tête de l'épididyme des animaux KO s'accompagne d'un déséquilibre Th17/Treg en faveur de la différenciation Th17 inflammatoire.

d. Modification de l'équilibre Th1/Th2

De façon à apprécier si le déplacement de l'équilibre Th17/Treg en faveur des Th17 inflammatoires enregistré dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 à une répercussion locale sur l'équilibre Th1/Th2, nous avons de la même façon que précédemment évalué dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 versus les animaux contrôle l'induction des voies de signalisation STAT1 et STAT6 ainsi que le niveau d'expression des facteurs de transcription T-bet et GATA-3 qui gouvernent la différenciation de ces sous-populations T inflammatoires. Comme illustré sur la figure R26, le couple STAT1/T-bet est impliqué dans la différenciation de la sous-population Th1 alors que le couple STAT6/GATA-3 est impliqué dans la différenciation de la sous-population Th2. En accord avec les résultats précédents reposant sur le profil cytokinique qui met en avant une réponse de type Th1, nous montrons dans la figure R26 que seul le facteur T-bet est significativement plus abondant dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1. L'augmentation de l'expression de T-bet dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 n'est cependant pas accompagnée d'une stimulation de la voie STAT1 (pas de différence de phosphorylation de STAT1 enregistrée entre les extraits KO pour IDO1 et les extraits « contrôles »). Par contre, l'expression de STAT1 mesurée par PCR en temps réel est significativement accrue dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 (non illustrée).

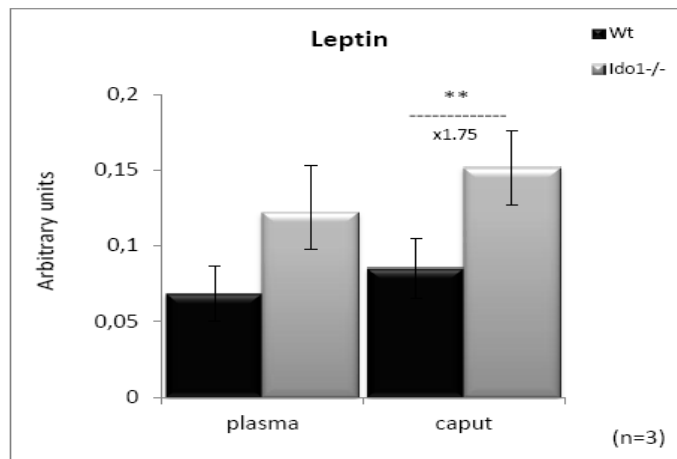


Figure R27: Evolution des concentrations en leptine dans les extraits de têtes d'épididyme et dans les plasmas de souris WT et KO pour IDO1. Souris âgées de 6 mois. Immuno-Elisa réalisés *via* un cytokine/chemokine antibody array commercial (RayBiotech, Inc). **** $P \leq 0.01$** .

	WT	Ido1-/-	
A			
Omega 6			
Acide linoléique 18:2n-6	8,73	13,44	↗
Acide γ -linoléique 18:3n-6	0,24	0,17	
Acide dhomo γ -linoléique 20:3n-6	0,65	0,36	
Acide arachidonique 20:4n-6	21,4	16,53	↘
Acide acdrénique 22:4n-6	0,52	0,37	
Acide docosapentanoïque 22:5n-6	1,02	0,69	
Total Omega 6	32,56	31,56	
Omega 3			
Acide α -linoléique 18:3n-3	ND	ND	
Acide écosapentaénoïque 20:5n-3	0,35	0,21	
Acide docosapentaénoïque 22:5n-3	0,35	0,21	
Acide docosahexaénoïque 22:6n-3	7,91	6,03	↘
Total Omega 3	8,61	6,45	↘
RATIO OMEGA 6/OMEGA3	3,78	4,89	↗
B			
INDEX ACIDES GRAS			
SCD/D9D ratio (16:n-7/16:0)	0,085	0,283	+ x3,3
D6D ratio (20:3n-6/18:2n-6)	0,075	0,027	- x2,7
D5D ratio (20:4N-6/20:3n-6)	32,92	45,92	+ x1,4

Figure R28: **A**: Evolution des concentrations en acides gras des séries Omega6 et Oméga 3 trouvées dans des extraits de têtes d'épididyme de souris mâles âgées de 6 mois dans le fond *Ido1-/-* comparés au fond sauvage. **B**: Evolution des ratio SCD, D6D et D5D dans les extraits de têtes d'épididyme de souris mâles âgées de 6 mois dans le fond *Ido1-/-* comparés au fond sauvage.

e. Autres signes inflammatoires dans les têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}

De façon à analyser plus largement l'état inflammatoire du tissu épидидymaire des animaux KO pour IDO1 nous avons évalué plusieurs intermédiaires lipidiques qui sont généralement modifiés lors de la réponse inflammatoire.

▪ **Elévation de la leptine périphérique**

Sachant le rôle démontrée de la leptine comme inducteur de la réponse immune adaptative et, en particulier, comme un activateur de la réponse Th1 lorsque des cellules T CD4⁺ ont été activées par des Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) (Matarese, 2000 ; La Cava et *al.*, 2004) nous avons mesuré les niveaux de leptine plasmatique et au sein du tissu épидидymaire (têtes d'épididyme) des animaux sauvages et KO pour IDO1. En accord avec l'installation d'une réponse inflammatoire chez les animaux KO pour IDO1 nous montrons dans la figure R27 que les niveaux de leptine sont augmentés dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 comparativement aux mêmes échantillons chez les animaux sauvages. L'augmentation des concentrations en leptine n'est statistiquement significative que dans les extraits épидидymaires des animaux KO pour IDO1 alors que seule une tendance à la hausse est observée pour les plasmas correspondants.

▪ **Distorsion du ratio Oméga6/Oméga3**

Dans une première approche, nous avons comparé le contenu en acides gras polyinsaturés (PUFA) des séries n6 et n3 (aussi dénommés Oméga6 [ω 6] et Oméga3 [ω 3]). En effet, une augmentation du ratio n6-PUFA/n3-PUFA (ω 6/ ω 3) est considérée comme un indicateur fiable de l'installation d'une réponse inflammatoire dans un tissu donné. Nous montrons (Fig. R28) que dans les têtes d'épididyme des souris *Ido1*^{-/-} ce rapport ω 6/ ω 3 est significativement supérieur à celui enregistré dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux contrôles.

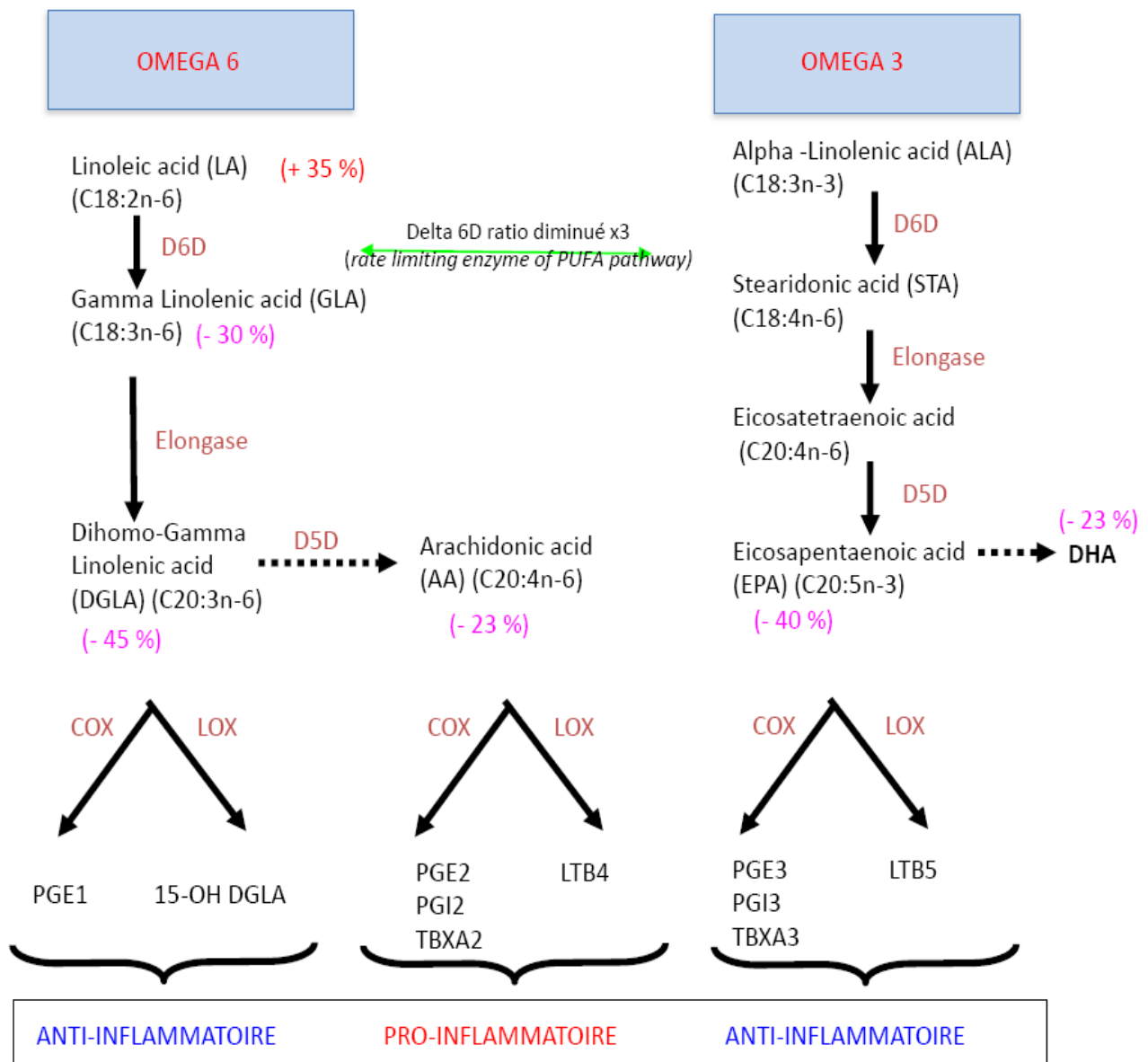


Figure R29 : Implication du métabolisme des acides gras Omega6/Oméga 3 dans la production de médiateurs pro- et anti-inflammatoires. Entre parenthèses sont données les évolutions à la baisse ou à la hausse de la représentation des différents intermédiaires dans des extraits de têtes d'épididyme de souris âgées de 6 mois dans le fond *Ido1*^{-/-} comparé au fond sauvage.

En analysant de façon plus détaillée les différentes espèces d'acides gras, nous observons dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 une nette augmentation du contenu en acide linoléique (18 :2n-6) suggérant une baisse d'activité de l'enzyme limitante qui métabolise ce substrat, le delta-6-désaturase (D6D).

En accord avec cette interprétation, tous les acides gras de la série n6 dérivés du catabolisme de l'acide linoléique (nommément GLA, DGLA et AA) sont significativement moins représentés dans les têtes d'épididyme des souris KO pour IDO1 (voir Fig. R29). En parallèle, le contenu en acides gras à longue chaîne de la série n3 issus de l'acide linoléique (nommément : EPA, DPA et DHA) est aussi diminué mais de façon moindre que les ω6 dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 sans que cela s'accompagne d'une plus forte accumulation du précurseur, l'acide linoléique. Ainsi, par compétition l'enzyme limitante D6D est utilisée préférentiellement pour métaboliser l'acide linoléique et produire des dérivés de la série n3 (EPA, DPA et DHA) qui conduisent classiquement aux médiateurs anti-inflammatoires tels que les leucotriènes (LKT ; de la série 4) alors que les dérivés de la série 6 conduisent eux préférentiellement aux médiateurs pro-inflammatoires tels que les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TBX). L'évolution des ratios SCD(D9D), D6D et D5D dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 comparés aux animaux sauvages témoignent en outre d'une augmentation de l'insaturation des acides gras (*via* l'augmentation des ratio SCD et D6D) dans le fond KO pour IDO1. Cette observation est aussi une caractéristique des états inflammatoires. Ces résultats suggèrent qu'à la fois une réponse inflammatoire et une réponse anti-inflammatoire sont activées dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1, ce qui est inhérent à une réponse inflammatoire classique dans laquelle les 2 volets inflammatoires et anti-inflammatoires sont mobilisés.

En accord avec la consommation accrue des intermédiaires lipidiques conduisant aux médiateurs pro- (PG et TBX) et anti-inflammatoires (LKT) nous montrons figure R30 que l'expression des enzymes cyclo-oxygénases COX1 et COX2 est augmentée dans les têtes d'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}.

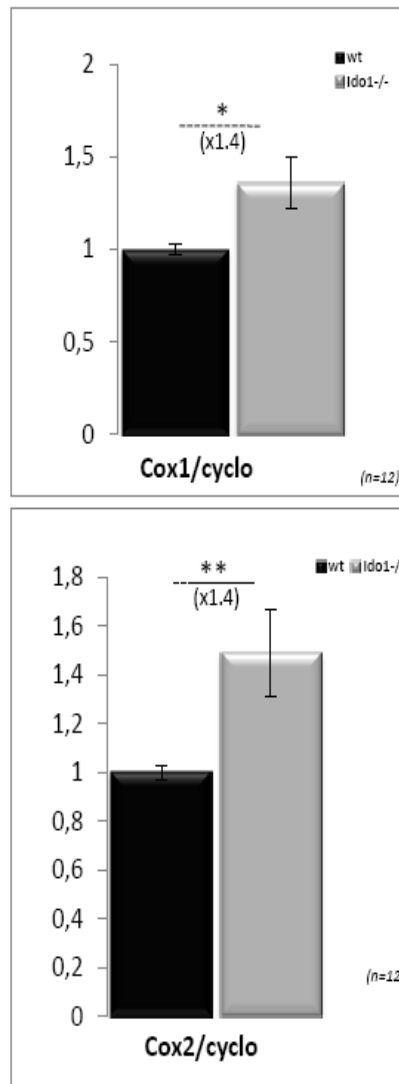


Figure R30 : Evaluation par QRT-PCR de la concentration en transcrits des cyclo-oxygénases (Cox1 et Cox2) dans les extraits de têtes d'épididyme de souris mâles âgées de 6 mois sauvages et *Idol1*^{-/-}. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

▪ Perte ciblée du tissu adipeux péri-épididymaire chez les animaux KO pour IDO1

L'épididyme et, en particulier la tête de l'épididyme, est entourée par un dépôt adipeux blanc dénommé EWAT (pour « Epididymal White Adipose Tissue »).

En dehors des fonctions classiques de réserves énergétiques et de régulateurs endocrines associées aux dépôts adipeux, un rôle dans la régulation de la réponse immune a été associé à ces dépôts adipeux. Il a ainsi été évoqué que les dépôts adipeux blancs périphériques pouvaient constituer des réservoirs locaux de cellules de l'immunité, ainsi qu'être le site de production de médiateurs de l'inflammation à la fois pro- et anti-inflammatoires. De façon intrigante, nous montrons figure R31 que le EWAT des animaux KO pour IDO1 ne grossit pas au cours du vieillissement (entre 6 et 11 mois) alors que l'évolution classique de ce tissu adipeux au cours de l'âge est une augmentation significative de sa masse (comme illustré pour les animaux contrôle fig. R31) [mesures corrigées de l'IMC]. Par ailleurs, chez ces mêmes animaux et quel que soit l'âge, le poids des testicules et des épididymes ne sont pas différents entre les souris sauvages et les souris KO pour IDO1 (non illustré).

Nous montrons aussi, figure R32, que seul le eWAT des têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 est concerné par ce phénomène puisque un autre dépôt abdominal de tissu adipeux blanc, le IWAT « Inguinal White Adipose Tissue », ne semble pas être affecté (pas de différence significative entre les animaux KO et les animaux sauvages). Nous montrons par ailleurs, figure R33, que la perte de masse enregistrée dans le dépôt adipeux blanc péri-épididymaire des animaux KO pour IDO1 est associée à la fois à une moindre cellularité et à une diminution de la taille des cellules adipeuses. De façon intéressante, la figure R33 montre aussi que la diminution de taille des cellules adipeuses dans le EWAT des animaux KO pour IDO1 est régionalisée au EWAT le plus proximal, c'est à dire à la partie du dépôt adipeux qui est au contact de l'épididyme.

De façon à apprécier si la mobilisation du EWAT péri-épididymaire proximal pouvait correspondre à sa participation au règlement d'une situation inflammatoire locale, nous avons utilisé la cytométrie de flux pour évaluer les populations en cellules

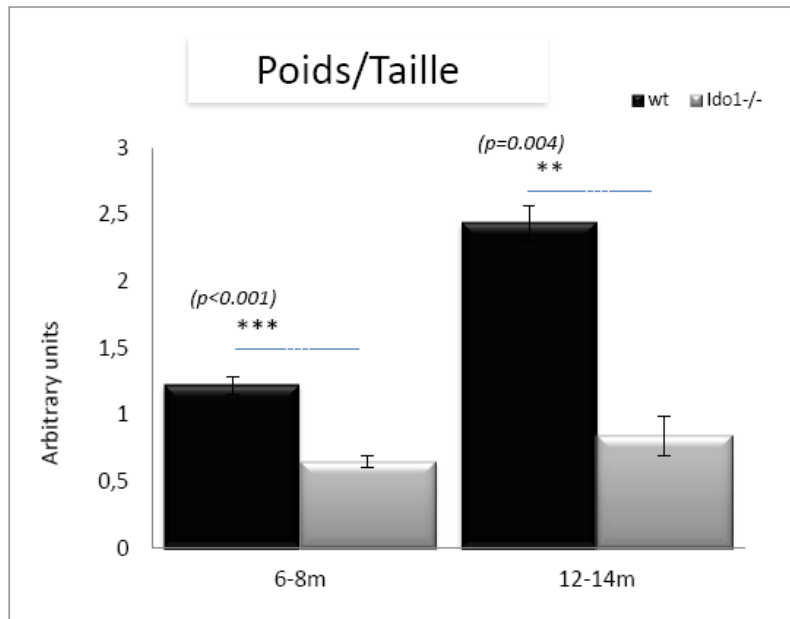


Figure R31 : Evaluation des poids (en mg ramenés à la taille des animaux) des tissus adipeux péri-épididymaires de souris mâles âgées de 6-8 mois et de 12-14 mois sauvages et *Ido1*^{-/-}. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

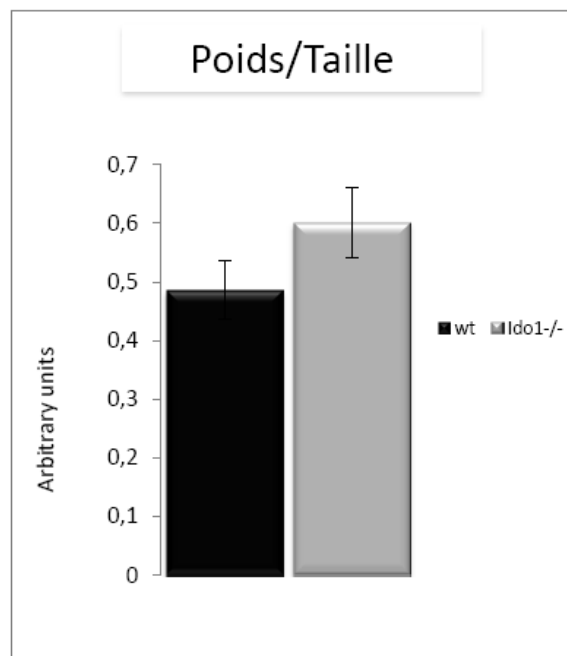


Figure R32 : Evaluation des poids (en mg ramenés à la taille des animaux) des tissus adipeux inguinaux (IWAT = inguinal white adipose tissue) de souris mâles âgées de 6-8 mois sauvages et *Ido1*^{-/-}.

de l'immunité (cellules T^{CD3+} versus cellules T^{CD3-} , cellules $T^{CD3+CD8+}$ versus cellules $T^{CD3+CD4+}$, cellules $T^{CD3+CD4+CD8+}$ et cellules $T^{CD3+CD4-CD8-}$ aussi appelées cellules T^{CD3+} doubles négatives [DN]= T^{CD3+DN}) des tissus adipeux des animaux sauvages et KO pour IDO1. En parallèle, nous avons aussi évalué les populations en ces mêmes cellules de l'immunité dans les têtes d'épididyme de ces mêmes animaux.

La figure R34 montre que l'on n'observe aucune variation qui soit statistiquement significative du contenu en cellules de l'immunité dans les EWAT des animaux KO pour IDO1 comparés aux animaux sauvages. En ce qui concerne les tissus épидидymaires on note, en premier lieu, la très grande différence dans la représentation en cellules de l'immunité comparé au tissu adipeux. Les points les plus marquants sont la très faible représentation en cellules $CD3^+$ (inférieure à 0.5%) et la très forte représentation en cellules $CD3^-$ (autour de 99%). Ces chiffres révèlent que le contingent le plus représenté en cellules de l'immunité dans l'épididyme n'est pas dans le répertoire lymphocytaire. En accord avec cette faible représentation du répertoire T dans le tissu épидидymaire les différentes sous-populations lymphocytaires T^{CD3+} ($CD4^+$ ou $CD8^+$) sont elles aussi sous représentées par rapport au tissu adipeux des mêmes animaux. Enfin, la quasi totalité des cellules T^{CD3+} présentes dans le tissu épидидymaire appartient à la sous-population T^{CD3+DN} contre la moitié dans le tissu adipeux de ces mêmes animaux. Chez les animaux KO pour IDO1, les seules différences significatives dans la répartition des sous-populations T^{CD3+} sont l'augmentation des cellules $T^{CD3+CD8+}$ au détriment des cellules T^{CD3+DN} .

En résumé, sur la base des données rapportées ci-dessus on peut estimer que la perte de l'activité IDO1 dans la tête de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} conduit à l'engagement d'une réponse inflammatoire qui repose sur un déséquilibre des sous-populations Th17/Treg en faveur de la différenciation des Th17. Les cellules Th17 par leurs cytokines déstabilisent la réponse cellulaire T inflammatoire en faveur des Th1, lesquelles orientent à leur tour l'engagement de l'immunité à médiation cellulaire qui repose sur les cellules T cytotoxiques (T^{CD8+}).

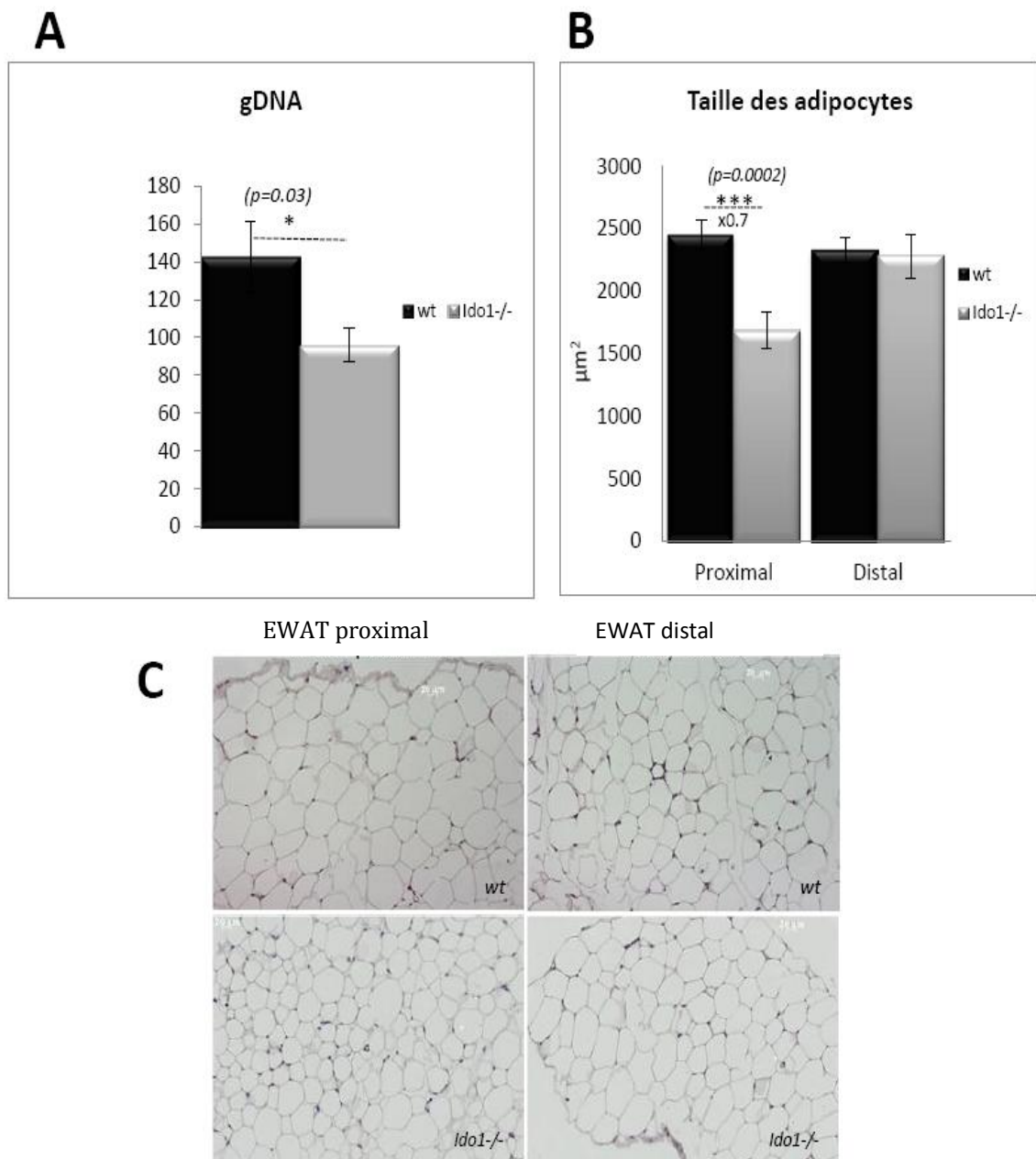


Figure R33 : **A**: Evaluation de la cellularité (via la mesure de la quantité d'ADN génomique [gDNA] ramenée à la masse de tissu) pour le tissu adipeux péri-épididymaire de souris mâles âgées de 6 mois dans le fond sauvage et dans le fond KO pour IDO1. **B**: Evaluation de la surface des adipocytes de l'EWAT en fonction de leur localisation par rapport au tissu épидидymaire, adipocytes proximaux (ou adipocytes plus distaux de souris mâles âgées de 6-8 mois sauvages et *ldo1*^{-/-}. **C**: Photographies représentatives de sections en paraffine de tissu adipocytaires péri-épididymaire (EWAT) proximal et distal. Noter la plus faible surface cellulaire des adipocytes de l'EWAT proximal chez les animaux KO pour IDO1. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$.

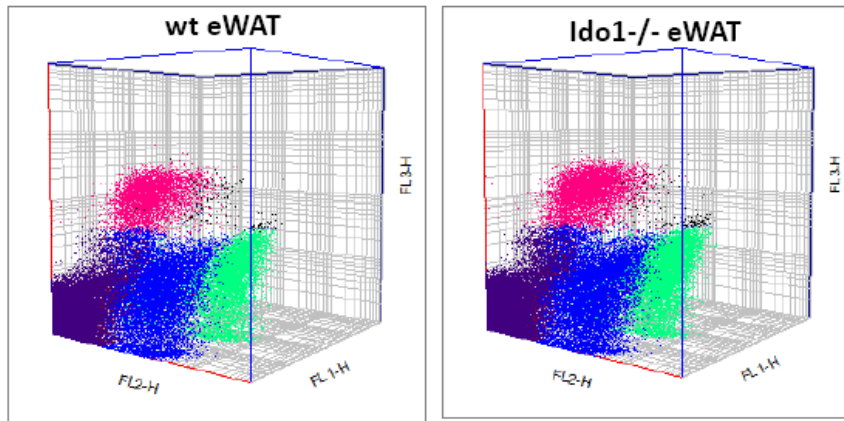
3. Les kynurénines dans l'épididyme et au niveau des spermatozoïdes

Ainsi que nous l'avons démontré ci-dessus, l'épididyme murin contient des quantités importantes d'acide kynurénique (KA) et de 3-hydroxy kynurénine (HK). Nous avons utilisé des anticorps commerciaux spécifiques de ces deux espèces afin de localiser ces métabolites au sein du tissu épидидymaire.

a. L'acide kynurénique (KA) et la 3-hydroxykynurénine (HK) dans l'épithélium épидидymaire

▪ KA

Comme illustré dans les figures R35 et R36, KA a été localisé dans les espaces intertubulaires et dans les cellules apicales de l'épithélium de la tête d'épididyme de souris sauvages à partir du segment 2 et ce, jusqu'au segment 7. KA n'est pas détecté dans le segment 1. La figure R35 montre un exemple de ce marquage intertubulaire dans les segments 4 et 7. Chez les individus KO, aucun marquage n'est observé ni dans les cellules apicales ni dans les espaces intertubulaires des mêmes segments ce qui atteste de la spécificité du marquage. La figure R36 montre plus clairement ce même marquage dans le segment 3, le segment 3 donnant les signaux les plus intenses. On notera aussi la détection de KA au niveau du cytoplasme apical des cellules apicales du segment 3. En revanche, KA n'est pas observé dans les cellules apicales du segment 1. Dans ce segment où le marquage KA est le plus fort, on notera que KA peut toujours être détecté cependant avec une intensité beaucoup plus faible dans les espaces intertubulaires des sections d'épididyme des animaux KO pour IDO1 (voir fig. R37). Cette observation suggère que la concentration en KA dans les espaces intertubulaires peut aussi être le résultat du fonctionnement d'autres enzymes du catabolisme du Trp (telles que l'INDOL ou TDO). Comme déjà dit plus haut et rapporté par Britan et *al.*, 2006, TDO est en particulier exprimée dans l'assise de cellules musculaires lisses péri-tubulaires. Enfin, il est à noter que KA est absent du compartiment luminal chez les souris sauvages comme chez les souris KO.



lymphocytes répartition	eWAT		Epididymis	
	<i>wt</i>	<i>Ido1-/-</i>	<i>wt</i>	<i>Ido1-/-</i>
B cells (CD19+)	11%	10%	0,3%	10 %
	89 %	90%	99,7%	90%
CD3+ cells	39,5%	37,5%	0,4%	0,20%
CD3- cells	49,5%	52,5%	99,3%	98,8%
CD3 ^{CD8+} cells	28%	30%	2,0%	6,80% ↗
CD3 ^{CD4+} cells	20%	19%	-	-
CD3 ^{CD4+CD8+} cells	0,7%	0,7%	1,5%	1%
CD3 ^{DN} cells	50,6%	50,3%	96,0%	92,20% ↘

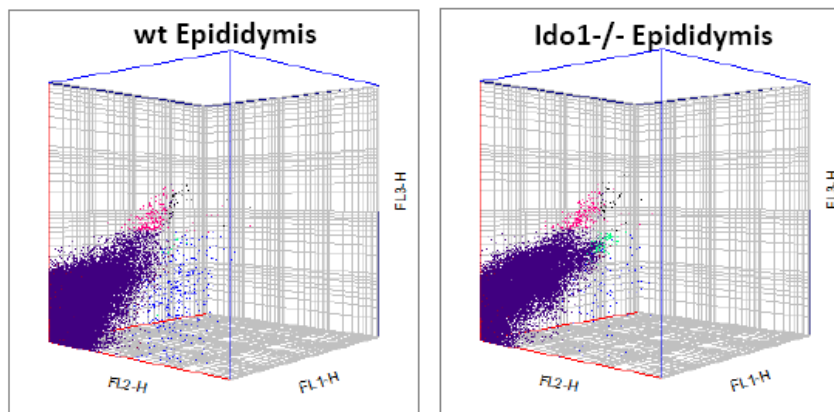


Figure R34 : Evaluation par cytométrie de flux des populations de cellules de l'immunité du lignage lymphoïde trouvées dans les tissus adipeux péri-épididymaires (eWAT; haut) et dans les têtes d'épididymes (Epididymis; bas) de souris mâles âgés de 6-8 mois sauvages (*wt*) et *Ido1-/-*. Le code couleur identifie en bleu les cellules CD3^{DN}; en turquoise les cellules CD3^{CD4+}; en rose les cellules CD3^{Cd8+}; en noir les cellules CD3^{CD4+/CD8+} et en violet les cellules CD3⁻. Le tableau au centre donne en pourcentage les représentations des différents lignages

En conclusion, KA est détecté à la fois dans les espaces intertubulaires et dans les cellules apicales de l'épithélium épидидymaire à partir du segment S2. KA est abondant dans le segment S3 et présent aussi en S4. KA est beaucoup moins présent dans les segments postérieurs à la tête de l'épididyme (S6/S7). Cette distribution de KA est conforme à la localisation tissulaire d'IDO1 dans l'épididyme (voir Fig. R1 et, Britan et al., 2006 ;Jrad-Lamine et al., 2011). Dans les cellules apicales de l'épithélium épидидymaire, KA est préférentiellement localisé dans le cytoplasme apical. KA n'est pas détecté dans le compartiment luminal. Chez les animaux KO pour IDO1, KA ne disparaît pas totalement mais sa concentration est significativement diminuée à la fois du tissu interstitiel et de l'épithélium suggérant que le contenu en KA épидидymaire n'est pas uniquement le fruit de l'activité IDO1, ce qui pouvait être présumé étant donné que l'épididyme murin exprime aussi TDO au moins dans l'assise de cellules musculaires lisses pérítubulaires (Britan et al., 2006) et que INDOL a aussi été trouvé exprimée dans l'épididyme murin (Jrad-lamine et al., 2011).

▪ HK

Nous avons pu remarquer, en observant la localisation de HK au sein de l'épithélium épидидymaire, qu'elle était partiellement différente de celle de KA. Comme le montre la figure R38, nous retrouvons cette kynurénine dans les espaces intertubulaires et dans les cellules apicales du segment 3 de l'épithélium épидидymaire des animaux sauvages. Chez les animaux KO, le signal observé est plus faible dans le cytoplasme des cellules apicales. Au niveau du compartiment interstitiel (intertubulaire) du S3 la détection de HK n'est pas moindre chez les animax KO pour IDO1 suggérant ainsi qu'IDO1 n'est probablement pas la source de HK dans ce territoire interbulaire. Par ailleurs, la figure R39 montre que contrairement à KA, HK est détectée dans les espaces intertubulaires du segment 1 de la tête de l'épididyme de souris sauvages. Cette localisation qui ne correspond pas à un site d'expression d'IDO1 atteste une fois de plus que la présence de cette kynurénine dans l'espace intertubulaire n'est pas le fait de l'activité IDO1. Enfin, de façon identique à KA, le compartiment luminal du tubule épидидymaire ne contient pas de HK.

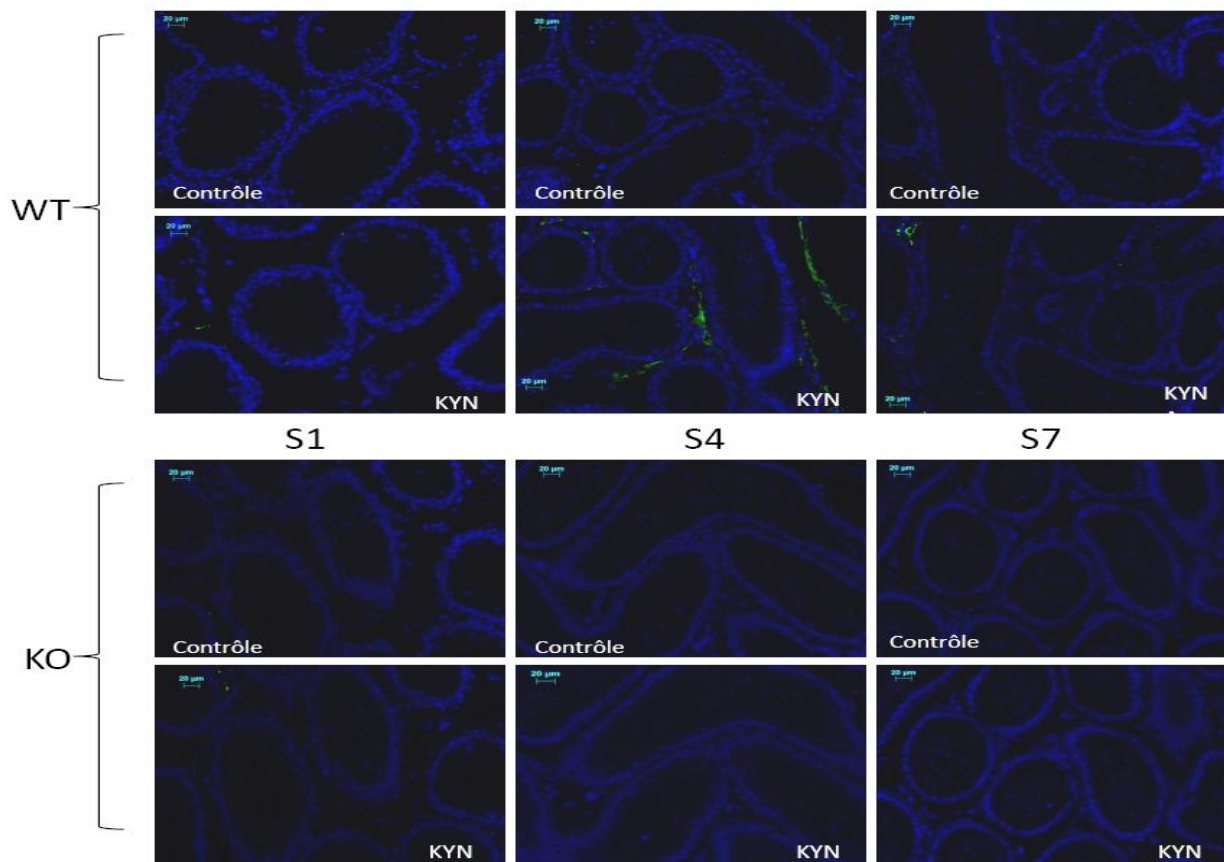


Figure R35 : Etude par immunofluorescence, dans l'épididyme de souris sauvages (WT) et KO pour IDO1 (KO), du signal correspondant à la kynurénine KYNA dans les segments 1, 4 et 7. Prises de vue au microscope (x 10) effectuées à une même intensité, et un même traitement d'image a été réalisé. Noter le marquage prépondérant dans les espaces périlitubulaires du S4. Un marquage rédisuel est visible dans les mêmes espaces intertubulaires dans le S7. Il n'y a pas de marquage dans le S1. La spécificité du marquage est attestée par le fait que toute détection est abolie dans les coupes d'épididyme d'un animal KO pour IDO1 qui produit beaucoup moins de kynurénines. Dans les coupes « contrôle » seul l'anticorps secondaire a été utilisé.

b. L'acide kynurénique (KA) et la 3-hydroxykynurénine (HK) sur le spermatozoïde murin**▪ KA**

Comme on peut le voir dans la figure R40, KA est observé dans le spermatozoïde de queue d'épididyme de souris sauvages au niveau de la tête spermatique, et semble réparti en foyers. Seule la localisation de KA sur des spermatozoïdes de souris sauvages est illustrée figure R40 car la détection est similaire sur des spermatozoïdes de souris *Ido1*^{-/-}. Ceci atteste que KA sur les gamètes ne provient pas de l'activité de IDO1. On détecte également KA, mais de manière plus faible dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde. De façon à évaluer si le marquage « tête spermatique » est au niveau membranaire ou interne, nous avons observé les gamètes présentant ce marquage au microscope confocal (fig R41). Nous avons ainsi pu constater que le marquage est bien présent au centre de la tête spermatique réparti dans différents foyers discrets.

▪ HK

Comme illustré dans la figure R41, HK, a été localisée au niveau de la pièce intermédiaire du spermatozoïde uniquement, chez les souris sauvages comme chez les souris KO pour IDO1 (non illustré pour les spermatozoïdes de souris *Ido1*^{-/-}). Comme cela était le cas pour KA, l'IDO1 épидидymaire n'est donc pas la source majeure de la HK présente sur le spermatozoïde épидидymaire. La littérature rapporte que l'enzyme qui produit HK se situe à la membrane externe de la mitochondrie, nous avons donc cherché à savoir si HK se situait elle aussi au niveau des mitochondries de la pièce intermédiaire. Grâce à un co-marquage au Mitotracker, nous avons effectivement observé une co-localisation de HK avec les mitochondries.

c. Approches préliminaires dans l'identification de protéines spermatiques modifiées par kynurénilation

Les kynurénines et en particulier KYNU et HK peuvent participer à des événements de kynurénilation, qui correspondent à des modifications post-traductionnelles des protéines par fixation de kynurénines sur certains acides aminés (Cystéine, Histidine, ..).

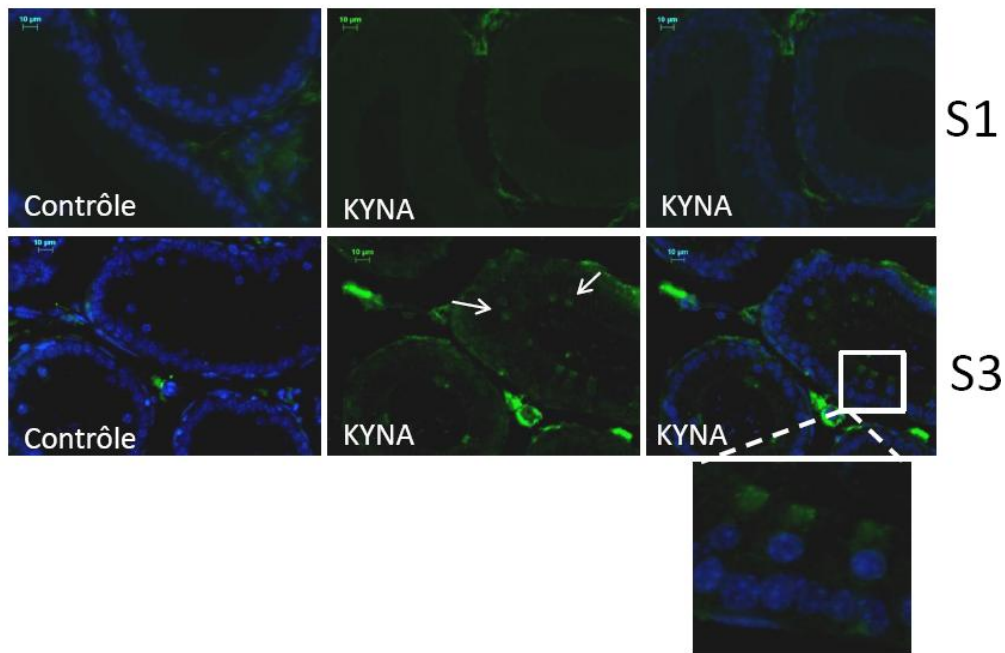


Figure R36 : Etude par immunofluorescence, dans l'épididyme de souris sauvages, du signal correspondant à la kynurénine KYNA dans les segments 1 et 3. Prises de vue au microscope (x 10) effectuées à une même intensité, et un même traitement d'image a été réalisé. On peut observer une différence de marquage entre les deux segments 1et 3. Noter le marquage intense dans les espaces péritybulaires du S3. Les flèches indiquent la présence d'un marquage des cellules apicales. L'insert sous le dernier panneau de droite est un agrandissement (x40) illustrant la présence d'un signal dans le cytoplasme apical des cellules apicales.

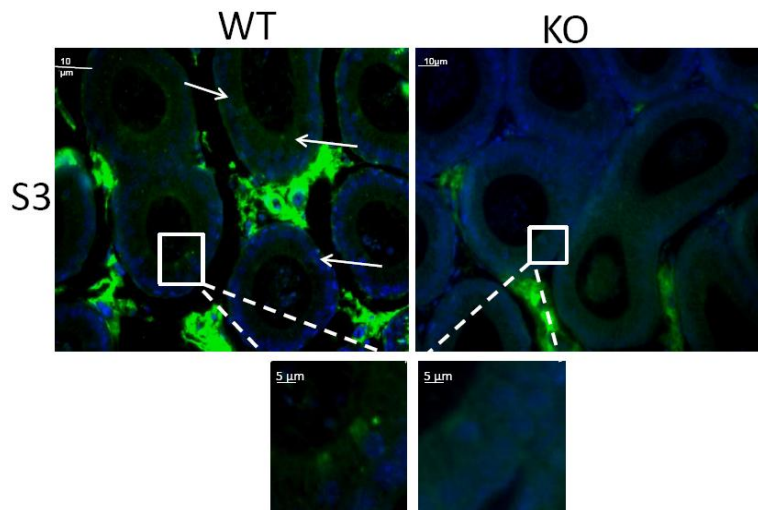


Figure R37 : Etude par immunofluorescence, dans l'épididyme de souris sauvages (WT) et KO pour IDO1 (KO), du signal correspondant à la kynurénine KYNA dans le segment 3. Prises de vue au microscope (x 10) effectuées à une même intensité, et un même traitement d'image a été réalisé. On peut observer une nette différence d'intensité de marquage entre les deux segments 3 WT et KO. Les flèches indiquent la présence d'un marquage des cellules apicales. Les inserts sous les panneaux sont des agrandissements (x40) illustrant de même la nette diminution du signal dans le cytoplasme apical des cellules apicales des animaux KO.

De façon à évaluer si des protéines spermatiques peuvent porter de telles modifications par kynurénification nous avons utilisé une approche en western-blot dans laquelle des extraits protéiques de spermatozoïdes collectés dans la queue de l'épididyme de souris sauvages et *Ido1*^{-/-} ont été déposés sur un gel SDS-PAGE. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane nylon et mis en présence des anticorps dirigés contre KA et HK. Nous montrons figure R42 que les anticorps anti-KA et anti-HK détectent plusieurs espèces protéiques spermatiques sur une gamme large de poids moléculaires et avec des intensités variables. Les profils protéiques révélés présentent des similitudes qui ne présument en rien sur ce type de gel monodimension de la concordance des espèces protéiques reconnues.

Quelques espèces protéiques (ne migrant pas à des tailles identiques) semblent être révélées de façon spécifique par les anticorps anti-KA ou anti-HK. La comparaison des profils protéiques reconnus par les deux anticorps entre le fond sauvage et le fond KO pour IDO1 révèle que l'essentiel des protéines reconnues est identique mis à part une à deux protéines qui ne sont plus détectées dans les fonds KO pour IDO1. Il semblerait donc qu'il y aurait une petite contribution des kynurénines issuent de l'activité IDO1 épithéliale au « pool » de kynurénines des spermatozoïdes.

V. L'invalidation d'IDO1 a t'elle un impact sur la fertilité des animaux et sur les paramètres spermatiques ?

1. Fertilité des mâles *Ido1*^{-/-}

Afin d'étudier l'impact de l'absence d'IDO1 sur les capacités reproductives des mâles *Ido1*^{-/-}, ces derniers ont été croisés avec des souris femelles BALB/c sauvages. Des souris femelles à un âge reproductif optimal (3 mois) ont été croisées avec des lots de mâles sauvages et *Ido1*^{-/-} âgés de 6 et 12 mois (n=5 par groupe, 2 femelles/mâle). Nous n'avons pas noté de changement dans le comportement lors de l'accouplement dans les groupes d'animaux testés. La figure R44 montre que quel que soit l'âge des mâles il n'y a aucune différence de fertilité entre les mâles sauvages et les mâles *Ido1*^{-/-} puisque les tailles des portées sont équivalentes entre les groupes (6.6+/-0.7 à 6 mois et 6.1+/-1.0 à

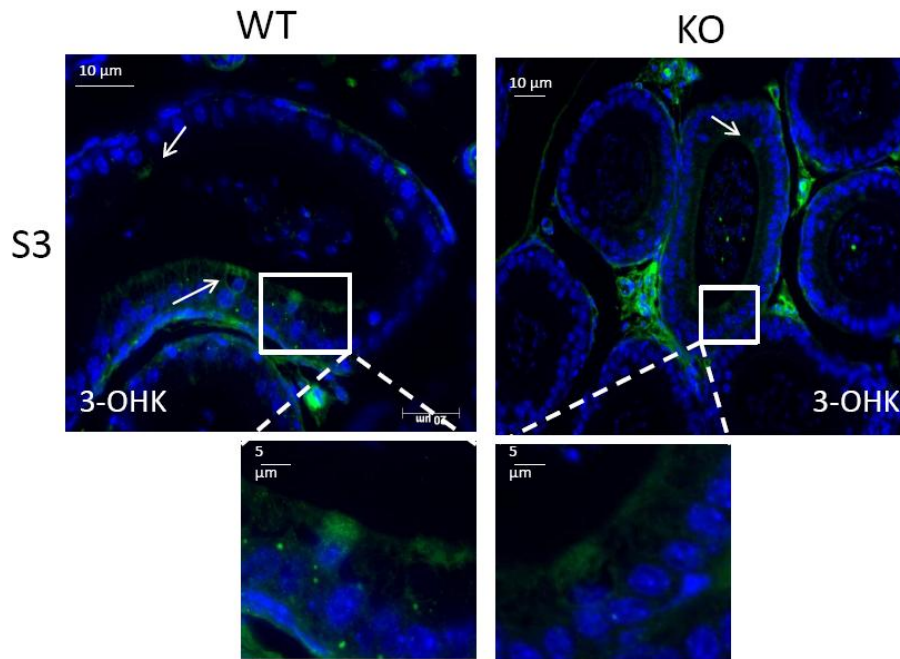


Figure R38 : Etude par immunofluorescence, dans l'épididyme de souris sauvages (WT) et KO pour IDO1 (KO), du signal correspondant à la kynurénine HK dans le segment 3. Prises de vue au microscope (x 10) effectuées à une même intensité, et un même traitement d'image a été réalisé. Les flèches indiquent la présence d'un marquage des cellules apicales. Les inserts sous les panneaux sont des agrandissements (x40) illustrant de même la diminution du signal dans le cytoplasme apical des cellules apicales des animaux KO. Par contre, à la différence de KA, les espaces intertubulaires du S3 restent fortement marqués par l'anticorps anti-HK chez les individus KO.

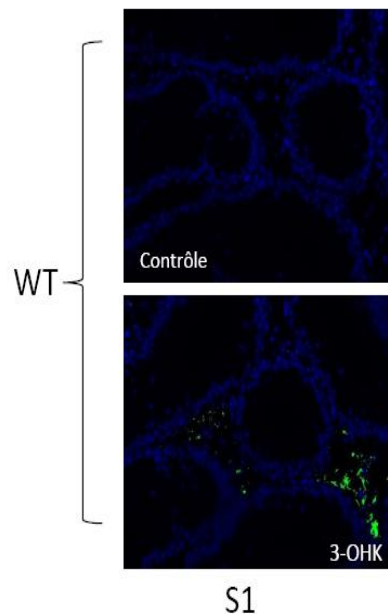


Figure R39 : Etude par immunofluorescence, dans l'épididyme de souris sauvages (WT) du signal correspondant à la kynurénine 3-OHK (3-hydroxy kynurénine) dans le segment 1. Prises de vue au microscope (x 10) effectuées à une même intensité, et un même traitement d'image a été réalisé. Noter le marquage dans les espaces péritybulaires du S1. Dans les coupes « contrôle » seul l'anticorps secondaire a été utilisé.

12 mois) lorsque les mâles sont KO pour IDO1 et (5.4+/-1.5 à 6 mois et 6.6+/-0.6 à 12 mois) lorsque les mâles sont sauvages. Le délai de gestation a été aussi comparé et n'a pas été trouvé statistiquement différent (non illustré). Ces données suggèrent, qu'au moins jusqu'à l'âge d'un an, l'absence d'IDO1 n'a pas d'impact délétère sur les capacités fécondantes des mâles *Ido1*^{-/-}.

2. Paramètres spermatiques des mâles *Ido1*^{-/-}

Bien que les capacités fécondantes des mâles *Ido1*^{-/-} ne soient pas affectées en monte naturelle, nous avons néanmoins cherché à évaluer certains paramètres spermatiques chez ces animaux. En premier lieu, nous montrons figure R45 que le nombre de spermatozoïdes collectés dans la queue de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} est significativement plus important (x 1,8 environ) que chez les animaux sauvages aux mêmes âges (6 mois). En l'absence de différence dans le poids des testicules des animaux KO pour IDO1 comparés aux animaux sauvages (illustré fig. R46), l'augmentation du nombre des spermatozoïdes n'est probablement pas due à une augmentation du rendement spermatogénique testiculaire.

En second lieu, nous montrons figure R47 que l'augmentation du nombre de spermatozoïdes enregistrée dans la queue de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 est accompagnée d'une augmentation du nombre de gamètes présentant une morphologie anormale (x 2,2 chez les KO par rapport aux sauvages) au détriment du « pool » de gamètes morphologiquement normaux (x 0,73 chez les KO par rapport aux sauvages). Les photographies présentées dans la figure R47 illustrent des exemples de morphologies spermatiques anormales trouvées plus fortement représentées dans la queue de l'épididyme des animaux KO pour IDO1. Les anomalies de morphologie de la tête spermatique sont les plus fréquentes avec une nette augmentation des spermatozoïdes présentant un phénotype dit de tête en « cerf-volant » (Kite-spermatozoa) chez les animaux KO pour IDO1. En troisième lieu, étant donné l'implication d'IDO1 dans le contrôle de l'inflammation et dans l'immuno-modulation et sachant que le fluide épидидymaire contient en plus des spermatozoïdes un certain nombre de leucocytes nous avons cherché à évaluer si le contenu en leucocytes dans le

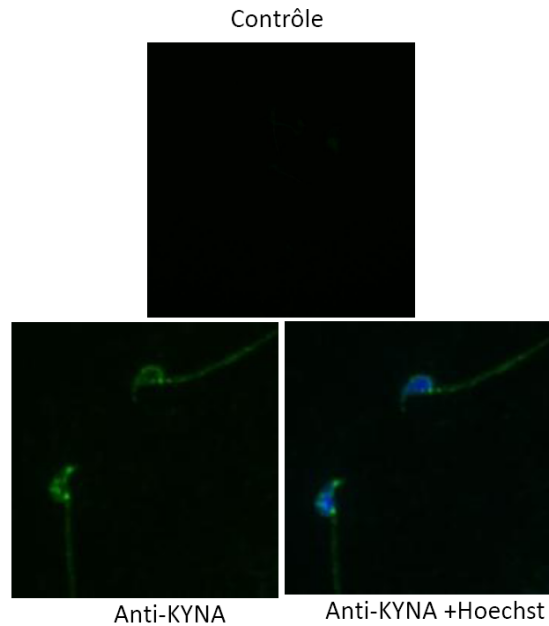


Figure R40 : Etude par immunofluorescence du signal correspondant à la kynurénine KYNA (acide kynurénique) sur des spermatozoïdes de queue d'épididyme de souris sauvages (en bas à gauche: coloration verte). Prises de vue au microscope (x 100) effectuées à une même intensité, et un même traitement d'image a été réalisé. Dans la photo « contrôle » seul l'anticorps secondaire a été utilisé. Un co-marquage Hoechst/anti-KYNA est présenté en bas à droite pour visualiser le noyau du spermatozoïde. Noter la localisation en foyer de KYNA dans la tête spermatique.

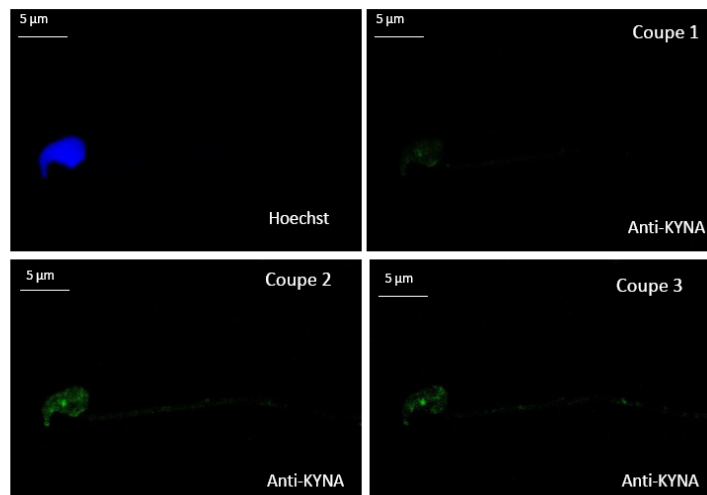


Figure R41 : Etude par immunofluorescence du signal correspondant à la kynurénine KYNA (acide kynurénique) sur des spermatozoïdes de queue d'épididyme de souris sauvages (en bas à gauche: coloration verte). Prises de vue au microscope confocal (à intervalle de 0,5µm, coupes 1 à 3). Un marquage Hoechst est présenté en haut à gauche pour visualiser le noyau du spermatozoïde. Noter la localisation en foyers et en interne (maximum de fluorescence au niveau de la coupe 2) de KYNA dans la tête spermatique.

fluide épидидymaire de la queue de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 est différent de celui trouvé chez les animaux sauvages. Nous montrons figure R48 que le nombre de leucocytes trouvés dans des échantillons de fluides prélevés dans la queue de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 est beaucoup moins important que chez les animaux « contrôles ».

Ainsi, la perte d'expression d'IDO1 est associée à une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme des mâles *Ido1*^{-/-}, ainsi qu'à une plus faible proportion de leucocytes. En outre, l'augmentation du nombre de spermatozoïdes stockés est associée à une plus forte proportion de spermatozoïdes morphologiquement anormaux.

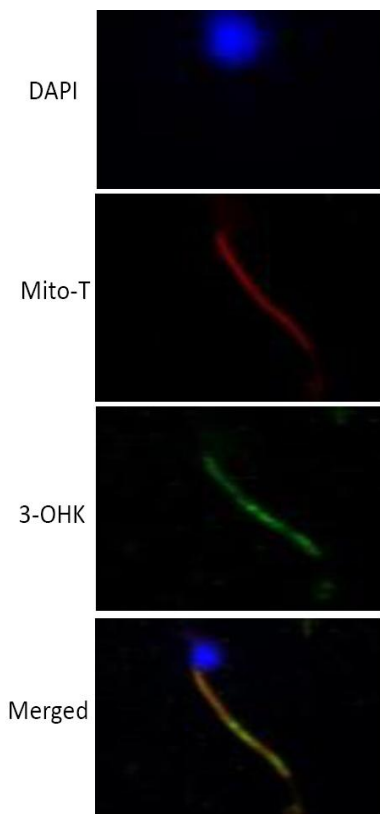


Figure R42 : Etude par immunofluorescence du signal correspondant à la kynurénine HK sur des spermatozoïdes de queue d'épididyme de souris sauvages. Un marquage DAPI (bleu) est présenté pour visualiser le noyau du spermatozoïde. Un marquage à l'aide d'un Mitotracker (rouge) marque la région de la pièce intermédiaire contenant le manchon mitochondrial. Le marquage obtenu avec l'anticorps anti-3-OHK est en vert. La dernière image (Merged) est une image de synthèse dans laquelle les trois marquages sont superposés. Apparaissent en jaune/vert les points de co-localisation de 3-OHK avec les mitochondries reconnues par le mitotracker.

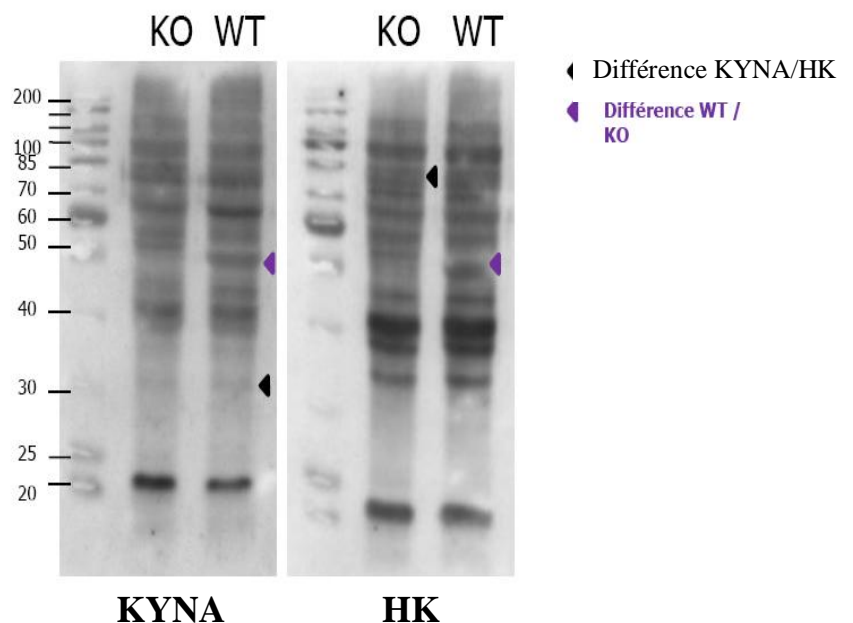


Figure R43 : Analyses par western-blot des protéines reconnues par les anticorps anti-KYNA et anti 3-OHK dans des extraits de protéines spermatiques préparées à partir de spermatozoïdes de queue d'épididyme de souris mâles âgées de 6 mois sauvages (WT) ou KO pour IDO1 (KO). Dans la marge gauche les nombres en Kilo daltons donne une indication de la taille des protéines reconnues par les anticorps. Les têtes de flèches (noires) ou (violette) mentionnent quelques espèces protéiques discrètes qui sont reconnues de façon différentielle par les deux anticorps ou de façon différentielle dans le fond sauvage versus le fond KO pour IDO1.

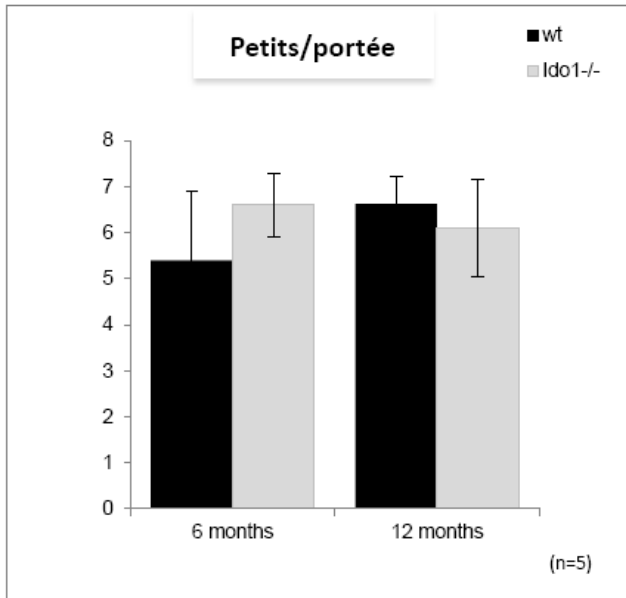


Figure R44 : La perte d'IDO1 n'affecte pas la fertilité des mâles. Histogrammes donnant le nombre moyen de petits obtenus par portées dans des croisements dans lesquels des mâles KO pour IDO1 ou sauvages (de 6 mois ou de 12 mois) ont été croisés avec des femelles sauvages de 3mois.

Figure R45 : Histogramme montrant que les mâles KO pour IDO1 ont un nombre de spermatozoïdes présents dans la queue de l'épididyme significativement supérieur à celui trouvé chez les mâles sauvages au même âge (6 mois). ** $P \leq 0.01$.

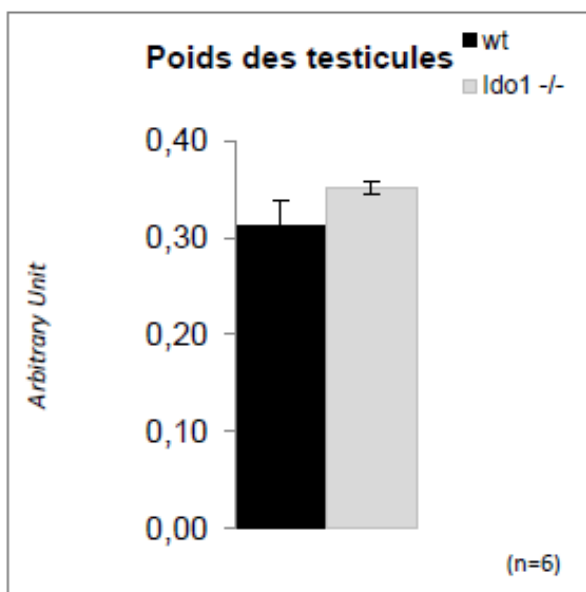
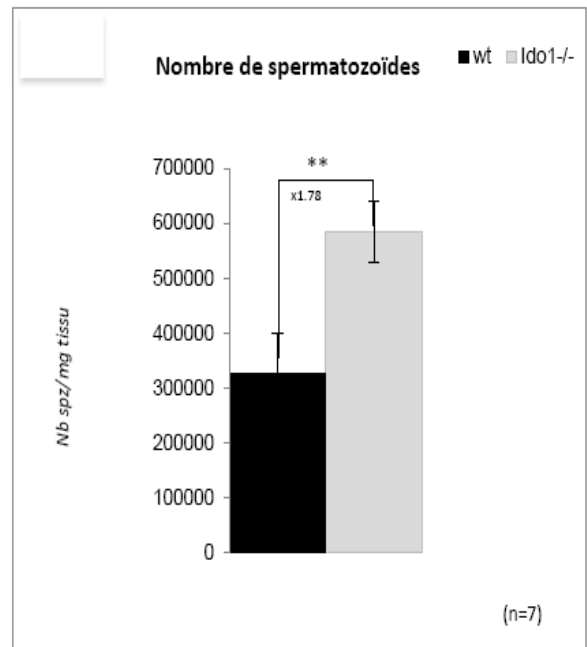


Figure R46 : Histogramme montrant que le poids des testicules des mâles KO pour IDO1 n'est pas significativement différent de celui des mâles sauvages de même âge (6 mois).

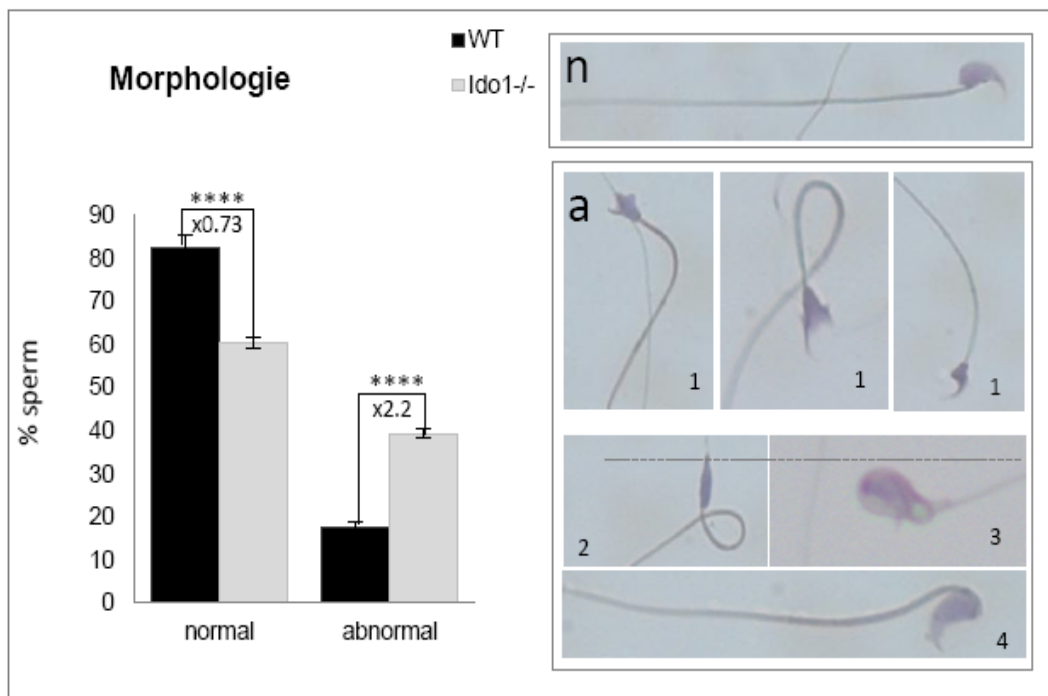


Figure R47 : Histogramme (à gauche) montrant les pourcentages de spermatozoïdes de morphologie normale ou anormale après coloration de Schorr et observation microscopique (x200). Les photographies à droite sont des exemples représentatifs des différents principaux types de morphologies rencontrés (n=normal; a=anormal : 1= spermatozoïdes « cerf-volant » = Kit- spermatozoa, 2= spermatozoïdes à tête plate = Pin-head spermatozoa, 3=spermatozoïdes à têtes géantes = giant-head spermatozoa, 4= spermatozoïdes à têtes angulés = kinked-spermatozoa). **** $P \leq 0.0001$.

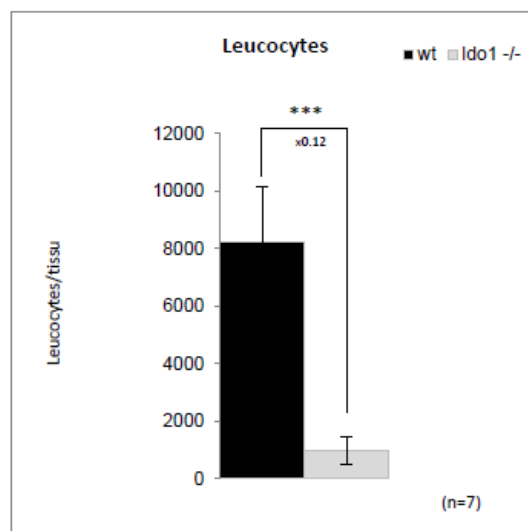


Figure R48 : Histogramme montrant que le nombre de leucocytes trouvés dans le fluide épидидymaire (queue d'épididyme) des mâles KO pour IDO1 est très significativement différent de celui des mâles sauvages de même âge (6 mois). *** $P \leq 0.001$.

Discussion

I. IDO1 et les métabolites résultant de l'activité IDO1 dans l'épididyme des souris sauvages et des souris KO pour IDO1

1. Les enzymes de dégradation du tryptophane dans l'épididyme murin

En accord avec les études précédentes (Yoshida *et al.*, 1980 ; Baban *et al.*, 2004 ; Britan *et al.*, 2006 ; Tone *et al.*, 2007 ; Dai & Zhu, 2010) nous montrons ici que *Ido1* est fortement exprimé dans la tête de l'épididyme de souris alors que *Tdo* et *Indol* (*Ido2*), les deux autres gènes codant pour des enzymes sœurs d'IDO1 sont plus faiblement exprimés. Les deux transcrits IDO1 sont accumulés de façon abondante (le transcrit 2 d'IDO1 étant cependant le transcrit prépondérant) dans la tête de l'épididyme murin et, leur cinétique d'accumulation est similaire atteignant un maximum à 30 jours post-natal, ce qui correspond à la maturité sexuelle. Nous montrons que l'arrivée des gamètes dans l'épididyme à la maturité sexuelle conditionne à 30j post-natal l'expression d'*Ido1* puisque si on bloque la spermatogenèse sans affecter les activités de sécrétion sertolienne (traitement au busulfan) on influe fortement sur le niveau d'accumulation des transcrits d'IDO1. Cette observation suggère fortement que l'expression maximale d'*Ido1* dans la tête de l'épididyme est conditionnée à l'arrivée des gamètes dans le tubule. Une telle réponse est en accord avec l'idée qu'IDO1 dans la tête de l'épididyme serait induite par le « challenge » immun que représente l'arrivée des spermatozoïdes antigéniquement « semi-étranger ». Il est intéressant de noter que l'expression d'*Indol* (*Ido2*) dans l'ontogenèse post-natale de l'épididyme n'est pas soumise à la même régulation puisque le niveau d'accumulation des transcrits de l'INDOL ne change pas entre 15j et 40j de développement post-natal. Ceci révèle que le gène de l'INDOL pourtant issu d'un événement de duplication génique de *Ido1* et situé à proximité de celui-ci (Ball *et al.*, 2007) n'est pas soumis dans la tête de l'épididyme murin aux mêmes événements de régulation que le gène codant pour IDO1.

Chez les animaux KO pour IDO1 (animaux *Ido1*^{-/-}), nous montrons une extinction totale de l'accumulation des 2 transcrits d'IDO1 dans la tête de l'épididyme des animaux KO sans que cela soit accompagné d'une compensation par la surexpression des autres enzymes qui catabolise le tryptophane (Trp) c'est à dire TDO et INDOL. On note même de façon surprenante que l'accumulation des transcrits de TDO et de INDOL apparaît

plus faible chez les animaux KO (voir fig. R3). La baisse d'expression d'*Indol* dans le fond génétique *Ido1*^{-/-} n'est pas surprenante car Baban *et al.*, 2004 ont déjà rapporté cette observation de l'expression diminuée d'*Indol* dans le fond KO pour IDO1. Cette sous expression de *Indol* dans le fond *Ido1*^{-/-} a été attribuée à la proximité des deux gènes *Ido1* et *Indol* sur le chromosome (< à 5 kb) et au fait qu'ils partagent certaines séquences *cis*-régulatrices (Baban *et al.*, 2004). En accord avec la perte des transcrits majeurs d'IDO1 et la non compensation par INDOL et par TDO, nous montrons ici que la production de kynurénines dans les extraits de têtes d'épididyme des souris KO pour IDO1 est grandement affectée (voir fig. R8) puisque le niveau de kynurénines est effondré. Cette observation suggère qu'IDO1 exprimée dans l'épithélium épiddymaire est l'enzyme majeure assurant la production des kynurénines dans les têtes d'épididyme de souris. La contribution de TDO et d'INDOL à cette production de kynurénines épiddymaires est donc faible.

2. Les métabolites issus de la dégradation du tryptophane par IDO1 dans l'épididyme de souris sauvages et KO

Concernant les kynurénines, il est intéressant de noter que le niveau de kynurénines dans les extraits de têtes d'épididyme de souris est élevé comparé à la concentration en kynurénines dans le plasma (comparer 1400 nmol/l dans le plasma avec $80 \cdot 10^6$ nmol/kg dans les extraits de têtes d'épididyme) [voir fig. R8]. Ceci est en accord avec l'expression constitutive d'IDO1 dans le territoire épiddymaire. Il est intéressant de noter par ailleurs que le niveau de kynurénines dans le plasma des animaux KO pour IDO1 diminue mais dans une moindre mesure comparé aux extraits épiddymaires de ces mêmes animaux. Les différences n'étant mêmes plus significatives dans les plasmas des souris KO *versus* les souris sauvages pour les autres kynurénines situées plus bas dans la cascade (telles que KA et HK). Ces observations suggèrent que soit IDO1 n'est pas une enzyme prépondérante pour la production des différentes kynurénines dans le plasma, soit que des compensations sont à l'œuvre (sans doute par les autres enzymes de dégradation du Trp, TDO et INDOL) pour maintenir la production de kynurénines plasmatiques.

En dehors de la concentration élevée en kynurénine (L-kynurénine= KYNU), le premier produit de la dégradation du Trp par IDO1 (voir fig. R6), nous montrons ici que

les espèces suivantes de la cascade des kynurénines les plus représentées dans les extraits de têtes d'épididyme sont l'acide kynurénique (KA) et la 3-hydroxy-kynurénine (HK). Cette forte représentation en KA et HK dans les extraits de têtes d'épididyme est corrélée à l'observation que parmi les différentes enzymes de la cascade des kynurénines (Fig. R6), la tête de l'épididyme exprime préférentiellement (voir fig. R7) la formaminase (AFMID) et la kynurénine amino-transférase (KAT3). De façon logique, associée à la chute de la concentration en L-kynurénine, les concentrations en KA et HK sont aussi très significativement effondrées dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 (Fig. R8).

Dans ce travail nous avons aussi tenté par immunohistochimie et immunocytochimie de localiser dans l'épididyme et sur les spermatozoïdes épидидymaires les métabolites terminaux principaux de la voie des kynurénines (KA et HK) (voir fig. R35 à R42). Nous montrons que dans le tissu épидидymaire KA et HK ont une double localisation puisque nous avons pu les détecter dans l'épithélium au sein des cellules apicales et dans le tissu intersticiel (intertubulaire). Baban *et al.*, 2004 et Britan *et al.*, 2006 avaient déjà rapporté que l'expression d'IDO1 concernaient deux sous populations de l'épithélium épидидymaire, les cellules principales et les cellules apicales, et que c'était au niveau des cellules apicales que l'expression a été trouvée la plus forte.

Comme nous n'avons pas de connaissance de la distribution cellulaire dans l'épididyme des enzymes AFMID et KAT3 à l'origine de la production de KA et HK, respectivement, nous pouvons seulement avancer l'hypothèse que nous détectons KA et HK dans les cellules apicales probablement parce que ces enzymes sont préférentiellement exprimées dans ce type cellulaire. Dans ces deux territoires (tissu intersticiel et cellules épithéliales apicales) l'accumulation de KA et HK diminue fortement chez les animaux KO pour IDO1 sans toutefois disparaître complètement en accord avec l'idée que IDO1 n'est pas la seule enzyme à métaboliser le Trp exprimée dans le tissu épидидymaire. KA n'est pas détecté dans le segment 1 de l'épididyme en accord avec le fait qu'IDO1 n'est pas non plus exprimée dans ce segment de l'épididyme. A la différence, HK est présente dans les espaces intertubulaires du segment 1 de l'épididyme. Ce qui pourrait laisser suggérer que dans ce territoire ce n'est pas IDO1 qui contribue à la formation de cette kynurénine. TDO que nous avons trouvé exprimée dans

les cellules musculaires lisses péritubulaires dans tous les segments de l'épididyme pourrait être à l'origine de cette kynurénine dans le segment 1 (Britan *et al.*, 2006). Que ce soit pour KA et HK nous ne les détectons pas dans la lumière du tubule épидидymaire ce qui pourrait laisser penser que ces kynurénines ne sont pas (en tous les cas pas massivement) exportées vers le fluide luminal. Cependant nous montrons ici que les spermatozoïdes sont positifs pour ces kynurénines et ce quel que soit le fond génétique, WT ou KO pour IDO1. Ceci signifie que 1) les spermatozödes ont fait l'acquisition de ces kynurénines avant leur entrée dans l'épididyme donc probablement durant la phase testiculaire de la spermatogenèse et, 2) que IDO1 n'est pas majoritairement à l'origine des kynurénines spermatiques. A nouveau, TDO pourrait-être une bonne candidate en tant que source des kynurénines spermatiques puisque nous avons déjà montré que l'enzyme TDO est présente sur les spermatozoïdes épидидymaires et qu'elle est mise en place dans le gamète au stade spermatide allongée de la spermatogenèse (Britan *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter que la localisation de KA et de HK sur le gamète de queue d'épididyme est différente. Nous rapportons ici que KA est plutôt localisée au niveau de la tête spermatique dans des sous domaines internes probablement du noyau spermatique comme le suggère les images en microscopie confocale. HK quant à elle est localisée dans la pièce intermédiaire des gamètes au niveau des mitochondries. Cette localisation mitochondriale de HK est en accord avec le fait que l'enzyme responsable de la synthèse de HK (K3H) a été localisée à la membrane externe de la mitochondrie (Okamoto *et al.*, 1967).

II. Rôles potentiels des kynurénines dans la physiologie de l'épididyme et des gamètes mâles

1. Modulateurs de l'immunité

Des résultats récents rapportés dans la littérature ont suggéré que ces métabolites de la cascade des kynurénines (KYNU, KA et HK) contribuent à l'établissement des situations d'immuno-tolérance vis à vis de cellules étrangères, par exemple dans les cas de tumeurs et dans les situations de greffes allogéniques (Liu & Wang, 2009 ; Zhu, 2010).

Dans le cas de KYNU, cet effet est réalisé *via* la suppression de la prolifération des cellules T (Hwu *et al.*, 2000 ; Terness *et al.*, 2002). Moins d'éléments sont disponibles quant aux rôles immunosuppresseurs de KA et de HK. Il a été suggéré que KA puisse exercer un rôle complémentaire à celui de KYNU sur les cellules T en réduisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IFN- γ (Wang *et al.*, 2006). Plus récemment encore, KA a été montré comme favorisant le recrutement et l'aggrégation leucocytaire sur les endothélia vasculaires *via* un mécanisme dépendant d'un récepteur membranaire couplé aux protéines G ou GPCR (Barth *et al.*, 2009). Ainsi en accord avec l'hypothèse qu'IDO1 pourrait dans l'épididyme exercer un rôle immunomodulateur, les métabolites issues de l'activité IDO1 et du « pathway » des kynurénines les plus représentés dans ce tissu pourraient aussi avoir des actions immuno-modulatrices. Nous discuterons plus avant de cet aspect un peu plus loin.

2. Modificateurs post-traductionnels de protéines

En dehors de leur participation à la régulation de la réponse immune d'autres rôles ont été évoqués pour ces métabolites kynurénines. KYNU et HK ont été présentés comme des agents modificateurs post-traductionnels de protéines. En effet, KYNU et HK peuvent se fixer secondairement sur certains acides aminés nucléophiles (histidine, cystéine et lysine, en particulier) sur des protéines et conduire à la kynurénylation de ces protéines. Ce type de modification a été trouvée par exemple sur l' α 1-microglobuline (Sala *et al.*, 2004), une protéine sécrétée de la famille des lipocalines de fonction inconnue, et sur les protéines du cristallin de l'œil (α -cristallines) (Staniszewska & Nagaraj, 2005). Il a été suggéré que ces modifications des protéines cristallines *via* la kynurénylation pouvaient provoquer des événements d'aggrégation protéique à l'origine de l'opacification caractéristique de la pathologie de la cataracte (Aquilina & Truscott, 2000 ; Staniszewska & Nagaraj, 2005). HK a été aussi impliquée dans le « cross-linking » de protéines de l'œil indirectement *via* la modification redox de ces mêmes cristallines kynurenyles sous l'effet de réactions photochimiques lors de l'exposition lumineuse (Parker *et al.*, 2004).

En effet, HK contient un groupe hydroxyle réactif qui peut générer des espèces oxygénées réactives (EOR : H₂O₂ en particulier) dans des réactions de réduction avec des métaux de transition (Goldstein *et al.*, 2000).

Selon la théorie radicalaire du vieillissement, la baisse des défenses anti-oxydantes au cours de l'âge expliquerait alors l'exacerbation de l'aggrégation des protéines du cristallin et ainsi l'opacification dans cette pathologie typique du vieillissement qu'est la cataracte. A l'instar de ce qui est évoqué ci-dessus, un rôle aggrégant de HK et de KYNU sur des protéines spermatiques pourrait donc être envisageable. Ces phénomènes d'aggrégation protéique *via* la kynurénation pourraient faire partie du large éventail des modifications protéiques subies par les protéines spermatiques au cours de la maturation épидидymaire contribuant à renforcer/solidifier/structurer cette cellule particulière qu'est le spermatozoïde. Nous avons entrepris de caractériser dans les différents compartiments du spermatozoïde mature épидидymaire quelles sont les protéines sujettes à la kynurénation par des approches de protéomique (gels bi-dimensionnels) couplées à des approches western-blot et à de la spectrométrie de masse. Alternativement, des approches d'immuno-précipitation pourront être tentées.

3. Découpleurs mitochondriaux

Comme évoqué plus haut, de façon logique avec la localisation mitochondriale de l'enzyme K3H qui est responsable de la formation de HK à partir de KYNU, nous avons trouvé HK associée aux mitochondries de la pièce intermédiaire du spermatozoïde. Il a été suggéré dans un autre contexte (cellules musculaires cardiaques) que HK (ainsi que d'autres kynurénines comme : KYNU, KA, AA et HAA) pourraient jouer un rôle de découpleur mitochondrial contribuant ainsi à baisser la synthèse d'ATP *via* la chaîne respiratoire en réduisant l'index de contrôle respiratoire et le ratio oxygène/ADP de mitochondries stimulées par les substrats respiratoires glutamate/malate (Baran *et al.*, 2003). Pour HK cet effet « découpleur mitochondrial » serait dose-dépendant *in vitro* à des concentrations de l'ordre du micro-molaire. Il est à noter que de tels niveaux de concentration en kynurénines sont non-physiologiques dans la plupart des tissus mais qu'ils correspondent aux concentrations élevées en KYNU, HK et KA trouvées dans ce travail dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux sauvages.

Il n'est pas exclu cependant que l'effet inhibiteur des kynurénines sur l'efficacité de la respiration mitochondriale ne soit associé à leurs effets pro-oxydant évoqués ci-dessus qui perturberaient le fonctionnement mitochondrial (Baran *et al.*, 2003).

4. KA : un antagoniste de la signalisation glutamatergique

L'effet le mieux répertorié de KA est son rôle d'antagoniste de la signalisation glutamatergique. En effet KA est un bloqueur endogène efficace des récepteurs ionotropiques au glutamate (récepteurs N- Methyl-D-Aspartate = récepteurs NMDA ; Perkins & Stone, 1982 ; Stone, 2001), des récepteurs α -amino- 3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (récepteurs AMPA ; Stone & Addae, 2002) et un bloqueur non-compétitif des récepteurs α 7-nicotiniques dans le cerveau (Hilmas *et al.*, 2001). Ainsi KA serait un inhibiteur d'influx calcique intracellulaire classiquement transduit par ces récepteurs (Kessler *et al.*, 1989 ; Singer & Diamond, 2003). Il est intéressant de noter que le spermatozoïde possède de tels récepteurs et que la distribution géographique de ces récepteurs sur le gamète est régionalisée (Meizel, 2004). Des inhibiteurs de signalisation calcique comme KA pourraient ainsi participer à la quiescence du spermatozoïde épидидymaire à la fois en ce qui concerne l'expression de sa mobilité et l'absence de déclenchement prématuré de la capacitation et de la réaction acrosomique, deux événements qui nécessitent une signalisation calcique pour être mis en œuvre.

III. IDO1 : un modulateur de l'état inflammatoire et de l'installation d'un état d'immunotolérance dans la tête de l'épididyme

En accord avec les rôles présumés d'IDO dans la modulation de l'immunité nous montrons ici que l'inactivation d'IDO1 est accompagnée dans l'épididyme des animaux KO d'un changement important du ratio K/T (kynurénine/tryptophane) un indicateur fiable de l'activation d'IDO et de la dégradation du Trp qui a été retrouvé associé avec la progression de plusieurs pathologies inflammatoires chroniques ou aiguës (Giusti *et al.*, 1996 ; Medana *et al.*, 2003 ; Schröecksnadel *et al.*, 2006). Dans les pathologies inflammatoires le rapport K/T classiquement augmente à cause de l'induction de l'IDO et de son activité de dégradation du Trp libre selon la voie des kynurénines.

Il est intéressant de noter ici que chez les animaux sauvages le ratio K/T des têtes d'épididyme est 38 fois supérieur à celui des plasmas des mêmes animaux suggérant que physiologiquement la tête de l'épididyme murin est dans un contexte immunomodulateur/inflammatoire particulier en accord avec l'expression constitutive

et forte d'IDO1 et les concentrations élevées en kynurénines dans ce tissu. Dans le fond *Ido1*^{-/-} nous montrons ici que le ratio K/T chute considérablement (-285 fois) dans les têtes d'épididyme alors que la baisse est nettement moindre dans les plasmas de ces mêmes animaux (-3 fois). Cette observation souligne une fois encore le rôle majeur joué par IDO1 dans la tête de l'épididyme en tant que pourvoyeur principal des métabolites de la voie des kynurénines. L'atteinte plus faible du ratio K/T dans les plasmas des animaux KO pour IDO1 reflète probablement les compensations exercées par les autres enzymes catabolisant le Trp (TDO et INDOL). Nous avons montré que de telles compensations n'existaient pas (au moins au niveau transcriptionnel) dans les têtes d'épididyme des souris KO pour IDO1.

Ainsi, en accord avec les rôles immunomodulateurs connus d'IDO, l'activité constitutive IDO1 dans l'épididyme pourrait être la réponse du tissu face à la situation immunitaire particulière de ce tissu qui doit régler un problème inflammatoire déclenché par la présence des spermatozoïdes (lesquels représentent un challenge immunologique) et la nécessité de créer un environnement immunotolérant vis à vis de ces mêmes gamètes. Si tel est le cas l'inactivation d'IDO1 et la chute des métabolites de la voie des kynurénines dans l'épididyme devrait placer le tissu épидидymaire dans une contrainte inflammatoire plus importante et devrait le pousser à trouver un nouvel équilibre inflammation/immunotolérance. Nous montrons ici que c'est effectivement ce qui se passe.

L'aggravation de l'état inflammatoire du tissu épидидymaire est avérée par plusieurs observations :

- les concentrations en cytokines pro-inflammatoires classiques : INF- γ , TNF- α , IL-6 et IL-1 β sont significativement augmentées dans les têtes d'épididyme des animaux KO comparées aux animaux sauvages.
- les concentrations en plusieurs chémokines inflammatoires et en plusieurs interleukines, qui rendent compte de l'activation du lignage lymphocytaire T (un acteur clef de la réponse immunitaire inflammatoire) sont aussi augmentées dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 comparées aux animaux sauvages.

On notera au passage que cette réponse cytokinique a lieu uniquement dans

l'épididyme et non dans les plasmas de ces mêmes animaux dans lesquels on a vu ci-dessus le rapport K/T était plutôt préservé. On a donc pas dans ce modèle *Ido1*^{-/-} de réponse systémique à la perte de l'activité IDO1 (dans l'espèce, pas de réponse similaire à celle engagée dans l'épididyme !). Ceci atteste de la spécificité tissulaire de la réponse inflammatoire engagée uniquement dans l'épididyme à l'issue de la perte de l'activité IDO1.

D'autres indicateurs directs et indirects de l'aggravation de l'état inflammatoire des tissus de têtes d'épididymes des animaux KO pour IDO1 comparés aux mêmes tissus chez les animaux sauvages viennent des observations que :

- les cyclo-oxygénases COX1 et COX2 sont transcriptionnellement stimulées dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 en comparaison avec les animaux sauvages. Il est à noter que, en ce qui concerne l'expression des cyclo-oxygénases, l'épididyme est déjà dans une situation particulière puisqu'il présente une expression constitutive de COX2 (Stanfield & Khan, 2003 ; Johnston *et al.*, 2005). La cyclo-oxygénase COX2 est, normalement dans tous les tissus, induite en situation inflammatoire en réponse aux cytokines classiques de l'inflammation (INF- γ , TNF- α). L'expression constitutive de COX2 dans l'épididyme est à relier à l'expression constitutive d'IDO1 dans ce même tissu. Toutes deux témoignent de la situation inflammatoire particulière mais physiologique de l'épididyme. COX1 quant à elle est exprimée basalement dans tous les tissus chez les mammifères et n'est pas classiquement impliquée dans la régulation des réponses immunes (Smith *et al.*, 1998). Cependant, il est intéressant de noter que des rapports récents ont montré que COX1 pouvait être activement impliquée dans des phénomènes d'immunomodulation (Chen *et al.*, 2008) et que cet effet pouvait en partie passer par la production d'IL17 par le sous-lignage Th17 (Blaho *et al.*, 2009).

En accord avec la stimulation des cyclo-oxygénases, nous montrons ici que le ratio des intermédiaires lipidiques de la série 6 et de la série 3 (Oméga6/Oméga3) qui sont à l'origine des substrats métabolisés par les cyclo-oxygénases pour produire des effecteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (voir Fig. R29) est modifié significativement dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 comparées aux animaux sauvages.

- en accord avec l'augmentation des concentrations en TNF- α dans les extraits de têtes d'épididymes des animaux KO pour IDO1 nous montrons ici que la voie des sphingolipides/céramides est significativement activée dans ces mêmes extraits comparativement aux animaux sauvages. Comme nous l'avons illustré dans la figure R20, la voie des sphingolipides/céramides est un des relais intracellulaires dans la transmission d'un signal apoptotique *via* la signalisation inflammatoire du TNF- α (Schwandner *et al.*, 1998; Pimentel-Muinos & Seed, 1999; Plumpe *et al.*, 2000). En accord avec la mise en oeuvre d'une signalisation apoptotique nous montrons que des sections du segment 2 du tubule épидидymaire des animaux KO pour IDO1 sont plus positives pour un marquage immunohistochimique anti-caspase3, un acteur de la cascade apoptotique. Cependant, ce marquage reste faible et n'a été observé que dans le segment 2 de l'épididyme des animaux KO pour IDO1.

Nous n'avons pas pu à ce jour mettre en évidence si en contrepois de cette activation de la voie apoptotique (TNF- α /sphingolipides-céramides) il y avait aussi activation de la voie de survie dont la cascade intracellulaire passe par la mobilisation du facteur NF- κ B (voir fig. R20). C'est probablement le cas puisque un grand nombre de gènes dont nous avons trouvé ici les produits augmentés (gènes de cytokines, gènes de chémokines,...) sont des cibles de NF- κ B (Bonizzi & Karin, 2004; Caamano & Hunter, 2002 ; Lawrence, 2009). D'une façon générale, la voie de survie ne doit pas être très stimulée car nous n'avons pas enregistré de différence dans le niveau de prolifération cellulaire (évaluée par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines PCNA et Ki67) dans des sections de têtes d'épididyme d'animaux KO pour IDO1 comparées aux animaux sauvages (non-illustré).

Ainsi, malgré l'augmentation de la signalisation TNF- α , la balance apoptose/prolifération ne semble pas être altérée de façon significative dans le tissu épидидymaire en l'absence d'IDO1.

Nous continuerons à analyser la voie NF-KB car à coté des rôles pro-inflammatoires bien décrits de ce facteur, il apparaît clairement maintenant que NF-KB (*via* ses différents hétérodimères de protéines) est aussi impliqué dans des actions anti-inflammatoires (Lawrence & Fong, 2010).

- plus indirect, mais que nous pensons relié à un phénotype inflammatoire, est notre surprenante observation que les dépôts de tissus adipeux blanc péri-épididymaires (EWAT= epididymal white adipose tissue) ont été trouvés significativement diminués autour des épидидymes des animaux KO pour IDO1 comparés aux animaux sauvages. Cette diminution de volume et de masse de ce dépôt adipeux blanc correspond à une diminution de la croissance de ce dépôt adipeux au cours du vieillissement des animaux, puisque nous avons montré que les volumes de ces dépôts adipeux sont encore plus réduits à 12 mois qu'ils ne le sont à 6 mois. La diminution de volume et de masse de ce dépôt est spécifique à plus d'un titre. Premièrement, elle n'est pas accompagnée d'une différence d'IMC entre les animaux KO pour IDO1 et les animaux sauvages. Donc, cela ne correspond pas à un phénotype "maigre" général des animaux *Ido1*^{-/-}. Deuxièmement, elle ne concerne que le dépôt adipeux blanc péri-épididymaire puisque nous avons testé en parallèle d'autres dépôts abdominaux (tels que les dépôts de tissus adipeux blancs inguinaux et péritonéaux) et ceux-ci sont inchangés quels que soient l'âge et le génotype des animaux. Troisièmement, à l'intérieur du tissu adipeux blanc péri-épididymaire cette perte de volume et de masse de l'EWAT ne concerne que la partie du tissu qui est la plus proche de la tête de l'épididyme. Nous avons montré que la diminution de volume et de masse de ce dépôt adipeux était due à la fois à une baisse de la taille des adipocytes et à une baisse du nombre des adipocytes. En dehors des fonctions de stockage et des fonctions endocrines du tissu adipeux blanc, il a été clairement établi que le tissu adipeux blanc constitue aussi un réservoir de cellules immunes et inflammatoires (Poglio *et al.*, 2010). Il a aussi été montré que chaque dépôt adipeux blanc en fonction de sa localisation présente des propriétés immunologiques différentes (Caspar-Bauguil *et al.*, 2009). Plus particulièrement, il a été montré que le EWAT est fortement enrichi en cellules NK et NKT à fonctions anti-tumorales, ainsi qu'en certaines sous-populations de cellules T; des caractéristiques que le EWAT partage avec les tissus épithéliaux où ces cellules immunes aident à maintenir l'intégrité tissulaire, la défense contre les pathogènes et l'inflammation (Doherty & O'Farrelly, 2000; Kaufman, 1996).

Nous faisons ici l'hypothèse que cette perte ciblée du EWAT chez les animaux KO pour IDO1 est secondaire au règlement de la situation pro-inflammatoire générée dans la tête de l'épididyme de ces animaux. Deux aspects pourraient être à prendre en

compte : un aspect dépense énergétique locale accrue et/ou un aspect mobilisation locale des cellules de l'immunité du EWAT pour soutenir la réponse inflammatoire de la tête de l'épididyme. Par une approche préliminaire en cytométrie de flux nous montrons ici que en ce qui concerne les sous-populations lymphocytaires T du EWAT, celles-ci ne sont quantitativement pas différentes dans les deux fonds génétiques. Nous n'avons pas non plus remarqué en immunohistochimie de différences dans la réponse à un marqueur pan-leucocytaire (anti-CD45) sur des sections de EWAT des deux fonds génétiques (non-illustré). Ces observations suggèrent pour le moins qu'il n'y a pas d'infiltration leucocytaire du EWAT chez les animaux KO pour IDO1.

A ce jour nous ne sommes pas en mesure d'expliquer plus avant cette perte ciblée du EWAT proximal à l'épididyme chez les animaux KO pour IDO1. Par ailleurs en regard de la fonction majeure de l'épididyme qui est la maturation des spermatozoïdes, il est à noter qu'une étude récente a révélé que le EWAT jouait un rôle de support dans la production et la maturation des gamètes mâles (Chu *et al.*, 2010). A l'instar de ce groupe nous montrons donc ici que l'EWAT pourrait localement participer au contrôle de l'inflammation dans le territoire épидидymaire.

1. La perte d'IDO1 dans l'épididyme modifie les balances des sous-populations T (Th1/Th2/Th17/Treg)

Grâce à la signature cytokinique de la réponse immune observée dans le tissu épидидymaire du fond *Ido1*^{-/-} nous pouvons avancer que le tissu épидидymaire est engagé dans une réponse immune T-dépendante. Cette hypothèse est par ailleurs confortée par le fait que nous observons, dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1, une augmentation des concentrations des facteurs de stimulation des colonies leucocytaires GM-CSF (produit par les cellules T) et G-CSF (produit par les cellules dendritiques et les cellules T et régulant l'équilibre Th1/Th2).

La réponse T classiquement résulte de l'engagement de cellules T naïves auxquelles *via* des macrophages activés ou *via* des cellules dendritiques interdigitées activées sont présentés des peptides antigéniques. Jusqu'à très récemment, il était considéré que l'épithélium épидидymaire n'était pas engagé dans des activités de présentation antigénique. Or, Da Silva *et al.* (2011) ont identifié un réseau dense de

cellules dendritiques interdigitées fonctionnelles dans l'épithélium épidiymaire et ce, en particulier, dans les régions proximales de la tête de l'épididyme. Ces cellules dont le corps cellulaire est situé au niveau des cellules basales de l'épithélium épidiymaire émettent de longues et nombreuses projections cellulaires ou dendrites entre les cellules principales et apicales de l'épithélium jusqu'à atteindre la bordure apicale de la lumière du tubule. Ils ont montré par ailleurs que ces cellules dendritiques interdigitées de l'épithélium épidiymaire nommées eDC (pour epididymal Dendritic Cells) ont les caractéristiques des cellules dendritiques trouvées dans l'épithélium intestinal lesquelles participent à l'immunité mucoale de cet épithélium digestif (Da Silva *et al.*, 2011). Ces cellules dendritiques de l'épithélium intestinal expriment IDO (Matteoli *et al.*, 2010). Ainsi, il est fort probable que l'on assiste au niveau de l'épithélium épidiymaire à une intense activité de présentation d'antigènes luminaux et donc d'antigènes spermatiques.

L'expression épidiymaire d'IDO1 trouverait ici son explication, puisque *via* les effets immunosuppresseurs associés à IDO1 et à ses produits d'activité (ie : les kynurénines) elle exercerait un frein sur la réponse T engagée suite à la présentation des antigènes spermatiques aux cellules T naïves conduisant ainsi à une situation d'immunotolérance. Ce rôle serait tout à fait conforme à celui joué par IDO au niveau des cellules géantes trophoblastiques de l'interface fœto-maternelle (Mellor & Munn, 2004) où l'activité IDO contribue à diminuer la réponse T de la mère engagée par l'implantation du fœtus allogénique. Un problème de taille subsiste qui est que l'on ne peut à ce jour corréliser l'expression d'IDO1 dans l'épithélium épidiymaire aux eDC (Da Silva *et al.*, communication personnelle).

Quelle que soit la source d'IDO1 dans l'épididyme, la logique voudrait que son expression contribue à inhiber la réponse T engagée suite à la présentation des antigènes spermatiques de façon à préserver la situation d'immunotolérance vis à vis des gamètes mâles. Ainsi, en l'absence d'IDO1 et de ses produits d'activités (les kynurénines) et de leurs rôles connus sur les équilibres des sous lignages T (voir section bibliographique) l'on est en droit d'attendre des modifications de ces équilibres des sous populations T dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 comparativement aux animaux sauvages.

a. Déplacement de l'équilibre Th17/Treg

Comme évoqué dans l'introduction bibliographique, IDO et ses produits d'activité, les kynurénines, sont des promoteurs du sous-lignage Treg. Ces dernières *via* la production de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et TGF β participent à l'installation d'un état d'immunotolérance, en inhibant la différenciation des cellules T inflammatoires et en particulier du sous-lignage Th17. En absence d'IDO1 dans les têtes d'épididymes des animaux KO nous pouvons donc attendre un éventuel déplacement de la balance Th17/Treg.

Nous montrons ici que c'est exactement ce qui se passe dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1. En effet, nos observations indiquent que la perte d'IDO1 favorise, dans les têtes d'épididymes des animaux KO, la différenciation du sous-lignage Th17 comme en témoigne la plus forte expression du facteur de transcription RORc (aussi nommé ROR γ T), le facteur de transcription de la différenciation des Th17 à partir des cellules T naïves. En accord avec cette observation, nous avons aussi trouvé que, en amont de RORc, la voie d'activation STAT3 spécifique de la différenciation du sous-lignage Th17 est aussi activée comme en témoigne l'augmentation de la phosphorylation de STAT3 dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 comparés aux animaux sauvages. En parallèle, nous n'avons pas vu de modification de la représentation des transcrits de FOXP3 (le facteur de transcription clef de la différenciation des cellules naïves en Treg) ni d'activation de la voie d'activation STAT5 correspondante. Il est intéressant de noter que malgré l'absence d'IDO1 et des kynurénines la différenciation Treg (mesurée par l'accumulation de FOXP3 et *via* l'activation de STAT5) n'est pas significativement différente de celle enregistrée dans les extraits de têtes d'épididyme d'animaux sauvages. Ceci suggère que des phénomènes compensatoires sont à l'œuvre pour maintenir la différenciation Treg dans les tissus épидидymaires des animaux KO pour IDO1.

b. Déplacement de l'équilibre Th1/Th2 vers une réponse de type Th1

La signature cytokinique du tissu épидидymaire en réponse à la perte de l'expression d'IDO1 non seulement indique qu'une réponse T est engagée dans les têtes

d'épididyme des souris *Ido1*^{-/-}, elle indique également que la réponse T est plutôt de type Th1. Plusieurs arguments soutiennent cette interprétation puisque nous observons que les cytokines du lignage Th1 (Borish & Steinke, 2003):

- que cela soient les chémokines qui recrutent les Th1 [comme CCL3 (MIP1 α), CCL5 (RANTES), CXCL9 (MIG) et CXCL11 (ITAC)],
- les cytokines qui stimulent la réponse Th1 (comme l'IL-12p70 et l'IL-12p40p70) et,
- les interleukines résultantes de l'activation des Th1 (telles que, IL-2, IL-6, IL-1 β , TNF- α et INF- γ),

sont significativement augmentées dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 comparées à celles des animaux sauvages.

En parallèle, la concentration en chémokines qui recrutent plutôt les Th2 [comme (MCP1) (TCA3) et (TARC)] et, plus évocateur encore, la concentration en IL-4, l'interleukine prépondérante du Th2, ne changent pas entre les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 et celles des animaux sauvages.

Le déplacement de l'équilibre Th1/Th2 vers les Th1 est aussi soutenu par l'observation que seul le facteur de transcription Tbet, spécifique de la différenciation des cellules T naïves en cellules Th1 est significativement plus abondant dans les têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1. Aucune différence significative dans l'accumulation du facteur de transcription GATA-3 (spécifique de l'engagement des cellules T naïves vers la différenciation Th2) n'a été observé dans les mêmes échantillons.

Notre interprétation que la perte d'IDO1 déclenche une réponse immune de type Th1 dans les têtes d'épididyme des animaux KO est aussi supportée par l'augmentation de la concentration en leptine dans les extraits tissulaires. Il a été montré que la leptine stimule la réponse immune pro-inflammatoire Th1 (Matarese, 2000 ; La Cava *et al.*, 2004).

Il a par ailleurs été rapporté que la leptine avait des actions pro-inflammatoires et immunomodulatrices dans plusieurs pathologies auto-immunes caractérisées par une réponse Th1-autoréactive (Otéro *et al.*, 2006 ; Matarese *et al.*, 2005).

Promouvoir une réponse Th1 dans l'épididyme des animaux KO pour IDO1 est somme toute logique car il a été rapporté que les kynurénines, et en particulier HK (3 hydroxy kynurénine), une des kynurénines majoritaires dans les extraits épидидymaires

(Jrad-Lamine *et al.*, 2011) inhibent les actions des cellules Th1 et favorisent les actions des cellules Th2 (Platten *et al.*, 2005). La littérature a de même clairement établi que les actions immunosuppressives d'IDO et son rôle dans l'induction de la tolérance immune passaient par l'inhibition de la population Th1 (Xu *et al.*, 2008). De la même façon, il a été montré que la stimulation de l'activité IDO dans les cellules dendritiques réduit les réponses Th1 (Orabona *et al.*, 2006) et que, au contraire l'inhibition de l'activité IDO (par exemple, avec le 1-méthyl Trp) augmente la sévérité des atteintes inflammatoires liées aux Th1 (Kwidzinski *et al.*, 2005). Ainsi, en l'absence de ces kynurénines ou dans un contexte de forte réduction de leur concentration, comme c'est le cas dans l'épididyme des animaux KO pour IDO1 (ce travail), il est logique d'assister à un déplacement de l'équilibre Th1/Th2 en faveur des Th1.

En conclusion de cet aspect, de façon canonique, la perte d'IDO1 et des kynurénines dans le tissu épидидymaire provoque un déplacement de l'équilibre Th17/Treg en faveur des Th17, lesquels par leurs cytokines (et aussi à cause de l'absence des effets spécifiques des kynurénines sur les sous populations Th1 et Th2) influencent l'équilibre Th1/Th2 en faveur des Th1 (Xu *et al.*, 2008). Ceci est en accord avec la littérature qui souligne que dans les situations d'immunotolérance l'expression d'IDO est plutôt associée à une réponse Th2 (Xu *et al.*, 2008).

Nos essais préliminaires de cytométrie en flux sur les épидидymes des animaux sauvages et *Ido1*^{-/-} supportent aussi cette évolution puisque sur la petite population T du tissu épидидymaire nous montrons que chez les animaux KO pour IDO1 la population de cellules T^{CD8+} (cellules T cytotoxiques) est augmentée comparativement aux animaux sauvages. La stimulation de l'immunité à médiation cellulaire est ce qui est attendu d'une réponse Th1. On notera au passage que cette augmentation se fait au détriment des cellules T^{CD3+DN}.

c. Quelques pistes pour expliquer le nouvel équilibre Inflammation/Immuno-tolérance atteint par le tissu épидидymaire des animaux KO pour IDO1

Il est intéressant de constater que bien que la perte d'expression d'IDO1

provoque dans le tissu épидидymaire des animaux KO un état plus inflammatoire associé à un déséquilibre Th17/Treg/Th1/Th2 en faveur des Th17 et des Th1, cela ne s'accompagne pas de changements dramatiques de l'équilibre immun et physiologique du tissu. En d'autres mots la situation inflammatoire est régulée et le tissu ne s'engage pas vers des manifestations inflammatoires plus sévères, comme par exemple la formation de granulomes. On ne note pas non plus d'infiltration leucocytaire (mesurée par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps pan-leucocytaire anti-CD45) dans le tissu épидидymaire (non-illustré). Ceci suggère que des mécanismes régulateurs se sont mis en place afin d'élaborer un nouvel équilibre immun au sein du tissu épидидymaire préservant à la fois la notion d'immunotolérance vis à vis des gamètes et la gestion de la réponse inflammatoire qu'ils contribuent à créer.

Bien que nous n'ayons pas à ce stade tous les éléments pour comprendre cette situation, nous avons quelques arguments expérimentaux qui nous permettent de privilégier quelques pistes :

1- Il a été démontré que les actions immunosuppressives (baisse de l'inflammation et maintenance de la tolérance périphérique) des cellules Treg est essentiellement assurée par leur production de la cytokine immunosuppressive IL-10 et du facteur TGF β 1. L'IL-10 est une puissante cytokine anti-inflammatoire et les Treg sont les pourvoyeurs majeurs de cette cytokine. Il est intrigant de noter que dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 nous avons trouvé une augmentation significative de la concentration en IL10 malgré le déséquilibre du ratio Treg/Th17 en faveur des Th17. La littérature mentionne que bien que le Treg soit le principal producteur d'IL-10, cette dernière n'est pas restreinte aux seuls Treg. D'autres types cellulaires, tels que les Th1, Th2, les cellules T^{CD8+} (cellules T cytotoxiques), les lymphocytes B, les mastocytes, certaines cellules phagocytaires et les cellules présentatrices d'antigènes dans certaines conditions peuvent produire de l'IL-10 (Borish & Steinke, 2003).

L'élévation des concentrations en IL-10 notées dans les extraits épидидymaires des animaux KO pour IDO1 peut très bien avoir pour origine l'un ou l'autre de ces types cellulaires, en particulier les eDC, les T^{CD8+} et les Th1. En ce qui concerne TGF β 1, en plus d'être produit par les Treg, TGF β 1 est par ailleurs un acteur autocrine qui favorise la

différenciation des cellules Treg (Sakaguchi, 2000 ; Chen *et al.*, 2003). Il est intéressant de mentionner que dans une approche transcriptomique dans laquelle nous avons comparé les profils transcriptionnels trouvés dans les têtes d'épididymes des animaux KO pour IDO1 et sauvages (non illustré ici), l'un des transcrits trouvé très fortement surexprimé dans le fond KO code pour un facteur de la famille TGF β /BMP, en l'occurrence BMP8a. BMP8a a été rapporté dans la littérature comme étant un acteur dans le programme de différenciation de l'épithélium épидидymaire (Zhao *et al.*, 1998 ; Zhao *et al.*, 2001). Ces auteurs ont par ailleurs montré que l'absence de l'expression de BMP8a ainsi que de BMP7 dans des modèles murins transgéniques conduit à la génération d'un phénotype inflammatoire dans l'épididyme de ces animaux caractérisé par la survenue plus fréquente de granulomes causés par l'arrivée des spermatozoïdes dans le tubule (Zhao *et al.*, 2001). Ces observations soutiennent l'idée que BMP8a pourrait participer au contrôle de la réponse immune dans l'épididyme. Il est alors possible que dans une réponse anti-inflammatoire autocrine/paracrine l'épithélium épидидymaire des animaux *Ido1*^{-/-} ait recouvré un équilibre immun en activant une voie de signalisation BMP/TGF β /Activine. Il sera nécessaire de définir quel type cellulaire au sein de l'épithélium est impliqué dans cette stimulation de l'expression de BMP8a dans le fond *Ido1*^{-/-}. De même, il sera nécessaire de vérifier que les effecteurs en aval de la signalisation BMP (les facteurs SMAD) sont activés dans l'épithélium épидидymaire. Enfin, il faudra démontrer aussi que la signalisation BMP8a maintient la différenciation des Treg au sein de l'épithélium épидидymaire. Cette question pourra être posée dans le fond KO pour BMP8a ou dans le double KO BMP8a/BMP7.

2- A coté de cette signalisation TGF β -like, il est possible que l'équilibre immun du tissu épидидymaire dans le fond *Ido1*^{-/-} soit en partie maintenu par un phénomène physiologique plus général que nous avons révélé ici en caractérisant le phénotype épидидymaire des animaux KO.

En effet, nous avons remarqué que l'activité du protéasome épидидymaire est divisée par 2 dans les extraits de têtes d'épididyme des animaux KO pour IDO1 comparativement aux animaux sauvages (Jrad-Lamine *et al.*, 2011). L'inhibition du protéasome a été récemment proposée comme étant un mécanisme de sauvetage anti-inflammatoire qui ralentit le « turn-over » protéique des cellules concernées. Cela permet

d'un côté de diminuer la production de cytokines inflammatoires et de l'autre, cela permet aussi de diminuer la présentation antigénique *via* le CMH (Qureshi *et al.*, 2005 ;Qureshi *et al.*, 2011). L'inhibition du protéasome pourrait donc être un mécanisme anti-inflammatoire supplémentaire mis en oeuvre dans l'épithélium épидидymaire des animaux *Ido1*^{-/-} pour rétablir l'équilibre de la réponse immune. Il sera nécessaire de pousser les investigations pour valider cette hypothèse. En particulier, il sera intéressant d'évaluer l'activité de présentation antigénique *via* l'expression des molécules du CMH de classes I et II dans les extraits épидидymaires des animaux KO pour IDO1 comparativement aux animaux sauvages.

IV. L'invalidation d'IDO1 ne perturbe pas la fertilité des animaux mais diminue la qualité de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes

Nous montrons ici que la perte de l'activité IDO1 dans l'épithélium épидидymaire ne s'accompagne pas d'une baisse de fertilité des animaux KO. Ceux-ci sont en effet aussi performants que des mâles sauvages dans les tests de fertilité que nous avons menés pour féconder en monte naturelle de jeunes souris femelles sauvages. Nous n'observons dans les conditions de nos tests de fertilité aucune incidence sur la fécondation, le délai de conception et le nombre de petits par portée. Des tests plus poussés seront néanmoins nécessaires pour évaluer plus finement l'impact de l'invalidation d'IDO1 sur la fertilité mâle. Par exemple, pour s'affranchir de l'effet sélection par le tractus génital femelle du pool de spermatozoïdes les plus performants, nous aurons recours à la fécondation *in vitro* (FIV).

Par contre, il est intéressant de noter que bien que l'efficacité de la reproduction ne semble pas affectée par l'invalidation d'IDO1, la qualité de la maturation des spermatozoïdes au sein de l'épididyme des animaux KO est altérée.

Cette altération se manifeste par l'observation que le nombre de spermatozoïdes collectés dans la queue de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 est près de deux fois plus élevé que celui trouvé dans les queues d'épididyme des animaux sauvages de même âge. Nous avons vérifié que cette différence de nombre de spermatozoïdes n'était pas due à une différence du rendement de la spermatogenèse chez les animaux KO en comparant

le poids des testicules des animaux dans les deux génotypes. Nous avons aussi vérifié que ces différences n'étaient le fait d'une différence de libido et que les animaux KO avaient le même rythme de monte que les animaux sauvages. Les cellules germinales testiculaires représentant 80% des cellules de la gonade mâle, le poids des gonades devrait être augmenté si la spermatogenèse est plus intense. Nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les deux génotypes suggérant que le nombre plus élevé de spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 ne provient pas d'une activité spermatogénique accrue.

Le nombre plus élevé de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 est en outre associé à un nombre plus important de spermatozoïdes morphologiquement anormaux. Cette observation suggère plutôt que c'est le processus d'épuration des gamètes anormaux qui a lieu normalement durant le transit épидидymaire (pour revues voir : Sutovsky, 2003 ; Axner, 2006) qui est altéré chez les animaux KO. Trois processus non exclusifs ont été évoqués pour l'épuration épидидymaire des spermatozoïdes anormaux ou/et nécrotiques (Jones, 2004) : la spermiphagie par des cellules de l'immunité présentes dans le fluide épидидymaire, l'autophagie par les cellules de l'épithélium épидидymaire et la participation d'un équipement protéasomal embarqué dans des vésicules au niveau du fluide épидидymaire (Baska *et al.*, 2008 ; Dominguez & Ward, 2009). De façon intéressante nous avons évoqué plus haut que l'activité protéasome des extraits épидидymaires des souris KO pour IDO1 est diminuée d'environ 50%. Ceci pourrait expliquer la plus faible épuration épидидymaire chez les animaux *Ido1*^{-/-} et donc le plus grand nombre de spermatozoïdes et de spermatozoïdes anormaux stockés dans la queue de l'épididyme de ces animaux. Cette activité protéasomale épuratrice dans la tête de l'épididyme est en accord avec l'observation qu'il existe dans ce compartiment une activité de sécrétion apocrine d'ubiquitine (Baska *et al.*, 2008).

Nous montrons aussi dans ce travail que le nombre plus élevé de spermatozoïdes constaté dans la queue de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 est associé à un nombre très significativement plus faible de leucocytes dans le fluide épидидymaire. Ainsi, l'épuration des spermatozoïdes (nécrotiques, déféctueux, anormaux) dans l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} peut aussi souffrir d'une épuration spermiphagique moindre par les leucocytes qui normalement infiltrent la lumière du tubule

épididymaire. Nous faisons l'hypothèse que les modifications de l'équilibre immun (environnement cytokinique) de l'épididyme que nous avons décrites ci-dessus suite à l'inactivation d'IDO1 modifient le niveau d'infiltration leucocytaire dans le fluide épидидymaire.

Ainsi notre interprétation du phénotype de moindre épuration épидидymaire est qu'il est colatéral au nouvel équilibre inflammatoire atteint par le tissu épидидymaire des animaux KO pour IDO1 qui repose sur un changement de l'environnement cytokinique et une diminution de l'activité protéasomale du tissu.

Conclusions et
perspectives

CONCLUSIONS

Nos travaux montrent qu'IDO1 est un acteur de l'équilibre immunitaire de l'épididyme murin. En accord avec les rôles immunomodulateurs connus d'IDO et de ses produits d'activité (les kynurénines), IDO1 dans l'épididyme murin influence sur l'équilibre Th17/Treg en faveur des Treg contribuant ainsi à l'établissement d'un environnement tolérogénique vis à vis des gamètes mâles qui sollicitent la réponse immunitaire adaptative de l'hôte. Dans ce contexte fonctionnel, et, de façon logique, les animaux KO pour IDO1 présentent un léger déplacement de l'équilibre immunitaire qui se traduit par une augmentation de l'état inflammatoire de l'épididyme et un engagement limité de l'immunité à médiation cellulaire reposant sur les cellules Th1. Malgré ce léger déséquilibre pro-inflammatoire, les fonctions physiologiques de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} ne sont pas mises en péril et les animaux sont totalement fertiles. L'inactivation d'IDO1 conduit néanmoins à l'apparition d'un double phénotype épидидymaire caractérisé d'une part par des manifestations autophagiques épithéliales localisées à la région proximale de la tête (segment 2) et, d'autre part, par une proportion accrue de gamètes stockés dans la partie distale de l'organe (cauda). Un phénotype annexe de lipodystrophie est aussi observé chez les animaux *Ido1*^{-/-} caractérisé par une absence de croissance des dépôts adipeux péri-épididymaires. L'augmentation du nombre de gamètes stockés dans la queue de l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} est surtout représentée par l'augmentation du nombre de gamètes morphologiquement aberrants qui normalement sont épurés lors de la descente épидидymaire. Cette observation suggère que les mécanismes épидидymaires d'élimination des spermatozoïdes défectueux sont affectés dans le modèle *Ido1*^{-/-}. Trois mécanismes non exclusifs sont mis en avant par la littérature lorsque l'on évoque l'épuration épидидymaire : l'autophagie par l'épithélium épидидymaire, la spermiphagie par des cellules de l'immunité présentes dans le fluide épидидymaire et des activités de type protéasome associées au fluide épидидymaire. Il est intéressant de noter que nous avons enregistré chez les animaux *Ido1*^{-/-} une baisse importante de l'activité du protéasome, des manifestations autophagiques de l'épithélium épидидymaire proximal

et une diminution très significative du taux de leucocytes présents dans le fluide épидидymaire.

Notre interprétation de la situation est la suivante : la rupture de l'équilibre inflammation/immunotolérance vis à vis des gamètes mâles provoquée par la perte de l'expression de IDO1 dans la tête de l'épididyme conduit à l'installation d'un état plus inflammatoire. Le tissu épидидymaire régule cette inflammation accrue en mobilisant les effets immunomodulateurs du tissu adipeux périphérique et en diminuant l'activité protéasomale de l'épithélium (une manifestation déjà répertoriée dans d'autres contextes comme faisant partie d'une réponse anti-inflammatoire). Ces réponses perturbent l'environnement cytokinique de l'épididyme conduisant à une plus faible chémo-attraction leucocytaire et à une plus faible épuration luminale des spermatozoïdes.

Par ailleurs nos investigations révèlent que les kynurénines sont présentes dans des domaines discrets sur le gamète mâle où elles pourraient jouer des rôles variés structuraux et fonctionnels.

PERSPECTIVES

La poursuite de ces travaux va se faire dans plusieurs directions majeures.

A court terme nous préciserons l'impact réel de l'invalidation d'IDO1 sur la fertilité mâle en réalisant des fécondations *in vitro* (FIV) de femelles sauvages hormonalement stimulées de façon à s'affranchir de la sélection des spermatozoïdes « performants » par le tractus génital femelle.

Des expériences de CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) seront menées en parallèle pour appréhender les paramètres de mobilité des spermatozoïdes dans le fond *Ido1*^{-/-} comparativement aux animaux contrôles.

Dans une première orientation, nous chercherons à mieux caractériser les réponses anti-inflammatoires et de maintien de la tolérance immune engagés dans l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-}.

Une approche transcriptomique comparative des gènes dont l'expression est dérégulée dans la tête de l'épididyme des animaux KO pour IDO1 en comparaison aux tissus contrôle de souris sauvage a déjà été conduite. Celle-ci est en cours d'analyse *in silico* afin de définir les éventuels réseaux de gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie. Déjà, quelques acteurs émergent de cette analyse et en particulier la signalisation TGF β /BMP/Activine évoquée dans la discussion ci-dessus. Quel(s) type(s) cellulaire(s) de l'épithélium épидидymaire est(sont) concerné(s) par cette signalisation reste(nt) à définir ?

Dans une autre approche, nous testerons la solidité du nouvel équilibre immunitaire atteint dans l'épididyme des animaux *Ido1*^{-/-} par exemple via des injections localisées de lipopolysaccharides bactériens (LPS) qui provoquent de puissantes réponses inflammatoires.

Une meilleure caractérisation des populations leucocytaires épидидymaires et de leurs rôles est aussi à envisager.

Dans une seconde orientation nous souhaitons poursuivre les investigations sur les kynurénines spermatiques. Nous avons localisé KA, HK, mais aussi KYNU (non montré ici) sur le spermatozoïde murin. Brièvement ces trois kynurénines ont des localisations distinctes sur le gamète ; KA étant à localisation nucléaire, HK à localisation mitochondriale et KYNU à localisation flagellaire.

Des approches de protéomique bi-dimensionnelles associées à de l'immunolocalisation et à de la spectrométrie de masse devraient nous permettre de caractériser les protéines spermatiques concernées par les événements de kynurénylation. Des techniques d'immunoprécipitation pourront aussi compléter ces approches.

La participation de KA (antagoniste de la signalisation calcique) et de HK (potentiel découpleur mitochondrial) sera testée fonctionnellement en soumettant *in vitro* les spermatozoïdes épидидymaires des fonds sauvages et *Ido1*^{-/-} à ces métabolites qui sont commercialement disponibles. Des tests de signalisation calcique, et d'évaluation de la maturité mitochondriale seront réalisés.

Références
bibliographiques

A

Abe K, Takano H, Ito T. 1983. Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. *Arch Histol Jpn* 46:51-68.

Abe M, Minagawa F, Yoshino Y T, Saikawa K, Saito T. 1980. Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr* 48: 109

Abou-Haila A, Fain-Maurel M. 1984. Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterisation. *Anatomical Record* 209:197-208.

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. 2002. *Cells. Nat Immunol* 3(6):549-57.

Agarwal A, Hoffer AP. 1989. Ultrastructure studies on the development of the blood - epididymis barrier in immature rats. *J Androl* 10: 425-431.

Agaugue S, Perrin-Cocon L, Coutant F, Andre P, Lotteau V. 2006. 1-methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. *J Immunol* 177:2061-2071.

Aitken JB, Thomas SE, Stocker R, Thomas SR, Takikawa O, Armstrong RS, Lay PA. 2004. Determination of the nature of the heme environment in nitrosyl indoleamine 2,3-dioxygenase using multiple-scattering analyses of X-ray absorption fine structure. *Biochemistry* 43: 4892-4898.

Alberati-Giani D, Malherbe P, Ricciardi-Castagnoli P, Köhler C, Denis-Donini S, Cesura AM. 1997. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN-gamma-activated murine macrophages and microglial cells. *J Immunol* 159(1):419-26.

Alexander AM, Crawford M, Bertera S, Rudert WA, Takikawa O, Robbins PD, Trucco M. 2002. Indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 51: 356-365.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* Mar 5(3):266-71.

Aquilina JA, Truscott RJ. 2000. Cysteine is the initial site of modification of alpha crystallin by kynurenine. *Biochem Biophys Res Commun* 276 (1):216-23.

Araki Y, Suzuki K, Matusik RJ, Obinata M, Orgebin-Crist MC. 2002. Immortalized epididymal cell lines from transgenic mice overexpressing temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *J Androl* 23(6):854-69.

Austin CR. 1951. Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust J Sc Res (B)* 4:581-92.

Austin CJ, Mailu BM, Maghzal GJ, Sanchez-Perez A, Rahlfs S, Zocher K, Yuasa HJ, Arthur JW, Becker K, Stocker R, Hunt NH, Ball HJ. 2010. Biochemical characteristics and inhibitor selectivity of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase-2. *Amino Acids* 39(2):565-78.

Avruch J, Belham C, Weng Q, Hara K, Yonezawa K. 2001. The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity. *Prog Mol Subcell Biol* 26:115-54.

Aveldano MI, Rotstein NP, Vermouth NT. 1992. Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmemylcholines containing longchain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochem J* 283 (Pt 1):235-241.

Axnér E. 2006. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology* 66(1):14-24.

B

Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn, DH, Mellor A L. 2004. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *J Reprod Immunol* 61: 67-77.

Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJ, Astelbauer F, Miu J, McQuillan JA, Stocker R, Jermini LS, Hunt NH. 2007. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 396:203–213.

Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJ, Weiser S, Hunt NH. 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 41(3):467-71.

Baran H, Jellinger K, Deecke L. 1999. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 106 (2):165-81.

Baran H, Staniek K, Kepplinger B, Stur J, Draxler M, Nohl H. 2003 . Kynurenines and the respiratory parameters on rat heart mitochondria. *Life Sci* 72(10):1103-15.

Barth M, Ahluwalia N, Anderson TJJ, Hardy GJ. 2009. Kynurenic Acid Triggers Firm Arrest of Leukocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions 284:19189–19195.

Baska KM, Manandhar G, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, Yi YJ, Sutovsky P. 2008. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J Cell Physiol* 215(3):684-96.

Beagley KW, Wu ZL, Pomeroy M, Jones RC. 1998. Immune responses in the epididymis: implications for immunocontraception. *J Reprod Fertil Suppl* 53:235-45.

Beaulieu V, Da Silva N, Brown C R, Smith P J, Brown D, Breton S. 2004. Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H⁺ATPase (V-ATPase) recycling. *J Biol Chem* 280(9):8452-63.

- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. 1995. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377(6550):630-2.
- Benahmed M, Lobaccaro JM. 2007. Multiple roles of the nuclear receptors for between principal cells of the rat epididymis. *Microsc Res Tech* 30(1):54-66.
- Bendall DS. 1996. Protein electron transfer. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Bild AH, Turkson J, Jove R. 2002. Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *EMBO J* 21:3255-63.
- Bladergroen BA, Strik MC, Bovenschen N, van Berkum O, Scheffer GL, Meijer CJ, Hack CE, Kummer JA. 2001. The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J Immunol* 166(5):3218-25.
- Blaho VA, Buczynski MW, Dennis EA, Brown CR. 2009. Cyclooxygenase-1 orchestrates germinal center formation and antibody class-switch via regulation of IL-17. *J Immunol* 183(9):5644-53.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8):911-7.
- Boadle-Biber MC. 1993. Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 60: 1-15.
- Bomgardner D, Wehrenberg U, Rune GM. 1999. TGF- β could be involved in paracrine actions in the epididymis of the marmoset monkey (*callithrix jacchus*). *J Androl* 20:375-83.
- Bonizzi G, Karin M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25(6):280-8.
- Borish LC, Steinke JW. 2003. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111(2 Suppl):S460-75.
- Bozza S, Fallarino F, Pitzurra L, Zelante T, Montagnoli C, Bellocchio S, Mosci P, Vacca C, Puccetti P, Romani L. 2005. A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. *J Immunol* 174:2910-2918.
- Brastianos HC, Vottero E, Patrick BO, Soest RV, Maitainaho T, Mauk AG, Andersen RJ. 2006. Exiguamine A, an indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor isolated from the marine sponge *Neopetrosia exigua*. *J Am Chem Soc* 128:16046-16047.
- Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR. 2006. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res* 324:301-10.
- Brown RR. 1996. Metabolism and biology of tryptophan. Some clinical implications. *Adv Exp Med Biol* 398:15-25.

Burkin, DJ, Kimbro, KS, Barr, BL, Jones C, Taylor MW, Gupta SL. 1993. Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. *Genomics* 17:262-263.

Burudi EM, Marcondes MC, Watry DD, Zandonatti M, Taffe MA, Fox HS. 2002. Regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in simian immunodeficiency virus-infected monkey brains. *J Virol* 76:12233-12241.

C

Caamaño J, Hunter CA. 2002. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 15(3):414-29.

Cao Y, Klionsky DJ. 2007. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res* (10):839-49.

Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI. 1987. Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Immunol* 139(7):2414-8.

Caspar-Bauguil S, Cousin B, Bour S, Casteilla L, Penicaud L, Carpéné C. 2009. Adipose tissue lymphocytes: types and roles. *J Physiol Biochem* 65(4):423-36.

Chauhan N, Basran J, Efimov I, Svistunenko DA, Seward HE, Moody PC, Raven EL .2008. The role of serine 167 in human indoleamine 2, 3-dioxygenase: a comparison with tryptophan 2, 3-dioxygenase. *Biochemistry* 47:4761-4769.

Chaves AC, Cerávolo IP, Gomes JA, Zani CL, Romanha AJ, Gazzinelli RT. 2001. IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma. *Eur J Immunol* 31(2):333-44.

Chon SY, Hassanain HH, Gupta SL. 1996. Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p 91(STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Biol Chem* 271:17247-17252.

Chon SY, Hassanain HH, Pine R, Gupta SL. 1995. Involvement of two regulatory elements in interferon-gamma-regulated expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Interferon Cytokine Res* 15: 517-526.

Chu Y, Huddleston GG, Clancy AN, Harris RB, Bartness TJ. 2010. Epididymal fat is necessary for spermatogenesis, but not testosterone production or copulatory behavior. *Endocrinology* 151(12):5669-5679.

Cobbold S, Waldmann H. 1998. Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* (5):518-24.

Cohen B, Peretz D, Vaiman D, Benech P, Chebath J. 1988. Enhancer-like interferon responsive sequences of the human and murine (2'-5') oligoadenylate synthetase gene promoters. *Embo J* 7:1411-1419.

Connor TJ, Starr N, O'Sullivan JB, Harkin A. 2008. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma? *Neurosci Lett* 441(1):29-34.

Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW. 2005. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* 25(17): 7637-44.

Cooper TG, Yeung CH, Jones R, Orgebin-Crist M C, Robaire B. 2002. Rebuttal of a role for the epididymis in sperm quality control by phagocytosis of defective sperm. *J Cell Sci* 115: 5-7.

Cooper TG, Yeung CH. 2003. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech* 61(1): 28-38.

Cooper TG. 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 53:119-136.

Cornwall GA, Lareyre JJ, Matusik RJ, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. 2002. Gene Expression and Epididymal Function. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp 169-200.

Cottrez F, Groux H. 2004. Specialization in tolerance: innate CD (4+) CD (25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* 77(1 Suppl):S12-5.

Crocker PR, Jefferies WA, Clark SJ, Chung LP, Gordon S. 1987. Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen. *J Exp Med*. 166(2):613-8.

Cuervo A M. 2011. Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 535-541

Curiel TJ. 2007. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 117(5):1167-74.

Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. 2009. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 113(11):2394-401.

Curzon G. 1996. Brain tryptophan. Normal and disturbed control. *Adv Exp Med Biol* 398: 27-34.

Cyr DG, Finnson K, Dufresne J, Gregoty M. 2002. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Edited by Robaire and Hinton, Kluwer Academic/Plenum Publishers, p103-118.

Cyr DG, Gregory M, Dube E, Dufresne J, Chan PT, Hermo L. 2007. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian J Androl* 9:463-475.

Cyr DG, Robaire B, Hermo L. 1995. Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microsc Res Tech* 30: 54-66.

D, E, F

Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirski FK, Pittet MJ, Breton S. 2011. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141: 653-663.

Dacheux, J L, Gatti JL, Dacheux F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 61(1): 7-17.

Dadoune, JP & Demoulin A. 2001. Structure et fonctions du testicule. In: *La reproduction chez les mammifères et l'homme* Thibault C, Levasseur MC. Eds. Ellipses, Paris: 256-288.

Dai W, Gupta SL. 1990. Regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. *J Biol Chem* 265:19871-19877.

Dai X, Zhu BT. 2010. Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. *J Histochem Cytochem* 58(1):17-28.

Dai Z, Nasr IW, Reel M, Deng S, Diggs L, Larsen CP, Rothstein DM, Lakkis FG. 2005. Impaired recall of CD8 memory T cells in immunologically privileged tissue. *J Immunol* 174(3):1165-70.

Dal Secco V, Riccioli A, Padula F, Ziparo E, Filippini A. 2008. Mouse Sertoli cells display phenotypical and functional traits of antigen-presenting cells in response to interferon gamma. *Biol Reprod* 78(2):234-42.

Däubener W, Posdziech V, Hadding U, MacKenzie CR. 1999. Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med Microbiol Immunol* (3):143-7.

Dayer JM, Beutler B, Cerami A. 1985. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 162:2163-2168.

De Kretser DM, Huidobro C, Southwick GJ, Temple-Smith PD. 1998. The role of the epididymis in human infertility. *J Reprod Fertil Suppl* 53:271-5.

De la Maza LM, Peterson EM. 1988. Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res* 48(2):346-50.

De Rooij DG. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121(3):347-354.

Deslee G, Hammad H, Rataczak C, Just N, Tillie-Leblond I, Lebargy F, Pestel J, Tonnel AB. 2004. Involvement of dendritic cells in allergic airway diseases. *Rev Mal Respir* 21(3 Pt 1):549-55.

Ditzian-Kadanoff R. 1999. Testicular-associated immune deviation and prevention of adjuvant-induced arthritis by three tolerization methods. *Scand J Immunol* 50(2):150-8.

Doherty DG, O'Farrelly C. 2000. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 174:5-20.

Dominguez K, Ward, WS. 2009. A novel nuclease activity that is activated by Ca (2+) chelated to EGTA. *Syst Biol Reprod Med* 55:193-199.

Du Plessis SS, Cabler S, McAlister D, Sabanegh E, Agarwal A. 2010. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nature Reviews Urology* 7:153-161.

Dym M, Fawcett D.W. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3: 308-326.

Dym M, Romrell LJ. 1975. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *J Reprod Fertil* 42:1-7.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(12):1206-12.

Fallarino F, Volpi C, Zelante T, Vacca C, Calvitti M, Fioretti MC, Puccetti P, Romani L, Grohmann U. 2009. IDO mediates TLR9-driven protection from experimental autoimmune diabetes. *J Immunol* 183(10):6303-12.

Fallarino F, Bianchi R, Orabona C, Vacca C, Belladonna ML, Fioretti MC, Serreze DV, Grohmann U, Puccetti P. 2004. CTLA-4-Ig activates forkhead transcription factors and protects dendritic cells from oxidative stress in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 200(8):1051-62.

Feng GS, Taylor MW. 1989. Interferon gamma-resistant mutants are defective in the induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7144-7148.

Fiszer D, Ulbrecht M, Fernandez N, Johnson JP, Weiss EH, Kurpysz M. 1997. Analysis of HLA class Ib gene expression in male gametogenic cells. *Eur J Immunol* 27(7):1691-5.

Flickinger CJ, Bush LA, Howards SS, Herr JC. 1997. Distribution of leukocytes in the compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3(3):308-26.

Fontenot JD, Rudensky AY. 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 6(4):331-7.

Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterisation, secretion and changes of major proteins. *Biol Reprod* 62(6): 1790-803.

Foulds LM, Boysen RI, Crane M, Yang Y, Muir JA, Smith AI, de Kretser DM, Hearn MT, Hedger MP. 2008. Molecular identification of lyso-glycerophosphocholines as endogenous immunosuppressives in bovine and rat gonadal fluids. *Biol Reprod* 79(3):525-36.

Frenette G, Lessard C, Sullivan R. 2002. Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod* 67:308-313.

Friend DS, Gilula NB. 1972. Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *JCell Biol* 53:758-776.

Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, Mellor A L, Munn D H, Antonia S J. 2002. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer* 101: 151-155.

Fujigaki S, Saito K, Sekikawa K, Tone S, Takikawa O, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M. 2001. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN γ -independent mechanism. *Eur J Immunol* 31: 2313-2318.

Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Yamada Y, Wada H, Seishima M. 2002. Ltryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 70:779-786.

G, H

Gaspari P, Banerjee T, Malachowski WP, Muller AJ, Prendergast GC, DuHadaway J, Bennett S, Donovan AM. 2006. Structure-activity study of brassinin derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *J Med Chem* 49:684-692.

Gibbins DJ, Marcet-Palacios M, Sekar Y, Ng MC, Befus AD. 2007. CD8 alpha is expressed by human monocytes and enhances Fc gamma R-dependent responses. *BMC Immunol* 8:12.

Gilliet M, Liu YJ. 2002. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* 63(12):1149-55.

Giusti RM, Maloney EM, Hanchard B, Morgan OS, Steinberg SM, Wachter H, Williams E, Cranston B, Fuchs D, Manns A. 1996. Differential patterns of serum biomarkers of immune activation in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, and adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5 (9):699-704.

Goldstein LE, Leopold MC, Huang X, Atwood CS, Saunders A J, Hartshorn M, Lim JT, Faget KY, Muffat JA, Scarpa RC, Chylack Jr LT, Bowden EF, Tanzi RE, Bush AI. 2000. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. *Biochemistry* 39: 7266-7275.

Gribaudo G, Toniato E, Engel DA, Lengyel P. 1987. Interferons as gene activators. Characteristics of an interferon-activatable enhancer. *J Biol Chem* 262:11878-11883.

Grohmann U, Fallarino F, Bianchi R, Belladonna ML, Vacca C, Orabona C, Uyttenhove C, Fioretti MC, Puccetti P. 2001. IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J Immunol* 167(2):708-14.

Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. 2003. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 24(5):242-8.

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3(11):1097-101.

Grohmann U, Volpi C, Fallarino F, Bozza S, Bianchi R, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Ayroldi E, Nocentini G, Boon L, Bistoni F, Fioretti MC, Romani L, Riccardi C, Puccetti P. 2007. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat Med* 13:579-586.

Guillonnet C, Hill M, Hubert FX, Chiffolleau E, Hervé C, Li XL, Heslan M, Usal C, Tesson L, Ménoret S, Saoudi A, Le Mauff B, Josien R, Cuturi MC, Anegon I. 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117(4):1096-106.

Habara-Ohkubo A, Takikawa O, Yoshida R. 1991. Cloning and expression of a cDNA encoding mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Gene* 105(2):221-7.

Haidl G, Opper C. 1997. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Hum Reprod* 12:2720-2723.

Hall JC, Hadley J, Doman T. 1991. Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J Androl* 12:76-87.

- Hamilton DW. 1990. LM, editor. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses: 256-289.
- Hariri M, Millane G, Guimond MP, Guay G, Dennis JW, Nabi IR. 2000. Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Mol Biol Cell* 11(1):255-68.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6(11):1123-32.
- Hassanain HH, Chon SY, Gupta SL. 1993. Differential regulation of human indoleamine 2,3- dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *J Biol Chem* 268: 5077-5084.
- Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. 2004. *Pharmacol Ther* 103(2):147-66.
- Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. 1989. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84(5):1663-70.
- Hayaishi O, Hirata F, Ohnishi T, Henry JP, Rosenthal I, Katoh A. 1977. Indoleamine 2,3-dioxygenase: incorporation of ¹⁸O₂ and ¹⁸O into the reaction products. *J Biol Chem* 252:3548-3550.
- Head JR, Neaves WB, Billingham RE. 1983. Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival. *Transplantation* 36:423-31.
- Hedger MP. 2007. Immunologically privileged environments. In: Halberstadt CR, Emerich DF eds. *Cellular Transplantation from Laboratory to Clinic*. Amsterdam: Elsevier: 567-590.
- Hedger MP. 2011. Toll-like receptors and signalling in spermatogenesis and testicular responses to inflammation—a perspective. *Journal of Reproductive Immunology* 88(2): 130-141.
- Henry DP, Bowsher RR. 1986. An improved radioenzymatic assay for plasma norepinephrine using purified phenylethanolamine N-methyltransferase. *Life Sci* 38: 1473-1483.
- Hermo L, Robaire B. 2002. Epididymal cell types and their function. In the epididymis: from molecules to clinical practice, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers): 81-102.
- Hermo L, Jacks D. 2002. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev* 63:394-410.

- Heyes MP, Quearry BJ, Markey SP. 1989. Systemic endotoxin increases L-tryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid, 3-hydroxykynurenine and quinolinic acid content of mouse cerebral cortex. *Brain Res* 491: 173-179.
- Heyes MP, Saito K, Jacobowitz D, Markey SP, Takikawa O, Vickers JH. 1992. Poliovirus induces indoleamine 2,3-dioxygenase and quinolinic acid synthesis in macaque brain. *Faseb J* 6: 2977-2989.
- Heyes MP, Achim CL, Wiley CA, Major EO, Saito K, Markey SP. 1996. Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem J* 320 (Pt 2):595-7.
- Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R and Albugureque EX. 2001. The brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ -nicotinic receptor activity and increases non $\alpha 7$ -nicotinic receptor expression: physio – pathological implications. *J Neurosci* 21: 7463– 7473.
- Hinton BT, Palladino MA. 1995. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech* 30:67-81.
- Hinton BT. 1980. The epididymal microenvironment: a site of attack for a male contraceptive? *Invest Urol* 18(1):1-10.
- Hinton, BT. 1983. The epithelium of the caput epididymidis: its permeability and its role in the formation of a specialized microenvironment. *Ann NY Acad Sci* 383: 462-463.
- Hirata F, Nomiya S, Hayaishi O. 1975. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note I. Catalytic and molecular properties. *Acta Vitaminol Enzymol* 29(1-6): 288-290.
- Hirata F, Ohnishi T, Hayaishi O. 1977. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Characterization and properties of enzyme. O₂-complex. *J Biol Chem* 252:4637–4642.
- Hirata F, Hayaishi O. 1975. Studies on indoleamine 2, 3-dioxygenase. I. Superoxide anion as substrate. *J Biol Chem* 250: 5960-5966.
- Hoffer AP, Hamilton DW, Fawcett DW. 1973. The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *Anat Rec* 175:169-201.
- Hoffer AP, Hinton BT. 1984. Morphological evidence for a blood epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biol Reprod* 30: 991–1004.
- Hooper P, Smythe E, Richards RC, Howard CV, Lynch RV, Lewis-Jones DI 1995. Total number of immunocompetent cells in the normal rat epididymis and after vasectomy. *J Reprod Fertil* 104: 193-198.
- Honig A, Rieger L, Kapp M, Sutterlin M, Dietl J, Kammerer U. 2004. Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-foetal tolerance. *J Reprod Immunol* 61:79-86.

Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC, Munn DH. 2007. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* 67:792–801.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. 2008. Pillars article: development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. 1993. *Science* 260(5107): 547-549.

Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. 2000. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 164(7):3596-9.

I, J, K

Indoleamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB J* 19: 1347-1349.

Itoh M, Chen XH, Takeuchi Y, Miki T. 1995. Morphological demonstration of the immune privilege in the testis using adjuvants: tissue responses of male reproductive organs in mice injected with Bordetella pertussis. *Arch Histol Cytol* 58(5): 575-9.

Itoh M, Miyamoto K, Ohga T, Takeuchi Y. 1999. Spontaneous occurrence of vasculitis-like lesions in male reproductive tissues in mice: a histological study. *Arch Androl* 42(3):151-9.

Itoh M, Miyamoto K, Ooga T, Iwahashi K, Takeuchi Y. 1999b. Spontaneous accumulation of eosinophils and macrophages throughout the stroma of the epididymis and vas deferens in alymphoplasia (aly) mutant mice: A histological study. *Am J Reprod Immunol* 42(4):246-53.

Itoh, M, Morita K, Tsukita S. 1999. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* 274:5981-5986.

Johnston DS, Jelinsky SA, Bang H. J, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, Turner TT. 2005. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod* 73(3): 404-13.

Jones R. 1998. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53: 73-84.

Jrad-Lamine A, Henry-Berger J, Gourbeyre P, Damon-Soubeyrand C, Lenoir A, Combaret L, Saez F, Kocer A, Tone S, Fuchs D, Zhu W, Oefner PJ, Munn DH, Mellor AL, Gharbi N, Cadet R, Aitken RJ, Drevet JR. 2011. Deficient tryptophan catabolism along the kynurenine pathway reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. *J Biol Chem* 286(10):8030-42.

- Jones, R. Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis. 2004. *Biol Reprod* 71:1405-1411.
- Kamimura S, Eguchi K, Yonezawa M, Sekiba, K. 1991. Localization and developmental change of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med Okayama* 45:135-139.
- Kappler JW, Roehm N, Marrack P. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49(2):273-80.
- Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. 2008. Indoleamine 2, 3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* 222:206–221.
- Kaufmann SH. 1996. γ/δ and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci USA* 93(6):2272-9.
- Kawaguchi R, Shimokawa T, Umehara N, Nunomura S, Tanaka T, Ra C. 2008. Priming of peripheral monocytes with prolactin (PRL) sensitizes IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression without affecting IFN-gamma signaling. *J Reprod Immunol* 77(2):117-25.
- Kazeem AA. *Scand J Immunol*. 1988. A critical consideration of the rat epididymis as an immunologically privileged site 27(2):149-56.
- Kessler M, Terramani T, Lynch G and Baudry M. 1989. A glycine site associated with N-Methyl- D-Aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem* 52: 1319– 1328.
- Khayyamian S, Hutloff A, Büchner K, Gräfe M, Henn V, Kroczeck RA, Mages HW. 2002. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(9):6198-203.
- Kimball SR. 2001. Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. *Prog Mol Subcell Biol* 26:155-84.
- King NJ, Thomas SR. 2007. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2167-2172.
- Kirchhoff C. 1999. Gene expression in the epididymis. *Int Rev Cytol* 188: 133-202.
- Konan KV, Taylor MW. 1996. Importance of the two interferon-stimulated response element (ISRE) sequences in the regulation of the human indoleamine 2, 3-dioxygenase gene. *J Biol Chem* 271: 19140-19145.
- Kourilsky P, Claverie JM. 1989. MHC-antigen interaction: what does the T cell receptor see? *Adv Immunol* 45:107-93.
- Krawetz SA, De Rooij DG, Hedger MP. 2009. Molecular aspects of male fertility. *International Workshop on Molecular Andrology. EMBO reports* 10: 1087 – 1092.

Krieg AM.2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5:471-484.

Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM. 2004. Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med*199 (9):1285-91.

Kujala M, Hihnala S, Tienari J, Kaunisto K, Hastbacka J, Holmberg C, Kere J, Hoglund P.2007. Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. *Reproduction* 133:775-784.

Kumar S, Malachowski WP, DuHadaway JB, LaLonde JM, Carroll PJ, Jaller D, Metz R, Prendergast GC, Muller AJ.2008. Indoleamine 2, 3-dioxygenase is the anticancer target for a novel series of potent naphthoquinone-based inhibitors. *J Med Chem* 51:1706-1718.

Kwidzinski E, Bunse J, Aktas O, Richter D, Mutlu L, ZippF, Nitsch R, Bechmann I. 2005.

L, M

La Cava A, Alviggi C, Matarese G. 2004. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*.82(1):4-11.

Larrea E, Riezu-Boj JI, Gil-Guerrero L, Casares N, Aldabe R, Sarobe P, Civeira MP, Heeney JL, Rollier C, Verstrepen B, Wakita T, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ, Prieto J.2007. Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J Virol* 81(7):3662-6.

Lawrence T, Fong C. 2010. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(4):519-523.

Lawrence T. 2009. The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation Cold Spring Harb *Perspect Biol*1(6):a001651.

Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells.*J Exp Med* 172(3):921-9.

Lee HM, Oh BC, Lim DP, Lee DS, Cho J, Lee G, Lee JR. 2007. Role of complement regulatory proteins in the survival of murine allo-transplanted Sertoli cells. *J Korean Med Sci* 22:277-82.

Leichman, G, Gravenor D, Woytowitz D, Mezger J, Albert G, Schmalbach T, Al-Adhami M, Manegold C. 2005. CPG 7909, a TLR9 agonist, added to first line taxane/platinum for advanced non-small cell lung cancer, a randomized, controlled phase II study. *J Clin Oncol*23 (Supl.):7039.

- Lefrancois AM, Jimenez C, Dufaure JP. 1993. Developmental expression and androgen regulation of 24 kDa secretory proteins by the murine epididymis. *Int J Androl* 16:147-54.
- Li F, Huarte M, Zaratiegui M, Vaughn MW, Shi Y, Martienssen R, and Cande WZ. 2008. Lid2 is required for coordinating H3K4 and H3K9 methylation of heterochromatin and euchromatin. *Cell* 135: 272–283.
- Li H, Ren J, Dhabouwala CB, Shichi H. 1997. Immunotolerance induced by intratesticular antigen priming expression of TGF- β , Fas ligand. *Ocul Immunol Inflamm* 5:75-84.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146.
- Li Z, Sun ZJ, Liao CG, Ma L, Ma BF, Zhang YQ. Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted originating from the epididymis differentially associates with viable and defective spermatozoa.
- Liebau C, Baltzer AW, Schmidt S, Roesel C, Karreman C, Prisack JB, Bojar H, Merk H . 2002. Interleukin-12 and interleukin-18 induce indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) activity in human osteosarcoma cell lines independently from interferon-gamma. *Anticancer Res* Mar22 (2A):931-6.
- Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* (4):350-4.
- Liu VC, et al. 2007. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* 178:2883-2892.
- Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. 1967. Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* 155:217-219.
- Lucki I. 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44(3):151-62.
- Macchiarulo A, Camaioni E, Nuti R, Pellicciari R. 2009. Highlights at the gate of tryptophan catabolism: a review on the mechanisms of activation and regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a novel target in cancer disease. *Amino Acids* 37:219–229.
- Macchiarulo A, Nuti R, Bellocchi D, Camaioni E, Pellicciari R. 2007. Molecular docking and spatial coarse graining simulations as tools to investigate substrate recognition, enhancer binding and conformational transitions in indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO). *Biochim Biophys Acta* 1774:1058–1068.
- MacKenzie CR, Heseler K, Müller A, Däubener W. 2007. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab* 8(3):237-44.

- Maghzal GJ, Thomas SR, Hunt NH, Stocker R. 2008. Cytochrome b5, not superoxide anion radical, is a major reductant of indoleamine 2,3-dioxygenase in human cells. *J Biol Chem* 283:12014–12025.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13:453-61.
- Martinez-Garcia F, Regadera J, Cobo P, Palacios J, Paniagua R, Nistal M. 1995. The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 27:195-206.
- Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. 2005. Leptin in immunology. *J Immunol* 174(6):3137-42.
- Matarese G. 2000. Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response. *Eur Cytokine Netw* 11(1):7-14.
- Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, Chieppa M, Rescigno M. 2010. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut*, 59(5):595-604.
- Mcmenamy RH, Oncley JL, Medina IM, Day NP, Salahifar-sabet H, Stocker R, Smythe G, Bwanaisa L, Njobvu A, Kayira K, Turner GD, Taylor TE, Hunt NH. 2003. Metabolites of the kyn- urenine pathway of tryptophan metabolism in the cerebrospinal fluid of Malawian children with malaria. *J Infect Dis* 188(6):844–9.
- Medawar PB. 1953. Biological problems of skin surgery. *J Int Chir* (4):385-91.
- Meinhardt A, Hedger MP. 2011. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol* 335(1):60-8
- Meizel S. 2004. The sperm, a neuron with a tail: 'neuronal' receptors in mammalian sperm. *Biological Reviews* 79 (4):713–732.
- Mellor AL, Baban B, Chandler PR, Manlapat A, Kahler DJ, Munn DH. 2005. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2, 3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J Immunol* 175(9):5601-5.
- Mellor AL, Chandler P, Baban B, Hansen AM, Marshall B, Pihkala J, Waldmann H, Cobbold S, Adams E, Munn DH. 2004. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA-4 mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol* 16: 1391-1401.
- Mellor AL, Munn DH. 2003. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol* 170: 5809-5813.
- Mellor AL, Munn DH. 2008. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat Rev Immunol* 8:74–80.

- Mellor AL, Munn D. 2004. Policing pregnancy: Tregs help keep the peace. *Trends Immunol* 25(11):563-5.
- Mellor AL, Munn DH. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4(10):762-74.
- Metz R, Duhadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. 2007. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res* 67(15):7082-7.
- Miki T, Sun H, Lee Y, Tandin A, Kovscek AM, Subbotin V, Fung JJ, Valdivia LA. 2001. Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplant Proc* 33: 129-130.
- Miyara M, Sakaguchi S. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13(3):108-16.
- Moreau M, Lestage J, Verrier D, Mormede C, Kelley KW, Dantzer R, Castanon N. 2005. Bacille Calmette-Guerin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2, 3-dioxygenase in mice. *J Infect Dis* 192: 537-544.
- Morelli AE, Thomson AW. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7: 610-621.
- Mruk DD, Cheng CY. Tight junctions in the testis: new perspectives. 2010. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1546):1621-35.
- Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. 2004. Targeted deletion of the suppressor gene Bin1/Amphiphysin2 accentuates the neoplastic character of transformed mouse fibroblasts. *Cancer Biol Ther* 3:1236-42.
- Muller AJ, Malachowski WP, Prendergast GC. 2005. Indoleamine 2,3-dioxygenase in cancer: targeting pathological immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 9: 831-849.
- Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. 2005. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 11(3):312-9.
- Muller AJ, Prendergast GC. 2007. Indoleamine 2, 3-dioxygenase in immune suppression and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 7(1):31-40.
- Muller AJ, Scherle PA. 2006. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer* 6:613-625.
- Muller AJ, Prendergast GC. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 7 (1):31-40.

Muller N, Schwarz MJ. 2007. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry* 12: 988-1000.

Munn DH, Armstrong E. 1993. Cytokine regulation of human monocyte differentiation in vitro: the tumor-cytotoxic phenotype induced by macrophage colony-stimulating factor is developmentally regulated by gamma-interferon. *Cancer Res* 53: 2603-2613.

Munn DH, Mellor AL. 2007. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 117:1147-1154.

Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. 2005. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Immunity* 22(5):633-42.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281 : 1191-1193.

Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189(9):1363-72.

Murray MF. 2003. Tryptophan depletion and HIV infection: a metabolic link to pathogenesis. *Lancet Infect Dis* 3(10):644-52.

Murray MF. 2010. Insights into therapy: tryptophan oxidation and HIV infection. *Sci Transl Med* 2(32):32 ps 23.

Musso T, Gusella GL, Brooks A, Longo DL, Varesio L. 1994. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood* 83(5):1408-11.

N, O, P

Nagano T, Suzuki F. 1976. The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze-fracture. *Anat Rec* 185:403-417.

Nashan D, Cooper TG, Knuth UA, Schubeus P, Sorg C, Nieschlag E. Presence and distribution of leucocyte subsets in the murine epididymis after vasectomy. 1990. *Int J Androl* 13: 39 -49.

Nashan D, Malorny U, Sorg C, Cooper T, Nieschlag E. 1989. Immuno-competent cells in the murine epididymis. *Int J Androl* 12: 85-94.

Nashan D, Jantos C, Ahlers D, Bergmann M, Schiefer HG, Sorg C, Nieschlag E. 1993. Immuno-competent cells in the murine epididymis following infection with *Escherichia coli* *Int J Androl* 16 (1): 47-52.

- Nasr IW, Wang Y, Gao G, Deng S, Diggs L, Rothstein DM, Tellides G, Lakkis FG, Dai Z. 2005. Testicular immune privilege promotes transplantation tolerance by altering the balance between memory and regulatory T cells. *J Immunol* 174(10):6161-8.
- Nettelbreker E, Zeidler H, Bartels H, Dreses-Werringloer U, Däubener W, Holtmann H, Köhler L. 1998. Studies of persistent infection by *Chlamydia trachomatis* serovar K in TPA-differentiated U937 cells and the role of IFN-gamma. *J Med Microbiol* 47(2):141-9.
- Noben-Trauth N, Hu-Li J, Paul WE. 2000. Conventional, naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J Immunol* 165(7):3620-5.
- Noblanc A, Kocer A, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Conrad M, Drevet JR. 2011. Glutathione peroxidases (GPx) at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *J Androl* 32(6):641-50
- Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJ, Thomas G. 2005. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(40):14238-43.
- Nossal GJ. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76(2):229-39.
- O'Bryan MK, Gerdprasert O, Nikolic-Paterson DJ, Meinhardt A, Muir JA, Foulds LM, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. 2005. Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal localized suppression of inflammatory responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(6): R 1744-55.
- O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. 2009. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* (5):511-22.
- Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S, Ghahary A, Moqbel R. 2004. Cutting Edge: Human Eosinophils Regulate T Cell Subset Selection through Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J Immunol* 173: 5909-5913.
- O'Garra A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8(3):275-83.
- Ogawa T, Matson WR, Beal MF, Myers RH, Bird ED, Milbury P, Saso S. 1992. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology* 42:1702-1706.
- Okamoto R, Kawashima K, Fujii K. 1967. Actions of prolactin on the male sexual organs of the rat. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 14(1):37-50.
- Olson GE, Hinton BT. 1985. Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Andrology* 6:20-34.

Olson GE, Nagdas SK, Winfrey VP. 2002. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In: B. Robaire and B.T. Hinton, eds. *The Epididymis From Molecules to Clinical Practice: A comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis and the Vas Deferens*. New York, NY: Kluwer Academic/ Plenum Publishers: 371-387.

Orabona C, Puccetti P, Vacca C, Bicciato S, Luchini A, Fallarino F, Bianchi R, Velardi E, Perruccio K, Velardi A, Bronte V, Fioretti MC, Grohmann U. 2006. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 107(7):2846-54.

Otero M, Lago R, Gomez R, Dieguez C, Lago F, Gómez-Reino J, Gualillo O. nTowards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology* 45(8):944-50.

Ouvrier A, Alves G, Damon-Soubeyrand C, Marceau G, Cadet R, Janny L, Brugnon F, Kocer A, Pommier A, Lobaccaro JM, Drevet JR, Saez F. 2011. Dietary cholesterol-induced post-testicular infertility. *PLoS One* 6(11):e26966.

Ouvrier A, Cadet R, Vernet P, Laillet B, Chardigny JM, Lobaccaro JM, Drevet JR, Saez F. 2009. LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. *J Lipid Res* 50(9):1766-75.

Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM. 1998. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9(5):745-55.

Ozaki Y, Nichol CA, Duch DS .1987. Utilization of dihydroflavin mononucleotide and superoxide anion for the decyclization of Ltryptophan by murine epididymal indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch Biochem Biophys* 257:207-216.

Ozaki Y, Reinhard JF Jr, Nichol CA .1986. Cofactor activity of dihydroflavin mononucleotide and tetrahydrobiopterin for murine epididymal indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 137:1106-1111.

Ozaki, Y, Edelstein MP, Duch, DS.1988. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1242-1246.

Parker NR, Jamie JF, Davies MJ, Truscott RJ. 2004. Protein-bound kynurenine is a photosensitizer of oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 37(9):1479-89.

Perkins MN and Stone TW. 1982. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinoic acid. *Brain Res* 247: 184 - 187.

Peterson AC, Migawa MT, Martin MM, Hamaker LK, Czerwinski KM, Zhang W, Arend RA, Fisette PL, Ozaki Y, Will JA, Brown RR, Cook JM. 1994. Evaluation of functionalized tryptophan derivatives and related compounds as competitive inhibitors of Indoleamine 2,3-dioxygenase. *Med Chem Res* 3:531–544.

Pfefferkorn E R. 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 908-912.

Pimentel-Muñoz FX, Seed B. 1999. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* 11(6):783-93.

Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G, Cimini D, Degrassi F, Giordano R, Magnano A R, Lorenzini R, Lavia P, Spadafora C. 1999. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci* 112:3537–3548.

Platten M, Ho PP, Youssef S, Fontoura P, Garren H, Hur EM, Gupta R, Lee LY, Kidd BA, Robinson WH, Sobel RA, Selley ML, Steinman L. 2005. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science* 310(5749): 850-855.

Plümpe J, Malek NP, Bock CT, Rakemann T, Manns MP, Trautwein C. 2000. NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(1):G173-83.

Poglio S, De Toni-Costes F, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L, Cousin B. 2010. Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells* 28(11):2065-72.

Popov A, Schultze JL. 2008. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med* 86: 145e160.

Puccetti P. 2007. On watching the watchers: IDO and type I/II IFN. *Eur J Immunol* 37: 876–879.

Q, R, S

Qureshi N, Vogel SN, Way CV III, Papasian CJ, Qureshi AA, Morrison DC. 2005. The proteasome: A central regulator of inflammation and macrophage function. *Immunological Research* 31(3):243-260.

Qureshi AA, Tan X, Reis JC, Badr MZ, Papasian CJ, Morrison DC, Qureshi N. 2011. Suppression of nitric oxide induction and pro-inflammatory cytokines by novel proteasome inhibitors in various experimental models. *Lipids Health Dis* 10:177.

Reid AT, Redgrove K, Aitken RJ, Brett Nixon. 2011. Cellular mechanisms regulating sperm–zona pellucida interaction. *Asian Journal of Andrology* 13:88–96.

- Reiner SL. 2007. Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 129(1):33-6.
- Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux J.M, Vericel E, Grizard, G, Vernet P, Drevet JR. 2006. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod* 74:1104-1113.
- Rejraji H, Vernet P, Drevet J. R. 2002. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* 63: 96-103.
- Reynolds GP, Pearson SJ. 1989. Increased brain 3-hydroxykynurenine in Huntington's disease. *Lancet* 2: 979-980.
- Ritchie AW, Hargreave TB, James K, Chisholm JD. 1984. Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens? *Br J Urol* 56:79-83.
- Rival C, Guazzone VA, von Wulffen W, Hackstein H, Schneider E, Lustig L, Meinhardt A, Fijak M. 2007. Expression of co-stimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cells from normal and chronically inflamed rat testis. *Mol Hum Reprod* 13(12):853-61.
- Robaire B, Hermo L. 1998. Efferent ducts, epididymis, vas deferens: structure, functions, and their regulation. In *The physiology of reproduction*, ed. N. J. Knobil E, Raven Press, New-York, p 999-1080.
- Robaire B, Hermo L. 1988. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In *The Physiology of Reproduction* pp 999-1080 Eds E Knobil and J Neill. Raven Press, New-York.
- Robaire B, Jervis K.M, Ezer N. 2003. Cell Dynamics and Cell Death in the Epididymal Epithelium. In: *Third International Conference on the Epididymis*. pp 35-49, BT Hinton and TT Turner eds. The Van Doren Company, Charlottesville, Virginia, USA.
- Robaire B, Viger RS. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52: 226-236.
- Robaire B, Viger RS. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52: 226-236.
- Robinson CM, Hale PT, Carlin JM. 2006. NF-kappa B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine* 35: 53-61.
- Robinson CM, Shirey KA, Carlin JM. 2003. Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 23:413-421.
- Rochwerger L, Cuasnicu P. S. 1992. Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation." *Mol Reprod Dev* 31(1): 34-41.

- Romani L, Puccetti P. 2006. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism, *Trends Microbiol* 14:183e189.
- Romani L, Puccetti P. 2008. Immune regulation and tolerance to fungi in the lungs and skin. *Chem Immunol Allergy* 94:124e137.
- Russo S, Kema IP, Fokkema MR, Boon JC, Willemsse PH, de Vries EG, den Boer JA, Korf J. 2003. Tryptophan as a link between psychopathology and somatic states. *Psychosom Med* 65:665-671.
- Ryan AF, Grendell RL, Geraghty DE, Golos TG. 2002. A soluble isoform of the rhesus monkey nonclassical MHC class I molecule Mamu-AG is expressed in the placenta and the testis. *J Immunol* 169(2):673-83.
- Saez F, Frenette G, Sullivan R. 2003. Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *J Androl* 24:149-154.
- Saito S, Shima T, Nakashima A, Shiozaki A, Ito M, Sasaki Y. 2007. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet* 24: 379-386.
- Sakaguchi S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101(5):455-8.
- Sala A, Campagnoli M, Perani E, Romano A, Labò S, Monzani E, Minchiotti L, Galliano M. 2004. Human alpha-1-microglobulin is covalently bound to kynurenine-derived chromophores. *J Biol Chem* 279(49):51033-41.
- Salazar-Onfray F. 1999. Interleukin-10: a cytokine used by tumors to escape immunosurveillance. *Med Oncol* 16(2):86-94.
- Salter M, Knowles RG, Pogson CI. 1989. How does displacement of albumin-bound tryptophan cause sustained increases in the free tryptophan concentration in plasma and 5-hydroxytryptamine synthesis in brain? *Biochem J* 262:365-368.
- Sanni LA, Thomas SR, Tattam BN, Moore DE, Chaudhri G, Stocker R, Hunt NH. 1998. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and noncerebral malaria. *Am J Pathol* 152: 611-619.
- Scarlett G, John F K, Susan M L, Cheryl PE, Patricia G. Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene. 2003. *Molecular Microbiology* 50(2): 659-671.
- Schröcksnadel H, Baier-Bitterlich G, Dapunt O, Wachter H, Fuchs D. 1996. Decreased plasmatryptophan in pregnancy. *Obstet Gynecol* 88: 47-50.
- Schröcksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D. 2006. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin Chim Acta* 364(1-2):82-90.

- Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K, Kreder D, Kronke M. 1998. TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 273(10):5916-22.
- Schwarcz R, Du F. 1991. Quinolinic acid and kynurenic acid in the mammalian brain. *Adv Exp Med Biol* 294: 185-199.
- Sedlmayr P. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase in materno-fetal interaction. *Curr Drug Metab* 8(3):205-8.
- Seiler P, Cooper TG, Nieschlag E. 2000. Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int J Androl* 23: 65-76.
- Seiler P, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. 1999. Regional variation in macrophage antigen expression by murine epididymal basal cells and their regulation by testicular factors. *J Androl* 20:738-746.
- Serre V, Robaire B. 1999. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod* 61(3): 705-14.
- Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In *The physiology of reproduction* (E. Knobil and J.D. Neill, Eds), pp: 1063-1175. Raven Press, New York.
- Shimizu T, Nomiyama S, Hirata F, Hayaishi O. 1978. Indoleamine 2, 3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem* 253: 4700-4706.
- Silva NM, Rodrigues CV, Santoro MM, Reis LF, Alvarez-Leite JI, Gazzinelli RT. 2002. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during *in vivo* infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 70: 859-868.
- Sipione S, Simmen KC, Lord SJ, Motyka B, Ewen C, Shostak I, Rayat GR, Dufour JM, Korbitt GS, Rajotte RV, Bleackley RC. 2006. Identification of a novel human granzyme B inhibitor secreted by cultured Sertoli cells. *J Immunol* 177(8):5051-8.
- Skinner MK, Tung PS, Fritz IB. 1985. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol* 100(6):1941-7.
- Singh US, Kumar MV, Panda JN. 1987. Changes in angiotensin converting enzyme in testes and epididymis of rat due to serotonin administration. *Andrologia* 19(2):153-6.
- Singer JH, Diamond JS. 2003. Sustained Ca²⁺ entry elicits transient postsynaptic currents at a retinal ribbon synapse. *J Neurosci* 23(34):10923-33.

- Slukvin II, Watkins DI, Golos TG. 1999. Tissue distribution of the mRNA for a rhesus monkey major histocompatibility class Ib molecule, Mamu-AG. *Tissue Antigens* 53(3):282-91.
- Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC. 1998. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13313-1331.
- Sono M, Cady SG. 1989. Enzyme kinetic and spectroscopic studies of inhibitor and effector interactions with indoleamine 2,3-dioxygenase 1. Norharman and 4-phenylimidazole binding to the enzyme as inhibitors and heme ligands. *Biochemistry* 28:5392-5399.
- Sono M, Taniguchi T, Watanabe Y, Hayaishi O. 1980. Indoleamine 2, 3-dioxygenase. Equilibrium studies of the tryptophan binding to the ferric, ferrous, and CO-bound enzymes. *J Biol Chem* 255:1339-1345.
- Soranzo L, Dadoune JP, Fain-Maurel MA. 1982. La segmentation du canal épидидymaire chez la souris: étude ultrastructurale. *Reprod Nutr Dev* 22: 999-1012.
- Sotero-Esteva WD, Wolfe D, Ferris M, Taylor MW. 2000. An indoleamine 2,3-dioxygenase-negative mutant is defective in stat1 DNA binding: differential response to IFN-gamma and IFN-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 20:623-632.
- Stanfield KM, Khan KN. 2003. Localization of COX-2 in the mâle reproductive tract during sexual maturation. *Inflammopharmacology* 11(3):259-66.
- Staniszewska MM, Nagaraj RH. 2005. 3-hydroxykynurenine-mediated modification of human lens proteins: structure determination of a major modification using a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 280(23):22154-64.
- Stanley Meizel The sperm, a neuron with a tail: 'neuronal' receptors in mammalian sperm. *Biol. Rev.* (2004), 79, pp. 713-732.
- Stein-Streilein J, Streilein JW. 2002. Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int Rev Immunol* 21(2-3):123-52.
- Stone TW. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 45:309-379.
- Stone TW. 2001. Kynurenins in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol* 64: 185 - 218.
- Stone TW, Addae JI. 2002. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *Eur J Pharmacol.* 447(2-3):285-96.
- Suarez-Pinzon W, Korbitt GS, Power R, Hooton J, Rajotte RV, Rabinovitch A. 2000. Testicular sertoli cells protect islet beta-cells from autoimmune destruction in NOD mice by a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism. *Diabetes* 49(11):1810-8.

Sugimoto H, Oda S, Otsuki T, Hino T, Yoshida T, Shiro Y. 2006. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2611–2616.

Sullivan R, Frenette G, Girouard J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 9:483-491.

Sun T, Zhou Y, Yang M, Hu Z, Tan W, Han X, Shi Y, Yao J, Guo Y, Yu D, Tian T, Zhou X, Shen H, Lin D. 2008. Functional genetic variation in cytotoxic T – lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiples types of cancer. *Cancer Res* 68:702567034.

Sutovsky P. 2003. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech* 61(1):88-102.

Suzuki F, Nagano T. 1978. Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. *Dev Biol* 63:321-334.

Suzuki T, Yokouchi K, Kawamichi H, Yamamoto Y, Uda K, Yuasa HJ. 2003. Comparison of the sequences of Turbo and Sulculus indoleamine dioxygenase-like myoglobingenes. *Gene* 308:89-94.

Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti JL, Okamura N, Dacheux JL. 1996. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod* 55:956–974.

T, U

Tafari A, Alferink J, Moller P, Hammerling GJ, Arnold B. 1995. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 270, 630-633.

Takano H. 1980. Quantitative and qualitative histology and histogenesis of the mouse epididymis, with special emphasis on the regional differences. *Acta anatomica nipponica* 57:11-20.

Takikawa O, Habara-Ohkubo A, Yoshida R. 1990. IFN-gamma is the inducer of indoleamine 2, 3-dioxygenase in allografted tumor cells undergoing rejection. *J Immunol* 145: 1246-1250.

Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, Kido R. 1988. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J Biol Chem* 263:2041-2048.

Takikawa O, Yoshida R, Kido R, Hayaishi O. 1986. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 261:3648-3653.

- Takikawa O, Tagawa Y, Iwakura Y, Yoshida R, Truscott RJ. 1999. Interferon-gamma-dependent/independent expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Studies with interferon-gamma-knockout mice. *Adv Exp Med Biol* 467:553-7.
- Taylor MW, Feng G. 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 5: 2516-2522.
- Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. 2002. Inhibition of allogenic Tcell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196:447-457.
- Thomas SR, Stocker R. 1999. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep* 4(5):199-220.
- Toda A, Piccirillo CA. 2006. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 80(3):458-70.
- Tone S, Takikawa O, Habara-Ohkubo A, Kadoya A, Yoshida R, Kido R. 1990. Primary structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase deduced from the nucleotide sequence of its cDNA. *Nucleic Acids Res* 18(2): 367.
- Tone S, Britan A, Jrad A, Maffre V, Drevet J. 2007. The mouse epididymis : A site of strong and constitutive expression of the tryptophan metabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). *International Congress Series* 1304:233-240.
- Toshimori K, Ito C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol* 66(5):383-96.
- Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G, Panfili E. 1998. "Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* 59(4): 753-8.
- Tulsiani DRP. 2006. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 250 (1-2): 16 58-65.
- Türk J, Oberdörfer C, Vogel T, Mackenzie CR, Däubener W. 2005. Enhancement of antimicrobial effects by glucocorticoids. *Med Microbiol Immunol* 194(1-2):47-53.
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ, 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-1274.

V, W

- Valore EV, Martin E, Harwig SSL, Ganz T. 1996. Intramolecular inhibition of human defensin HNP-1 by its propeptide. *J Clin Invest* 97:1624-1629.

- Veräjänkorva E, Setälä N, Teros T, Salmi AA, Pöllänen P. 2002. Testicular-associated immune deviation: flushing of the testicular lymph sinusoids induces immunosuppression and inhibits formation of EAE in SJL mice. *Scand J Immunol* 55(5):478-83.
- Veri JP, Hermo L, Robaire B. 1994. Immunocytochemical localization of glutathione S-transferase Yo subunit in the rat testis and epididymis. *J Androl* 15(5): 415-34.
- Vernet P, Britan A, Gueux E, Mazur A, Drevet JR. 2004. Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse caput epididymidis *Biochimica et Biophysica Acta* 1675 (2004) 32 – 45.
- Vieu C, Tercé F, Chevy F, Rolland C, Barbaras R, Chap H, Wolf C, Perret B, Collet X. 2002. Coupled assay of sphingomyelin and ceramide molecular species by gas liquid chromatography. *JLipid Res.* 43(3):510-22.
- Visconti P E, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezon J G. 1999. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* 61(1): 76-84.
- Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B, Veyssiére G, Benahmed M, Lobaccaro JM. 2007. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21(5):1014-27.
- Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 9(6):650-7.
- Von Bergwelt-Baildon M S, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S, Stoffel MS, Fiore F, Roth U, Beyer M, Debey S, Wickenhauser C, Hanisch FG, Schultze JL. 2006. CD25 and indoléamine 2,3 dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* 108:228-237.
- Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, Ling L. 2006. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem* 281:22021-22028.
- Wang YF, Hosltein, A. 1983. Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell Tissue Res* 233:517-521.
- Watanabe M, Kashiwakura Y, Kusumi N, Tamayose K, Nasu Y, Nagai A, Shimada T, Daida H, Kumon H. 2005. Adeno-associated virus-mediated human IL-10 gene transfer suppresses the development of experimental autoimmune orchitis. *Gene Therapy* 12:1126–1132.
- Wingender G, Garbi N, Schumak B, Jüngerkes F, Endl E, von Bubnoff D, Steitz J, Striegler J, Moldenhauer G, Tüting T, Heit A, Huster KM, Takikawa O, Akira S, Busch DH, Wagner

H, Hämmerling GJ, Knolle PA, Limmer A. 2006. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur J Immunol* 36(1):12-20.

Winkler C, Frick B, Schroecksadel K, Schennach H, Fuchs D. 2006. Food preservatives sodium sulfite and sorbic acid suppress mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Food Chem Toxicol* 44(12):2003-7.

Winkler C, Wirleitner B, Schroecksadel K, Schennach H, Fuchs D. 2005a. Extracts of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds suppress stimulated peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Am J Immunol* 1:6-11.

Winkler C, Wirleitner B, Schroecksadel K, Schennach H, Fuchs D. 2005b. In vitro effects of Beet Root Juice on stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Am J Biochem Biotechnol* 1:180-185.

Winkler C, Schroecksadel K, Schennach H, Fuchs D. 2007. Vitamin C and E suppress mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 142(2):127-32.

Winnall WR, Ali U, O'Bryan MK, Hirst JJ, Whiley PA, Muir JA, Hedger MP. Constitutive expression of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 by somatic and spermatogenic cells is responsible for prostaglandin E2 production in the adult rat testis. 2007. *Biol Reprod* 76(5):759-68.

Wirleitner B, Schroecksadel K, Winkler C, Schennach H, Fuchs D. 2005. Resveratrol suppresses interferon-gamma-induced biochemical pathways in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Immunol Lett* 100(2):159-63.

Whitmore WF, Gittes RF. 1978. Intratesticular grafts: the testis as an exceptional immunologically privileged site. *Trans Am Assoc Genitourin Surg* 70:76-80.

X, Y, Z

Xiao BG, Liu X, Link H. 2004. Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. *Steroids* 69(10):653-9.

Xu H, Oriss TB, Fei M, Henry AC, Melgert BN, Chen L, Mellor AL, Munn DH, Irvin CG, Ray P, Ray A. 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:6690-6695.

Yadav MC, Burudi EM, Alirezaei M, Flynn CC, Watry DD, Lanigan CM, Fox HS. 2007. IFN-gamma-induced IDO and WRS expression in microglia is differentially regulated by IL-4. *Glia* 55(13):1385-96.

Yakirevich E, Yanai O, Sova Y, Sabo E, Stein A, Hiss J, Resnick MB. 2002. Cytotoxic phenotype of intra-epithelial lymphocytes in normal and cryptorchid human testicular excurrent ducts. *Hum Reprod* 17(2):275-83.

- Yamamoto S, Hayaishi O. 1967. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J Biol Chem* 242: 5260-5266.
- Yasui H, Takai, K, Yoshida, R, Hayaishi, O.1986. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6622-6626.
- Yeung C H, Wagenfeld A, Nieschlag E, Cooper TG. 2000. The cause of infertility of male cros tyrosine kinase receptor knockout mice. *Biol Reprod* 6: 612-618.
- Yoo-Ott KA, Schiller H, Fandrich F, Oswald H, Richter K, Xhu X F, Kampen WU, Kronke M, Zavazava N. 2000. Co-transplantation of donor-derived hepatocytes induces long-term tolerance to cardiac allografts in a rat model. *Transplantation* 69:2538-2546.
- Yoshida R, Hayaishi O. 1978. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:3998-4000.
- Yoshida R, Park SW, Yasui H, Takikawa O. 1988. Tryptophan degradation in transplanted tumor cells undergoing rejection. *J Immunol* 141: 2819-2823.
- Yoshida R, Urade Y, Nakata K, Watanabe Y, Hayaishi O.1981. Specific induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by bacterial lipopolysaccharide in the mouse lung. *Arch Biochem Biophys* 212: 629-637.
- Yoshida R, Urade Y, Tokuda M, Hayaishi O.1979. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4084-4086.
- Yoshida R, Nukiwa T, Watanabe Y, Fujiwara M, Hirata F, Hayaishi O.1980. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Arch Biochem Biophys* 203(1):343-51.
- Young HA. 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 16:563-568.
- Yu WG, Yamamoto N, Takenaka H, Mu J, Tai XG, Zou JP, Ogawa M, Tsutsui T, Wijesuriya R, Yoshida R, Herrmann S, Fujiwara H, Hamaoka T. 1996. Molecular mechanisms underlying IFN-gamma-mediated tumor growth inhibition induced during tumor immunotherapy with rIL-12. *Int Immunol* 8(6):855-65.
- Yuan W, Collado-Hidalgo A, Yufit T, Taylor M, Varga J. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J Cell Physiol* 177(1):174-86.
- Zamanakou M, Germenis AE, Karanikas V.2007. Tumor immune escape mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol Lett* 111(2):69-75.

Zelante T, Fallarino F, Bistoni F, Puccetti P, Romani L. 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. *Microbes Infect* 11(1):133-41.

Zhao GQ, Chen YX, Liu XM, Xu Z, Qi X. 2001. Mutation in Bmp7 exacerbates the phenotype of Bmp8a mutants in spermatogenesis and epididymis. *Dev Biol* 240(1):212-22.

Zheng Y, Rudensky AY. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8(5):457-62.

Zhu BT. 2010. Development of selective immune tolerance towards the allogeneic fetus during pregnancy: Role of tryptophan catabolites. *Int J Mol Med* 25:831-835.

Zhou M, Mellor AL. 1998. Expanded cohorts of maternal CD8+ T-cells specific for paternal MHC class I accumulate during pregnancy. *J Reprod Immunol* 40: 47-62.

Zou W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6(4):295-307.

Annexes

Deficient Tryptophan Catabolism along the Kynurenine Pathway Reveals That the Epididymis Is in a Unique Tolerogenic State*

Received for publication, August 4, 2010, and in revised form, November 23, 2010. Published, JBC Papers in Press, December 28, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.172114

Aïcha Jrad-Lamine,^{a,1} Joelle Henry-Berger,^a Pascal Gourbeyre,^b Christelle Damon-Soubeyrand,^a Alain Lenoir,^a Lydie Combaret,^c Fabrice Saez,^a Ayhan Kocer,^a Shigenobu Tone,^d Dietmar Fuchs,^e Wentao Zhu,^f Peter J. Oefner,^f David H. Munn,^{g,h} Andrew L. Mellor,^{g,i} Najoua Gharbi,^j Rémi Cadet,^a R. John Aitken,^k and Joël R. Drevet^{a,2}

From the ^aGReD, CNRS UMR 6247/INSERM U931, Clermont Université, 24 Avenue des Landais, BP 80026, 63171 Aubière Cedex, France, ^bInstitut National de Le Recherche Agronomique-Biopolymères, Interactions, Assemblages, 44316 Nantes Cedex, France, ^cInstitut National de Le Recherche Agronomique, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne and Clermont Université, Unité de Nutrition Humaine, BP10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France, the ^dDepartment of Biochemistry, Kawasaki Medical School, Okayama 701-0192, Japan, the ^eDivision of Biological Chemistry, Biocentre, Innsbruck Medical University, 6020 Innsbruck, Austria, the ^fInstitute of Functional Genomics, University of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany, the ^gImmunotherapy Center and Departments of ^hPediatrics and ⁱMedicine, Medical College of Georgia, Augusta, Georgia 30912, the ^jFaculté des Sciences de Tunis, Département de Biologie, Université de Tunis El Manar, Mutuelleville, 1060 Tunis, Tunisia, and the ^kAustralian Research Council Centre of Excellence in Biotechnology and Development, School of Environmental and Life Sciences, University of Newcastle, Callaghan, NSW 2308, Australia

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is the first and rate-limiting enzyme of tryptophan catabolism through the kynurenine pathway. Intriguingly, IDO is constitutively and highly expressed in the mammalian epididymis in contrast to most other tissues where IDO is induced by proinflammatory cytokines, such as interferons. To gain insight into the role of IDO in the physiology of the mammalian epididymis, we studied both wild type and *Ido1*^{-/-}-deficient mice. In the caput epididymis of *Ido1*^{-/-} animals, the lack of IDO activity was not compensated by other tryptophan-catabolizing enzymes and led to the loss of kynurenine production. The absence of IDO generated an inflammatory state in the caput epididymis as revealed by an increased accumulation of various inflammation markers. The absence of IDO also increased the tryptophan content of the caput epididymis and generated a parallel increase in caput epididymal protein content as a consequence of deficient proteasomal activity. Surprisingly, the lack of IDO expression had no noticeable impact on overall male fertility but did induce highly significant increases in both the number and the percentage of abnormal spermatozoa. These changes coincided with a significant decrease in white blood cell count in epididymal fluid compared with wild type mice. These data provide support for IDO playing a hitherto unsuspected role in sperm quality control in the epididymis involving the ubiquitination of defective spermatozoa and their subsequent removal.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)³ (EC 1.13.11.42) is the first and rate-limiting enzyme in Trp catabolism through the

kynurenine pathway (Fig. 1). IDO is a ubiquitously expressed cytoplasmic protein typically activated by interferons (IFNs) (1–5). There is ample evidence that IDO mediates potent immunosuppression in classical immune responses as well as in fetal tolerance, tumor immune resistance, and regulation of autoimmune responses (1–3, 6–8).

Thirty years ago, Yoshida *et al.* (9) reported that rodent epididymal protein extracts exhibited a high IDO activity. Later, Takikawa *et al.* (10) demonstrated that unlike the classical cytokine-mediated expression of IDO encountered in nearly all mammalian tissues, the epididymal expression of IDO was constitutive and independent of IFN- γ . More recently, we have shown that IDO is expressed in a regionalized manner by both the principal and the apical cells of the most proximal epididymal region, the caput epididymis. To gain insights into the functions of IDO and the intermediates of the kynurenine pathway in the physiology of the mammalian epididymis, we measured the expression of IDO and related enzymes as well as the abundance of kynurenines and other Trp metabolites in both wild type (WT) and *Ido1*^{-/-} male mice. These data were correlated with light and electron microscopic analyses of epididymal epithelium, sperm count, sperm morphology, and fertility.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals—The present study was approved by the Regional Ethics Committee in Animal Experimentation (Authorization CE2-04) and adhered to the current legislation on animal experimentation in France. Wild type and *Ido1*^{-/-} BALB/c male mice (11) aged 6 months were used throughout the study unless otherwise indicated. Mice were housed under controlled environmental conditions (temperature 22 °C, 12-h dark period), fed a basal diet (Global diet, 2016S, Harlan, Gannat, France) *ad libitum*, and given free access to water. For fertility testing, vir-

* This work was supported by grants from the French Ministry of Higher Education, CNRS, and INSERM (to J. R. D.). This work was also supported by grants from BayGene (to P. J. O.) and the Australian Research Council (to R. J. A.).

¹ Supported by a fellowship from the French Society of Andrology.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-73-40-74-13; Fax: 33-4-73-40-52-45; E-mail: joel.drevet@univ-bpclermont.fr.

³ The abbreviations used are: IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase; DPN, days postnatal; ESI, electrospray ionization;

KYN, kynurenine; KA, kynurenic acid; AMC, 7-amido-4-methylcoumarin; Ub, ubiquitin; HK, 3-hydroxykynurenine; INDOL, indoleamine 2,3-dioxygenase-like; bNa, β -naphthylamide.

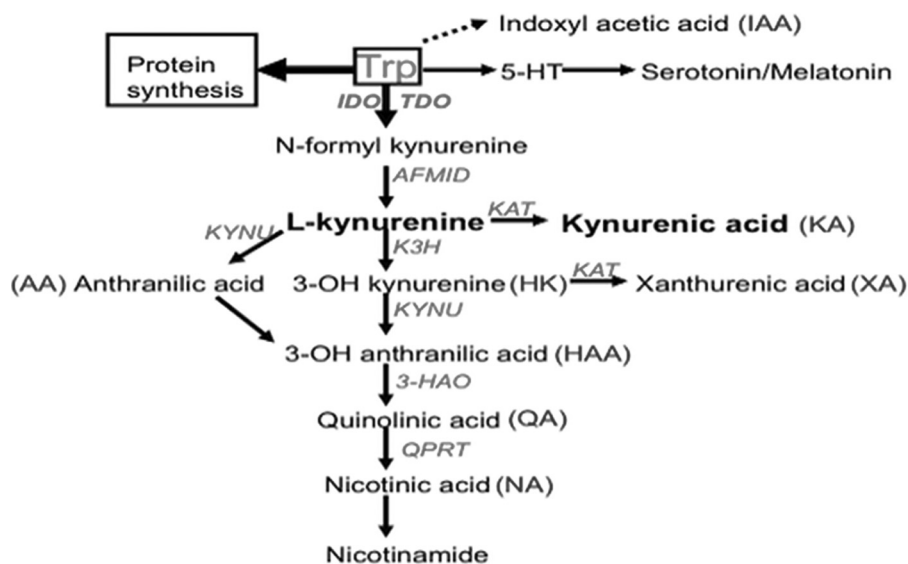


FIGURE 1. **Scheme of mammalian tryptophan catabolism.** Briefly, in mammalian cells, tryptophan is used mostly for protein synthesis. In a second quantitatively important pathway (driven by IDO in most cell types and by TDO more specifically in liver cells), it is the starting point of the kynurenine pathway. The kynurenine pathway gives birth to several metabolites, providing the appropriate enzymes that metabolize the various kynurenine intermediates are expressed. The main route of the kynurenine pathway leads to the formation of *N*-formyl kynurenine, L-kynurenine, 3-hydroxykynurenine, 3-hydroxyanthranilic acid, quinolinic acid, nicotinic acid, and *in fine* nicotinamide adenine dinucleotides. Additional lateral branches of the kynurenine pathway lead to the formation of other terminal kynurenines, such as KA, xanthurenic acid, and anthranilic acid. Kynurenines indicated in **boldface type** (*i.e.* L-kynurenine and KA) correspond to the most abundant kynurenines found in caput epididymal tissue. Outside the kynurenine pathway, tryptophan is also the precursor of serotonin and melatonin. A very small proportion of tryptophan is also transformed into indol derivatives, such as indoxyl acetic acid. Conversion of Trp to *N*-formyl kynurenine is achieved via IDO and/or TDO. Kynurenine intermediates and terminal kynurenines are produced through the action of several distinct enzymes, including formaminase (arylformamidase; *AFMID*), kynurenine aminotransferase (*KAT*; also known as AADAT), kynureninase (*KYNU*), kynurenine 3-hydroxylase (*K3H*; also known as *KMO*), and 3-hydroxyamino oxidase (*3HAO*).

gin 10-week-old BALB/c females were used. Wild type and *Ido*^{-/-} male mice were killed by decapitation.

Immunohistochemistry—After deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidases were inhibited with 0.3% (v/v) aqueous H₂O₂ (Sigma-Aldrich) for 30 min at ambient temperature, followed by blocking of the sections in PBS/bovine serum albumin (BSA) (1% (w/v); Euromedex, Mundosheim, France) for 30 min. In-house rabbit polyclonal anti-IDO (1:1000) (11) was incubated overnight at 4 °C. Sections were washed for 5 min in PBS and incubated for 1 h with biotin-SP-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H + L) antibody (1:500 in PBS/BSA 0.1%, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA)). After a wash in PBS, sections were incubated for 30 min with peroxidase-conjugated streptavidin (1:500 in PBS; Jackson ImmunoResearch Laboratories) and developed with the Vector NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

RT-PCR and Semiquantitative Analysis—RT-PCR was used to amplify the transcripts of IDO, tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO; EC 1.13.11.11), INDOL1 (indoleamine 2,3-dioxygenase-like 1, EC 1.13.11.52), arylformamidase (EC 3.5.1.9), kynureninase (EC 3.7.1.3), kynurenine aminotransferase (EC 2.6.1.7), and kynurenine 3-hydroxylase (EC 1.14.13.9) in mouse epididymal total RNA extracts. One μg of total RNA was reverse transcribed using ImPromII reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega Corp., Madison, WI). For each sequence, specific primers were used (see Table 1). Amplification of GAPDH served as a semiquantitative control. Relative transcript levels of Trp-catabolizing enzymes in mouse caput epididymal RNA extracts of WT and *Ido*^{-/-} animals were compared with those in lung tissue of the same animals.

PCR amplifications were carried out as described earlier (12) with 2 μl of reverse-transcribed mixture using 1 unit of *Taq* polymerase (New England Biolabs) on different tissue samples (minimum *n* = 3). Suppression of spermatogenesis was achieved via busulfan (1,4-butanediol dimethanesulfonate) treatment (Sigma-Aldrich). Busulfan (35 mg/kg) diluted in dimethyl sulfoxide (50%) was inoculated intraperitoneally in animals (two injections at 15 and 22 days postnatal (DPN)). Animals were then sacrificed at 30 DPN.

Western Blots—Proteins (40 μg) were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond ECL, GE Healthcare Biosciences). Blots were blocked with 10% low fat dried milk, 0.1% Tween 20, Tris base salt (TBS) and probed overnight at 4 °C with anti-GAPDH (1:5000, Sigma-Aldrich), anti-mTor, anti-phosphorylated mTor, anti-p70S6K, anti-phosphorylated p70S6K, and anti-beclin-1/ATG6. Secondary antibody was a goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugate (1:5000; GE Healthcare) that was detected using the ECL Western blotting Detection kit on HyperfilmTM (GE Healthcare).

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry—Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was performed on an Agilent Technologies (Santa Clara, CA) 1200 SL HPLC system connected to an AB SCIEX (Foster City, CA) 4000 QTrap mass spectrometer equipped with a turbo ion spray source. LC separation was carried out on an Atlantis T3 3-μm (2.1 × 150-mm) reversed phase column (Waters Corp., Milford, MA) at ambient temperature using a mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water (Solvent A) and acetonitrile (Solvent B), respectively. The gradient employed was as follows: 0–2 min, 0% B; 2–10 min, linear

TABLE 1

Oligonucleotide primers used in RT-PCR assays

AFMID, arylformamidase; KYNU, kynureninase; KMO, kynurenine 3-hydroxylase; 3HAO, 3-hydroxyamino oxidase; KAT3, kynurenine aminotransferase.

Gene product	Primer sequences (5' → 3')	Product length	T_m
		bp	°C
IDO1-T1	GGGGTCAGTGGAGTAGACA (forward) GCAGATTTCTAGCCACAAGGA (reverse)	173	60
IDO1-T2	TGCC TGGTTT T GAGGTTTTC (forward) GCAGATTTCTAGCCACAAGGA (reverse)	246	60
INDOL	CCTCATCCCTCCTTCCTTTC (forward) GGAGCAATTGCC TGGTATGT (reverse)	218	57
TDO	TGAATGCGCAAGAACTTCAG (forward) TTCCAGAACC GAGA ACTGCT (reverse)	244	58
KYNU	CTTGCCCTTCAACCGAAA (forward) CAAAGCATT CATTAGAGCTATTTCTT (reverse)	200	57
KMO	TTCAATAAGCAGAGAAA ACTTAAACAA (forward) TCACACCC TACAACAAGGTCA (reverse)	199	57
3HAO	CTAAGCCTGTTGGGGACAG (forward) GGTTCCAGCAGGCACCCAG (reverse)	197	60
AFMID	CCGCAGTGTGCTGTTCTAC (forward) CTATGAGGGGCTCCAGGTC (reverse)	200	60
KAT3	GCTGCCAAGATGGTCTCTGT (forward) TTCCACTGGGAAAGGATTTTT (reverse)	200	57
GAPDH	GAAGACTGTGGATGGCCCTC (forward) GTTGAGGGCAATGCCAGCCCC (reverse)	358	58

increase from 0 to 90% B; 10–12 min, hold at 90% B. Then the mobile phase was returned to 0% B, and the column was re-equilibrated with 0% B for 5 min. The flow rate was 400 μ l/min. Injection volumes were 10 μ l.

The 4000 QTrap mass spectrometer was operated in positive mode using turbo ion spray with gas 1, gas 2, and curtain gas set at 50, 50, and 10 arbitrary units, respectively. The source was heated to 500 °C. Quantitative determination was performed by multiple-reaction monitoring. All MS parameters were optimized by direct infusion, and the source parameters were optimized by flow injection. Data analysis was performed using Analyst version 1.5.1 (AB SCIEX).

Calibration curves were generated by serial dilution of 1 mM aqueous stock solutions of unlabeled Trp, kynurenine (KYN), kynurenic acid (KA), 3-hydroxykynurenine, xanthurenic acid, anthranilic acid, 3-hydroxyanthranilic acid, indole-3-acetic acid, melatonin and serotonin (Sigma-Aldrich) over a concentration range of 0.5–400 μ M. To compensate for matrix effects, standard solutions were spiked with a ubiquitously 13 C isotope-labeled yeast extract (Silantes GmbH) as well as 0.1 μ M melatonin- d_4 and 1.0 μ M serotonin- d_4 creatinine sulfate complex from C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, Canada). Standard calibration curves were plotted as the chromatographic peak area ratio versus the corresponding nominal concentration ratio. A $1/x$ weighted regression analysis was used to determine the slope, intercept, and coefficient of determination (r^2). Lower limits of quantitation ranged from 1 to 5 nM with the exception of tryptophan (0.1 μ M), and the linear ranges extended from 500 to 3000 nM except for tryptophan (400 μ M).

Measurement of Cytokine Levels—Commercially available mouse inflammation antibody arrays (RayBiotech, Inc., Norcross, GA) were used to detect cytokine expression. Caput epididymal protein extracts ($n = 3$) were treated as described by the supplier.

Measurement of Proteasome Activity and Ubiquitin Protein Conjugate Contents—To assess the peptidase activities associated with proteasomal activity, caput epididymal samples from WT and *Ido1*^{-/-} mice were homogenized in 10 volumes of

ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 250 mM sucrose, 10 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, and protease inhibitors (10 μ g/ml each of antipain, aprotinin, leupeptin, and pepstatin A and 20 μ M PMSF) as described (13, 14). Proteasomes were isolated by three sequential centrifugations (13, 14). The final pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 5 mM MgCl₂ and 20% glycerol. Protein content of these concentrates was determined according to Lowry *et al.* (15). Proteasome chymotrypsin-like, trypsin-like, and peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing activities were determined by measuring the hydrolysis of the fluorogenic substrates succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), Boc-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LRR-AMC), and benzoyloxycarbonyl-Leu-Leu-Glu- β -naphthylamide (LLE-bNa) (Sigma-Aldrich), respectively. Fifteen μ l of concentrate were mixed with 60 μ l of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 units of aprotinin, and either 300 μ M LLVY-AMC or 800 μ M LRR-AMC and LLE-bNa, respectively. Reactions were performed with or without the proteasome inhibitor MG132 (40 μ M; KCOM Group Plc, Hull, UK). Chymotrypsin- and trypsin-like activities were determined by measuring the accumulation of the fluorogenic cleavage product AMC by means of a fluorescence spectrometer FLX800 (BioTek, Colmar, France) over 45 min at excitation and emission wavelengths of 380 and 440 nm, respectively. Peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing activity was determined by measuring the accumulation of the fluorogenic cleavage product (bNa) over 45 min at excitation and emission wavelengths of 340 and 450 nm, respectively. Proteasome activities were measured by calculating the difference between arbitrary fluorescence units recorded with or without MG132 in the reaction medium. The final data were corrected by the amount of protein in the reaction medium. The time course for the accumulation of AMC or bNa after hydrolysis of the substrate was analyzed by linear regression to calculate activities (*i.e.* the slopes of best fit of accumulated AMC or bNa versus time).

Accumulation of Ub protein conjugates in caput epididymal samples from WT and *Ido1*^{-/-} mice was assessed by immuno-

blotting using the FK1 antibody (KCOM), which recognizes polyubiquitin chains. Samples were homogenized in ice-cold 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.25 mM *N*^α-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, 5 mM *N*-ethylmaleimide, 5 μg/ml leupeptin, and 5 μg/ml soybean trypsin inhibitor (13). Homogenates were centrifuged for 5 min (1500 × *g*, 4 °C). Supernatants were centrifuged again for 10 min (10,000 × *g*, 4 °C), and the resulting supernatants were ultracentrifuged for 3 h (100,000 × *g*, 4 °C). The final supernatants were stored at –80 °C until processed. The accumulation of Ub-protein conjugates was measured on proteins from this last supernatant. Protein concentration was determined as described (15). Twenty-five μg of protein were separated on 7.5% (w/v) acrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. The FK1 antibody was used at a 1:1000 dilution. Signals were detected using the ECL+ detection kit (GE Healthcare) after exposition on Hyperfilm ECL (GE Healthcare), quantified using the Image J software, and normalized against the amount of protein determined by Ponceau Red staining to correct for uneven loading. [³⁵S]Methionine incorporation was used to assess the rate of protein synthesis in caput epididymides and was performed as originally described (16, 17).

Fertility and Spermatozoa Analyses—Five each of WT and *Ido1*^{−/−} male mice, 6 or 12 months of age, were mated for 8 days with 2 BALB/c WT females. At the end of the 15-day reproductive period, males were removed, and females were housed in individual cages in order to follow eventual pregnancies and deliveries. Time to conceive and number of pups per litter were monitored. For sperm preparations, mice were killed by CO₂ asphyxiation. Epididymides were removed, divided into caput and caudal regions, and transferred to a small glass dish containing 1 ml of M2 medium (Sigma-Aldrich). To recover the spermatozoa, the caudae epididymides were repeatedly punctured with a 26-gauge needle. After 5 min of incubation to allow for sperm dispersal, these preparations were centrifuged at 500 × *g* for 5 min, and pellets were resuspended in 200 μl of M2. Eosin exclusion was used to assess sperm viability, whereas morphology was examined using the Shorr stain. The presence of leukocytes in cauda luminal fluid was assessed using a commercially available LeucoscreenTM kit as recommended by the supplier (FertiPro NV).

Statistical Analysis—Analysis of variance ANOVA 2 and Student's *t* tests were performed to determine the significance of differences between samples. *p* values of ≤0.05 were regarded as significant.

RESULTS

Tryptophan-catabolizing Enzyme Expression in WT and *Ido1*^{−/−} Mouse Caput Epididymis—Immunocytochemical analysis revealed that IDO is expressed in WT BALB/c mice posterior to the initial segment S1 of the caput epididymis and ceases after the caput's most distal segment, S5 (Fig. 2A). IDO expression is maximal in S2–S4, and patchy in S5. IDO accumulates as a cytoplasmic protein in the epithelial cells of those segments. Fig. 2, B and C, shows that both known IDO transcripts (IDO mRNA1 and mRNA2; *Ido1*-T1 and *Ido1*-T2, respectively) are expressed in WT BALB/c caput epididymis and that they accumulate over a period of 25–30 days during

postnatal ontogenesis until sexual maturity is reached and spermatozoa are released into the epididymal lumen. To verify that spermatozoa entering the epididymal tubule at sexual maturity could trigger IDO expression, we inhibited spermatogenesis by treating male mice aged 20 days with busulfan, which blocks germinal cell meiosis without affecting the secretory activity of Sertoli cells. Busulfan treatment significantly inhibited IDO expression at 30 DPN as compared with DMSO-treated as well as untreated controls (Fig. 2C). Other tryptophan-catabolizing enzymes, such as INDOL (also called IDO2 (18, 19)) and TDO (11), are expressed at much lower levels in the adult mouse caput epididymis (Fig. 2, B and D). The absence of IDO expression was not compensated by increased accumulation of TDO and INDOL transcripts in the *Ido1*^{−/−} animals (Fig. 2D). In fact, these transcripts were even less abundant in *Ido1*^{−/−} as compared with the WT controls.

Evaluation of Tryptophan Catabolites along the IDO Pathway in WT and *Ido1*^{−/−} BALB/c Mice—Using semiquantitative RT-PCR, we measured the expression of the first five enzymes of the IDO pathway in total RNA extracts of caput epididymal tissue (Fig. 2E). It appears that the mouse caput epididymis expresses some of the major enzymes of the kynurenine pathway downstream of IDO. A semiquantitative comparison of the different amplifications carried out on a pool of WT caput epididymal cDNAs (*n* = 6) indicated that arylformamidase and kynurenine aminotransferase were the most abundant enzymes of the IDO pathway in mouse caput epididymis aside from IDO itself. Kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase were expressed at much lower levels.

LC-ESI-MS/MS was used to measure the concentrations of various tryptophan-derived metabolites in caput epididymal extracts as well as in sera from WT and *Ido1*^{−/−} animals (Table 2 and Fig. 3A). In agreement with the constitutive expression of IDO in the mouse caput epididymis, KYN was highly abundant in caput extracts of WT animals. Downstream of KYN, KA and 3-hydroxykynurenine (HK) were the second and third most abundant kynurenine species, respectively, in WT caput epididymis. Anthranilic acid, 3-hydroxyanthranilic acid, and xanthurenic acid were also present in WT caput extracts but at lower concentrations that were similar to systemic levels (Fig. 3). The concentrations of quinolinic acid and nicotinic acid in both caput epididymis and serum samples were below the lower limits of quantitation of the MS method employed.

Identical measurements of Trp and its metabolites were performed in *Ido1*^{−/−} animals. As illustrated in Fig. 3A, we observed a dramatic decrease in both KYN (>100 times less) and KA (about 50 times less) levels in caput epididymal extracts of *Ido1*^{−/−} animals. The caput epididymal levels of HK, anthranilic acid, 3-hydroxyanthranilic acid, and xanthurenic acid were also reduced in the *Ido1*^{−/−} animals but to a lesser extent.

Does the Absence of IDO Activity Change the Inflammatory Status of the Caput Epididymis?—The KYN/Trp ratio is commonly used to evaluate IDO activity and, by extension, the immunosuppressive status of a given tissue or biological fluid (20). Fig. 4A shows that the KYN/Trp ratio in WT caput epididymis is about 38-fold higher than that in serum, suggesting that in adult WT mice, the caput epididymis is in an immunosuppressed state. In the *Ido1*^{−/−} animals, the situation was reversed,

IDO in the Epididymis

with a caput KYN/Trp ratio not much different from serum (0.008 and 0.004, respectively).

To evaluate the inflammatory status of the caput epididymis in WT and *Ido1*^{-/-} animals, we measured the levels of various inflammatory cytokines by the use of mouse inflammation anti-

body arrays from RayBiotech. As shown in Fig. 4B, levels of some selected inflammatory cytokines were significantly higher in *Ido1*^{-/-} than in WT animals, attesting to an overall more pronounced or at least different inflammatory state of the caput territory in the absence of IDO. In agreement with the hypoth-

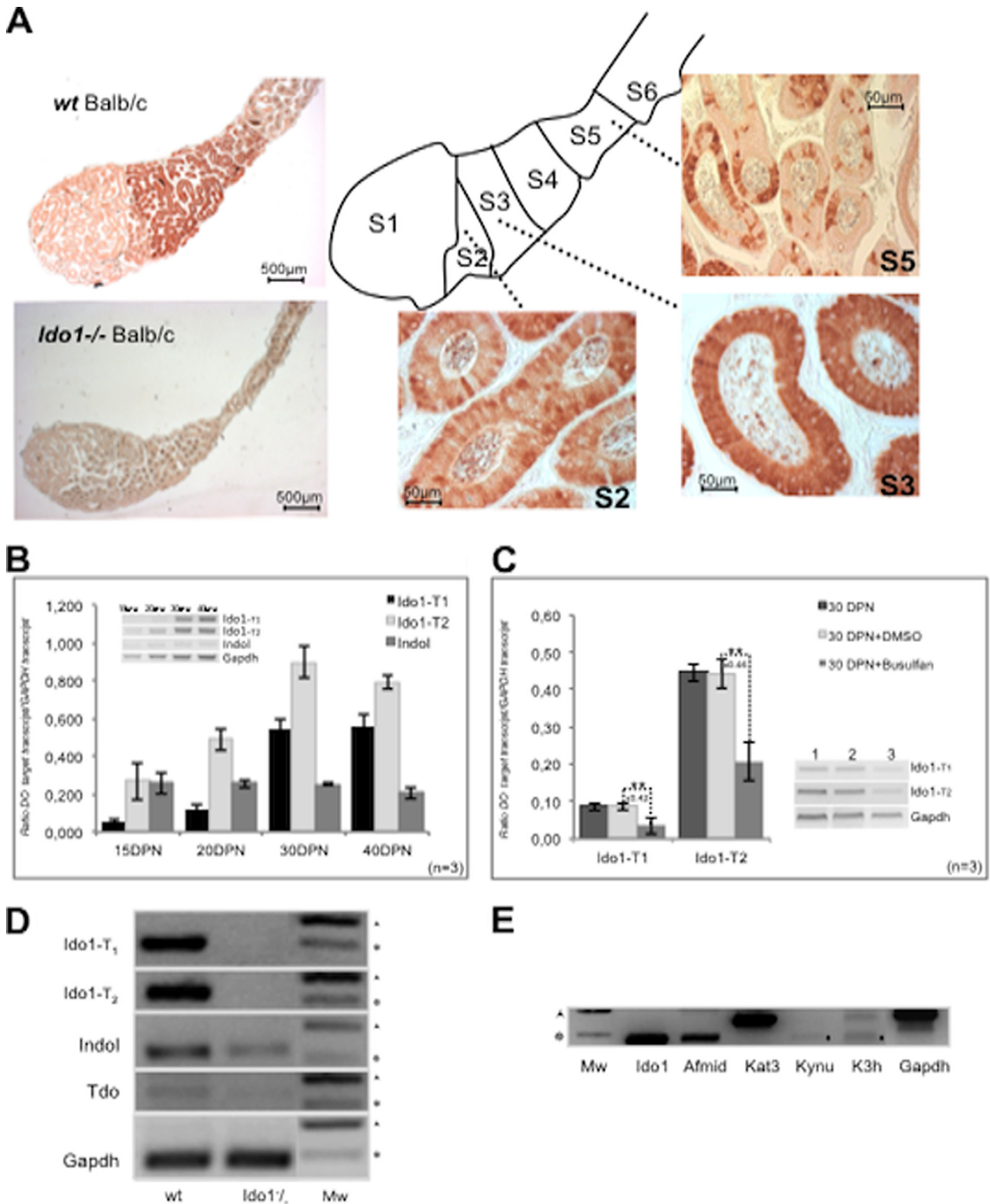


TABLE 2

Concentrations of Trp and Trp catabolites along the kynurenine pathway in caput epididymis extracts and whole sera of WT and *Ido1*^{-/-} animals

Mean concentrations are given in nmol/g for all analytes except tryptophan, where the concentrations are in $\mu\text{mol/g}$. S.E. values ($n = 3$) are shown in italic type. Concentrations in sera are given in nM except tryptophan, where the concentrations are in μM . Numbers with plus and minus symbols preceding indicate positive (+) or negative (-) -fold differences between WT and *Ido1*^{-/-} animals. Kyn, kynurenine; AA, anthranilic acid; HAA, 3-hydroxyanthranilic acid; XA, xanthurenic acid.

	Trp	Kyn	KA	HK	AA	HAA	XA
Caput epididymidis							
WT							
Mean	70.91	80547.23	1241.21	688.91	103.18	52.89	20.62
S.E.	<i>1.14</i>	<i>12704.51</i>	<i>54.51</i>	<i>37.40</i>	<i>7.05</i>	<i>4.12</i>	<i>6.02</i>
<i>Ido1</i> ^{-/-}							
Mean	174.03	680.06	25.30	198.17	70.14	36.98	12.87
S.E.	<i>9.33</i>	<i>60.38</i>	<i>0.66</i>	<i>24.70</i>	<i>9.39</i>	<i>2.10</i>	<i>1.13</i>
<i>Ido1</i> ^{-/-} versus WT (-fold difference)	+2.45	-118.44	-49.06	-3.48	-1.47	-1.43	-1.60
Serum							
WT							
Mean	50.68	1467.65	105.98	49.05	78.43	24.09	62.38
S.E.	<i>7.62</i>	<i>356.11</i>	<i>43.52</i>	<i>27.52</i>	<i>4.58</i>	<i>4.97</i>	<i>12.40</i>
<i>Ido1</i> ^{-/-}							
Mean	53.66	420.73	52.60	24.01	64.28	18.57	37.36
S.E.	<i>10.15</i>	<i>79.65</i>	<i>9.99</i>	<i>13.17</i>	<i>2.15</i>	<i>2.91</i>	<i>1.60</i>
<i>Ido1</i> ^{-/-} versus WT (-fold difference)	+1.06	-3.49	-2.01	-2.04	-1.22	-1.30	-1.67

esis that outside the caput epididymis other tryptophan-catabolizing enzymes (TDO presumably) could compensate for the lack of IDO in *Ido1*^{-/-} animals, we show in Fig. 4C that none of the cytokines found up-regulated in the caput extracts are statistically different in the sera of *Ido1*^{-/-} animals as compared with WT. Confirming the peculiar inflammatory behavior of the caput epididymis territory, the three selected cytokines that did not change in WT versus *Ido1*^{-/-} caput (i.e. IL-4, MCP1, and MCSF) were found down-regulated in the serum samples of WT animals versus *Ido1*^{-/-} (Fig. 4, B and C).

Does the Absence of IDO Activity Increase the Availability of Trp for the Other Trp-dependent Pathways?—The absence of IDO expression and, consequently, of Trp consumption along the kynurenine pathway results in a 2.5-fold increase in caput epididymal Trp concentration (Fig. 5A). Because Trp can be used for the generation of other Trp derivatives such as indole-3-acetic acid, serotonin, and melatonin (see Fig. 1), we investigated whether there was any increase in the abundance of these metabolites in caput epididymal extracts of *Ido1*^{-/-} animals. As shown in Table 3, the observed increase in Trp concentration in caput epididymal extracts of *Ido1*^{-/-} animals had no significant impact on the abundance of indole-3-acetic acid, serotonin, and melatonin.

The major utilization route of amino acids is along the protein synthesis pathway to support the production of proteins

(see Fig. 1). Considering that Trp is often the rate-limiting amino acid in protein synthesis, we asked whether the increase in Trp concentration in caput epididymal extracts of *Ido1*^{-/-} animals could lead to an increase in protein synthesis and, consequently, to an increased caput protein content. To that end, we compared the protein contents of WT and *Ido1*^{-/-} caput epididymal samples and observed, in relation to organ weight, significantly greater amounts of protein in caput epididymal extracts of *Ido1*^{-/-} animals as compared with WT controls (Fig. 5B). This increase in protein content was not due to an enlargement of the caput epididymis in *Ido1*^{-/-} animals, because the mean weights of caput tissues were not statistically different in *Ido1*^{-/-} and WT animals. It was also not the consequence of increased cell content or proliferation as measured via histological and immunocytological approaches (DAPI staining and Ki67 or PCNA antibody; data not shown).

*The Higher Protein Content of *Ido1*^{-/-} Caput Epididymis Extracts Is Due to Decreased Protein Degradation*—Cellular or tissue protein content is a balance between protein synthesis and protein degradation. To clarify the origin of the increased protein content in caput extracts from *Ido1*^{-/-} animals, we monitored both. Regarding protein synthesis, an excess of amino acid availability is known to activate the mTOR pathway, ultimately leading to an increase in protein synthesis (21–23). To monitor whether the increase in Trp

FIGURE 2. IDO expression in the mouse epididymis. A, immunohistochemical localization of IDO protein in a longitudinal section (top left panel) of a 6-month-old WT BALB/c caput epididymis. The top middle panel schematizes the various segments separated by connective septa found in the caput. Panels S2, S3, and S5 show the intracellular epithelial localization of IDO in the various segments as well as its patchy appearance (especially in segment S5). The bottom left panel illustrates the absence of IDO in a longitudinal section of a caput epididymis from *Ido1*^{-/-} male mice 6 months of age. B, semiquantitative RT-PCR amplifications of the two known IDO transcripts (IDO1-T1 and IDO1-T2), as well as the INDOL transcript, in caput epididymal total RNA extracts from 6-month-old male mice ($n = 3$) during postnatal ontogenesis at 15, 20, 30, and 40 days of life. Transcript levels in the y axis are given in arbitrary units representing the transcript level normalized to GAPDH expression. A representative amplification is shown as an inset. C, semiquantitative RT-PCR amplifications of the two known IDO transcripts in untreated (30 DPN), vehicle-treated (30 DPN + DMSO), and busulfan-treated (30 DPN + Busulfan) animals (lanes 1–3, respectively), in the representative Western blot presented as an inset. Transcript levels in the y axis are given in arbitrary units representing the transcript level normalized to GAPDH expression. D, representative RT-PCR amplifications of IDO-T1, IDO-T2, INDOL, and TDO transcripts in WT and *Ido1*^{-/-} caput epididymis total RNA extracts showing the complete loss of both IDO transcripts in the caput of *Ido1*^{-/-} animals. Please note that INDOL and TDO mRNA are not up-regulated in parallel. Boldface asterisks on the right indicate the 400 and 200 bp bands of the molecular weight marker run in lane Mw. E, RT-PCR analysis of the expression of the various enzymes (IDO (*Ido1*), arylformamidase (*Afmid*), kynurenine aminotransferase (*Kat3*), kynureninase (*Kynu*), and kynurenine 3-hydroxylase (*K3h*)) involved in the kynurenine pathway (see Fig. 1) in the caput epididymis of WT BALB/c mice along with the amplification of a GAPDH control. Each amplification was performed on pooled cDNA generated from caput epididymal tissues collected from 6 animals (aged 6 months). Boldface asterisks on the right indicate the 400 and 200 bp bands of the molecular weight marker run in lane Mw. Error bars, S.D.

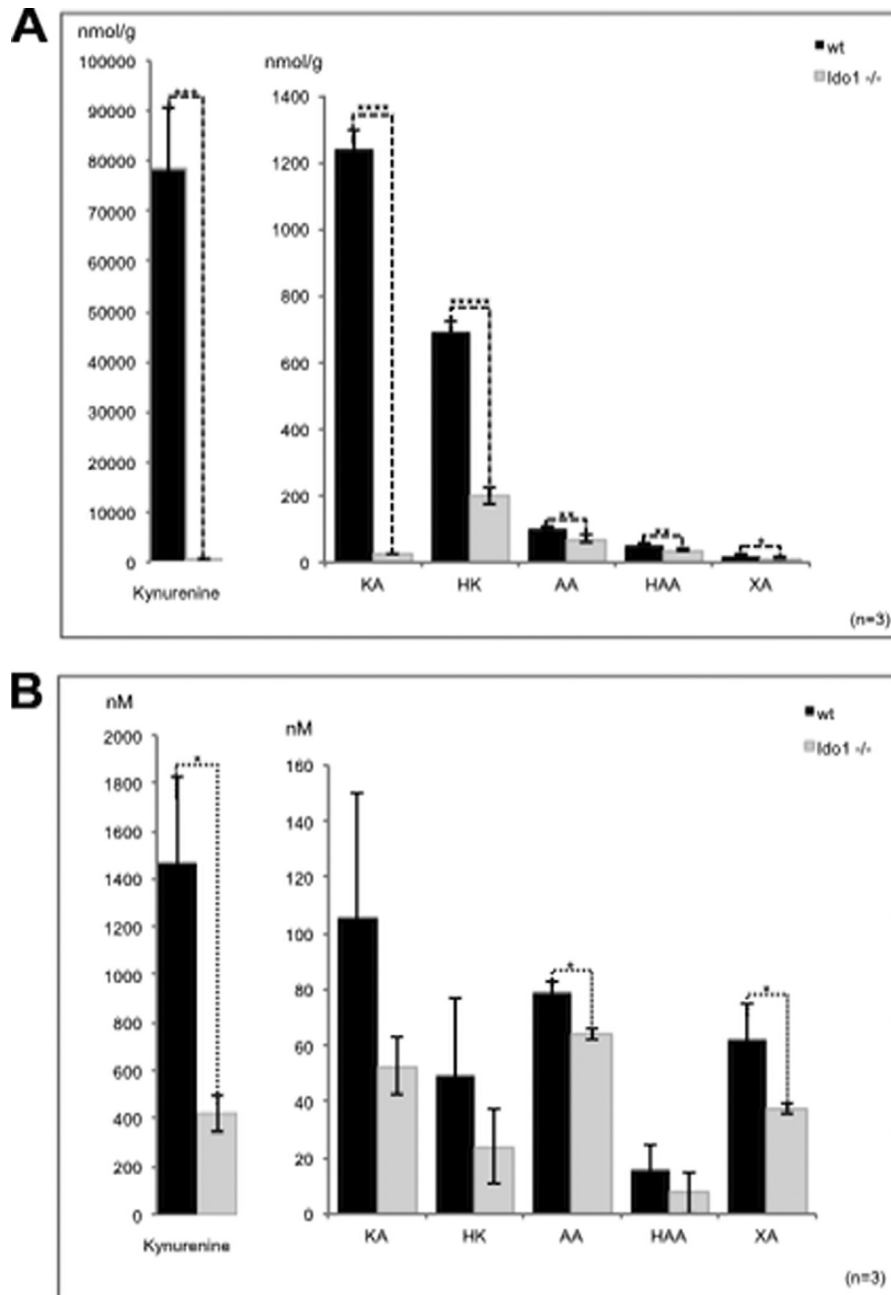


FIGURE 3. Concentrations of Trp and Trp catabolites along the kynurenine pathway in caput epididymal extracts and whole sera of WT and *Ido1*^{-/-} animals. Histograms illustrate the recorded differences in kynurenine concentrations in caput epididymal extracts (A) and sera (B) from 6-month-old WT and *Ido1*^{-/-} animals. KA, kynurenic acid; KH, hydroxykynurenic acid; AA, anthranilic acid; HAA, hydroxyanthranilic acid. *, $p \leq 0.5$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$; *****, $p \leq 0.00001$. Error bars, S.E.

observed in caput epididymal extracts of *Ido1*^{-/-} animals stimulates protein synthesis via the mTOR pathway, we performed Western blot analyses using antibodies directed against phosphorylated mTOR and one of its direct targets, the p70S6 kinase. Fig. 5C shows that neither kinase is activated in caput epididymal extracts of both *Ido1*^{-/-} and WT animals. To confirm that increased protein synthesis was not responsible for the higher protein content of *Ido1*^{-/-} caput tissues, we have carried out [³⁵S]methionine incorporation assays in organotypic cultures of caput epididymides from WT and *Ido1*^{-/-} animals. Data presented in Fig. 5D attest

that the rate of the amino acid tracer incorporation is not statistically different between WT and *Ido1*^{-/-} animals.

Because pathways leading to increased protein synthesis were not enhanced in *Ido1*^{-/-} animals, we hypothesized that the higher protein content was due to a decrease in protein degradation. The two major cellular pathways responsible for protein degradation are the ubiquitin/proteasome system and the lysosomal compartment. To evaluate the activity of the ubiquitin/proteasome system in caput epididymal samples, we first monitored the three major proteolytic activities associated with the 26 S proteasome. As shown in Fig. 6A, chymotrypsin-like, tryp-

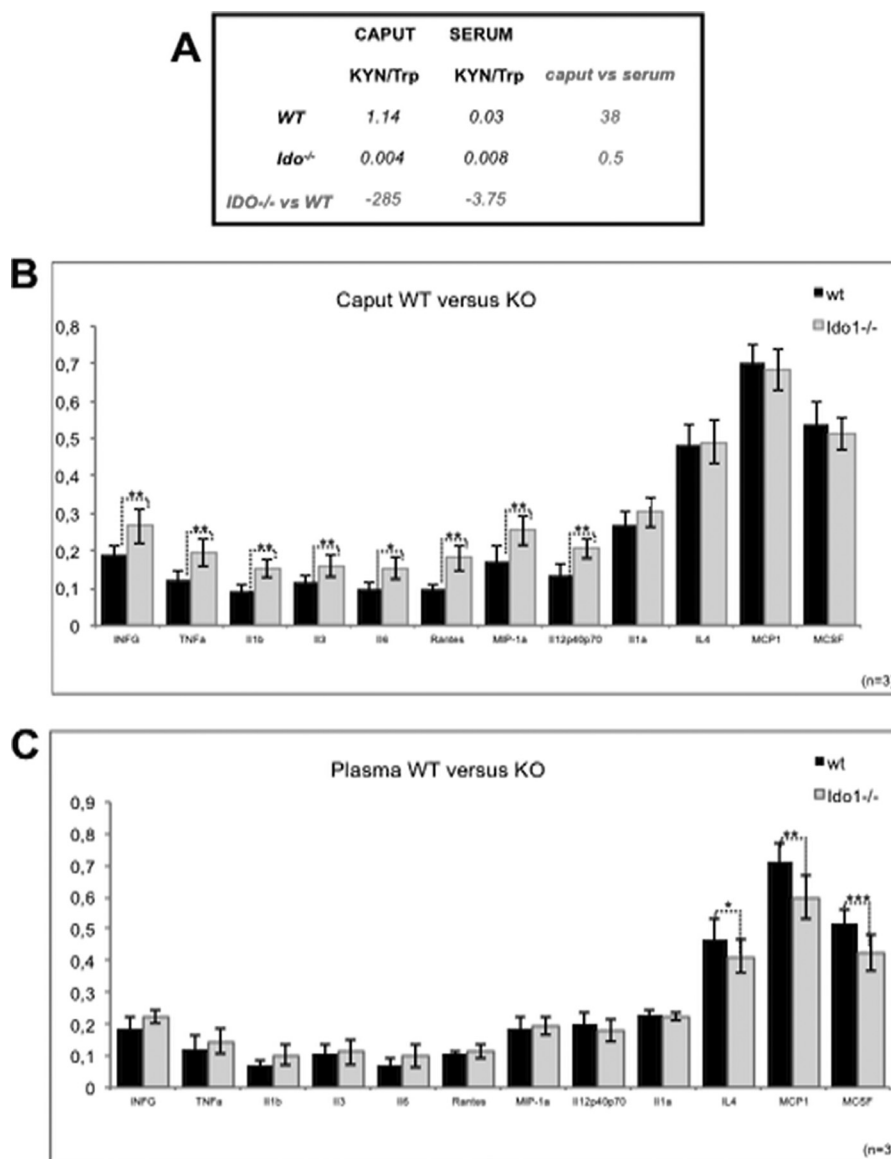


FIGURE 4. **Analysis of the inflammatory status of the epididymis.** A, Kyn/Trp ratio in caput epididymis and serum from 6-month-old WT and *Ido1*^{-/-} animals. -Fold differences are indicated on the right side of the table (caput versus serum) and at the bottom of the table (*Ido1*^{-/-} versus WT). B and C, histograms show the levels of various inflammatory cytokines (INF- γ , TNF- α (TNF α), interleukin-1 β (IL1 β), IL-3 (IL3), interleukin-6 (IL6), regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES), interleukin-12p40p70 (IL12p40p70), interleukin 4 (IL4), monocyte chemoattracting protein 1 (MCP1), and macrophage/monocyte colony-stimulating factor (MCSF) in caput epididymal extracts (B) and sera (C) from 6-month-old WT and *Ido1*^{-/-} animals. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$. Error bars, S.E.

sin-like, and peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing activities were decreased by ~40% in *Ido1*^{-/-} caput epididymal samples as compared with WT ($p < 0.001$). In contrast to proteasomal activities, poly-Ub conjugates remained unchanged in *Ido1*^{-/-} versus WT caput epididymal samples (Fig. 6B).

The Lysosomal/Autophagic Pathway Is Locally Activated in the Caput Epididymis of *Ido1*^{-/-} Animals—Next we asked whether the lysosomal pathway would back up the failing proteasomal pathway in the caput epididymis of *Ido1*^{-/-} animals. The lysosomal pathway is a complex pathway that uses several parallel routes, including macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy. In Fig. 6C, we show that these autophagic processes were indeed triggered in the caput epididymis of *Ido1*^{-/-} animals, because beclin-1/ATG6, one of the early ATG (autophagy-related) gene products (reviewed in

Ref. 24), was clearly up-regulated in caput epididymal samples of *Ido1*^{-/-} animals as compared with WT.

Because endosomal/lysosomal autophagy is often reflected in cell phenotypic modifications, we used photon and electron microscopy to compare WT and *Ido1*^{-/-} caput epididymal tissues. As shown in Fig. 7, A–D, IDO deficiency led to a caput segment S2-localized phenotype that was characterized by cytoplasmic vesicles, which were not visible in WT caput sections. Transmission electron microscopy of segment S2 of the caput epididymis in *Ido1*^{-/-} animals (Fig. 7, E–G) revealed an elevated level of multilamellar/multivesicular bodies as compared with WT sections. Such structures are known autophagic features (25).

IDO Deficiency Affects Sperm Number and Morphology but Not Overall Fertility—To study the impact of IDO deficiency on reproductive competence, *Ido1*^{-/-} males were mated

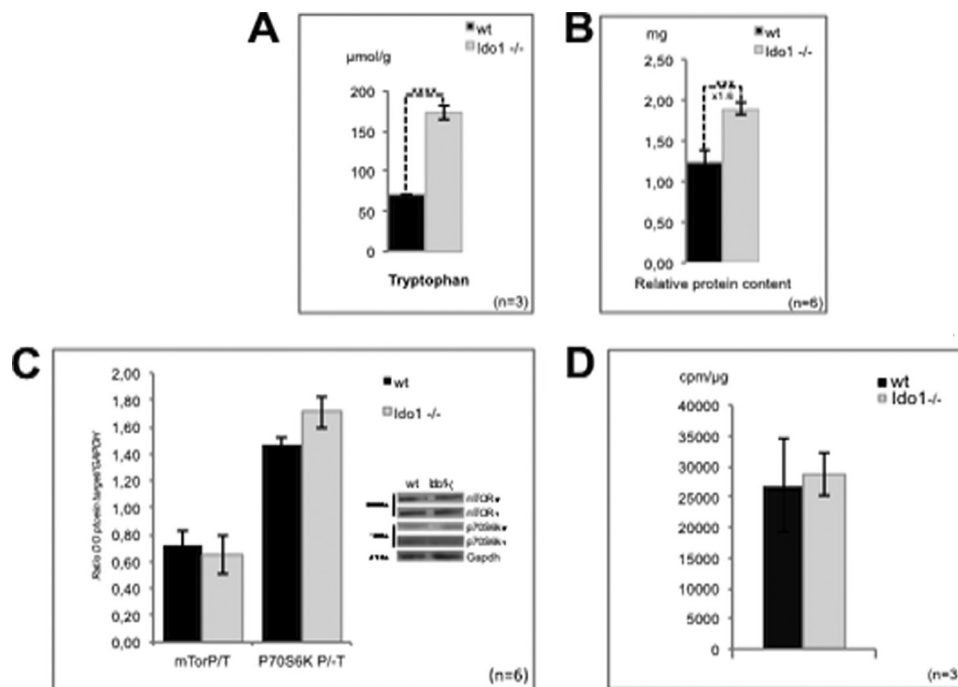


FIGURE 5. IDO deficiency leads to Trp accumulation and higher protein content in caput epididymal extracts of *Ido1*^{-/-} animals. *A*, histogram of Trp concentrations in caput epididymal extracts from 6-month-old *Ido1*^{-/-} and WT mice, respectively (*n* = 3 each). *B*, evaluation of caput epididymal total protein content relative to organ weight from 6-month-old WT and *Ido1*^{-/-} mice (*n* = 6 each). Mean weights of WT caput tissues were not found to be statistically different from that of *Ido1*^{-/-} caput tissues and were 20.17 ± 0.87 and 19.37 ± 1.87 mg, respectively. *C*, a representative Western blot showing the levels of total mTOR (*mTOR-T*) or the activated phosphorylated form of mTOR (*mTOR-P*) as well as of the total p70S6K (*p70S6K-T*) and the activated phosphorylated form of p70S6K (*p70S6K-P*) is shown in the left panel. GAPDH immunodetection was used as an internal standard. Histograms in the right panel show a comparative quantitative analysis of phosphorylated mTOR/total mTOR and phosphorylated p70S6K/total p70S6K between caput epididymis protein extracts from 6-month-old WT and *Ido1*^{-/-} mice (*n* = 6 each). *D*, [³⁵S]methionine incorporation in organotypic cultures of caput epididymis from WT and *Ido1*^{-/-} animals (*n* = 3 each). Error bars, S.E.

TABLE 3
Concentrations in nm/kg of other non-kynurenine Trp catabolites in caput epididymis extracts

For non-kynurenine Trp derivatives (namely indoxyl acetic acid (IAA), serotonin, and melatonin), mean concentrations are given in nmol/g. S.E. values (*n* = 3) are shown in italic type. Numbers with plus and minus symbols preceding indicate positive (+) or negative (-) -fold differences between WT and *Ido1*^{-/-} animals.

	IAA	Serotonin	Melatonin
WT			
Mean	133.75	1708.40	9.80
S.E.	9.18	355.20	0.69
<i>Ido1</i> ^{-/-}			
Mean	140.92	2382.83	11.07
S.E.	16.90	641.70	0.53
<i>Ido1</i> ^{-/-} versus WT (-fold difference)	+1.05	+1.39	+1.13

with WT BALB/c female mice. Mating was conducted using female mice at optimal reproductive age (3 months) and groups of *n* = 5 each WT or *Ido1*^{-/-} males 6 and 12 months of age, respectively. No changes in mating behavior were noticed with any of the animal groups tested. Both 6- and 12-month-old male *Ido1*^{-/-} mice showed normal fertility, with litter sizes of 6.6 ± 0.7 and 6.1 ± 1.0 pups, respectively (Fig. 8A). In comparison, the respective litter sizes in WT mice were 5.4 ± 1.5 and 6.6 ± 0.6 pups. Time to gestation was also comparable (data not shown). These data suggested that at least up to an age of 1 year, IDO deficiency had no deleterious impact on the fertilization competence of *Ido1*^{-/-} males. Nevertheless, we noticed some interesting differences between WT and *Ido1*^{-/-} males. First, the cauda epididymal sperm counts were nearly twice as high in

Ido1^{-/-} animals as compared with WT animals (Fig. 8B). In the absence of a difference in testis weight (Fig. 8C), the increase in sperm count was unlikely to be due to an increase in testicular spermatogenesis. Sperm viability and motility were also assessed, and we found that the percentages of dead and immotile spermatozoa were only slightly higher in cauda preparations from *Ido1*^{-/-} as compared with WT animals (not shown). However, we did notice a significant increase in the proportion of spermatozoa exhibiting abnormal morphology in the *Ido1*^{-/-} animals versus WT animals, including pinhead, giant head, hairpin, and kite spermatozoa (Fig. 8E). Finally, we observed that the concomitant increase in sperm number and decrease in sperm quality were associated with a significant decrease in the leukocyte count in the caudal epididymal fluid of *Ido1*^{-/-} animals (Fig. 8D).

DISCUSSION

The IDO Pathway and Immunosuppression in the Mouse Caput Epididymis—In accordance with previous studies (11, 26, 27), IDO is strongly expressed in the mouse caput epididymis, whereas TDO is not. The expression of both known IDO transcripts increased gradually during postnatal development of the caput epididymis and reached a maximum at the time of sexual maturity. IDO-mRNA2 appears to be the more abundant IDO transcript in the mouse caput epididymis. We have shown that INDOL, which is a mammalian IDO homologue located in close proximity on the same mouse chromosome as the result of an IDO gene duplication event (26, 27), is also

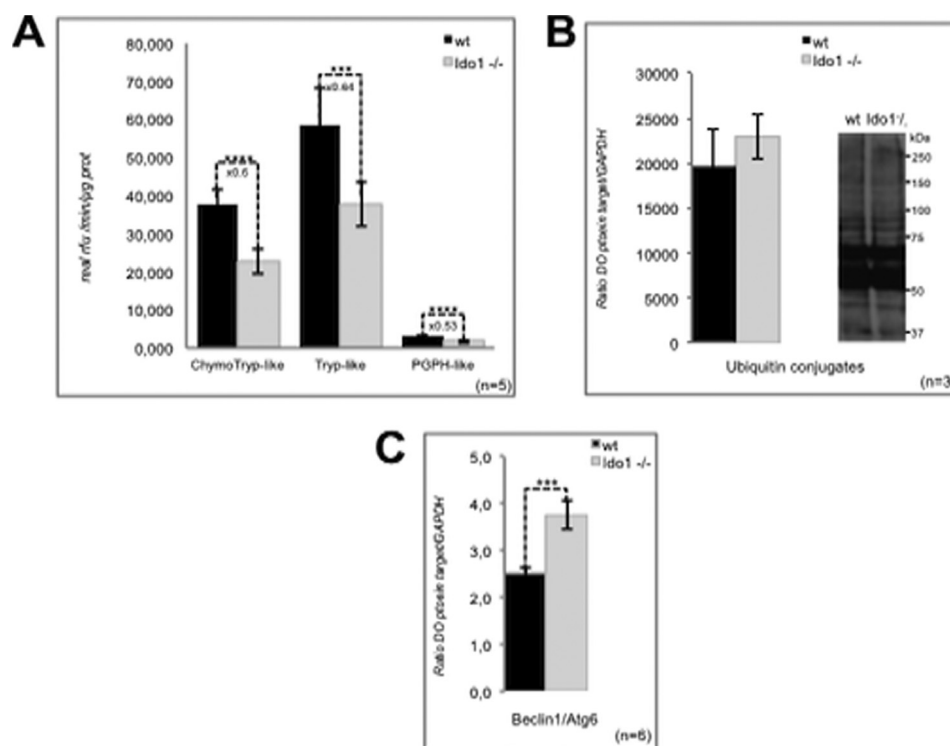


FIGURE 6. Proteasomal protein degradation and autophagy induction in WT and *Ido1*^{-/-} caput epididymal protein extracts. *A*, histograms show the three major peptidase activities of the proteasome (chymotrypsin-like (*ChymoTryp-like*), trypsin-like (*Tryp-like*), and peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing (*PGPH-like*)) in caput epididymal protein extracts from 6-month-old WT and *Ido1*^{-/-} mice (left). The numbers above the columns give the -fold difference recorded. *B*, histogram presents the level of polyubiquitinated proteins found in caput protein extracts from 6-month-old WT and *Ido1*^{-/-} animals (a representative Western blot is shown on the right to show that neither the intensity nor the banding pattern changes when WT extracts are compared with *Ido1*^{-/-} extracts). *C*, histogram shows a quantitative analysis of beclin-1/ATG6 (an early autophagy marker) in 6-month-old WT versus *Ido1*^{-/-} mouse caput epididymal protein extracts ($n = 6$ each). ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$. Data are expressed in cpm/μg of protein. Error bars, S.E.

expressed in the mouse caput epididymis, albeit at a much lower level. Contrary to IDO transcripts, accumulation of INDOL transcripts does not change during postnatal ontogeny of epididymal tissue. Busulfan treatment that stops spermatogenesis without affecting Sertoli cell functions shows that the epididymal accumulation of IDO transcripts is greatly reduced, suggesting that spermatozoa entering the epididymal duct trigger/sustain IDO expression. In the *Ido1*^{-/-} knock-out, both IDO transcripts are lost in the epididymis. This IDO deficiency is not compensated for at the transcriptional level by an increased accumulation of INDOL and/or TDO transcripts. Accordingly, KYN production is dramatically reduced in *Ido1*^{-/-} versus WT caput epididymal samples. These observations prove that IDO is the major kynurenine contributor in the mouse caput epididymis. Furthermore, the preferential localization of the enzymes TDO and INDOL on spermatozoa transiting the caput epididymis (11, 18, 19) suggests that Trp catabolism via IDO is essentially an epididymal epithelial phenomenon.

The strong constitutive expression of IDO in the mouse epididymis is accompanied by the generation of KYN, HK, and KA. Recent data have suggested that metabolites of the IDO pathway contribute to the generation of a tolerogenic state against foreign cells, including tumors and the fetal allograft (28, 29). In the case of KYN, this is achieved through the suppression of T-cell proliferation (30, 31). Less is known about KA and HK. The former may play a complementary role to KYN by reducing

the secretion of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and INF- γ (32).

A similar immunosuppressive role can be ascribed to IDO in the epididymis. Spermatozoa are generated long after immunological tolerance has been established, and for this reason, they are potentially immunogenic. In the testes, immune recognition is prevented by the blood-testis barrier, which physically shields postmeiotic germ cells from the immune system. Similarly, the epididymis is an immunologically privileged site that does not mount an autoimmune response against spermatozoa, although millions of these foreign cells are continually passing through its lumen. This is a delicate balancing act, for although tolerance is expressed toward spermatozoa in the epididymal lumen, full immunological competence is retained in the sub-epithelial compartment (33). IDO-dependent reduction in Trp levels in concert with the production of immunosuppressive kynurenines (KYN and KA) along with the blood-epididymis barrier formed by the epididymal epithelium may create the requisite tolerogenic state. This interpretation is somehow supported by the up-regulation of inflammatory cytokines (both pro- and anti-inflammatory) observed in the epididymides of *Ido1*^{-/-} knock-out mice. The participation of IDO in establishing an immunosuppressive state around spermatozoa is also supported by the observation that IDO expression is triggered by spermatozoa entering the epididymis tubule at sexual maturity, as shown by the data obtained after busulfan treatment of young male mice. We hypothesize that in the absence of IDO

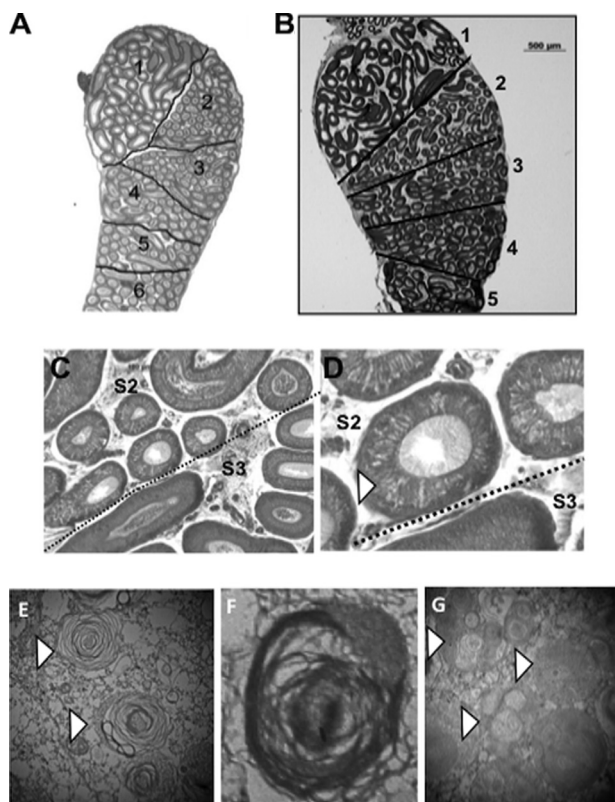


FIGURE 7. IDO deficiency provokes a caput epididymal regionalized phenotype. *A* and *B* show longitudinal caput epididymal sections of a WT and an *Idol*^{-/-} 6-month-old male mouse, respectively. In both panels, connective septa separating the various caput segments are highlighted (dark black lines). Note the weak staining of the caput segment S2 area in the *Idol*^{-/-} animal compared with WT. *C* and *D* show higher magnifications of caput epididymal tubules at the S2/S3 junction from an *Idol*^{-/-} animal (aged 6 months). Note the presence of numerous bright vesicles (white arrowhead) within the epithelium of S2 tubules. *E–G* show typical autophagic features revealed by transmission electron micrographs in caput segment S2 of an *Idol*^{-/-} animal. An example of multilamellar vesicles (white arrowhead) is magnified in *E* and *F* (magnification, $\times 40,000$ in *E* and $\times 50,000$ in *F*). An example of plurivesicular structures (white arrowhead) is shown in *G* (magnification, $\times 15,000$).

expression and its associated tolerogenic effect, spermatozoa entering the tubule are likely to exacerbate the local inflammatory situation. However, we think that a new equilibrium is found in order to preserve the situation of immune tolerance toward spermatozoa, which may explain why the cytokine increase is minor and why it concerns both pro- and anti-inflammatory cytokines. This *in fine* might result in a diminution of the leukocyte population infiltrating the epididymis tubule. Several very recent papers have brought forward the idea that the classical Th1/Th2 balancing act in regulating the immune response in such immune privileged settings is not that simple (34–36).

The IDO Pathway and Changes in Protein Processing—The absence of IDO activity in the caput epididymis of *Idol*^{-/-} animals does not only nearly abolish KYN synthesis; it also leads to a 2.5-fold increase in the concentration of Trp. This was only observed in epididymal samples. In serum, Trp concentrations were quite similar in both WT and *Idol*^{-/-} genetic backgrounds, most likely because of TDO compensation. This reinforces the idea that Trp catabolism along the KYN pathway in the mouse caput epididymis is essentially driven by IDO and

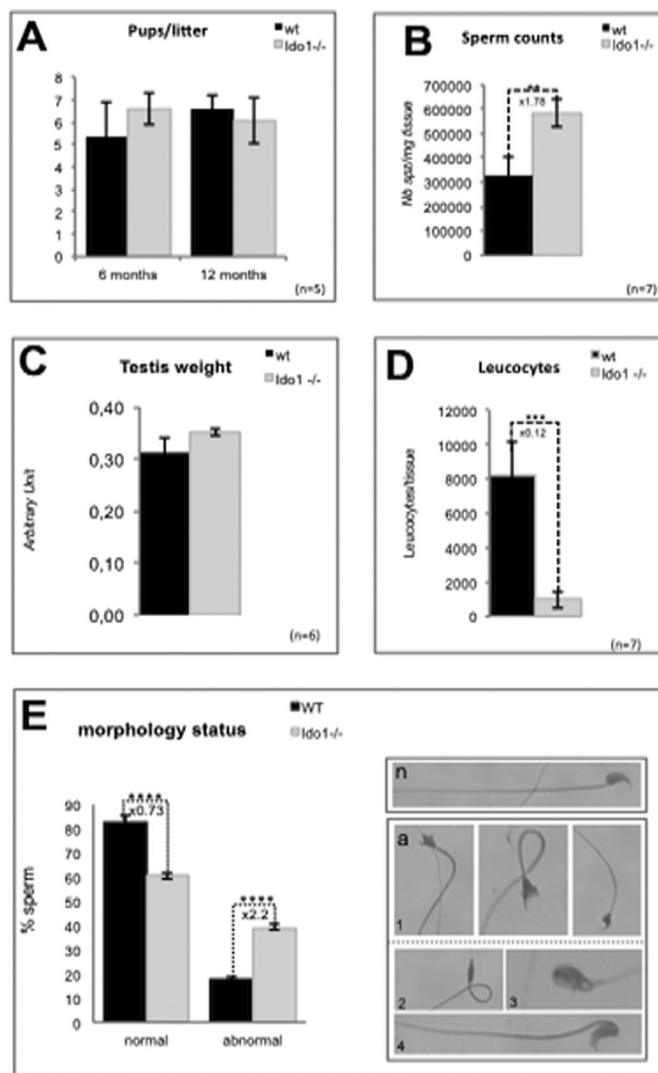


FIGURE 8. Evaluation of fertility/spermatozoa parameters of *Idol*^{-/-} males versus WT males. *A*, histograms show the number of pups obtained when WT or *Idol*^{-/-} male mice (either 6 or 12 months old) were mated with WT female mice (3 months old) of proven fertility ($n = 5$ each). *B*, histogram shows numbers of spermatozoa found in the caudae epididymides of 6-month-old WT and *Idol*^{-/-} animals ($n = 7$ each). *C*, histogram shows the testis weights (relative to body weights) of WT versus *Idol*^{-/-} animals (6 months old). The unit given in the y axis has been arbitrarily multiplied by 1000. *D*, histogram shows the leukocyte counts in cauda epididymal fluids of 6-month-old WT and *Idol*^{-/-} animals ($n = 7$ each). *E*, histograms show the percentage of morphologically abnormal spermatozoa as revealed by Schorr staining in WT or *Idol*^{-/-} male mice (WT, $n = 4$; *Idol*^{-/-}, $n = 5$). The photograph panel on the right shows an example of normal spermatozoa (*n*) and various abnormal (*a*) situations, including spermatozoa exhibiting kite head (1), pinhead (2), giant head (3), and hairpin (4) sperm that were found to be more numerous in *Idol*^{-/-} versus WT male mice. **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$. Error bars, S.E.

that other Trp-catabolizing enzymes do not compensate for IDO loss of function in this tissue. The fact that Trp concentrations were dramatically increased in caput epididymal tissues of *Idol*^{-/-} mice also suggests that Trp is not a rate-limiting amino acid in this tissue, although it is often the least abundant of the essential amino acids. Concordantly, we show here that the increase in *Idol*^{-/-} caput epididymal Trp content is not accompanied by significantly elevated concentrations of the non-kynurenine Trp derivatives indole-3-acetic acid, serotonin, and melatonin. However, *Idol*^{-/-} animals possessed a

higher caput epididymal protein content than WT animals. This was not due to an increase in protein synthesis but rather due to a decrease in protein catabolism mediated by a defective proteasome function.

Amino acid-mediated inhibition of protein catabolism has already been reported in liver and muscle cell extracts (37). It was shown that of all amino acids investigated, an excess of Trp was the most effective in impairing proteasomal activity. The competitive nature of this inhibition allowed the authors to suggest that it was triggered by a relative abundance of intracellular amino acids (37). We hypothesize that this situation pertains in the caput epididymis of *Ido1*^{-/-} animals, where the elevated Trp content mediates an inhibition of proteasomal activity. We also show that the observed proteasome inhibition is not accompanied by an accumulation of ubiquitinated proteins in *Ido1*^{-/-} caput epididymal protein extracts. This suggests that the ubiquitination rate either is very low or has been adjusted to avoid the otherwise deleterious accumulation of ubiquitinated protein aggregates that would drive cellular stress responses, eventually leading to apoptotic cell death (38). It is interesting to note that the literature also reports that proteasome inhibition may be one way that cells ameliorate an inflammatory situation and minimize autoimmunity (39, 40). In light of these findings, it is possible that the suppression of proteasome activity is an adaptive response on the part of the epididymis, designed to maintain a local tolerogenic environment toward spermatozoa in the face of a precipitous loss of IDO activity in the *Ido1*^{-/-} animals.

Intracellular protein degradation is not solely ensured by the ubiquitin/proteasome system. It is also achieved by the lysosomal pathway through autophagic processes. Depending on the cell type and the nature of the stimulus, lysosomal and proteasomal protein degradation may work hand in hand and compensate for each other (41). We provide evidence that in the caput epididymis of *Ido1*^{-/-} animals, autophagic processes might be increased to compensate for the deficient proteasomal pathway. In support of this hypothesis, we show that beclin-1/ATG6, one of the early ATG genes, is up-regulated in *Ido1*^{-/-} caput epididymal protein extracts. Beclin-1/ATG6 is part of a lipid kinase complex that has been shown to play a central role in coordinating the cytoprotective function of autophagy and in opposing apoptosis (24). In addition, the activity of the lysosomal/endosomal vesicular pathway appeared to be increased in the caput epididymal epithelium of the *Ido1*^{-/-} animals, as evidenced by ultrastructural features characteristic of autophagic processes, such as the intracellular accumulation of multilamellar bodies (25). Together, these data support the idea that autophagy is up-regulated in *Ido1*^{-/-} caput epididymis to compensate for a decline in intracellular proteasome-dependent protein catabolism. It is interesting to note that beclin-1-mediated autophagy has been reported elsewhere to be part of an immune defense mechanism (24, 42). Thus, the hallmarks of autophagy seen in caput segment 2 of the *Ido1*^{-/-} animals might be associated with changes in the inflammatory situation. Determination of whether up-regulation of autophagy in the *Ido1*^{-/-} caput epididymis serves an immunological role or is simply an intracellular adjustment to proteasome inhibition and defective intracellular protein catabolism will have to await

further investigation. Only caput segment S2 presented microscopically detectable autophagic features suggesting that this particular segment is somehow more sensitive or involved in a specialized function. As proposed earlier, caput epididymis segment 2 may constitute a separate functional entity with immunoregulatory properties (43).

The IDO Pathway and Sperm Quality Control—Intriguingly, the caudae epididymides of IDO-deficient males yielded sperm counts that were twice those of WT mice. Because testis weights were not different between *Ido1*^{-/-} and WT animals, increased spermatogenesis might not be responsible for the greater number of spermatozoa found in *Ido1*^{-/-} males. In addition, fertile *Ido1*^{-/-} did not show any impairment of their mating behavior, ruling out the idea that these elevated sperm counts were due to a low frequency of ejaculation. Alternatively, significantly less sperm may be lost during epididymal transit in *Ido1*^{-/-} males because of an impaired sperm quality control mechanism that normally eliminates defective spermatozoa.

There is a growing body of evidence supporting the active selection, removal, and degradation of mammalian spermatozoa during epididymal transport (reviewed in Refs. 44 and 45). There are three non-exclusive major processes that have been proposed to explain how spermatozoa might be disposed of during epididymal transit (46). Two of these hypotheses involve spermophagy by infiltrating leukocytes and/or by epithelial cells lining the epididymal duct. The third hypothesis implicates enzyme-based degradation of spermatozoa in the epididymal lumen. In support of the latter, evidence has been generated indicating that the intraluminal degradation of defective spermatozoa could occur by means of proteasomal proteolysis and extracellular nuclease activity in the epididymal lumen (47, 48). Our work brings arguments in favor of the participation of the proteasome apparatus in epididymal spermatozoa quality control processes. Our observation that increased sperm counts in the cauda epididymis of *Ido1*^{-/-} animals are significantly correlated with a reduction in leukocyte count and decreased proteasome activity suggests an active mechanism for the removal of damaged, abnormal, and/or necrotic spermatozoa during their epididymal descent. Our data also indicate that proteasome-mediated degradation of spermatozoa is a process that starts as early as in the caput region, in line with evidence for the apocrine secretion of ubiquitin in this region of the epididymis (47). IDO and its downstream metabolites can be thus viewed as potent regulators of both cell-based spermophagy and proteasome-mediated destruction of spermatozoa, two processes that appear to be heavily involved in an active sperm quality control mechanism operating in the epididymis. These observations are supported by the fact that *Ido1*^{-/-} animals possess significantly greater numbers of morphologically defective spermatozoa as compared with WT controls. We propose that IDO activity on the one hand controls the level of epididymal leukocytes and, on the other hand, regulates the involvement of the epididymal proteasome in clearing defective transiting spermatozoa. Exactly how this is achieved will be the focus of future studies.

Thus, IDO expression appears essential in maintaining immunological tolerance toward spermatozoa on the one hand

while mediating an active sperm quality control system on the other. Clinically, these findings have important implications ranging from the understanding of inflammation and infectious situations in the epididymis (a significant part of male infertility cases) to the development of autoimmunity against sperm antigens as well as the poor sperm morphology that is such a consistent feature of human infertility.

Acknowledgments—We thank Agnès Claustre for excellent technical assistance in addressing the regulation of the unfolded protein stress pathway. We are indebted to Dr. Felicity Vear (Institut National de Le Recherche Agronomique) for English grammar and syntax corrections.

REFERENCES

1. Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2004) *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 762–774
2. Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2008) *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 74–80
3. Munn, D. H., and Mellor, A. L. (2007) *J. Clin. Invest.* **117**, 1147–1154
4. Beutelspacher, S. C., Tan, P. H., McClure, M. O., Larkin, D. F., Lechler, R. L., and George, A. J. (2006) *Am. J. Transplant.* **6**, 1320–1330
5. Wang, Y., Liu, H., McKenzie, G., Witting, P. K., Stasch, J. P., Hahn, M., Changsirivathanathamrong, D., Wu, B. J., Ball, H. J., Thomas, S. R., Kapoor, V., Celermajer, D. S., Mellor, A. L., Keaney, J. F., Jr., Hunt, N. H., and Stocker, R. (2010) *Nat. Med.* **16**, 279–285
6. Jalili, R. B., Forouzandeh, F., Bahar, M. A., and Ghahary, A. (2007) *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* **6**, 167–179
7. King, N. J., and Thomas, S. R. (2007) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **3**, 2167–2172
8. Xu, H., Zhang, G. X., Ciric, B., and Rostami, A. (2008) *Immunol. Lett.* **121**, 1–6
9. Yoshida, R., Nukiwa, T., Watanabe, Y., Fujiwara, M., Hirata, F., and Hayashi, O. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **203**, 343–351
10. Takikawa, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Yoshida, R., and Truscott, R. J. (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* **467**, 553–557
11. Britan, A., Maffre, V., Tone, S., and Drevet, J. R. (2006) *Cell Tissue Res.* **324**, 301–310
12. Dufaure, J. P., Lareyre, J. J., Schwaab, V., Mattei, M. G., and Drevet, J. R. (1996) *C. R. Acad. Sci. III* **319**, 559–568
13. Vazeille, E., Codran, A., Claustre, A., Averous, J., Listrat, A., Béchet, D., Taillandier, D., Dardevet, D., Attaix, D., and Combaret, L. (2008) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E1181–E1190
14. Combaret, L., Dardevet, D., Rieu, I., Pouch, M. N., Béchet, D., Taillandier, D., Grizard, J., and Attaix, D. (2005) *J. Physiol.* **569**, 489–499
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
16. Lefrançois, A. M., Jimenez, C., and Dufaure, J. P. (1993) *Int. J. Androl.* **16**, 147–154
17. Rajapurohitam, V., Bedard, N., and Wing, S. S. (2002) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E739–E745
18. Metz, R., Duhadaway, J. B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A. J., and Prendergast, G. C. (2007) *Cancer Res.* **67**, 7082–7087
19. Ball, H. J., Yuasa, H. J., Austin, C. J., Weiser, S., and Hunt, N. H. (2009) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 467–471

20. Jenny, M., Santer, E., Pirich, E., Schennach, H., and Fuchs, D. (2009) *J. Neuroimmunol.* **207**, 75–82
21. Kimball, S. R. (2001) *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **26**, 155–184
22. Avruch, J., Belham, C., Weng, Q., Hara, K., and Yonezawa, K. (2001) *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **26**, 115–154
23. Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., Byfield, M. P., Backer, J. M., Natt, F., Bos, J. L., Zwartkruis, F. J., and Thomas, G. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 14238–14243
24. Cao, Y., and Klionsky, D. J. (2007) *Cell Res.* **17**, 839–849
25. Hariri, M., Millane, G., Guimond, M. P., Guay, G., Dennis, J. W., and Nabi, I. R. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 255–268
26. Baban, B., Chandler, P., McCool, D., Marshall, B., Munn, D. H., and Mellor, A. L. (2004) *J. Reprod. Immunol.* **61**, 67–77
27. Ball, H. J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C. J., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillan, J. A., Stocker, R., Jermini, L. S., and Hunt, N. H. (2007) *Gene* **396**, 203–213
28. Liu, X. Q., and Wang, X. (2009) *Chin. Med. J.* **122**, 3072–3077
29. Zhu, B. T. (2010) *Int. J. Mol. Med.* **25**, 831–835
30. Terness, P., Bauer, T. M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002) *J. Exp. Med.* **196**, 447–457
31. Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W., and Young, H. A. (2000) *J. Immunol.* **164**, 3596–3599
32. Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., and Ling, L. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 22021–22028
33. Itoh, M., Terayama, H., Naito, M., Ogawa, Y., and Tainosho, S. (2005) *J. Reprod. Immunol.* **67**, 57–67
34. Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., and Ito, M. (2010) *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 601–610
35. Favre, D., Mold, J., Hunt, P. W., Kanwar, B., Loke, P., Seu, L., Barbour, J. D., Lowe, M. M., Jayawardene, A., Aweeka, F., Huang, Y., Douek, D. C., Brenchley, J. M., Martin, J. N., Hetch, F. M., Deeks, S. G., and McCune, J. M. (2010) *Transl. Med.* **32**, 32–36
36. Belladonna, M. L., Orabona, C., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2009) *Trends Mol. Med.* **15**, 41–49
37. Hamel, F. G., Upward, J. L., Siford, G. L., and Duckworth, W. C. (2003) *Metabolism* **52**, 810–814
38. Bence, N. F., Sampat, R. M., and Kopito, R. R. (2001) *Science* **292**, 1552–1555
39. Levine, S. J., Adamik, B., Hawari, F. I., Islam, A., Yu, Z. X., Liao, D. W., Zhang, J., Cui, X., and Rouhani, F. N. (2005) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **289**, L233–L243
40. Fissolo, N., Kraus, M., Reich, M., Ayturan, M., Overkleef, H., Driessen, C., and Weissert, R. (2008) *Eur. J. Immunol.* **38**, 2401–2411
41. Korolchuk, V. I., Menzies, F. M., and Rubinsztein, D. C. (2010) *FEBS Lett.* **584**, 1393–1398
42. Deretic, V. (2006) *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 375–382
43. Johnston, D. S., Jelinsky, S. A., Bang, H. J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G. S., and Turner, T. T. (2005) *Biol. Reprod.* **73**, 404–413
44. Axner, E. (2006) *Theriogenology* **66**, 14–24
45. Sutovsky, P. (2003) *Microsc. Res. Tech.* **61**, 88–102
46. Jones, R. (2004) *Biol. Reprod.* **71**, 1405–1411
47. Baska, K. M., Manandhar, G., Feng, D., Agca, Y., Tengowski, M. W., Sutovsky, M., Yi, Y. J., and Sutovsky, P. (2008) *J. Cell. Physiol.* **215**, 684–696
48. Dominguez, K., and Ward, W. S. (2009) *Syst. Biol. Reprod. Med.* **55**, 193–199

Downloaded from www.jbc.org at CNRS, on February 28, 2012