



Physiologie de la réponse et de la tolérance immunes dans l'épididyme murin

Allison Voisin

► To cite this version:

Allison Voisin. Physiologie de la réponse et de la tolérance immunes dans l'épididyme murin. Biologie de la reproduction. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC102 . tel-02518837

HAL Id: tel-02518837

<https://theses.hal.science/tel-02518837>

Submitted on 25 Mar 2020

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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA
SANTÉ – AGRONOMIE – ENVIRONNEMENT

THESE

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

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologies, Nutrition, Microbiologie Santé, Innovation

Soutenue publiquement par

Allison Voisin

Le 09 Novembre 2018

**Physiologie de la réponse et de la tolérance immunes
dans l'épididyme murin**

<u>Rapporteurs</u> :	Dr. Méhats Céline	CR1 INSERM U1016 - CNRS UMR8104 Université Paris Descartes
	Pr. Jean-Philippe Wolf	PU-PH CR1 INSERM U1016 - CNRS UMR8104 Université Paris Descartes
<u>Examineur</u> :	Dr. Elisabeth Billard	MCU UMR 1071 INSERM Université Clermont Auvergne
<u>Directeur de thèse</u> :	Pr. Joël Drevet	PU UMR CNRS 6293 – INSERM U1103 Université Clermont Auvergne
<u>Membre invité</u> :	Dr. Rachel Guiton	MCU UMR CNRS 6293 – INSERM U1103 Université Clermont Auvergne

*« Une rencontre, c'est quelque chose de décisif,
une porte, une fracture, un instant qui marque le
temps et crée un avant et un après. »*

Eric-Emmanuel Schmitt

#

Je remercie sincèrement le Dr. Céline Méhats et le Pr. Jean-Philippe Wolf d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteur. Mes remerciements vont également au Dr. Elisabeth Billard qui a accepté de prendre part à mon jury en tant qu'examinatrice.

Joël, Je vous remercie de m'avoir accueillie dans l'équipe pour mon master 2 puis ma thèse. Merci pour votre aide et surtout la confiance que vous m'avez accordée pour mener à bien ce projet. L'épididyme va me manquer!

Rachel, J'ai adoré ces années à tes côtés. Je trouve qu'on a formé un binôme de choc! Merci de m'avoir si bien encadrée tout en me laissant m'épanouir et proposer de nouvelles directions pour le projet. Je te remercie de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de l'immunologie ^^ Mais surtout merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et ton écoute. Nos rigolades, sessions potins autour d'un thé, congrès/vacances, virées shopping vont me manquer. Je te souhaite le meilleur pour la suite, avec pleins de découvertes sur « l'immunité de l'épididyme murin » mais surtout plein de bonheur avec ta jolie petite famille.

Fabrice, merci pour l'aide que tu m'as apportée durant ma thèse, en relectures, corrections et entraînements divers. Merci surtout pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie Marjorie et Alexandre mes collègues thésards de chez MePTI pour m'avoir si bien accueillie. Votre départ en postdoc a laissé un grand vide, ce n'était plus pareil sans vous! Marjorie, alias celle qui dissèque des épididymes plus vite que son ombre, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée dès mon arrivée en master. Merci pour ton écoute, tes précieux conseils et tes cahiers de labo hors normes! Je te souhaite un postdoc épanouissant qui n'est, j'en suis sûre, que le début d'une brillante carrière dans la recherche.

Alex, merci pour tout (enfin si l'on passe sous silence les tentatives de sabotage de mon M2...) J'espère que ton postdoc aux Etats-Unis sera enrichissant mais pas au point de ne pas rentrer en France!

Christelle, merci pour ta gentillesse et toute l'aide que tu m'as apportée en histo. Une grande partie de ce travail n'aurait pas pu être faite sans toi!

Ayhan, Joëlle, Chantal, Stéphanie, Areski, Je vous remercie pour l'aide que vous m'avez apportée durant ma thèse mais aussi pour tous les moments de discussions/dégustations autour d'un café. Je vous souhaite à tous le meilleur.

Sandrine, Khirredine et Philippe, merci de vous être occupés de mes souris.

Pierre, merci pour l'aide que tu m'as apportée au cours de ma thèse, les ballades en rouge bolide (si on omet la fois où une araignée géante et probablement transgénique a failli me tuer...), les barbecues et j'en passe. Je te souhaite le meilleur pour la suite tant sur le plan professionnel (maintenant que tu fais de l'immuno ça devrait aller ^^) que personnel.

Laura, merci pour tout, des demis kiwi aux happy meal en passant par ces moments juste inoubliables à Chapdes-Beaufort ^^ . Merci de m'avoir offert un bureau secondaire au 3^{ème} où j'ai pu trouver écoute, potins et rigolade. Je te souhaite bon courage pour la dernière ligne droite. Je sais que tout n'a pas été facile mais tu es une battante tu réussiras à réaliser tous tes projets j'en suis sûre!

Cyril, merci pour tous ces bons moments qu'on a partagés. Nos discussions, cafés terrasse et goûters hélicoptère vont énormément me manquer. Je ne sais pas comment je vais faire en postdoc sans mon p'tit sunshine mais voyons le côté positif maintenant que toute forme de distraction a disparue tu vas pouvoir nous faire x Zabriot et al... L'avenir de l'IC² en dépend !!

PS : N'oublie pas de prendre REGULIEREMENT des notes pour être à jour pour nos skypes biannuels !

Amandine, ma jumelle. On s'est rencontrées en licence mais c'est le master qui nous a vraiment rapproché, où avec Fatiha on a pu créer notre trio de choc (AQP8 *in vivo* for ever <3). Ca a été tellement bien d'avoir quelqu'un tout au long du chemin pour partager tout ça. Je ne sais pas comment j'aurais affronté ces années sans les nombreux moments de rigolade, de décompression mais surtout d'écoute et de soutien sans faille dans les moments de stress et de doute. J'ai encore du mal à réaliser qu'après toutes ces années on ne vivra pas l'étape du postdoc ensemble. Je te souhaite le meilleur au pays des Caribous et j'espère pouvoir venir profiter très vite de ma chambre d'ami!

Merci également à tous les membres du GReD que je n'ai pas cité mais qui ont contribué à la réalisation de cette thèse!!

Fatiha, je te souhaite une belle fin de thèse, c'est dommage que nous n'ayons pas vécu ce moment ensemble mais je suis sûre que tu t'en sortiras très bien. Tu es une des plus belles personnes que j'ai pu rencontrer (Il y a plus de 8 ans déjà !!), pleine de gentillesse, d'empathie et de force. Même si tu refuses de l'admettre je connais peu de personnes qui auraient pu mener de front une vie de maman solo avec 3 enfants, des études si bien réussies et une thèse. Je te souhaite le meilleur avec tes ptits loups et dans la carrière que tu choisiras. N'oublie jamais que Tu es notre Wonder Woman.

Anaïs, Emeline, Servane, Pauline, Mathilde, merci pour tous ces pas de bourrée, pirouettes et autres dégagés. Vous retrouver pour nos cours de danse, nos chorées, nos spectacles a toujours été un de mes moments les plus attendu de la semaine. Sans oublier nos nombreux délires, nos tea time, nos weekends et escape games. Vous allez cruellement me manquer, la danse sans vous ne sera plus pareille.

Clara, Thérèse, Marie, merci pour ces belles et longues années d'amitié. Même si on ne se voit pas aussi souvent que je le souhaiterai vous savez que vous pourrez toujours compter sur moi.

Maman, Papa, Kévin, Thibaut et Unic, merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Pile au moment où vous arriviez enfin TOUS à dire aux gens sur quoi je travaille vous allez devoir tout recommencer. Quel dommage ^^

Avant-propos

Une partie de ces travaux a été présentée aux congrès suivants :

Communications orales à des congrès ou conférences

Journée de l'Ecole Doctorale 2018 (JED) : Immunité de l'épididyme murin: une clé pour préserver la fertilité masculine. Clermont Ferrand, 15 juin 2018.

XXXII^{ème} congrès de la Société d'Andrologie en Langue Française : Immunité de l'épididyme murin en contextes physiologique et inflammatoire. Prix Master. Lyon, 29 Janvier 2016

Communications affichées

7th International conference on the epididymis : Immune tolerance in the murine epididymis: potential contribution of Transforming Growth Factor-beta isoforms and their receptors. Montréal, 20-23 Septembre 2018.

Reprosciences 2017 : Comprehensive overview of murine epididymal immune cells. Tours, 10-12 Avril 2017.

Congrès annuel du Club Francophone des Cellules Dendritiques : Deciphering innate immunity of the murine epididymis. Paris, 7-8 Décembre 2015.

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'articles publiés, soumis ou en cours d'écriture :

Allison Voisin, Marjorie Whitfield, Christelle Damon-Soubeyrand, Chantal Goubely, Joëlle Henry-Berger, Fabrice Saez, Ayhan Kocer, Joël R. Drevet, Rachel Guiton. **Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: Unexpected populations arise.** Journal of Reproductive Immunology, 2018 (**Article 1**).

Allison Voisin, Christelle Damon-Soubeyrand, Stéphanie Bravard, Chantal Goubely, Henry-Berger Joëlle, Fabrice Saez, Joël R. Drevet, Rachel Guiton. **Regionalized expression of the TGF- β isoforms and receptors in the murine epididymis: where, when and why?** Asian Journal of Andrology (En cours d'écriture, **Article 2**).

Allison Voisin, Fabrice Saez, Joël R. Drevet, Rachel Guiton. **The epididymal immune balance: a key to preserve male fertility.** Article de revue, Asian Journal of Andrology, 2018 (En révision, **Annexe 1**)

Résumé

L'épididyme, organe clé de la fertilité masculine, est le lieu de maturation et de stockage des spermatozoïdes. Cependant, l'arrivée massive et tardive de ces cellules à la puberté, longtemps après la mise en place du répertoire du soi, en fait des cibles potentielles pour le système immunitaire qui risque de les détruire. Dans le même temps, l'épididyme est fréquemment la cible d'infections rétrogrades qui, non contrôlées, altèrent la fertilité. Par conséquent, l'épididyme doit mettre en place une réponse immunitaire efficace contre les agents pathogènes tout en établissant une tolérance envers les spermatozoïdes. Une altération de cet équilibre est impliquée dans 10 à 15% des cas d'infertilité masculine. Le testicule a longtemps été considéré, à tort, comme le seul organe possédant une immunité dans le tractus génital mâle, induisant un retard dans l'étude des autres organes, dont l'épididyme.

Les travaux menés au cours de cette thèse visaient à compléter les connaissances disponibles sur les acteurs cellulaires et moléculaires potentiellement impliqués dans les mécanismes de maintien de l'équilibre immunitaire dans l'épididyme murin. Mon premier objectif était d'identifier et de quantifier les populations de phagocytes mononucléaires et de lymphocytes, présents dans le tissu en contexte physiologique. J'ai ainsi identifié et localisé trois populations lymphocytaires jamais décrites dans l'épididyme murin. La suite de mes travaux a porté sur l'étude du *Transforming growth factor-beta* (TGF- β), dont la voie de signalisation est impliquée dans la tolérance aux spermatozoïdes chez la souris, sans que la molécule ou ses récepteurs y soient totalement décrits. Nous avons ainsi montré que les 3 isoformes du TGF- β et de ses récepteurs sont exprimées de manière différentielle tout au long de l'organe, suggérant des rôles variés dans la physiologie épидидymaire, en plus de la tolérance aux spermatozoïdes.

Ces études ont montré la richesse des mécanismes potentiellement impliqués dans l'équilibre immunitaire épидидymaire et offrent de nombreuses pistes de recherche qui viseraient à améliorer les traitements de l'infertilité masculine d'origine immunologique.

Abréviations

3-HAA	acide 3-hydroxyanthranilique
AAS	anticorps anti-spermatozoïdes
ABCA1	<i>ATP binding cassette A1</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AND	Acide désoxyribonucléique
ALK	<i>Activating receptor like kinase</i>
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adenosine triphosphate
BCR	Récepteur des cellules B
BHE	Barrière hémato-épididymaire
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CD	Cluster de différenciation
cDC	Cellule dendritique conventionnel
CDP	<i>Common DC progenitor</i>
cGAS	<i>cGMP-AMP synthase</i>
Cl ⁻	chlore
CLDN	Claudine
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
cMOP	<i>Common monocyte progenitor</i>
Co-SMAD	SMAD commune
CPAg	Cellule présentatrice d'antigènes
CRES	<i>Cystatin-related epididymal spermatogenic</i>
CRS1C	<i>Cryptdin-related sequence 1 C</i>
CST	Cystatine
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>

CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
CX ₃ CR1	<i>CX3C chemokine receptor 1</i>
CXCL	<i>Chemokine (C–X–C motif) ligand</i>
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN regulatory factor</i>
DC	Cellule dendritique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELSPBP1	<i>Epididymal sperm binding protein 1</i>
EMP	<i>Erythro-Myeloid Progenitor</i>
EOR	Espèces oxygénées réactives
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FGL2	<i>Fibrinogen like protein 2</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GCN2	<i>General control nonderepressible 2</i>
GDF	<i>Growth differentiation factor</i>
GMP	Guanosine monophosphate
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPX	Glutathion peroxydase
Gram–	Gram négative
Gram+	Gram positive
GTP	Guanosine triphosphate
hBD	<i>human β-defensin</i>
hCAP-18	<i>human cationic antimicrobial peptide -18</i>
HD	<i>Human defensin</i>
HNP	<i>Human neutrophil peptide</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFI16	<i>IFN-inducible protein 16</i>
IFN	Interféron
IL-	Interleukine-

IL-10R	<i>IL-10 receptor</i>
INDOL	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein</i>
I-SMAD	SMAD inhibitrice
iTreg	Treg induit
Jak	<i>Janus kinase</i>
K ⁺	Potassium
LAP	<i>Latency associated protein</i>
LB	Lymphocyte B
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LLC	<i>Large latent complex</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
LT	Lymphocyte T
LTBP	<i>Latent-TGF-β-binding protein</i>
LYZL	Lysozyme-like
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation associated gene 5</i>
MDP	<i>Monocyte and dendritic cell progenitor</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Na ⁺	Sodium
NF-K β	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>Natural Killer T cell</i>
nTreg	Treg naturel
PAM	Peptide antimicrobien
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

pré-cDC	<i>Conventional DC precursor</i>
pré-pDC	<i>pDC precursor</i>
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
QUIN	<i>Acide quinolinique</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RLR	<i>RIG-I like receptor</i>
RPN	<i>Rat Neutrophil Peptide</i>
R-SMAD	<i>SMAD associée au récepteur</i>
<i>S. Aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SLC	<i>Small latent complex</i>
SLPI	<i>Secretory leukocyte peptidase inhibitor</i>
snGPX4	<i>sperm nucleus GPX4</i>
SPAG	<i>Sperm associated antigen</i>
TCR	<i>Récepteur des cellules T</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TGF- β R	<i>TGF-β receptor</i>
Th	<i>T helper</i>
TIR	<i>Toll-IL-1 receptor</i>
TJP	<i>Tight junction proteins</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	<i>Lymphocyte T régulateur</i>
UPEC	<i>Uropathogenic E. coli</i>
ZO	<i>Protéine zonula occludens</i>

Liste des figures

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique du testicule et de l'épididyme.

Figure 2 : Segmentation de l'épididyme murin.

Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'épididyme.

Figure 4 : Représentation schématique d'un spermatozoïde mature.

Figure 5 : Représentation schématique des événements testiculaire et épididymaire qui conduisent au remaniement de la chromatine spermatique.

Figure 6 : Représentation schématique de la sécrétion apocrine par les cellules principales de l'épididyme.

Figure 7 : Représentation schématique de l'assemblage des jonctions serrées.

Figure 8 : Représentation schématique de la localisation des récepteurs Toll-like et de leurs principaux ligands.

Figure 9 : Représentation simplifiée de la signalisation TLR.

Figure 10 : Représentation schématique de l'ontogénie des phagocytes mononucléaires.

Figure 11 : Identification de cellules dendritiques dans l'épididyme murin.

Figure 12 : Représentation schématique de l'activation d'un lymphocyte T naïf par une cellule dendritique.

Figure 13 : Représentation schématique de la polarisation des LT CD4⁺.

Figure 14 : Schéma hypothétique de l'organisation de la réponse aux pathogènes dans l'épididyme.

Figure 15 : Représentation schématique de l'*immunoediting* au cours de la tumorigénèse.

Figure 16 : Représentation schématique des modes d'action des iTreg.

Figure 17 : Voie de synthèse des kynurénines.

Figure 18 : Voie de signalisation de l'interleukine-10 (IL-10).

Figure 19 : Représentation schématique de la synthèse du TGF- β .

Figure 20 : Voie de signalisation simplifiée du TGF- β .

Figure 21 : Représentation schématique de la synthèse des activines et des inhibines.

Figure 22 : Modèle hypothétique de la réponse aux pathogènes dans l'épididyme.

Figure 23 : Modèle hypothétique de la réponse anti-tumorale dans l'épididyme.

Figure 24 : Modèle hypothétique de la tolérance aux spermatozoïdes dans l'épididyme.

Figure 25 : Localisation par immunohistochimie des trois isoformes du TGF- β dans l'épididyme humain.

Sommaire

<i>Introduction bibliographique</i>	1
A. L'épididyme	2
I. Anatomie.....	2
II. Histologie	3
1. Les cellules principales	3
2. Les cellules basales	4
3. Les cellules apicales	4
4. Les cellules étroites	5
5. Les cellules claires	6
6. Les cellules en halo	6
III. Les fonctions de l'épididyme	6
1. Le transport et le stockage des spermatozoïdes	6
2. La maturation des spermatozoïdes	8
a. Modifications morphologiques	8
• Régulation du volume du spermatozoïde	8
• Migration de la gouttelette cytoplasmique	9
• Compaction nucléaire par pontages disulfure	9
• Modifications de l'acrosome	10
b. Modifications biochimiques	10
• Protéines	11
• Glucides	12
• Lipides	14
c. Modifications fonctionnelles	14
3. La protection des spermatozoïdes	15
IV. La barrière hémato-épididymaire	16
1. La barrière physique	17
a. Formation	17
b. Composition des jonctions serrées	17
• Les protéines membranaires	17
L'occludine.....	17
Les claudines	18
La tricelluline	18
• Les protéines cytoplasmiques	19

Les protéines « <i>Zonula occludens</i> »	19
c. Régulation de la BHE	19
2. La barrière physiologique	20
3. La barrière immunologique	21
B. Immunité de l'épididyme	21
I. Les acteurs de l'immunité présents à l'état physiologique	22
1. Les protéines de défense	23
a. Les récepteurs de l'immunité innée	23
• Les récepteurs Toll-like	24
• Autres récepteurs	26
b. Les peptides antimicrobiens	26
• Défensines	28
• Cathélicidines	30
c. Les protéines à activité antimicrobienne	31
• Inhibiteurs de protéases	32
• Chimioquinas	33
• Lactoferrine	34
• Lysozyme	35
• Indoleamine 2,3-dioxygénase	35
2. Les cellules immunitaires	37
a. Les phagocytes mononucléaires	37
• Macrophages épididymaires	38
• Cellules dendritiques épididymaires	39
b. Les lymphocytes	40
• Lymphocytes B	40
• Lymphocytes T	41
II. La réponse aux pathogènes	44
1. La réponse innée	46
2. La réponse adaptative	47
III. L'immunité anti-tumorale	48
1. Le cancer de l'épididyme	48
2. Immunité et cancer	49
a. La phase d'élimination	50
b. La phase d'équilibre	52

c.	L'échappement tumoral.....	53
IV.	La tolérance immune aux spermatozoïdes	54
1.	Généralités.....	55
2.	Les acteurs épididymaires	56
a.	Les cellules dendritiques tolérogènes.....	56
b.	Les lymphocytes T régulateurs	58
c.	L'indoleamine 2,3-dioxygénase et les kynurénines	59
d.	L'IL-10.....	60
e.	Le TGF- β	62
•	Généralités	62
•	Signalisation	63
•	Actions sur les cellules immunitaires	65
•	TGF- β et épididyme.....	67
f.	L'activine A.....	68

<i>Projet de recherche</i>	69
----------------------------------	----

<i>Résultats</i>	72
Présentation de la première publication	73
Présentation de la deuxième publication	74

<i>Discussion & Perspectives</i>	75
--	----

<i>Annexe</i>	75
---------------------	----

<i>Références bibliographiques</i>	75
--	----

Introduction bibliographique

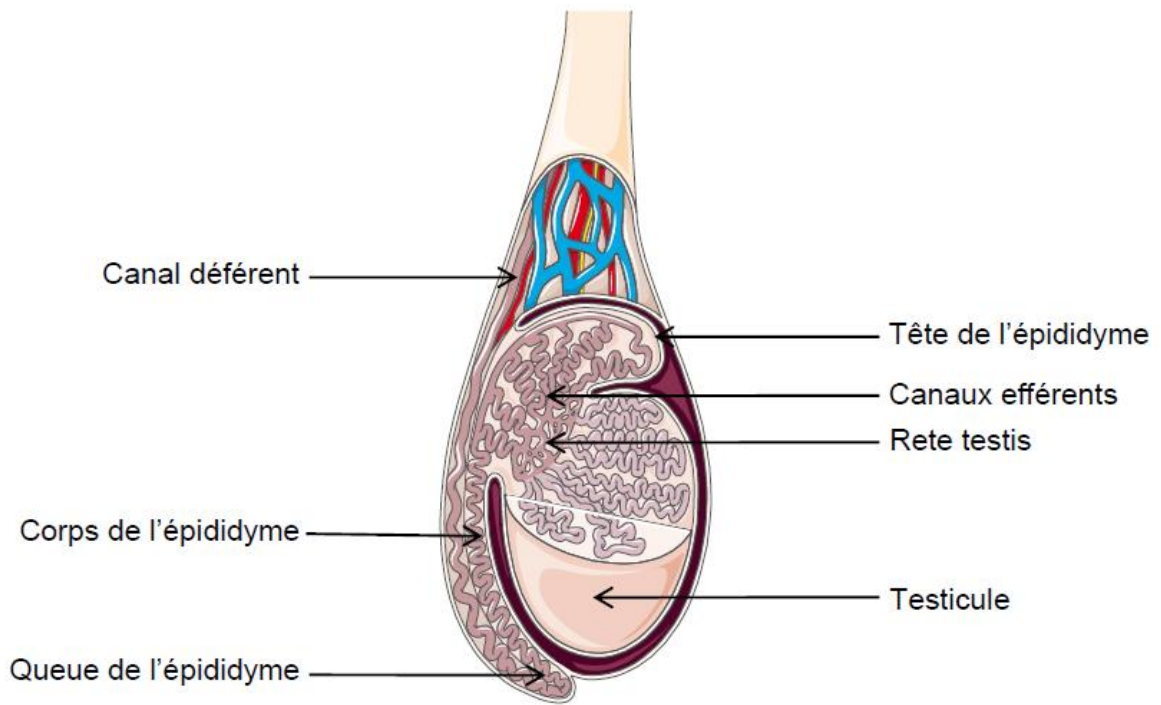


Figure 1 : Représentation schématique du testicule et de l'épididyme.

L'épididyme, situé à la face postérieure du testicule, relie les canaux efférents au canal déférent. www.servier.fr

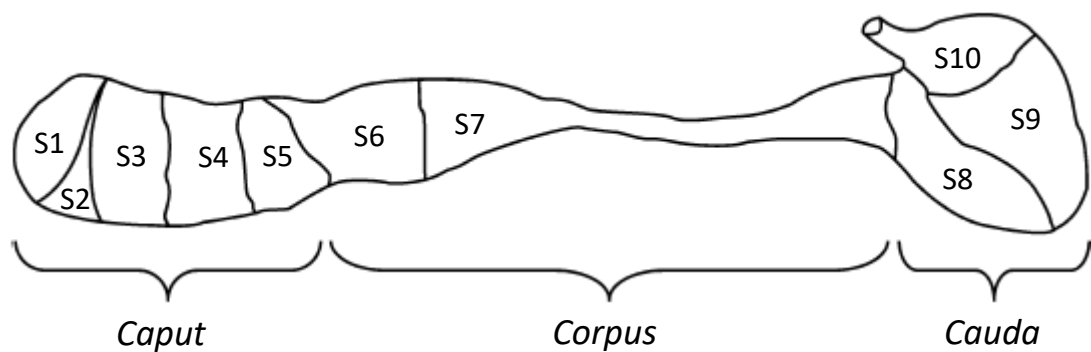


Figure 2 : Segmentation de l'épididyme murin.

L'épididyme est divisé en trois parties anatomiques et fonctionnelles : la tête (*Caput*), le corps (*Corpus*) et la queue (*Cauda*). Ces parties sont subdivisées en 10 segments chez la souris. D'après Johnston et al., 2005.

A. L'épididyme

I. Anatomie

L'épididyme, organe du tractus génital mâle, est accolé à la face postérieure du testicule et relie les canaux efférents au canal déférent (**Figure 1**). Chez les mammifères, c'est un long tubule unique, fortement contourné dont la taille varie selon les espèces. Il mesure plus d'un mètre chez la souris (Takano et al., 1981) et peut atteindre jusqu'à 5 mètres chez l'homme (Sullivan, 2004). L'épididyme est un dérivé Wolfien, à l'exception de la partie la plus proximale (ou segment initial [S1]) qui dérive du mésoderme mésonéphrotique. Le segment initial a ainsi une origine embryonnaire commune avec le rein, ce qui rappelle les analogies de fonctionnement entre ces deux organes en terme de réabsorption et de filtration de fluide (Robaire et al., 2006). Sur la base de sa morphologie et de son histologie, cet organe peut être divisé en trois parties distinctes : la tête (*caput*) ou région proximale, reliée au hile du testicule par les canaux efférents et le *rete testis*, le corps (*corpus*) ou région médiane, et la queue (*cauda*) ou région distale connectée au canal déférent (**Figure 1** ; Abe et al., 1983 ; Abou-Haila and Fain-Maurel, 1984). En raison de la présence de cloisons conjonctives, ou *septa*, l'épididyme peut être subdivisé en segments dont le nombre diffère en fonction des espèces (Abou-Haila and Fain-Maurel, 1984). Chez la souris, la tête de l'épididyme peut être subdivisée en cinq segments, tandis que le corps et la queue de l'épididyme sont respectivement subdivisés en deux et trois segments (**Figure 2** ; Johnston et al., 2005). En complément de leur rôle de support interne pour l'organisation de l'organe, les *septa* permettent l'expression spécifique de gènes et de protéines et la création d'un microenvironnement spécifique à chaque segment (Kirchhoff, 1999 ; Cornwall et al., 2002 ; Turner et al., 2003 ; Johnston et al., 2005 ; Tomsig et al., 2006 ; Turner et al., 2007).

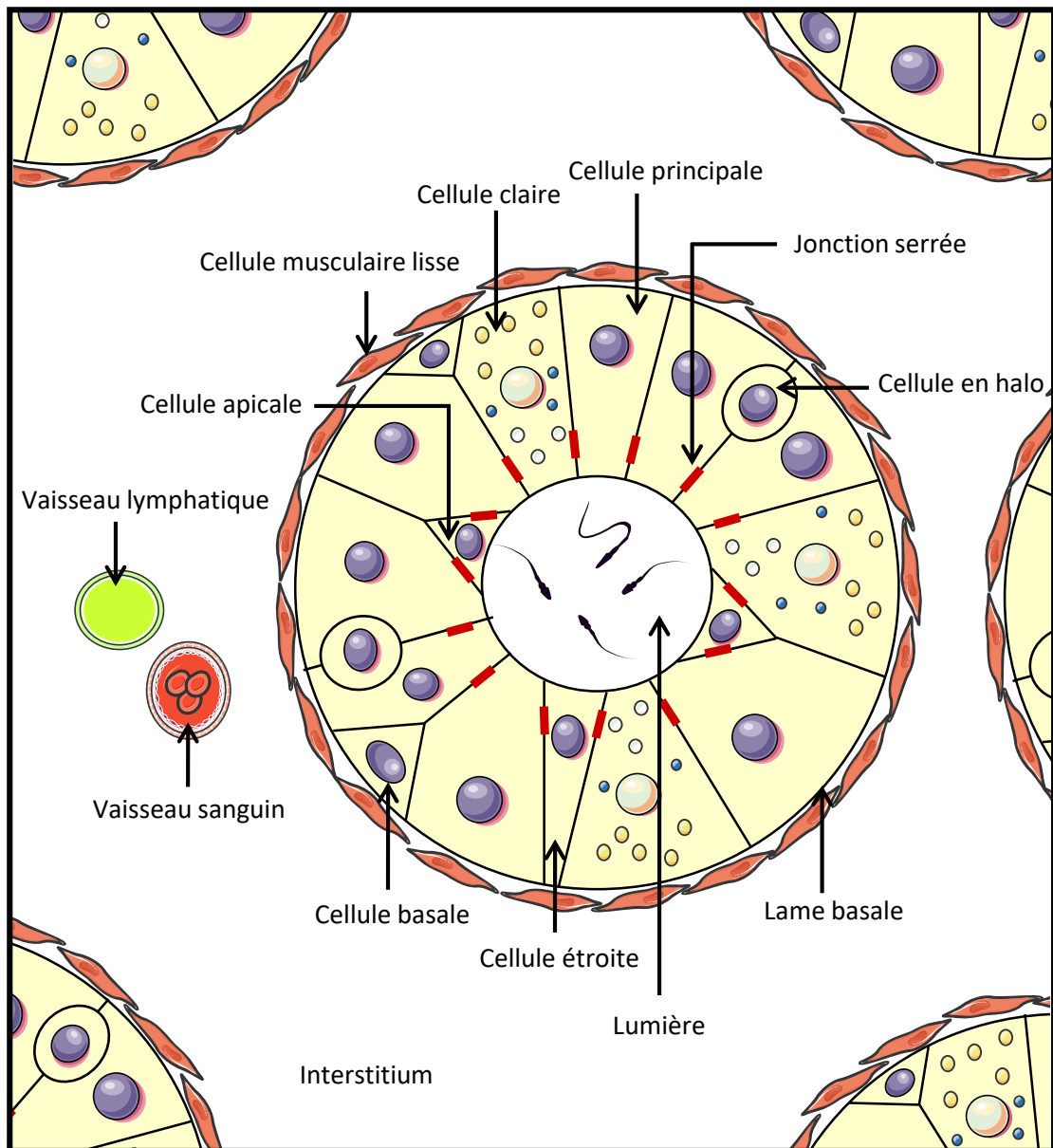


Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'épididyme.

Représentation des différents types cellulaires qui composent l'épithélium épididymaire : les cellules claires, les cellules en halo, les cellules basales, les cellules étroites, les cellules apicales et les cellules principales. La lame basale est entourée d'une couche de muscles lisses. Entre les tubules, dans l'interstitium, se trouvent les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

D'après *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2006.

II. Histologie

L'épithélium épидидymaire est un épithélium pseudo-stratifié cylindrique (**Figure 3**). Il est entouré d'un tissu conjonctif contenant des terminaisons nerveuses, des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques (Robaire and Hermo, 1988). Le tubule épидидymaire 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'organe (Setchell et al., 1994). L'épithélium repose sur une lame basale et est constitué de plusieurs types cellulaires dont la proportion varie tout au long de l'organe, assurant ainsi une évolution de la composition du fluide épидидymaire.

1. Les cellules principales

Les cellules principales sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium épидидymaire. Elles présentent des modifications morphologiques en fonction des régions dans lesquelles elles se situent, en lien avec l'évolution de leur fonction (Hermod et al., 1994). Dans le segment initial chez la souris, ces cellules sont hautes et possèdent à leur pôle apical de nombreuses microvillosités qui se projettent dans la lumière du tubule (Abe et al., 1983). La hauteur de ces cellules ainsi que le nombre et la taille des microvillosités diminuent fortement dans la queue de l'épididyme. Elles sont très actives quant au transport, à la sécrétion et à l'absorption de petites particules et de protéines, jouant ainsi un rôle important dans la maturation épидидymaire des spermatozoïdes (Hermod and Robaire, 2002). Via l'établissement de jonctions serrées, les cellules principales participent également à la formation de la barrière hémato-épидидymaire (Suzuki and Nagano, 1978), structure qui sera développée ultérieurement (*cf.* partie A-IV). Le nombre de cellules principales décroît graduellement tout au long de l'organe. Elles constituent environ 80% de la population cellulaire totale dans le segment initial

et ne représentent plus que 65% de la population cellulaire totale dans la queue de l'épididyme (Trasler et al., 1988).

2. Les cellules basales

Les cellules basales représentent 10 à 20% de la population cellulaire totale de l'épithélium épididymaire (Soranzo et al., 1982). De forme triangulaire et aplatie, elles sont situées à la base de l'épithélium épididymaire et ne sont donc pas en contact direct avec la lumière du tubule. Cependant, dans le segment initial de l'épididyme murin, il a été montré que ces cellules sont capables d'émettre des projections cytoplasmiques entre les cellules épithéliales, en direction de la lumière (Kim et al., 2015). Les cellules basales sont en association étroite avec les cellules claires, avec lesquelles elles participent à la régulation de l'acidité du fluide épididymaire, *via* leurs extensions cytoplasmiques (Veri et al., 1993 ; Shum et al., 2009). Elles sont également impliquées dans la détoxification des radicaux libres (Veri et al., 1993). En raison de la présence de cellules exprimant des marqueurs macrophagiques en position basale de l'épithélium épididymaire, certains auteurs ont associé les cellules basales à des macrophages résidents (Yeung et al., 1994 ; Seiler et al., 1998, 1999). Cependant, des expériences d'immunofluorescence et de cytométrie en flux ont permis de montrer de manière non équivoque que les cellules basales (exprimant le marqueur cytokeratine 5) sont différentes des macrophages épithéliaux (exprimant le marqueur F4/80) (Shum et al., 2014).

3. Les cellules apicales

Les cellules apicales, qualifiées ainsi en raison de la présence de leur noyau au pôle apical de l'épithélium, présentent un cytoplasme dense très riche en mitochondries. Elles se trouvent principalement dans le segment initial où elles représentent 10% de la population cellulaire totale de l'épididyme. Leur nombre diminue tout au long de l'organe pour ne

représenter que 1% des cellules dans la queue de l'épididyme (Adamali and Hermo, 1996). Tout comme les types cellulaires précédents, elles participent à l'acidification du fluide épидидymaire et donc à la quiescence des spermatozoïdes, grâce à la production d'anhydrase carbonique qui permet la sécrétion de protons et la réabsorption du bicarbonate (Martínez-García et al., 1995 ; Hermo et al., 2005). De plus, la proportion de ce type cellulaire est augmentée en cas de stress inflammatoire tel que celui occasionné lors d'une carence en magnésium, sans que leur implication dans ces processus inflammatoires soit réellement connue (Vernet et al., 2004). Les cellules apicales ont également été montrées comme étant capables d'endocyter des substances présentes dans la lumière (Robaire and Hermo, 2002). Enfin, elles semblent également jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au sein de l'épithélium épидидymaire, puisqu'elles présentent le transporteur inverse de cholestérol ABCA1 (ATP binding cassette A1) à leur pôle apical (Ouvrier et al., 2009).

4. Les cellules étroites

Les cellules étroites sont plus fines que les cellules principales et sont reliées à la membrane basale par un mince filet cytoplasmique. Elles représentent un faible pourcentage des cellules de l'épithélium épидидymaire et ne sont présentes que dans la tête de l'épididyme chez la souris (Sun and Flickinger, 1980 ; Adamali and Hermo, 1996). Les fonctions de ce type cellulaire au sein de l'épithélium ne sont pas clairement définies. Elles semblent participer à l'acidification du fluide épидидymaire car elles possèdent une activité anhydrase carbonique et sont capables de sécréter des protons dans la lumière (Cohen et al., 1976 ; Hermo et al., 2005 ; Pietrement et al., 2006).

5. Les cellules claires

Les cellules claires sont caractérisées par la présence de vésicules claires en position apicale, de lysosomes en partie médiane et d'inclusions lipidiques en position basale (Robaire and Hermo, 1988). Elles se retrouvent essentiellement dans le corps et la queue de l'épididyme (Soranzo et al., 1982). Ces cellules ont un rôle d'endocytose bien plus important que celui des cellules principales (Olson and Hinton, 1985 ; Robaire and Hermo, 1988) et sont capables de récupérer le contenu des gouttelettes cytoplasmiques relarguées par les spermatozoïdes lorsqu'ils traversent le canal épидидymaire (Hermo et al., 1988 ; Robaire and Hermo, 1988). Elles sont également impliquées dans l'absorption de certains composés présents dans le compartiment luminal comme la V-ATPase (Beaulieu et al., 2005) et dans la régulation du pH du fluide épидидymaire (Kujala et al., 2007).

6. Les cellules en halo

Les cellules en halo sont situées à la base de l'épithélium mais ne sont pas en contact avec la lame basale. Leur rôle n'est toujours pas clairement défini même si elles semblent impliquées dans la défense immunitaire. En effet, chez le jeune rat, le nombre total des cellules dites en halo correspond à la somme du nombre de monocytes-macrophages (ED1⁺), de cellules CD4⁺ et de cellules CD8⁺. De plus, la localisation de ces cellules dans l'épithélium épидидymaire est identique à celle des cellules en halo (Serre and Robaire, 1999).

III. Les fonctions de l'épididyme

1. Le transport et le stockage des spermatozoïdes

Chez l'homme, la durée de transit des spermatozoïdes dans l'épididyme est de l'ordre de 12 jours (Rowley et al., 1970) alors qu'elle est évaluée à 9-10 jours chez la souris (Meistrich et al., 1975). Le transport des spermatozoïdes ne peut se faire de manière passive, la pression

hydrostatique augmentant entre la tête et la queue de l'épididyme (Johnson and Howards, 1975). Les contractions péristaltiques des fibres musculaires lisses entourant l'épithélium épididymaire et les mouvements induits des stéréocils portés par les cellules épithéliales assurent donc la progression des spermatozoïdes qui sont immotiles (Robaire & Hermo, 1998). L'immobilité des spermatozoïdes dans l'épididyme est due à l'immaturité de leur équipement mitochondrial (dans les régions proximales du tubule), à la faible tension intraluminale en oxygène et au fait que le pH et la disponibilité en substrat énergétique ne sont pas optimaux (Carr et al., 1985). L'immobilité des spermatozoïdes épididymaires est en outre renforcée par des sécrétions épididymaires telles que l'immobiline qui bloque mécaniquement la mobilité des gamètes chez le rat et le hamster en créant un environnement hautement viscoélastique (Usselman and Cone, 1983). Le stockage des spermatozoïdes s'effectue dans la partie distale ou queue de l'épididyme entre deux éjaculations.

L'hypothèse selon laquelle les gamètes anormaux sont éliminés durant le stockage dans la queue de l'épididyme a été émise par certains auteurs. Une équipe a notamment montré que les spermatozoïdes défectueux sont ubiquitinylés, déclenchant un signal de phagocytose pour les cellules principales épididymaires ou l'adressage au protéasome contenu dans les épididymosomes (Sutovsky et al., 2001 ; Baska et al., 2008). Cependant, ces données ont été vivement critiquées car les observations histologiques de l'épididyme ne montrent que très rarement une phagocytose des gamètes mâles. Ce mécanisme est donc peu probable pour expliquer l'élimination des spermatozoïdes défectueux produits chaque jour (Cooper et al., 2002). D'autres études mettent en avant la présence d'un contrôle qualité dans l'épididyme. Chez le hamster, FGL2 (*Fibrinogen Like protein 2*), une glycoprotéine sécrétée dans la queue de l'épididyme, est exclusivement associée aux spermatozoïdes morts. En « isolant » les spermatozoïdes morts, FGL2 permettrait de protéger la population de gamètes viables des enzymes potentiellement délétères libérées par les spermatozoïdes mourants (Olson and Hinton,

1985 ; NagDas et al., 2000). Dans le sperme humain, une forme particulière de clusterine est associée à des spermatozoïdes morphologiquement anormaux et pourrait jouer un rôle dans leur agrégation (O' Bryan et al., 1994). Enfin chez le taureau, la protéine ELSPBP1 (*Epididymal Sperm Binding Protein 1*) est spécifiquement associée aux spermatozoïdes morts dans l'épididyme, suggérant un rôle de cette protéine dans le contrôle qualité bien que ce dernier ne soit pas identifié (D'Amours et al., 2012).

2. La maturation des spermatozoïdes

La maturation des spermatozoïdes correspond à l'ensemble des modifications morphologiques, biochimiques et fonctionnelles que subissent les spermatozoïdes au cours du transit épидидymaire en vue d'acquérir leur mobilité et leur pouvoir fécondant. Cette maturation est un processus dynamique. En effet, chez le lapin, des spermatozoïdes issus de la tête ou du corps proximal de l'épididyme ne sont capables de féconder que 1% des ovocytes, contre 57% pour des spermatozoïdes issus du corps distal et 95% pour des spermatozoïdes de queue d'épididyme (Orgebin-Crist, 1967). La maturation repose sur l'interaction des spermatozoïdes avec le fluide épидидymaire, somme des activités de synthèse, de sécrétion et de réabsorption des cellules épithéliales. La composition de ce fluide est constamment et progressivement modifiée tout au long de l'organe, ce qui permet la création d'un environnement unique, spécifique à chaque segment (Kirchhoff, 1999).

a. Modifications morphologiques

- 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

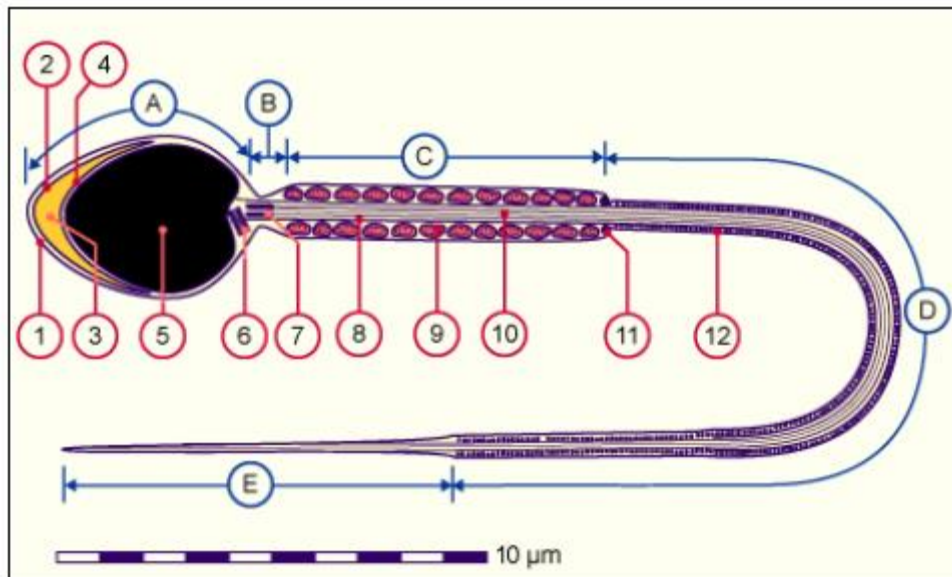


Figure 4 : Représentation schématique d'un spermatozoïde mature.

A) Tête - B) Collet - C) Pièce intermédiaire - D) Pièce principale - E) Pièce terminale
(C + D + E = flagelle)

1) Membrane plasmique - 2) Membrane acrosomique externe - 3) Acrosome - 4) Membrane acrosomique interne - 5) Noyau - 6) Centriole proximal - 7) Restes du centriole distal - 8) Faisceaux longitudinaux extérieurs denses - 9) Mitochondrie - 10) Axonème - 11) Annulus - 12) Fibres denses externes.

D'après <http://www.embryology.ch>.

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 415 mmol/kg alors que l'osmolarité spermatique est d'environ 290 mmol/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 (**Figure 4**). Cependant, le fluide permet aux spermatozoïdes d'éviter la déshydratation, grâce aux électrolytes sécrétés par l'épithélium épидидymaire (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).

- Migration de la gouttelette cytoplasmique

Au niveau du flagelle (**Figure 4**), la migration de la gouttelette cytoplasmique de la base de la tête vers l'annulus au cours du transit épидидymaire est observée dans de nombreuses espèces (Cooper and Yeung, 2003). Cette gouttelette pourrait intervenir dans la régulation du volume cellulaire. De nombreuses observations mettent en évidence la perte de la gouttelette cytoplasmique suite à sa migration. Cependant, ce sujet est soumis à controverse puisque la majorité de ces observations est réalisée sur des spermatozoïdes dilués dans un milieu hypotonique pouvant entraîner la rupture et la perte de la gouttelette cytoplasmique.

- Compaction nucléaire par pontages disulfure

Un autre aspect important de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes est l'accentuation de la compaction du noyau spermatique. Cette condensation est initiée durant la phase finale de la spermatogénèse testiculaire *via* le remplacement des histones par les protamines (**Figure 5 A** ; Sergerie et al., 2005). La condensation se poursuit durant le transit épидидymaire par une intense activité de pontage disulfure inter- et intra-protamines, au niveau

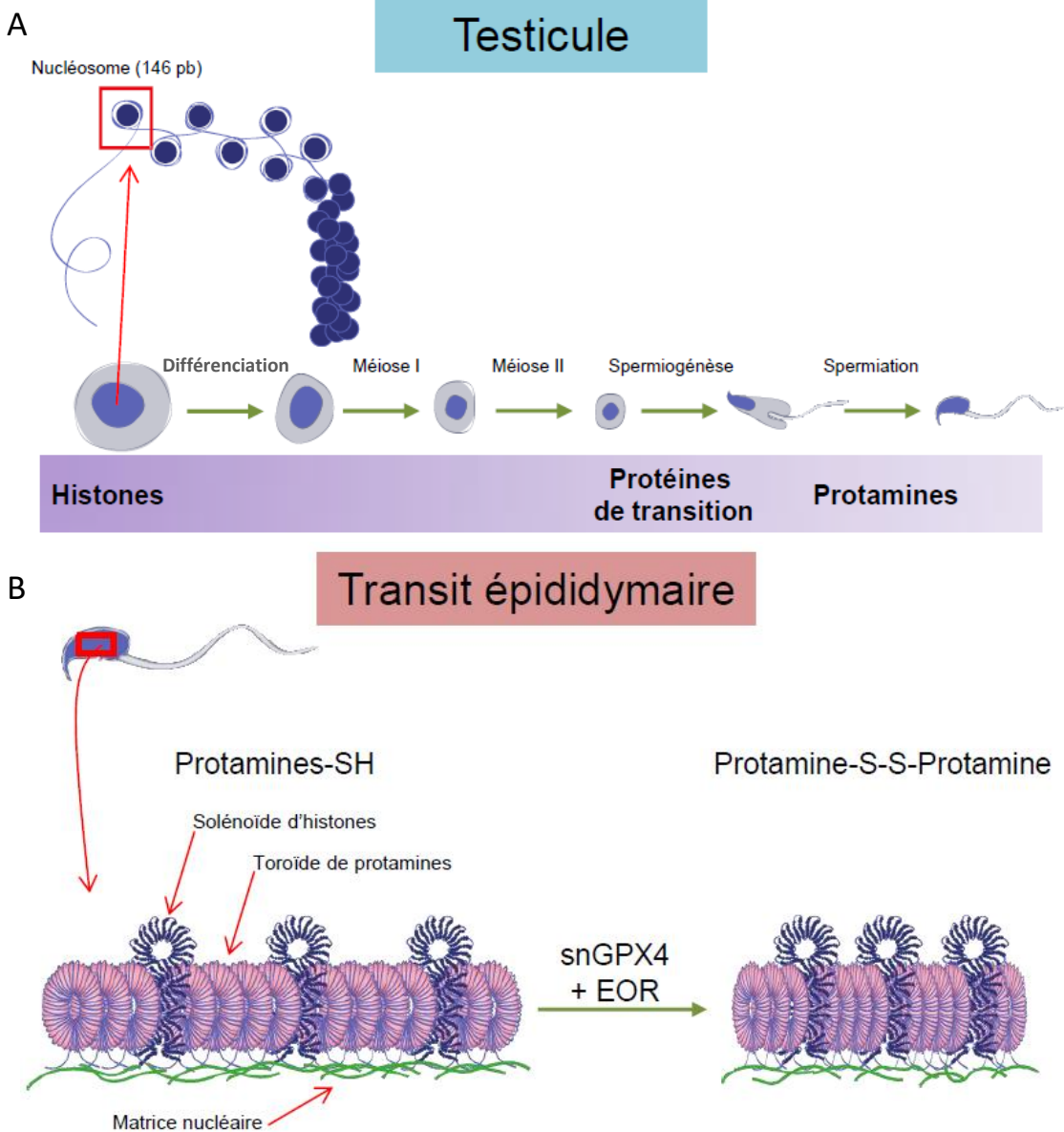


Figure 5 : Représentation schématique des évènements testiculaire et épидидymaire qui conduisent au remaniement de la chromatine spermatique.

A) Au cours de la spermatogénèse, les histones sont progressivement remplacées par des protéines nucléaires de transition, elles-mêmes finalement remplacées par les protamines. A la fin de la spermiogénèse, l'ADN lié aux protamines prend une apparence de toroïde de 50 à 100 kb. A certains endroits, l'ADN reste lié à des histones persistantes et forme les solénoïdes.

B) Au cours du transit épидидymaire, l'ADN spermatique est à nouveau condensé par un intense pontage disulfure. La snGPX4 utilise les EOR pour créer des ponts disulfure inter et intra-protamines.

EOR : Espèces oxygénées réactives, snGPX4 : *sperm nucleus Glutathione Peroxidase 4*.
D'après Champroux et al., 2016.

des nombreux résidus cystéines portés par ces protéines nucléaires (**Figure 5 B**). Cette activité de pontage disulfure est assurée par un variant spermatique de la glutathion peroxydase 4 (GPX4), la snGPX4 (*sperm nucleus GPX4*) présente dans le noyau spermatique (Conrad et al., 2005). L'environnement luminal de la tête de l'épididyme fournit un contexte pro-oxydant suffisant pour que cette activité de pontage disulfure ait lieu, la snGPX4 utilisant les espèces oxygénées réactives. 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 d'éventuels effets mutagènes en limitant l'accès aux agresseurs potentiels, qu'ils soient d'origine physique (radiations ionisantes par exemple) ou chimique (agents intercalants) (Noblanc et al., 2011).

- Modifications de l'acrosome

L'acrosome (**Figure 4**) se développe pendant la spermiogenèse. Toutefois, des changements de la morphologie et du contenu protéique de l'acrosome sont observés chez plusieurs espèces au cours du transit épидидymaire (Fawcett and Hollenberg, 1963 ; Toshimori, 1998 ; Olson et al., 2003). A titre d'exemple, des changements dans la distribution et dans le poids moléculaire de la protéine acrosomique acrin2 (MC41) sont observés au cours de la maturation épидидymaire chez le cochon d'Inde (Yoshinaga et al., 2001).

b. Modifications biochimiques

En complément des modifications morphologiques, le spermatozoïde subit un remodelage complet de sa surface en terme de protéines, de glucides et de lipides au cours du transit épидидymaire.

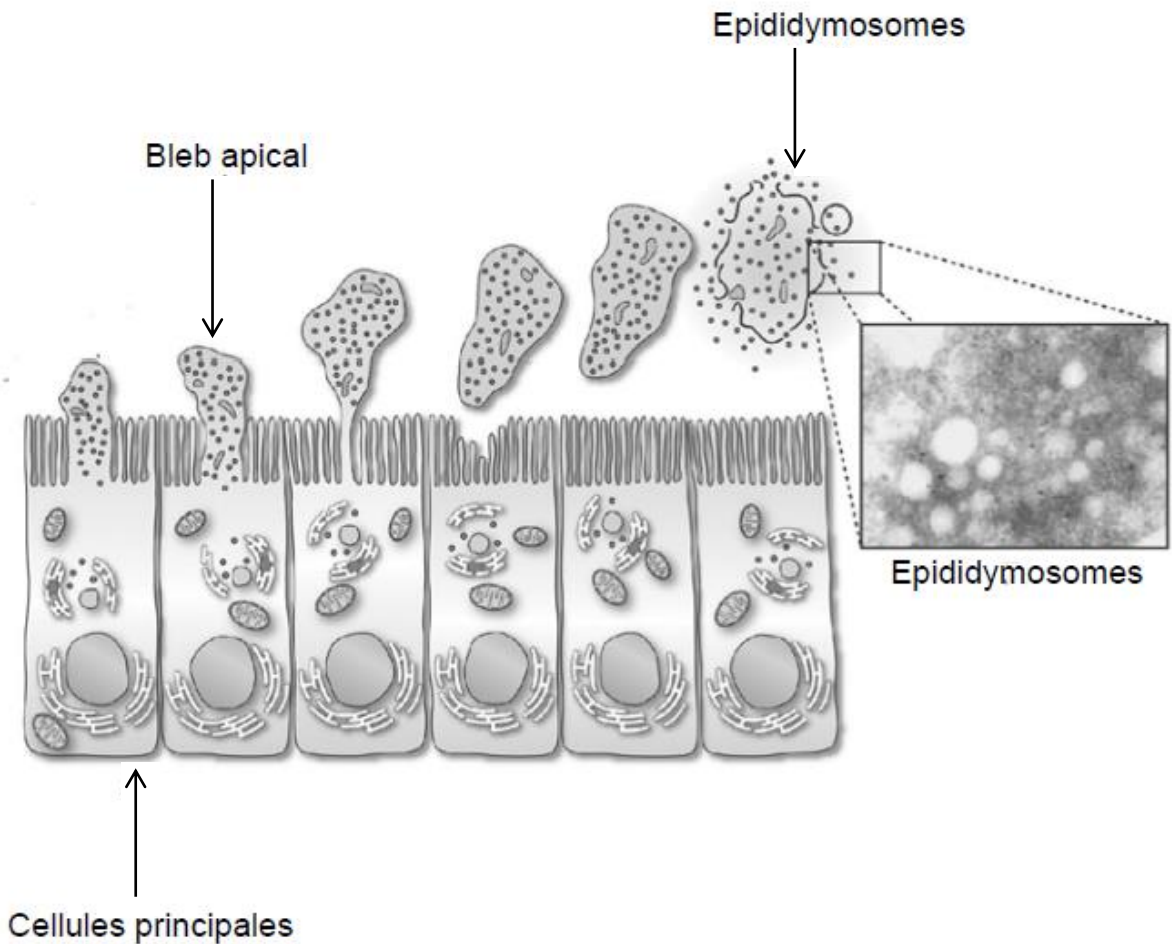


Figure 6 : Représentation schématique de la sécrétion apocrine par les cellules principales de l'épididyme.

Les blebs contenant les épididymosomes se forment au pôle apical des cellules principales puis se détachent de l'épithélium épididymaire et relâchent leur contenu dans la lumière du tubule. L'encart représente une photographie des épididymosomes en microscopie électronique. D'après *Sullivan et al., 2007*.

- Protéines

Au cours de leur transit dans l'épididyme, les spermatozoïdes subissent des changements dans leur composition protéique. Ces changements peuvent être classés en deux grandes catégories : ceux impliquant des protéines d'origine testiculaire (modification, relocalisation ou élimination) et ceux impliquant l'ajout de nouvelles protéines produites par l'épididyme.

L'un des meilleurs exemples de remodelage de protéines d'origine testiculaire est la famille de protéines ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*). L'un de ses membres, la fertiline β , recouvre initialement toute la tête spermatique chez le hamster et est dégradée par deux clivages successifs pendant le transit épididymaire (Blobel, 2000). Cette maturation induit une relocalisation de la protéine au niveau de la membrane plasmique post-acrosomale. Cette étape de protéolyse épididymaire est indispensable à la maturation fonctionnelle de la fertiline β et à la maturation du spermatozoïde. En effet, les souris invalidées pour la fertiline β présentent une réduction importante de la fertilité caractérisée par un défaut de migration à travers l'oviducte, ainsi qu'un défaut de liaison à la zone pellucide et à la membrane de l'ovocyte (Cho et al., 1998).

La deuxième catégorie de modifications protéiques implique l'acquisition par le spermatozoïde de nouvelles protéines produites par l'épididyme.

Une particularité de la sécrétion protéique épididymaire vient de la sécrétion de protéines ne possédant pas de peptide signal, *via* des processus de sécrétion apocrine. Ces protéines sont localisées dans des vésicules/exosomes appelés épididymosomes (**Figure 6**). Ces épididymosomes sont libérés dans la lumière par les cellules principales, principalement dans la tête proximale et dans la queue de l'épididyme. L'intérêt de ces vésicules, outre le fait qu'elles permettent la sécrétion de protéines ne possédant pas de peptide signal, pourrait être

de protéger les protéines d'une éventuelle dégradation enzymatique par le fluide épидидymaire (Sullivan et al., 2007). Il a été montré que certaines protéines contenues ou portées par les épидидymosomes pouvaient être retrouvées associées aux spermatozoïdes en transit, suggérant que les épидидymosomes pourraient participer à la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes (Frenette et al., 2002).

Une grande partie des protéines secrétées par l'épithélium épидидymaire est associée faiblement aux spermatozoïdes du fait de leur forte concentration dans la lumière épидидymaire et des ponts électrostatiques qu'elles développent avec la membrane spermatique (Dacheux et al., 2003). Cet attachement à la membrane pourrait faciliter leur activité comme pour les enzymes GPX5 (*Glutathione peroxidase*) ou la lactoferrine qui pourraient ainsi avoir des effets protecteurs plus importants contre les atteintes oxydantes ciblant les spermatozoïdes.

Enfin, on observe des protéines hydrophobes ancrées à la membrane des spermatozoïdes, qu'elles soient transmembranaires ou liées par ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol). Ces protéines pourraient également en partie être transférées aux spermatozoïdes *via* les épидидymosomes (Sullivan et al., 2007). Cependant, une large quantité de protéines hydrophobes sont présentes dans le fluide épидидymaire indépendamment des épидидymosomes, ce qui suggère un autre type de transport, *via* des complexes protéiques solubles par exemple (Gatti et al., 2004 ; Dacheux and Dacheux, 2014).

- Glucides

Les gamètes mâles sont entourés d'un revêtement dense, riche en carbohydrates, de 20 à 60nm d'épaisseur, appelé le glycocalyx qui forme une véritable « forêt » moléculaire autour du spermatozoïde (Bearer and Friend, 1990). Une étude a révélé que 297 protéines spermatiques étaient N-glycosylées chez l'homme (Wang et al., 2013), témoignant de l'importance de cette modification post-traductionnelle.

Le glycocalyx se met en place au niveau testiculaire au cours de la spermatogénèse. Certains composants sont synthétisés par le spermatozoïde lui-même alors que d'autres sont assemblés ou produits par les cellules de Sertoli (Schröter et al., 1999). Par la suite, les modifications du glycocalyx sont assurées par l'environnement du gamète et en particulier l'épididyme, le spermatozoïde étant incapable de synthétiser des glycanes *de novo*. Dans l'épididyme, on observe des modifications post-traductionnelles de glycosylations mises en place dans le testicule *via* la sécrétion d'enzymes de type glycosyltransférase ou glycosidase (Tulsiani, 2006). Ces activités enzymatiques représentent à elles seules plus de 80% de l'activité enzymatique totale présente dans le fluide luminal épидидymaire (Tulsiani et al., 1998). Ces modifications sont très régulées tout le long de l'organe puisque les différentes enzymes sont différentiellement exprimées entre la tête, le corps et la queue de l'épididyme (Scully et al., 1987 ; Ram et al., 1989). Le glycocalyx est encore davantage transformé par l'ajout de glycoconjugués sécrétés par l'épithélium épидидymaire et incorporés à la membrane plasmique du spermatozoïde (Kirchhoff and Hale, 1996 ; Sullivan et al., 2007).

Le glycocalyx mature permet aux spermatozoïdes de pénétrer le mucus cervical en conférant à la membrane spermatique une charge négative (Gilks et al., 1989 ; Tollner et al., 2008). Ce revêtement permet également aux gamètes mâles d'être protégés du système immunitaire cellulaire et humoral présent dans l'utérus (Pandya and Cohen, 1985 ; Thompson et al., 1992). Les interactions médiées par les glycanes sont également impliquées dans l'attachement des spermatozoïdes à l'épithélium oviductaire durant la formation du réservoir de spermatozoïdes chez les mammifères (Suarez and Pacey, 2006). Enfin, de nombreux auteurs ont également émis l'hypothèse que les glycanes seraient impliqués dans la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide (Diekman, 2003).

- Lipides

Au cours du transit épидидymaire, la composition lipidique du spermatozoïde est modifiée. Les spermatozoïdes perdent 40% de leurs phospholipides (Jones, 1998), ce qui induit une augmentation de la fluidité membranaire mais également une diminution de sa stabilité. Ces modifications sont nécessaires aux étapes ultérieures que sont 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 membranaires, 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 membranaires diminue (Avelzano et al., 1992). La proportion des acides gras polyinsaturés 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 épидидymosomes dont la composition lipidique varie d'une façon anti-parallèle à celle des spermatozoïdes durant la descente épидидymaire, sont aussi probablement des acteurs des modifications du profil lipidique des gamètes mâles (Rejraji et al., 2006).

c. Modifications fonctionnelles

La modification fonctionnelle majeure observée au cours du transit épидидymaire est l'acquisition de la mobilité spermatique, obtenue dès le passage de la tête de l'épидидyme. Cette mobilité est caractérisée par des mouvements désordonnés et asymétriques associés à une progression circulaire. Ce n'est que dans la queue de l'épидидyme que les spermatozoïdes sont capables de progresser de manière linéaire (Soler et al., 1994). Cependant, ces différents types de mobilité ne sont visibles qu'une fois les spermatozoïdes sortis de leur environnement

épididymaire. En effet, le fluide épididymaire, par son pH acide et sa viscosité, maintient les gamètes mâles dans un état quiescent, immobile, afin qu'ils conservent leurs réserves énergétiques (Usselman and Cone, 1983 ; Cooper, 1998). En contexte physiologique, la mobilité ne se développe qu'après éjaculation, lors du mélange avec les sécrétions des glandes accessoires.

3. La protection des spermatozoïdes

Comme mentionné précédemment, l'épididyme fournit un environnement luminal pro-oxydant essentiel pour assurer le pontage disulfure et donc la condensation du noyau spermatique. Cette situation est assez paradoxale car le gamète mâle est particulièrement sensible au stress oxydant. Cette sensibilité vis-à-vis de l'attaque radicalaire est due à la composition lipidique particulière de sa membrane plasmique riche en acides gras polyinsaturés, cibles de choix des espèces oxygénées réactives (EOR). Il est démontré depuis de nombreuses années que le peroxyde d'hydrogène entraîne une diminution de la mobilité et la mort des spermatozoïdes (Tosic and Walton, 1950). Les EOR entraînent également des dommages à l'ADN spermatique pouvant conduire à des anomalies de développement, à une augmentation des fausses couches et à de la morbidité dans la descendance (Sawyer et al., 2003 ; Aitken and Baker, 2004). Il est donc essentiel de protéger les gamètes mâles contre ces dommages afin de garantir la fertilité et la santé de la descendance.

Les spermatozoïdes étant transcriptionnellement et traductionnellement inactifs, ils ne peuvent engendrer de réponse face à ce stress radicalaire. De plus, ayant éliminé la majeure partie de leur cytoplasme, ils possèdent une quantité limitée d'enzymes cytoplasmiques ou de métabolites impliqués dans des mécanismes anti-oxydants. C'est donc l'épididyme qui doit assurer la protection des spermatozoïdes contre les dommages oxydants. Pour ce faire, l'épididyme sécrète dans le fluide de nombreuses enzymes anti-oxydantes comme la

superoxyde dismutase (Alvarez et al., 1987), les glutathion peroxydases (Dufaure et al., 1996 ; Noblanc et al., 2012) et les glutathion transférases (Robaire and Hales, 1982).

Par ailleurs, l'épididyme est fréquemment la cible d'infections rétrogrades qui, non contrôlées, altèrent la fertilité. Dans le même temps, il doit faire face à une arrivée massive mais tardive de spermatozoïdes. En effet, les spermatozoïdes sont produits à la puberté, longtemps après la mise en place du répertoire du soi et, par conséquent, les antigènes spécifiques des spermatozoïdes sont inconnus du système immunitaire (Witkin et al., 1996). Ces antigènes sont donc des cibles potentielles pour ce dernier, qui risque de les détruire.

Par conséquent, l'épididyme doit être en mesure de mettre en place une réponse immunitaire efficace contre les agents pathogènes tout en établissant une tolérance envers les spermatozoïdes. Ces aspects feront l'objet de la seconde partie de cette introduction bibliographique. Une altération de cet équilibre est impliquée dans le développement d'une infertilité d'origine immunologique, qui représente 10 à 15% des cas d'infertilité masculine (Dohle et al., 2005).

IV. La barrière hémato-épididymaire

La formation de jonctions serrées au pôle apical des cellules épithéliales adjacentes et la création de la barrière hémato-épididymaire (BHE) représentent des événements clés de la physiologie de l'épididyme. La formation de cette barrière physique est critique non seulement pour la protection des spermatozoïdes vis-à-vis du système immunitaire mais également, en coopération avec les activités sécrétoires et d'endocytose des cellules épithéliales, pour la création d'un milieu luminal optimal à la maturation des gamètes mâles. Ainsi, la BHE peut être décomposée en trois éléments distincts mais complémentaires : la barrière physique, la barrière physiologique et la barrière immunologique (Mital et al., 2011).

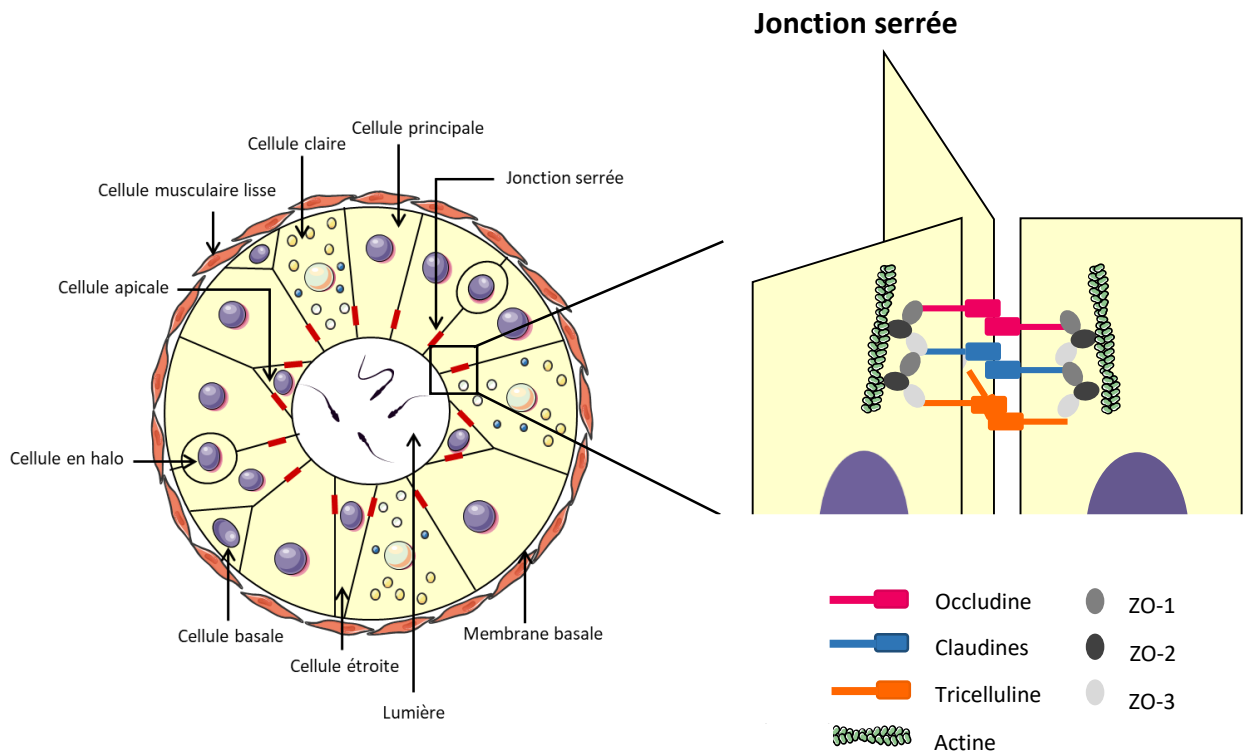


Figure 7 : Représentation schématique de l'assemblage des jonctions serrées.

Les jonctions serrées sont localisées au pôle apical des cellules épithéliales. Elles sont composées de protéines de jonctions transmembranaires : les claudines, l'occludine et la tricelluline, et de protéines de liaison au cytosquelette : les *Zonula occludens* (ZO) 1 à 3. D'après Cyr *et al.*, 2007.

1. La barrière physique

a. Formation

La BHE a été décrite pour la première fois par Friend et Gilula qui ont mis en évidence la présence d'un ensemble de jonctions serrées entre les cellules principales de l'épithélium épидидymaire (Friend and Gilula, 1972). Des expériences de cryofracture ont confirmé la présence de cette barrière et révélé que les jonctions varient en nombre et en complexité tout au long de l'organe (Suzuki and Nagano, 1978). Elles sont notamment plus étendues au niveau de la tête de l'épididyme par rapport à la queue, observation confirmée par des études de microscopie électronique (Cyr et al., 1995). Les preuves de l'intégrité morphologique de la BHE ont été apportées par Hoffer et Hinton qui ont montré qu'elle est imperméable au lanthanum et à l'inuline (Hoffer and Hinton, 1984). La fenêtre de mise en place de la BHE n'est pas conservée entre les différentes espèces de mammifères. Elle va de la période embryonnaire pour le vison et la souris (Suzuki and Nagano, 1978 ; Pelletier 1988) à la période post-natale chez le rat (Agarwal and Hoffer, 1989 ; Guan et al., 2005). Des expériences de perfusion à la peroxydase de raifort ont également permis de confirmer la présence d'une BHE chez le primate et l'homme (Yeung et al., 1989).

b. Composition des jonctions serrées

- Les protéines membranaires

L'occludine

L'occludine a été la première protéine identifiée au niveau des jonctions serrées (**Figure 7** ; Furuse et al., 1993). Cette protéine contient 4 domaines transmembranaires et est capable de se lier à l'occludine d'une cellule adjacente mais également aux protéines du cytosquelette. Dans l'épididyme murin, l'occludine est exprimée dès le jour embryonnaire 13,5 mais ce n'est qu'au jour embryonnaire 18,5 que la protéine est localisée au pôle apical des cellules épithéliales. Ce jour coïncide avec un pic de production d'androgènes, suggérant que ces

derniers pourraient jouer un rôle dans la mise en place des jonctions serrées de l'épididyme (Cyr et al., 1999). Chez la souris adulte, on retrouve l'occludine au pôle apical des cellules principales de tous les segments, à l'exception du segment initial (Cyr et al., 1999). Cependant, un réseau étendu de jonctions serrées a été identifié dans le segment initial (Cyr et al., 1995), suggérant que dans cette région, d'autres protéines interviennent dans la formation des jonctions. Chez l'homme, l'occludine est localisée spécifiquement au niveau des jonctions serrées, dans toutes les régions de l'organe (Dubé et al., 2007).

Les claudines

La découverte d'une autre famille de protéines transmembranaires impliquées dans la formation des jonctions serrées, nommées claudines (CLDNs), a ajouté un niveau de complexité dans la compréhension des jonctions serrées (**Figure 7**). Elles sont recrutées au niveau des jonctions indépendamment de la présence ou non d'occludine (Saitou et al., 2000). A ce jour, 24 CLDNs ont été identifiées avec une distribution tissulaire variable. Cette diversité est illustrée dans l'épididyme, où 9 et 5 CLDNs différentes sont retrouvées au niveau des jonctions serrées chez le rat (Gregory and Cyr, 2006) et l'homme (Dubé et al., 2007), respectivement. La signification d'un nombre si important de CLDNs au niveau des jonctions serrées n'est pour le moment pas connue mais elle peut être partiellement expliquée par la localisation spécifique à certains segments de certaines de ces protéines (Gregory and Cyr, 2006). La présence des CLDNs au niveau des jonctions serrées est indispensable au maintien de l'intégrité de la BHE. En effet, celle-ci est altérée dans une lignée de cellules épithéliales épididymaires humaines suite à la diminution de l'expression des *CLDN1*, 3, 4 et 7 par des petits ARNs interférents (Dubé et al., 2010).

La tricelluline

La dernière protéine membranaire retrouvée dans les jonctions serrées épидидymaires est la tricelluline (**Figure 7**). Cette protéine récemment identifiée chez le rat, est spécifique des jonctions serrées tricellulaires (Ikenouchi et al., 2005). La protéine est localisée dans la région apicale de l'épithélium et plus précisément au niveau des jonctions serrées, comme en témoigne sa co-localisation avec l'occludine. La tricelluline est présente de manière uniforme dans toutes les régions de l'épididyme. Le *knock-down* de la tricelluline provoque une diminution de la résistance transépithéliale, indiquant son importance dans la fonction des jonctions serrées et le maintien de la BHE (Mandon and Cyr, 2015).

- Les protéines cytoplasmiques

Les protéines « Zonula occludens »

Les protéines membranaires (claudines, occludine et tricelluline) constituent le noyau des jonctions serrées. Elles sont associées à une multitude de protéines cytoplasmiques qui peuvent être soit des adaptateurs les reliant au cytosquelette d'actine, ce qui permet de stabiliser la structure de la jonction, soit des protéines régulatrices impliquées dans différents processus comme la transcription, la polarité cellulaire ou la signalisation cellulaire (Matter and Balda, 2003). Parmi ces protéines cytoplasmiques, seules les *Zonula occludens proteins* (ZO-1, 2, 3), également connues sous le nom de *Tight Junction Proteins* (TJP1, 2, 3), ont été décrites dans l'épididyme (**Figure 7**). ZO-2 et ZO-3 ont été uniquement décrites chez la souris (Kim and Breton, 2015), alors que ZO-1 est retrouvée au niveau des jonctions serrées épидидymaires de la souris (Kim and Breton, 2015), du rat (Levy and Robaire, 1999) et de l'homme (Dubé et al., 2008).

c. Régulation de la BHE

Les facteurs régulant la formation et le maintien de la BHE sont à ce jour peu connus. Une étude réalisée par Suzuki et Nagano démontre que le maintien des jonctions serrées dans

l'épididyme est sous la dépendance de facteurs testiculaires (Suzuki and Nagano, 1978). En effet, l'orchidectomie de souris adultes entraîne une baisse du nombre de jonctions serrées au niveau de la tête de l'épididyme. Cette observation est confirmée chez le rat où l'expression des *Cldn5*, *8*, *11* et *14* diminue au niveau de l'épididyme proximal suite à une ligation des canaux efférents (Turner et al., 2007). Enfin, une implication des facteurs de transcription SP1 et SP3 (Dufresne and Cyr, 2007), des TGF- β s (*transforming growth factor-beta* ; Stammeler et al., 2013) et de la voie de signalisation MAPK/ERK (Kim and Breton, 2015) a été rapportée dans la régulation des jonctions serrées épididymaires.

2. La barrière physiologique

La BHE contrôle soigneusement le microenvironnement luminal, de sorte que les spermatozoïdes baignent dans un milieu approprié à leur maturation tout au long du transit épididymaire. Cet aspect fonctionnel de la BHE est connu sous le nom de barrière physiologique. La création de ce microenvironnement repose sur le contrôle strict du passage d'un certain nombre d'ions, de solutés et de macromolécules à travers l'épithélium épididymaire. A titre d'exemple, des molécules telles que l'inositol et la carnitine peuvent être concentrées de dix à cent fois dans la lumière de la tête d'épididyme, tandis que d'autres, telles que l'inuline, le L-glucose et l'albumine, sont efficacement exclues (Hinton and Hernandez, 1985 ; Hinton and Palladino 1995). Ce contrôle est rendu possible en régulant l'influx et l'efflux de solutés à travers les membranes basolatérales et apicales de l'épithélium *via* des transporteurs spécifiques (Turner, 1991). La manière dont chaque transporteur est régulé individuellement et la manière dont ils se coordonnent pour fournir un microenvironnement unique et en constante évolution le long de l'organe ne sont pas élucidées.

3. La barrière immunologique

Trois éléments distincts mais complémentaires composent la barrière immunologique : les jonctions serrées, les cellules épithéliales et les cellules immunitaires épididymaires. Les jonctions serrées permettent une séparation physique entre les spermatozoïdes immunogéniques et les cellules immunitaires. Ce mécanisme de tolérance périphérique connu sous le nom d'ignorance permet de prévenir les réactions auto-immunes contre les gamètes mâles. Cependant, l'étanchéité de la barrière n'est pas totale et des mécanismes complémentaires sont nécessaires pour assurer la tolérance aux spermatozoïdes. Ils reposent sur un dialogue efficace entre les cellules épithéliales, les cellules immunitaires et les spermatozoïdes qui permet, à l'état physiologique, la création d'un environnement pro-toléro-gène (*cf.* partie B-IV). Inversement, en cas d'infection par un pathogène, ce dialogue aboutit à la mise en place d'une réponse immune efficace (*cf.* partie B-II ; Hedger, 2011 ; Guiton et al., 2013).

B. Immunité de l'épididyme

L'étude de l'immunité de l'épididyme a longtemps été négligée par rapport à l'étude de l'immunité du testicule. En effet, du fait de sa position anatomique en amont du tractus urogénital, il était communément admis que le testicule conférait sa protection immunitaire à l'ensemble du tractus génital mâle. Cependant, des données expérimentales et cliniques remettent sérieusement en question ce dogme.

Des expériences de greffes allogéniques d'ilôts pancréatiques, de peau ou de parathyroïde chez le rat et le cochon d'Inde ont démontré que le tissu interstitiel testiculaire autorise, même pour des temps très longs, la survie des greffons (Fergusson and Scothorne, 1977 ; Head et al., 1983). Ainsi, ce compartiment est à l'abri des réponses immunes classiques qui visent à éliminer tout composant étranger et qui conduiraient dans tout autre contexte, au rejet de la greffe. Ce phénomène, appelé privilège immun, est la résultante de mécanismes complexes aboutissant au

contrôle actif de l'antigène au sein du tissu privilégié et de ses structures lymphatiques associées (pour revue : Fijack et al., 2011 ; Meinhardt and Hedger, 2011). A l'inverse, les expériences de greffes allogéniques de parathyroïde dans l'interstitium épидидymaire de rat montrent un rejet rapide du greffon après la transplantation (Kazeem, 1988). L'organe n'est donc pas un lieu de privilège immun et est capable de mettre en place une réponse immune rapide.

Ces résultats expérimentaux sont appuyés par des données cliniques montrant la différence de réponse des deux organes à des pathologies telles que le cancer et l'inflammation. Le cancer du testicule est 30 à 75 fois plus fréquent que le cancer de l'épididyme, ce dernier étant bénin dans 80% des cas (Yeung, 2012). De plus, l'inflammation de l'épididyme, ou épидидymite, est la pathologie inflammatoire la plus fréquente du tractus uro-génital mâle (Moore, 1971) alors que l'orchite seule, inflammation du testicule, est rare et généralement associée aux oreillons chez les jeunes enfants (Trojan, 2009). En terme d'immunologie, si le cancer reflète un défaut de surveillance immune, laissant la possibilité aux cellules transformées de se multiplier, l'inflammation marque l'initiation d'une réponse immunitaire suite à une surveillance immune efficace.

Il est donc clair aujourd'hui que l'immunité de l'épididyme est différente de celle du testicule et il apparaît crucial de rattraper le retard de connaissances accumulé. En effet, l'étude de l'immunité épидидymaire, par la compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'élimination des pathogènes et la protection des spermatozoïdes, est un prérequis à la mise en œuvre de traitements efficaces contre l'infertilité d'origine immunologique.

I. Les acteurs de l'immunité présents à l'état physiologique

Le rôle premier du système immunitaire est de contrôler l'invasion et la prolifération des agents pathogènes. En pénétrant dans l'organisme, un agent pathogène est confronté à une première ligne de défense appelée immunité naturelle ou innée (Akira et al., 2006). Cette étape

fait intervenir des barrières physiques (épithélia digestif, bronchique et uro-génital), une composante cellulaire et une composante humorale. La réponse immunitaire innée est suivie d'une réponse adaptative, caractérisée par la mise en place de réponses lymphocytaires B et T spécifiques adaptées à la destruction du pathogène rencontré. Cette réponse spécifique aboutit à une mémoire immunologique qui permettra une destruction plus efficace et plus rapide lors d'un deuxième contact avec le même pathogène. Pendant de nombreuses années, les immunologistes ont dissocié les deux types de réponses immunes, innée et adaptative. En 1989, Charles Janeway propose une théorie intégrative, dans laquelle les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la reconnaissance innée des micro-organismes contrôlent la nature de la réponse immune adaptative, suggérant une liaison étroite entre les deux types de réponse (Janeway, 1989).

Cette première section présente les acteurs moléculaires et cellulaires de l'immunité innée et adaptative présents au sein de l'épididyme à l'état physiologique.

1. Les protéines de défense

a. Les récepteurs de l'immunité innée

Le système immunitaire est capable de détecter et d'éliminer les micro-organismes pathogènes en discriminant le soi du non-soi (*cf.* partie B-IV). La détection des agents pathogènes est assurée par des récepteurs dits PRRs (*pattern-recognition receptors*), qui reconnaissent des produits (ou motifs moléculaires) conservés et partagés par les agents microbiens et que l'on regroupe sous le terme de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Medzhitov, 2009). L'activation des PRRs déclenche des voies de signalisation essentielles pour l'élimination des agents infectieux par l'immunité innée. Parallèlement, les voies de signalisation des PRRs induisent l'activation des cellules dendritiques, qui sont responsables de l'induction de l'immunité adaptative.

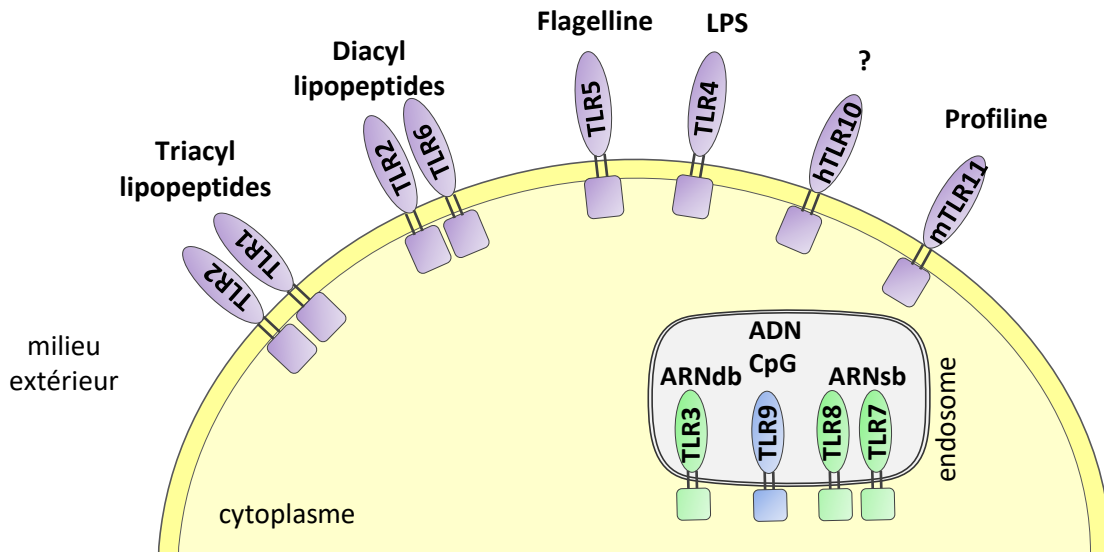


Figure 8 : Représentation schématique de la localisation des récepteurs *Toll-like* et de leurs principaux ligands.

Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, hTLR10 et mTLR11 sont localisés à la membrane plasmique et reconnaissent principalement des composants de la membrane microbienne alors que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont localisés à la membrane de l'endosome et reconnaissent des acides nucléiques.

TLR : *Toll-like* receptor, LPS : Lipopolysaccharide, ARNdb : ARN double brin, ARNsb : ARN simple brin, hTLR : TLR humain, mTLR : TLR murin

D'après *Takeda and Akira, 2005*.

- Les récepteurs Toll-like

Parmi les PRRs, les récepteurs de signalisation Toll-like (TLRs) ont été les premiers identifiés et sont les mieux caractérisés. Ils reconnaissent un large spectre de PAMPs et jouent un rôle important dans l'orchestration des immunités innée et adaptative (Blasius and Beutler, 2010 ; Kawai and Akira, 2011). Le rôle des TLRs dans l'immunité innée a été décrit pour la première fois chez la drosophile. Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I, avec un domaine extracellulaire composé de répétitions de motifs riches en leucine (LRR, *leucine-rich repeats*) assurant la reconnaissance, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire globulaire présentant de fortes homologies avec la portion cytoplasmique du récepteur de l'interleukine-1 (TIR, Toll-IL-1 *receptor*) et nécessaire à la transduction du signal (Takeda et al., 2003). Les TLRs sont exprimés de manière dynamique par de nombreux types cellulaires, aussi bien immunitaires (macrophages, cellules dendritiques, cellules B et certains sous-types de cellules T) que non immunitaires (fibroblastes et cellules épithéliales) (Takeda et al., 2003). Chaque TLR détecte des composants microbiens distincts provenant de bactéries, de virus, de champignons ou de parasites (**Figure 8**). Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11 sont localisés à la surface cellulaire et reconnaissent principalement des composants de la membrane microbienne alors que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés dans des vésicules intracellulaires et reconnaissent des acides nucléiques (Takeda et al., 2003).

Un nombre croissant de données montre que les TLRs reconnaissent également des molécules endogènes libérées par les tissus lésés ou des cellules mortes, jouant ainsi un rôle important dans l'induction de l'inflammation en l'absence d'agent pathogène (inflammation stérile). Les voies de signalisation TLR activées par des ligands endogènes sont impliquées dans des conditions physiopathologiques telles que les maladies auto-immunes, la tumorigenèse ou des lésions tissulaires (Yu et al., 2010).

The diagram illustrates the signaling pathways of various Toll-like receptors (TLRs) within a cell. TLRs are located on the cell surface or within endosomes. TLR4, TLR2, TLR1, and TLR6 are on the surface, while TLR3, TLR7/8/9, and TLR5 are in endosomes. TLR4 signaling involves MyD88, TIRAP, TRAM, and TRIF. TLR2/1 and TLR6/1 signaling involve MyD88 and TIRAP. TLR3 signaling involves TRIF. TLR7/8/9 signaling involves MyD88. TLR5 signaling involves MyD88. The MyD88-TIRAP complex activates IRAK and TRAF6, leading to NF- κ B activation. The TRAM-TRIF complex activates IKK ϵ and TBK1. TRIF also activates IRF-3 and IRF-7. IRAK and TRAF6 also activate IRF-7. NF- κ B, IRF-3, and IRF-7 translocate to the nucleus to induce the expression of pro-inflammatory cytokines and type I interferons, respectively.

Les TLRs exercent leur fonction *via* deux voies de signalisation : la voie dépendante de MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*) et la voie indépendante de MyD88, impliquées dans la transcription de gènes pro-inflammatoires et d'interférons de type I (**Figure 9** ; Kawai and Akira, 2006). A ce jour, 10 TLRs fonctionnels ont été identifiés chez l'homme et 12 chez la souris, les TLRs 1 à 9 étant conservés dans les deux espèces. Le TLR10 murin est non fonctionnel en raison d'une insertion rétrovirale dans le gène correspondant, alors que les gènes codant pour les TLR11, TLR12 et TLR13 ont été perdus par le génome humain (Takeda and Akira, 2005).

Dans l'épididyme murin, bien que les ARNm des 12 TLRs fonctionnels soient présents, seuls les TLRs 3 à 5 ont été mis en évidence au niveau protéique (Johnston et al., 2005 ; Cheng et al., 2016). Chez l'homme, les seules données disponibles montrent la présence du TLR3 dans des lignées cellulaires d'épididyme (Browne et al., 2018). Les 11 TLRs de rat sont retrouvés dans l'épididyme (transcrits et protéines). Certains, comme les TLRs 1, 2, 4 et 6 sont plus abondants que d'autres (Palladino et al., 2007). Ils sont localisés au niveau de l'épithélium épидидymaire, dans tous les types cellulaires, à l'exception des cellules claires de la queue d'épididyme pour les TLRs 5-7 et 11 (Palladino et al., 2008). De manière plus inattendue, certains TLRs sont retrouvés sur les spermatozoïdes, de manière différentielle en fonction du lieu de recueil (spermatozoïdes testiculaires vs épидидymaires), montrant une acquisition au cours du transit épидидymaire. Le rôle de ces TLRs ainsi que leur état d'activation ne sont pour le moment pas connus, mais les auteurs émettent l'hypothèse d'un rôle de leurre où le spermatozoïde se lierait au pathogène pour l'occuper avant d'être *in fine* endocyté et dégradé par les cellules épithéliales (Palladino et al., 2008).

- Autres récepteurs

En complément des TLRs, des hélicases de la famille RLR (*RIG-I [retinoic acid-inducible gene I] like receptor*) et des senseurs d'ADN cytosolique, impliqués dans la réponse immune antivirale, ont été mis en évidence dans des cultures cellulaires d'épididyme.

Les RLRs sont essentiels à la détection des ARN double brins viraux dans presque tous les types cellulaires, y compris les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules dendritiques.

La famille RLR est composée de 3 membres : RIG-I, MDA5 (*Melanoma differentiation associated gene 5*) et LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*) (Kato et al., 2005).

Les senseurs d'ADN cytosolique, comme la protéine DAI (*DNA-dependent activator of IFN regulatory factor*), l'ARN polymérase III, la cGAS (*cGMP-AMP synthase*) et l'IFI16 (*IFN-inducible protein 16*) sont activés par l'ADN viral (Paludan and Bowie, 2013).

Les protéines RIG-I, MDA5, DAI et IFI16 ont été identifiées dans des lignées cellulaires d'épididyme humain et murin (Zhu et al., 2015 ; Browne et al., 2018).

b. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAMs) ont été identifiés chez les vertébrés, les invertébrés, les plantes et les bactéries. Ils possèdent un large spectre d'action incluant les bactéries, les champignons, les virus enveloppés, les parasites et parfois même les cellules cancéreuses. Ils sont généralement de petite taille (12 à 100 acides aminés), positivement chargés et amphiphiles (Yeaman and Yount, 2003 ; Deslouches and Di, 2017). À ce jour, des centaines de peptides ont été identifiés, indiquant leur importance dans le système immunitaire inné (Hancock and Chapple, 1999). Leur expression peut être constitutive ou induite par des stimuli infectieux et/ou inflammatoires, tels que des cytokines pro-inflammatoires, des bactéries ou des molécules bactériennes comme le LPS (lipopolysaccharide) (Hancock, 2001 ; Cunliffe and Mahida, 2004). Il existe également quelques PAMs anioniques, comme la dermicidine (Harris et al.,

2009). Ces derniers n'ayant jamais été mis en évidence dans l'épididyme, ils ne seront pas développés dans cette introduction.

La première étape du mode d'action des PAMs repose sur l'attraction entre le PAM et sa cible. Elle est rendue possible par la liaison électrostatique entre le peptide cationique et les composants bactériens chargés négativement comme le LPS des bactéries Gram-négatives ou les acides lipotéichoïques présents à la surface des bactéries Gram-positives (Hancock and Rozek, 2002). La forte proportion de lipides chargés négativement à la surface des bactéries joue un rôle crucial dans la sélectivité des PAMs pour les bactéries plutôt que pour les membranes des cellules eucaryotes dont la surface présente majoritairement des lipides neutres. Les événements qui se produisent à la surface de la membrane bactérienne sont sujets à débat et plusieurs modèles ont été proposés (pour revue Jenssen et al., 2006). Cependant, ils aboutissent tous à la perméabilisation de la membrane bactérienne et/ou à la translocation du PAM dans le cytoplasme sans dommage membranaire. La formation de pores par les PAMs à action membranaire induit une fuite du contenu cytoplasmique, une dépolarisation de la membrane, l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane et *in fine* la mort de la cible. Les PAMs à action non membranaire ciblent des processus cellulaires essentiels comme la synthèse d'acides nucléiques et de protéines ainsi que les activités enzymatiques pour induire la mort cellulaire (Brodgen, 2005).

Les PAMs participent également à d'autres aspects de l'immunité innée. Ils sont notamment capables d'améliorer l'activité phagocytaire des macrophages (Ichinose et al., 1996), de stimuler la libération d'histamine et de prostaglandines (Befus et al., 1999 ; Niyonsaba et al., 2001), de neutraliser les effets septiques du LPS, de favoriser l'angiogenèse (Koczulla et al., 2003) et d'induire la réparation des plaies (Chan and Gallo, 1998). Enfin, les PAMs jouent également un rôle dans l'initiation de la réponse adaptative en induisant le

recrutement des monocytes (Teritto et al., 1989), des lymphocytes T (Chertov et al., 1996) et en modulant l'activation des cellules dendritiques (Davidson et al., 2004).

- Défensines

Les défensines sont de petits peptides cationiques de 3 à 6 kDa contenant six résidus cystéine (motif consensus), permettant la formation de trois ponts disulfure intramoléculaires dont l'organisation permet de définir 3 groupes chez les mammifères : α , β et θ (Diamond and Bevens, 1998 ; Ganz 2003). Les θ -défensines sont cycliques et n'ont jusqu'à présent été identifiées que dans les leucocytes de primates (Tang et al., 1999). Les structures tertiaires des α - et des β -défensines sont très proches malgré une faible homologie des séquences peptidiques primaires. Elles sont chacune constituées de trois feuillets β et d'une hélice α (Ganz, 2003). Les défensines sont actives sous forme d'octamères (Hoover et al., 2000) et possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne (bactéries Gram⁺ et Gram⁻, champignons, virus enveloppés).

Les α -défensines ont été identifiées chez l'homme, le singe et certains rongeurs et sont particulièrement abondantes dans les neutrophiles, certaines populations de macrophages et au niveau de l'intestin, dans les cellules de Paneth (Ganz, 2003). Dans le tractus génital mâle, et particulièrement au niveau de l'épididyme, on note la présence des RPN 1-2 et 4 (*Rat Neutrophil Peptide*) chez le rat et de la CRS1C (*Cryptdin-related sequence 1 C*) chez la souris. De plus, les peptides HNP1-3 (*Human neutrophil peptide*) et HD-5 (*human defensin*) ont été identifiés sur des spermatozoïdes éjaculés humains. Cependant, il ne peut pas être exclu que la présence de ces peptides soit due à une contamination des échantillons par des neutrophiles (Com et al., 2003).

Les β -défensines sont retrouvées chez tous les mammifères, principalement dans les cellules épithéliales de l'épiderme, de l'arbre bronchique et du tractus uro-génital, y compris de

l'épididyme, chez les mammifères (Yamaguchi et al., 2002 ; Zaballos et al., 2004 ; Zhou et al., 2004, 2013 ; Patil et al., 2005). La première étude rapportant la présence d'une défensine à expression exclusivement épидидymaire a été réalisée chez le rat : le peptide *Bin1b* (*Spag11a*), un variant d'épissage de *SPAG11* (*Sperm Associated Antigen 11*), est exclusivement exprimé dans la partie médiane de la tête d'épididyme (Li et al., 2001). D'autres études ont confirmé par immunohistochimie, la présence de plusieurs isoformes du peptide SPAG11 dans les cellules de l'épithélium épидидymaire chez l'homme (Hamil et al., 2000), le bovin (Avellar et al., 2007) et le rat (Yenugu et al., 2006a).

A l'aide d'une approche plus globale, le répertoire complet des gènes codant les β -défensines a pu être établi dans 5 espèces de mammifères (Patil et al., 2005). Chez le rat, 42 gènes ont été mis en évidence et respectivement, 39 et 52 gènes/pseudogènes chez l'homme et la souris. Ces gènes sont organisés en clusters, au nombre de 5 chez l'homme. Cette richesse génique peut être expliquée par une non redondance de la fonction et/ou de la localisation de ces peptides. Par la suite, les auteurs ont examiné le profil d'expression de la totalité des 42 gènes composant la famille des β -défensines de rat. Il en ressort une expression préférentielle au niveau du tractus génital mâle, et notamment au niveau de l'épididyme où certains gènes comme *Defb51*, -52 ou -18 sont spécifiques de l'organe (Patil et al., 2005). Ce travail met également en avant une expression différentielle en fonction de la région de l'épididyme (tête, corps ou queue). A titre d'exemple, *Defb12*, -15, -17, -18, -21, -25, -34, -35 et -41, *Spag11c*, et *Spag11e* sont exprimés plus abondamment dans la tête de l'organe alors que *Defb9*, -10, -11, -13 et -40 le sont plus en queue d'épididyme. Chez la souris, les gènes des β -défensines sont également majoritairement exprimés dans l'épididyme, avec une différence en fonction des segments étudiés (Yamaguchi et al., 2002 ; Zaballos et al., 2004). Enfin, on note également chez l'homme la présence de β -défensines spécifiques de l'épididyme comme hBD5 et 6 (*human β -defensin*) (Yamaguchi et al., 2002).

Bien qu'un grand nombre de gènes de β -défensines ait été identifié dans l'épididyme de nombreuses espèces, leur activité antimicrobienne reste majoritairement inconnue. Chez le rat, DEFB-22, -24 et -30 sont capables d'exercer une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* (*E. coli*) (Yenugu et al., 2006c ; Diao et al., 2011) tandis que DEFB15 et DEFB14 inhibent la survie des pathogènes *E. coli*, *Candida albicans* (*C. albicans*) et *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*), de manière dose dépendante (Zhao et al., 2011). La famille de β -défensines SPAG11 possède également des activités antimicrobiennes : les peptides entiers humains, bovins et de macaque, ainsi que le domaine C-terminal des variants SPAG11A, D et G possèdent une activité antimicrobienne contre *E. coli* (Yenugu et al., 2003). De plus, le peptide C-terminal de SPAG11A est également capable de tuer *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), *S. aureus* et *Enterococcus faecalis* (Liao et al., 2005). Les β -défensines SPAG11 et DEFB118 sont capables de tuer les bactéries *E. coli* par 2 mécanismes complémentaires, d'une part en induisant des perturbations de la membrane bactérienne et d'autre part en inhibant la synthèse de macromolécules (Yenugu et al., 2004a ; Yenugu et al., 2004b ; Yenugu et al., 2006b). Les attaques membranaires sont rapidement mises en place : la membrane externe est endommagée en 30 secondes et la membrane interne quelques minutes plus tard. La microscopie électronique à balayage permet de visualiser ces dommages qui aboutissent en 30 min à une fuite du contenu cellulaire qui engendre la mort du pathogène.

- Cathélicidines

Les cathélicidines dérivent d'une protéine précurseur, caractérisée par un peptide signal et un pro-domaine hautement conservé dans la région N-terminale et d'une région C-terminale très variable contenant le peptide antimicrobien à proprement parler. Le pro-domaine appelé domaine cathéline pour son homologie avec la cathéline (inhibiteur de la cathepsine L) est à l'origine du nom de cathélicidine. Chez l'homme, une seule cathélicidine nommée hCAP-18 (*human cationic antimicrobial peptide -18*) a été identifiée (Durr et al., 2006). L'extrémité C-

terminale de hCAP-18 contient le peptide cationique LL-37, qui porte l'activité antibactérienne. Un processus de clivage est essentiel pour l'activation de cette activité antibactérienne *in vivo*. Le LL-37 présente un large spectre d'activité antimicrobienne contre des bactéries Gram + et Gram -, des champignons et virus (Dürr et al., 2006). De manière similaire aux β -défensines, le LL-37 exerce son action antibactérienne d'une part en endommageant la membrane (Sochacki et al., 2011) et d'autre part en ciblant les composants intracellulaires (Zhang et al., 2010). Enfin, les cathélicidines sont capables de stimuler la réponse immunitaire adaptative. En effet, LL-37 est chimiotactique pour les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T (Yang et al., 2001).

Bien que les neutrophiles soient la source principale de hCAP-18, la protéine est retrouvée dans de nombreux tissus et liquides biologiques (Dürr et al., 2006). Des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont révélé la présence de hCAP-18 dans l'épididyme humain (Malm et al., 2000). La protéine est localisée dans l'épithélium épидидymaire, majoritairement au niveau de la queue de l'organe. hCAP-18 est également détectée dans le fluide séminal (qui provient des sécrétions de l'épididyme, des vésicules séminales, de la prostate et des glandes de Cooper) à un taux 70 fois supérieur à celui du plasma. Enfin, la protéine est présente sur le gamète avec une moyenne de 6,6 millions de molécules hCAP-18 par spermatozoïde (Malm et al., 2000). Ces données suggèrent un rôle de hCAP-18 dans la protection du spermatozoïde contre les attaques microbiennes au niveau de l'organe mais également au niveau du tractus génital femelle. Cependant, il faut noter que le peptide LL-37, n'a jamais été mis en évidence au niveau de l'épididyme ou des gamètes mâles.

c. Les protéines à activité antimicrobienne

En complément des PAMs « classiques » décrits précédemment, l'épididyme est la source de nombreuses protéines à activité antimicrobienne.

- Inhibiteurs de protéases

Comme nous l'avons vu précédemment, la modification des protéines de surface des spermatozoïdes (élimination, relocalisation ou acquisition) est un élément clé de la maturation du gamète mâle. Ces modifications, en partie réalisées par des protéases, sont finement régulées tant au niveau spatial que temporel. La présence de protéases dans l'épididyme nécessite donc la présence de leurs inhibiteurs pour assurer cette régulation. En complément de leur rôle dans la maturation des spermatozoïdes, les inhibiteurs de protéases jouent un rôle dans la réponse immunitaire innée, les enzymes protéolytiques étant des facteurs de virulence essentiels pour les pathogènes (Armstrong, 2001).

La protéine SLPI (*Secretory leukocyte peptidase inhibitor*), également connue sous le nom *human seminal inhibitor I* ou antileucoprotéase, a été décrite dans le liquide séminal humain (Schiessler et al., 1976) ainsi que dans les cellules épithéliales et la lumière de la prostate, des vésicules séminales et de l'épididyme (Ohlsson et al., 1995). Comme les défensines, SLPI est une protéine cationique de faible poids moléculaire (Seemuller et al., 1986). Dans le fluide séminal humain, SLPI est retrouvée à des concentrations suffisantes pour tuer les bactéries *E. coli* et *S. aureus in vitro* (Hiemstra et al., 1996 ; Shugars, 1999).

Les cystatines (CST), sont une autre famille d'inhibiteurs de protéases à activité antimicrobienne. Nous nous intéresserons ici à la sous-famille CRES (*Cystatin-related epididymal spermatogenic*) exprimée majoritairement dans le tractus génital mâle. Elle est composée de 4 membres : CST11, CRES (CST8), Testatin (CST9) et CST T, les deux derniers n'étant pas retrouvés au niveau de l'épididyme (Cornwall and Hsia, 2003).

Chez le macaque, *CST11* est exprimée spécifiquement dans l'épididyme (Hamil et al., 2002). Bien que présente dans tout l'organe, la protéine est plus abondante au niveau de la tête. On la retrouve également chez l'homme, sur les spermatozoïdes éjaculés (Hamil et al., 2002). *In vitro*,

la protéine recombinante est capable de tuer *E. coli* de manière dose dépendante mais son mode d'action reste pour le moment inconnu.

Le gène *Cres* est majoritairement exprimé dans l'épididyme, mais on le retrouve également à des niveaux inférieurs dans le testicule, l'ovaire et l'hypophyse. Dans l'épididyme murin, CRES est synthétisée uniquement dans les cellules principales de la tête proximale (Cornwall and Hann, 1995 ; Syntin and Cornwall, 1999). La protéine recombinante est capable d'exercer une activité antimicrobienne contre *E. coli* et *Ureaplasma urealyticum* de manière dose dépendante (Wang et al., 2012). Cette activité passe à la fois par une perméabilisation de la membrane et par une inhibition de la synthèse des macromolécules bactériennes.

- Chimiotiques

Les cytokines chimio-attractantes, ou chimiokines, sont des polypeptides de 70 à 100 acides aminés. Elles forment un ensemble complexe de molécules qui jouent un rôle clé dans l'inflammation en régulant le trafic et l'activation des cellules du système immunitaire. Elles sont regroupées en 5 sous-familles, dénommées CXC, CC, XC, CX3C, et CX en fonction de l'arrangement de leurs deux premiers résidus cystéine (Nomiyama et al., 2010).

Ces dernières années, il a été démontré que certaines chimiokines comme CXCL6 ou CXCL9 exercent une activité antimicrobienne de type défensine (Cole et al., 2001 ; Linge et al., 2008). Chez l'homme, ces deux chimiokines sont retrouvées de manière constitutive dans le tractus génital mâle (Collin et al., 2008 ; Linge et al., 2008). Dans le fluide séminal, CXCL6 et CXCL9 sont présentes de manière significativement plus importante chez des hommes fertiles que vasectomisés, démontrant une implication majeure du testicule et/ou de l'épididyme dans sa production. Cette observation est confirmée par la détection immunohistochimique de CXCL6 dans les cellules épithéliales du testicule, de l'épididyme et des vésicules séminales et de CXCL9 dans les cellules épithéliales du testicule, de l'épididyme et de la prostate. Enfin, les auteurs ont montré que CXCL6 et CXCL9 possèdent une activité antimicrobienne contre le

pathogène uro-génital *N. gonorrhoeae* à des concentrations similaires à celles retrouvées dans le fluide séminal.

- Lactoferrine

La lactoferrine est une glycoprotéine de liaison au fer, de la famille des transferrines. Elle est exprimée dans la plupart des liquides biologiques et constitue un élément majeur du système immunitaire inné des mammifères. Son effet protecteur va des activités antimicrobiennes directes contre un large éventail de microorganismes, y compris les bactéries, les virus, les champignons et les parasites, aux activités anti-inflammatoires et anticancéreuses. Le principal mécanisme par lequel elle exerce son action bactériostatique est la déprivation en fer. Sécrétée dans les fluides biologiques sous une forme non saturée (apo-lactoferrine), elle inhibe la croissance de bactéries par compétition avec les sidérophores bactériens pour la séquestration du fer libre (Legrand et al., 2008). La lactoferrine exerce également des activités bactériostatiques et bactéricides indépendantes de sa fonction de chélateur du fer. En effet, par sa capacité à se fixer directement au LPS, aux acides lipoteichoïques ou aux porines, la lactoferrine déstabilise la membrane des bactéries, provoque leur fragilisation et augmente leur perméabilité. L'activité bactériostatique de la lactoferrine passe également par l'inhibition de l'attachement des bactéries aux cellules hôtes (Legrand et al., 2008 ; Jenssen et al., 2009).

Plusieurs centaines de protéines épидидymaires ont été identifiées à partir du liquide épидидymaire de différentes espèces. Ces sécrétomes sont caractérisés par la présence de protéines à des concentrations élevées, et pas plus de 15-20 protéines représentent 60-80% des protéines luminales totales. Chez le bélier, le sanglier, l'étalon et l'homme, la lactoferrine fait partie de ces protéines surreprésentées (Dacheux et al., 2009). Chez l'étalon, elle représente 41,2% des protéines totales (Fouchécourt et al., 2000) et est retrouvée au niveau des cellules principales du corps et de la queue de l'épididyme, ainsi que sur les spermatozoïdes (Pearl and Roser, 2014). Chez le sanglier âgé de 2 à 8 mois, la lactoferrine est présente dans tout

l'épididyme au niveau du cytoplasme des cellules principales. Chez l'animal adulte, le marquage n'est plus présent dans la tête d'épididyme. Enfin, quel que soit l'âge, la protéine est retrouvée sur les spermatozoïdes (Pearl and Roser, 2008).

- Lysozyme

Le lysozyme est retrouvé dans un grand nombre de liquides biologiques et de tissus (Jolles and Jolles, 1984), incluant l'épididyme, la prostate, le testicule et le liquide séminal (Tauber et al., 1976). Le lysozyme catalyse la lyse des parois cellulaires des bactéries Gram+ en clivant la liaison entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine dans le peptidoglycane. Le lysozyme est moins efficace contre les bactéries Gram- malgré sa capacité à interagir fortement avec leur LPS et à le perturber (Ohno and Morrison, 1989). Cependant, les effets destructeurs du lysozyme sur les bactéries Gram - ne sont pas tous dépendants de l'activité enzymatique. Il a par exemple été montré qu'un pentadécapeptide dérivé du lysozyme et qui n'a pas d'activité muramidase, est capable de perméabiliser la membrane externe d'*E. coli*, d'inhiber la synthèse de l'ARN et de l'ADN bactérien et de provoquer la mort bactérienne (Pellegrini et al., 2000).

Plus récemment, 3 nouveaux gènes lysozyme-like (*LYZL2*, 4 et 6) ont été identifiés chez l'homme (Zhang et al., 2005). L'analyse par *Northern blot* et hybridation *in situ* met en évidence une expression de *LYZL2* et 6 majoritairement dans le testicule et l'épididyme et une expression de *LYZL4* exclusivement épididymaire. Cependant, aucune donnée n'est disponible quant à leur rôle potentiel dans l'immunité innée.

- Indoleamine 2,3-dioxygénase

L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) est la première enzyme limitante du catabolisme du tryptophane par la voie des kynurénines (Yamamoto and Hayaishi, 1967). IDO est une protéine cytoplasmique ubiquitaire activée par les interférons (IFN). Elle a été associée à

l'épididyme dès 1980, quand il a été montré que son activité était étonnamment élevée dans des extraits épididymaires (Yoshida et al., 1980). L'expression d'IDO dans l'épididyme s'est avérée constitutive et indépendante de son inducteur inflammatoire classique, l'IFN- γ (Takikawa et al., 1999). Plus récemment, une autre enzyme impliquée dans la première étape de dégradation du tryptophane a été identifiée (Ball et al., 2007 ; Metz et al., 2007). Cette enzyme possède 43% d'homologie avec IDO et a été appelée IDO2 ou INDOL (*indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein*). Chez la souris, IDO est fortement présente dans la tête de l'épididyme, mais n'est pas retrouvée dans le corps ou la queue de l'organe (Britan et al., 2006). Les analyses immunohistochimiques révèlent que l'accumulation d'IDO démarre postérieurement au segment initial de la tête de l'épididyme, est maximale dans les segments 2 à 4 et cesse après le segment le plus distal (S5), où l'expression est mosaïque (Jrad-Lamine et al., 2011). IDO est présente dans le cytoplasme des cellules principales et apicales mais n'est pas détectée dans la lumière (Britan et al., 2006).

Même si IDO est généralement considérée pour ses propriétés pro-toléroènes (qui seront développées dans la section IV-2-c de cette introduction), elle est également un effecteur antimicrobien grâce à son activité catabolique qui déprive l'environnement en tryptophane. En effet, à l'image des mammifères pour qui le tryptophane est un acide aminé essentiel, de nombreux autres organismes en sont dépendants (protozoaires, bactéries, virus). Par exemple, la déplétion en tryptophane provoque, *in vitro*, l'inhibition de la prolifération de *Toxoplasma gondii* (Pfefferkorn et al., 1984 ; Daubener et al., 1999), de différentes espèces de *Chlamydia* (Carlin et al., 1989 ; Pantoja et al., 2000) et du virus de la rougeole (Obojes et al., 2005). Cependant, les données *in vivo* quant au rôle d'IDO dans la lutte antimicrobienne sont plus contrastées et révèlent que l'action antimicrobienne est dépendante du pathogène (Divanovic et al., 2012).

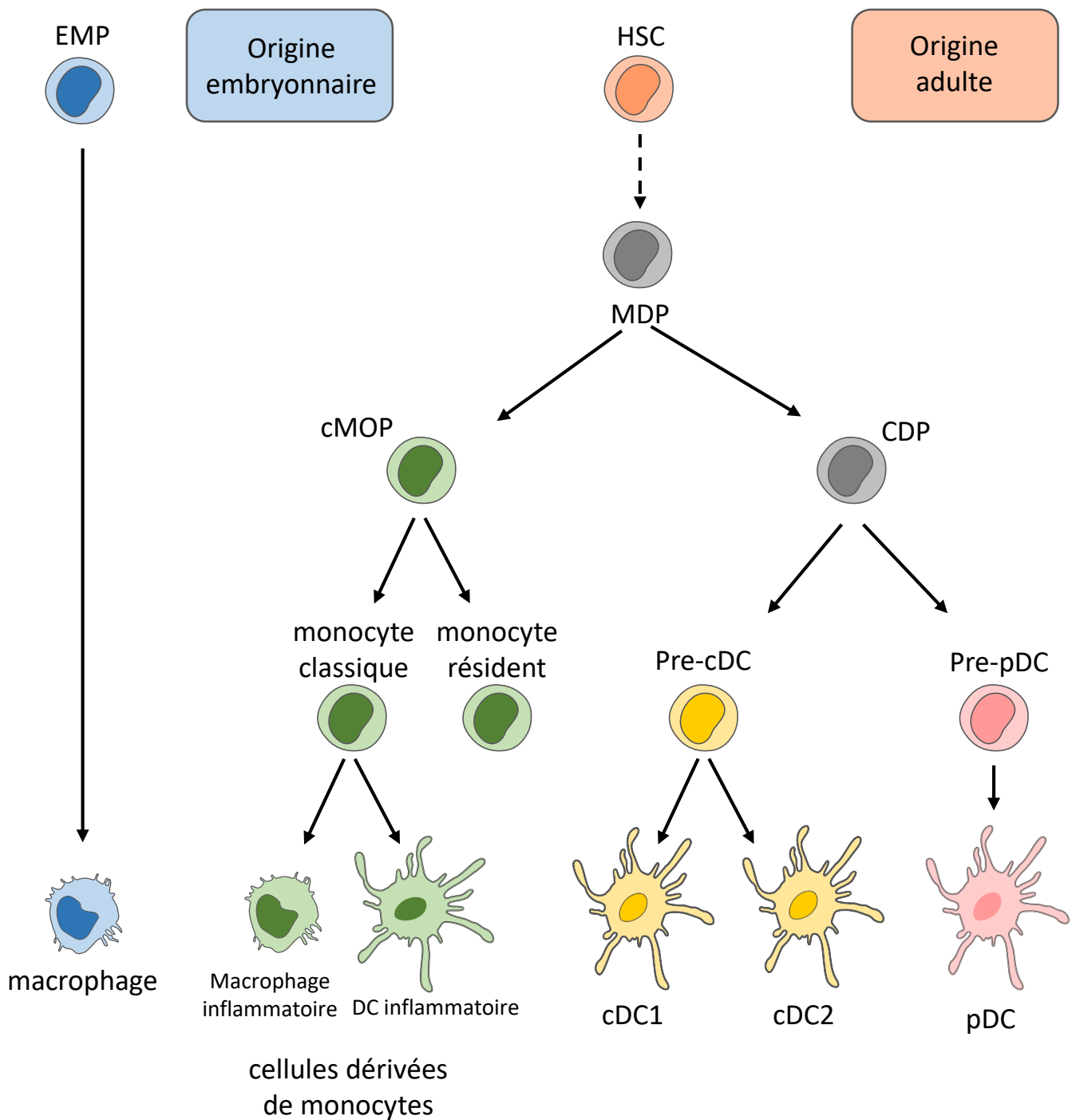


Figure 10 : Représentation schématique de l'ontogénie des phagocytes mononucléaires.

Le système des phagocytes mononucléaires regroupe les macrophages, d'origine embryonnaire et les monocytes et les cellules dendritiques, d'origine adulte.

HSC : *hematopoietic stem cell*, EMP : *Erythro-myeloid progenitor*, MDP : *monocyte and dendritic cell progenitor*, cMOP : *common monocyte progenitor*, CDP : *common dendritic cell progenitor*, cDC : *conventional dendritic cells*, Pre-cDC : *cDC precursor*, pDC : *plasmacytoid DC*, Pre-pDC : *pDC precursor*.

2. Les cellules immunitaires

a. Les phagocytes mononucléaires

La population des phagocytes mononucléaires est une population hétérogène regroupant les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Jusqu'à récemment, il était admis que les monocytes circulants donnaient naissance, dans les tissus, à la fois aux macrophages et aux cellules dendritiques (DCs). Des expériences de devenir cellulaire et de traçage de lignées ont bouleversé ce dogme (Ginhoux and Jung, 2014 ; Gomez Perdiguero et al., 2015 ; Guilliams et al., 2014 ; Hoeffel et al., 2015).

En effet, à l'état physiologique, la plupart des macrophages résidents des tissus proviennent de progéniteurs érythro-myéloïdes (EMP) qui ont été mis en place au cours du développement embryonnaire et qui s'auto-renouvellent localement (**Figure 10** ; Gomez Perdiguero et al., 2015).

Les monocytes, quant à eux, proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans la moelle osseuse adulte. Les HSC se différencient *via* plusieurs intermédiaires, en un progéniteur commun aux cellules dendritiques et aux monocytes, appelé MDP (*monocyte and dendritic cell progenitor*) (Fogg et al., 2006).

Le MDP donne naissance à un précurseur intermédiaire résidant dans la moelle osseuse appelé progéniteur commun aux monocytes (cMOP) (Hettinger et al., 2013). Ce progéniteur va donner naissance à deux sous-populations : les monocytes classiques (Ly6C^{hi}) et les monocytes non classiques ou résidents (Ly6C^{low}). Les monocytes non classiques restent principalement dans les vaisseaux sanguins où ils patrouillent et surveillent l'intégrité de l'endothélium. Les monocytes classiques peuvent être recrutés sur des sites inflammatoires et se différencier, en fonction du microenvironnement local, en macrophages ou DCs inflammatoires (Ginhoux and Jung, 2014).

Le MDP peut également se différencier en un progéniteur commun aux DCs appelé CDP (*common DC progenitor*). Le progéniteur CDP produit le pré-pDC (*plasmacytoid DCs [pDCs] precursor*) qui donne naissance aux pDCs, principalement impliquées dans l'immunité anti-virale *via* la production d'interférons de type I. Le CDP produit aussi un précurseur immédiat des DCs conventionnelles appelé pré-cDC (*conventional DC precursor*). Le précurseur pré-cDC est capable de migrer de la moelle osseuse vers les organes périphériques *via* la circulation sanguine pour donner naissance aux deux sous-populations de DCs conventionnelles (cDC) : les cDC1 et les cDC2 (Naik et al., 2007 ; Onai et al., 2007). Chez la souris, dans la plupart des organes non lymphoïdes, ces deux populations peuvent être distinguées sur la base de l'expression des marqueurs de surface CD103 (intégrine αE) et CD11b (intégrine αM). Les DCs CD103⁺, ou cDC1, sont spécialisées dans la cross-présentation, qui correspond à la présentation d'antigènes exogènes à des lymphocytes T CD8⁺ *via* les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I. Les DCs CD11b⁺ (et CD103⁻), ou cDC2, expriment des niveaux élevés de CMH de classe II et induisent la réponse T CD4⁺. Certains organes comme la peau ou l'intestin possèdent des populations particulières de DCs avec des marqueurs spécifiques (Guilliams et al., 2004 ; Schlitzer and Ginhoux, 2014).

- Macrophages épидидymaires

Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus représentées au sein de l'épididyme. Ils ont été mis en évidence chez l'homme (Wang and Holstein, 1983), le rat (Hooper et al., 1995 ; Flickinger et al., 1997 ; Serre and Robaire, 1999) et la souris (Nashan et al., 1989). Chez le rat, ils sont présents dans le compartiment interstitiel et dans l'épithélium, proches de la lame basale. Dans la tête de l'épididyme, les macrophages épithéliaux sont significativement plus nombreux que les macrophages interstitiels (Hooper et al., 1995 ; Flickinger et al., 1997 ; Serre and Robaire, 1999).

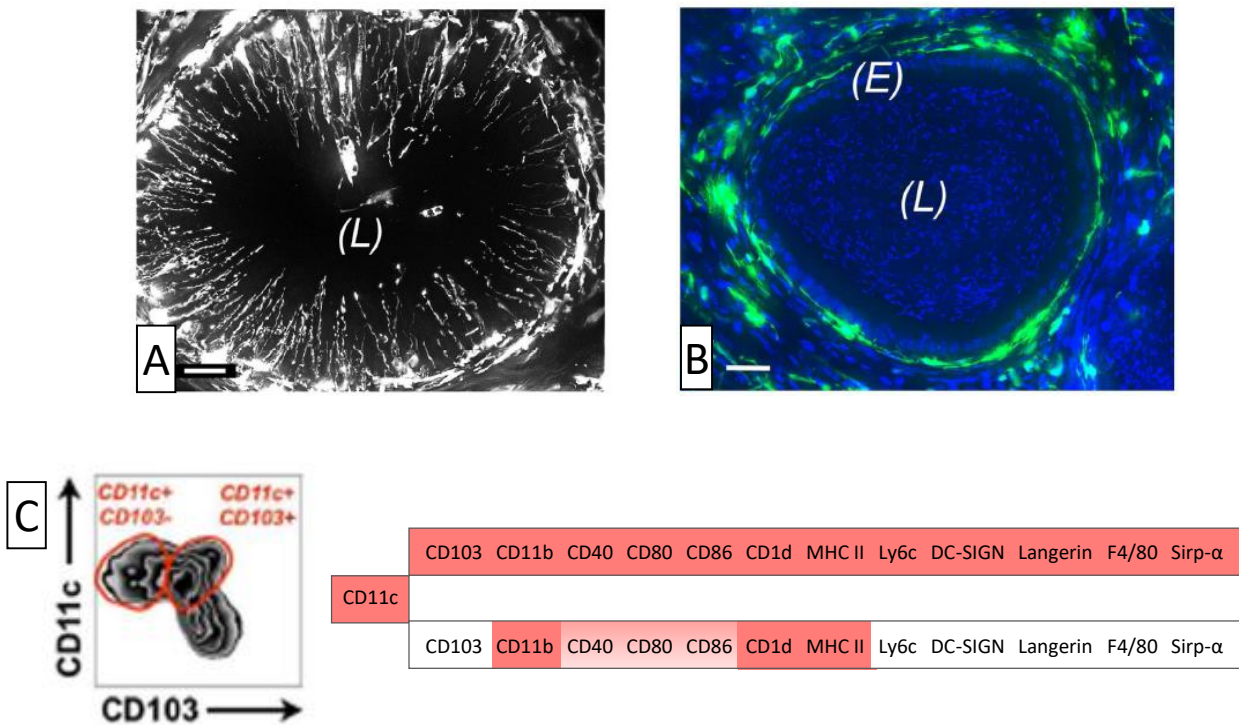


Figure 11 : Identification de cellules dendritiques dans l'épididyme murin.

A- Photographie du segment initial de l'épididyme de souris CD11c-EYFP montrant de nombreux prolongements cytoplasmiques en direction de la lumière ; échelle = 10µm.

B- Inversement, les DCs de la queue d'épididyme ne projettent pas de dendrite ; échelle = 10µm.

C- L'analyse par cytométrie en flux des marqueurs de surface exprimés par les DCs épididymaires révèle deux populations majoritaires : les DCs CD11c⁺ CD103⁺ (ligne supérieure) et les DCs CD11c⁺ CD103⁻ (ligne inférieure).

(L) : lumière, (E) : épithélium. *Da Silva et al., 2011*

Chez la souris, les macrophages sont majoritairement localisés au niveau péritubulaire mais sont également retrouvés dans l'interstitium et dans une moindre mesure dans l'épithélium. La distribution est équivalente entre la tête, le corps et la queue de l'organe (Nashan et al., 1989).

Chez l'homme, les macrophages ont été mis en évidence entre les cellules épithéliales épидидymaires (Wang and Holstein, 1983).

Quelle que soit l'espèce considérée, les macrophages ne sont jamais retrouvés dans la lumière de l'épididyme.

Dans la queue de l'épididyme, les macrophages pourraient être responsables de la phagocytose des spermatozoïdes en excès, vieillissants ou anormaux, hypothèse soutenue par l'augmentation du nombre de cellules épithéliales portant un marqueur macrophagique en présence de spermatozoïdes endommagés. Cependant, cette notion reste très controversée (Ritchie et al., 1984 ; Tomlinson et al., 1992 ; Seiler et al., 2000 ; Cooper et al., 2002).

- Cellules dendritiques épидидymaires

Des travaux récents ont révélé la présence, chez la souris, d'un réseau dense de cellules dendritiques (Da Silva et al., 2011). Elles sont présentes tout le long du tubule épидидymaire, avec une abondance particulière au niveau de la région proximale. Dans le segment initial, les DCs sont situées à la base de l'épithélium et émettent des projections cytoplasmiques entre les cellules principales atteignant ainsi le compartiment luminal (**Figure 11 A**). Dans le reste de l'organe, les DCs sont également situées à la base de l'épithélium mais n'émettent pas de projections (**Figure 11 B**). L'analyse par cytométrie en flux des marqueurs de surface exprimés par les DCs épидидymaires révèle la présence de deux populations majoritaires : les DCs CD11c⁺ CD103⁺ et les DCs CD11c⁺ CD103⁻ (**Figure 11 C**). Ces cellules dendritiques épидидymaires expriment les molécules du CMH de classe II et sont capables, *in vitro*, de présenter des antigènes et d'activer les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ (Da Silva et al., 2011). Cette découverte établit pour la première fois que des cellules de l'épithélium épидидymaire pourraient être douées d'une activité de présentation antigénique. Des DCs ont

également été détectées dans l'épididyme humain (Duan et al., 2015). Les auteurs ont pu mettre en évidence 3 populations de DCs, toutes immatures : les DCs CD11c⁺ et les DCs CD209⁺ apparaissent dans l'interstitium tandis que les DCs CD1a⁺ forment un réseau dans l'épithélium. Ils notent également l'absence de pDCs chez l'homme sain.

La distinction entre cellules dendritiques et macrophages est délicate du fait de la redondance de certains marqueurs membranaires entre ces deux populations. On sait par exemple aujourd'hui que des marqueurs comme F4/80 et CD11c, couramment utilisés dans la littérature comme marqueurs spécifiques des macrophages et des DCs respectivement, sont en fait exprimés par les deux types cellulaires (Geissmann et al., 2010). La caractérisation fine de ces populations ne peut donc pas reposer sur l'utilisation de marqueurs uniques et nécessite l'utilisation d'une combinaison complexe de marqueurs de surface. Da Silva et son équipe nuancent eux-mêmes leur découverte en utilisant le terme général de « phagocytes mononucléaires », population regroupant à la fois les cellules dendritiques et les macrophages dans leurs travaux ultérieurs (Shum et al., 2014 ; Smith et al., 2014).

b. Les lymphocytes

Les acteurs de l'immunité adaptative sont les lymphocytes T et B qui expriment des récepteurs spécifiques des antigènes : le récepteur des cellules T (TCR) et le récepteur des cellules B (BCR).

- Lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont capables de reconnaître directement les antigènes. Leur maturation est dépendante d'une part de l'engagement du BCR et d'autre part de la coopération avec les lymphocytes T auxiliaires. Une fois matures, ils sont impliqués dans l'immunité à médiation humorale *via* la production d'anticorps spécifiques de l'antigène rencontré. Les LB activés sont également des cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) capables d'activer les réponses T.

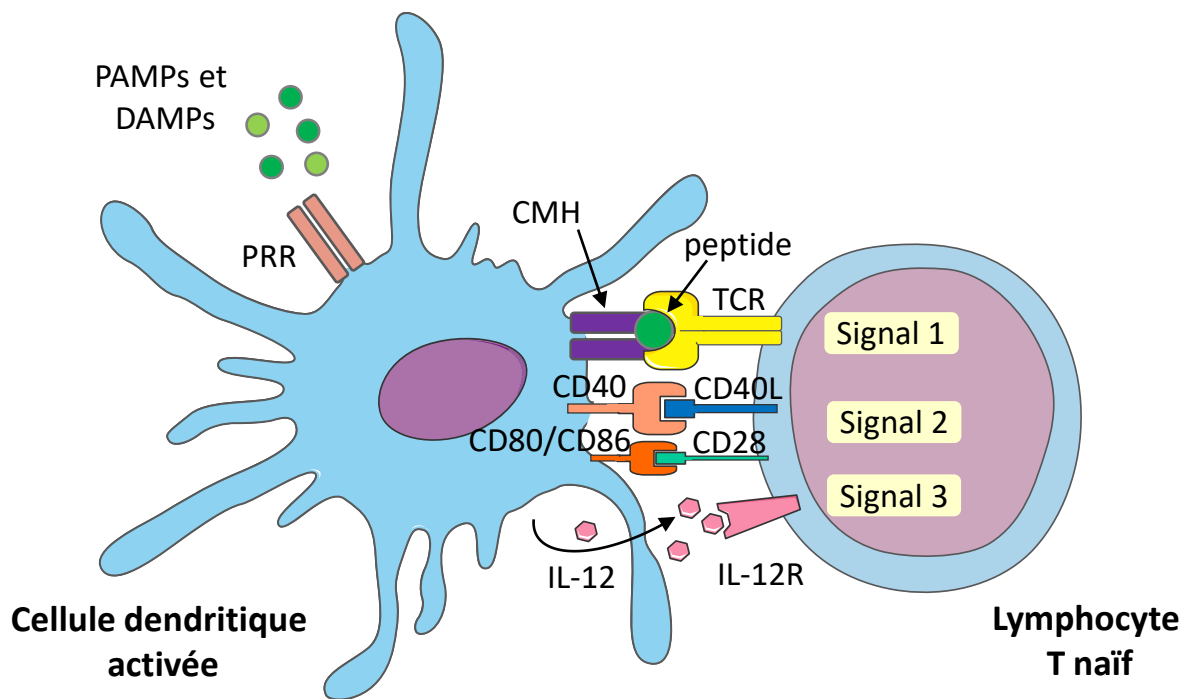


Figure 12 : Représentation schématique de l'activation d'un lymphocytes T naif par une cellule dendritique.

Trois signaux sont nécessaires pour activer les lymphocytes T (LT) naïfs. Le premier signal correspond à la reconnaissance spécifique du complexe CMH-peptide par le TCR du LT. Le second signal implique l'engagement de récepteurs de co-stimulation comme le CD40L et le CD28, illustrés sur ce schéma. Enfin, le troisième signal est un signal de différenciation pour le LT, en réponse aux cytokines produites par la cellule dendritique, comme l'IL-12, ou présentes dans le microenvironnement.

D'après Kambayashi and Laufer, 2014.

CD40L : CD40 ligand, DAMP : damage-associated molecular pattern, IL-12 : interleukine-12, IL-12R : IL-12 receptor, PAMP : pathogen-associated molecular pattern, PRR : pattern recognition receptor, TCR : T cell receptor, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité.

Les LB ne sont que très rarement retrouvés dans l'épididyme (Ritchie et al., 1984 ; Serre and Robaire, 1999). Chez le rat, ils sont localisés dans la région basale de l'épithélium épididymaire, jamais dans la lumière (Serre and Robaire, 1999).

- Lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) naïfs ne reconnaissent les antigènes que lorsqu'ils sont présentés sous forme de peptides antigéniques associés aux molécules du CMH à la surface des CPAg professionnelles, les cellules dendritiques (**Figure 12**). Si le TCR reconnaît spécifiquement le complexe peptide-CMH, une forte liaison est établie et le processus de sélection clonale peut débuter. Cette interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH, ou premier signal d'activation, donne un signal de spécificité puisque seuls les lymphocytes présentant un TCR donné seront activés. Cependant, ce premier signal d'activation n'est pas suffisant pour déclencher la prolifération et la différenciation du LT naïf en LT effecteur. Le deuxième signal nécessaire implique l'engagement de molécules de co-stimulation entre la DC et le LT. Ce signal est indispensable pour protéger le LT d'une anergie ou d'une apoptose précoce. Enfin, les LT empruntent différentes voies de différenciation en réponse à un signal de différenciation ou troisième signal (**Figure 12**). Ce signal est dépendant de la nature du pathogène, du contexte dans lequel se fait la présentation antigénique et de l'environnement cytokinique (Santana and Esquivel-Guadarrama, 2006).

En réponse à ce troisième signal, les LT CD4⁺, aussi appelés T *helper* (Th) ou T auxiliaires, se différencient en sous-populations effectrices caractérisées par l'expression d'un facteur de transcription spécifique et un profil de sécrétion cytokinique unique qui détermine l'orientation de la réponse (**Figure 13**).

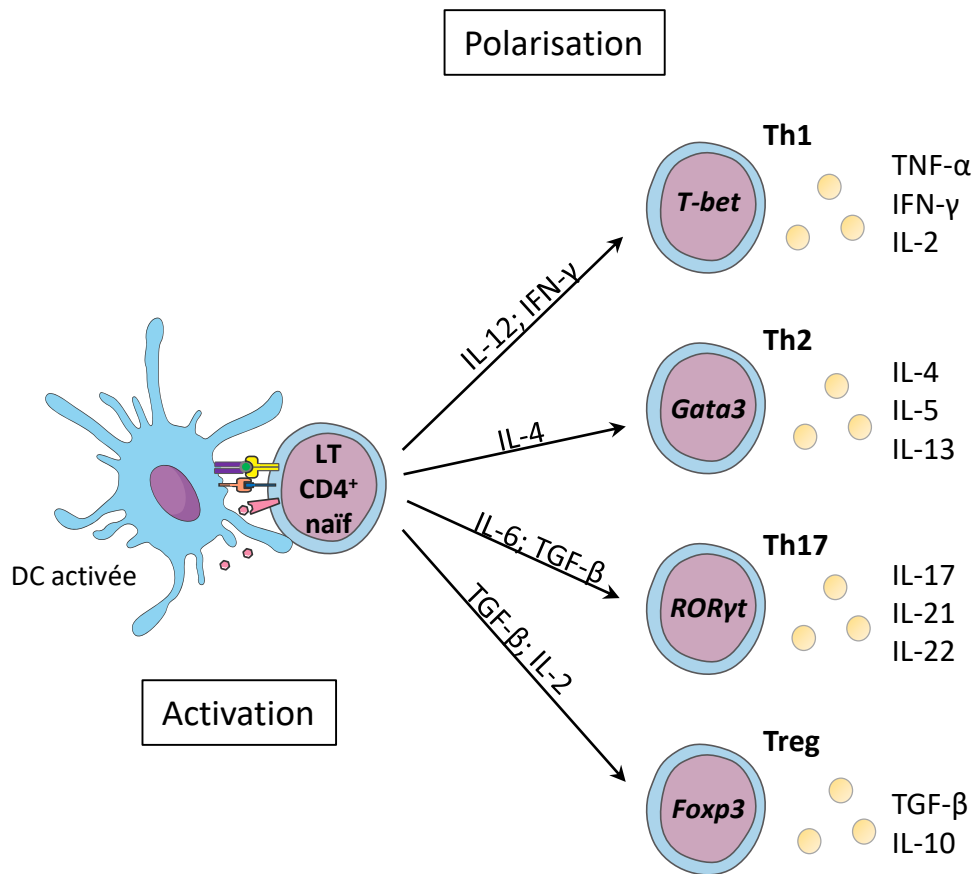


Figure 13 : Représentation schématique de la polarisation des LT CD4⁺.

Suite à son activation par une DC, le LT CD4⁺ naïf subit une polarisation vers une sous-population de LT auxiliaire (Th) particulière, en fonction de l'environnement cytokinique et de l'expression d'un facteur de transcription spécifique. Chaque sous-population de LTh est caractérisée par un profil cytokinique unique. Ne sont représentées sur ce schéma que les 4 sous-populations de LT CD4⁺ majoritaires. D'après *Leung et al., 2010*.

DC : cellule dendritique, Foxp3 : *forkhead box P3*, GATA3 : *GATA binding protein 3*, IFN : interféron, IL : interleukine, Treg : *regulatory T cell*, Tbet : *T-box transcription factor*, TGF : *transforming growth factor*, TNF : *tumor necrosis factor*, ROR : *RAR-related orphan receptors*.

A l'origine, seule la dichotomie entre les deux sous-populations T auxiliaires dites Th1 et Th2 était considérée comme déterminant la nature de la réponse immune, le développement de ces sous-populations étant mutuellement exclusif.

La lignée Th1 est prépondérante dans les réponses contre les pathogènes intracellulaires et dans l'immunité à médiation cellulaire. Le profil de sécrétion cytokinique est de type pro-inflammatoire (IL-2, IFN- γ , TNF- α [*Tumor necrosis factor-alpha*]). Les cellules Th1 agissent notamment sur les CPAg en augmentant leur capacité de phagocytose, leur production de médiateurs pro-inflammatoires ainsi que leur aptitude à présenter des antigènes et à activer des lymphocytes T naïfs.

Les lymphocytes Th2 sont quant à eux impliqués dans les réponses contre les pathogènes extracellulaires et dans l'immunité à médiation humorale (stimulation de la production d'anticorps par les LB). Ils sécrètent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13, l'IL-4 étant la cytokine qui permet l'engagement des T naïfs vers un phénotype Th2. La principale source d'IL-4 semble être les LT 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).

Plus récemment, d'autres sous-populations de LT CD4⁺ effecteurs ont été décrites. C'est notamment le cas des lymphocytes Th17, caractérisés par leur production d'IL-17, d'IL-21 et d'IL-22 (Harrington et al., 2005). Bien que le rôle de ces cellules n'est que partiellement élucidé, elles sont impliquées dans la lutte contre les infections bactériennes extracellulaires et fongiques et jouent un rôle dans le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée comme les polynucléaires neutrophiles. Les lymphocytes Th17 peuvent aussi être impliqués dans des maladies auto-immunes et inflammatoires (Bettelli et al., 2008).

La dernière sous-population bien caractérisée de LT auxiliaires est la sous-population des lymphocytes T régulateurs (Treg). Ils sont caractérisés par leur production de TGF- β et d'IL-

10, cytokines leur conférant leurs propriétés régulatrices ou immunosuppressives. Cette population sera développée dans la section IV-2-b.

A l'instar des Th1/Th2, les Treg et Th17 sont mutuellement exclusifs (Bettelli et al., 2006).

De nouvelles sous-populations de LT auxiliaires plus atypiques ont également été décrites. C'est notamment le cas des lymphocytes Th9 (Kaplan et al., 2015), Th3, Tr1 (Shevach, 2006), Th22 ou Th CTL (*cytotoxic T lymphocyte*) (Cheroutre and Husain, 2013). N'ayant jamais été décrites dans l'épididyme, elles ne seront pas développées dans cette introduction.

Les LT CD8⁺ sont eux aussi soumis à un troisième signal de différenciation qui conditionne l'acquisition de leurs fonctions. Plusieurs sous-populations de LT CD8⁺ sont décrites dans la littérature : les Tc1, Tc2, Tc17, Tc9 et CD8⁺ Treg (pour revue voir Mittrücker et al., 2014). Nous ne nous intéresserons ici qu'à la population Tc1, aussi connue sous le nom de LT cytotoxiques (CTL), seule sous-population décrite dans l'épididyme. Les CTL interviennent dans l'immunité à médiation cellulaire et jouent un rôle crucial dans la clairance des pathogènes intracellulaires (bactéries et virus). Ils sont capables de tuer spécifiquement les cellules portant l'antigène cible par trois voies distinctes. Deux de ces voies impliquent une interaction directe entre le CTL et la cellule cible, et la troisième est médiée par des cytokines telles que l'IFN- γ et le TNF- α . Le TNF- α se lie à son récepteur sur la cellule cible et déclenche la cascade de la caspase, conduisant à l'apoptose de la cible. L'IFN- γ induit la transcription des molécules du CMH de classe I et de Fas dans les cellules cibles, améliorant ainsi la présentation antigénique et la lyse des cellules cibles. L'activité cytotoxique nécessitant un contact direct entre le CTL et la cellule cible, pour induire sa mort par apoptose, peut être médiée par deux mécanismes distincts. Dans le premier cas, le ligand Fas qui est exprimé à la surface des CTL, se lie au récepteur Fas de la cellule cible. Cette liaison déclenche l'apoptose *via* les caspases. Dans le deuxième cas, le CTL libère de la perforine et des granzymes dans l'espace

intercellulaire induisant la lyse de la cellule cible par formation de pores membranaires (Andersen et al., 2006).

Les deux populations de lymphocytes T (LT CD4⁺ et LT CD8⁺) ont été caractérisées dans l'épididyme humain, murin et de rat à l'état physiologique. Dans l'épididyme humain, la plupart des lymphocytes intraépithéliaux sont des lymphocytes T CD8⁺ (Ritchie et al., 1984). Une analyse immunohistochimique plus poussée a mis en évidence qu'un grand nombre de ces cellules sont marquées pour les protéines TIA-1 ou granzyme B, révélant un potentiel cytotoxique (Yakirevich et al., 2002). Les LT CD4⁺ sont quant à eux retrouvés majoritairement dans le tissu interstitiel (Ritchie et al., 1984). Chez le rat, les LT CD4⁺ et CD8⁺ ont été identifiés tout le long de l'épididyme, avec une localisation préférentielle dans l'interstitium par rapport au compartiment intraépithélial (Hooper et al., 1995 ; Flickinger et al., 1997). Aucune des cellules immunitaires identifiées dans l'épididyme du rat n'a été trouvée dans la lumière (Serre and Robaire, 1999). À l'instar de l'épididyme humain et de rat, il a été démontré que l'épididyme murin contient des LT CD4⁺ et CD8⁺ (Nashan et al., 1989). Ils sont observés majoritairement dans l'interstitium mais jamais dans la lumière du tubule.

II. La réponse aux pathogènes

L'épididymite est une affection courante chez les hommes présentant une douleur uni- ou bilatérale aiguë et un gonflement du scrotum (Lorenzo et al., 2016). Aux Etats-Unis, 600 000 cas sont recensés chaque année, ce qui en fait la pathologie inflammatoire la plus fréquente du tractus uro-génital mâle (Trojian et al., 2009). L'inflammation peut se propager au testicule (épididymo-orchite), en particulier quand un traitement adéquat est retardé. Dans la majorité des cas, l'épididymite est d'origine infectieuse, avec une ascension bactérienne rétrograde (Pilatz et al., 2015b). Chez les hommes de 14 à 35 ans, tranche d'âge la plus touchée, l'épididymite est principalement causée par les bactéries sexuellement transmissibles *N. gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). Avant l'âge de 14 ans et après 35 ans,

l'épididymite est généralement causée par des bactéries uropathogènes comme les *E. coli* (Redfern et al., 1984).

Malgré la prévalence élevée de l'épididymite chez les hommes en âge de procréer, peu d'études sont disponibles sur l'impact de cette pathologie sur la qualité des gamètes (Dietz, 1960 ; Tozzo, 1968 ; Ludwig and Haselberger, 1977 ; Weidner et al., 1990 ; Osegbe, 1991 ; Lang et al., 2013). Leur analyse collective indique une détérioration profonde de la qualité du sperme (concentration, mobilité, morphologie) associée à une leucocytospermie prononcée dans la phase aiguë de l'infection. La guérison est observée 3 à 6 mois après le traitement antibiotique. Néanmoins, des oligozoospermies et azoospermies persistantes sont rapportées dans 40% des cas (Rusz et al., 2012). L'obstruction du canal épидидymaire pourrait en être la cause (Michel et al., 2016). De plus, compte tenu du fait que jusqu'à 60% des cas d'épididymite évoluent en épидидymo-orchite (Desai et al., 1986 ; Kaver et al., 1990 ; Pilatz et al., 2013), un impact négatif direct ou indirect sur la spermatogenèse peut être supposé (Dietz, 1960 ; Osegbe, 1991). Il apparaît donc crucial d'étudier les mécanismes complexes gouvernant l'immunité de l'épididyme en réponse à l'infection et à l'inflammation, ainsi que leur impact sur la fertilité. Ces études sont un pré-requis nécessaire au développement d'outils de diagnostic efficaces et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Comme nous venons de le voir, un nombre important d'acteurs du système immunitaire inné et adaptatif a été identifié dans l'épididyme. Cependant, leurs rôles lors d'une infection de l'organe reste pour la plupart non élucidés. La disponibilité d'échantillons humains étant très limitée, des modèles animaux d'épididymite bactérienne ont été établis pour caractériser les changements morphologiques et les voies moléculaires impliqués dans la pathogenèse des infections épидидymaires. Dans la plupart des cas, *E. coli* et *C. trachomatis*, bactéries Gram- et pathogènes les plus pertinents quant aux cas cliniques, sont injectés dans la lumière du canal déférent afin de simuler la voie d'entrée des infections ascendantes rétrogrades. Une méthode

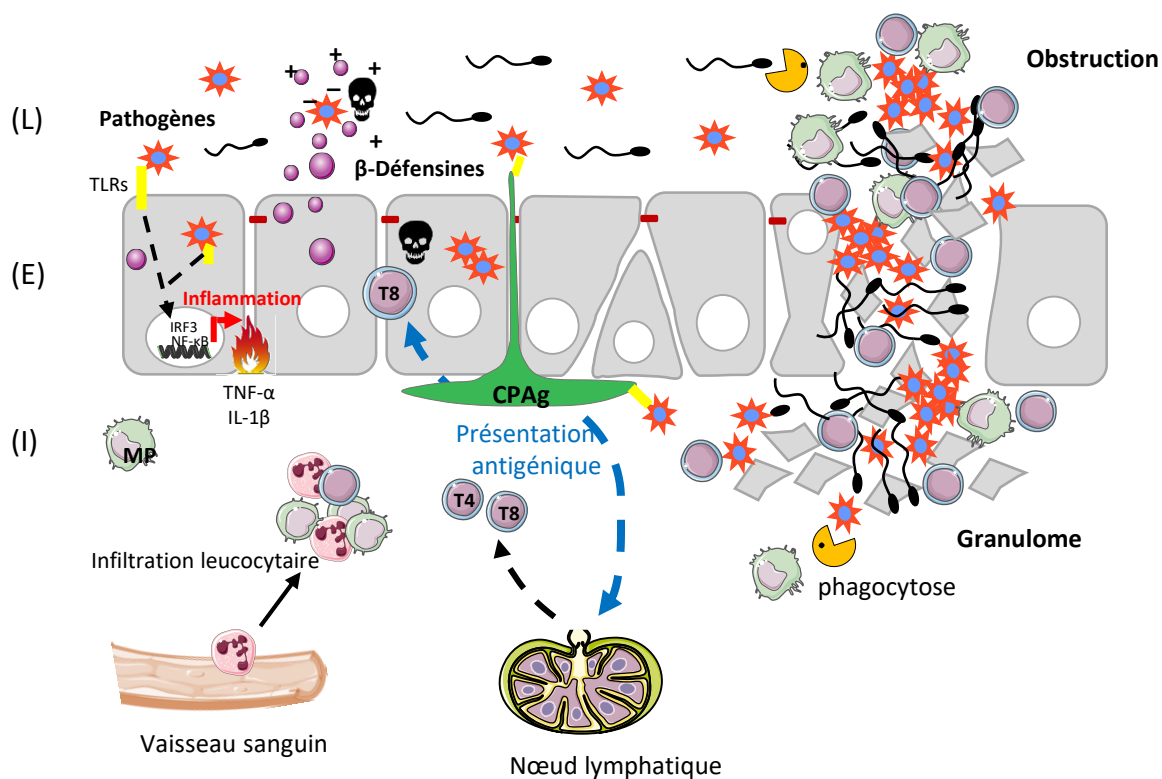


Figure 14 : Schéma hypothétique de l'organisation de la réponse aux pathogènes dans l'épididyme.

Le pathogène est reconnu par les TLRs exprimés par les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires épiddymaires, qui induisent alors une réponse inflammatoire. L'épithélium est également responsable de la synthèse de β -défensines qui sont capables de tuer le pathogène. La réponse inflammatoire locale se traduit par une infiltration leucocytaire et la formation de granulomes constitués d'amas de cellules immunitaires et de spermatozoïdes. Dans un second temps, une présentation antigénique peut avoir lieu, *in situ* ou dans le nœud lymphatique drainant, pour initier une réponse immunitaire adaptative classique *via* les LT effecteurs $CD4^+$ et $CD8^+$. Lorsque le système immunitaire échoue à contrôler l'infection, une obstruction du tubule due à des remodelages fibrotiques et la phagocytose des spermatozoïdes sont observées, induisant une infertilité.

(L) : lumière, (E) : Epithélium, (I) : Interstitium, TLR : *Toll-like receptor*, CPAg : cellule présentatrice d'antigène, MP: phagocyte mononucléaire, TNF : *tumor necrosis factor*, IL : interleukine, IRF : *Interferon regulatory factor*, NF- κ B : *nuclear factor-kappa B*.

alternative pour induire l'épididymite est l'administration de LPS, un composant structurel majeur de la membrane externe des bactéries à Gram -, en remplacement de bactéries vivantes (Michel et al., 2015).

En nous basant sur ces modèles expérimentaux, un schéma de la réponse aux pathogènes dans l'épididyme peut être établi (**Figure 14**).

1. La réponse innée

La première étape de la réponse immunitaire innée repose sur la reconnaissance des pathogènes et l'initiation de la réponse inflammatoire. Grâce à la présence de nombreux TLRs, l'épithélium épididymaire joue un rôle crucial dans ces mécanismes. L'épididyme de rongeur est capable de répondre à une infection par des pathogènes entiers ou des composants bactériens (LPS) en augmentant la synthèse de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-6 et les IFN de type I (Tanaka et al., 1995 ; Rodrigues et al., 2008 ; Zhu et al., 2015 ; Cheng et al., 2016 ; Michel et al., 2016). Il a été démontré, *in vivo*, que cette inflammation est médiée par la signalisation TLR (Cheng et al., 2016 ; Michel et al., 2016). En effet, des souris invalidées pour *Myd88* ou *Tlr4/5* ne sont plus capables d'initier cette réponse inflammatoire en réponse à une injection d'UPEC (*Uropathogenic E. coli*) dans l'épididyme.

Les β -défensines, constitutivement exprimées dans l'épididyme, jouent également un rôle clé dans la réponse innée aux pathogènes. L'impact de l'infection sur ces acteurs est très variable en fonction du modèle d'épididymite utilisé, des β -défensines impliquées mais également de la région de l'épididyme considérée. Chez le rat, l'épididymite induite par le LPS provoque une diminution de l'expression des ARNm de *Defb2*, *Defb21* et *Defb27* en tête d'épididyme, tandis que l'expression d'autres défensines telles que *Defb1*, *Defb24* et *Defb36* augmente (Cao et al., 2010 ; Biswas and Yenugu, 2011). A l'inverse, une augmentation des transcrits *Defb2* et *Defb27* est observée dans la queue de l'organe (Biswas and Yenugu, 2011).

Contrairement au modèle précédent, l'injection d'UPEC dans le canal épидидymaire du rat induit une augmentation des ARNm de *Defb21* via NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*, Biswas et al., 2015). Bien que les informations disponibles sur l'effet de l'infection bactérienne sur la synthèse des β -défensines par l'épithélium épидидymaire soient limitées, leur rôle protecteur a pu être démontré *in vivo*. En effet, l'administration intraveineuse de DEFB21 à des rats infectés par *E. coli* réduit significativement la charge bactérienne dans l'épididyme et s'avère plus efficace qu'un traitement antibiotique à la gentamycine (Biswas et al., 2015). De plus, la surexpression épидидymaire de Bin1b dans des souris transgéniques rend les animaux plus résistants à l'épididymite induite par *E. coli* et est capable de restaurer partiellement les paramètres spermatiques altérés par l'infection (Fei et al., 2012).

L'un des rôles de l'inflammation est de permettre le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection. Cette caractéristique est bien présente en cas d'épididymite où une infiltration leucocytaire est rapidement observée. Chez la souris et le rat, l'infiltrat, principalement composé de macrophages, de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes (Kuzan et al., 1989 ; Jantos et al., 1992 ; Tanaka et al., 1995 ; Turner et al., 2011 ; Cao et al., 2014), est souvent confiné à l'interstitium, mais peut également être observée dans la lumière du tubule (Ludwig et al., 2002 ; Kaya et al., 2006). Chez des hommes souffrant d'épididymite chronique d'origine bactérienne, un recrutement de macrophages activés est observé (Zheng et al., 2017). Ces derniers, lorsqu'ils se trouvent dans la lumière du tubule, sont capables de phagocyter les spermatozoïdes, ce qui pourrait en partie expliquer les oligozoospermies et asthénozoospermies observées chez les patients.

2. La réponse adaptative

Des cellules présentatrices d'antigènes sont retrouvées dans toutes les régions de l'épididyme (Da Silva et al., 2011 ; Duan et al., 2015). Dans la partie la plus proximale de l'épididyme murin, ces cellules émettent des projections en direction de la lumière (Da Silva et

al., 2011). Elles pourraient donc échantillonner le contenu luminal et présenter les antigènes (*in situ* ou dans le nœud lymphatique drainant) aux lymphocytes T. Les cellules dendritiques interstitielles retrouvées chez l'homme pourraient, elles, reconnaître le pathogène directement dans le milieu interstitiel ou dans la lumière, après destruction de la BHE. En retour, les lymphocytes activés pourraient participer à l'élimination des agents pathogènes, soit directement pour les LT cytotoxiques CD8⁺ (Yakirevitch et al., 2002), soit indirectement pour les LT auxiliaires CD4⁺. La mise en place de cette réponse immunitaire classique est soutenue par les données issues de modèles murins d'épididymite et des patients souffrant d'épididymite chronique. Chez la souris, l'épididymite bactérienne est suivie d'un recrutement interstitiel de macrophages, de cellules CMH II⁺, de LT auxiliaires et cytotoxiques (Nashan et al., 1993). Enfin, chez les hommes souffrant d'épididymite chronique un recrutement de cellules dendritiques matures (Duan et al., 2015), mais également de lymphocytes Th1 et Th17 est observé, signe qu'une réponse adaptative s'est mise en place (Duan et al., 2015 ; Zheng et al., 2017).

Le rôle du système immunitaire est de détecter et d'éliminer les éléments étrangers. Si ces éléments peuvent être, comme nous venons de le voir, des agents pathogènes, il peut également s'agir de cellules transformées ou cancéreuses.

III. L'immunité anti-tumorale

1. Le cancer de l'épididyme

Le cancer de l'épididyme est un cancer rare, qui ne représente que 0,03% des cancers masculins dans les pays occidentaux. A titre de comparaison, le cancer masculin le plus fréquent, le cancer de la prostate, représente 20% des cas (Yeung et al., 2012). De plus, le cancer de l'épididyme est dans la grande majorité des cas (environ 80%) un cancer bénin. La plupart de ces tumeurs bénignes (60-78%) ont une origine épithéliale (adénomes, cystadénomes

papillaires) mais des tumeurs d'origine musculaire (leiomyomes) ou adipeuse (lipomes) ont également été rapportées (Beccia et al., 1976 ; Ganem et al., 1998).

Les tumeurs épидидymaires malignes sont rares et existent sous forme de lésions primaires ou métastatiques. Elles comprennent des tératomes et autres tumeurs d'origine germinale, des léiomyosarcomes, des carcinomes épidermoïdes, des fibrosarcomes, des rhabdomyosarcomes, des carcinomes et des adénocarcinomes (Ganem et al., 1998). L'adénocarcinome de l'épididyme, qui est la forme de tumeur maligne la plus fréquente, ne représente qu'une quarantaine de cas dans la littérature. Parmi ces cas, seulement 21 avaient une origine primaire épидидymaire, ce qui illustre bien la rareté du cancer de l'épididyme (Jones et al., 1997 ; Ganem et al., 1998).

Chez l'homme, la protection contre les cellules cancéreuses repose à la fois sur des mécanismes non immunitaires et immunitaires. Dans l'épididyme, certains mécanismes non immunitaires, comme la présence de puissants mécanismes antioxydants, de suppresseurs de tumeurs actifs et d'oncogènes inactifs ont été mis en évidence. Une absence probable de cellules souches a également été évoquée comme mécanisme anti-cancéreux potentiel (Yeung et al., 2012). Une étude récente a montré que les cellules basales de l'épididyme de rat expriment des marqueurs de cellules souches adultes et peuvent se différencier *in vitro*, remettant en question cette hypothèse (Mandon et al., 2015). Cependant, d'autres études ont rapporté que les cellules basales ont un index mitotique très bas chez le rat adulte (Clermont and Flannery, 1970). La possibilité que les cellules basales puissent renouveler les cellules épithéliales épидидymaires dans des conditions particulières n'est pas exclue mais mérite des études complémentaires. Enfin, la présence de jonctions serrées et d'une combinaison de facteurs anti-angiogéniques contribuent à prévenir le développement de néoplasies (Yeung et al., 2012).

2. Immunité et cancer

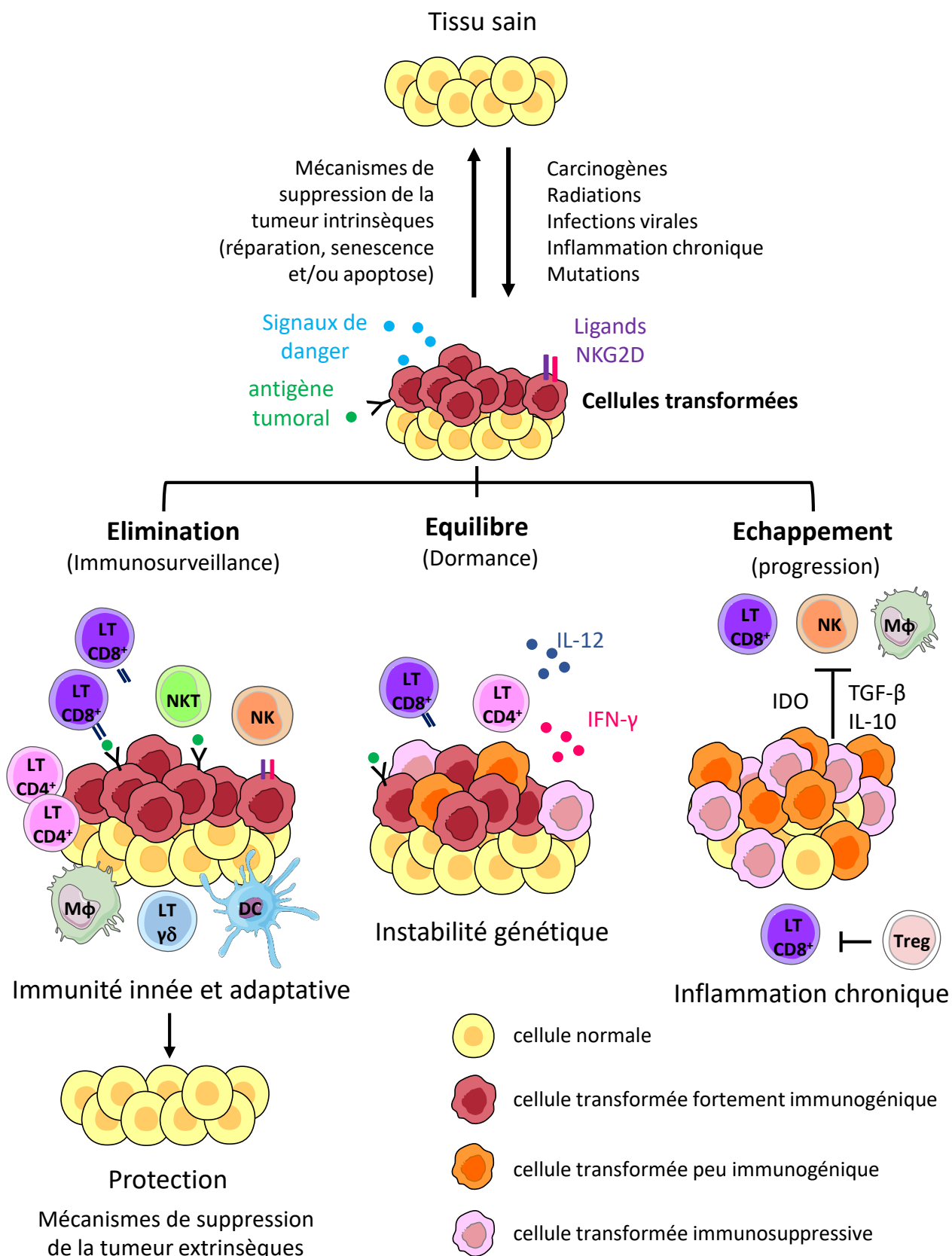


Figure 15 : Représentation schématique de l'immunoediting au cours de la tumorigénèse.

LT : lymphocyte T, Mφ : macrophage, NK : *natural killer*, NKT : *natural killer T cell*, DC : cellule dendritique, Treg : LT régulateur, IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase, TGF : *transforming growth factor*, IFN : interféron, IL : interleukine, NKG2D : *Natural Killer Group 2D*. D'après Vesely et al., 2011.

Le système immunitaire a trois rôles principaux dans la prévention des tumeurs. Premièrement, il peut protéger l'hôte contre les tumeurs induites par les virus en éliminant les infections virales.

Deuxièmement, la prise en charge rapide des agents pathogènes et la résolution de l'inflammation peuvent empêcher l'établissement d'un environnement inflammatoire propice à la tumorigenèse.

Enfin, le système immunitaire peut spécifiquement identifier et éliminer les cellules tumorales sur la base de leur expression d'antigènes tumoraux spécifiques. Ce troisième processus, appelé immunosurveillance du cancer, se produit lorsque le système immunitaire identifie les cellules transformées qui ont échappé aux mécanismes suppresseurs de tumeurs intrinsèques et les élimine avant l'établissement d'une tumeur maligne. Cependant, on sait maintenant que le système immunitaire exerce à la fois des effets protecteurs pour l'hôte et des effets sculptants sur les tumeurs en développement. Ces découvertes ont mené à l'évolution du concept d'immunosurveillance vers la notion plus large de «cancer immunoediting», qui décrit de manière plus appropriée les deux actions opposées du système immunitaire. L'immunoediting est considéré comme un processus dynamique composé de trois phases distinctes : l'élimination, l'équilibre et l'évasion (**Figure 15** ; Dunn et al., 2002).

a. La phase d'élimination

L'élimination est la phase durant laquelle les molécules et les cellules de l'immunité innée et adaptative travaillent ensemble pour détecter la présence d'une tumeur en développement et la détruire longtemps avant qu'elle ne devienne cliniquement apparente.

Dans la première phase d'élimination, la croissance invasive de la tumeur provoque des perturbations mineures dans les tissus environnants qui induisent des signaux inflammatoires. Ils conduisent au recrutement de cellules du système immunitaire inné (cellules NK [*Natural Killer*] et NKT, $LT\gamma\delta$, macrophages et DCs) au niveau de la tumeur (Smyth et al., 2000). Des

motifs sur les cellules transformées (exprimés à la suite du processus de transformation lui-même ou induits par la réponse inflammatoire) sont reconnus par les lymphocytes infiltrés (cellules NK et NKT, $LT\gamma\delta$) qui sont ensuite stimulés pour produire de l'IFN- γ (Yokoyama, 2000).

Dans la seconde phase, l'IFN- γ induit la mort des cellules tumorales (en quantité limitée) au moyen de mécanismes anti-prolifératifs (Bromberg et al., 1996) et apoptotiques (Kumar et al., 1997). Il induit également la production de chimiokines par les cellules tumorales et les cellules saines environnantes (Luster and Ravetch, 1987). Certaines de ces chimiokines ont des capacités angiostatiques puissantes qui bloquent ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein de la tumeur, conduisant à une mort cellulaire encore plus importante (Sgadari et al., 1996). Les débris de cellules tumorales sont ensuite ingérés par les DCs locales, qui migrent dans les ganglions lymphatiques drainants. Les chimiokines produites au cours du processus inflammatoire recrutent davantage de cellules NK et de macrophages sur le site.

Dans la troisième phase, les cellules NK et NKT, les $LT\gamma\delta$ et les macrophages tuent davantage de cellules tumorales par des mécanismes dépendant notamment de TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), des perforines/granzymes et des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote (Bancroft et al., 1991 ; Smyth et al., 2000 ; Takeda et al., 2002). Dans le ganglion lymphatique drainant, les cellules dendritiques nouvellement immigrées activent des $LT\ CD4^+$ spécifiques de la tumeur qui expriment alors l'IFN- γ ($LTh1$). Ces $LTh1$, à leur tour, facilitent le développement de cellules $T\ CD8^+$ spécifiques de la tumeur (Pardoll, 2002).

Dans la quatrième phase, les lymphocytes $T\ CD4^+$ et $CD8^+$ spécifiques des antigènes tumoraux migrent sur le site de la tumeur. Les $LT\ CD8^+$ devenus cytotoxiques détruisent les cellules tumorales *via* un mécanisme dépendant de Fas/FasL et du système perforine/granzyme (Russell and Ley, 2002).

Les cellules NK et NKT et les LT $\gamma\delta$ n'ont jamais été décrits dans l'épididyme. Néanmoins, nous avons pu voir dans la partie précédente que les CPAg (macrophages et DCs) ainsi que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sont retrouvés au sein de l'organe. Certaines données épidémiologiques suggèrent que ces cellules pourraient être efficaces dans l'immunosurveillance précoce de l'épididyme. En effet, la tête d'épididyme, où les CPAg forment un vaste réseau (Da Silva et al., 2011) et sont particulièrement actives dans la phagocytose des cellules apoptotiques (Smith et al., 2014), est moins affectée par les tumeurs que la queue de l'organe (Yeung et al., 2012). Ainsi, les données disponibles suggèrent qu'un mécanisme d'immunosurveillance « classique » pourrait être en place dans cette région.

b. La phase d'équilibre

Certaines cellules tumorales peuvent échapper à l'élimination et entrer dans une phase d'équilibre (**Figure 15**). Dans ce processus, les LT et l'IFN- γ exercent une pression de sélection puissante sur les cellules tumorales, suffisante pour contenir mais pas pour éradiquer la tumeur (Koebel et al., 2007). L'existence de la phase d'équilibre, ou dormance, a été initialement supposée pour expliquer la longue période de latence entre l'événement de transformation initial et l'apparition d'une maladie maligne (phase d'évasion). La phase d'équilibre est donc la plus longue des phases d'immunoediting et peut même perdurer tout au long de la vie de l'individu. Au cours de cette période, de nombreux variants de la tumeur originelle sont détruits mais de nouveaux variants peuvent apparaître suite à différentes mutations qui leur confèrent une résistance accrue aux attaques immunitaires (Vesely et al., 2011).

Etant donné que la dormance des cellules tumorales est maintenue par l'immunité adaptative, les LT CD4⁺ et CD8⁺ de l'épididyme pourraient également jouer un rôle dans l'établissement et le maintien d'une phase d'équilibre. Des données expérimentales soutiennent l'existence de la dormance des cellules transformées dans l'épididyme. En effet, l'organe est

naturellement résistant à la tumorigenèse et ne développe que des phénotypes d'hyperplasie/hypertrophie en réponse à des stimuli tumorigéniques, comme l'activation d'oncogènes, la délétion de gènes suppresseurs de tumeurs ou la surexpression de facteurs de croissance (Jhappan et al., 1992 ; Stöcklin et al., 1993 ; Guy et al., 1996 ; Gilbert et al., 1997 ; Korpelainen et al., 1998 ; La Perle et al., 2002 ; Sipilä et al., 2002 ; Bierie et al., 2003 ; Frew et al., 2008).

c. L'échappement tumoral

Durant la phase d'échappement (**Figure 15**), les variants tumoraux survivants qui ont acquis une insensibilité à la détection et/ou à l'élimination immunologique par des modifications génétiques ou épigénétiques, commencent à se développer de manière incontrôlée. Ils développent des mécanismes pour inhiber ou échapper à l'immunité par des moyens intrinsèques et extrinsèques. Les altérations intrinsèques au sein des cellules tumorales leur permettent d'échapper à l'immunité en régulant à la baisse la présentation antigénique, en régulant à la hausse les inhibiteurs de l'apoptose ou en exprimant des molécules de surface inhibitrices qui tuent directement les lymphocytes T cytotoxiques. De plus, les cellules tumorales sécrètent des facteurs qui inhibent les fonctions des cellules immunitaires effectrices ou recrutent des cellules régulatrices pour générer un microenvironnement immunosuppresseur. Une fois recrutées, les cellules régulatrices atténuent l'immunité antitumorale en libérant des cytokines immunosuppressives et en altérant la teneur en nutriments du microenvironnement. Ces mécanismes extrinsèques aboutissent à une maladie maligne cliniquement observable qui, si elle n'est pas contrôlée, entraîne la mort de l'hôte (Vesely et al., 2001).

De manière surprenante, l'épididyme est peu sujet à l'échappement tumoral alors qu'il est baigné dans un environnement immunosuppresseur imitant celui de la niche tumorale (cf. partie IV).

La rareté des cancers épидидymaires est un fait intrigant qui mériterait de plus grandes investigations. En effet, la compréhension des mécanismes par lesquels l'épididyme est capable d'échapper à la tumorigénèse pourrait être utile pour la conception et/ou l'amélioration de thérapies anticancéreuses.

Ainsi, le système immunitaire au sein de l'épididyme apparaît capable de gérer les infections et de contrôler le processus tumoral, même si les mécanismes exacts et les cellules impliquées ne sont pas encore bien définis. Dans le même temps, il doit mettre en place et maintenir un mécanisme opposé à la réponse immune, la tolérance, afin de gérer l'afflux massif et continu de spermatozoïdes.

IV. La tolérance immune aux spermatozoïdes

Les spermatozoïdes sont produits à la puberté, bien après l'établissement du répertoire du soi qui permet au système immunitaire de reconnaître les composés propres de l'individu afin de ne pas les détruire. Ainsi, les spermatozoïdes apparaissent comme étrangers (non soi) pour le système immunitaire et risquent d'être éliminés par ce dernier. L'Organisation Mondiale de la Santé définit les réactions auto-immunes contre les spermatozoïdes comme l'une des causes d'infertilité masculine. Elles se traduisent notamment par l'apparition d'auto-anticorps dirigés contre les spermatozoïdes. Les premières études faisant état d'anticorps anti-spermatozoïdes (AAS) dans des échantillons de sérum d'hommes infertiles datent de 1954 (Rumke, 1954 ; Wilson, 1954). Depuis, un grand nombre d'études ont été réalisées et les AAS ont été décrits chez 8 à 21% des hommes infertiles. Cependant, la présence d'AAS a également été détectée chez 1,2 à 19% des hommes fertiles, ce qui suggère que tous les AAS ne provoquent pas d'infertilité (Francavilla and Barbonetti, 2009 ; Krause, 2009 ; Vazquez-Levin et al., 2014). Ces données intrigantes sont à l'origine d'une controverse sur le rôle réel des AAS dans l'infertilité (Taylor and Collins, 1992 ; Helmerhorst et al., 1999). Néanmoins, de nombreuses études ont montré que les anticorps dirigés contre les spermatozoïdes peuvent avoir des effets

néfastes sur la fertilité en altérant différents processus. Ils peuvent en effet diminuer la motilité des spermatozoïdes par agglutination ou immobilisation, inhibant ainsi la migration des spermatozoïdes à travers les voies génitales femelles. Les AAS sont également capables d'altérer la capacitation et la réaction acrosomique et de bloquer l'interaction du spermatozoïde avec l'ovocyte. Enfin, le développement embryonnaire précoce peut être affecté par les AAS (pour revue voir : Francavilla et al., 2007).

1. Généralités

La tolérance compte deux versants complémentaires qui interviennent à différents moments de la vie de l'individu. La tolérance centrale est mise en place pendant la vie embryonnaire et fait référence aux processus par lesquels les cellules T potentiellement auto-réactives sont supprimées pendant la maturation thymique (Griesemer et al., 2010). Elle se décompose en deux étapes successives: la sélection positive puis la sélection négative. La sélection positive aboutit à l'élimination des LT portant des TCR qui ne se lient pas aux molécules de CMH autologues (du soi) ou au contraire, qui se lient avec une affinité trop élevée au CMH. La sélection positive donne naissance à une population de cellules T périphériques capables de reconnaître les molécules du CMH du soi, mais pas au point d'être activées par toutes les CPAg qu'elles rencontrent. La sélection négative expose les LT en développement à une large gamme de peptides du soi. Leur reconnaissance de ces auto-antigènes entraîne leur suppression. Ainsi, la sélection de LT qui expriment un TCR pouvant se lier au CMH du soi et l'élimination des LT auto-réactifs aboutit à une population de LT matures qui peut interagir efficacement et être activée par les CPAg présentant des peptides étrangers afin de les éliminer (Griesemer et al., 2010).

La tolérance périphérique a lieu dans les organes périphériques tout au long de la vie de l'individu et repose sur trois mécanismes de base : la délétion, l'anergie et la suppression des LT auto-réactifs. La délétion des lymphocytes auto-réactifs dans le thymus et à la périphérie est

réalisée par apoptose. L'anergie est un mécanisme au cours duquel le lymphocyte est intrinsèquement inactivé après sa rencontre avec l'antigène, mais reste en vie pendant une période prolongée, dans un état d'hyporéactivité. *In vivo*, elle est le plus souvent initiée dans les cellules T naïves après stimulation dans un environnement déficient en molécules de costimulation ou riche en molécules de co-inhibition (comme le CTLA-4 : *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, ou le PD-1 : *Programmed cell death 1*). Enfin, la suppression fait référence à la capacité de lymphocytes T régulateurs (Treg) à supprimer l'activation et/ou la fonction de lymphocytes T auto-réactifs (Xing and Hogquist, 2012 ; Mueller, 2010). Les spermatozoïdes apparaissant à la puberté, bien après l'établissement de la tolérance centrale, leur protection vis-à-vis du système immunitaire repose donc sur cette tolérance périphérique.

Ces mécanismes reposent sur l'action conjointe d'un nombre important de cellules immunitaires et de molécules immunorégulatrices. Certains de ces acteurs sont présents dans l'épididyme et sont détaillés ci-après.

2. Les acteurs épидидymaires

a. Les cellules dendritiques tolérogènes

En complément de leur rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire, les DCs peuvent jouer un rôle dans l'établissement de la tolérance périphérique. A l'origine, ce rôle était supposé uniquement médié par les DCs immatures qui, en l'absence de molécules de co-stimulation, ne pouvaient pas induire le second signal d'activation des LTs, induisant *in fine* leur anergie ou apoptose (Reis e Sousa, 2006). On considère maintenant les DCs tolérogènes comme une population à part entière, jouant un rôle actif dans l'établissement de la tolérance périphérique en participant notamment à la délétion et à l'anergie des cellules T et à l'induction de LTreg (Li and Shi, 2015).

Dans l'intestin, une population de DCs tolérogènes, exprimant le marqueur CD103⁺ a été décrite. Elles acquièrent les antigènes indirectement, *via* les cellules épithéliales ou les macrophages intraépithéliaux CX₃CR1⁺ [CX3C chemokine receptor 1], puis migrent vers le nœud lymphatique mésentérique où elles induisent le développement de LTreg (McDole et al., 2012 ; Mazzini et al., 2014). De manière semblable à l'intestin, la région proximale du canal épididymaire contient des cellules intraépithéliales CX₃CR1⁺ qui projettent un nombre important de dendrites en direction de la lumière (Da Silva et al., 2011). Les auteurs ont montré que ces cellules CX₃CR1⁺ sont de puissants phagocytes et pénètrent occasionnellement dans le compartiment luminal, ce qui suggère qu'elles peuvent directement prélever des antigènes solubles et des particules dans la lumière (Smith et al., 2014). Il est donc tentant de supposer que certaines cellules épididymaires peuvent acquérir directement des antigènes provenant de spermatozoïdes afin d'initier une réponse tolérogène, médiée par les cellules CD11c⁺ CD103⁺ également présentes dans l'épididyme (Da Silva et al., 2011). L'acquisition d'antigènes spermatiques pourrait également se produire *via* des mécanismes indirects impliquant les cellules épithéliales, ou par la modulation de la perméabilité de jonctions serrées apicales (Stammler et al., 2013). Cependant, la capacité des DCs CD11c⁺ CD103⁺ à induire la différenciation de LTreg dans l'intestin est associée à leur capacité à exprimer l'enzyme immunosuppressive IDO (Harden and Egilmez, 2012). Bien qu'IDO soit présente de manière constitutive dans l'épididyme murin, les observations immunohistochimiques n'ont pas révélé la présence de l'enzyme dans les DCs épididymaires (Jrad-Lamine et al., 2011 ; Britan et al., 2006 ; Da Silva, communication personnelle). Pour autant, l'IDO épididymaire par son activité de synthèse de métabolites actifs, les kynurénines, pourrait participer à la génération de DCs tolérogène. En effet, il a été montré qu'un phénotype tolérogène peut être acquis par des DCs dépourvues d'IDO fonctionnelle grâce à la présence de kynurénines dans le microenvironnement (Belladonna et al., 2007).

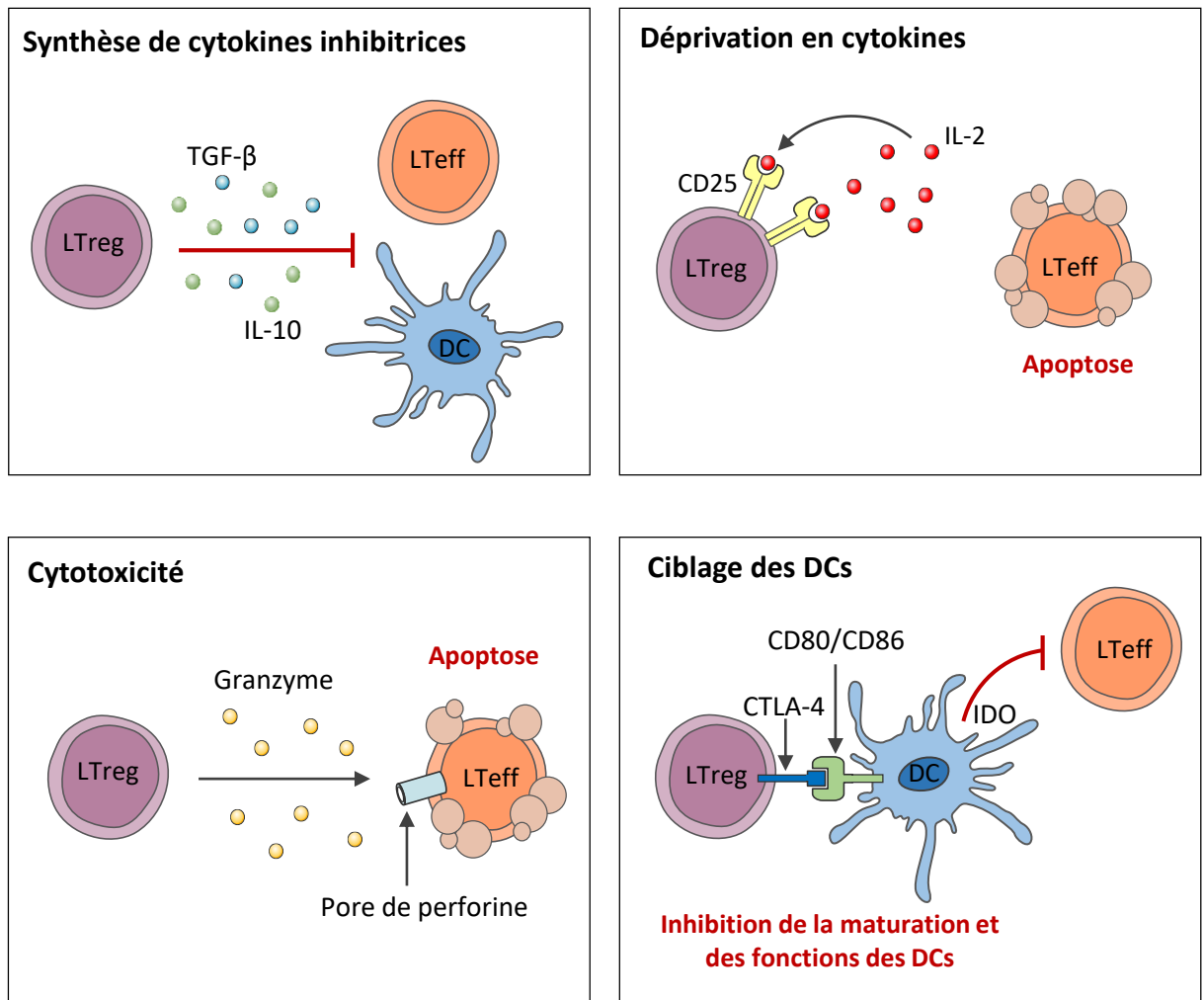


Figure 16 : Représentation schématique des modes d'action des iTreg.

Les iTreg exercent leurs fonctions *via* deux modes d'action : l'immunorégulation par la consommation ou la production de médiateurs solubles et l'immunorégulation *via* l'interaction directe avec les DCs ou les LT effecteurs. iTreg : lymphocyte T régulateur induit, DC : cellule dendritique, LTeff : lymphocyte T effecteur, CD40L : *CD40 ligand*, CTLA-4 : *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, IDO : *indoleamine 2,3-dioxygénase*, TGF-β : *transforming growth factor beta*, IL : *interleukine*.

D'après Vignali *et al.*, 2008

b. Les lymphocytes T régulateurs

La tolérance périphérique est requise pour inhiber les LT auto-réactifs qui auraient échappé à la sélection thymique, ou dirigés contre des néo-antigènes à tolérer comme les spermatozoïdes ou les antigènes alimentaires. Elle repose sur une population particulière de lymphocytes T, les LTreg qui peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leur ontogénie : les LTreg naturels (nTreg), qui sont des cellules CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (*forkhead box P3*) d'origine thymique, et les LTreg adaptatifs ou induits (iTreg) qui se développent à la périphérie à partir de LT CD4⁺ CD25⁻. Les nTreg possèdent des TCR dirigés contre des protéines du soi exprimées dans le thymus pendant l'établissement de la tolérance centrale. Ainsi, cette population, à l'inverse des iTreg, ne peut pas être impliquée dans l'établissement de la tolérance aux spermatozoïdes (Vignali et al., 2008).

L'un des acteurs clés de la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en iTreg est le TGF-β. Son rôle a été décrit pour la première fois par Yamagiwa, qui a démontré qu'il pouvait induire la différenciation de LT CD4⁺ humains naïfs en LT suppresseurs (Yamagiwa et al., 2001). D'autres études ont démontré que les LT CD4⁺ CD25⁻ de souris pouvaient être convertis en lymphocytes régulateurs CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ par stimulation de leur TCR en présence de TGF-β (Chen et al., 2003 ; Fantini et al., 2004). *In vitro*, les LT CD4⁺ convertis par le TGF-β possèdent une activité de suppression dépendante du contact cellulaire.

De façon générale, il existe deux modes d'action des LTreg : l'immunorégulation par la consommation ou la production de médiateurs solubles (principalement des cytokines) et l'immunorégulation *via* l'interaction directe avec les CPAg ou les LT effecteurs (CD4⁺ et CD8⁺) (**Figure 16**).

A l'état physiologique, les LTreg sont peu présents dans l'épididyme (Pierucci-Alves et al., 2018). Cependant, Wheeler et ses collaborateurs ont montré que les Treg contrôlent le devenir de la réponse (autoimmune vs tolerogène) à des antigènes spermatiques (Wheeler et al.,

2011). En effet, à l'aide d'un modèle de souris vasectomisées, ils ont pu mettre en évidence que l'extravasation des spermatozoïdes ne déclenche pas de rupture de tolérance chez des animaux sauvages. A l'inverse, le même modèle appliqué à des souris déficientes en LTreg montre l'établissement d'une réponse autoimmune caractérisée par l'apparition d'auto-anticorps. Ces données suggèrent donc un rôle des LTreg dans le maintien de la tolérance aux spermatozoïdes. Ce rôle pro-toléro-gène passe probablement par la synthèse de TGF- β puisque des souris incapables d'induire la signalisation TGF- β dans les DCs développent des granulomes et des AAS, malgré la présence de LTreg épидидymaires (Pierucci-Alves et al., 2018).

c. L'indoleamine 2,3-dioxygénase et les kynurénines

Il est rapidement apparu qu'IDO jouait non seulement un rôle dans l'immunité innée mais également dans l'immunité adaptative et l'établissement de la tolérance périphérique. En effet, le traitement de souris gestantes avec un inhibiteur pharmacologique d'IDO induit un rejet du fœtus par l'intermédiaire des LT. Ainsi, les cellules placentaires synthétisant l'IDO protègent le fœtus semi-allogénique d'une attaque par les LT maternels (Munn et al., 1998). La même équipe a par ailleurs prouvé que les cellules T naïves humaines et murines sont particulièrement sensibles à une déplétion locale en tryptophane. En effet, la prolifération des LT stimulés dans un milieu sans tryptophane est arrêtée en phase G1, avant l'entrée en phase S (Munn et al., 1999). Les mécanismes induisant cette anergie sont partiellement élucidés et impliqueraient la kinase GCN2 (*general control nonderepressible 2*), qui est activée par l'augmentation de la concentration intracellulaire en ARNt non chargés, suite à un apport insuffisant en acides aminés essentiels. Ainsi, la diminution de tryptophane dans l'environnement, par l'action d'IDO, induit l'activation de la voie GCN2 dans les cellules T, et leur entrée en anergie (Munn et al., 2005).

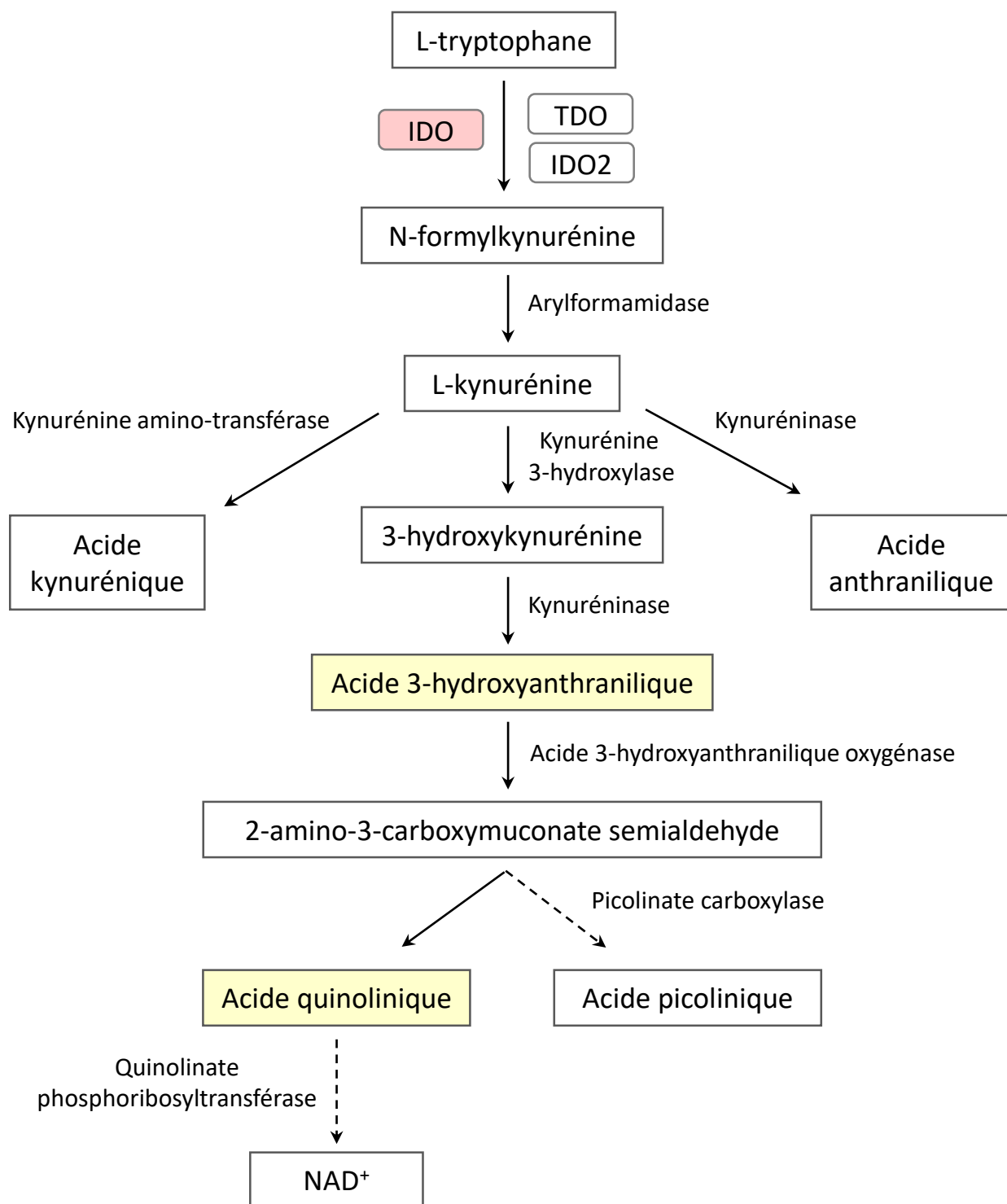


Figure 17 : Voie de synthèse des kynurénines.

Le catabolisme du tryptophane par la voie des kynurénines induit la synthèse de métabolites actifs comme l'acide 3-hydroxyanthranilique et l'acide quinolinique qui jouent un rôle dans l'induction de la tolérance.

NAD: nicotinamide adénine dinucléotide, IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase, TDO : tryptophane 2,3-dioxygénase. D'après Curti *et al.*, 2009.

L'utilisation de souris déficientes en *Ido1* (*Ido1*^{-/-}) a permis d'étudier son rôle dans l'établissement et/ou le maintien de la tolérance aux spermatozoïdes. Dans l'épididyme, l'absence d'IDO induit une inflammation locale et une modification des sous-populations de LT en faveur des LTh1 et LTh17 (Jrad-Lamine et al., 2013). Cependant, cela ne se traduit jamais par l'apparition de granulomes ou d'AAS, suggérant l'existence de mécanismes compensatoires.

L'induction de la tolérance par IDO passe également par son activité de synthèse de métabolites actifs *via* la voie des kynurénines (**Figure 17** ; Stone and Darlington, 2002). Parmi ces métabolites, l'acide 3-hydroxyanthranilique (3-HAA) et l'acide quinolinique (QUIN) ont un rôle reconnu. Ils induisent l'apoptose sélective des LTh1, mais pas des LTh2, par l'activation de la caspase-8 et la libération du cytochrome c par les mitochondries (Fallarino et al., 2002), mais également par des processus médiés par des radicaux oxygénés libres (Grohmann et al., 2003). Les LT CD8⁺, les LB et les cellules NK sont également sensibles à ces composés (Frumento et al., 2002 ; Terness et al., 2002).

Le 3-HAA est retrouvé dans la tête de l'épididyme murin, ce qui n'est pas le cas du QUIN (Jrad-Lamine et al., 2011).

d. L'IL-10

L'IL-10 a été initialement classée comme une cytokine spécifique des cellules Th2 avec une forte capacité à supprimer les réponses immunitaires Th1. Cependant, il est maintenant bien établi qu'une grande variété de cellules T (LTreg, LTh1, LTh17) et de CPAg (DCs, macrophages et LB) sont capables de produire de l'IL-10 au cours de la réponse immunitaire (Moore et al., 2001). L'IL-10 se lie à un récepteur hétérodimérique constitué des sous-unités IL-10R1 (sous-unité de liaison au ligand) et IL-10R2 (sous-unité accessoire pour la signalisation). La liaison au récepteur active la voie de signalisation Jak-STAT (**Figure 18** ;

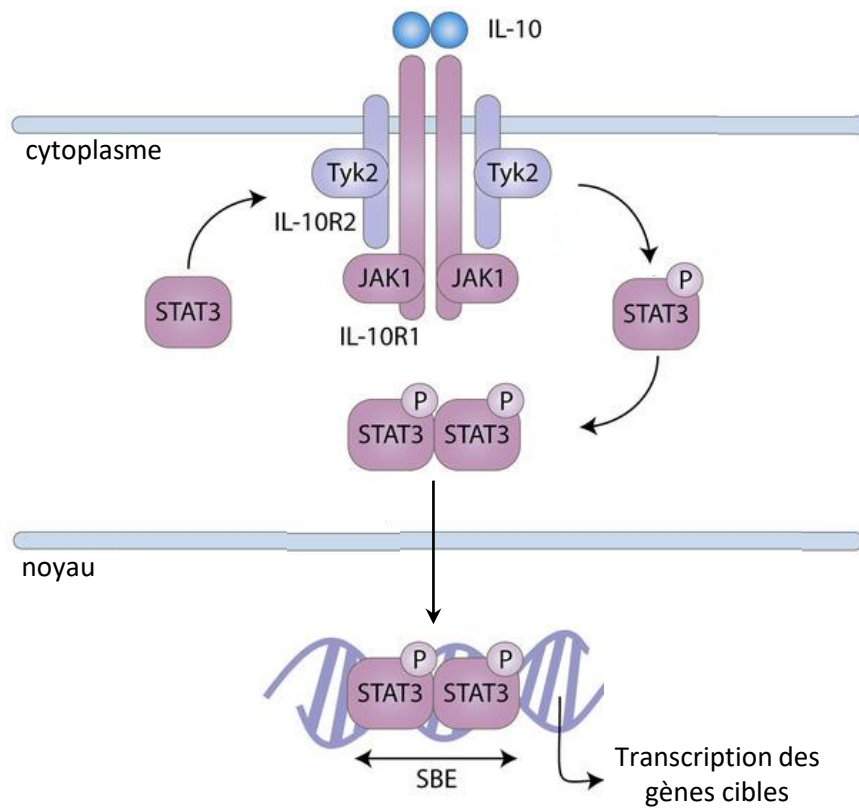


Figure 18 : Voie de signalisation de l'interleukine-10 (IL-10).

La liaison de l'IL-10 à la sous unité IL-10R1 de son récepteur active la phosphorylation de JAK1 et Tyk2. Ces kinases phosphorylent alors le domaine intracellulaire d'IL-10R1 qui devient un site d'ancrage transitoire pour STAT3 permettant ainsi sa phosphorylation par JAK1 et Tyk2. En réponse, STAT3 s'homodimérise et transloque dans le noyau pour induire l'expression de ses gènes cibles. D'après *Berti et al., 2017*.

Tyk : *tyrosine kinase*, JAK : *janus kinase*, STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*, SBE : *STAT binding element*.

Carey et al., 2012). Les effets immunosuppresseurs de l'IL-10 sont principalement médiés par la phosphorylation de STAT3 (Mittal and Roche, 2015).

De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer l'immunosuppression médiée par l'IL-10. Au niveau des CPAg, l'un des principaux mécanismes réside dans la capacité de l'IL-10 à altérer directement la signalisation TLR (Bhattacharyya et al., 2004 ; Chang et al., 2009 ; Curtale et al., 2013 ; Quinn et al., 2014). L'IL-10 peut également réduire l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6 (Rossato et al., 2012). De plus, l'IL-10 induit l'inhibition de la surexpression des molécules de co-stimulation CD80/CD86 à la surface des CPAg en réponse à un signal activateur (Ding et al., 1993 ; Mittal and Roche 2015) et peut affecter directement la formation des peptides antigéniques et l'assemblage du complexe peptide-CMH II (Bobadilla et al., 2013).

L'IL-10 exerce également des effets immunomodulateurs sur les lymphocytes T. Elle inhibe fortement la prolifération des LT CD4⁺ et leur production de cytokines *via* ses effets négatifs sur les fonctions des CPAg (de Waal Malefyt et al., 1991 ; Fiorentino et al., 1991). Elle affecte également la fonction des LT de manière directe, en inhibant leur production de cytokines et en diminuant leur capacité migratoire (de Waal Malefyt et al., 1993 ; Schandene et al., 1994 ; Jinqun et al., 2000). L'IL-10 a des effets inverses sur les LT CD8⁺ et stimule leur recrutement, leur activité cytotoxique et leur prolifération (Groux et al., 1998 ; Rowbottom et al., 1999 ; Santin et al., 2000). L'activation des lymphocytes T en présence d'IL-10 induit leur anergie, de façon irréversible (Groux et al., 1996). L'anergie induite par l'IL-10 peut être associée à l'induction d'une population de LTreg qui produisent des taux élevés d'IL-10 et peuvent supprimer les réponses spécifiques à l'antigène *in vitro* et *in vivo* (Groux et al., 1997 ; Asseman et al., 1999).

Dans l'épididyme murin, l'IL-10 est localisée au niveau des cellules principales, suggérant qu'elle pourrait être sécrétée dans l'espace interstitiel ou dans la lumière du tubule

(Verajankorva et al., 2002). Cependant, la cytokine n'a été décrite dans aucune autre espèce et aucune donnée n'est disponible quant à son rôle dans la tolérance aux spermatozoïdes.

e. Le TGF- β

- Généralités

La superfamille du *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) est composée d'une trentaine de membres, comprenant le TGF- β , les activines/inhibines, les *bone morphogenetic proteins* (BMPs), les *growth differentiation factors* (GDFs), NODAL et l'hormone anti-müllérienne (Chang et al., 2002). Le TGF- β est une molécule régulatrice ayant des effets pléiotropes sur la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaires. Il est impliqué dans de nombreux processus biologiques, notamment le développement, la cancérogenèse, la fibrose, la cicatrisation et les réponses immunitaires (Blobe et al., 2000).

Il existe trois isoformes du TGF- β chez les mammifères, TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, codées par trois gènes différents. Les fonctions des différentes isoformes semblent être similaires *in vitro*, mais la diversité des phénotypes des souris invalidées pour chaque isoforme suggère des fonctions distinctes *in vivo*. Environ la moitié des souris déficientes en *Tgf- β 1* meurent à l'état embryonnaire suite à un défaut de développement du sac vitellin (Dickson et al., 1995) et les survivantes meurent quelques semaines après leur naissance suite au développement d'une inflammation multi-organe incontrôlée (Shull et al. 1992 ; Kulkarni et al. 1993). Chez les individus déficients en *Tgf- β 2*, une létalité embryonnaire et périnatale due à des défauts développementaux sévères, notamment du cœur et des poumons, est observée (Sanford et al., 1997). Enfin, les souris déficientes en *Tgf- β 3* présentent des défauts de développement des poumons et du palais, engendrant la mortalité périnatale des souriceaux qui ne peuvent pas téter (Kaartinen et al., 1995 ; Proetzel et al., 1995). TGF- β 1 est l'isoforme prédominante dans le système immunitaire et possède de puissantes propriétés immunorégulatrices (Chang et al., 2002 ; Govinden and Bhoola, 2003).

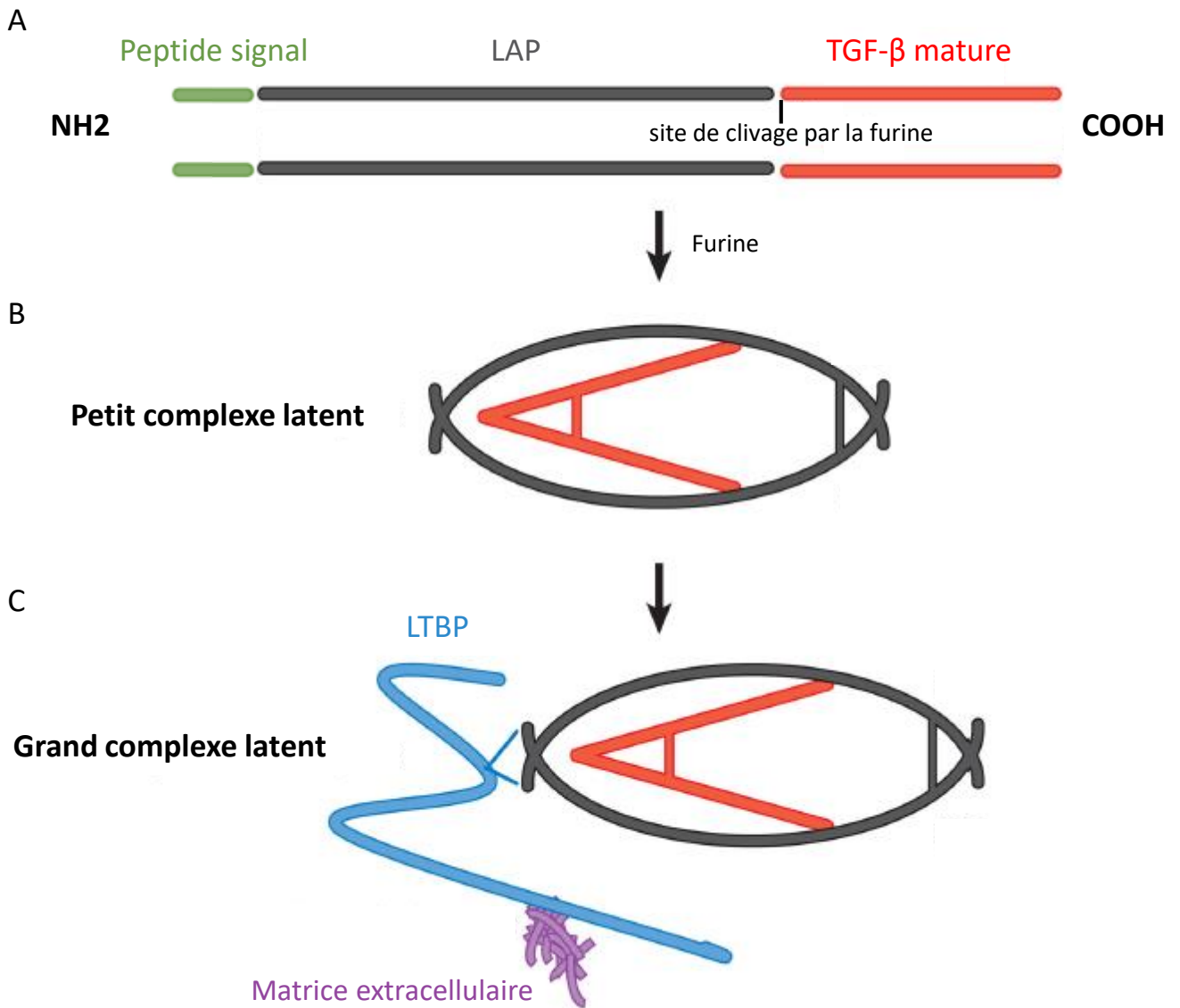


Figure 19 : Représentation schématique de la synthèse du TGF- β .

A- Le TGF- β est synthétisé sous la forme d'un précurseur comprenant un peptide signal, une grande partie N-terminale appelée *latency associated protein* (LAP) et un court fragment C-terminal, qui est la cytokine mature. B- Le LAP et le TGF- β mature sont clivés par l'enzyme furine mais restent associés de manière non covalente, formant le « petit complexe latent ». C- Dans certaines cellules, le « petit complexe latent » peut s'associer à la protéine LTBP (*latent-TGF- β -binding protein*), formant ainsi le « grand complexe latent ».

D'après Travis and Sheppard, 2014

Le TGF- β est synthétisé sous la forme d'un précurseur comprenant un peptide signal qui dirige la protéine vers le réticulum endoplasmique, une grande partie N-terminale appelée *latency associated protein* (LAP) et un court fragment C-terminal, qui est la cytokine mature (**Figure 19 A**). Après le retrait du peptide signal, le polypeptide transloque dans la lumière du réticulum endoplasmique, où il est clivé par l'endoprotéase Furine. Un homodimère de la protéine LAP est associé de manière non covalente à un homodimère de TGF- β mature. Ce complexe est connu sous le nom de TGF- β latent ou « petit complexe latent » (SLC, *small latent complex*) (**Figure 19 B** ; Munger et al., 1997). Le SLC peut être sécrété en tant que tel ou en association avec la protéine de liaison au TGF- β latent (*latent-TGF- β -binding protein*, LTBP) en tant que « grand complexe latent » (*large latent complex*, LLC) (**Figure 19 C**). Le LTBP joue un rôle important dans le ciblage du TGF- β vers la matrice extracellulaire (Annes et al., 2003). Le TGF- β ne peut pas se lier à ses récepteurs sous sa forme latente et doit être libéré des contraintes du LAP et du LTBP. *In vitro*, ceci peut être réalisé en utilisant des pH extrêmes, la chaleur ou des protéases (Annes et al., 2003). *In vivo*, les mécanismes d'activation sont moins clairs, mais plusieurs modèles ont été proposés, y compris l'activation protéolytique par la transglutaminase, des changements conformationnels de LAP *via* l'interaction physique avec la thrombospondine, et des tractions mécaniques *via* les intégrines $\alpha\beta 6$ des cellules épithéliales (Nunes et al., 1995 ; Crawford et al., 1998 ; Munger et al., 1999).

- Signalisation

Le TGF- β induit ses fonctions biologiques *via* sa liaison à des récepteurs sérine/thréonine kinase transmembranaires de type I et II. Bien que plus de 35 membres de la famille TGF aient été identifiés, seulement cinq récepteurs de type I (*activating receptor like kinase*, ALK) et sept récepteurs de type II ont été identifiés (Chang et al., 2002). Le TGF- β médie ses fonctions principalement *via* les récepteurs TGF- β I (TGF- β RI) ou ALK5 et TGF- β RII (**Figure 20**). Les formes actives du TGF- β engagent initialement le TGF β RII. Le TGF-

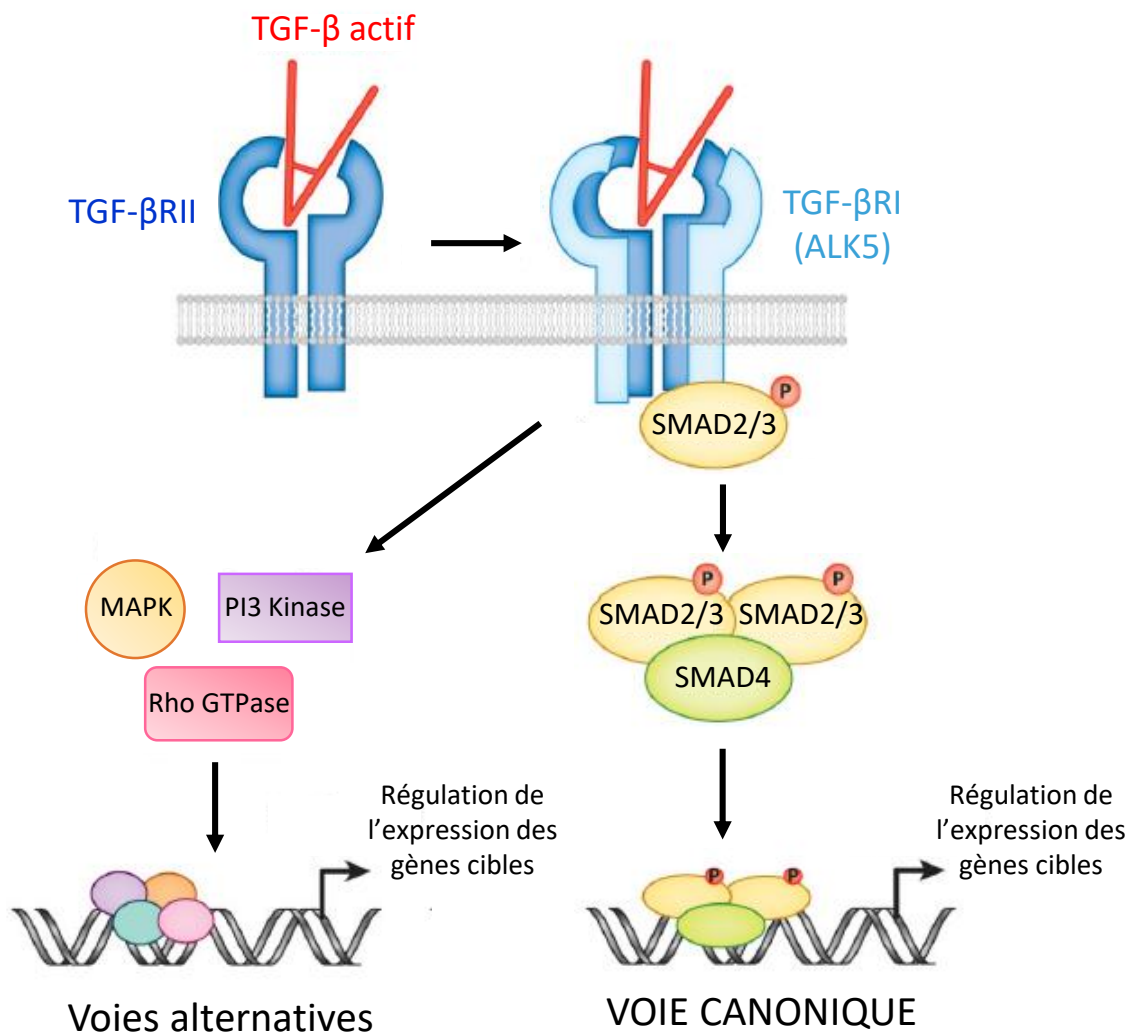


Figure 20 : Voie de signalisation simplifiée du TGF- β .

Le TGF- β actif se lie à un dimère de TGF- β RII, qui s'associe à un dimère de TGF- β RI pour former un complexe de récepteur tétramérique. Le TGF- β RII phosphoryle alors le domaine cytoplasmique du TGF- β RI, ce qui active son activité kinase. Le TGF- β RI peut alors s'associer à et phosphoryler SMAD2 ou SMAD3, qui forment ensuite un complexe avec Smad4. Le complexe Smad activé agit alors pour moduler l'expression des gènes cibles en se liant à ses éléments de réponse. Cette voie est la voie de signalisation canonique du TGF- β mais l'activation du récepteur peut également déclencher une signalisation non dépendante des Smads (par exemple *via* MAPK, Rho GTPases, ou PI3 kinase) pour réguler l'expression génique. D'après *Travis and Sheppard, 2014*.

TGF- β : *transforming growth factor beta*, TGF- β R : *TGF- β receptor*, MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*, PI3 kinase : *phosphoinositide 3-kinase*, GTPase : *Guanosinetriphosphatase*

$\beta 1$ et le TGF- $\beta 3$ se lient au TGF β RII avec une haute affinité, mais une forte liaison du TGF- $\beta 2$ à ce récepteur ne se produit qu'en présence de bétaglycane (TGF β RIII) lié à la membrane (López-Casillas et al., 1993 ; Brown et al., 1999). Bien qu'ALK5 ne soit pas requis pour la liaison initiale du TGF- β , il est nécessaire pour la signalisation. Un dimère de TGF- β actif se lie au complexe récepteur tétramère ALK5/TGF β RII pour initier la signalisation cellulaire (**Figure 20** ; Massague, 1998). Dans les cellules endothéliales, le TGF- β peut utiliser un récepteur de type I alternatif, ALK1, mais son implication dans les fonctions des cellules immunitaires reste inconnue (ten Dijke and Hill, 2004). La signalisation du TGF- β a été caractérisée comme une voie assez linéaire où la liaison du ligand amène le récepteur de type II à proximité du récepteur de type I puis l'active. Le récepteur activé induit la phosphorylation des protéines intracellulaires SMADs qui transloqueront dans le noyau pour induire la transcription de leurs gènes cibles (Massague, 1998 ; Huse et al., 2001). Les 8 SMADs identifiées à ce jour chez les vertébrés sont regroupés en trois catégories : 5 SMADs associées aux récepteurs (R-SMAD1, 2, 3, 5, et 8), une SMAD commune (Co-SMAD4), et 2 SMADs inhibitrices (I-SMAD6 et 7). Les R-SMADs sont séquestrées dans le cytoplasme en l'absence de signalisation. Lors de la phosphorylation par ALK5, R-Smad2 et 3 s'associent à Co-SMAD4 et transloquent dans le noyau pour se lier à leurs éléments de réponse (*Smad-binding element*) (Massague, 1998). Bien que Co-Smad4 facilite la translocation nucléaire des R-SMADs, celle-ci peut se faire de manière indépendante de Co-SMAD4 (Liu et al., 1997). Contrairement aux R-SMADs, I-Smad7 n'est pas phosphorylée lors de l'activation du TGF- β (Nakao et al., 1997). I-Smad7 supprime la signalisation du TGF- β par au moins deux mécanismes distincts : la compétition avec les R-SMADs pour la liaison à ALK5 et le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase Smurf qui dégrade ALK5 (Kavsak et al., 2000). La transduction du signal dépendante des SMADs représente la voie de signalisation du TGF- β la mieux comprise et est généralement appelée voie «canonique». Cependant, des voies de signalisation alternatives comme les voies

MAP kinases, PI3 kinase, and Rho GTPases peuvent être activées par le TGF- β (**Figure 20** ; Mu et al., 2012). L'importance de ces voies dans la régulation des fonctions des cellules immunitaires reste à établir.

- Actions sur les cellules immunitaires

Le TGF- β est capable d'exercer ses fonctions immunomodulatrices sur la quasi-totalité des leucocytes. Son rôle dominant dans le système immunitaire est d'induire la tolérance mais le TGF- β régule également positivement les réponses immunes en recrutant les leucocytes pendant la phase initiale de la réponse ou en favorisant la survie des lymphocytes T. L'activité finale du TGF- β est influencée par le microenvironnement. A titre d'exemple, des cytokines comme l'IL-10 favorisent le rôle pro-toléro-gène du TGF- β alors que des molécules comme l'IFN- γ , le CD28 ou le CD40 contre-carrent cette action suppressive (Li et al., 2006). Il est donc concevable qu'à l'état physiologique, l'environnement immunosuppresseur de l'épididyme favorise l'action toléro-gène du TGF- β pour protéger les spermatozoïdes de toute réponse auto-immune. Nous ne développerons ici que les effets du TGF- β sur la tolérance immune avec un accent particulier sur les lymphocytes T et les DCs mais une vision plus globale est présentée dans la revue très complète de Li et ses collaborateurs (Li et al., 2006).

Les lymphocytes

Le TGF- β affecte la prolifération, la différenciation et la survie des lymphocytes T (Cerwenka and Swain, 1999 ; Gorelik and Flavell, 2002). Il est capable d'inhiber la prolifération des cellules T en diminuant l'expression de la cytokine mitogène des LT, l'IL-2, et en ciblant directement des acteurs du cycle cellulaire (Ruegamer et al., 1990). Par exemple, le TGF- β bloque l'expression de c-myc, de la cycline D2 et de la cycline E dans des lignées de cellules T (Genestier et al., 1999 ; Nelson et al., 2003), ainsi que l'expression de cdk4 dans les LT CD4⁺ primaires (Wolfrain et al., 2013). Bien que le TGF- β inhibe la prolifération des cellules T naïves, il a un effet minimal sur les cellules T activées (Cottrez and Groux, 2001).

Le TGF- β joue également un rôle important dans la régulation de la différenciation des LT (Gorelik and Flavell, 2002). Plusieurs rapports montrent que le TGF- β empêche le développement des LTh2 en inhibant l'expression de GATA-3, facteur de transcription clé de leur différenciation (Gorelik et al., 2000 ; Heath et al., 2000). Il est également capable de bloquer la différenciation des LTh1 en diminuant l'expression du récepteur $\beta 2$ de l'IL-12 (IL-12R $\beta 2$) et du facteur de transcription T-bet (Gorham et al., 1998 ; Gorelik et al., 2002). En plus de son rôle sur les LT CD4⁺, le TGF- β inhibe efficacement la différenciation des LT CD8⁺. Des études ont montré que les LT CD8⁺ activés en présence de TGF- β n'acquièrent pas les fonctions des lymphocytes T cytotoxiques (Ranges et al., 1987), ce qui est probablement dû à l'inhibition de l'expression de la perforine (Smyth et al., 1991). Le TGF- β inhibe également l'expression du ligand Fas (FasL) dans des lignées de cellules T (Genestier et al., 1999), affectant ainsi l'apoptose dépendante des récepteurs de mort.

Enfin, le TGF- β joue un rôle dans la mise en place et le maintien des iTreg en induisant l'expression du facteur de transcription *Foxp3* dans les LT CD4⁺ CD25⁻ (Chen et al., 2003).

Les cellules dendritiques

In vitro, le TGF- $\beta 1$ est capable d'inhiber la maturation des DCs. En effet, des DCs différenciées à partir de progéniteurs hématopoïétiques ou de monocytes humains en présence de TGF- $\beta 1$, possèdent un phénotype immature caractérisé par la localisation majoritairement intracellulaire du CMH II et l'expression à de faibles niveaux de CD1d et des molécules costimulatrices CD80, CD83 et CD86 (Geissmann et al., 1999 ; Ronger-Savle et al., 2005). Ces observations sont confirmées chez la souris, où le TGF- $\beta 1$ inhibe la maturation des DCs dérivées de cellules de moelle osseuse (Yamaguchi et al., 1997).

Le TGF- β est également capable de modifier la capacité de présentation antigénique des DCs. L'inclusion de TGF- β dans une culture de DCs stimulées par du LPS inhibe l'expression des

molécules du CMH II et des molécules de costimulation, ce qui atténue *in fine* la fonction de présentation antigénique des DCs. De plus, la maturation des DCs et leur production d'IL-12 induites par les cytokines inflammatoires IL-1 et TNF- α , sont inhibées par le TGF- β (Geissmann et al., 1999).

- TGF- β et épидидyme

Tgf- β 1 et *Tgf- β 3* sont exprimés dans toutes les régions de l'épididyme de rat. La protéine TGF- β 1 est retrouvée dans la tête, le corps et la queue de l'organe mais exclusivement sous sa forme latente. A l'inverse, TGF- β 3 est détectée sous sa forme active, uniquement dans le corps de l'épididyme. Enfin, *Tgf- β 2* n'a pas été mis en évidence, quelle que soit la région considérée (Desai et al., 1998). Une autre étude a décrit le TGF- β 1 et l'un de ses récepteurs, TGF- β RII, dans l'épididyme du ouistiti (Bomgardner et al., 1999). Alors que le TGF- β 1 a été trouvé dans les cellules apicales de la tête et du corps de l'épididyme, son récepteur a été retrouvé dans les cellules principales des mêmes régions, suggérant un mode d'action paracrine. Enfin, l'épididyme de souris exprime *Tgf- β 1* à des taux élevés dans la tête et le corps (Oh et al., 2016). Finalement, le rôle du TGF- β dans la tolérance aux spermatozoïdes a été démontré dans l'épididyme murin (Pierucci-Alves et al., 2018). Plus précisément, grâce à l'utilisation de souris invalidées pour le *Tgf- β RII* dans les DCs (*Tgfbr2^{ADC}*), les auteurs rapportent que la signalisation TGF- β dans ces cellules est cruciale pour l'immunotolérance aux spermatozoïdes. En effet, les animaux *Tgfbr2^{ADC}* développent une inflammation sévère de l'organe caractérisée par l'apparition de granulomes et d'infiltrats leucocytaires ainsi qu'une perte de tolérance aux spermatozoïdes révélée par l'apparition d'AAS. Cependant, les auteurs n'ont pas montré quelle(s) isoforme(s) du TGF- β est(sont) impliquée(s) dans cette tolérance.

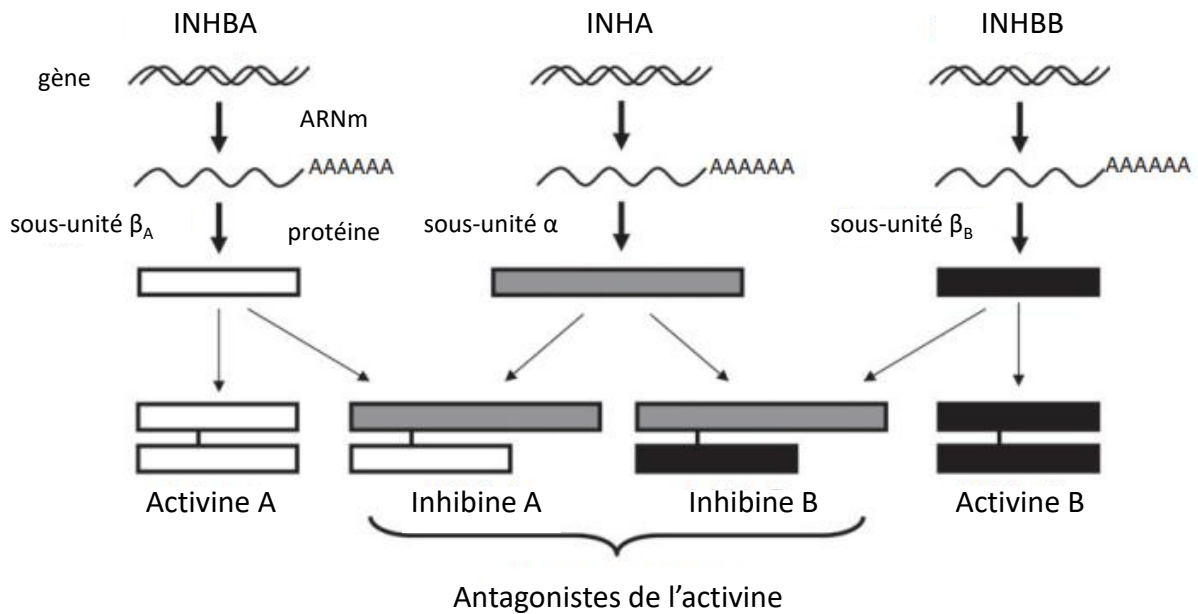


Figure 21 : Représentation schématique de la synthèse des activines et des inhibines.

L'activine A est formée d'un homodimère de la sous-unité de l'inhibine β_A , codée par le gène *Inhba*. L'activine B est formée d'un homodimère de la sous-unité de l'inhibine β_B , codée par le gène *Inhbb*. Enfin, l'association de la sous-unité de l'inhibine α , codée par le gène *Inha*, et de la sous-unité β_A ou β_B forme l'inhibine A ou B respectivement.

D'après Hedger et al., 2011

f. L'activine A

Les activines sont des membres de la superfamille du TGF- β . Ce sont des protéines dimériques composées de deux sous-unités β , tandis que les inhibines, leurs antagonistes fonctionnels, sont des hétérodimères d'une sous-unité β et d'une sous-unité α . Trois formes d'activine ont été décrites, l'activine A ($\beta A \beta A$), l'activine B ($\beta B \beta B$) et l'activine AB ($\beta A \beta B$) (**Figure 21**). De manière similaire au TGF- β , l'activine se lie d'abord à un récepteur sérine/thréonine kinase de type II qui se complexe à un récepteur de type I avant d'induire une voie de signalisation classique *via* la phosphorylation des SMADs.

La majorité des informations disponibles sur le rôle des activines dans la réponse immune concernent l'activine A, mais des données récentes suggèrent que l'activine B jouerait un rôle similaire (Rosendahl et al., 2001 ; Dohi et al., 2005 ; Patella et al., 2006). Leurs rôles dans l'inflammation et l'immunité sont loin d'être complètement compris. Au début de l'inflammation, l'activine A favorise la réponse, et le blocage de son activité peut réduire l'inflammation et l'induction de la fibrose. Cependant, l'activine A possède également un rôle important dans le maintien de l'immunorégulation et de la tolérance (Hedger et al., 2011). Elle peut inhiber la croissance et la survie des LB normaux et transformés (Nishihara et al., 1993 ; Brosh et al., 1995 ; Zipori and Barda-Saad, 2001), mais également l'activation et la prolifération des LT thymiques et périphériques (Hedger et al., 1989 ; Hedger and Clarke, 1993 ; Karagiannidis et al., 2006), tout en favorisant le développement des LTreg (Huber et al., 2009 ; Semitekolou et al., 2009). Enfin, un certain nombre d'études suggèrent que l'activine A est également capable d'inhiber la maturation des DCs (Robson et al., 2008 ; Segerer et al., 2008).

Chez l'homme, les sous-unités βA et βB ont été mises en évidence au niveau des cellules épithéliales de la tête et de la queue de l'épididyme (Bahathiq et al., 2005). Les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence la présence d'inhibine α chez l'homme, contrairement à l'ovin chez qui la protéine est retrouvée dans la tête et la queue de l'organe (Veeramachaneni et al., 1989).

Les ARNm des inhibines α , β A et β B sont retrouvés dans toutes les régions de l'épididyme de singe, avec une localisation préférentielle au niveau de la tête (Zhang et al., 1997). Enfin, les activines A et B ont été retrouvées dans l'épididyme murin (Winnall et al., 2013 ; Wijayarathna et al., 2018). Pour le moment, le rôle fonctionnel de ces acteurs dans l'établissement et/ou le maintien de la tolérance aux spermatozoïdes dans l'épididyme n'est pas connu mais leur présence dans plusieurs espèces suggère leur implication potentielle.

Projet de recherche

Un couple sur six dans le monde rencontre des difficultés à concevoir un enfant. Un tiers de ces infertilités est exclusivement d'origine masculine, dont 10% à 15% ont une cause immunologique comme des inflammations chroniques et/ou aiguës répétées des organes reproducteurs ou des réactions auto-immunes. Les inflammations sont généralement causées par des infections bactériennes qui conduisent fréquemment à des dommages tissulaires et spermatiques, et cela même après un traitement adapté.

L'épididyme, organe clé de la fertilité masculine est l'organe du tractus uro-génital mâle le plus touché par ces inflammations. Il doit donc être en mesure de combattre les pathogènes ascendants de manière efficace tout en protégeant ou tolérant les spermatozoïdes. En effet, ces cellules sont produites à la puberté, bien après l'éducation du système immunitaire au soi, et elles portent des protéines de surface uniques au lignage germinal. Les spermatozoïdes sont donc des cibles potentielles pour le système immunitaire qui ne les connaît pas et risque de les éliminer, induisant alors une infertilité. Au sein de l'épididyme, le système immunitaire fait donc face à une situation paradoxale dans laquelle un équilibre immun entre réponse et tolérance doit être mis en place. Du fait de l'idée communément admise, mais aujourd'hui révolue, que le testicule confère son immunité à l'ensemble du tractus génital mâle, un retard de connaissances sur l'immunobiologie de l'épididyme s'est accumulé.

La première partie de mon projet de recherche s'est ainsi intéressée à la caractérisation fine des cellules immunitaires présentes, à l'état physiologique, dans l'épididyme murin. Ce travail est un prérequis nécessaire à la compréhension des mécanismes mis en place dans l'organe en terme de réponse aux pathogènes et de tolérance aux spermatozoïdes.

L'utilisation de la cytométrie en flux nous a permis de quantifier les populations précédemment identifiées mais surtout, grâce à l'utilisation d'une combinaison de marqueurs de surface importante, de caractériser de manière non équivoque les différentes populations de phagocytes

mononucléaires. Ce travail a également mis en évidence des populations de lymphocytes inédites dans l'organe, que nous avons localisées par immunofluorescence.

La deuxième partie de mon projet s'est intéressée à l'étude d'un facteur clé de la tolérance aux spermatozoïdes, le TGF- β . Bien que la signalisation TGF- β soit requise dans les cellules dendritiques épидидymaires pour le maintien de la tolérance aux spermatozoïdes peu d'informations sont disponibles sur la présence des isoformes de cette cytokine et de ses récepteurs dans l'organe ou sur la nature des cellules qui les produisent. Nous avons donc étudié le profil d'expression/localisation de chaque isoforme et de leurs récepteurs par des approches moléculaires et histologiques dans les différentes régions de l'épididyme murin. Ce travail a mis en avant une intéressante distribution différentielle des 3 isoformes au sein de l'organe suggérant qu'elles pourraient jouer des rôles distincts dans la physiologie épидидymaire.

Résultats

Présentation de la première publication

JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY

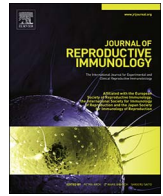
Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: Unexpected populations arise

Au sein de l'épididyme le système immunitaire fait face à une situation paradoxale. En effet, il doit être en mesure de combattre les pathogènes ascendant, tout en tolérant les spermatozoïdes qui lui sont étrangers. Une altération de cet équilibre est impliquée dans le développement d'une infertilité d'origine immunologique, qui représente 10 à 15% des cas d'infertilité masculine. Cependant, les cellules et molécules impliquées dans l'immunité épидидymaire restent largement méconnues.

Ce premier article propose une analyse poussée des populations de cellules immunitaires présentes à l'état physiologique dans la tête et la queue de l'épididyme murin.

L'utilisation de la cytométrie en flux nous a permis de caractériser de manière non équivoque les sous-populations de monocytes, cellules dendritiques et macrophages. Nous avons également mis en évidence, pour la première fois, des LB, des LT $\gamma\delta$ et des LT double négatifs dans l'épididyme murin. Ces lymphocytes ont été localisés par immunofluorescence et sont retrouvés préférentiellement dans l'interstitium, quelquefois dans l'épithélium mais jamais dans la lumière du tubule.

Ces résultats fournissent de nouvelles informations sur les acteurs présents et les mécanismes potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire contre les agents pathogènes et dans l'établissement et/ou le maintien de la tolérance aux spermatozoïdes qui sont brièvement abordés dans la discussion de l'article.



Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: Unexpected populations arise

Allison Voisin, Marjorie Whitfield, Christelle Damon-Soubeyrand, Chantal Goubely, Joëlle Henry-Berger, Fabrice Saez, Ayhan Kocer, Joël R. Drevet*, Rachel Guiton**

GReD laboratory, CNRS UMR 6293 – INSERM U1103 – Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Epididymis
Flow cytometry
Mononuclear phagocytes
Gamma delta T cells
Double negative T cells

ABSTRACT

Despite increasing evidence that epididymal immune disorders can lead to infertility, the cells and mechanisms underlying epididymal immunity remain poorly understood. In this study, we propose a rather exhaustive overview of innate and adaptive immune cells present in the murine *caput* and *cauda* epididymis. Using flow cytometry and a wide set of markers, we screened the broadest panel of immune cells ever, in this organ. For the first time, we unequivocally quantified the innate populations of monocytes, macrophages, and dendritic cells subtypes. We also revealed the presence of B cells, gamma delta T cells, and double negative T cells in the murine epididymis. They were localized by immunofluorescence stainings, and appeared to be all present in the interstitium and epithelium along the organ, but with respective preferential regional distribution. Altogether, these findings provide new insights on the actors and potential mechanisms involved in the immune responses against genital tract ascending pathogens and in the setting and maintenance of tolerance toward the sperm cells.

1. Introduction

Immune disorders, including infections and autoimmune reactions, represent up to 15% of known cases of male infertility and might be involved in the 30% of idiopathic cases (Haidl et al., 2008; Jungwirth et al., 2012). Studies regarding male reproductive tract immunity mainly focus on testis, originally thought to confer immunity to the whole tract while very little is known on the accessory organs, like epididymis. However, the incidence of cancers and inflammatory diseases vary in these organs, partly due to the tissues structural organization. While the blood-testis barrier is efficient at isolating most meiotic and all haploid germ cells from immune cells, the blood-epididymis barrier is not that impenetrable, suggesting that epididymal immune control is different from that of the testis (Hedger, 2011).

The epididymis has a vital role in managing the influx of both ascending pathogens and “foreign” spermatozoa. Sperm cells are produced at puberty, long after the setting of self-tolerance, and thus express germ-cell specific antigens that appear as foreign to the adult immune system which have yet to develop a tolerance to them. At the

same time, the male genital tract, in contact with the external environment, is also frequently challenged by ascending pathogens. The epididymis is especially sensitive to these pathogens as epididymitis, mostly caused by sexually transmitted bacteria in young men, is the most frequent inflammatory disease of the male urogenital tract and can lead to transient or permanent infertility if not properly treated (Michel et al., 2015). While there are abundant studies on epididymal innate immunity, and especially beta defensins (for review, see Ribeiro et al., 2016), the relatively scarce literature on cellular innate and adaptive immunity may account for the poor understanding of the complex mechanisms involved in sperm tolerance and concomitant active protection against pathogens.

Cellular adaptive immunity relies on the lymphoid B and T cell populations. To date, B lymphocytes have been described only in rats while CD4⁺ T lymphocytes were mainly found in the interstitium, and cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes mainly in the epithelium of mouse, rat and human epididymis (Nashan et al., 1989; Ritchie et al., 1984; Serre and Robaire, 1999; Yakirevich et al., 2002). However since these studies were published, the adaptive compartment has proven to be much

Abbreviations: APC, antigen-presenting cell; BEB, blood-epididymis barrier; CD, cluster of differentiation; DC, dendritic cell; cDC1, conventional type 1 dendritic cell; cDC2, conventional type 2 dendritic cell; DN T cells, double negative T cells; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; Ig, immunoglobulin; MPS, mononuclear phagocyte system; NKT cell, natural killer T cell; O/N, overnight; pDC, plasmacytoid dendritic cell; PFA, paraformaldehyde; TCR, T cell receptor; Treg, regulatory T cell; WT, wild type

* Corresponding author at: GReD laboratory, Faculté de Médecine, bâtiment CRBC, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France.

** Corresponding author.

E-mail addresses: joel.drevet@uca.fr (J.R. Drevet), rachel.guigon@uca.fr (R. Guigon).

more complex than originally thought, especially among the T cell populations.

Among the innate immune cells, macrophages have long been described as the major leukocyte population of the interstitium and peritubular layer of mouse epididymis from the *caput* to the *cauda* regions (Nashan et al., 1989). These cells may phagocytose senescent and excess sperm but this remains a controversial issue (Cooper et al., 2002; Tomlinson et al., 1992). Recent studies also identified mouse and human epididymal dendritic cells. While few or no mature cells (defined as CD83⁺ dendritic cells) populate the interstitium of human epididymis, dendritic cells form a dense network in the basal region of the mouse epididymal epithelium, and extend dendrites toward the lumen through the apical tight junctions in the initial segment (Da Silva et al., 2011; Duan et al., 2016).

Mouse dendritic cells were also shown to be able to present antigens, at least *in vitro* (Da Silva et al., 2011). Nevertheless, the authors could not exclude that these cells were macrophages and further referred to them as mononuclear phagocytes in their subsequent works (Shum et al., 2014; Smith et al., 2014).

In fact, the mononuclear phagocyte system (MPS) gathers three innate immune cell types as it was long thought that monocytes were the precursors of both macrophages and dendritic cells. Since the first description of the MPS, technical advances, and especially flow cytometry, has allowed the characterization of multiple distinct monocyte, macrophage and dendritic cell subsets (Guilliams et al., 2014).

In this study, we propose an overview of the mononuclear phagocyte and lymphocyte populations present in the murine *caput* and *cauda* epididymis at steady state. Using a wide set of markers and flow cytometry, we screened six populations of mononuclear phagocytes and seven populations of lymphocytes. We finally localized the newly discovered cell populations using immunofluorescence and confocal imaging on tissue sections from the initial segment, *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymis. This study gives reliable clues to the spatial distribution and organization of murine epididymal immune cells. It is a first mandatory step to decipher these cells interactions and mechanisms of action to set and maintain tolerance to spermatozoa and/or immune response to pathogens.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Six month-old WT BALB/cAnNCrl male mice (Charles River Laboratories) were housed in an animal facility with controlled environment and fed *ad libitum* (Teklad global diet 2016, Envigo). Mouse housing and manipulation were approved by the Regional Ethic Committee in Animal Experimentation (C2E2A, authorization CE 99-12). Mice were killed by cervical dislocation and epididymides were collected.

2.2. Single cell suspension preparation

Pooled organs were divided into *caput* and *cauda* epididymides (*corpus* was discarded) and processed for the preparation of single cell suspensions. Briefly, the conjunctive capsule was mechanically removed before the tissues were digested in HBSS medium (Sigma-Aldrich®) containing 1.25 mM CaCl₂, 0.4 mM MgSO₄, and 1 mg/ml type II collagenase (Sigma-Aldrich®) for 30 min (*caput* epididymides) or 15 min (*cauda* epididymides) at 37 °C under gentle shaking. Digested tissues were washed in PBS with 2.5 mM EDTA and 0.5% BSA, and filtered through 30 µm Partec CellTrics® filters (Sysmex).

2.3. Flow cytometry analyses

All Abs and kits were purchased from BioLegend® unless otherwise stated. Viability was assessed using the Zombie UV™ Fixable Viability Kit according to the manufacturer's instructions. Cells were then fixed

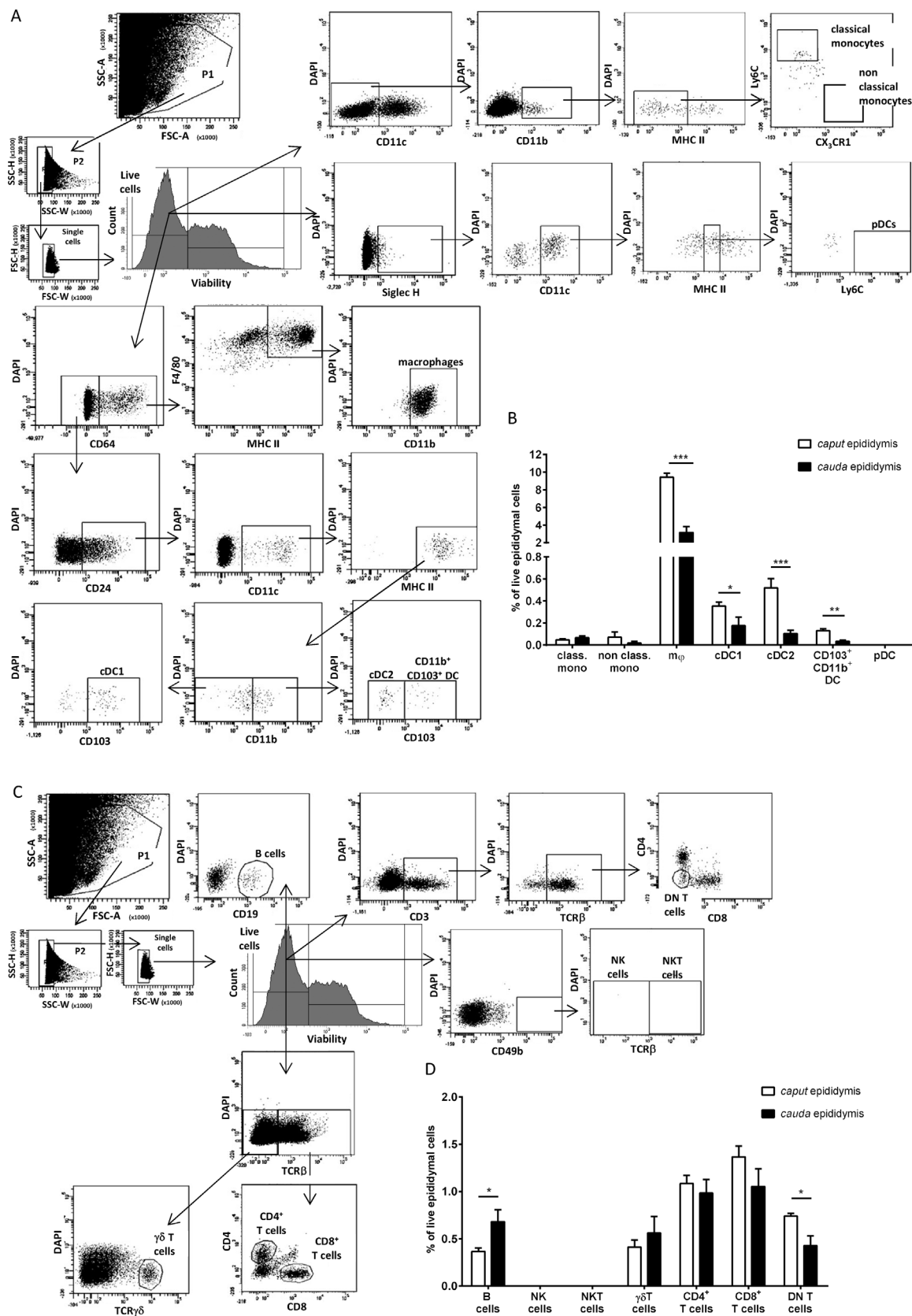
in 1% PFA (paraformaldehyde, Sigma-Aldrich®) for 15 min at 4 °C, washed, and incubated in a blocking buffer (PBS, 2.5 mM EDTA, 0.5% BSA, 5 µg/ml anti-CD16/CD32) for 10 min at 4 °C. Cells were incubated for 20 min at 4 °C with combinations of conjugated anti-mouse Abs or corresponding isotypes: PE/Cy7 or A700-TCRβ (H57-597; 2 or 5 µg/ml), PE-CD3 (17A2; 2 µg/ml), A488-CD4 (GK1.5; 5 µg/ml), PerCP-CD8α (53-6.7; 2 µg/ml), APC-CD19 (6D5; 2 µg/ml), PE/Cy7-TCRγδ (GL3; 2 µg/ml), A488- or Pacific Blue™-CD49b (DX5; 10 µg/ml), PE-CD25 (3C7; 2 µg/ml), PE/Dazzle™ 594-CD64 (X54-5/7.1; 4 µg/ml), A700-CD24 (M1/69; 10 µg/ml), PerCP-CD11b (M1/70; 4 µg/ml), PE-CD11c (N418; 2 µg/ml), PE/Cy7-I-A/I-E (M5/114.15.2; 2 µg/ml), A700-Ly6C (HK1.4; 5 µg/ml), A488-CX3CR1 (R&D Systems; 1/50), APC- or A488-F4/80 (BM8; 4 or 10 µg/ml), A647-CD103 (2E7; 10 µg/ml), APC-Siglec H (551; 4 µg/ml). To detect FOXP3-positive cells, the A647 anti-mouse/rat/human FOXP3 Flow kit was used according to the manufacturer's instructions. Finally, cells were washed and kept at 4 °C until processing. Data were acquired on an LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using the FACSDiva™ Software (v6.1.3, BD Biosciences). The cells were first selected based on their size (FSC) and granularity (SSC) characteristics (Fig. 1, P1 gate). The residual sperm cells were excluded from the analysis thanks to the FSC/SSC criteria. Indeed the sperm cells are smaller and less granular than the epididymal somatic cells and consequently appear as a distinct population on the FSC/SSC dot plot. The quantification is thus only based on somatic epididymal cells. Next, the singlets were selected (P2 and P3 gates). Finally, live cells were gated based on their negative staining for the viability marker before the cells were selected for the various markers tested. The percentages presented for each cell population are reported as the positivity minus the corresponding isotype control.

2.4. Immunofluorescence staining

Whole epididymides were fixed for 1 h (TCRγδ staining only) or O/N in 4% PFA at 4 °C, before being cryoprotected in PBS with 30% sucrose (weight/volume) for 6 h at 4 °C, embedded in cryosection medium (Richard-Allan Scientific™ Neg-50™, Microm Microtech) and sectioned (10 µm) in a cryostat (HM 560, Microm Microtech). Sections were fixed for 15 min in 4% PFA, washed and endogenous peroxidases were inhibited with 0.3% H₂O₂ for 30 min at room temperature. Sections were further saturated for 1 h in PBS with 5% normal goat serum (Vector Laboratories), and incubated with the following purified primary anti-mouse Abs alone or combined, O/N at 4 °C: anti-CD4 (GK1.5; 5 µg/ml), anti-CD8 (53-6.7; 5 µg/ml), anti-CD19 (6D5; 10 µg/ml), anti-TCRγδ (GL3; 10 µg/ml), all purchased from BioLegend®. Then, various conditions were used as follows. To detect double negative (DN) T cells, the CD4 and CD8 double staining was followed by a first incubation with A488 goat anti-rat IgG (2 µg/ml; ThermoFisher Scientific) and a second incubation with A594-CD3 Ab (17A2; 10 µg/ml; BioLegend®). Concerning the CD19 staining, slides were incubated with the ImmPRESS™ reagent (anti-rat Ig, Vector Laboratories) and an A555-labeled tyramide (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Concerning the TCRγδ staining, sections were incubated with a biotin-goat anti-hamster IgG (1 µg/ml; BioLegend®), before an A555 Tyramide Signal Amplification kit was used (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Finally, all slides were counterstained with 1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich®), mounted in Tris-MWL 4-88 solution (Citifluor™) and observed through a Leica SPE confocal microscope. Digital images were processed with the OMERO open-source software (OME consortium).

2.5. Statistical analyses

Mann-Whitney *U* tests were performed (GraphPad Prism software v6.01) to analyze the differences in immune cell proportions between *caput* and *cauda* epididymides. *P* values < .05 were regarded as statistically significant.



(caption on next page)

Fig. 1. Gating strategy and distribution of the immune cell populations in the *caput* and *cauda* epididymides of WT BALB/c mice.

Gating strategies used during the flow cytometry analysis of mononuclear phagocyte populations (A) and lymphocyte populations (C) according to the surface markers presented in Table 1 (“DAPI” refers to an empty compensated channel, not to a staining). Distribution of mononuclear phagocyte populations (B) and lymphocyte populations (D) in the murine epididymis. A positive control for NK and NKT cells included spleen cells staining with the anti-CD49b Ab (not shown). Bars represent means $\pm$ SEM. $n = 6$ independent experiments, each performed on a pool of 3 mice (monocytes), $n = 8$ on pools of 3 mice (cDCs and macrophages), $n = 3$ on pools of 3 mice (pDCs), $n = 7$ on pools of 4 mice (B lymphocytes), $n = 5$ on pools of 4 mice ($\gamma\delta$ T lymphocytes), $n = 6$ on pools of 4 mice (CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes), $n = 4$ on pools of 4 mice (DN T lymphocytes), $n = 3$ on pools of 3 mice (NK and NKT cells). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Abbreviations: class. mono, classical monocytes; non class. mono, non classical monocytes; mφ, macrophages; DC, dendritic cell; pDCs, plasmacytoid dendritic cells.

Table 1

Sets of surface markers used for the characterization of murine epididymal immune cells by flow cytometry. The markers appear as their order of use in the gating strategy.

Population	Markers
classical monocytes	CD11c [−] , CD11b ⁺ , MHC II [−] , Ly6C ^{hi} , CX ₃ CR1 [−]
non classical monocytes	CD11c [−] , CD11b ⁺ , MHC II [−] , Ly6C ^{lo} , CX ₃ CR1 ⁺
macrophages	CD64 ⁺ , F4/80 ⁺ , CD11b ⁺ , MHC II ⁺
cDCs1	CD64 [−] , CD24 ⁺ , CD11c ⁺ , MHC II ⁺ , CD11b [−] , CD103 ⁺
cDCs2	CD64 [−] , CD24 ⁺ , CD11c ⁺ , MHC II ⁺ , CD11b ⁺ , CD103 [−]
CD103 ⁺ CD11b ⁺ DCs	CD64 [−] , CD24 ⁺ , CD11c ⁺ , MHC II ⁺ , CD11b ⁺ , CD103 ⁺
pDCs	Siglec H ⁺ , CD11c ^{int} , MHC II ^{lo} , Ly6C ^{hi}
B lymphocytes	TCRβ [−] , CD19 ⁺
NK cells	TCRβ [−] , CD49b ⁺
NKT cells	TCRβ ⁺ , CD49b ⁺
$\gamma\delta$ T lymphocytes	TCRβ [−] , TCRγδ ⁺
CD4 ⁺ T lymphocytes	TCRβ ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 [−]
CD8 ⁺ T lymphocytes	TCRβ ⁺ , CD4 [−] , CD8 ⁺
DN T lymphocytes	TCRβ ⁺ , CD3 ⁺ , CD8 [−] , CD4 [−]

Abbreviations: cDCs1, conventional type 1 dendritic cells; cDCs2, conventional type 2 dendritic cells; DCs, dendritic cells; pDCs, plasmacytoid dendritic cells; DN T lymphocytes, double negative T lymphocytes; hi, high; lo, low; int, intermediate.

3. Results

3.1. Quantification of the mononuclear phagocytes

Combining the latest published ontogenies (Guilliams et al., 2016; McGovern et al., 2016), we used sets of surface markers (Table 1, Fig. 1A) to clearly identify and quantify the different populations of the MPS by flow cytometry in *caput* and *cauda* epididymides of WT BALB/c mice.

We first analyzed the monocytes that are divided into two sub-populations. Classical monocytes, characterized by a high level of Ly6C expression (Ly6C^{hi}), account for 0.05% and 0.07% of total live cells in the *caput* and *cauda* epididymis respectively (Fig. 1B). Non classical monocytes, which express low levels of Ly6C (Ly6C^{lo}), represent 0.07% and 0.02% of live epididymal cells in the *caput* and *cauda* epididymis respectively. These little variations between *caput* and *cauda* cells failed to reach any statistical significance in the tested monocyte populations (classical or non classical).

We next investigated one population of macrophages, based on the expression of consensual markers, ie CD11b, CD64 and MHCII (McGovern et al., 2016) and on the canonical marker F4/80. Even if other populations may exist, we determined that these macrophages are the most numerous immune cells in the murine epididymis and that they are significantly more abundant in *caput* than in *cauda* epididymides: 9.4% and 3.15% of live cells respectively ($P < .001$) (Fig. 1B).

Finally, we studied the dendritic cells (DC) populations. Among the conventional DCs, cDCs1 that are specialized in the cross-presentation of antigens (den Haan et al., 2000), account for 0.35% and 0.2% of the *caput* and *cauda* epididymis cells respectively ($P < .05$). The cDC2 population, that mostly induce T helper cell type responses (Schlitzer et al., 2015), represent 0.5% of the live *caput* cells and 0.1% of the *cauda* cells ($P < .001$). The CD103⁺CD11b⁺ DCs, a particular type of cDCs2 first described in the intestine as resident cells capable of migrating to the lymph nodes once activated (Schulz et al., 2009), also are

over-represented in the *caput* vs *cauda* epididymis cells (0.1% vs 0.03%, $P < .005$) (Fig. 1B). Concerning the plasmacytoid DCs, they were absent at steady state.

Given the lack of unique markers characterizing each population of mononuclear phagocytes, these cells were not localized in this study. Previous attempts were done elsewhere with various markers, each shared by several mononuclear phagocytes (Da Silva et al., 2011; Shum et al., 2014).

3.2. Quantification of the lymphoid cells

Murine epididymal lymphoid cells were last assessed in the 1980s, in studies focusing on the historical CD4⁺ vs CD8⁺ T cells dichotomy, neglecting B cells and others (Nashan et al., 1989; Nashan et al., 1990). We took advantage of the technical advances to explore old and new populations (Fig. 1C).

We first evaluated the B lymphocytes and found that their number was significantly higher in the *cauda* epididymis compared to the *caput*: 0.7% and 0.35% of live epididymal cells respectively ($P < .05$) (Fig. 1D).

Given the low incidence of epididymal tumors, an efficient control of cancer cells can be hypothesized, so we looked for two well-known antitumor effector cell types (Smyth et al., 2000), NK and NKT cells, using an anti-CD49b Ab. We found that these two populations were absent from the murine epididymis.

We next screened the T cell populations, and first the $\gamma\delta$ T lymphocytes, typical of mucosal epithelia. For the first time, they were identified in the tissue and were quite equally distributed along the organ: 0.4% of *caput* live cells and 0.55% of *cauda* epididymal cells (Fig. 1D).

In a first attempt to quantify the CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Jrad-Lamine et al., 2013), we failed to reveal clear populations. We thus improved the single cell isolation technique and observed that the CD4⁺ T lymphocytes were equally found in the *caput* and *cauda* epididymides: 1.1% and 1% of live cells, respectively. Moreover, we ascertain that these cells are not regulatory T (Treg) cells as they do not express the CD25 surface marker nor the FOXP3 transcription factor (data not shown). Similarly to the CD4⁺ T cells, the CD8⁺ T lymphocytes are evenly distributed along the epididymis: they account for 1.4% of the *caput* live cells and for 1.05% of the *cauda* cells (Fig. 1D).

Finally, the most intriguing lymphoid population we identified was the DN T cell population that lacks both the CD4 and CD8 surface markers. They were quite recently described and mainly found in female genital tracts and in lungs. There were significantly more DN T lymphocytes in the *caput* epididymis than in the *cauda* epididymis, 0.75% vs 0.4% of live cells respectively ($P < .05$) (Fig. 1D).

3.3. Localization of the lymphoid cells

The immune response and tolerance mechanisms in the epididymis not only depend on the cell types but also on their tissue location. Immunofluorescence helped us localize the newly described populations in the *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymis.

B lymphocytes (Fig. 2A) and $\gamma\delta$ T lymphocytes (Fig. 2B) were found in each region of the epididymis, mainly in the interstitium but few cells were also found in the epithelium, close to the basal membrane. They were never found in the lumen.

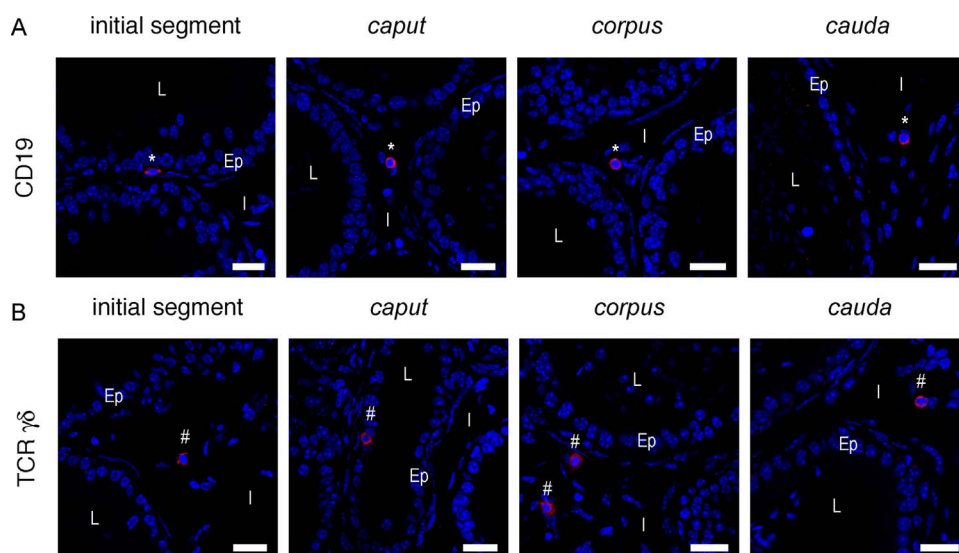


Fig. 2. Localization of B and $\gamma\delta$ T lymphocytes in the murine epididymis. WT BALB/c mouse epididymis cryosections (10 μ m) were labeled with an anti-CD19 Ab (A) to identify B cells (*, $n = 7$, 3 sections/epididymal segment) or an anti-TCR $\gamma\delta$ Ab (B) to identify $\gamma\delta$ T cells (#, $n = 4$, 4 sections/epididymal segment). Nuclei were stained with Hoechst 33342. Bars = 20 μ m. Abbreviations: L, lumen; ep, epithelium; I, interstitium.

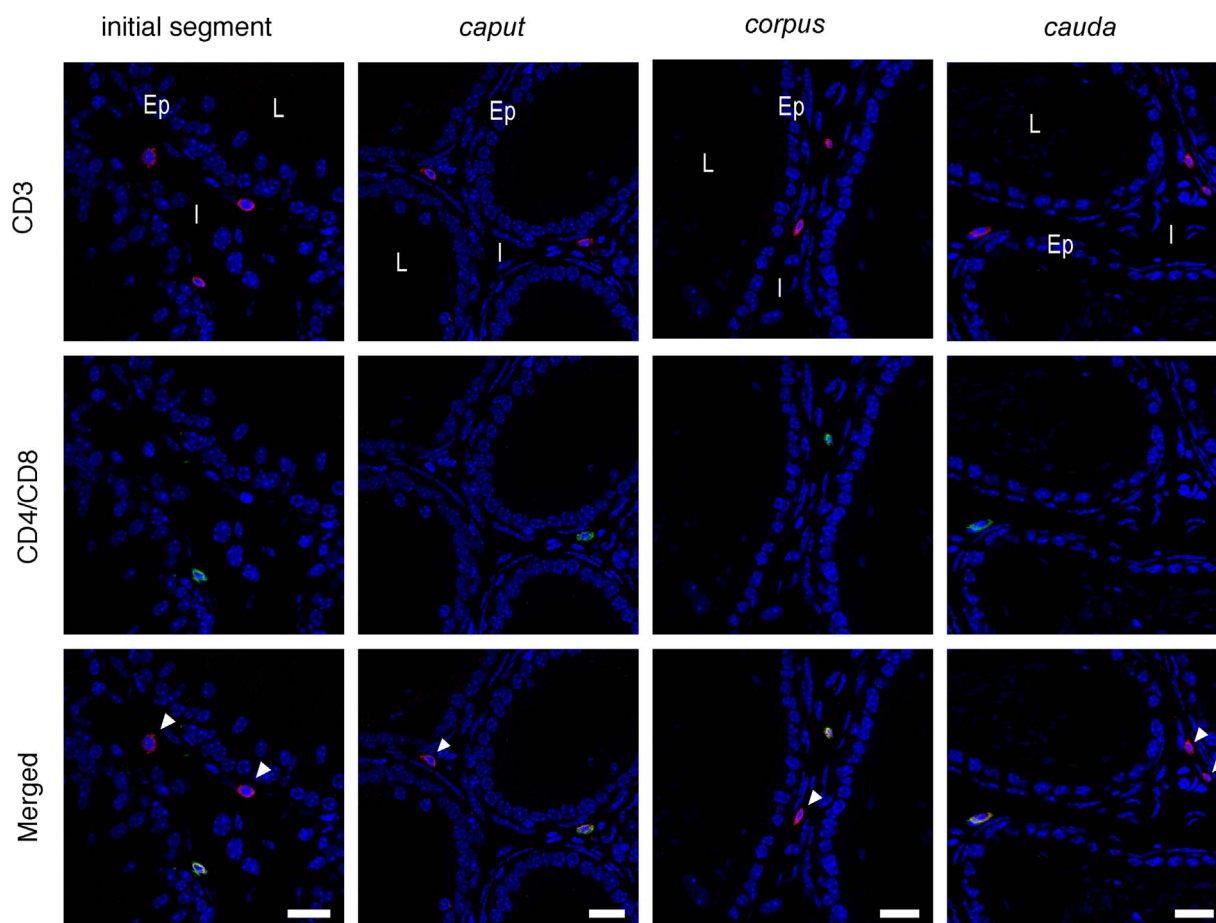


Fig. 3. Localization of DN T lymphocytes in the murine epididymis. WT BALB/c mouse epididymis cryosections (10 μ m) were labeled with an anti-CD3 Ab (red) and with a combination of anti-CD4 and anti-CD8 Abs (green) to identify DN T cells (arrowheads, $n = 6$, 3 sections/epididymal segment). Nuclei were stained with Hoechst 33342. Bars = 20 μ m. Abbreviations: L, lumen; ep, epithelium; I, interstitium.

As the DN T lymphocytes express the CD3 T cell surface marker but lack both the CD4 and CD8 markers, we performed a triple staining to localize them (Fig. 3). DN T lymphocytes were observed in every region of the epididymis, in the interstitium and to a lesser extent in the epithelium. These cells were not identified in the lumen.

4. Discussion

Despite a significant percentage of male infertility cases being linked to immune disorders, including epididymitis (Jungwirth et al., 2012), data regarding epididymal immune cells are scarce. The present work proposes an overview of the murine epididymal immune cells,

mononuclear phagocytes and lymphocytes, at steady state. The isolation technique, which uses a mild digestion of the tissue, allowed the conservation of surface markers and thus the characterization of a broad spectrum of immune cells by flow cytometry. This is the first work to present such a panel of cell populations potentially implicated in immune responses to pathogens (Section 4.1) and/or in tolerance to sperm cells (Section 4.2).

4.1. Response to pathogens

In most cases of epididymitis, pathogens enter the tissue *via* the *cauda* epididymis and we found that B cells were significantly more abundant in this region compared to the *caput* region. These cells may secrete the high amount of local IgAs described in the tissue (Stern et al., 1992). As no secretory component was described in association with these IgAs, they must be confined to the interstitium where we detected the majority of B cells.

The *caput* epididymis is probably a key site to the immune response as it is one of the last region before the ascending pathogens reach the testis and thus alter spermatozoa production. We demonstrated that the antigen-presenting cell populations (DC subpopulations and macrophages) were found in higher proportions in this region of the epididymis. An earlier work showed that, particularly in the *caput* compartment, these cells could extend processes towards the lumen (Da Silva et al., 2011). In the present study, macrophages are presented as one population but further studies will be needed to characterize the variety of their functional subpopulations. Unfortunately, we failed at finely localizing the APCs given the number of surface markers necessary to identify each population. As we also described a high proportion of canonical effectors, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, one can assume the existence of classical immune responses in this region. Some questions are somehow unsolved as to i) which mononuclear phagocyte population samples luminal antigens and how these antigens switch from epithelial presenting cells to interstitial T lymphocytes (Schulz et al., 2009), ii) the place where this presentation occurs, locally or in the closest draining lymph node that still needs to be identified, and iii) the origin and fate of the tissular T cells we found.

In some cases, pathogens are viruses that enter the tissue *via* lymphatic or blood vessels. The plasmacytoid DCs (pDCs) are specialized anti-viral cells that rapidly secrete high levels of type I IFN (IFN α/β) as a first line of defense (Asselin-Paturel et al., 2001). Moreover, they move to non-lymphoid inflamed organs after infection. In this context, it is not surprising that we did not find any in the murine epididymis at steady state.

Similarly, we found only few monocytes in the epididymis at steady state. This was quite expected as these cells mostly sense the stress signature that allows their recruitment and local differentiation into inflammatory DCs or macrophages (Mildner et al., 2016).

In this work, we identified for the first time in the epididymis, a typical mucosal population, the $\gamma\delta$ T cells. As we described interstitial and intraepithelial $\gamma\delta$ T cells, it is important to characterize the subpopulations present in the tissue as they exist under various subtypes. Many tissue-resident $\gamma\delta$ T cells show a limited TCR diversity, and only V γ 681⁺ T cells have been identified so far in the mouse reproductive tract: uterus, placenta and testes (Bonneville et al., 2010). Further experiments, especially on an epididymitis mouse model, will be needed to assess the potential roles of this newly described population.

Finally, as epididymal cancers are extremely rare (Yeung et al., 2012), we hypothesized that the organ is protected by a strong anti-tumoral immunity. Surprisingly the classical anti-tumoral NK and NKT cells were absent from the murine epididymis, suggesting the involvement of other populations or mechanisms.

4.2. Tolerance to sperm cells

Spermatozoa are produced at puberty, long after the setting of

central tolerance, and thus express unknown antigens that the immune system has to tolerate (Guiton et al., 2013). Their protection relies on peripheral tolerance mechanisms which are crucial to control auto-reactive lymphocytes and on a physical barrier.

The first level of protection is the blood-epididymis barrier (BEB) composed of tight junctions at the apical side of adjacent epithelial cells (Friend and Gilula, 1972). One function of the BEB is to protect the sperm from the immune system either by preventing sperm antigens from escaping the duct or by impeding immune cells to infiltrate the lumen. Under physiological conditions, we have shown that the B and T lymphocytes are located in the epididymal epithelium and interstitium but not in the lumen, suggesting an effective role of the BEB. Nevertheless, this barrier is not impenetrable as in the mouse some CD11c⁺ and basal cells are able to extend cytoplasmic projections across the tight junctions to reach the lumen (Da Silva et al., 2011; Roy et al., 2016). As a consequence, epididymal DCs are thought to continuously sample the luminal content, of which all testicular antigens (Da Silva and Barton, 2016). Such a situation suggests that the peripheral tolerance set only to some meiotic germ cell antigens at the testicular level (Tung et al., 2017) may not be sufficient to maintain a tolerogenic state in the epididymis. Several facts support the need and setting of specific epididymal tolerance mechanisms. First, a previous work from the team showed that the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is constitutively and highly expressed in the epididymis, which is not the case in the other male reproductive organs (Britan et al., 2006). Second, in the present study, we described a particular DC subpopulation, the CD103⁺CD11b⁺ DCs, which may be relevant for the establishment of a tolerogenic state to sperm antigens transiting through the epididymis. Indeed, in the gut, the CD103⁺ DCs were reported to induce tolerance by promoting the differentiation of naïve T cells into immunosuppressive Treg cells (Coombes et al., 2007), in association with their expression of IDO (Matteoli et al., 2010).

However, two findings suggest an alternative mechanism for tolerance to spermatozoa in the murine epididymis. Indeed, despite the fact that IDO is highly expressed in the murine epididymis, CD11c⁺ and CD103⁺ DCs from the *caput* epididymis were never found to express IDO (Jrad-Lamine et al., 2011; Da Silva, personal communication). Moreover, we did not describe Treg cells in the murine epididymis, contrary to what was seen in the testis (Tung et al., 2017).

Thus, instead of the classical DC-Treg cell interaction, there may be a DC-DN T cell interaction. Indeed, in this study, we first described an unexpected antigen-specific regulatory T cell population (Hillhouse and Lesage, 2013), the epididymal DN T cells, significantly more present in the *caput* epididymis. To clearly determine the importance of the epididymal DN T cells, further experiments exploring their cellular targets and mode of action will be needed, at steady state or following epididymitis induction.

In conclusion, this article is the first to identify three novel immune cell populations in the murine epididymis, two T cell populations and B lymphocytes, and to localize them at steady state. All of these cells were predominantly found in the interstitium. The DN T cells were preferentially located in the *caput* epididymis while the $\gamma\delta$ T cells were found equally distributed in the *caput* and *cauda* epididymis. Finally, the B lymphocytes were mostly described in the *cauda* epididymis. Functional studies will be of great interest to determine their exact contributions in the establishment/maintenance of the tolerance toward sperm cells as well as in the control of ascending pathogens.

Funding sources

AV was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (MESR). FS, AK, JRD and RG received funds from INSERM, CNRS and MESR.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Cézeaux staff of the animal facility (Université Clermont Auvergne, Campus des Cézeaux, Aubière) for mouse care, Christelle Blavignac (Centre Imagerie Cellulaire Santé, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand) for technical support on the flow cytometer, Caroline Vachias (plateforme d'imagerie confocale, GREd, Clermont-Ferrand) for technical assistance on the confocal microscope, and the Anipath platform staff (GREd, Clermont-Ferrand) for technical assistance during histology stainings. Finally the authors would like to thank Dorraïn Low for the English language edition.

References

- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Brière, F., Trinchieri, G., 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* 2, 1144–1150. <http://dx.doi.org/10.1038/ni736>.
- Bonneville, M., O'Brien, R.L., Born, W.K., 2010. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 467–478. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2781>.
- Britan, A., Maffre, V., Tone, S., Drevet, J.R., 2006. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res.* 324, 301–310. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-005-0151-7>.
- Coombs, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., Powrie, F., 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757–1764. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20070590>.
- Cooper, T.G., Yeung, C.-H., 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.
- Da Silva, N., Barton, C.R., 2016. Macrophages and dendritic cells in the post-testicular environment. *Cell Tissue Res.* 363, 97–104. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-015-2270-0>.
- Da Silva, N., Cortez-Retamozo, V., Reinecker, H.-C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., Swirski, F.K., Pittet, M.J., Breton, S., 2011. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141, 653–663. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-10-0493>.
- Duan, Y.-G., Wang, P., Zheng, W., Zhang, Q., Huang, W., Jin, F., Cai, Z., 2016. Characterisation of dendritic cell subsets in chronically inflamed human epididymis. *Andrologia* 48, 431–440. <http://dx.doi.org/10.1111/and.12463>.
- Friend, D.S., Gilula, N.B., 1972. Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J. Cell Biol.* 53, 758–776.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubczak, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., Yona, S., 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571–578. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3712>.
- Guilliams, M., Dutertre, C.-A., Scott, C.L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Pijck, S., Tavernier, S.J., Low, I., Irac, S.E., Mattar, C.N., Sumatoh, H.R., Low, G.H.L., Chung, T.J.K., Chan, D.K.H., Tan, K.K., Hon, T.L.K., Fossom, E., Bogen, B., Choolani, M., Chan, J.K.Y., Larbi, A., Luche, H., Henri, S., Saey, Y., Newell, E.W., Lambrecht, B.N., Malissen, B., Ginhoux, F., 2016. Unsupervised high-dimensional analysis aligns dendritic cells across tissues and species. *Immunity* 45, 669–684. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.015>.
- Guiton, R., Henry-Berger, J., Drevet, J.R., 2013. The immunobiology of the mammalian epididymis: the black box is now open!. *Basic Clin. Androl.* 23, 8. <http://dx.doi.org/10.1186/2051-4190-23-8>.
- Haidl, G., Allam, J.P., Schuppe, H.-C., 2008. Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia* 40, 92–96. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0272.2007.00819.x>.
- Hedger, M.P., 2011. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J. Androl.* 32, 625–640. <http://dx.doi.org/10.2164/jandrol.111.012989>.
- Hillhouse, E.E., Lesage, S., 2013. A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *J. Autoimmun.* 40, 58–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.010>.
- Jrad-Lamine, A., Henry-Berger, J., Goubeyre, P., Damon-Soubeyrand, C., Lenoir, A., Combaret, L., Saez, F., Kocer, A., Tone, S., Fuchs, D., Zhu, W., Oefner, P.J., Munn, D.H., Mellor, A.L., Gharbi, N., Cadet, R., Aitken, R.J., Drevet, J.R., 2011. Deficient tryptophan catabolism along the kynurenine pathway reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. *J. Biol. Chem.* 286, 8030–8042. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.172114>.
- Jrad-Lamine, A., Henry-Berger, J., Damon-Soubeyrand, C., Saez, F., Kocer, A., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Munn, D.H., Mellor, A.L., Gharbi, N., Cadet, R., Guiton, R., Aitken, R.J., Drevet, J.R., 2013. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (ido1) is involved in the control of mouse caput epididymis immune environment. *PLoS One* 8, e66494. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066494>.
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C., 2012. European association of urology working group on male infertility. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur. Urol.* 62, 324–332. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.048>.
- Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I.D., 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, 595–604. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2009.185108>.
- McGovern, N., Schlitzer, A., Janela, B., Ginhoux, F., 2016. Protocols for the identification and isolation of antigen-presenting cells in human and mouse tissues. *Methods Mol. Biol.* 1423, 169–180. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3606-9_12.
- Michel, V., Pilatz, A., Hedger, M.P., Meinhardt, A., 2015. Epididymitis: revelations at the convergence of clinical and basic sciences. *Asian J. Androl.* 17, 756–763. <http://dx.doi.org/10.4103/1008-682X.155770>.
- Mildner, A., Marinkovic, G., Jung, S., 2016. Murine monocytes: origins, subsets fates, and functions. *Microbiol. Spectr.* 4. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0033-2016>.
- 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., Cooper, T.G., Knuth, U.A., Schubert, P., Sorg, C., Nieschlag, E., 1990. Presence and distribution of leucocyte subsets in the murine epididymis after vasectomy. *Int. J. Androl.* 13, 39–49.
- Ribeiro, C.M., Silva, E.J.R., Hinton, B.T., Avellar, M.C.W., 2016. β -defensins and the epididymis: contrasting influences of prenatal, postnatal, and adult scenarios. *Asian J. Androl.* 18, 323–328. <http://dx.doi.org/10.4103/1008-682X.168791>.
- Ritchie, A.W., Hargreave, T.B., James, K., Chisholm, G.D., 1984. Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens? *Br. J. Urol.* 56, 79–83.
- Roy, J., Kim, B., Hill, E., Visconti, P., Krapp, D., Vinegoni, C., Weissleder, R., Brown, D., Breton, S., 2016. Tyrosine kinase-mediated axial motility of basal cells revealed by intravital imaging. *Nat. Commun.* 7, 10666. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10666>.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Ginhoux, F., 2015. Dendritic cells and monocyte-derived cells: two complementary and integrated functional systems. *Semin. Cell Dev. Biol.* 41, 9–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.03.011>.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., Pabst, O., 2009. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J. Exp. Med.* 206, 3101–3114. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20091925>.
- 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, 705–714.
- Shum, W.W., Smith, T.B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L.S., Roy, J.W., Hill, E., Pittet, M.J., Breton, S., Da Silva, N., 2014. Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 90, 90. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.113.116681>.
- Smith, T.B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L.S., Hill, E., Pittet, M.J., Da Silva, N., 2014. Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology* 2, 755–762. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00251.x>.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., Godfrey, D.I., 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* 191, 661–668.
- Stern, J.E., Gardner, S., Quirk, D., Wira, C.R., 1992. Secretory immune system of the male reproductive tract: effects of dihydrotestosterone and estradiol on IgA and secretory component levels. *J. Reprod. Immunol.* 27, 275–283.
- Tomlinson, M.J., White, A., Barratt, C.L., Bolton, A.E., Cooke, I.D., 1992. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Hum. Reprod.* 7, 517–522.
- Tung, K.S.K., Harakal, J., Qiao, H., Rival, C., Li, J.C.H., Paul, A.G.A., Wheeler, K., Pramoonjago, P., Grafer, C.M., Sun, W., Sampson, R.D., Wong, E.W.P., Reddi, P.P., Deshmukh, U.S., Hardy, D.M., Tang, H., Cheng, C.Y., Goldberg, E., 2017. Egress of sperm autoantigen from seminiferous tubules maintains systemic tolerance. *J. Clin. Invest.* 127, 1046–1060. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI89927>.
- Yakirevich, E., Yanai, O., Sova, Y., Sabo, E., Stein, A., Hiss, J., Resnick, M.B., 2002. Cytotoxic phenotype of intra-epithelial lymphocytes in normal and cryptorchid human testicular excurrent ducts. *Hum. Reprod.* 17, 275–283.
- den Haan, J.M., Lehar, S.M., Bevan, M.J., 2000. CD8(+) but not CD8(−) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1685–1696.
- Yeung, C.-H., Wang, K., Cooper, T.G., 2012. Why are epididymal tumours so rare? *Asian J. Androl.* 14, 465–475. <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2012.20>.

Présentation de la deuxième publication

ASIAN JOURNAL OF ANDROLOGY
(en cours de préparation)

**Regionalized expression of the TGF- β isoforms and receptors in the murine epididymis:
where, when and why?**

Les spermatozoïdes sont produits à la puberté, bien après l'établissement du répertoire du soi, et portent des protéines de surface uniques. Ils sont donc des cibles potentielles pour le système immunitaire qui ne les connaît pas et risque de les éliminer, induisant alors une infertilité. La protection des spermatozoïdes au sein de l'épididyme est assurée par la mise en place d'une tolérance périphérique dont les mécanismes cellulaires et moléculaires sont majoritairement méconnus. Une étude récente a montré que la signalisation TGF- β dans les DCs est requise pour le maintien de la tolérance épидидymaire aux spermatozoïdes chez la souris (Pierucci-Alves et al., 2018) mais peu d'informations sont disponibles quant aux différentes isoformes du TGF- β et de ses récepteurs présents dans l'épididyme ou quant à la nature des cellules qui les produisent.

Par des approches de biologie moléculaire et d'histologie, nous avons mis en évidence des variations dans l'expression et la distribution spatiale et temporelle des trois isoformes du TGF- β et de leurs récepteurs, ainsi qu'une différence dans la nature des cellules synthétisant les TGF- β s (cellules immunitaires et non immunitaires). Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les 3 isoformes pourraient jouer des rôles différents dans la physiologie épидидymaire.

**Regionalized expression of the TGF- β isoforms and receptors in the murine epididymis:
where, when and why?**

Running title: **Murine epididymal TGF- β expression**

Allison Voisin^a, Christelle Damon-Soubeyrand^a, Stéphanie Bravard^a, Chantal Goubely^a,
Henry-Berger Joëlle^a, Fabrice Saez^a, Joël R. Drevet^a, Rachel Guiton^a

^a GReD laboratory, CNRS UMR 6293 - INSERM U1103 - Université Clermont Auvergne, 28
place Henri Dunant 63001 Clermont-Ferrand Cedex, France

* Correspondence: Pr. J. Drevet (joel.drevet@uca.fr) or Dr. R. Guiton (rachel.guiton@uca.fr)

ABSTRACT

The testis produces spermatozoa that transit through and are stored in the epididymis where they acquire their fertilizing capacities. Spermatozoa appear in the genital tract at puberty, long after the immune system was trained to self antigens. As a consequence, these organs have to set strategies to tolerate sperm antigens to avoid autoimmune responses that would specifically target and destroy them. A recent study pointed to the TGF- β signaling in dendritic cells as a crucial mechanism for epididymal tolerance to spermatozoa. In the mouse, three isoforms of the TGF- β , and three isoforms of its receptor have been described. Using RT-qPCR, immunohistochemistry and ELISA techniques, we established variations in the expression and spatial distribution of the isoforms of TGF- β s and receptors. Moreover, we showed that TGF- β s and their receptors were produced by both immune and non immune cells in the epididymis of adult mice. Finally, we determined the kinetics of the postnatal expression of the TGF- β s as it may complete our vision of their epididymal functions.

Keywords: epididymis, mouse, TGF- β , TGF- β receptor.

INTRODUCTION

After being produced in the testis, spermatozoa transit through and are stored in the epididymis in order to become fully mature. Therefore, the epididymis has a vital role in managing the constant influx of spermatozoa that appear at puberty. The ability to discriminate self antigens from foreign antigens relies on the tolerance mechanism which encompasses both central and peripheral tolerances. Central tolerance is established before birth or during the perinatal period in mammals, that is long before the production and release of antigens associated with the various stages of sperm development. In this respect, spermatozoa appear as foreign to the adult immune system. These « foreign » antigens are

managed by the peripheral tolerance which is maintained throughout life by interactions between antigen-presenting cells and T cells under tolerizing conditions, *i.e.* in the absence of mandatory costimulatory signals or in the presence of immunoregulatory cytokines, ligands, leukocyte subsets, or through a combination of these elements (1). These tolerizing interactions result in responses ranging from the destruction of antigen-specific T cells to the generation of actively immunosuppressive antigen-specific T-cell subsets (2,3). Maintaining the peripheral tolerance to sperm cells in the epididymis is crucial for the host to avoid the development of autoimmune reactions such as the production of anti-sperm antibodies (ASAs) which are involved in a wide range of infertility mechanisms (4). Among the well-known tolerizing molecules, the transforming growth factor-beta (TGF- β) has proven to be a key cytokine (5).

The TGF- β superfamily comprises more than 30 members, including TGF- β isoforms, bone morphogenetic proteins, growth and differentiation factors, activins/inhibins, NODAL and the anti-Müllerian hormone. They are involved in the regulation of numerous cellular processes, including differentiation, proliferation, cytoskeletal organization, adhesion, and apoptosis (6). In mammals three isoforms of TGF- β s have been identified, TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3. Although the isoforms are mostly described as functionally overlapping *in vitro*, isoform-specific knockout mice revealed nonredundant phenotypes. Half of *Tgf- β 1* knockout mice typically die prenatally due to yolk sac defects and the survivors develop inflammatory disorders and eventually die within a few weeks after birth (7–9). *Tgf- β 2* knockout mice display a wide variety of defects in the development of skeletal, cardiac, lung, eye, spinal, inner ear and urogenital tissues resulting in perinatal mortality (10). *Tgf- β 3* knockout mice also die perinatally due to developmental defects of the lung and cleft palate (11,12). TGF- β s are secreted as non-covalent complexes associated with the latency-associated peptides (LAPs). After activation by the release of LAPs, TGF- β s trigger intracellular signaling *via*

binding to the TGF- β receptor complex, a tetrameric structure composed of two type I TGF- β receptors (TGF- β RI) and two type II TGF- β receptors (TGF- β RII). A third receptor exists, the TGF- β RIII (also called β -glycan), which is required for an optimal TGF- β 2 signaling by enhancing its initial binding to the TGF- β RII. Subsequently, TGF- β RII phosphorylates the cytoplasmic domain of TGF- β RI, which triggers the recruitment of the intracellular receptors Smad2 and Smad3 to the cytoplasmic domain of activated TGF- β RI, inducing the phosphorylation of the Smad2/3 complex. Once phosphorylated, Smad2/3 forms a trimeric structure with Smad4, which translocates to the nucleus to activate or repress gene expression *via* binding to Smad-responsive regulatory regions (13).

Few studies have explored the presence of TGF- β s in the epididymis. TGF- β 1 proteins were shown to be present in the rat epididymis, under a latent form, while active TGF- β 3 proteins have been detected in the *corpus* epididymis. *Tgf- β 2* mRNA was not detected, whatever the epididymal region considered (14). Another study described the presence of TGF- β 1 and of the receptor TGF- β RII in the epididymis of the marmoset monkey (15). While the TGF- β 1 was found in the apical cells of the *caput* and *corpus* epididymis, its receptor was found in the principal cells of the same regions, suggesting a paracrine mode of action (15). Finally, the mouse epididymis presented with high *Tgf- β 1* mRNA levels in the *caput* and *corpus* regions (16). A very recent work has revealed that the loss of TGF- β signaling in dendritic cells (DCs) induced a severe epididymal pathology characterized by leukocytosis with granulomas, generation of ASAs and upregulation of pro-inflammatory pathways, thus indicating a key role for the TGF- β signaling in the establishment of peripheral tolerance to spermatozoa in the murine epididymis (17).

Considering the lack of knowledge on the TGF- β s and receptors isoforms in the murine epididymis and the recent revelation of their importance in sperm tolerance, we

undertook this work to localize them in the different regions of the organ and to identify the TGF- β -producing cells. These data could complete our vision of the mechanisms of the peripheral tolerance to sperm cells in the murine epididymis and give clues to potential other independent implications of the cytokine isoforms.

MATERIALS AND METHODS

Animals

WT BALB/cAnNCrl male mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed in an animal facility with controlled environment and fed *ad libitum*. Mice were killed by cervical dislocation or decapitation and epididymides were collected and either snap frozen in liquid nitrogen for further use or processed for fixation as described below.

Extraction of tissue proteins

For the Western Blot analyses, epididymides were separated into *caput*, *corpus* and *cauda* regions and homogenized in high salt buffer (25 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1% IGEPAL[®] CA-630, Sigma-Aldrich) supplemented with a protease inhibitor cocktail (cOmplete[™], Roche) and phosphatase inhibitors (1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄). Lysates were centrifuged at 4°C for 10 min at 13000xg. Supernatants were collected and the proteins were dosed by the Bradford method (18). For electrophoresis, 35 μ g of proteins were diluted in Laemmli sample buffer and incubated for 5 min at 95°C.

For ELISA, *caput*, *corpus* and *cauda* epididymal tissues were homogenized in tissue extraction buffer (100 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholate) supplemented with protease (cOmplete[™], Roche) and phosphatase inhibitors (1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄). Lysates were then maintained under

constant agitation for 2 h at 4°C and centrifuged for 20 min at 13000×g at 4°C. Supernatants were collected and stored at -80°C until use.

Western Blot Analysis

Proteins (35 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL, GE Healthcare). Blots were blocked with Tris Buffered Saline (TBS) (50 mM Tris, 150 mM NaCl) containing 10% low-fat dried milk/0.1% Tween 20 (for the anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [GAPDH] antibody) or 0.1% Tween 20/10% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich; for other antibodies). Membranes were probed overnight at 4°C with either anti-GAPDH (1:20000; G9545 Sigma-Aldrich), anti-SMAD2 (1:500), anti-SMAD3 (1:500), anti-SMAD4 (1:500), anti-phospho-SMAD2 (1:500) or anti-phospho-SMAD3 (1:500) (Smad2/3 Antibody Kit Sampler 12747, Cell Signaling Technology) antibodies in corresponding blocking solutions. After washing, membranes were incubated with a goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10000 [GAPDH] or 1:1000 [others] BI 2407, Abliance) for 1h at room temperature (RT). Detection was performed using the Clarity™ Western ECL Substrate (Biorad) on a ChemiDoc™ MP Imaging System (Biorad). Densitometric analyses were carried out using Image lab software (Biorad).

ELISA

Epididymis protein extracts were tested for the presence of the three isoforms of TGF-β using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions. The TGF-β1 and TGF-β2 kits were purchased from RnDSystems, and the TGF-β3 kit from OriGene Technologies. Total proteins concentration measurement was achieved after activation of the protein extracts using 1 N HCl and 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES according to the manufacturer's instructions.

The concentrations obtained were normalized with the corresponding region weights so they are expressed as pg/mg tissue.

Tissue stainings

Whole epididymides were fixed for 24h in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4 °C, before being cryoprotected in PBS with 30% sucrose (w/v) for 6 h at 4 °C, embedded in cryosection medium (Richard-Allan Scientific™ Neg-50™, Microm Microtech) and sectioned (10 µm) in a cryostat (HM 560, Microm Microtech). Sections were fixed for 15 min in 4% PFA, washed and endogenous peroxidases were inhibited with 0.3% H₂O₂ for 30 min at RT.

For immunohistochemistry stainings, sections were further saturated for 1 h in PBS with 2.5% normal horse serum (Vector Laboratories), or with 5% normal horse serum/1% BSA (for TGF-βRII), and incubated with one of the following purified primary antibodies overnight (O/N) at 4 °C: anti-TGF-β1 (1:300, Ab92486, Abcam), anti-TGF-β2 (1:200, sc-90, Santa Cruz Biotechnology), anti-TGF-β3 (1:200, NB600-1531SS, Novus Biologicals), anti-TGF-βRI (1:100, Ab31013, Abcam), anti-TGF-βRII (1:50, Ab61213, Abcam), anti-TGF-βRIII (1:200, AF5034, RnD Systems). Slides were further incubated with the ImmPRESS™ HRP reagent kit (anti-rabbit Ig or anti-goat Ig [for TGFβRIII], Vector Laboratories) or with a biotin-goat anti-rabbit IgG antibody (1:500, Jackson ImmunoResearch) followed by an incubation with peroxidase-conjugated streptavidin (1:500, Jackson ImmunoResearch) for TGF-β1. Color was developed with the VECTOR NovaRED peroxidase substrate kit (Vector Laboratories). Slides were then counterstained with Mayer's hematoxylin for 10 sec, mounted in PBS-Glycerol (v/v) before the observation with a Carl Zeiss Axio Scan.Z1. Digital images were processed with the Zen software (Carl Zeiss).

For immunofluorescence stainings, sections were further saturated for 1 h in PBS with 2.5% normal horse serum (Vector Laboratories) or with 5% normal horse serum/1% BSA (for TGF- β 1), and incubated with one of the following purified primary antibodies overnight (O/N) at 4 °C: anti-TGF- β 1 (1:100), anti-TGF- β 2 (1:200), anti-TGF- β 3 (1:200), anti-TGF- β RI (1:100), anti-TGF- β RII (1:200), anti-TGF- β RIII (1:200). Slides were further incubated with the ImmPRESS™ HRP reagent kit (anti-rabbit Ig or anti-goat Ig [for TGF β RIII], Vector Laboratories) and an A555-labeled tyramide (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions or an A555 goat anti-rabbit antibody (Invitrogen, 2 μ g/ml) for TGF- β 1. For the co-staining with CD45, sections were further saturated for 1 h in PBS with 2.5% normal horse serum (Vector Laboratories), and incubated with the anti-CD45 primary antibody (1:100 Clone 30-F11, BD Biosciences) O/N at 4 °C before incubation with an A488-goat anti-rat IgG (2 μ g/ml; Invitrogen). Finally, slides were counterstained with 1 μ g/ml Hoechst 33342, mounted in Citifluor™ Tris-MWL 4-88 solution and observed with a Leica SPE confocal microscope. Digital images were processed with the OMERO open-source software (OME consortium).

Quantification of mRNA by Real-Time Quantitative RT-PCR

Total mRNAs from *caput*, *corpus* or *cauda* epididymides were isolated using the NucleoSpin RNA II column kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. RNA (0.5 μ g) was reverse transcribed with Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed with SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa Bio) on a LightCycler 480 II (Roche). Primer sequences are listed in Table 1. The relative accumulation level of each mRNA was normalized using 36b4 as a standard, following the comparative Ct method ($\Delta\Delta$ Ct method).

Statistical Analysis

To determine whether experimental differences were statistically significant, groups were compared using the Mann-Whitney *U* test. A *P* value of 0.05 or less was considered to be statistically significant. The software GraphPad PRISM v6.01 was used to perform the statistical analysis and to generate the associated graphs.

RESULTS

Expression of the TGF- β isoforms

To define the expression pattern of the TGF- β isoforms, total RNAs from *caput*, *corpus* and *cauda* epididymides of adult mice were analyzed by RT-qPCR (Figure 1A). Although all isoforms were expressed in the three epididymal regions, preferential expressions were observed. *Tgf- β 1* was significantly more expressed in the *corpus* epididymis than in the other compartments, while *Tgf- β 2* and *Tgf- β 3* had a higher expression in the *cauda* epididymis compared to the *caput* and *corpus* regions.

Then, the total protein concentrations were determined by ELISA (Figure 1B). The three isoforms were effectively present at the protein level and again revealed regional differences. Indeed, the total TGF- β 1 concentration per mg of tissue was highest in the *caput* epididymis and significantly decreased through the organ to reach its minimum in the *cauda* region. Conversely, the total TGF- β 2 concentration increased gradually along the adult epididymis, from the *caput* to the *cauda* compartments. Finally, the total TGF- β 3 concentration was significantly higher in the *corpus* region compared to the *caput* and *cauda* epididymis.

The TGF- β signaling pathway

To determine if the epididymal TGF- β can trigger local signaling pathways, the three TGF- β receptors (TGF- β R) mRNAs were studied by RT-qPCR in the adult tissue (Figure 2A). As the ligands did, the receptors proved to be differentially expressed. *Tgf- β RI* was predominantly expressed in the *caput* epididymis while *Tgf- β RII* and *Tgf- β RIII* were mainly expressed in the *cauda* epididymis.

Next, the activation status of the pathway was assessed through the detection of the canonical actors, *i.e.* the SMAD2-4 proteins (Figure 2B). Western blot analyses revealed the presence of each SMAD protein in the three regions of the epididymis. The phosphorylated form of SMAD3 was highly expressed in the *corpus* compartment. In agreement with this observation, the TGF- β signaling pathway was significantly activated in the *corpus* epididymis compared to the other compartments as illustrated by the quantification of the p-SMAD3/SMAD3 ratio (Figure 2C). No phosphorylation of SMAD2 was observed whatever the region considered.

Localization of the TGF- β s and receptors isoforms

Given that the expression profile is not sufficient to raise hypotheses concerning the functions of the TGF- β s and receptors isoforms, the localization of each isoform was determined by immunohistochemistry (see the Figure 3 for raw stainings and Table 2 for details). TGF- β 1 and TGF- β 2 positive cells were found throughout the organ in the interstitial space, as well as in the epithelium with the exception of the proximal *caput* epididymis. The lumen also presented with TGF- β 1 and TGF- β 2 positive cells, from the *caput* to the *cauda* epididymis. TGF- β 3 had a different pattern of expression as it was only found in the interstitium of the *corpus* epididymis. Positive cells also appeared in the epithelium throughout the organ, and only in the lumen of the *corpus* and *cauda* compartments.

TGF- β RI and TGF- β RII were found expressed by interstitial cells in the three regions except in the initial segment. Moreover, both receptors were found throughout the organ with the exception of the proximal *caput* epididymis. TGF- β RI positive cells appeared in the lumen of the *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymides except in the initial segment, and their number raised from the *caput* to the *cauda* compartments. Comparatively, TGF- β RII positive cells were found from the proximal *caput* to the *cauda* epididymis but to a lesser extent. The TGF- β RIII was observed in great number in the interstitium throughout the organ. Surprisingly, it was also strongly expressed by the smooth muscle layer all along the epididymis. Moreover, the epithelial staining differed from all the previous ones as it appeared as intracellular granules, whatever the region considered. Finally, TGF- β RIII luminal positive cells were found from the distal *caput* to the *cauda* epididymis.

From a general point of view, the epithelial stainings varied from one another as various cell types seem to express the TGF- β s and receptors isoforms, and this pattern changed along the organ.

TGF- β -producing cells

As TGF- β immunosuppressive functions are mostly mediated by immune cells, and as the immunohistochemistry revealed three locations for the TGF- β -producing cells (luminal, epithelial, and interstitial), we tried to characterize these cells. To do so, immunofluorescent stainings were done using a combination between a pan-leukocyte marker (CD45) and each TGF- β ligand and receptor (Figure 4). For clarity and space reasons, only the *corpus* epididymis staining was shown, as it was representative of all the compartments. Almost all interstitial TGF- β and TGF- β R positive cells were also stained for CD45, indicating their leukocytic nature, with the exception of TGF- β RIII positive cells that were all negative for the

CD45 marker. Contrary to the interstitial cells, none of the intraluminal cells positive for a TGF- β isoform or for a receptor were leukocytes.

Kinetics of postnatal expression of the TGF- β isoforms

A recent study demonstrated the importance of the TGF- β signaling in dendritic cells to maintain the epididymal tolerance to sperm cells (Pierucci-Alves, 2018). We thus hypothesized a potential link between TGF- β production and sperm arrival in the tissue of young mice (postnatal days 15 to 30). Spermatozoa were first shown in the epididymis of mice aged 25 days but were absent from animals aged 20 days or less (data not shown). Total concentrations of TGF- β s per mg of tissue were determined by ELISA (Figure 5). Interestingly, in the *caput* epididymis, a significant increase in TGF- β 1 and TGF- β 2 concentrations was noted between days 20 and 25. On the other hand, a significant decrease of both TGF- β 1 and TGF- β 2 concentrations was generally observed in the aging mice in the three regions of the epididymis, with the exception of the TGF- β 2 concentration in the *corpus* region. No variations of TGF- β 3 concentrations were observed along the kinetics whatever the epididymal region considered.

DISCUSSION

The present study provides new data regarding the patterns of expression and localization of the three TGF- β isoforms and their receptors along the murine epididymis and highlights potential specific features.

Where are the TGF- β s and their receptors produced?

Although all TGF- β isoforms were present in each region (*i.e. caput, corpus* and *cauda*) of the murine epididymis at both mRNA and protein levels, preferential

regionalizations could be highlighted. Even if some differences appeared between the mRNA and protein levels, strong post-transcriptional and post-translational regulations of these actors are well-known and can explain these discrepancies (5). It should be noted that only the total form concentrations of TGF- β s were determined by ELISA and thus may not reflect the distribution of the bioactive form. Preliminary results of ELISA determination of the active form concentrations of the TGF- β 1 and TGF- β 2 suggest that these isoforms are mainly present under a latent form. This would be consistent with the data found in the rat where TGF- β 1 was described under a latent form (14). Such data need to be confirmed and completed by the study of the TGF- β 3 active form.

Similarly, the three TGF- β receptors were present in the murine epididymis with preferential regionalization. In addition, the TGF- β signaling was active as demonstrated by the phosphorylation of a downstream effector of the signaling pathway, the SMAD3 protein. Interestingly, the TGF- β signaling was particularly active in the *corpus* epididymis compared to the *caput* (x16) and *cauda* compartments (x6), as illustrated by the augmentation of the pSMAD3/SMAD3 ratio. Further experiments will be needed to assess the biological significance of this finding but this may reflect a peculiar implication of the *corpus* epididymis in terms of tolerance to sperm cells or of other functions that may be attributed to the TGF- β signaling pathway.

Given that the expression profile is not sufficient to raise hypotheses concerning the functions of the TGF- β s and receptors isoforms, the localization of each isoform was determined by immunohistochemistry. A specific localization pattern for each TGF- β ligand and receptor was observed along the organ, suggesting a non-redundant role of the TGF- β isoforms in the murine epididymis. Interestingly, we could notice that all ligands and receptors were almost exclusively produced by apical cells in the initial segment while they were mainly found in principal cells in the subsequent segments and regions, suggesting

autocrine and/or paracrine actions. Whatever the isoform tested three types of stainings were observed: epithelial, interstitial and luminal stainings. Additionally, a positive staining was reported in smooth muscle cells for the TGF- β RIII. We next tried to identify the interstitial and intraluminal positive cells with a particular focus on immune cells, in agreement with the known roles of TGF- β in immunity. The immunofluorescence stainings showed that all interstitial cells positive for the TGF- β ligands and receptors (with the exception of TGF- β RIII) were indeed immune cells, as demonstrated by the co-staining with the CD45 pan-leukocyte antigen. Conversely, luminal positive cells were not immune cells. They could be either detached epididymal epithelial cells or cells arising from the testis. Further characterization is needed to determine the population(s) of TGF- β -producing immune cells in the murine epididymis as it might give clues to their functions.

When are the TGF- β s produced?

As a recent study demonstrated the importance of the TGF- β signaling in the maintenance of epididymal tolerance to sperm cells (17), we hypothesized a potential link between the TGF- β production and the sperm arrival in the epididymis of young mice. Interestingly, in the *caput* epididymis of mice aged 25 days, spermatozoa arrival was correlated with a significant increase in TGF- β 1 and TGF- β 2 concentrations. No variations of TGF- β 3 concentrations were observed along the kinetics whatever the epididymal region considered, suggesting that this isoform has a different role in the epididymal physiology from the TGF- β 1 and TGF- β 2 isoforms. Nevertheless, as for TGF- β concentrations in adult mice, it should be noted that these results only concerned the total form of the protein and not the bioactive one.

Why are TGF- β s produced in the murine epididymis?

As demonstrated by the work of Pierucci-Alves, a major role of the TGF- β signaling in the murine epididymis is the maintenance of an immune tolerance to spermatozoa. Indeed,

the lack of TGF- β signaling in the dendritic cells caused a severe epididymal pathology characterized by a leukocytosis and granulomas, the generation of ASAs and an upregulation of pro-inflammatory pathways (17). Nevertheless, no data are available concerning the TGF- β isoform(s) implicated in the loss of peripheral tolerance. Our observations that spermatozoa arrival was correlated with a significant increase in the TGF- β 1 and TGF- β 2 concentrations in the *caput* epididymis suggest that these isoforms may play a role in this process. However, the immunofluorescence stainings pointed to the lack of TGF- β RIII in immune cells, and as this receptor is essential for an optimal TGF- β 2 signaling, it seems unlikely that this isoform indeed plays a role in the DC-mediated epididymal tolerance.

This leave TGF- β 1 as the main player. This is in agreement with the observation that TGF- β 1 has well-characterized actions on immune cells to induce a tolerogenic environment. It has been shown that, *in vitro*, it can inhibit both human and mouse dendritic cells maturation, *via* the downregulation of the expression of costimulatory molecules (19–21). It has also been demonstrated that the TGF- β 1 could decrease the expression of MHC class II molecules on dendritic cells, thus influencing their antigen presentation activity (20).

Moreover, in an *in vitro* model, TGF- β s were shown to modulate the permeability of the blood- epididymal barrier (BEB) (22). Among the TGF- β isoforms, the TGF- β 3 was shown to strongly increase the BEB permeability whereas the TGF- β 1 had a lower impact, and the TGF- β 2 virtually none. As hypothesized by the authors, the modulation of the BEB permeability could allow the migration of dendritic cells into the epididymal epithelium, and thus the establishment of peripheral tolerance to sperm cells thanks to the dendritic cell sampling of luminal sperm antigens.

Finally, the TGF- β 1 is well known to play a role in the immunosuppressive activity of the human seminal plasma (23,24). However, the epididymis did not seem to take a

significant part in this production, as seminal TGF- β concentrations were normal in men with epididymal occlusions (25).

On the other hand, TGF- β could be one of the actors involved in the low occurrence of primary epididymal cancers. Indeed, the TGF- β was shown to suppress tumor initiation and early development through the inhibition of cell cycle progression, induction of apoptosis, and suppression of growth factor, cytokine and chemokine expression (26).

In conclusion, this work highlights specific expression and localization patterns for each TGF- β isoform, suggesting non-redundant roles in the murine epididymis. Further investigations will be needed to understand the specific role(s) of the TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 in the organ. To do so, the Cre-LoxP system could be exploited to generate epididymis- specific knockout mice for each isoform (27–29) even if this technique remains limited in the murine epididymis since only Cre recombinases specific of the *caput* principal cells are available (30,31). Given the great implication of the TGF- β signaling in maintaining the tolerance to sperm cells in the epididymis, identifying the individual roles of the TGF- β isoforms certainly is the first step to efficiently treat tolerance breakdowns in the epididymal compartment.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AV and RG designed the experiments and drafted the manuscript. AV and CDS performed the immunohistochemistry experiments. AV performed the RT-qPCR experiments. AV and CG performed the Western blots. RG performed the ELISA. SB was in charge of the mouse welfare and handling. JHB took part to the discussion of the results. FS and JRD took part to the discussion of the results and revised the article. All authors read and approved the final manuscript.

375

376 **COMPETING INTERESTS**

377 All authors declare no competing interests.

378

379 **ACKNOWLEDGMENTS**

380 The authors would like to thank the Cézeaux staff of the animal facility (Université Clermont
381 Auvergne, Campus des Cézeaux, Aubière) for mouse care, the CLIC platform (GReD
382 laboratory) for help in confocal imaging, and the Anipath platform (GReD laboratory) for
383 histology support. AV was supported by the French Ministry of Higher Education and
384 Research (MESR). FS, JRD and RG received funds from INSERM, CNRS and MESR.

385

386 **REFERENCES**

- 387 1. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2010
388 Jan;11(1):21–7.
- 389 2. Gilliet M, Liu Y-J. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-
390 activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2002 Mar 18;195(6):695–704.
- 391 3. Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+
392 regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2006 Sep;80(3):458–70.
- 393 4. Francavilla F, Santucci R, Barbonetti A, Francavilla S. Naturally-occurring antisperm
394 antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Front*
395 *Biosci J Virtual Libr.* 2007 May 1;12:2890–911.
- 396 5. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA. Transforming growth factor-
397 beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:99–146.
- 398 6. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming
399 growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev.* 2002 Dec;23(6):787–823.
- 400 7. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted
401 disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal
402 inflammatory disease. *Nature.* 1992 Oct 22;359(6397):693–9.

- 403 8. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming
404 growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and
405 early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jan 15;90(2):770–4.
- 406 9. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective
407 haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice.
408 *Dev Camb Engl*. 1995 Jun;121(6):1845–54.
- 409 10. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, et
410 al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-
411 overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Dev Camb Engl*. 1997
412 Jul;124(13):2659–70.
- 413 11. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, et al.
414 Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates
415 defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet*. 1995 Dec;11(4):415–21.
- 416 12. Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, et al.
417 Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet*.
418 1995 Dec;11(4):409–14.
- 419 13. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the
420 nucleus. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):685–700.
- 421 14. Desai KV, Flanders KC, Kondaiah P. Expression of transforming growth factor-beta
422 isoforms in the rat male accessory sex organs and epididymis. *Cell Tissue Res*. 1998
423 Nov;294(2):271–7.
- 424 15. Bomgardner D, Wehrenberg U, Rune GM. TGF-beta could be involved in paracrine
425 actions in the epididymis of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Androl*. 1999
426 Jun;20(3):375–83.
- 427 16. Oh YS, Na EJ, Gye MC. Effects of bilateral vasectomy on the interleukin 1 system in
428 mouse epididymis. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. 2016;76(3):235–42.
- 429 17. Pierucci-Alves F, Midura-Kiela MT, Fleming SD, Schultz BD, Kiela PR. Transforming
430 Growth Factor Beta Signaling in Dendritic Cells Is Required for Immunotolerance to
431 Sperm in the Epididymis. *Front Immunol*. 2018;9:1882.
- 432 18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities
433 of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May
434 7;72:248–54.
- 435 19. Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K. Contrasting effects of TGF-beta 1 and
436 TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone
437 marrow. *Stem Cells Dayt Ohio*. 1997;15(2):144–53.
- 438 20. Geissmann F, Revy P, Regnault A, Lepelletier Y, Dy M, Brousse N, et al. TGF-beta 1
439 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol*
440 *Baltim Md* 1950. 1999 Apr 15;162(8):4567–75.

21. Ronger-Savle S, Valladeau J, Claudy A, Schmitt D, Peguet-Navarro J, Dezutter-Dambuyant C, et al. TGFbeta inhibits CD1d expression on dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2005 Jan;124(1):116–8.
22. Stammer A, Müller D, Tabuchi Y, Konrad L, Middendorff R. TGFβs modulate permeability of the blood-epididymis barrier in an in vitro model. *PloS One*. 2013;8(11):e80611.
23. Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*. 2005 Oct;322(1):43–52.
24. Robertson SA, Ingman WV, O’Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. Transforming growth factor beta--a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol*. 2002 Nov;57(1–2):109–28.
25. Loras B, Vételé F, El Malki A, Rollet J, Soufir JC, Benahmed M. Seminal transforming growth factor-beta in normal and infertile men. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1999 Jun;14(6):1534–9.
26. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. 2010 Jun;31(6):220–7.
27. Azhar M, Yin M, Bommireddy R, Duffy JJ, Yang J, Pawlowski SA, et al. Generation of mice with a conditional allele for transforming growth factor beta 1 gene. *Genes N Y N* 2000. 2009 Jun;47(6):423–31.
28. Doetschman T, Georgieva T, Li H, Reed TD, Grisham C, Friel J, et al. Generation of mice with a conditional allele for the transforming growth factor beta3 gene. *Genes N Y N* 2000. 2012 Jan;50(1):59–66.
29. Ishtiaq Ahmed AS, Bose GC, Huang L, Azhar M. Generation of mice carrying a knockout-first and conditional-ready allele of transforming growth factor beta2 gene. *Genes N Y N* 2000. 2014 Sep;52(9):817–26.
30. Björkgren I, Saastamoinen L, Krutskikh A, Huhtaniemi I, Poutanen M, Sipilä P. Dicer1 ablation in the mouse epididymis causes dedifferentiation of the epithelium and imbalance in sex steroid signaling. *PloS One*. 2012;7(6):e38457.
31. Xie S, Xu J, Ma W, Liu Q, Han J, Yao G, et al. Lcn5 promoter directs the region-specific expression of cre recombinase in caput epididymidis of transgenic mice. *Biol Reprod*. 2013 Mar;88(3):71.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of the TGF-β isoforms.

(A) mRNA expression of the three isoforms of the *Tgf-β* in the *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymides of adult mice. The expression level was determined by qRT-PCR and *36b4* was

used to normalize the results. Bars represent means $\pm$ SD. n=6, Mann-Whitney *U* test, **P* < 0.05, ***P* < 0.01. (B) TGF- β s protein expression in adult mice *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymides. The concentrations (pg/mg tissue) were determined by ELISA and normalized with the compartment weight. Bars represent means $\pm$ SD. n=6, Mann-Whitney *U* test, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

Figure 2. Activation state of the TGF- β signaling pathway.

(A) mRNA expression of the three isoforms of the *Tgf- β* receptors in the *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymides of adult mice. *36b4* was used to normalize the results. Bars represent means $\pm$ SD. n=6, Mann-Whitney *U* test, **P* < 0.05, ***P* < 0.01. (B) Western blot analysis of the expression of the adaptor molecules of the TGF- β signaling pathway in the *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymides of adult mice. These results are representative of 6 mice. (C) Relative quantification of the ratio between the SMAD3 and its phosphorylated form (pSMAD3) in the *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymides of adult mice. GAPDH was used to normalize the results. Bars represent means $\pm$ SD. n=6, Mann-Whitney *U* test, ***P* < 0.01.

Figure 3. Localization of the TGF- β isoforms and of the TGF- β receptors.

Immunohistochemistry using specific antibodies directed against each TGF- β and TGF- β R isoform in the initial segment, *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymides of adult mice. L: lumen, ep: epithelium, I: interstitium. Scale bars represent 20 μ m. n=5-11 depending on the antibody.

Figure 4. TGF- β -producing cells.

Immunofluorescent stainings using an anti-CD45 (pan-leukocyte, green) combined to each isoform of TGF- β s and receptors (A555, red). The *corpus* epididymis staining is representative of all segments of adult mice. * show co-stained cells. L: lumen, ep: epithelium, I: interstitium, c: capsule, SM: smooth muscle. Scale bars represent 10 μ m. n=5-6 depending on the antibody.

Figure 5. Kinetics of postnatal expression of the TGF- β isoforms.

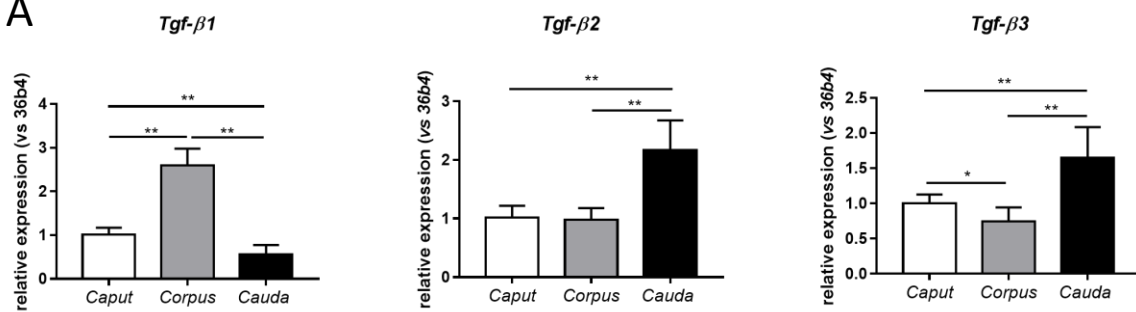
TGF- β isoforms concentrations were determined by ELISA in the *caput*, *corpus*, and *cauda* epididymides of mice aged 15 to 30 days. The results were expressed relative to the compartment weight (pg/mg tissue). Bars represent means $\pm$ SD. n=5 (TGF- β 1 and TGF- β 2), n=4 (TGF- β 3), Mann-Whitney *U* test, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

Table 1. Primer sequences used to determine the expression level of the isoforms of TGF- β s and receptors by qRT-PCR.

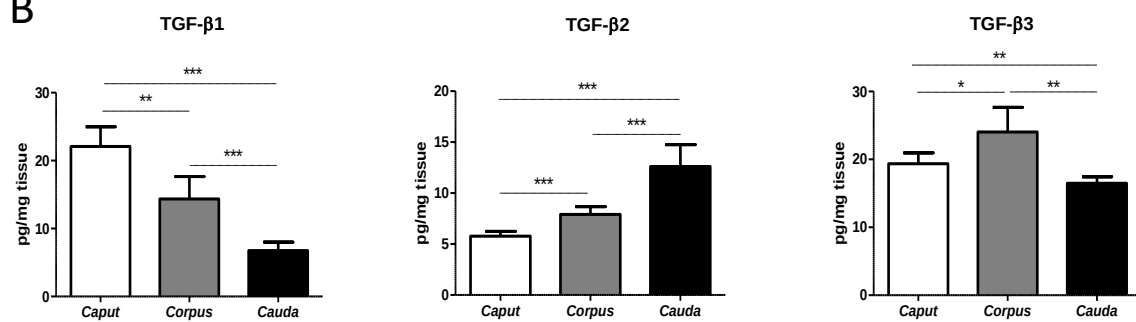
Table 2. Summary of the immunohistochemistry results.

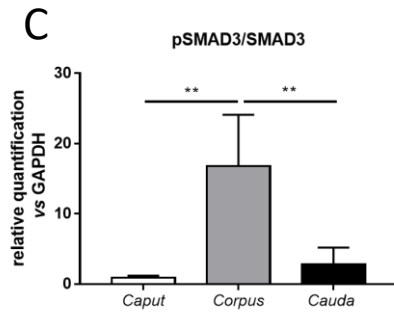
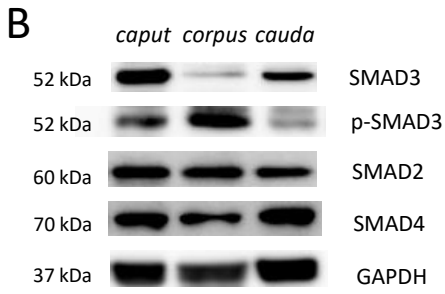
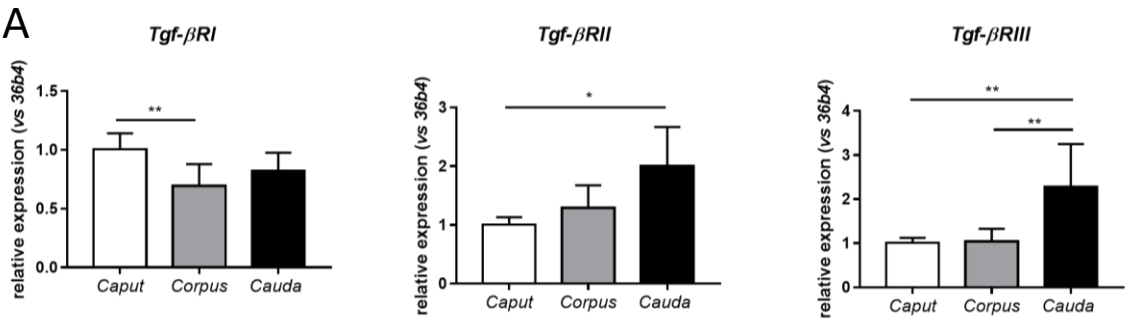
Table showing the relative quantification and preferential localization of the isoforms of TGF- β s and receptors in the initial segment, *caput* (proximal and distal), *corpus*, and *cauda* epididymides of adult mice. I: interstitium, Ep: epithelium, L: lumen, SM: smooth muscle, AP: apical cells, BC: basal cells, HC: halo cells, NC: narrow cells, PC: principal cells. -: absence of positive cells, +: low number of positive cells, ++: moderate number of positive cells, +++: high number of positive cells, ++++: very high number of positive cells. These observations are representative of 5 to 11 different mice.

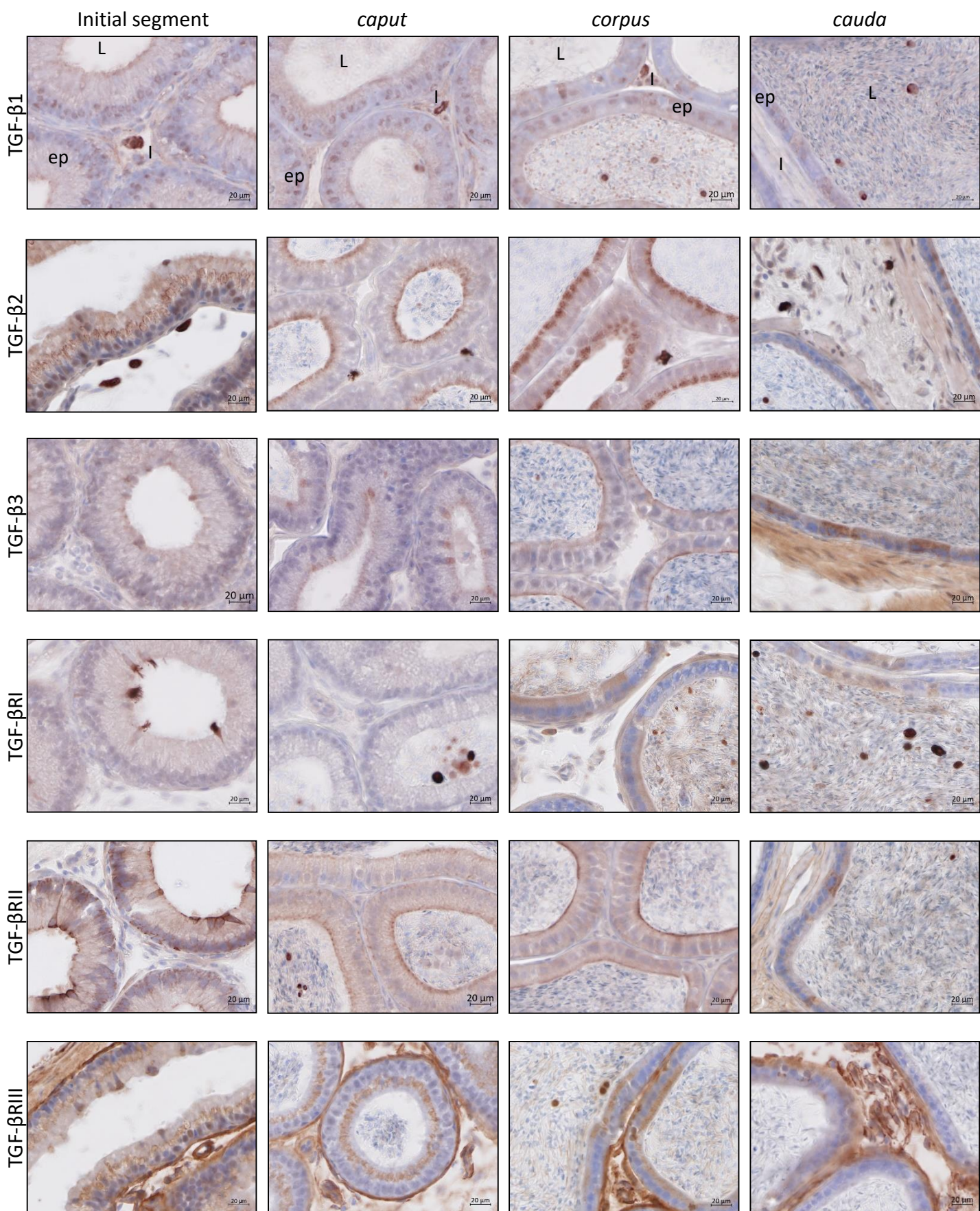
A

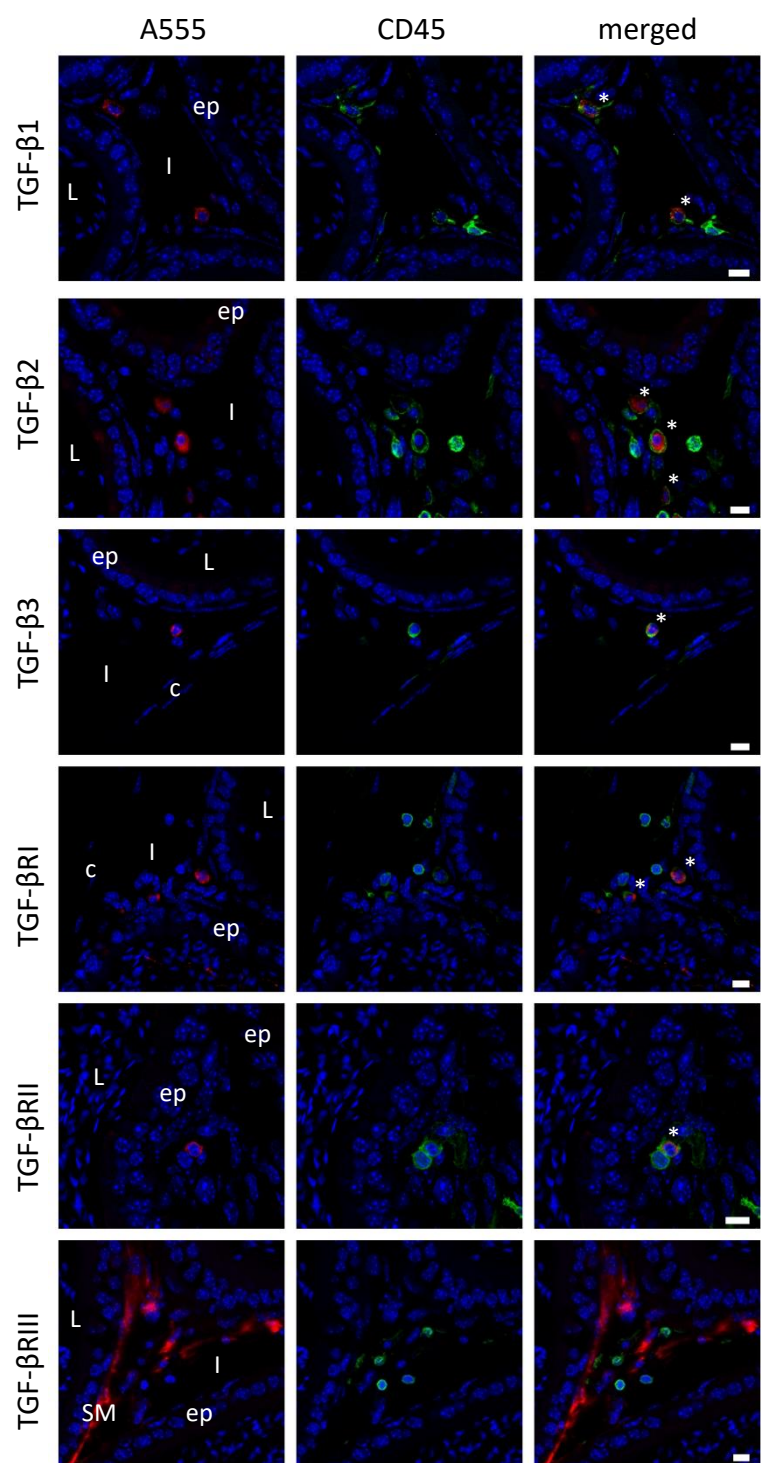


B

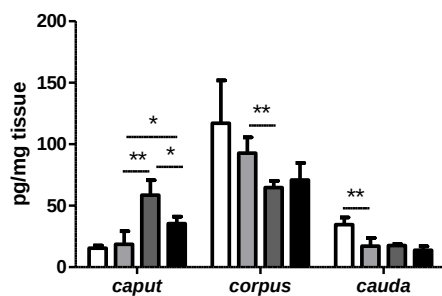




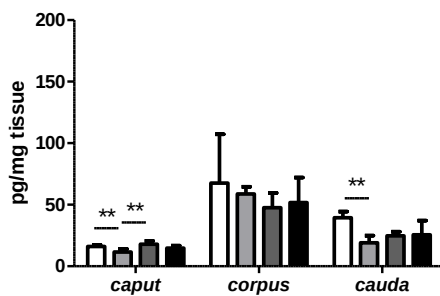




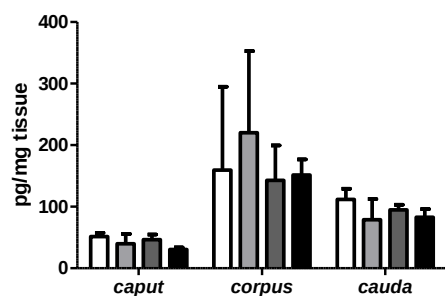
TGF-β1



TGF-β2



TGF-β3



15 days 20 days 25 days 30 days

Gene	Primer sequences (5'-3')	
	Forward	Reverse
<i>Tgf-β1</i>	AGGGCTACCATGCCAACTTC	CCACGTAGTAGACGATGGGC
<i>Tgf-β2</i>	GGGTCTTCCGCTTGCAAAAC	GAAGGAGAGCCATTCACCCT
<i>Tgf-β3</i>	AGCGCTACATAGGTGGCAAG	CCATTGGGCTGAAAGGTGTG
<i>Tgf-βRI</i>	TGCTGCAATCAGGACCACTG	TGGTGAATGACAGTGCCGGTT
<i>Tgf-βRII</i>	GAGTCGTTCAAGCAGACGGA	GAACCAAATGGGGGCTCGTA
<i>Tgf-βRIII</i>	CCCTGCATCTGAACCCCAT	GACCACAGAACCCTCCGAAA

	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3	TGF-βRI	TGF-βRII	TGF-βRIII
Initial segment	I: ++ Ep: + (AC) L: -	I: +++ Ep: ++ (mid-height granular staining) L: -	I: - Ep: ++ (AC) L: -	I: - Ep: + (AC, HC, stereocils) L: -	I: - Ep: ++ (AC, BC, NC) L: -	I: +++ Ep: +++ (AC, mid-height granular staining) L: - SM: +++
Caput	<u>Proximal</u> I: + Ep: - L: - <u>Distal</u> I: ++ Ep: + (PC) L: +	<u>Proximal</u> I: + Ep: - L: + <u>Distal</u> I: ++ Ep: +++ (PC) L: +	<u>Proximal</u> I: - Ep: +++ (AC) L: - <u>Distal</u> I: - Ep: +++ (AC) ++ (PC) L: -	<u>Proximal</u> I: + Ep: - L: + <u>Distal</u> I: + Ep: + (PC) L: ++	<u>Proximal</u> I: + Ep: - L: - <u>Distal</u> I: + Ep: ++ (PC) L: +	<u>Proximal</u> I: +++ Ep: +++ (PC, apical granular staining) L: - SM: ++++ <u>Distal</u> I: ++++ Ep: +++ (PC, apical granular staining) L: + SM: ++++
Corpus	I: +++ Ep: ++ (PC) L: ++	I: ++ Ep: ++++ (PC) L: ++	I: + Ep: +++ (PC) + (AC) L: +	I: ++ Ep: ++ (PC) L: +++	I: + Ep: +++ (PC) L: +	I: ++++ Ep: ++ (apical granular staining) L: ++ SM: ++++
Cauda	I: ++ Ep: + (PC) L: +++	I: +++ Ep: +++ (PC) L: ++	I: - Ep: ++ (PC) L: +	I: ++ Ep: + (PC) L: ++++	I: + Ep: + (PC) L: ++	I: ++++ Ep: + (apical granular staining) L: ++ SM: ++++

Discussion & Perspectives

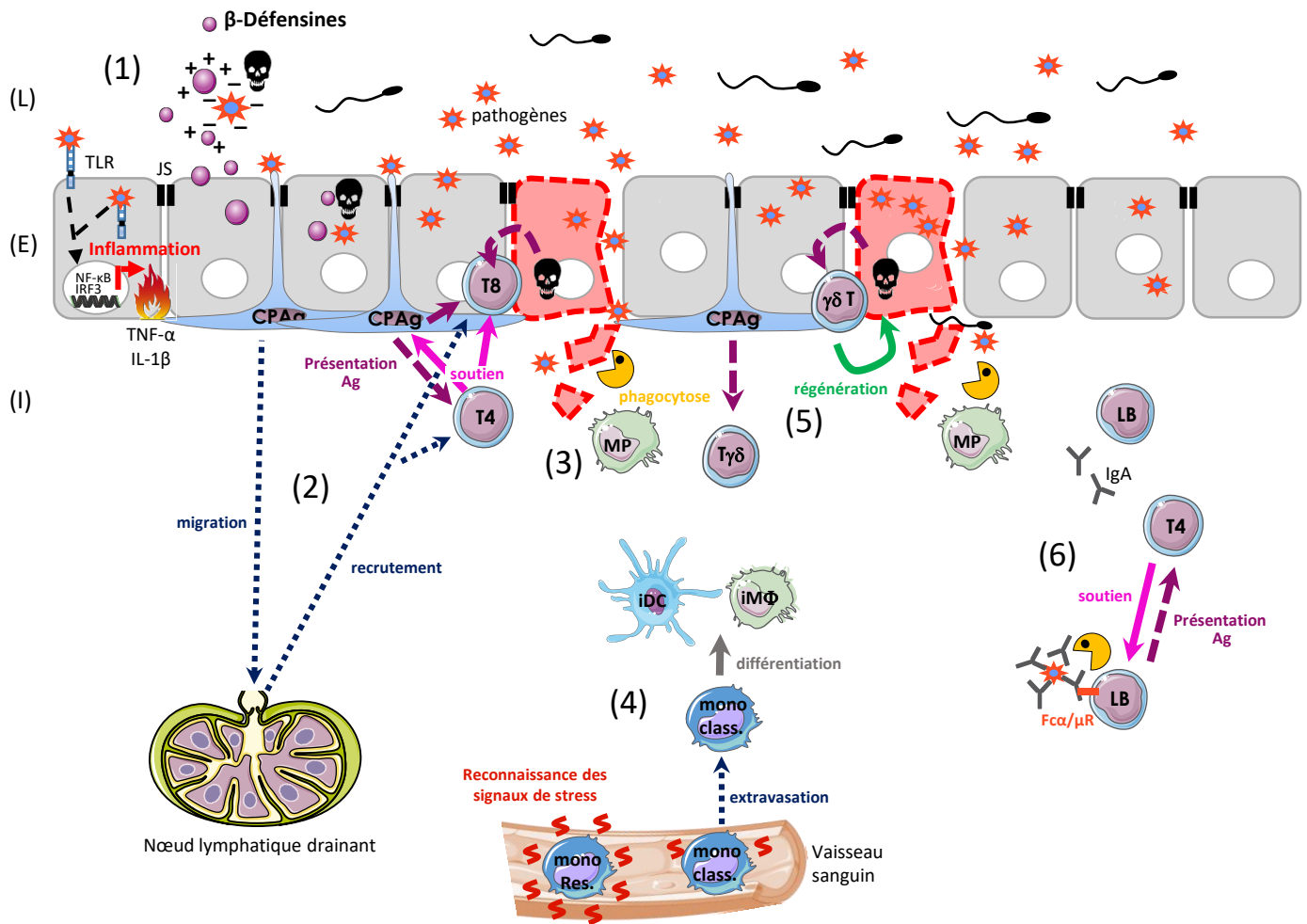


Figure 22 : Modèle hypothétique de la réponse aux pathogènes dans l'épididyme.

(1) Protéines de défense épидидymaires impliquées dans la réponse immunitaire innée. (2) Les CPAg pourraient échantillonner le contenu luminal et présenter les antigènes aux LT, *in situ* ou dans le nœud lymphatique drainant pour induire l'élimination du pathogène. (3) En cas de rupture épithéliale, certains MP CX3CR1⁺ pourraient participer à l'élimination des débris cellulaires ou des pathogènes libérés dans l'interstitium. (4) Les monocytes détectent les signaux de stress ce qui induit leur extravasation dans les tissus et leur différenciation en DC et macrophages inflammatoires (iDC et iMΦ) qui soutiennent temporairement la réponse immunitaire. (5) Les LTγδ pourraient participer à l'élimination du pathogène et à la préservation de l'intégrité de l'épithélium épидидymaire. (6) Les LB pourraient synthétiser les IgA et phagocyter les complexes bactérie/IgA pour limiter la dissémination des pathogènes. Les LB activés pourraient également activer la réponse adaptative en présentant les antigènes aux LT épидидymaires.

(L) : lumière, (E) : Epithélium, (I) : Interstitium, JS : jonction serrée, TLR : *Toll-like receptor*, TNF : *tumor necrosis factor*, IL : interleukine, IRF : *Interferon regulatory factor*, NF-κB : *nuclear factor-kappa B*, CPAg : cellule présentatrice d'antigène, T4/T8 : lymphocyte T CD4⁺ ou CD8⁺, MP: phagocyte mononucléaire, mono res : monocyte résident, mono class : monocyte classique, LB : lymphocyte B, IgA : immunoglobuline A, Fcα/μR : récepteur du fragment constant alpha/mu, Ag, antigène.

La première partie de mon travail de thèse concernait la caractérisation des cellules immunitaires présentes à l'état physiologique dans l'épididyme murin, pré-requis à la compréhension des mécanismes impliqués d'une part dans la réponse aux pathogènes et aux cellules cancéreuses et d'autre part dans l'établissement et/ou le maintien de la tolérance périphérique aux spermatozoïdes. Dans un second temps, mon travail s'est concentré sur un acteur clé de cette tolérance périphérique, le TGF- β .

Ces résultats, complétés par les données bibliographiques disponibles, nous permettent d'avoir une vision plus globale des cellules et molécules potentiellement impliquées dans la balance immune épидидymaire, ce qui, en lien avec le rôle connu de ces différents acteurs, nous a permis d'établir un modèle hypothétique de l'immunité épидидymaire. Ce modèle fait l'objet d'une revue présentée en **Annexe** et actuellement soumise pour publication dans *Asian Journal of Andrology*. La discussion qui suit, bien que basée sur les résultats de ma thèse, reprend les principaux points évoqués dans la revue, complétés par des perspectives visant à approfondir et valoriser le travail accompli.

La réponse aux pathogènes

L'épididymite, pathologie inflammatoire la plus fréquente du tractus uro-génital mâle, est associée à un nombre important d'infertilités masculines. Cependant, les mécanismes complexes gouvernant l'immunité de l'épididyme en réponse à l'infection et à l'inflammation sont peu connus. Ces études sont pourtant nécessaires au développement d'outils de diagnostic efficaces et de nouvelles stratégies thérapeutiques. La **Figure 22** propose un modèle hypothétique de la réponse aux pathogènes dans l'épididyme.

Les protéines de défense

La première étape de la réponse immunitaire innée repose sur la reconnaissance des pathogènes et l'initiation de la réponse inflammatoire. Les cellules de l'épithélium épидидymaire

jouent un rôle actif dans ces mécanismes grâce à l'expression de nombreux TLRs (Tanaka et al., 1995 ; Rodrigues et al., 2008 ; Zhu et al., 2015 ; Cheng et al., 2016 ; Michel et al., 2016).

Les β -défensines, constitutivement exprimées dans l'épididyme, jouent également un rôle clé dans la réponse innée aux pathogènes puisqu'elles sont capables de les cibler et de les détruire (Fei et al., 2012 ; Biswas et al., 2015) (**Figure 22 [1]**). De nombreuses autres protéines de défense commeIDO, les cathélicidines, les inhibiteurs de protéases, les chimiokines, la lactoferrine, et le lysozyme ont été décrites dans l'épididyme mais leur implication réelle dans la réponse aux pathogènes épididymaires n'est pour le moment pas démontrée.

En complément des protéines de défense, la réponse aux pathogènes repose sur l'action des cellules immunitaires présentes dans l'organe.

Les phagocytes mononucléaires

La nécessité de mise en place d'une réponse immune classique (CPAg/LT) est particulièrement importante en tête d'épididyme puisque cette région représente le dernier verrou avant une atteinte testiculaire. De manière concordante, nous avons pu mettre en évidence une présence significativement plus importante de toutes les sous-populations de CPAg (macrophages et DCs) dans cette région. Cependant, les CPAg et les LT sont retrouvés tout le long de l'organe, ce qui suggère que ce type de réponse pourrait être conservé de la tête à la queue de l'épididyme. Dans le segment initial, les CPAg épididymaires sont en partie situées à la base de l'épithélium et sont capables d'émettre des projections cytoplasmiques en direction de la lumière (Da Silva et al., 2011 ; Shum et al., 2014). Grâce à cette morphologie particulière, les CPAg pourraient échantillonner le contenu luminal et traiter les antigènes pour les présenter aux LT. Ces derniers pourraient alors participer à l'élimination des pathogènes, soit directement pour les LT CD8⁺ cytotoxiques, soit indirectement pour les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires (**Figure 22 [2]**). Dans les segments postérieurs au segment initial, les CPAg épithéliales sont situées à la base de l'épithélium et n'émettent pas, à l'état physiologique, de projection en

direction de la lumière. Cela suggère que les CPAg épithéliales ne réalisent pas l'échantillonnage à l'état physiologique mais qu'elles pourraient changer de morphologie pour capter les antigènes luminaux en contexte infectieux. De plus, tout au long de l'épididyme une partie des CPAg est localisée dans l'interstitium. Ces cellules pourraient donc participer à la reconnaissance des pathogènes et à la présentation antigénique après destruction de la BHE.

Une certaine redondance des marqueurs membranaires est observée entre les populations de CPAg, ce qui complique leur caractérisation et rend impossible l'utilisation de marqueurs uniques pour les différencier. Afin d'affiner et de compléter les travaux précédemment publiés, nous avons choisi d'utiliser la cytométrie en flux associée à une large combinaison de marqueurs pour identifier et quantifier de manière non équivoque les populations et sous-populations de phagocytes mononucléaires (CPAg et monocytes) présentes à l'état physiologique dans la tête et la queue de l'épididyme murin.

Conformément aux données de la littérature, nous avons pu mettre en évidence que les macrophages sont les cellules immunitaires les plus représentées dans l'épididyme murin (Nashan et al., 1989). Le choix des marqueurs à utiliser dans ce type d'analyse est rendu difficile par l'absence de liste universelle, l'hétérogénéité des marqueurs dépendant de l'organe étudié et de la plasticité de ces cellules (Geissmann et al., 2010). Nous avons donc fait le choix d'une liste complexe pour éviter la contamination par des faux positifs. Cependant, ce faisant, nous avons peut-être sous-estimé le nombre de macrophages puisque différentes sous-populations existent et qu'au sein d'une même population, en fonction de l'état d'activation, toutes les cellules n'expriment pas forcément les mêmes marqueurs (Geissmann et al., 2010). Une proportion de phagocytes mononucléaires épидидymaires exprimant le marqueur CX₃CR1 est capable *in vivo*, après ligation du canal efférent, de phagocyter les cellules épithéliales apoptotiques pour préserver l'intégrité de l'épithélium (Smith et al., 2014). Une telle caractéristique pourrait être attribuée à une population macrophagique et contribuer à la

résolution d'une infection grave ayant entraîné une destruction partielle de la BHE et une libération locale de débris cellulaires et de pathogènes (**Figure 22 [3]**). Il serait ainsi intéressant de compléter l'analyse phénotypique réalisée et d'effectuer des analyses fonctionnelles des sous-populations de macrophages épидидymaires, à l'état physiologique et en contexte inflammatoire.

Nous avons également confirmé l'existence de trois sous-types de cDCs dans l'épididyme murin : les cDC1, les cDC2 et les DCs CD11b⁺ CD103⁺ (sous-population de cDC2 décrite dans l'intestin). Du fait de l'absence d'anticorps commercial anti-CD11c⁺ fonctionnant en histologie dans l'épididyme murin, nous n'avons pas pu les localiser. Une alternative serait l'utilisation de souris CD11c-EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) exprimant la protéine fluorescente EYFP sous le contrôle du promoteur du CD11c, marqueur commun aux CPAg (Lindquist et al., 2004), en association avec des anticorps anti-CD103, anti-CD11b ou anti-CD64. Cela permettrait de distinguer les cDC1 (CD11c⁺ CD103⁺ CD11b⁻), les cDC2 (CD11c⁺, CD103⁻, CD11b⁺, CD64⁻) et les DCs de type intestinal (CD11c⁺ CD103⁺ CD11b⁺) et de préciser leurs fonctions au sein du tissu, en lien avec les données publiées dans d'autres organes.

L'une des perspectives à court terme de mon projet est de tester, *in vivo*, la capacité des CPAg à échantillonner le contenu luminal. Pour cela, nous comptons injecter des antigènes fluorescents directement dans la lumière du tubule en tête d'épididyme, ou des bactéries fluorescentes dans le canal déférent et suivre la fluorescence. En couplant cette approche avec de la cytométrie en flux, nous serons capables de connaître l'identité précise des cellules captant l'antigène. De plus, cette approche nous permettra de déterminer si les antigènes sont présentés *in situ* à des LT mémoires et/ou dans le nœud lymphatique drainant à des LT naïfs.

Enfin, les deux sous-populations de monocytes qui complètent les phagocytes mononucléaires, les monocytes classiques et les monocytes résidents, sont présentes en faible

proportion dans l'épididyme murin. Suite à une infection, ces cellules sont capables de reconnaître des signaux de stress et d'une part, d'induire le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection *via* la synthèse de chimiokines et d'autre part, de se différencier en macrophages et/ou DCs inflammatoires pour soutenir la réponse (**Figure 22 [4]**).

Les lymphocytes $T\gamma\delta$

Ce travail de cytométrie visait également les lymphocytes et a permis d'identifier des $LT\gamma\delta$, cellules typiques des épithélia muqueux, que nous avons localisées par immunofluorescence dans les compartiments interstitiels et intraépithéliaux de l'épididyme murin. Les $LT\gamma\delta$ détectent les signaux de danger (PAMPs/DAMPs) à la fois *via* leur TCR et *via* des récepteurs non-TCR (TLR et récepteurs NKR [*natural killer receptors*]). Une fois activés, ils contribuent à l'élimination des agents pathogènes soit de manière directe par la production de molécules bactériostatiques ou lytiques, telles que la granulysine, les défensines, les perforines/granzymes ou l'engagement de récepteurs de mort, soit de manière indirecte par l'induction de fonctions antibactériennes dans les cellules épithéliales et les cellules immunitaires (Bonneville et al., 2010). D'autre part, les $LT\gamma\delta$ favorisent également la cicatrisation des tissus et la régénération des cellules épithéliales par la production de facteurs de croissance et de facteurs de survie (Jameson and Havran, 2007). Suite à une infection de l'épididyme, les $LT\gamma\delta$ pourraient donc participer à l'élimination du pathogène et à la préservation de l'intégrité de l'épithélium épididymaire (**figure 22 [5]**). Cependant, la majeure partie des $LT\gamma\delta$ résidant dans les tissus présentent une diversité de leur TCR limitée, qui conditionne en partie leurs fonctions. Il sera donc nécessaire de caractériser le/les sous-types de $LT\gamma\delta$ présents dans l'épididyme murin.

Les lymphocytes B

Pour la première fois, nous avons mis en évidence des LB dans l'épididyme murin. Ils pourraient être responsables de la synthèse importante des IgA (Immunoglobuline A) retrouvées dans le tissu (Stern et al., 1992) et qui sont des acteurs clés de l'immunité des muqueuses. Dans l'intestin, la synthèse d'IgAs par les plasmocytes de la *lamina propria* est induite en réponse aux bactéries. Elles sont ensuite transportées à travers l'épithélium par le récepteur polymérique des immunoglobulines et libérées sous forme d'IgA sécrétoires dans la lumière intestinale où elles peuvent se fixer aux bactéries et ainsi les neutraliser. Dans l'épididyme, l'absence du composant sécrétoire a été décrite (Stern et al., 1992). Les IgAs ne peuvent donc pas être sécrétées dans la lumière du tubule, et sont confinées dans l'interstitium, en accord avec la forte présence des LB dans ce compartiment, où elles pourraient jouer un rôle crucial en cas de rupture la BHE. En effet, l'expression d'un récepteur spécifique des IgA et IgM, le Fc α / μ R, a été décrite dans plusieurs organes reproducteurs tels que le placenta et le testicule, or dans la rate, le Fc α / μ R est localisé à la surface des macrophages et des LB et permet la phagocytose du complexe bactérie/Ig par ces derniers (Shibuya et al., 2000). Si la présence de ce récepteur était avérée dans l'épididyme, ce processus de phagocytose pourrait être mis en place et participer à la limitation de la propagation des agents pathogènes tout en initiant la réponse adaptative *via* la présentation antigénique aux LT épididymaires (**Figure 22 [6]**).

Pour confirmer ce modèle hypothétique global de réponse et étudier l'implication de chaque population immunitaire identifiée à l'état physiologique, un modèle d'épididymite bactérienne expérimentale devra être mis en place. Ce projet devrait être réalisable à court terme étant donné que différents modèles murins ont déjà été publiés et ont servi de base à certaines études du système immunitaire local (Michel et al., 2015).

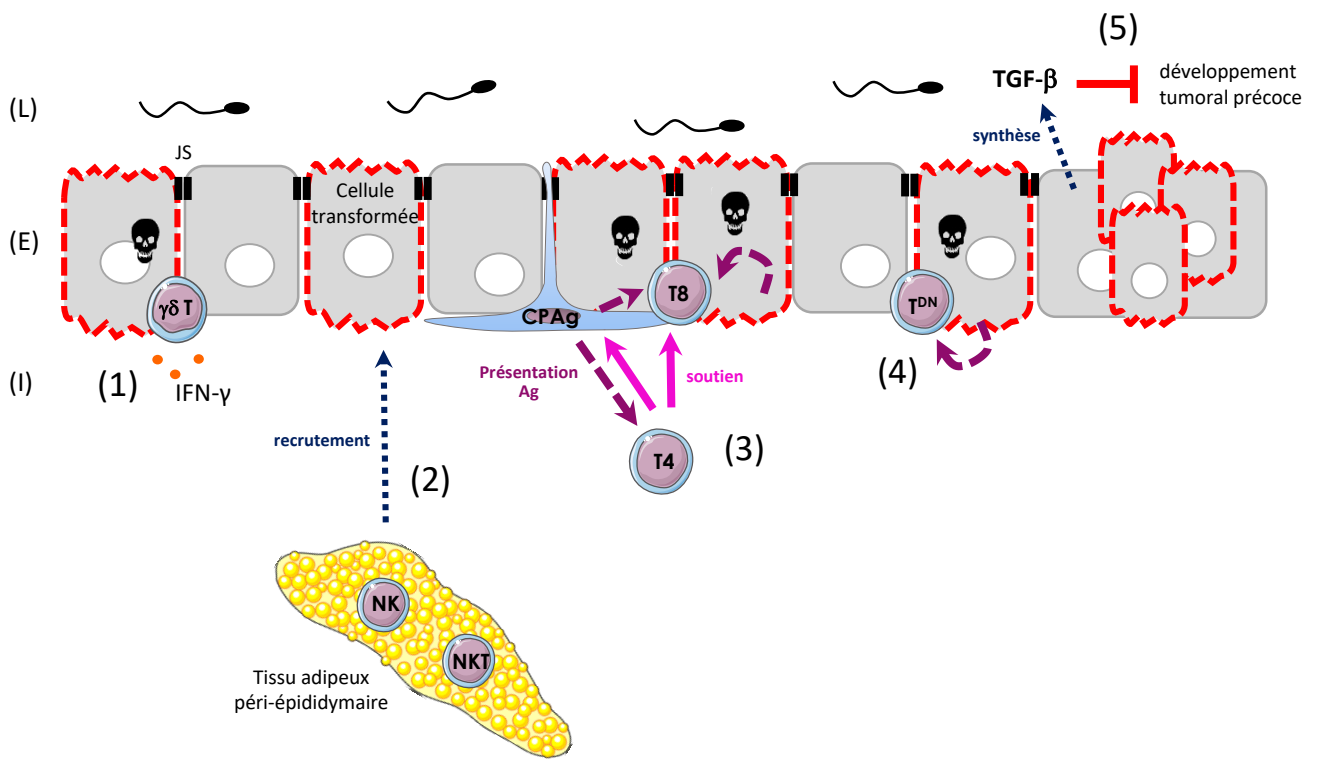


Figure 23 : Modèle hypothétique de la réponse anti-tumorale dans l'épididyme.

(1) Les LT $\gamma\delta$ activés par les cellules tumorales participeraient à leur élimination soit directement par l'engagement de récepteurs de mort et la libération de molécules effectrices cytotoxiques, soit indirectement par la synthèse d'IFN- γ qui induit la régulation positive de l'expression du CMH de classe I sur les cellules tumorales, augmentant ainsi les réponses des LT CD8 $^{+}$. (2) Le tissu adipeux péri-épididymaire pourrait participer à l'élimination des cellules cancéreuses en servant de réservoir aux cellules NK et NKT anti-tumorales. (3) Les CPAg pourraient présenter des antigènes tumoraux aux LT CD4 $^{+}$ et CD8 $^{+}$ pour initier une réponse immune classique spécifique de ces antigènes. (4) Les LT DN pourraient reconnaître les cellules transformées et acquérir des propriétés cytotoxiques afin de les éliminer. (5) Le TGF- β pourrait supprimer l'initiation et le développement tumoral précoce par l'inhibition de la progression du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la suppression de l'expression de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines.

(L) : lumière, (E) : Epithélium, (I) : Interstitium, JS : jonction serrée, IFN : interféron, NK : cellule *natural killer*, NKT : cellule NK T, CPAg : cellule présentatrice d'antigène, LT DN : LT double négatif, TGF- β : *transforming growth factor-beta*.

La réponse anti-tumorale

Le cancer de l'épididyme est un cancer rare qui ne représente que 0,03% des cancers masculins dans les pays occidentaux. De plus, c'est un cancer majoritairement bénin, ce qui suggère que dans l'organe, des mécanismes anti-tumoraux efficaces sont présents (Yeung et al., 2012). Une partie de ces mécanismes repose vraisemblablement sur la mise en place d'une réponse immune efficace contre les cellules transformées. Un modèle hypothétique de l'immunité anti-tumorale épидидymaire est présenté en **Figure 23**.

La première étape de la réponse anti-tumorale est la phase d'élimination, au cours de laquelle la croissance invasive des cellules transformées provoque des perturbations dans les tissus environnants. Ceci induit la libération de signaux de danger qui entraînent le recrutement de cellules de l'immunité innée : des LT $\gamma\delta$, des cellules NK, des cellules NKT et des CPAg (Dunn et al., 2002).

Les LT $\gamma\delta$, qui sont retrouvés dans toutes les régions de l'épididyme murin, ont été montrés capables dans d'autres organes de reconnaître des motifs sur les cellules transformées, amenant à leur activation. En retour, ils participent à l'élimination de ces cellules, soit directement par l'engagement de récepteurs de mort et la libération de molécules effectrices cytotoxiques, soit indirectement par la synthèse d'IFN- γ qui induit la régulation positive de l'expression du CMH de classe I sur les cellules tumorales, augmentant ainsi les réponses des LT CD8⁺ cytotoxiques (Gao et al., 2003 ; Riond et al., 2009 ; Silva-Santos et al., 2015 ; **Figure 23 [1]**).

Cependant certains LT $\gamma\delta$, les LT $\gamma\delta$ CD27⁻, produisent de l'IL-17 responsable du recrutement de cellules immunosuppressives qui peuvent favoriser l'angiogenèse, la croissance des cellules tumorales et le recrutement de LT $\gamma\delta$ régulateurs. (Ribot et al., 2009 ; Silva-Santos et al., 2015). Ces derniers produisent également de l'IL-4, de l'IL-10 et/ou du TGF- β et suppriment les

réponses immunitaires anti-tumorales en inhibant la maturation des cellules dendritiques et/ou les fonctions effectrices des LT $\gamma\delta$ anti-tumoraux et des LT CD4⁺ et CD8⁺ (Seo et al., 1999 ; Hao et al., 2011) Ce paradoxe conforte le caractère capital de la caractérisation du/des sous-type(s) de LT $\gamma\delta$ présent(s) dans l'épididyme.

De façon surprenante, notre analyse de cytométrie en flux a révélé une absence de cellules NK et NKT, acteurs anti-tumoraux classiques, dans l'épididyme murin à l'état physiologique. Cependant, ces résultats n'excluent pas le fait que ces cellules puissent jouer un rôle dans l'immunité anti-tumorale épидидymaire. En effet, la présence de cellules NK et NKT a été rapportée dans le tissu adipeux péri-épididymaire murin (Caspar-bauguil et al., 2005 ; Kondo et al., 2013). Ce dernier étant connecté à l'épididyme par un vaste réseau lymphatique et sanguin (Pérez-Clavier et al., 1982 ; Suzuki, 1982), nous pouvons supposer qu'il joue le rôle de réservoir pour ces cellules immunitaires qui seraient mobilisables suite à la réception des signaux de danger émis par l'épididyme (**Figure 23 [2]**).

Quant aux CPAg qui sont très représentées dans l'épididyme murin, elles pourraient tout à fait participer à la phase d'élimination *via* l'établissement d'une réponse immune classique spécifique des antigènes tumoraux, en collaboration avec les nombreux LT effecteurs CD4⁺ et CD8⁺ décrits dans le tissu (**Figure 23 [3]**).

Enfin, pour la première fois dans l'épididyme murin, nous avons mis en évidence la présence de LT double négatifs (LT^{DN}). De façon intéressante, ces cellules possèdent une activité anti-tumorale décrite *in vitro* et *in vivo*. En effet, les LT^{DN} s'avèrent hautement cytotoxiques vis-à-vis de cellules tumorales de patients souffrant de leucémie aiguë myéloïde ou de lignées cellulaires dérivées de leucémie et de lymphome, mais pas vis-à-vis de cellules normales. Les LT^{DN} sont capables de reconnaître les cellules tumorales *via* des récepteurs activateurs également exprimés par les cellules NK : le NKG2D et le DNAM-1 (*DNAX accessory molecule-1* ou CD226), ce qui renforce l'idée que ces cellules pourraient pallier

l'absence des cellules NK et NKT dans l'épididyme murin (Lee et al., 2018). Dans un autre modèle, les LT^{DN} induisent la mort par apoptose de cellules de lymphome *via* un mécanisme dépendant de l'interaction Fas-FasL, *in vivo* et *in vitro* (Young et al., 2003 ; **Figure 23 [4]**).

En complément de l'immunosurveillance exercée par les cellules immunitaires précédentes, et au vu de nos résultats concernant son expression épидидymaire, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une contribution du TGF- β dans l'inhibition du développement tumoral (**Figure 23 [5]**). En effet, le rôle de la signalisation TGF- β comme suppresseur de tumeur est bien illustré par la présence de mutations inactivatrices dans les gènes codant pour les récepteurs du TGF- β et des Smads dans les carcinomes humains, et par des études sur le développement de tumeurs dans des modèles murins (Derynck et al., 2001).

Chez l'homme, des mutations de *TGFBRII* sont fréquemment retrouvées dans les cancers du côlon, les cancers gastriques et les gliomes. Des mutations inactivatrices de *TGFBRI1* ont également été observées, notamment dans les cancers de l'ovaire, les cancers du sein métastatiques, les carcinomes pancréatiques et les lymphomes.

Dans un certain nombre de modèles murins, la délétion génétique ou la régulation négative de la signalisation du TGF- β entraîne le développement d'un phénotype malin dans des cancers du sein, de l'intestin, du pancréas ou du côlon.

Le TGF- β supprime l'initiation et le développement tumoral précoce par l'inhibition de la progression du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la suppression de l'expression de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines. Ainsi dans un système normal et sain, le TGF- β agit comme un suppresseur de tumeur. Cependant, à mesure que les tumeurs se développent, elles modifient leurs mécanismes de réponse au TGF- β et l'utilisent comme un puissant promoteur (Akhurst and Derynck, 2001).

Enfin, certaines cellules tumorales peuvent échapper à l'élimination et entrer dans une phase d'équilibre ou dormance. Dans ce processus, les LT et l'IFN- γ exercent une pression de

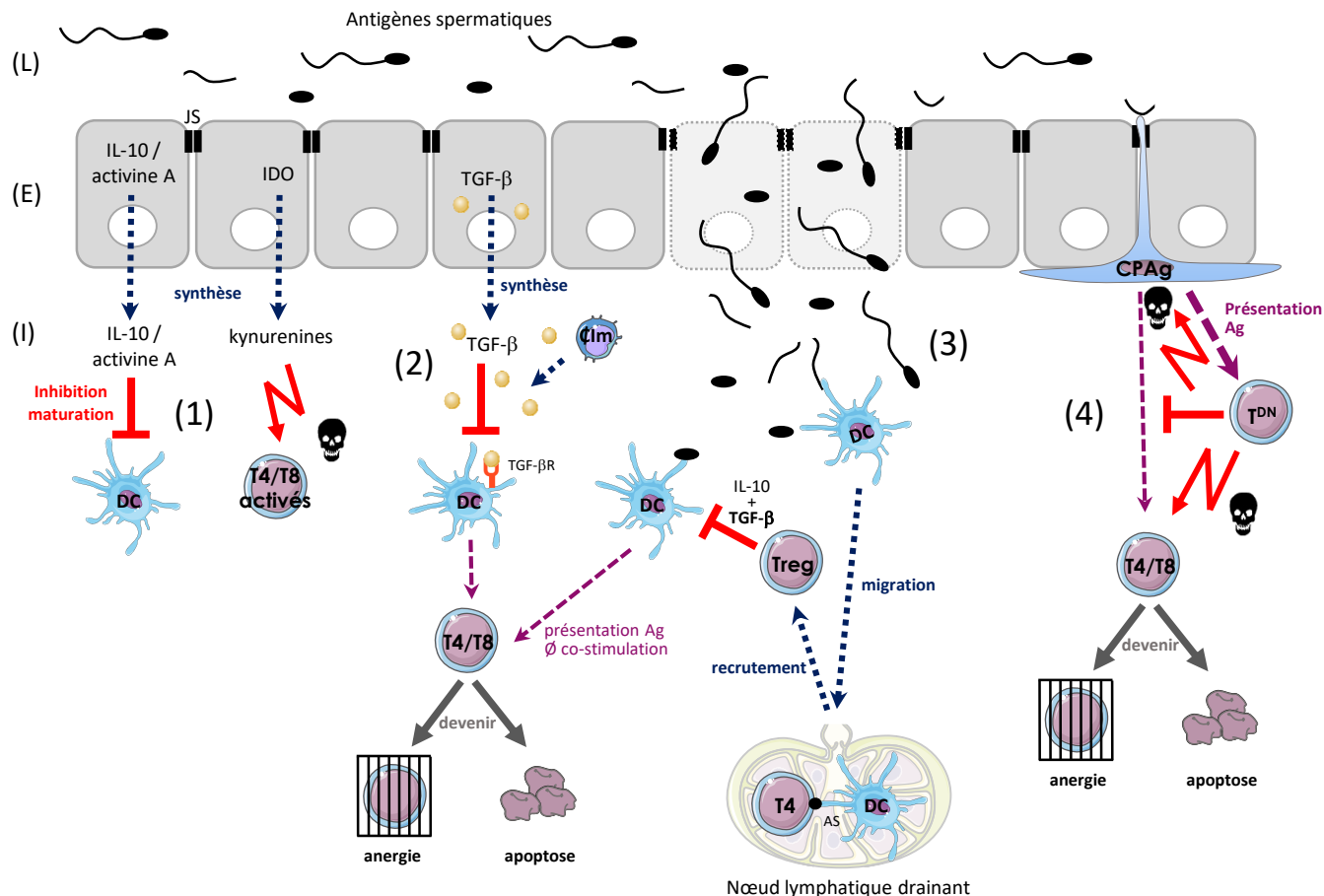


Figure 24 : Modèle hypothétique de la tolérance aux spermatozoïdes dans l'épididyme.

(1,2) L'épithélium épiddymaire sécrète des molécules pro-tolérologènes potentiellement impliquées dans la génération de DCs immatures (IL-10, activine A, TGF-β) ou dans la destruction des LT activés (kynurénines). (3) Dans le cas particulier d'une lésion tissulaire grave entraînant une fuite d'antigènes spermatiques dans l'interstitium, les DCs épiddymaires pourraient migrer dans le nœud lymphatique drainant où elles présenteraient les antigènes spermatique (AS) à des LT CD4⁺ naïfs induisant alors leur différenciation en LT régulateurs (Treg). Ces derniers, *via* la synthèse de TGF-β et d'IL-10 inhibent la maturation des DCs. La présentation antigénique dans ce contexte aboutirait à l'anergie ou à l'apoptose des LT activés. (4) Une nouvelle population de LT immunosuppresseurs, les LT double négatifs (LT^{DN}) a été décrite dans l'épididyme murin. Ils pourraient être activés par les CPAg locales pour devenir cytotoxiques envers les LT auto-réactifs et les CPAg et/ou inhiber la maturation des DCs.

(L) : lumière, (E) : Epithélium, (I) : Interstitium, JS : jonction serrée, DC : cellule dendritique, IL : interleukine, IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase, T4/T8 : lymphocyte T CD4⁺ ou CD8⁺, TGF-β : *transforming growth factor-beta*, TGF-βR : récepteur du TGF-β, LT : lymphocyte T.

sélection puissante sur les cellules tumorales, suffisante pour contenir mais pas pour éradiquer la tumeur.

Les données expérimentales soutiennent l'existence d'un contrôle efficace de la tumorigénèse dans l'épididyme. En effet, l'organe est résistant et ne développe que des phénotypes d'hyperplasie/hypertrophie en réponse à des stimuli tumorigéniques, comme l'activation d'oncogènes, la délétion de gènes suppresseurs de tumeurs ou la surexpression de facteurs de croissance (Jhappan et al., 1992 ; Stöcklin et al., 1993 ; Guy et al., 1996 ; Gilbert et al., 1997 ; Korpelainen et al., 1998 ; La Perle et al., 2002 ; Sipilä et al., 2002 ; Bieri et al., 2003 ; Frew et al., 2008). Malheureusement, ces modèles sont purement descriptifs et l'implication des cellules immunitaires dans ces phénomènes n'a jamais été étudiée. Il serait donc intéressant de confronter notre vision de l'*immunoediting* épididymaire à ces modèles puisque la compréhension des mécanismes par lesquels l'épididyme est capable d'échapper au développement de tumeurs malignes pourrait être utile pour la conception et/ou l'amélioration de thérapies anticancéreuses.

La tolérance aux spermatozoïdes

Comme nous l'avons vu en introduction, l'épididyme doit être en mesure de faire face à une arrivée massive mais tardive de spermatozoïdes immunogéniques *via* l'établissement d'une tolérance périphérique efficace, dont un modèle est proposé en **Figure 24**.

L'épithélium épididymaire joue un rôle clé dans l'établissement de cette tolérance périphérique *via* la synthèse de molécules immunosuppressives comme IDO, l'activine A, l'IL-10 et le TGF- β , créant un environnement pro-toléro-gène nécessaire à la protection des spermatozoïdes (**Figure 24 [1]**).

Parmi ces molécules, le TGF- β s'est révélé d'une importance capitale. En effet, des travaux très récents ont montré que l'inhibition de la signalisation du TGF- β dans les DCs induit

une perte de la tolérance périphérique dans l'épididyme murin, caractérisée par une infiltration leucocytaire, la formation de granulomes et le développement d'anticorps anti-spermatozoïdes (Pierucci-Alves et al., 2018). Classiquement, le TGF- β induit un phénotype de DCs immatures caractérisé par une faible expression du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation CD80/CD86 et CD40. La présentation d'antigènes spermatiques par ces DCs immatures induirait donc l'anergie ou l'apoptose des LT tissulaires (**Figure 24 [2]**).

Bien que démontrant le rôle crucial de la signalisation TGF- β dans l'établissement de la tolérance périphérique aux spermatozoïdes dans l'épididyme, cette publication ne donne pas d'indication sur les cellules productrices de TGF- β ou sur l'implication d'une isoforme particulière dans ce mécanisme. En effet, chez les mammifères le TGF- β existe sous trois isoformes : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, aux fonctions distinctes *in vivo*.

Ainsi, mon deuxième projet de thèse a porté sur l'étude du profil d'expression des différentes isoformes du TGF- β et de ses récepteurs ainsi que sur l'identité des cellules productrices dans l'épididyme murin. Ce travail a mis en évidence une implication importante de l'épithélium épididymaire qui synthétise à la fois les ligands et les récepteurs de la voie du TGF- β , et une contribution des cellules immunitaires épididymaires (CD45⁺), particulièrement pour les isoformes TGF- β 1 et TGF- β 2. Une étude plus fine sera réalisée pour déterminer l'identité exactes de ces cellules.

Pour appréhender la part réelle de chaque isoforme dans la physiologie épididymaire, l'étude de souris présentant un *knock out* (KO) conditionnel générées par le système Cre-LoxP serait nécessaire, étant donné que les KO totaux sont létaux à l'état embryonnaire ou péri-natal (Shull et al. 1992 ; Kulkarni et al. 1993 ; Kaartinen et al., 1995 ; Proetzel et al., 1995 ; Sanford et al., 1997). Cependant, cette approche reste limitée dans l'épididyme murin dans lequel aucun gène spécifique à l'organe et commun à tous les types cellulaires et/ou toutes les régions

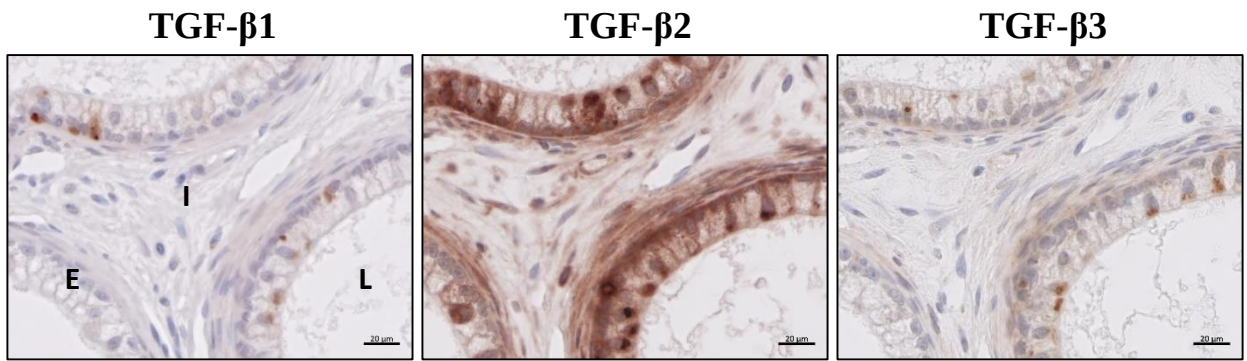


Figure 25 : Localisation par immunohistochimie des trois isoformes du TGF- β dans l'épididyme humain.

(L) : lumière ; (E) : Epithélium ; (I) : Interstitium. n=1. Echelle = 20 μ m.

épididymaires n'a été identifié. Les seuls KO conditionnels envisageables sont des KO conditionnels des cellules principales de tête d'épididyme, grâce à l'utilisation de la recombinase Cre sous contrôle du promoteur de la lipocaline 5 (Xie et al., 2013) ou de la β -défensine 41 (Björkgren et al., 2013).

En parallèle des études réalisées sur le modèle murin, j'ai étudié la localisation des 3 isoformes du TGF- β dans l'épididyme humain par immunohistochimie (**Figure 25**). Nous avons pu avoir accès à des coupes d'épididyme humain grâce à une collaboration avec le Dr Roger Mieusset, andrologue au CHU de Toulouse. De manière similaire aux données obtenues chez la souris, nous avons observé une localisation différentielle des 3 isoformes du TGF- β dans l'organe. Quelque soit l'isoforme testée, trois types de marquage ont été observés : épithélial, interstitiel et luminal. Cependant, du fait de la rareté des échantillons d'épididyme humain disponibles, cette étude se limite pour le moment à un seul individu.

En complément des molécules immunosuppressives, la tolérance périphérique repose sur l'action de cellules immunitaires particulières comme les lymphocytes T régulateurs.

Notre analyse de cytométrie en flux a révélé l'absence de LTreg CD25⁺ FOXP3⁺ dans l'épididyme murin à l'état physiologique, résultats cohérents avec ceux de Pierucci-Alves qui en rapportent une très faible proportion (Pierucci-Alves et al., 2018). Ces résultats étaient assez inattendus car l'épididyme, via son expression constitutive d'IDO et sa production abondante de kynurénines (Britan et al., 2006 ; Jrad-Lamine et al., 2011) constitue un environnement pro-différentiateur pour les LTreg (Fallarino et al., 2003 ; Fallarino et al., 2006). Cependant, les LTreg CD25⁺ FOXP3⁺ ne représentent qu'une population de lymphocytes T régulateurs (Shevach, 2006). Il serait donc intéressant d'étudier par cytométrie en flux la présence des autres populations de LTreg dans l'épididyme murin.

Bien que les LTreg CD25⁺ FOXP3⁺ ne jouent pas de rôle, à l'état physiologique, dans l'établissement et/ou le maintien de la tolérance périphérique aux spermatozoïdes, ils peuvent être des acteurs clés dans un contexte de lésion tissulaire sévère (**Figure 24 [3]**). En effet, dans un modèle murin de vasectomie, il a été mis en évidence que l'extravasation des spermatozoïdes ne déclenche pas de rupture de tolérance chez des animaux sauvages. A l'inverse, le même modèle appliqué à des souris déficientes en LTreg montre l'établissement d'une réponse auto-immune caractérisée par l'apparition d'auto-anticorps (Wheeler et al., 2011). Dans l'étude de Pierucci-Alves, une perte de la tolérance aux spermatozoïdes dans l'épididyme est observée en réponse à l'absence de signalisation TGF- β dans les DCs et ce malgré le recrutement/l'induction d'un nombre important de LTreg. Ces résultats suggèrent que dans l'épididyme murin, les LTreg médient leur action majoritairement *via* la synthèse de TGF- β (Pierucci-Alves et al., 2018).

Notre étude a également mis en évidence la présence d'une population de lymphocytes T régulateurs atypiques, les LT^{DN}. Ces cellules sont principalement décrites dans le tractus génital femelle, les reins et l'intestin, où elles agissent comme des cellules immunosuppressives (Martina et al., 2015). De manière similaire à ce qui est décrit dans la rate, les LT^{DN} épididymaires pourraient acquérir des antigènes spermatiques par trogocytose, un mécanisme de transfert membranaire entre CPAg et lymphocytes, pour devenir elles-mêmes des CPAg tout en devenant cytotoxiques envers les LT CD8⁺ auto-réactifs par un mécanisme dépendant de l'interaction Fas-FasL (Zhang et al., 2000). L'action des LT^{DN} ne se limite pas aux LT CD8⁺. En effet, ils préviennent efficacement les réponses auto-immunes en ciblant un large éventail de cellules immunitaires, notamment les LT CD8⁺, les LT CD4⁺, les LB, les cellules NK, les macrophages et les DCs (Gao et al., 2011 ; Hillhouse and Lesage, 2013 ; **Figure 24 [4]**).

Au cours de ma thèse j'ai entrepris la caractérisation fonctionnelle des LT^{DN} épididymaires par une approche *ex vivo* afin d'étudier leur mode de présentation antigénique et

la capacité de ces cellules à tuer les LT auto-réactifs. Malgré la mise au point de la technique de tri des LT^{DN} épидидymaires, le nombre de cellules obtenues était trop faible pour poursuivre le protocole. L'étape suivante sera d'étudier, après tri, le profil cytokinique des LT^{DN}, ce qui nous donnera une idée plus précise, bien qu'indirecte, du rôle potentiel de ces cellules dans l'épididyme.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de compléter les connaissances disponibles sur les cellules et molécules présentes, à l'état physiologique, dans l'épididyme murin. Ils ont également amené des pistes de réflexion quant aux rôles de ces acteurs. La poursuite de ce projet sera donc d'apporter des réponses sur leurs implications fonctionnelles dans les mécanismes de réponse aux pathogènes et aux cellules cancéreuses et de tolérance aux spermatozoïdes. Ces études sont un pré-requis à la mise en œuvre de traitements efficaces contre l'infertilité masculine d'origine immunologique et la conception et/ou l'amélioration de thérapies anticancéreuses.

Annexe

The epididymal immune balance: a key to preserve male fertility

Journal:	<i>Asian Journal of Andrology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Voisin, Allison Saez, Fabrice Drevet, Joël Guiton, Rachel; GReD laboratory
Keywords:	B cells, epididymis, dendritic cells, immune response, mononuclear phagocytes, T cells, tolerance

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 1 **The epididymal immune balance: a key to preserve male fertility**

2 2 Running title : **Epididymal immune regulation and male fertility**

3 3 Allison Voisin^a, Fabrice Saez^a, Joël R. Drevet^a, Rachel Guiton^a

4 4 ^a GReD laboratory, CNRS UMR 6293 - INSERM U1103 - Université Clermont Auvergne, 28
5 5 place Henri Dunant 63001 Clermont-Ferrand Cedex, France

6 6 * Correspondence: Pr. J. Drevet (joel.drevet@uca.fr) or Dr. R. Guiton (rachel.guiton@uca.fr)

21 ABSTRACT

22 Up to 15% of male infertility has an immunological origin, either due to repetitive infections
23 or to autoimmune responses mainly affecting epididymis, prostate and testis. Clinical
24 observations and epidemiological data clearly contradict the idea that testis would confer
25 immune protection to the whole male genital tract. As a consequence, the epididymis, in
26 which post-testicular spermatozoa mature and are stored, has raised some interest in recent
27 years when it comes to its immune mechanisms. Indeed sperm cells are produced at puberty,
28 long after the setting of self-tolerance, and they possess unique surface proteins that cannot be
29 recognized as self. They turn to be potential targets of the immune system, with the risk to
30 induce autoantibodies and finally male infertility. Epididymal immunity is based on a finely
31 tuned equilibrium between efficient immune responses to pathogens and strong tolerance to
32 sperm cells. These processes rely on incompletely described molecules and cell types. This
33 review aims at compiling recent studies focusing on the immune cell types populating the
34 epididymis and proposes hypothetical models of the organization of the epididymal immune
35 cells that contribute to balance the immune response and the tolerance.

36 **Keywords:** B cells, epididymis, dendritic cells, immune response, mononuclear phagocytes, T
37 cells, tolerance

39 TAKE HOME MESSAGE

- 40 • The epididymis faces an immunological paradox, between efficient immune response
41 to urogenital pathogens and tolerance to sperm cells, giving rise to a finely tuned balance that
42 preserves male fertility.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 43 • This review sums up the well-known mechanisms at work in the epididymis to
44 maintain the immune balance, and discusses the probable implication of newly identified cell
45 populations based on their canonical roles described in other organs.
- 46 • Finally, three models are proposed in this review, concerning the epididymal
47 organization in the contexts of the immune response to pathogens, the anti-tumoural response,
48

49 **INTRODUCTION**

50 About 15% of couples do not achieve pregnancy within one year, and male causes for
51 infertility are found in half of these couples.¹ About 15% of known male infertility originate
52 from autoimmune disorders or from inflammation caused by urogenital infections,¹ and this
53 rate is likely underestimated as 30% of male infertility cases are idiopathic.² Contrary to
54 orchitis, epididymitis is a frequent condition, and bacterial infections are common causes of
55 epididymitis, especially when involving sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* and
56 *Neisseria gonorrhoeae* in young men, and enteric *Escherichia coli* and *Pseudomonas* spp. in
57 older men.^{3,4} Even if successfully treated these infections have been shown to induce stenosis
58 in the epididymal duct, reduction of sperm counts and azoospermia in up to 40% of patients.<sup>5-
59 9</sup> These clinical data imply a crucial need for an efficient but finely controlled immune
60 response to pathogens in the epididymis.

61 On the other hand, spermatozoa are produced at puberty, long after the setting of
62 tolerance to self-antigens and therefore sperm-specific antigens are unknown to the immune
63 system.¹⁰ These antigens are thus potential targets of the male immune system and are at risk
64 of being destroyed. Therefore, there is a special need for tolerance to sperm cells all along
65 their testicular production and epididymal maturation, combined to the need for efficient
66 immune response to pathogens. While the testis relies on a very well sealed seminiferous

epithelium restricting immune cells and molecules to enter the luminal compartment, the epididymis has evolved different strategies.

New data have emerged in recent years on the immunity existing in the epididymis. This review will particularly focus on the immune cells and their potential implication in the immune balance taking place in the organ.

The epididymal epithelium: a first line of defense

The immune system of the epididymis has long been neglected compared to that of the testis, due to the commonly admitted idea that the testis conferred its immune protection to the whole genital tract. However clinical data seriously question this idea. First, there are 30 to 75 times more testicular cancers than epididymal cancers and 80% of epididymal cancers are not malignant.¹¹ Then, epididymitis, the inflammation of epididymis caused by the immune response to pathogens, is the most common intrascrotal inflammation¹² while isolated orchitis is rare and generally associated with mumps infection in young boys.¹³ Thus, as cancers arise second to a defective immune surveillance, and inflammations arise second to efficient immune responses, it can be assumed that the organization of the immune system greatly differs between the epididymis and the testis. Experimental data reinforce this assertion. Indeed, the survival of parathyroid grafts in the interstitial tissue has been assessed in both testes and epididymides of rats. Most intra-testicular parathyroid allografts survived for at least twice as long as control grafts in nonprivileged organs, *ie* around 41 days and one third of the grafts were still functional at 100 days.¹⁴ The intra-testicular environment is thus prone to immune tolerance, probably with the help of local testosterone, as the suppression of its secretion by Leydig cells *via* estrogen pretreatment led to rapid graft rejections.¹⁵ In sharp contrast, intra-epididymal allogeneic parathyroid grafts, preceded by orchiectomy to exclude any possible influence of intra-testicular factors, were rejected as soon as 7 to 12 days post-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

transplantation.¹⁶ Thus if testis is considered an immune privileged site,¹⁴ it cannot be the case of the epididymis.

The first line of defense of this organ is the blood-epididymis barrier (BEB). The BEB is a complex structure comprising a combination of three components that are the anatomical, the physiological, and the immunological barriers.¹⁷ The anatomical barrier is formed by the tight junctions and the basolateral and apical membranes of the epithelial cells.¹⁸ It limits the entry and the exit of molecules and cells from and to the lumen. The physiological barrier comprises transporters that control the movement of substances in or out the lumen to create a specialized microenvironment that is thought to play a role in the maturation of sperm cells.^{19,20} Finally, the immunological barrier is composed of non-immune cells, *ie* epithelial cells, that have developed defense systems, and immune cells which known and suggested roles will be exposed in the subsequent sections of this review.

Concerning the epithelial cells, several mechanisms of defense have been described. Among them is the expression of Toll-like receptors (TLRs) that are evolutionary conserved innate receptors that sense pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) derived from viruses, bacteria, fungi and protozoa (Figure 1 (1)). TLRs were localized to the epithelial and interstitial cells in the rat epididymis at steady state, some being more abundant than others. Moreover, their expression pattern varies. Indeed, TLRs1-4 are detected in principal cells throughout the epididymal epithelium in all regions of the duct whereas clear cells of the *cauda* epididymis do not express TLRs5-7 or TLR11.^{21,22} This may reflect the specificity of action of the different cell types populating the duct. Moreover, a study demonstrated that an *in vitro* *Staphylococcus aureus* infection induced the upregulation of TLR2 but not of TLR4 by epididymal epithelial cells (EECs), and this was concomittant with their secretion of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide.²³ This was supported by the *in vivo*

lipopolysaccharide (LPS) treatment of rats that showed no impact on the expression of TLR4.²⁴ In mice, primary cultures of EECs showed an abundant production of TLR4 and TLR5 in principal cells, basal cells, and some interstitial cells while TLR11 was not detected.²⁵ This study also showed that TLR4 and TLR5 cooperatively mediate pro-inflammatory cytokine production by EECs, while TLR4 alone mediated the expression of IFN- α and IFN- β , after uropathogenic *Escherichia coli* infection of mice. TLRs were also detected in the rooster where 9 of the 10 known chicken TLRs are expressed in the epididymis.^{26,27} LPS injection did not affect the level of TLR4 in the epididymis of roosters²⁶ while *Salmonella enteritidis* infection resulted in a significant induction of some TLR genes of mature roosters compared to healthy birds of the same age.²⁷ Finally, TLR3, specific to double stranded RNA, was shown to be constitutively expressed by mouse and human EECs in combination with other viral sensors. These EECs were then able to produce type I IFNs in response to viral ligands.^{28,29} Whatever the species, given the diversity of the TLRs expressed by the EECs, these cells appear well armed to fight bacteria (TLRs1, 2, 4-6, 9) and viruses (TLRs3, 7-9) that can be found in the epididymis.

β -defensins are an important class of antimicrobial agents found in the EECs, and more generally in male and female reproductive tracts (Figure 1 (1)). They are small cationic peptides with a broad-spectrum action against bacteria, fungi and enveloped viruses. A great number of β -defensins have been identified so far in the human, mouse and rat epididymis, some of them being specific to this organ while others are shared with the testis.³⁰⁻³² They are of particular interest as, besides their ability to rapidly kill microorganisms through membrane permeabilization,^{33,34} they are chemotactic for immature dendritic cells and T lymphocytes to sites of microbial invasion in human.³⁵

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

139 Actually, the innate defense of EECs also relies on many other antimicrobial proteins such as
140 cathelicidins, mucins, protease inhibitors, lactoferrin, lysozyme, LPS-binding proteins, and
141 chemokines well described in previous articles.^{30,36-38}

142 An interesting enzyme, indoleamine 2,3-dioxygenase or IDO, has also been described in the
143 epithelial cells of the murine epididymis (Figure 1 (1)).^{39,40} Contrary to other organs where it
144 is induced by inflammation, IDO is constitutively expressed in the epididymis,⁴¹ suggesting a
145 crucial role for this enzyme. Even if it is generally considered for its tolerogenic properties,
146 IDO is a well-described antimicrobial effector through its catabolic activity which deprives
147 the environment in tryptophan. Even if the *in vivo* effect of IDO, antimicrobial or
148 immunoregulatory, was generally shown to be dependent on the intracellular pathogen,⁴² it
149 was reported to act efficiently *in vitro* against bacterial tryptophan auxotrophs, of which the
150 *Chlamydiae* species,^{43,44} and against the measles virus.⁴⁵

151 ***The epididymal immune response to pathogens: innate and adaptive immune cells***

152 In addition to non-immune cells, the response to pathogens relies on immune cells,
153 whatever the organ. The innate immune cells are the first cells to interact with pathogens to
154 induce non-specific responses to rapidly limit the spread of pathogens. Thereafter innate
155 antigen-presenting cells (APCs, mostly macrophages and dendritic cells) initiate the adaptive
156 response which is late but pathogen-specific and triggers memory cells that will be able to
157 rapidly fight the pathogen during a second encounter.

158 As early as 1983, lymphocytes and macrophages were described in the human
159 epididymis at steady state.⁴⁶ These first observations were completed by the fact that most
160 intraepithelial lymphocytes were T cells, and mainly CD8⁺ T cells, contrasting with the
161 predominance of the CD4⁺ T cells subset in the interstitial tissue.⁴⁷ Moreover, the CD8⁺
162 intraepithelial T cells were prone to cytotoxicity as evidenced by their granzyme B-positive
163 staining.⁴⁸ In rats, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and macrophages were identified along the

epididymis, with a preferential presence in the interstitium compared to the intraepithelial compartment.^{49,50} When intraepithelial, CD4⁺ T cells and macrophages were mostly found close to the basement membrane while CD8⁺ T cells were observed at various heights between epithelial cells.⁵¹ B cells, although rarely seen in the epididymal epithelium, were often located close to the base of epithelial cells, and represented 1 to 5% of the immune cells of the tissue, depending on the age of the animals. None of the immune cells identified in the rat epididymis was found in the lumen.⁵¹ Similar to the rat and human epididymis, the mouse tissue was shown to contain macrophages, CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells.⁵² Macrophages were the most frequent leucocytes and were mainly located in the peritubular layer. The few T cells were essentially observed in the interstitium while helper T cells (CD4⁺) and cytotoxic T cells (CD8⁺) appeared similar in their regional and histological distribution patterns. The authors did not notice any distortion in the helper:cytotoxic cells ratio. Finally, there was no invasion of leucocytes into the murine epididymal lumen.⁵² Although studies describing epididymal immune cells are scarce and seem restricted by technical limitations, recent works have shed light on new immune populations thanks to innovative tools like transgenic animal models and flow cytometry. Such studies were necessary owing to the rapidly growing knowledge on the immune cell populations and ontogeny.⁵³ The first work reported a newly identified dense network of dendritic cells (eDCs) at the base of the epididymal epithelium using mice expressing CD11c-EYFP and CX₃CR1-GFP reporters.⁵⁴ Based on their differential expression of surface markers, the eDCs could be separated into two populations, the CD11c⁺CD103⁺ cells and the CD11c⁺CD103⁻ cells. eDCs were shown to project dendrites between epithelial cells and to be able to cross the tight junctions to reach the lumen in the initial segment. In more distal segments, the eDCs morphology changed as they lost their dendrites to become flat cells in the *cauda* epididymis. Moreover, these eDCs were functional, at least *in vitro*, as they could present antigens to both CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

189 However, these cells were referred to as mononuclear phagocytes (MPs) instead of dendritic
190 cells in subsequent works from the same team as the authors could not exclude that they were
191 macrophages.^{55,56} Indeed, the use of a unique marker to characterize a MP population appears
192 not to be sufficient.⁵³ This led our team to undertake a screening of the various MP and
193 lymphocyte populations present in the murine epididymis.⁵⁷ Using flow cytometry and a wide
194 set of markers, we identified and quantified the innate populations of monocytes,
195 macrophages, and dendritic cells subtypes. This study also revealed the presence of B
196 lymphocytes, $\gamma\delta$ T cells, and double negative T cells (T cells devoid of the CD4 and CD8
197 markers), which potential roles will be discussed in the subsequent sections. All lymphocytes
198 proved to be distributed along the organ, in the interstitium and to a lesser extent in the
199 epithelium.

200 All the above studies were led at steady state and give clues concerning the
201 organization of the immune system in the epididymis. The 3 figures illustrate our hypothetical
202 vision of the epididymal immune cells organization. These propositions are based both on the
203 epididymal literature and on the canonical functions known for the cells only recently
204 identified in the murine epididymis.

205 A model of the epididymal immunity taking place in response to a pathogen infection
206 is presented in Figure 1.

207 Epididymitis is mostly caused by pathogens entering the tissue *via* the *cauda*
208 epididymis, where B cells were found abundant.⁵⁷ Two complementary hypotheses could
209 explain the higher presence of B cells in the *cauda* compartment when compared to the *caput*
210 epididymis (Figure 1 (2)). First, these cells could secrete the high amount of local IgAs
211 described in the tissue.⁵⁸ As no secretory component was described in association with these
212 IgAs, they must be confined to the interstitium where most B cells reside.^{51,57} Second, B cells
213 could play a role in case of an epithelial breach. Indeed, the expression of an IgA/IgM-

specific receptor, the Fc α / μ R, has been described in several reproductive organs such as placenta and testis, and in B cells.⁵⁹ As shown in spleen, epididymal B cells could phagocyte antibody-coated bacteria, thus limiting the systemic spread of pathogens before processing pathogenic antigens and presenting them to local T helper lymphocytes that were found highly represented in the *cauda* epididymis.⁵⁷

The *caput* epididymis, as the last region before pathogens reach the testis, is a crucial compartment to avoid any alteration of the sperm production. The fact that the majority of MP/APC populations were more numerous in this region than in *cauda* epididymis combined to a high proportion of canonical effectors, *ie* CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes,⁵⁷ can question the existence of classical immune responses in this region (Figure 1 (3)). Indeed, the basal APCs could sample the luminal content thanks to their membrane projections and process the antigens to present them to effector T cells.⁵⁴ These cells could then participate to the pathogen elimination, either directly for the cytotoxic CD8⁺ T cells⁴⁸ or indirectly for the helper CD4⁺ T cells. Given the repartition of APCs and effector T cells along the organ it can be hypothesized that this kind of response is conserved from the *caput* to the *cauda* epididymis, even if the sampling and presentation of antigens must vary as the morphology of APCs evolves.⁵⁴ This potential immune response is supported by experimental infections where APCs, and/or lymphocytes increase in the interstitium of inflamed epididymis.⁶⁰⁻⁶³ In human chronic epididymitis, elevated numbers of dendritic cells, macrophages and helper T cells were also observed.^{64,65} In the steady state epididymis, several populations of APCs/MPs have been described based on their expression of various surface markers, of which CD11c, CD103, and CX₃CR1.⁵⁴ As so, they resemble APC populations of the gut where CD103 and CX₃CR1 phenotypically and functionally characterize distinct subsets of dendritic cells.^{66,67} Thus functional characterization of epididymal DCs and macrophages subsets should be considered for future experiments.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Intraepithelial CX₃CR1⁺CD11c⁺ MPs were found to have the ability to engulf apoptotic cells and debris after efferent duct ligation before returning to their steady state appearance at the end of the apoptotic wave.⁵⁶ Such a characteristic could contribute to the resolution of a severe infection leading to a partial destruction of the BEB and to a local release of cell and pathogen debris (Figure 1 (4)).

Interestingly, the $\gamma\delta$ T cells, typical cells of mucosa, were recently identified in the interstitial and intraepithelial compartments of the murine epididymis.⁵⁷ Many tissue-resident $\gamma\delta$ T cells show a limited TCR diversity, and only one subtype (V γ 6 δ 1⁺ T cells) has been identified so far in the mouse reproductive tract including uterus, placenta and testes. Depending on the context, this subtype is able to produce a broad range of cytokines including IL-17, IL-22, IFN- γ , TGF- β , to have a cytotoxic activity, and to promote bacterial clearance.⁶⁸ Moreover, these cells are also found in lungs where they participate in the epithelium maintenance after injury⁶⁹ suggesting a potential similar role for them in case of a breach in the epididymal epithelium following severe infections (Figure 1 (5)). Given the diversity of these cells, it appears of primary importance to establish the epididymal $\gamma\delta$ T cells phenotype to have solid clues regarding their actual role in the organ.

Finally, while few monocytes were identified in the epididymis at steady state, these cells are expected to rise in number after infections as they mostly sense the stress signature that allows their recruitment and local differentiation into inflammatory DCs or macrophages (Figure 1 (6)).⁷⁰

This model surely underestimates the role of innate immune cells like polymorphonuclear cells (PMNs) due to the scarcity of studies describing these cells,^{60,61,71} especially during the early steps of epididymal infections. Moreover, the role of the EECs and defense molecules should not be forgotten when considering the overall response to ascending pathogens (Figure 1 (1)). In the future, accurate works will be needed to assess the functional

implication of each immune cell type described in the epididymis, especially in the context of experimental bacterial infections. These works should surely pay attention to another tissue, the epididymal fat pad. Indeed, dense lymphatic and blood networks link the two contiguous organs,^{72,73} and the epididymal fat pad is a well-described reservoir of immune cells, notably $\gamma\delta$ T cells, NK cells and physiologically activated NKT cells that are able to fight pathogens, *via* their constitutive IFN- γ secretion (Figure 1 (5)), or cancer cells.^{74,75} The origin and phenotypes of effector cells found in the epididymis are other interesting points to decipher as it might influence the kinetics and efficiency of the immune response. This suggestion comes from a recent study that elegantly demonstrated that antigen-experienced, *ie* memory, CD8⁺ T cells were able to migrate through the peritoneal cavity to the infected epididymis by directly crossing the capsule, thus ignoring the classical vascular entry into non-lymphoid organs. This work also proved that at the end of the infection, some functional resident memory CD8⁺ T cells remained in the tissue.⁷⁶

The particular case of epididymal cancers

As mentioned earlier, epididymal tumours are rare. Indeed, they account for 0.03% of all male cancers, when the most common one, the prostate cancer, represents 20% of male cancers in Western countries.¹¹ Most of these tumours are benign and primary, and have an epithelial origin.^{11,77} A hypothetical model of the anti-tumoural defenses at work in the epididymis is illustrated in Figure 2.

Some non-immune mechanisms are suggested to prevent the initiation of epididymal tumour development, like strong antioxidant mechanisms, active tumour suppressors, and inactive oncogene products, that renders the cells less likely to become cancerous.¹¹ A probable absence of stem cells has been evoked as another potential anti-cancerous mechanism¹¹ but a recent study found that the rat basal cells can act as adult stem cells, thus questioning this aspect.⁷⁸ The presence of persistent tight junctions and a combination of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

289 anti-angiogenic factors and misplaced pro-angiogenic factors also contribute to prevent
290 metaplasia.¹¹ For example, the Transforming Growth Factor-beta3 (TGF-β3), which is highly
291 expressed in the rat epididymis and present in its active form in the secretory epithelium of
292 the *corpus* region, was proposed to act as an autocrine inhibitor of epithelial cell growth to
293 check uncontrolled proliferation (Figure 2 (1)).⁷⁹

294 Furthermore, senescence and immune cells play a crucial role in the early elimination
295 of transforming cells. It has been shown that both innate (DCs, macrophages, NK and NKT
296 cells) and adaptive cells (CD4⁺ and CD8⁺ T cells, γδ T cells) are required to protect the host
297 against developing tumours.⁸⁰ As evoked in the previous section, both APC populations and
298 adaptive cells were found in the epididymis, suggesting that this early immune surveillance
299 could be effective in the organ (Figure 2 (2)). This proposition is supported by the fact that the
300 *caput* epididymis, where most APCs and numerous effector T cells reside,⁵⁷ is less affected by
301 tumours than the *cauda* compartment.¹¹ In addition to the classical immune responses
302 (APC/effector T cells), γδ T cells were shown to be directly activated by the tumour cell to
303 become cytotoxic and release perforin and granzymes in some experimental conditions. They also
304 have the possibility to express ligands that engage death receptors, and they can secrete IFN-γ, thus
305 inhibiting angiogenesis while enhancing MHC class I expression by tumour cells. Consequently, the
306 expression of modified self on the MHC class I molecules promotes CD8⁺ T cell responses (Figure
307 2 (3)).⁸¹

308 Nevertheless, NK and NKT cells have never been described in the epididymis. We propose
309 that their absence could be overcome by the presence of the newly described epididymal DN
310 T cells.⁵⁷ Indeed, these cells were shown to be highly cytotoxic toward leukemia cells from
311 patients as well as cell lines derived from leukemia and lymphoma but not toward normal
312 cells. Interestingly, they selectively recognized these tumour cells *via* activator receptors also
313 expressed by NK cells, NKG2D (Natural Killer receptor group 2, member D) and DNAM-1

(DNAX accessory molecule-1, also known as CD226), further supporting the fact that DN T cells could replace NK cells.⁸² In another model, they were able to suppress lymphoma cells both *in vivo* and *in vitro* by apoptosis *via* the Fas-FasL mechanism (Figure 2 (4)).⁸³

When the elimination phase fails at eradicating every early transforming cells, some tumour cells may enter an equilibrium phase called dormancy, which could last for the lifetime.⁸⁰ A mouse model of primary chemical carcinogenesis was used to demonstrate that equilibrium is mechanistically distinct from elimination and escape phases of cancers,⁸⁴ as dormancy is only maintained by adaptive immunity, CD4⁺ and CD8⁺ T cells. They also proved that neoplastic cells in equilibrium were transformed but proliferated poorly *in vivo*.⁸⁴ Given the low incidence of cancer in the epididymis and the high proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells,⁵⁷ such a mechanism of immune control can be suggested to exist in the tissue to complete the immune surveillance. To investigate the anti-tumoural mechanisms that are really taking place in the epididymis, reliable mouse models are missing as even though many models are available, they only induce hyperplasia and/or hypertrophy, or dysplasia but fail to reach malignancy.⁸⁵⁻⁹³

Immune tolerance to sperm cells

On the other side of the epididymal immune balance is the peripheral tolerance that must be set and maintained toward spermatozoa, as presented in Figure 3.

The first level of protection, again, is the BEB, as one of its functions is to protect the sperm from the immune system either by preventing sperm antigens from escaping the duct or by impeding immune cells to infiltrate the lumen. Under physiological conditions all lymphocytes and APCs were localized in the epididymal epithelium and interstitium but not in the lumen, demonstrating an effective role of the BEB.^{46,47,49-52,54,57}

It has also been suggested that EECs, as Sertoli cells in the testis, could play a role in the tolerogenic state of the epididymis thanks to their expression of immunosuppressive

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

339 molecules known to inhibit T cell activation or survival, namely IL-10, IDO, TGF- β , and
340 activin A.⁹⁴
341 Indeed, IL-10 was localized in the principal cells of the murine epididymal epithelium,
342 suggesting that this cytokine could be secreted into the interstitial tissue and tubular lumen to
343 keep the T cells migrating to the organ quiet and inactive (Figure 3 (1)).⁹⁵
344 Activin A, a member of the TGF- β superfamily, is another well-known immunomodulatory
345 molecule. Interestingly, activin A was found expressed in the mouse epididymis,⁹⁶ as well as
346 in the epithelial cells of the human caput and cauda epididymis.⁹⁷
347 Activin A could act together with the IL-10 to deviate local immune responses toward an anti-
348 inflammatory profile, suppressing effector T cells activation and proliferation by
349 downregulating the expression of costimulatory receptors on the DC surface (Figure 3
350 (1)).^{98,99} Activin B, which is emerging for its similar functions to activin A,⁹⁹ has also been
351 described in the mouse and human epididymis at the protein level and in the rhesus monkey
352 and human epididymis at the mRNA level.^{97,100,101}
353 As mentioned earlier, IDO was found to be constitutively expressed by the epithelial cells of
354 the murine epididymis, where it could play a dual role between innate effector to ascending
355 pathogens and inducer of tolerance to sperm cells.³⁹⁻⁴¹ Moreover, IDO activity induces the
356 release of high amounts of tryptophan metabolites, kynurenines, in the epididymis.⁴⁰ In an *in*
357 *vitro* model, kynurenines were able to kill activated T cells without affecting DCs, and
358 showed additive suppressing effects on T cell responses (Figure 3 (2)).¹⁰² Kynurenines were
359 also shown to be implicated in the fetal tolerance during pregnancy.¹⁰³
360 TGF- β was also found in the epididymis of various species. TGF- β 1 proteins were shown to
361 be present in the rat epididymis under a latent form, while active TGF- β 3 proteins have been
362 detected in the *corpus* epididymis. Active TGF- β 2 was not found, whatever the epididymal
363 region considered.⁷⁹ Another study described TGF- β 1 and one of its receptors, TGF- β RII, in

the epididymis of the marmoset monkey.¹⁰⁴ While TGF- β 1 was found in the apical cells of the *caput* and *corpus* epididymis, its receptor was found in the principal cells of the same regions, suggesting a paracrine process.¹⁰⁴ The mouse epididymis also presented with high *Tgf- β 1* mRNA levels in the *caput* and *corpus* regions,¹⁰⁵ and we have recently shown that TGF- β isoforms and receptors were present in murine epididymal cells, with differential patterns of expression in the three regions of the organ (Voisin, unpublished results). Finally, some studies brought light on the potential mechanisms used by TGF- β to create and maintain a pro-tolerogenic environment toward sperm cells. Indeed, a recent study revealed that epididymal tolerance to sperm cells partly rely on TGF- β signaling in DCs, as transgenic mice with TGF- β RII-deficient DCs developed epididymal leukocytosis and antisperm antibodies (Figure 3 (3)).¹⁰⁶

The second level of protection relies on the immune cells populating the tissue.

While regulatory T cells (Treg cells) are the canonical tolerance-inducing cells in peripheral organs, there are no or few Treg cells in the steady state epididymis.^{57, 106} This is quite surprising as transcriptomic data strongly suggest the presence of Treg cells in the murine epididymis.¹⁰⁷ This discrepancy may be explained by the fact that many regulatory T cell populations have been described, independently of the Foxp3 expression, as the Th3 and Tr1 cells.¹⁰⁸

On the other hand, Treg cells may be the key players in a context of severe tissue injury. Indeed, vasectomy, which is used as a model to investigate the immune responses to self-antigens after a leak of spermatogenic antigens in the epididymal interstitium, induces a sperm-specific systemic tolerance which is abrogated by a simultaneous depletion of the Treg cells.¹⁰⁹ The tolerance state was suggested to rely on the presentation of meiotic germ cell antigens (MGCA) to antigen-specific T cells in the epididymis draining lymph node, leading to a rapid expansion of the Treg cells activity (Figure 3 (4)).¹¹⁰

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

389 Once activated, Treg cells may promote a local epididymal tolerogenic environment to sperm
390 cells, as a study showed significant increases of *IL-10* and *TGF-β* mRNA levels in the
391 epididymis following vasectomy.¹⁰⁵ These two immunosuppressive molecules secreted by the
392 Treg cells are known to inhibit immune responses, particularly T cell proliferation and
393 differentiation into effector cells (Figure 3 (4)).¹¹¹ Thus, considering these data and the work
394 by Pierucci-Alves,¹⁰⁶ it may be suggested that the TGF-β produced by the newly recruited
395 Treg cells after a severe tissue injury may signal through the DCs to maintain a tolerogenic
396 environment and limit the epididymal damage.

397 Another argument in favor of a possible recruitment of Treg cells in the epididymis is the
398 presence of CD103⁺ DCs in this tissue.^{54,57} Indeed, gut CD103⁺ DCs were reported to migrate
399 to the draining lymph nodes to induce tolerance by promoting the differentiation of naïve T
400 cells into immunosuppressive Treg cells (Figure 3 (4)).⁶⁶ However, the capacity of the gut
401 DCs to induce Treg cells was associated with their expression of the immunosuppressive
402 enzyme IDO.¹¹² Yet, despite that IDO is highly expressed in the murine epididymis,³⁹ CD11c⁺
403 and CD103⁺ DCs from the *caput* epididymis were never found to express IDO (Da Silva,
404 personal communication).⁴⁰ This apparent paradox will have to be questioned.

405 Altogether these results suggest that Treg cells are not very present at steady state while being
406 massively recruited in the tissue from the draining lymph node after a severe injury leading to
407 a leak of sperm antigens in the epididymal interstitium.

408 The previous hypothesis underlies that distinct mechanisms exist at steady state to
409 maintain the tolerance to sperm cells in the epididymis. One possibility may be the weak
410 activation of tissue effector T cells by local DCs in an immunosuppressive environment,
411 leading to anergy or apoptosis of T cells (Figure 3 (5)).

412 Interestingly we first described an unexpected antigen-specific regulatory T cell
413 population, the epididymal double negative T cells (DN T cells), that are significantly more

present in the *caput* epididymis.⁵⁷ These cells were mostly described in the female genital tract, the kidney and the intestine¹¹³ where they act as immunosuppressive cells, suggesting that they could play a role in the tolerance to spermatozoa. Indeed, as described in the mouse spleen, DN T cells could acquire sperm antigens from local DCs by trogocytosis, a mechanism of membrane transfer between APCs and lymphocytes, to become presenting cells themselves before killing autoreactive CD8⁺ T cells.¹¹⁴ In fact, they were able to efficiently prevent autoimmune responses by targeting a broad panel of immune cells including CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells, B cells, NK cells, macrophages and DCs (Figure 3 (6)).^{115,116} However, another work on human DN T cells pointed to mechanisms of action distinct from those of murine DN T cells, supporting the need for further studies on these promising cells.¹¹⁷

CONCLUSION

This review aimed at highlighting the wealth of immune mechanisms, proven or suspected, at work in the epididymis to maintain an efficient balance between immune responses to ascending pathogens and tolerance to sperm cells.

As it often happens when considering immunity, many cells and molecules are suggested to play multiple roles in the epididymis, and their actual implication in the regulation of epididymal immune balance will need further studies. For instance, TGF- β isoforms appear to impact (i) the BEB maintenance, through the control of epithelial cell growth,⁷⁹ (ii) the BEB function, through the induction of tight junctions loss and consequent epithelial permeability to MP migration,¹¹⁸ and (iii) the tolerance to sperm cells, through its inhibition of T cell activation.⁹⁴

Another important focus should also be done on the underestimated epididymal fat pad which seems a promising reservoir of immune cells potentially implicated in both sides of the immune balance, although not all species do have this fat pad.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Concerning this last point, there is a crucial need for animal models as useful tools to decipher the mechanisms underlying the extreme epididymal resistance to tumourigenesis, which could lead to new therapeutic strategies to cure certain cancers.

Finally, as human data are dramatically missing in the field, the transposition of ever-growing animal data to human remains limited, as well as the opportunities to treat human pathologies associated with epididymal immune defaults.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AV and RG drafted the manuscript. FS and JRD revised the article. All authors read and approved the final manuscript.

COMPETING INTERESTS

All authors declare no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

AV was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (MESR). FS, JRD and RG received funds from INSERM, CNRS and MESR.

REFERENCES

1. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W, et al. EAU guidelines on male infertility. Eur Urol. 2005 Nov;48(5):703–11.
2. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. Eur Urol. 2012 Aug;62(2):324–32.
3. Harnisch JP, Berger RE, Alexander ER, Monda G, Holmes KK. Aetiology of acute epididymitis. Lancet. 1977 Apr 16;1(8016):819–21.
4. Berger RE, Alexander ER, Harnisch JP, Paulsen CA, Monda GD, Ansell J, et al.

- 465 Etiology, manifestations and therapy of acute epididymitis: prospective study of 50
466 cases. *J Urol*. 1979 Jun;121(6):750–4.
- 467 5. Tozzo PJ. Semen analysis in unilateral epididymitis. *N Y State J Med*. 1968 Nov
468 1;68(21):2769–70.
- 469 6. Ludwig G, Haselberger J. [Epididymitis and fertility. Treatment results in acute
470 unspecific epididymitis]. *Fortschr Med*. 1977 Feb 17;95(7):397–9.
- 471 7. Weidner W, Garbe C, Weissbach L, Harbrecht J, Kleinschmidt K, Schiefer HG, et al.
472 [Initial therapy of acute unilateral epididymitis using ofloxacin. II. Andrological
473 findings]. *Urologe A*. 1990 Sep;29(5):277–80.
- 474 8. Dietz O. [The change in the degree of fertility during the course of acute nonspecific
475 epididymitis. (Contribution to the pathogenesis of primary inhibition of
476 spermiogenesis)]. *Arch Med Infant*. 1960;211:160–6.
- 477 9. Osegbe DN. Testicular function after unilateral bacterial epididymo-orchitis. *Eur Urol*.
478 1991;19(3):204–8.
- 479 10. Witkin SS, Jeremias J, Bongiovanni AM, Munoz MG. Immune regulation in the male
480 genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1996;4(3):131–5.
- 481 11. Yeung C-H, Wang K, Cooper TG. Why are epididymal tumours so rare? *Asian J*
482 *Androl*. 2012 May;14(3):465–75.
- 483 12. Moore CA, Lockett BL, Lennox KW, McAminch JW, Wurster JC, Ceccarelli FE, et al.
484 Prednisone in the treatment of acute epididymitis: a cooperative study. *J Urol*. 1971
485 Oct;106(4):578–80.
- 486 13. Trojian TH, Lishnak TS, Heiman D. Epididymitis and orchitis: an overview. *Am Fam*
487 *Physician*. 2009 Apr 1;79(7):583–7.
- 488 14. Head JR, Neaves WB, Billingham RE. Immune privilege in the testis. I. Basic
489 parameters of allograft survival. *Transplantation*. 1983 Oct;36(4):423–31.
- 490 15. Head JR, Billingham RE. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential
491 local factors. *Transplantation*. 1985 Sep;40(3):269–75.
- 492 16. Kazeem AA. A critical consideration of the rat epididymis as an immunologically
493 privileged site. *Scand J Immunol*. 1988 Feb;27(2):149–56.
- 494 17. Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are
495 more than just their tight junctions. *Biol Reprod*. 2011 May;84(5):851–8.
- 496 18. Hoffer AP, Hinton BT. Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the
497 effects of gossypol on its integrity. *Biol Reprod*. 1984 May;30(4):991–1004.
- 498 19. Cooper TG, Waites GM. Investigation by luminal perfusion of the transfer of
499 compounds into the epididymis of the anaesthetized rat. *J Reprod Fertil*. 1979
500 May;56(1):159–64.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

20. Hinton BT, Howards SS. Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymidis. *J Reprod Fertil.* 1981 Sep;63(1):95–9.

21. Palladino MA, Johnson TA, Gupta R, Chapman JL, Ojha P. Members of the Toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract. *Biol Reprod.* 2007 Jun;76(6):958–64.

22. Palladino MA, Savarese MA, Chapman JL, Dughi M-K, Plaska D. Localization of Toll-like receptors on epididymal epithelial cells and spermatozoa. *Am J Reprod Immunol.* 2008 Dec;60(6):541–55.

23. Zhao Y-T, Guo J-H, Wu Z-L, Xiong Y, Zhou W-L. Innate immune responses of epididymal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection. *Immunol Lett.* 2008 Aug 15;119(1–2):84–90.

24. Rodrigues A, Queiróz DBC, Honda L, Silva EJR, Hall SH, Avellar MCW. Activation of toll-like receptor 4 (TLR4) by in vivo and in vitro exposure of rat epididymis to lipopolysaccharide from *Escherichia Coli*. *Biol Reprod.* 2008 Dec;79(6):1135–47.

25. Cheng L, Chen Q, Zhu W, Wu H, Wang Q, Shi L, et al. Toll-like Receptors 4 and 5 Cooperatively Initiate the Innate Immune Responses to Uropathogenic *Escherichia coli* Infection in Mouse Epididymal Epithelial Cells. *Biol Reprod.* 2016 Mar;94(3):58.

26. Zhang M, Nii T, Isobe N, Yoshimura Y. Expression of Toll-like receptors and effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokine in the testis and epididymis of roosters. *Poult Sci.* 2012 Aug;91(8):1997–2003.

27. Anastasiadou M, Avdi M, Michailidis G. Expression of avian β -defensins and Toll-like receptor genes in the rooster epididymis during growth and *Salmonella* infection. *Anim Reprod Sci.* 2013 Aug;140(3–4):224–31.

28. Zhu W, Zhao S, Liu Z, Cheng L, Wang Q, Yan K, et al. Pattern recognition receptor-initiated innate antiviral responses in mouse epididymal epithelial cells. *J Immunol.* 2015 May 15;194(10):4825–35.

29. Browne JA, Leir S-H, Eggener SE, Harris A. Region-specific innate antiviral responses of the human epididymis. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Sep 15;473:72–8.

30. Hall SH, Hamil KG, French FS. Host defense proteins of the male reproductive tract. *J Androl.* 2002 Oct;23(5):585–97.

31. Com E, Bourgeon F, Evrard B, Ganz T, Collet D, Jégou B, et al. Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol Reprod.* 2003 Jan;68(1):95–104.

32. Ribeiro CM, Silva EJR, Hinton BT, Avellar MCW. β -defensins and the epididymis: contrasting influences of prenatal, postnatal, and adult scenarios. *Asian J Androl.* 2016 Apr;18(2):323–8.

33. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest.* 1989 Aug;84(2):553–61.

- 540 34. Yenugu S, Hamil KG, Radhakrishnan Y, French FS, Hall SH. The androgen-regulated
541 epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly
542 ESC42), is an antimicrobial beta-defensin. *Endocrinology*. 2004 Jul;145(7):3165–73.
- 543 35. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-
544 defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6.
545 *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):525–8. anc38
- 546 36. Malm J, Nordahl EA, Bjartell A, Sørensen OE, Frohm B, Dentener MA, et al.
547 Lipopolysaccharide-binding protein is produced in the epididymis and associated with
548 spermatozoa and prostasomes. *J Reprod Immunol*. 2005 Jun;66(1):33–43.40.
- 549 37. Collin M, Linge HM, Bjartell A, Giwercman A, Malm J, Egesten A. Constitutive
550 expression of the antibacterial CXC chemokine GCP-2/CXCL6 by epithelial cells of
551 the male reproductive tract. *J Reprod Immunol*. 2008 Oct;79(1):37–43.
- 552 38. Linge HM, Collin M, Giwercman A, Malm J, Bjartell A, Egesten A. The antibacterial
553 chemokine MIG/CXCL9 is constitutively expressed in epithelial cells of the male
554 urogenital tract and is present in seminal plasma. *J Interferon Cytokine Res*. 2008
555 Mar;28(3):191–6.
- 556 39. Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR. Quantitative and spatial differences in the
557 expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res*.
558 2006 May;324(2):301–10.
- 559 40. Jrad-Lamine A, Henry-Berger J, Gourbeyre P, Damon-Soubeyrand C, Lenoir A,
560 Combaret L, et al. Deficient tryptophan catabolism along the kynurenine pathway
561 reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. *J Biol Chem*. 2011 Mar
562 11;286(10):8030–42.
- 563 41. Takikawa O, Tagawa Y, Iwakura Y, Yoshida R, Truscott RJ. Interferon-gamma-
564 dependent/independent expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Studies with
565 interferon-gamma-knockout mice. *Adv Exp Med Biol*. 1999;467:553–7.
- 566 42. Divanovic S, Sawtell NM, Trompette A, Warning JJ, Dias A, Cooper AM, et al.
567 Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular
568 infection. *J Infect Dis*. 2012 Jan 1;205(1):152–61.
- 569 43. Carlin JM, Borden EC, Byrne GI. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase
570 activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. *J Interferon*
571 *Res*. 1989 Jun;9(3):329–37.
- 572 44. Pantoja LG, Miller RD, Ramirez JA, Molestina RE, Summersgill JT. Inhibition of
573 *Chlamydia pneumoniae* replication in human aortic smooth muscle cells by gamma
574 interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Infect Immun*. 2000
575 Nov;68(11):6478–81.
- 576 45. Obojes K, Andres O, Kim KS, Däubener W, Schneider-Schaulies J. Indoleamine 2,3-
577 dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma
578 interferon. *J Virol*. 2005 Jun;79(12):7768–76. Anc48
- 579 46. Wang YF, Holstein AF. Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

epididymis. *Cell Tissue Res.* 1983;233(3):517–21.50.

47. Ritchie AW, Hargreave TB, James K, Chisholm GD. Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens? *Br J Urol.* 1984 Feb;56(1):79–83.

48. Yakirevich E, Yanai O, Sova Y, Sabo E, Stein A, Hiss J, et al. Cytotoxic phenotype of intra-epithelial lymphocytes in normal and cryptorchid human testicular excurrent ducts. *Hum Reprod.* 2002 Feb;17(2):275–83.

49. Hooper P, Smythe E, Richards RC, Howard CV, Lynch RV, Lewis-Jones DI. Total number of immunocompetent cells in the normal rat epididymis and after vasectomy. *J Reprod Fertil.* 1995 Jul;104(2):193–8.

50. Flickinger CJ, Bush LA, Howards SS, Herr JC. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat Rec.* 1997 Jul;248(3):380–90.

51. Serre V, Robaire B. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod.* 1999 Sep;61(3):705–14.

52. Nashan D, Malorny U, Sorg C, Cooper T, Nieschlag E. Immuno-competent cells in the murine epididymis. *Int J Androl.* 1989 Feb;12(1):85–94.

53. Guillems M, Ginhoux F, Jakubczik C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(8):571–8.

54. Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker H-C, Wildgruber M, Hill E, Brown D, et al. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction.* 2011 May;141(5):653–63. *Anc* 57

55. Shum WW, Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Roy JW, Hill E, et al. Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. *Biol Reprod.* 2014 May;90(5):90. *Anc* 24

56. Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Hill E, Pittet MJ, Da Silva N. Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology.* 2014 Sep;2(5):755–62.

57. Voisin A, Whitfield M, Damon-Soubeyrand C, Goubely C, Henry-Berger J, Saez F, et al. Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: Unexpected populations arise. *J Reprod Immunol.* 2018 Apr;126:11–7.

58. Stern JE, Gardner S, Quirk D, Wira CR. Secretory immune system of the male reproductive tract: effects of dihydrotestosterone and estradiol on IgA and secretory component levels. *J Reprod Immunol.* 1992 Jun;22(1):73–85.

59. Shibuya A, Sakamoto N, Shimizu Y, Shibuya K, Osawa M, Hiroshima T, et al. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol.* 2000 Nov;1(5):441–6.

- 619 60. Kuzan FB, Patton DL, Allen SM, Kuo CC. A proposed mouse model for acute
620 epididymitis provoked by genital serovar E, *Chlamydia trachomatis*. *Biol Reprod*. 1989
621 Jan;40(1):165–72.
- 622 61. Jantos C, Baumgärtner W, Durchfeld B, Schiefer HG. Experimental epididymitis due to
623 *Chlamydia trachomatis* in rats. *Infect Immun*. 1992 Jun;60(6):2324–8.
- 624 62. Nashan D, Jantos C, Ahlers D, Bergmann M, Schiefer HG, Sorg C, et al. Immuno-
625 competent cells in the murine epididymis following infection with *Escherichia coli*. *Int*
626 *J Androl*. 1993 Feb;16(1):47–52.
- 627 63. Ludwig M, Johannes S, Bergmann M, Failing K, Schiefer HG, Weidner W.
628 Experimental *Escherichia coli* epididymitis in rats: a model to assess the outcome of
629 antibiotic treatment. *BJU Int*. 2002 Dec;90(9):933–8.
- 630 64. Duan Y-G, Wang P, Zheng W, Zhang Q, Huang W, Jin F, et al. Characterisation of
631 dendritic cell subsets in chronically inflamed human epididymis. *Andrologia*. 2016
632 May;48(4):431–40.
- 633 65. Zheng W, Wang Y, Chen J, Zhu Y, Li M, Fan L, et al. Identification and function
634 analysis of macrophages subsets in chronically inflamed human epididymis. *Int J Clin*
635 *Exp Pathol*. 2017;10(3):2461–2477.
- 636 66. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-
637 mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*.
638 2005 Jan 14;307(5707):254–8.
- 639 67. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, et al. Intestinal
640 CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve
641 classical dendritic cell functions. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3101–14.
- 642 68. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend
643 of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):467–
644 78.
- 645 69. Braun RK, Ferrick C, Neubauer P, Sjoding M, Sterner-Kock A, Kock M, et al. IL-17
646 producing gammadelta T cells are required for a controlled inflammatory response after
647 bleomycin-induced lung injury. *Inflammation*. 2008 Jun;31(3):167–79.
- 648 70. Mildner A, Marinkovic G, Jung S. Murine Monocytes: Origins, Subsets, Fates, and
649 Functions. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5).
- 650 71. Turner TT, Mammen T, Kavoussi P, Lysiak JJ, Costabile RA. Cytokine responses to *E.*
651 *coli*-induced epididymitis in the rat: blockade by vasectomy. *Urology*. 2011
652 Jun;77(6):1507.e9–14.
- 653 72. Pérez-Clavier R, Harrison RG, Macmillian EW. The pattern of the lymphatic drainage
654 of the rat epididymis. *J Anat*. 1982 Jun;134(Pt 4):667–75.
- 655 73. Suzuki F. Microvasculature of the mouse testis and excurrent duct system. *Am J Anat*.
656 1982 Apr;163(4):309–25.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

657 74. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, André M, et al.
658 Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS*
659 *Lett.* 2005 Jul 4;579(17):3487–92.

660 75. Kondo T, Toyoshima Y, Ishii Y, Kyuwa S. Natural killer T cells in adipose tissue are
661 activated in lean mice. *Exp Anim.* 2013;62(4):319–28.

662 76. Steinert EM, Thompson EA, Beura LK, Adam OA, Mitchell JS, Guo M, et al. Cutting
663 Edge: Evidence for Nonvascular Route of Visceral Organ Immunosurveillance by T
664 Cells. *J Immunol.* 2018 Jul 15;201(2):337–42.

665 77. Beccia DJ, Krane RJ, Olsson CA. Clinical management of non-testicular intrascrotal
666 tumors. *J Urol.* 1976 Oct;116(4):476–9.80.

667 78. Mandon M, Hermo L, Cyr DG. Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common
668 Properties with Adult Stem Cells. *Biol Reprod.* 2015 Nov;93(5):115.

669 79. Desai KV, Flanders KC, Kondaiah P. Expression of transforming growth factor-beta
670 isoforms in the rat male accessory sex organs and epididymis. *Cell Tissue Res.* 1998
671 Nov;294(2):271–7.

672 80. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive
673 immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:235–71.

674 81. Silva-Santos B, Serre K, Norell H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2015
675 Nov;15(11):683–91.

676 82. Lee J, Minden MD, Chen WC, Streck E, Chen B, Kang H, et al. Allogeneic Human
677 Double Negative T Cells as a Novel Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia and
678 Its Underlying Mechanisms. *Clin Cancer Res.* 2018 Jan 15;24(2):370–82.

679 83. Young KJ, Kay LS, Phillips MJ, Zhang L. Antitumor activity mediated by double-
680 negative T cells. *Cancer Res.* 2003 Nov 15;63(22):8014–21.

681 84. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive
682 immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007 Dec
683 6;450(7171):903–7.

684 85. Jhappan C, Gallahan D, Stahle C, Chu E, Smith GH, Merlino G, et al. Expression of an
685 activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces
686 neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes Dev.* 1992
687 Mar;6(3):345–55.

688 86. Stöcklin E, Botteri F, Groner B. An activated allele of the c-erbB-2 oncogene impairs
689 kidney and lung function and causes early death of transgenic mice. *J Cell Biol.* 1993
690 Jul;122(1):199–208.

691 87. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Activated neu induces rapid tumor progression. *J Biol*
692 *Chem.* 1996 Mar 29;271(13):7673–8.

693 88. Gilbert E, Morel A, Tulliez M, Maunoury R, Terzi F, Miquerol L, et al. In vivo effects
694 of activated H-ras oncogene expressed in the liver and in urogenital tissues. *Int J*

- Cancer. 1997 Nov 27;73(5):749–56.
89. Korpelainen EI, Karkkainen MJ, Tenhunen A, Lakso M, Rauvala H, Vierula M, et al. Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: evidence for nonendothelial targets for VEGF. *J Cell Biol.* 1998 Dec 14;143(6):1705–12.
90. La Perle KMD, Blomme EAG, Sagartz JE, Capen CC. Epididymal cribriform hyperplasia with nuclear atypia in p53 homozygous knockout mice on a mixed 129/Sv-FVB/N background. *Comp Med.* 2002 Dec;52(6):568–71.
91. Bierie B, Nozawa M, Renou J-P, Shillingford JM, Morgan F, Oka T, et al. Activation of beta-catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation. *Oncogene.* 2003 Jun 19;22(25):3875–87.
92. Sipilä P, Shariatmadari R, Huhtaniemi IT, Poutanen M. Immortalization of epididymal epithelium in transgenic mice expressing simian virus 40 T antigen: characterization of cell lines and regulation of the polyoma enhancer activator 3. *Endocrinology.* 2004 Jan;145(1):437–46.
93. Frew IJ, Minola A, Georgiev S, Hitz M, Moch H, Richard S, et al. Combined VHLH and PTEN mutation causes genital tract cystadenoma and squamous metaplasia. *Mol Cell Biol.* 2008 Jul;28(14):4536–48.
94. Hedger MP. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl.* 2011 Dec;32(6):625–40.
95. Veräjänkorka E, Pöllänen P, Hänninen A, Martikainen M, Sundström J, Antola H. IL-10 is highly expressed in the cryptorchid cryptepididymal epithelium: a probable mechanism preventing immune responses against autoantigenic spermatozoa in the epididymal tubule. *Int J Androl.* 2002 Jun;25(3):129–33.
96. Winnall WR, Wu H, Sarraj MA, Rogers PAW, de Kretser DM, Girling JE, et al. Expression patterns of activin, inhibin and follistatin variants in the adult male mouse reproductive tract suggest important roles in the epididymis and vas deferens. *Reprod Fertil Dev.* 2013;25(3):570–80.
97. Bahathiq AO, Stewart RL, Baxter L, Wells M, Moore HD, Ledger WL. Tissue immunoexpression and messenger ribonucleic acid localization of inhibin/activin subunit in human epididymis. *Fertil Steril.* 2005 Jan;83(1):78–85.
98. Segerer SE, Müller N, Brandt J van den, Kapp M, Dietl J, Reichardt HM, et al. The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2008 May 6;6:17.
99. Hedger MP, Winnall WR, Phillips DJ, de Kretser DM. The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. *Vitam Horm.* 2011;85:255–97.
100. Wijayarathna R, de Kretser DM, Sreenivasan R, Ludlow H, Middendorff R, Meinhardt A, et al. Comparative analysis of activins A and B in the adult mouse epididymis and vas deferens. *Reproduction.* 2018;155(1):15–23.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

101. Zhang T, Guo CX, Hu ZY, Liu YX. Localization of plasminogen activator and inhibitor, LH and androgen receptors and inhibin subunits in monkey epididymis. *Mol Hum Reprod.* 1997 Nov;3(11):945–52.

102. Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 2002 Aug 19;196(4):447–57.

103. Zhu BT. Development of selective immune tolerance towards the allogeneic fetus during pregnancy: Role of tryptophan catabolites (Review). *Int J Mol Med.* 2010 Jun;25(6):831–5.

104. Bomgardner D, Wehrenberg U, Rune GM. TGF-beta could be involved in paracrine actions in the epididymis of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Androl.* 1999 Jun;20(3):375–83.

105. Oh YS, Na EJ, Gye MC. Effects of bilateral vasectomy on the interleukin 1 system in mouse epididymis. *Am J Reprod Immunol.* 2016;76(3):235–42.

106. Pierucci-Alves F, Midura-Kiela MT, Fleming SD, Schultz BD, Kiela PR. Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dendritic Cells Is Required for Immunotolerance to Sperm in the Epididymis. *Front Immunol.* 2018;9:1882.

107. Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, et al. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod.* 2005 Sep;73(3):404–13.

108. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao D-M, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:60–73.

109. Wheeler K, Tardif S, Rival C, Luu B, Bui E, Del Rio R, et al. Regulatory T cells control tolerogenic versus autoimmune response to sperm in vasectomy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 May 3;108(18):7511–6.

110. Rival C, Wheeler K, Jeffrey S, Qiao H, Luu B, Tewalt EF, et al. Regulatory T cells and vasectomy. *J Reprod Immunol.* 2013 Nov;100(1):66–75.

111. Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2006 Sep;80(3):458–70.

112. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut.* 2010 May;59(5):595–604.

113. Martina MN, Noel S, Saxena A, Rabb H, Hamad ARA. Double negative (DN) $\alpha\beta$ T cells: misperception and overdue recognition. *Immunol Cell Biol.* 2015 Mar;93(3):305–10.

114. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat*

- 773 Med. 2000 Jul;6(7):782–9.
- 774 115. Gao JF, McIntyre MSF, Juvet SC, Diao J, Li X, Vanama RB, et al. Regulation of
775 antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells. Eur J
776 Immunol. 2011 Sep;41(9):2699–708.
- 777 116. Hillhouse EE, Lesage S. A comprehensive review of the phenotype and function of
778 antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. J Autoimmun. 2013
779 Feb;40:58–65.
- 780 117. Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of
781 human TCR- $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ double-negative T cells. Eur J Immunol. 2011
782 Mar;41(3):739–48.
- 783 118. Stammer A, Müller D, Tabuchi Y, Konrad L, Middendorff R. TGF β s modulate
784 permeability of the blood-epididymis barrier in an in vitro model. PLoS ONE.
785 2013;8(11):e80611.

786

787 FIGURE LEGENDS

788 *Figure 1. Model of innate and adaptive responses to urogenital tract ascending pathogens.*

789 (1) Epididymal epithelial cells have evolved innate mechanisms to fight pathogens, of which
790 expression of various TLRs, antimicrobial molecules (nitric oxide,IDO, β -defensins...), and
791 pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6...). (2) Interstitial B cells may be responsible for the
792 secretion of local IgAs and/or may phagocyte antibody-coated bacteria to limit their
793 dissemination in the tissue and induce specific effector T cells. Activated B cells may then
794 classically activate helper T cells. (3) Given the high proportion of MPs/APCs and canonical
795 effector T cells in the tissue, it is likely that classical immune responses are set toward
796 pathogens. APCs could sample circulating foreign antigens and present them to effector CD4 $^+$
797 and CD8 $^+$ T cells, inducing deadly cytotoxicity to infected cells while helper T cells sustain
798 the reaction. Depending on the population of APCs, some cells could migrate to the draining
799 lymph node to elicit the recruitment of effector cells to the infected epididymis. (4) In case of
800 an epithelial breach due to a severe infection, some CX $_3$ CR1 $^+$ CD11c $^+$ MPs may participate to
801 the elimination of cellular or pathogen debris released into the interstitium. (5) The newly

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

identified epididymal $\gamma\delta$ T cells could be activated either by APCs or directly by infected cells. Once activated they could become cytotoxic thus participating to bacterial clearance. They are also expected to promote the epithelial cell maintenance in case of a cell injury following severe infections. The epididymal fat pad is suggested as a potential immune reservoir where cytotoxic cells reside before being recruited during infections. (6) The few monocytes identified in the epididymis are expected to sense local stress signal which induces their extravasation into the tissue and their subsequent differentiation into inflammatory MPs (iDCs and iM ϕ) that temporarily sustain the immune response.

L, lumen. EP., epithelium. Int., interstitium. TJ, tight junction. TLR, Toll-like receptor. NO, nitric oxide. IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase. IL, interleukin. Ig, immunoglobulin. Ag, antigen. APC, antigen-presenting cell. MP, mononuclear phagocyte. NK, natural killer cell. NKT, natural killer T cells. iDC, inflammatory dendritic cell. iM ϕ , inflammatory macrophage. Class. mono, classical monocyte. N. class. mono, non classical monocyte.

NB: parts of the three figures use illustrations modified from Servier Medical Art, licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 unported license. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

Figure 2. Hypothetical complementary mechanisms of early immune surveillance of cancer cells.

(1) TGF- β 3 has been proposed as an autocrine inhibitor of epididymal epithelial cell growth to limit uncontrolled proliferation. (2) A classical immune response may be set to tumour cells. Modified antigens could be sampled by APCs and presented to effector T cells, inducing a cytotoxic response to epithelial tumour cells. (3) $\gamma\delta$ T cells can be directly activated by tumour cells to become cytotoxic and can induce indirect activation of cytotoxic CD8⁺ T cells by upregulating stimulating molecules on the tumour cell surface. $\gamma\delta$ T cells can

also inhibit angiogenesis. As for the immune response, the epididymal fat pad could participate to the early elimination of cancer cells by the release of cytotoxic cells as $\gamma\delta$ T cells, NK cells, and NKT cells. (4) Double negative (DN) T cells can selectively recognize transforming cells and become cytotoxic to suppress them.

L, lumen. Ep. Epithelium. Int., interstitium. TJ, tight junction. TGF- β , transforming growth factor-beta. APC, antigen-presenting cell. Ag, antigen. NK, natural killer cell. NKT, natural killer T cell.

Figure 3. Model of immune tolerance to sperm cells at steady state or following an interstitial leak of sperm antigens.

(1,2,3) The epididymal epithelial cells are known to express several molecules implicated in the inhibition of activation (IL-10, activin A, TGF- β) or in the killing of activated T cells (IDO). This list may not be exhaustive. (4) In particular cases such as severe tissue injuries leading to a leak of sperm antigens in the interstitium, tissue CD103⁺ DCs are to migrate to the draining lymph node where they present some meiotic germ cell antigens (MGCA) to T cells. The activation of lymph node T cells could then lead to the epididymal recruitment of Treg cells able to inhibit effector T cells activation thanks to their secretion of IL-10 and TGF- β . (5) A classical way to induce a tolerogenic response is the weak activation of effector cells by local APCs in an immunosuppressive microenvironment, leading either to their anergy or to their apoptosis. (6) A new immunosuppressive population of double negative T cells (DN T cells) has been described in the mouse epididymis. As in other organs, they are proposed to get activated by local APCs to become cytotoxic to activated T cells and APCs.

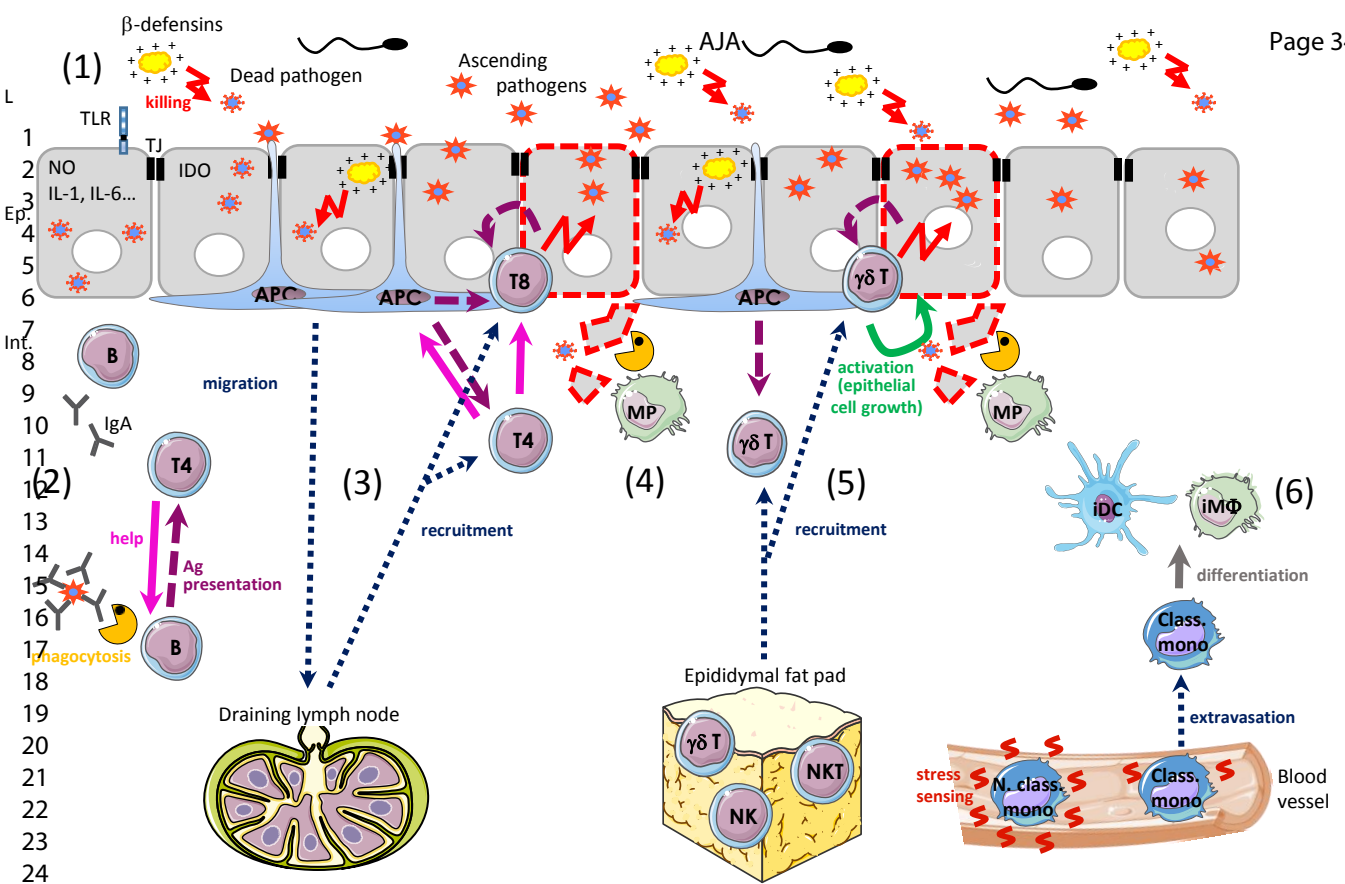
L, lumen. Ep. Epithelium. Int., interstitium. TJ, tight junction. IL, interleukin. TGF- β , transforming growth factor-beta. IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase. APC, antigen-presenting

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

849 cell. Ag, antigen. DN T, double negative T cell. Treg, regulatory T cell. DC, dendritic cell.

850 MGCA, meiotic germ cell antigen.

AJA



L

Ep.

Int.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

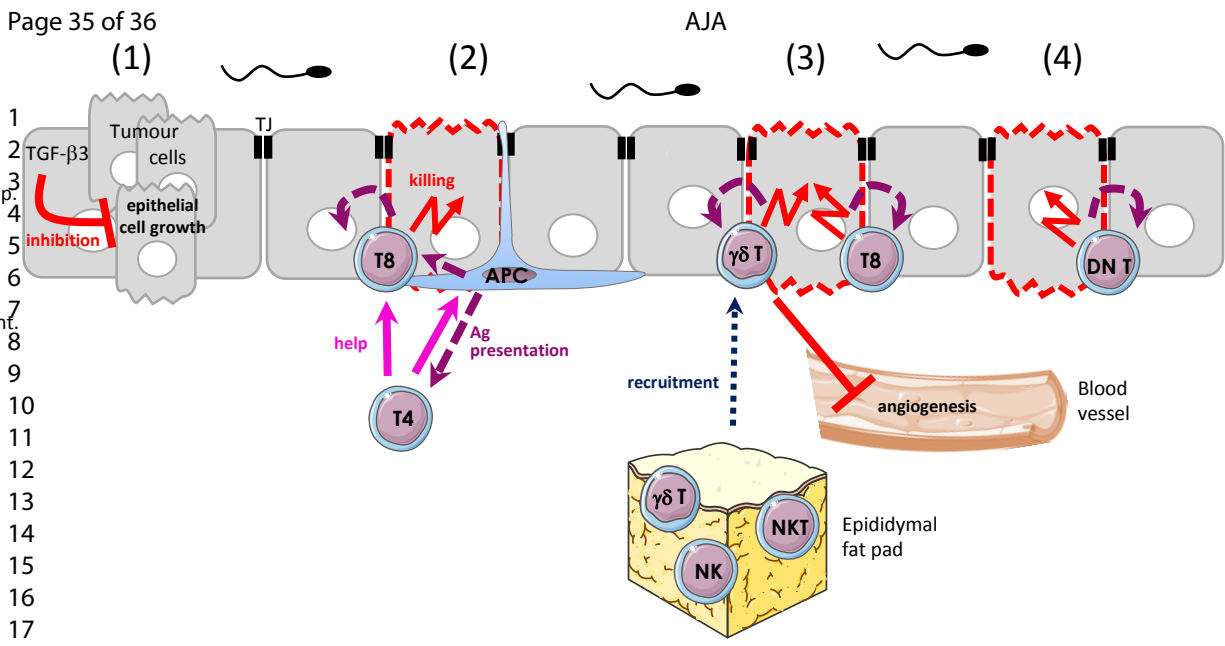
32

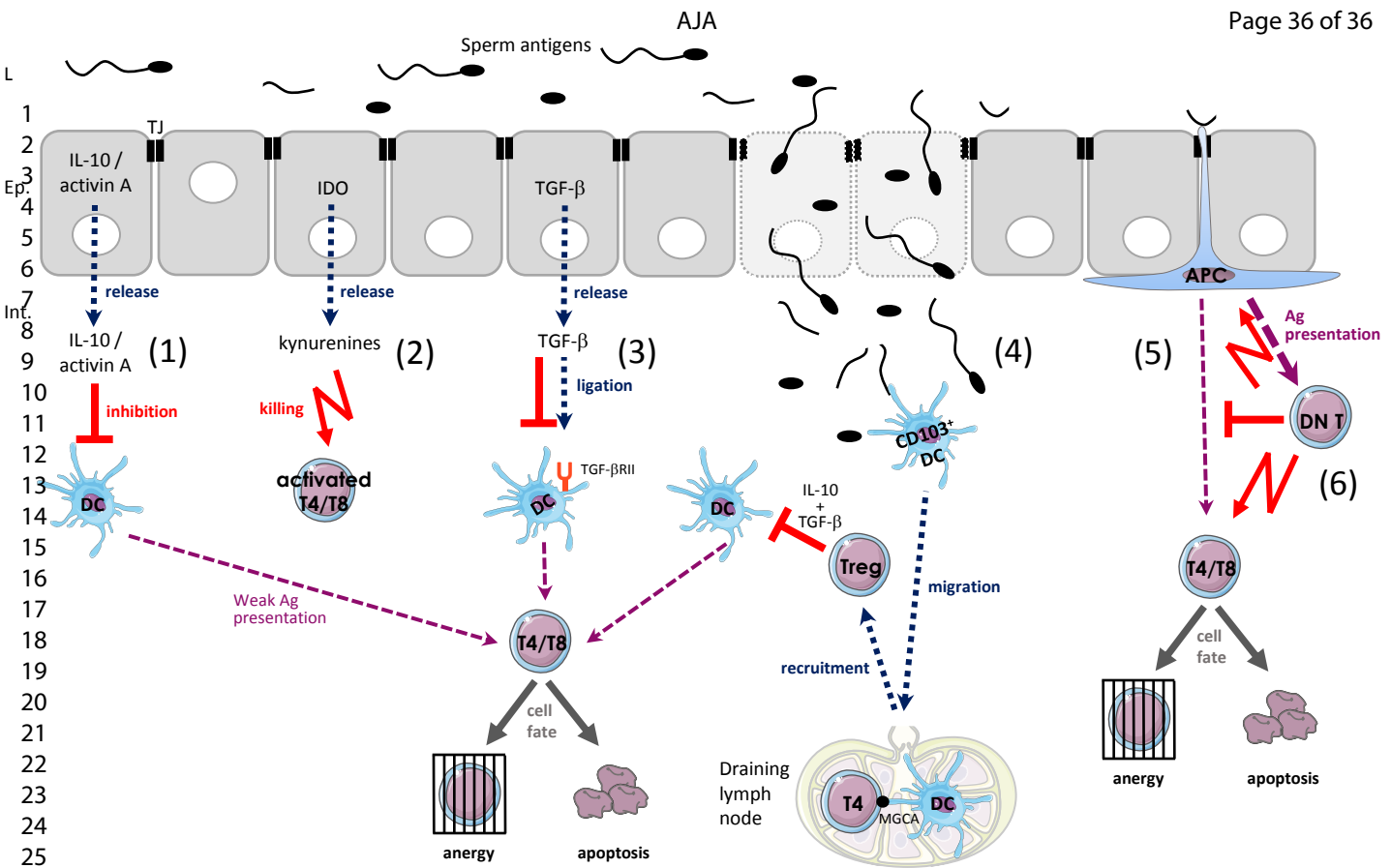
33

34

35

36





Références bibliographiques

- Abe, K., Takano, H., and 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.
- Abou-Haïla, A., and Fain-Maurel, M.A. (1984). Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. *Anat. Rec.* 209, 197–208.
- Adamali, H.I., and Hermo, L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J. Androl.* 17, 208–222.
- Agarwal, A., and Hoffer, A.P. (1989). Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. *J. Androl.* 10, 425–431.
- Aitken, R.J., and Baker, M.A. (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 581–588.
- Akhurst, R.J., and Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 11, S44-51.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L., and Storey, B.T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8, 338–348.
- Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* 126, 32–41.
- Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell. Sci.* 116, 217–224.
- Armstrong, P.B. (2001). The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. *Trends Immunol.* 22, 47–52.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 190, 995–1004.
- Avelaño, M.I., Rotstein, N.P., and Vermouth, N.T. (1992). Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochem. J.* 283 (Pt 1), 235–241.
- Avellar, M.C.W., Honda, L., Hamil, K.G., Radhakrishnan, Y., Yenugu, S., Grossman, G., Petrusz, P., French, F.S., and Hall, S.H. (2007). Novel aspects of the sperm-associated antigen 11 (SPAG11) gene organization and expression in cattle (*Bos taurus*). *Biol. Reprod.* 76, 1103–1116.
- Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* 250, 91–104.
- Bahathiq, A.O., Stewart, R.L., Baxter, L., Wells, M., Moore, H.D., and Ledger, W.L. (2005). Tissue immunoexpression and messenger ribonucleic acid localization of inhibin/activin subunit in human epididymis. *Fertil. Steril.* 83, 78–85.

- Ball, H.J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C.J.D., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillan, J.A., Stocker, R., Jermini, L.S., and Hunt, N.H. (2007). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 396, 203–213.
- Bancroft, G.J., Schreiber, R.D., and Unanue, E.R. (1991). Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.* 124, 5–24.
- Baska, K.M., Manandhar, G., Feng, D., Agca, Y., Tengowski, M.W., Sutovsky, M., Yi, Y.-J., and Sutovsky, P. (2008). Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J. Cell. Physiol.* 215, 684–696.
- Bearer, E.L., and Friend, D.S. (1990). Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J Electron Microsc Tech* 16, 281–297.
- Beaulieu, V., Da Silva, N., Pastor-Soler, N., Brown, C.R., Smith, P.J.S., Brown, D., and Breton, S. (2005). Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H⁺-ATPase recycling. *J. Biol. Chem.* 280, 8452–8463.
- Beccia, D.J., Krane, R.J., and Olsson, C.A. (1976). Clinical management of non-testicular intrascrotal tumors. *J. Urol.* 116, 476–479.
- Befus, A.D., Mowat, C., Gilchrist, M., Hu, J., Solomon, S., and Bateman, A. (1999). Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J. Immunol.* 163, 947–953.
- Belladonna, M.L., Puccetti, P., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Volpi, C., Gizzi, S., Pallotta, M.T., Fioretti, M.C., and Grohmann, U. (2007). Immunosuppression via tryptophan catabolism: the role of kynurenine pathway enzymes. *Transplantation* 84, S17–20.
- Berti, F.C.B., Pereira, A.P.L., Cebinelli, G.C.M., Trugilo, K.P., and Brajão de Oliveira, K. (2017). The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 34, 1–13.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453, 1051–1057.
- Bhattacharyya, S., Sen, P., Wallet, M., Long, B., Baldwin, A.S., and Tisch, R. (2004). Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. *Blood* 104, 1100–1109.
- Bierie, B., Nozawa, M., Renou, J.-P., Shillingford, J.M., Morgan, F., Oka, T., Taketo, M.M., Cardiff, R.D., Miyoshi, K., Wagner, K.-U., et al. (2003). Activation of beta-catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation. *Oncogene* 22, 3875–3887.
- Biswas, B., and Yenugu, S. (2011). Antimicrobial responses in the male reproductive tract of lipopolysaccharide challenged rats. *Am. J. Reprod. Immunol.* 65, 557–568.
- Biswas, B., Bhushan, S., Rajesh, A., Suraj, S.K., Lu, Y., Meinhardt, A., and Yenugu, S. (2015). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) induced antimicrobial gene expression in the male reproductive tract of rat: evaluation of the potential of Defensin 21 to limit infection. *Andrology* 3, 368–375.

- Björkgren, I., Saastamoinen, L., Krutskikh, A., Huhtaniemi, I., Poutanen, M., and Sipilä, P. (2012). Dicer1 ablation in the mouse epididymis causes dedifferentiation of the epithelium and imbalance in sex steroid signaling. *PLoS ONE* 7, e38457.
- Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32, 305–315.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., and Lodish, H.F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342, 1350–1358.
- Blobel, C.P. (2000). Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev. Reprod.* 5, 75–83.
- Bobadilla, K., Sada, E., Jaime, M.E., González, Y., Ramachandra, L., Rojas, R.E., Pedraza-Sánchez, S., Michalak, C., González-Noriega, A., and Torres, M. (2013). Human phagosome processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigens is modulated by interferon- γ and interleukin-10. *Immunology* 138, 34–46.
- Bomgardner, D., Wehrenberg, U., and Rune, G.M. (1999). TGF-beta could be involved in paracrine actions in the epididymis of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J. Androl.* 20, 375–383.
- Bonneville, M., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 467–478.
- Britan, A., Maffre, V., Tone, S., and Drevet, J.R. (2006). Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res.* 324, 301–310.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250.
- Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Wen, Z., Schreiber, R.D., and Darnell, J.E. (1996). Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7673–7678.
- Brosh, N., Sternberg, D., Honigwachs-Sha'anani, J., Lee, B.C., Shav-Tal, Y., Tzehoval, E., Shulman, L.M., Toledo, J., Hacham, Y., and Carmi, P. (1995). The plasmacytoma growth inhibitor restrictin-P is an antagonist of interleukin 6 and interleukin 11. Identification as a stroma-derived activin A. *J. Biol. Chem.* 270, 29594–29600.
- Brown, C.B., Boyer, A.S., Runyan, R.B., and Barnett, J.V. (1999). Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 283, 2080–2082.
- Browne, J.A., Leir, S.-H., Eggener, S.E., and Harris, A. (2018). Region-specific innate antiviral responses of the human epididymis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 473, 72–78.
- Byrne, G.I., Lehmann, L.K., and Landry, G.J. (1986). Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect. Immun.* 53, 347–351.
- Cao, D., Li, Y., Yang, R., Wang, Y., Zhou, Y., Diao, H., Zhao, Y., Zhang, Y., and Lu, J. (2010). Lipopolysaccharide-induced epididymitis disrupts epididymal beta-defensin expression and inhibits sperm motility in rats. *Biol. Reprod.* 83, 1064–1070.
- Cao, W., Chen, W., Liang, X., Zhou, J., Wei, C., Cui, S., and Liu, J. (2014). All-trans-retinoic acid ameliorates the inflammation by inducing transforming growth factor beta 1 and interleukin 10 in mouse epididymitis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 71, 312–321.

- Carey, A.J., Tan, C.K., and Ulett, G.C. (2012). Infection-induced IL-10 and JAK-STAT: A review of the molecular circuitry controlling immune hyperactivity in response to pathogenic microbes. *JAKSTAT* 1, 159–167.
- Carlin, J.M., Borden, E.C., and Byrne, G.I. (1989). Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. *J. Interferon Res.* 9, 329–337.
- Carr, D.W., Usselman, M.C., and Acott, T.S. (1985). Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol. Reprod.* 33, 588–595.
- Caspar-Bauguil, S., Cousin, B., Galinier, A., Segafredo, C., Nibbelink, M., André, M., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (2005). Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett.* 579, 3487–3492.
- Cerwenka, A., and Swain, S.L. (1999). TGF-beta1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes Infect.* 1, 1291–1296.
- Champroux, A., Torres-Carreira, J., Gharagozloo, P., Drevet, J.R., and Kocer, A. (2016). Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin Androl* 26, 17.
- Chan, Y.R., and Gallo, R.L. (1998). PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *J. Biol. Chem.* 273, 28978–28985.
- Chang, H., Brown, C.W., and Matzuk, M.M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr. Rev.* 23, 787–823.
- Chang, J., Kunkel, S.L., and Chang, C.-H. (2009). Negative regulation of MyD88-dependent signaling by IL-10 in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18327–18332.
- Chen, Y., Inobe, J., Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (1995). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376, 177–180.
- Chen, Z., O’Shaughnessy, M.J., Gramaglia, I., Panoskaltsis-Mortari, A., Murphy, W.J., Narula, S., Roncarolo, M.G., and Blazar, B.R. (2003). IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function. *Blood* 101, 5076–5083.
- Cheng, L., Chen, Q., Zhu, W., Wu, H., Wang, Q., Shi, L., Zhao, X., and Han, D. (2016). Toll-like Receptors 4 and 5 Cooperatively Initiate the Innate Immune Responses to Uropathogenic *Escherichia coli* Infection in Mouse Epididymal Epithelial Cells. *Biol. Reprod.* 94, 58.
- Cheroutre, H., and Husain, M.M. (2013). CD4 CTL: living up to the challenge. *Semin. Immunol.* 25, 273–281.
- Chertov, O., Michiel, D.F., Xu, L., Wang, J.M., Tani, K., Murphy, W.J., Longo, D.L., Taub, D.D., and Oppenheim, J.J. (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 271, 2935–2940.
- Cho, C., Bunch, D.O., Faure, J.E., Goulding, E.H., Eddy, E.M., Primakoff, P., and Myles, D.G. (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281, 1857–1859.
- Clermont, Y., and Flannery, J. (1970). Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. *Biol. Reprod.* 3, 283–292.

- Cohen, J.P., Hoffer, A.P., and Rosen, S. (1976). Carbonic anhydrase localization in the epididymis and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. *Biol. Reprod.* 14, 339–346.
- Cole, A.M., Ganz, T., Liese, A.M., Burdick, M.D., Liu, L., and Strieter, R.M. (2001). Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J. Immunol.* 167, 623–627.
- Collin, M., Linge, H.M., Bjartell, A., Giwercman, A., Malm, J., and Egesten, A. (2008). Constitutive expression of the antibacterial CXC chemokine GCP-2/CXCL6 by epithelial cells of the male reproductive tract. *J. Reprod. Immunol.* 79, 37–43.
- Com, E., Bourgeon, F., Evrard, B., Ganz, T., Collet, D., Jégou, B., and Pineau, C. (2003). Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol. Reprod.* 68, 95–104.
- Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G.W. (2005). The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7637–7644.
- Cooper, T.G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 119–136.
- Cooper, T.G., and Yeung, C.-H. (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc. Res. Tech.* 61, 28–38.
- Cooper, T.G., Yeung, C.-H., Jones, R., Orgebin-Crist, M.-C., and 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.
- Cornwall, G.A., and Hann, S.R. (1995). Transient appearance of CRES protein during spermatogenesis and caput epididymal sperm maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 41, 37–46.
- Cornwall, G.A., and Hsia, N. (2002). [Cres (cystatin-related epididymal spermatogenic) gene regulation and function]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 8, 313–318.
- Cornwall, G.A., and Hsia, N. (2003). A new subgroup of the family 2 cystatins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 200, 1–8.
- Cottrez, F., and Groux, H. (2001). Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *J. Immunol.* 167, 773–778.
- Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P., and Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93, 1159–1170.
- Cunliffe, R.N., and Mahida, Y.R. (2004). Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J. Leukoc. Biol.* 75, 49–58.
- Curtale, G., Mirolo, M., Renzi, T.A., Rossato, M., Bazzoni, F., and Locati, M. (2013). Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 11499–11504.

- Curti, A., Trabanelli, S., Salvestrini, V., Baccarani, M., and Lemoli, R.M. (2009). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 113, 2394–2401.
- Cyr, D.G., Robaire, B., and Hermo, L. (1995). Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microsc. Res. Tech.* 30, 54–66.
- Cyr, D.G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J.M., and Laird, D.W. (1999). Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology* 140, 3815–3825.
- Cyr, D.G., Gregory, M., Dubé, E., Dufresne, J., Chan, P.T.K., and 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.
- Da Silva, N., Cortez-Retamozo, V., Reinecker, H.-C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., Swirski, F.K., Pittet, M.J., and Breton, S. (2011). A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141, 653–663.
- Dacheux, J.-L., and Dacheux, F. (2014). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 147, R27–42.
- Dacheux, J.-L., Gatti, J.L., and Dacheux, F. (2003). Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.* 61, 7–17.
- Dacheux, J.-L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., Druart, X., Gatti, J.L., and Dacheux, F. (2009). Mammalian epididymal proteome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306, 45–50.
- D’Amours, O., Bordeleau, L.-J., Frenette, G., Blondin, P., Leclerc, P., and Sullivan, R. (2012). Binder of sperm 1 and epididymal sperm binding protein 1 are associated with different bull sperm subpopulations. *Reproduction* 143, 759–771.
- Däubener, W., Posdziech, V., Hadding, U., and MacKenzie, C.R. (1999). Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med. Microbiol. Immunol.* 187, 143–147.
- Davidson, D.J., Currie, A.J., Reid, G.S.D., Bowdish, D.M.E., MacDonald, K.L., Ma, R.C., Hancock, R.E.W., and Speert, D.P. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J. Immunol.* 172, 1146–1156.
- De Yang, null, Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters, J., Oppenheim, J.J., and Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* 192, 1069–1074.
- Derynck, R., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* 29, 117–129.
- Desai, K.M., Gingell, J.C., and Haworth, J.M. (1986). Localised intratesticular abscess complicating epididymo-orchitis: the use of scrotal ultrasonography in diagnosis and management. *Br Med J (Clin Res Ed)* 292, 1361–1362.

- Desai, K.V., Flanders, K.C., and Kondaiah, P. (1998). Expression of transforming growth factor-beta isoforms in the rat male accessory sex organs and epididymis. *Cell Tissue Res.* 294, 271–277.
- Deslouches, B., and Di, Y.P. (2017). Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. *Oncotarget* 8, 46635–46651.
- Diamond, G., and Bevins, C.L. (1998). beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88, 221–225.
- Diao, H., Yu, H.-G., Sun, F., Zhang, Y.-L., and Tanphaichitr, N. (2011). Rat recombinant β -defensin 22 is a heparin-binding protein with antimicrobial activity. *Asian J. Androl.* 13, 305–311.
- Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S., and Akhurst, R.J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121, 1845–1854.
- Diekman, A.B. (2003). Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 298–308.
- Dietz, O. (1960). [The change in the degree of fertility during the course of acute nonspecific epididymitis. (Contribution to the pathogenesis of primary inhibition of spermiogenesis)]. *Arch Klin Exp Dermatol* 211, 160–166.
- ten Dijke, P., and Hill, C.S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* 29, 265–273.
- Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., and Shevach, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151, 1224–1234.
- Divanovic, S., Sawtell, N.M., Trompette, A., Warning, J.I., Dias, A., Cooper, A.M., Yap, G.S., Arditi, M., Shimada, K., Duhadaway, J.B., et al. (2012). Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection. *J. Infect. Dis.* 205, 152–161.
- Dohi, T., Ejima, C., Kato, R., Kawamura, Y.I., Kawashima, R., Mizutani, N., Tabuchi, Y., and Kojima, I. (2005). Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. *Gastroenterology* 128, 411–423.
- Dohle, G.R., Colpi, G.M., Hargreave, T.B., Papp, G.K., Jungwirth, A., Weidner, W., and EAU Working Group on Male Infertility (2005). EAU guidelines on male infertility. *Eur. Urol.* 48, 703–711.
- Duan, Y.-G., Wang, P., Zheng, W., Zhang, Q., Huang, W., Jin, F., and Cai, Z. (2016). Characterisation of dendritic cell subsets in chronically inflamed human epididymis. *Andrologia* 48, 431–440.
- Dubé, E., Chan, P.T.K., Hermo, L., and Cyr, D.G. (2007). Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. *Biol. Reprod.* 76, 1034–1044.
- Dubé, E., Dufresne, J., Chan, P.T.K., Hermo, L., and Cyr, D.G. (2010). Assessing the role of claudins in maintaining the integrity of epididymal tight junctions using novel human epididymal cell lines. *Biol. Reprod.* 82, 1119–1128.

- Dufaure, J.P., Lareyre, J.J., Schwaab, V., Mattei, M.G., and Drevet, J.R. (1996). Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* 319, 559–568.
- Dufresne, J., and Cyr, D.G. (2007). Activation of an SP binding site is crucial for the expression of claudin 1 in rat epididymal principal cells. *Biol. Reprod.* 76, 825–832.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.
- Dürr, U.H.N., Sudheendra, U.S., and Ramamoorthy, A. (2006). LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1408–1425.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 9, 1069–1077.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4, 1206–1212.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C., et al. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* 176, 6752–6761.
- Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol.* 172, 5149–5153.
- Fawcett, D.W., and Hollenberg, R.D. (1963). Changes in the acrosome of the guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 60, 276–292.
- Fei, Z., Hu, S., Xiao, L., Zhou, J., Diao, H., Yu, H., Fang, S., Wang, Y., Wan, Y., Wang, W., et al. (2012). mBin1b transgenic mice show enhanced resistance to epididymal infection by bacteria challenge. *Genes Immun.* 13, 445–451.
- Ferguson, J., and Scothorne, R.J. (1977). Extended survival of pancreatic islet allografts in the testis of guinea-pigs. *J. Anat.* 124, 1–8.
- Fijak, M., Bhushan, S., and Meinhardt, A. (2011). Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol. Biol.* 677, 459–470.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., and O’Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146, 3444–3451.
- Flickinger, C.J., Bush, L.A., Howards, S.S., and Herr, J.C. (1997). Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat. Rec.* 248, 380–390.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83–87.

- Fouchécourt, S., Métayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., and Dacheux, J.L. (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol. Reprod.* 62, 1790–1803.
- Francavilla, F., Santucci, R., Barbonetti, A., and Francavilla, S. (2007). Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Front. Biosci.* 12, 2890–2911.
- Francavilla F., Barbonetti A. (2009) Male Autoimmune Infertility. In: Krause W., Naz R. (eds) *Immune Infertility*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Frenette, G., Lessard, C., and 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.
- Frew, I.J., Minola, A., Georgiev, S., Hitz, M., Moch, H., Richard, S., Vortmeyer, A.O., and Krek, W. (2008). Combined Vhlh and Pten Mutation Causes Genital Tract Cystadenoma and Squamous Metaplasia. *Mol Cell Biol* 28, 4536–4548.
- Friend, D.S., and Gilula, N.B. (1972). Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J. Cell Biol.* 53, 758–776.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G.B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* 196, 459–468.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993a). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993b). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.
- Ganem, J.P., Jhaveri, F.M., and Marroum, M.C. (1998). Primary adenocarcinoma of the epididymis: case report and review of the literature. *Urology* 52, 904–908.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 710–720.
- Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L.H., Craft, J., and Yin, Z. (2003). Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J. Exp. Med.* 198, 433–442.
- Gatti, J.-L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., and Dacheux, J.-L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 321–339.
- Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., and Durandy, A. (1999). TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J. Immunol.* 162, 4567–4575.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656–661.
- Genestier, L., Kasibhatla, S., Brunner, T., and Green, D.R. (1999). Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *J. Exp. Med.* 189, 231–239.

- Gilbert, E., Morel, A., Tulliez, M., Maunoury, R., Terzi, F., Miquerol, L., and Kahn, A. (1997). In vivo effects of activated H-ras oncogene expressed in the liver and in urogenital tissues. *Int. J. Cancer* 73, 749–756.
- Gilks, C.B., Reid, P.E., Clement, P.B., and Owen, D.A. (1989). Histochemical changes in cervical mucus-secreting epithelium during the normal menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 51, 286–291.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404.
- Gomez Perdiguerro, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.
- Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2002). Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 46–53.
- Gorelik, L., Fields, P.E., and Flavell, R.A. (2000). Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J. Immunol.* 165, 4773–4777.
- Gorelik, L., Constant, S., and Flavell, R.A. (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J. Exp. Med.* 195, 1499–1505.
- Gorham, J.D., Güler, M.L., Fenoglio, D., Gubler, U., and Murphy, K.M. (1998). Low dose TGF-beta attenuates IL-12 responsiveness in murine Th cells. *J. Immunol.* 161, 1664–1670.
- Govinden, R., and Bhoola, K.D. (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol. Ther.* 98, 257–265.
- Gregory, M., and Cyr, D.G. (2006). Identification of multiple claudins in the rat epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 580–588.
- Griesemer, A.D., Sorenson, E.C., and Hardy, M.A. (2010). The role of the thymus in tolerance. *Transplantation* 90, 465–474.
- Grohmann, U., Fallarino, F., and Puccetti, P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* 24, 242–248.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 184, 19–29.
- Groux, H., O’Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1998). Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J. Immunol.* 160, 3188–3193.
- Guan, X., Inai, T., and Shibata, Y. (2005). Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Arch. Histol. Cytol.* 68, 213–225.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571–578.

- Guiton, R., Henry-Berger, J., and Drevet, J.R. (2013). The immunobiology of the mammalian epididymis: the black box is now open! *Basic Clin Androl* 23, 8.
- Guy, C.T., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (1996). Activated neu induces rapid tumor progression. *J. Biol. Chem.* 271, 7673–7678.
- Hall, J.C., Hadley, J., and 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.
- Hamil, K.G., Sivashanmugam, P., Richardson, R.T., Grossman, G., Ruben, S.M., Mohler, J.L., Petrusz, P., O’Rand, M.G., French, F.S., and Hall, S.H. (2000). HE2beta and HE2gamma, new members of an epididymis-specific family of androgen-regulated proteins in the human. *Endocrinology* 141, 1245–1253.
- Hancock, R.E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 1, 156–164.
- Hancock, R.E., and Chapple, D.S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1317–1323.
- Hancock, R.E.W., and Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 143–149.
- Hao, J., Dong, S., Xia, S., He, W., Jia, H., Zhang, S., Wei, J., O’Brien, R.L., Born, W.K., Wu, Z., et al. (2011). Regulatory role of V γ 1 $\gamma\delta$ T cells in tumor immunity through IL-4 production. *J. Immunol.* 187, 4979–4986.
- Harden, J.L., and Egilmez, N.K. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunol. Invest.* 41, 738–764.
- Harris, F., Dennison, S.R., and Phoenix, D.A. (2009). Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 10, 585–606.
- Head, J.R., Neaves, W.B., and Billingham, R.E. (1983). Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival. *Transplantation* 36, 423–431.
- Heath, V.L., Murphy, E.E., Crain, C., Tomlinson, M.G., and O’Garra, A. (2000). TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur. J. Immunol.* 30, 2639–2649.
- Hedger, M.P. (2011). Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J. Androl.* 32, 625–640.
- Hedger, M.P., and Clarke, L. (1993). Isolation of rat blood lymphocytes using a two-step Percoll density gradient. Effect of activin (erythroid differentiation factor) on peripheral T lymphocyte proliferation in vitro. *J. Immunol. Methods* 163, 133–136.
- Hedger, M.P., Drummond, A.E., Robertson, D.M., Risbridger, G.P., and de Kretser, D.M. (1989). Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61, 133–138.
- Hedger, M.P., Winnall, W.R., Phillips, D.J., and de Kretser, D.M. (2011). The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. *Vitam. Horm.* 85, 255–297.
- Helmerhorst, F.M., Finken, M.J., and Erwich, J.J. (1999). Antisperm antibodies: detection assays for antisperm antibodies: what do they test? *Hum. Reprod.* 14, 1669–1671.

- Hermo, L., Dworkin, J., and Oko, R. (1988). Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am. J. Anat.* 183, 107–124.
- Hermo, L., Oko, R., and Morales, C.R. (1994). Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int. Rev. Cytol.* 154, 106–189.
- 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., Chong, D.L., Moffatt, P., Sly, W.S., Waheed, A., and Smith, C.E. (2005). Region- and cell-specific differences in the distribution of carbonic anhydrases II, III, XII, and XIV in the adult rat epididymis. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 699–713.
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* 14, 821–830.
- Hiemstra, P.S., Maassen, R.J., Stolk, J., Heinzl-Wieland, R., Steffens, G.J., and Dijkman, J.H. (1996). Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect. Immun.* 64, 4520–4524.
- Hillhouse, E.E., and Lesage, S. (2013). A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells. *J. Autoimmun.* 40, 58–65.
- Hinton, B.T., and Hernandez, H. (1985). Selective luminal absorption of L-carnitine from the proximal regions of the rat epididymis. Possible relationships to development of sperm motility. *J. Androl.* 6, 300–305.
- Hinton, B.T., and Palladino, M.A. (1995). Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* 30, 67–81.
- Hoffer, A.P., and Hinton, B.T. (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, R.C., Howard, C.V., Lynch, R.V., and Lewis-Jones, D.I. (1995). Total number of immunocompetent cells in the normal rat epididymis and after vasectomy. *J. Reprod. Fertil.* 104, 193–198.
- Hoover, D.M., Rajashankar, K.R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J.J., Chertov, O., and Lubkowski, J. (2000). The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J. Biol. Chem.* 275, 32911–32918.
- Huber, S., Stahl, F.R., Schrader, J., Lüth, S., Presser, K., Carambia, A., Flavell, R.A., Werner, S., Blessing, M., Herkel, J., et al. (2009). Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells. *J. Immunol.* 182, 4633–4640.
- Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.G., Kuriyan, J., and Massagué, J. (2001). The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol. Cell* 8, 671–682.
- Ibrahim, N.M., Foster, D.N., and Crabo, B.G. (2001). Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. *J. Androl.* 22, 891–902.
- Ichinose, M., and Sawada, M. (1996). Enhancement of phagocytosis by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Peptides* 17, 1405–1414.

- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 171, 939–945.
- Jameson, J., and Havran, W.L. (2007). Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol. Rev.* 215, 114–122.
- Janeway, C.A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1, 1–13.
- Jantos, C., Baumgärtner, W., Durchfeld, B., and Schiefer, H.G. (1992). Experimental epididymitis due to *Chlamydia trachomatis* in rats. *Infect. Immun.* 60, 2324–2328.
- Jenssen, H., and Hancock, R.E.W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 91, 19–29.
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E.W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491–511.
- Jhappan, C., Gallahan, D., Stahle, C., Chu, E., Smith, G.H., Merlino, G., and Callahan, R. (1992). Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes Dev.* 6, 345–355.
- Jinquan, T., Quan, S., Jacobi, H.H., Madsen, H.O., Glue, C., Skov, P.S., Malling, H.J., and Poulsen, L.K. (2000). CXC chemokine receptor 4 expression and stromal cell-derived factor-1alpha-induced chemotaxis in CD4⁺ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10. *Immunology* 99, 402–410.
- Johnson, A.L., and Howards, S.S. (1975). Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. *Am. J. Physiol.* 228, 556–564.
- Johnston, D.S., Jelinsky, S.A., Bang, H.J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G.S., and Turner, T.T. (2005). The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol. Reprod.* 73, 404–413.
- Jollès, P., and Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell. Biochem.* 63, 165–189.
- Jones, M.A., Young, R.H., and Scully, R.E. (1997). Adenocarcinoma of the epididymis: a report of four cases and review of the literature. *Am. J. Surg. Pathol.* 21, 1474–1480.
- Jrad-Lamine, A., Henry-Berger, J., Goubeyre, P., Damon-Soubeyrand, C., Lenoir, A., Combaret, L., Saez, F., Kocer, A., Tone, S., Fuchs, D., et al. (2011). Deficient tryptophan catabolism along the kynurenine pathway reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. *J. Biol. Chem.* 286, 8030–8042.
- Jrad-Lamine, A., Henry-Berger, J., Damon-Soubeyrand, C., Saez, F., Kocer, A., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Munn, D.H., Mellor, A.L., Gharbi, N., et al. (2013). Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (*ido1*) is involved in the control of mouse caput epididymis immune environment. *PLoS ONE* 8, e66494.
- Kaartinen, V., Voncken, J.W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genet.* 11, 415–421.
- Kambayashi, T., and Laufer, T.M. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* 14, 719–730.

- Kaplan, M.H., Hufford, M.M., and Olson, M.R. (2015). The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 295–307.
- Karagiannidis, C., Hense, G., Martin, C., Epstein, M., Rückert, B., Mantel, P.-Y., Menz, G., Uhlig, S., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C.B. (2006). Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 111–118.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., et al. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19–28.
- Kaver, I., Matzkin, H., and Braf, Z.F. (1990). Epididymo-orchitis: a retrospective study of 121 patients. *J Fam Pract* 30, 548–552.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell* 6, 1365–1375.
- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637–650.
- Kaya, M., Boleken, M.E., Zeyrek, F., Ozardali, I., Kanmaz, T., Erel, O., and Yücesan, S. (2006). Oxidative and antioxidative status in the testes of rats with acute epididymitis. *Urol. Int.* 76, 353–358.
- Kazeem, A.A. (1988). A critical consideration of the rat epididymis as an immunologically privileged site. *Scand. J. Immunol.* 27, 149–156.
- Kim, B., and Breton, S. (2016). The MAPK/ERK-Signaling Pathway Regulates the Expression and Distribution of Tight Junction Proteins in the Mouse Proximal Epididymis. *Biol. Reprod.* 94, 22.
- Kim, B., Roy, J., Shum, W.W.C., Da Silva, N., and Breton, S. (2015). Role of testicular luminal factors on Basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 92, 9.
- Kirchhoff, C. (1999). Gene expression in the epididymis. *Int. Rev. Cytol.* 188, 133–202.
- Kirchhoff, C., and Hale, G. (1996). Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 177–184.
- Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., et al. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111, 1665–1672.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903–907.
- Kondo, T., Toyoshima, Y., Ishii, Y., and Kyuwa, S. (2013). Natural killer T cells in adipose tissue are activated in lean mice. *Exp. Anim.* 62, 319–328.
- Korpelainen, E.I., Karkkainen, M.J., Tenhunen, A., Lakso, M., Rauvala, H., Vierula, M., Parvinen, M., and Alitalo, K. (1998). Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: evidence for nonendothelial targets for VEGF. *J. Cell Biol.* 143, 1705–1712.

- Krause W.K.H. (2009) Sperm Functions Influenced by Immune Reactions. In: Krause W., Naz R. (eds) Immune Infertility. Springer, Berlin, Heidelberg
- Kujala, M., Hihnala, S., Tienari, J., Kaunisto, K., Hästbacka, J., Holmberg, C., Kere, J., and Höglund, P. (2007). Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. *Reproduction* 133, 775–784.
- Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., and Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 770–774.
- Kumar, A., Commune, M., Flickinger, T.W., Horvath, C.M., and Stark, G.R. (1997). Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 278, 1630–1632.
- Kuzan, F.B., Patton, D.L., Allen, S.M., and Kuo, C.C. (1989). A proposed mouse model for acute epididymitis provoked by genital serovar E, *Chlamydia trachomatis*. *Biol. Reprod.* 40, 165–172.
- La Perle, K.M.D., Blomme, E.A.G., Sagartz, J.E., and Capen, C.C. (2002). Epididymal cribriform hyperplasia with nuclear atypia in p53 homozygous knockout mice on a mixed 129/Sv-FVB/N background. *Comp. Med.* 52, 568–571.
- Lang, T., Dechant, M., Sanchez, V., Wistuba, J., Boiani, M., Pilatz, A., Stammeler, A., Middendorff, R., Schuler, G., Bhushan, S., et al. (2013). Structural and functional integrity of spermatozoa is compromised as a consequence of acute uropathogenic *E. coli*-associated epididymitis. *Biol. Reprod.* 89, 59.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Conrad, D.H., Clark-Lewis, I., Finkelman, F.D., Plaut, M., and Paul, W.E. (1990). IL-3 promotes production of IL-4 by splenic non-B, non-T cells in response to Fc receptor cross-linkage. *J. Immunol.* 145, 2500–2506.
- Lee, J., Minden, M.D., Chen, W.C., Streck, E., Chen, B., Kang, H., Arruda, A., Ly, D., Der, S.D., Kang, S., et al. (2018). Allogeneic Human Double Negative T Cells as a Novel Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia and Its Underlying Mechanisms. *Clin. Cancer Res.* 24, 370–382.
- Legrand, D., Pierce, A., Ellass, E., Carpentier, M., Mariller, C., and Mazurier, J. (2008). Lactoferrin structure and functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606, 163–194.
- Leonhardt, R.M., Lee, S.-J., Kavathas, P.B., and Cresswell, P. (2007). Severe Tryptophan Starvation Blocks Onset of Conventional Persistence and Reduces Reactivation of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 75, 5105–5117.
- Leung, S., Liu, X., Fang, L., Chen, X., Guo, T., and Zhang, J. (2010). The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell. Mol. Immunol.* 7, 182–189.
- Levy, S., and Robaire, B. (1999). Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biol. Reprod.* 60, 1392–1401.
- Li, H., and Shi, B. (2015). Tolerogenic dendritic cells and their applications in transplantation. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 24–30.

- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K.L., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 99–146.
- Li, P., Chan, H.C., He, B., So, S.C., Chung, Y.W., Shang, Q., Zhang, Y.D., and Zhang, Y.L. (2001). An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* 291, 1783–1785.
- Liao, M., Ruddock, P.S., Rizvi, A.S., Hall, S.H., French, F.S., and Dillon, J.R. (2005). Cationic peptide of the male reproductive tract, HE2alpha, displays antimicrobial activity against *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 957–961.
- Lindquist, R.L., Shakhar, G., Dudziak, D., Wardemann, H., Eisenreich, T., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2004). Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat. Immunol.* 5, 1243–1250.
- Linge, H.M., Collin, M., Nordenfelt, P., Mörgelin, M., Malmsten, M., and Egesten, A. (2008). The human CXC chemokine granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2)/CXCL6 possesses membrane-disrupting properties and is antibacterial. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2599–2607.
- Liu, F., Pouponnot, C., and Massagué, J. (1997). Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.* 11, 3157–3167.
- López-Casillas, F., Wrana, J.L., and Massagué, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73, 1435–1444.
- Lorenzo, L., Rogel, R., Sanchez-Gonzalez, J.V., Perez-Ardavin, J., Moreno, E., Lujan, S., Broseta, E., and Boronat, F. (2016). Evaluation of Adult Acute Scrotum in the Emergency Room: Clinical Characteristics, Diagnosis, Management, and Costs. *Urology* 94, 36–41.
- Ludwig, G., and Haselberger, J. (1977). [Epididymitis and fertility. Treatment results in acute unspecific epididymitis]. *Fortschr. Med.* 95, 397–399.
- Ludwig, M., Johannes, S., Bergmann, M., Failing, K., Schiefer, H.G., and Weidner, W. (2002). Experimental *Escherichia coli* epididymitis in rats: a model to assess the outcome of antibiotic treatment. *BJU Int.* 90, 933–938.
- Luster, A.D., and Ravetch, J.V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J. Exp. Med.* 166, 1084–1097.
- Malm, J., Sørensen, O., Persson, T., Frohm-Nilsson, M., Johansson, B., Bjartell, A., Lilja, H., Ståhle-Bäckdahl, M., Borregaard, N., and Egesten, A. (2000). The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect. Immun.* 68, 4297–4302.
- Mandon, M., and Cyr, D.G. (2015). Tricellulin and its role in the epididymal epithelium of the rat. *Biol. Reprod.* 92, 66.
- Mandon, M., Hermo, L., and Cyr, D.G. (2015). Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common Properties with Adult Stem Cells. *Biol. Reprod.* 93, 115.
- Martínez-García, F., Regadera, J., Cobo, P., Palacios, J., Paniagua, R., and Nistal, M. (1995). The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 27, 195–206.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753–791.

- Matter, K., and Balda, M.S. (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 225–236.
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., and Rescigno, M. (2014). Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1⁺ macrophages to CD103⁺ dendritic cells. *Immunity* 40, 248–261.
- McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103⁺ dendritic cells in the small intestine. *Nature* 483, 345–349.
- Medzhitov, R. (2009). Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 30, 766–775.
- Meinhardt, A., and Hedger, M.P. (2011). Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol. Cell. Endocrinol.* 335, 60–68.
- Meistrich, M.L., Hughes, T.H., and Bruce, W.R. (1975). Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. *Nature* 258, 145–147.
- Metz, R., Duhadaway, J.B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A.J., and Prendergast, G.C. (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, 7082–7087.
- Michel, V., Pilatz, A., Hedger, M.P., and Meinhardt, A. (2015). Epididymitis: revelations at the convergence of clinical and basic sciences. *Asian J. Androl.* 17, 756–763.
- Michel, V., Duan, Y., Stoschek, E., Bhushan, S., Middendorff, R., Young, J.M., Loveland, K.L., Kretser, D.M.D., Hedger, M.P., and Meinhardt, A. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli* causes fibrotic remodelling of the epididymis. *J. Pathol.* 240, 15–24.
- Mital, P., Hinton, B.T., and Dufour, J.M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol. Reprod.* 84, 851–858.
- Mittal, S.K., and Roche, P.A. (2015). Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr. Opin. Immunol.* 34, 22–27.
- Mittrücker, H.-W., Visekruna, A., and Huber, M. (2014). Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 62, 449–458.
- Moore, C.A., Lockett, B.L., Lennox, K.W., McAminch, J.W., Wurster, J.C., Ceccarelli, F.E., and Gangai, M.P. (1971). Prednisone in the treatment of acute epididymitis: a cooperative study. *J. Urol.* 106, 578–580.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O’Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683–765.
- Mu, Y., Gudey, S.K., and Landström, M. (2012). Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 347, 11–20.
- Mueller, D.L. (2010). Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 11, 21–27.
- Mühlbauer, M., Cheely, A.W., Yenugu, S., and Jobin, C. (2008). Regulation and functional impact of lipopolysaccharide induced Nod2 gene expression in the murine epididymal epithelial cell line PC1. *Immunology* 124, 256–264.

- Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazzieri, R., Nunes, I., and Rifkin, D.B. (1997). Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 51, 1376–1382.
- Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., et al. (1999). The integrin α v β 6 binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96, 319–328.
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A.L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191–1193.
- Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A.L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 189, 1363–1372.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Baban, B., Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., and Mellor, A.L. (2005). GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity* 22, 633–642.
- Murashima, A., Miyagawa, S., Ogino, Y., Nishida-Fukuda, H., Araki, K., Matsumoto, T., Kaneko, T., Yoshinaga, K., Yamamura, K., Kurita, T., et al. (2011). Essential Roles of Androgen Signaling in Wolffian Duct Stabilization and Epididymal Cell Differentiation. *Endocrinology* 152, 1640–1651.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41, 14–20.
- NagDas, S.K., Winfrey, V.P., and Olson, G.E. (2000). Identification of a hamster epididymal region-specific secretory glycoprotein that binds nonviable spermatozoa. *Biol. Reprod.* 63, 1428–1436.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* 8, 1217–1226.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., et al. (1997). Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* 389, 631–635.
- Nashan, D., Malorny, U., Sorg, C., Cooper, T., and 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, H.G., Sorg, C., and Nieschlag, E. (1993). Immuno-competent cells in the murine epididymis following infection with *Escherichia coli*. *Int. J. Androl.* 16, 47–52.
- Nelson, B.H., Martyak, T.P., Thompson, L.J., Moon, J.J., and Wang, T. (2003). Uncoupling of promitogenic and antiapoptotic functions of IL-2 by Smad-dependent TGF- β signaling. *J. Immunol.* 170, 5563–5570.

- Nicholson, A., Rait, G., Murray-Thomas, T., Hughes, G., Mercer, C.H., and Cassell, J. (2010). Management of epididymo-orchitis in primary care: results from a large UK primary care database. *Br J Gen Pract* 60, e407-422.
- Nishihara, T., Okahashi, N., and Ueda, N. (1993). Activin A induces apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 985–991.
- Niyonsaba, F., Someya, A., Hirata, M., Ogawa, H., and Nagaoka, I. (2001). Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 1066–1075.
- Noben-Trauth, N., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2000). Conventional, naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J. Immunol.* 165, 3620–3625.
- Noblanc, A., Kocer, A., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Conrad, M., and Drevet, J.R. (2011). Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *J. Androl.* 32, 641–650.
- Noblanc, A., Kocer, A., and Drevet, J.R. (2012). [Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of the epididymis]. *Med Sci (Paris)* 28, 519–525.
- Nomiyama, H., Osada, N., and Yoshie, O. (2010). The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 253–262.
- Nunes, I., Shapiro, R.L., and Rifkin, D.B. (1995). Characterization of latent TGF-beta activation by murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 155, 1450–1459.
- Obojes, K., Andres, O., Kim, K.S., Däubener, W., and Schneider-Schaulies, J. (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J. Virol.* 79, 7768–7776.
- O'Bryan, M.K., Murphy, B.F., Liu, D.Y., Clarke, G.N., and Baker, H.W. (1994a). The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assessment of human sperm morphology and acrosome integrity. *Hum. Reprod.* 9, 1490–1496.
- O'Bryan, M.K., Murphy, B.F., Liu, D.Y., Clarke, G.N., and Baker, H.W. (1994b). The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assessment of human sperm morphology and acrosome integrity. *Hum. Reprod.* 9, 1490–1496.
- Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118, 240–249.
- Oh, Y.S., Na, E.J., and Gye, M.C. (2016). Effects of bilateral vasectomy on the interleukin 1 system in mouse epididymis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 76, 235–242.
- Ohlsson, K., Bjartell, A., and Lilja, H. (1995). Secretory leucocyte protease inhibitor in the male genital tract: PSA-induced proteolytic processing in human semen and tissue localization. *J. Androl.* 16, 64–74.
- Ohno, N., and Morrison, D.C. (1989). Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 264, 4434–4441.
- Olson, G.E., and Hinton, B.T. (1985). Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Androl.* 6, 20–34.

- Olson, G.E., Winfrey, V.P., and Nagdas, S.K. (2003). Structural modification of the hamster sperm acrosome during posttesticular development in the epididymis. *Microsc. Res. Tech.* 61, 46–55.
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* 8, 1207–1216.
- Orgebin-Crist, M.C. (1967). Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature* 216, 816–818.
- Osegbe, D.N. (1991). Testicular function after unilateral bacterial epididymo-orchitis. *Eur. Urol.* 19, 204–208.
- Osterhoff, C., Kirchhoff, C., Krull, N., and Ivell, R. (1994). Molecular cloning and characterization of a novel human sperm antigen (HE2) specifically expressed in the proximal epididymis. *Biol. Reprod.* 50, 516–525.
- Ouvrier, A., Cadet, R., Vernet, P., Laillet, B., Chardigny, J.-M., Lobaccaro, J.-M.A., Drevet, J.R., and Saez, F. (2009). LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. *J. Lipid Res.* 50, 1766–1775.
- Ouvrier, A., Alves, G., Damon-Soubeyrand, C., Marceau, G., Cadet, R., Janny, L., Brugnon, F., Kocer, A., Pommier, A., Lobaccaro, J.-M.A., et al. (2011). Dietary cholesterol-induced post-testicular infertility. *PLoS ONE* 6, e26966.
- Palladino, M.A., Johnson, T.A., Gupta, R., Chapman, J.L., and Ojha, P. (2007). Members of the Toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract. *Biol. Reprod.* 76, 958–964.
- Palladino, M.A., Savarese, M.A., Chapman, J.L., Dughi, M.-K., and Plaska, D. (2008). Localization of Toll-like receptors on epididymal epithelial cells and spermatozoa. *Am. J. Reprod. Immunol.* 60, 541–555.
- Paludan, S.R., and Bowie, A.G. (2013). Immune sensing of DNA. *Immunity* 38, 870–880.
- Pandya, I.J., and Cohen, J. (1985). The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. *Fertil. Steril.* 43, 417–421.
- Pantoja, L.G., Miller, R.D., Ramirez, J.A., Molestina, R.E., and Summersgill, J.T. (2000). Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Infect. Immun.* 68, 6478–6481.
- Pardoll, D.M. (2002). Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 227–238.
- Patella, S., Phillips, D.J., Tchongue, J., de Kretser, D.M., and Sievert, W. (2006). Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G137-144.
- Patil, A.A., Cai, Y., Sang, Y., Blecha, F., and Zhang, G. (2005). Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. *Physiol. Genomics* 23, 5–17.
- Pearl, C.A., and Roser, J.F. (2008). Expression of lactoferrin in the boar epididymis: effects of reduced estrogen. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34, 153–159.

- Pearl, C.A., and Roser, J.F. (2014). Lactoferrin expression and secretion in the stallion epididymis. *Reprod Biol* 14, 148–154.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Wild, P., Schraner, E., and von Fellenberg, R. (2000). Effect of lysozyme or modified lysozyme fragments on DNA and RNA synthesis and membrane permeability of *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.* 155, 69–77.
- Pelletier, R.M. (1988). Cyclic modulation of Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Am. J. Anat.* 183, 68–102.
- Pérez-Clavier, R., Harrison, R.G., and Macmillan, E.W. (1982). The pattern of the lymphatic drainage of the rat epididymis. *J. Anat.* 134, 667–675.
- 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.
- Pierucci-Alves, F., Midura-Kiela, M.T., Fleming, S.D., Schultz, B.D., and Kiela, P.R. (2018). Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dendritic Cells Is Required for Immunotolerance to Sperm in the Epididymis. *Front Immunol* 9, 1882.
- Pietrement, C., Sun-Wada, G.-H., Silva, N.D., McKee, M., Marshansky, V., Brown, D., Futai, M., and Breton, S. (2006). Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* 74, 185–194.
- Pilatz, A., Wagenlehner, F., Bschiepfer, T., Schuppe, H.-C., Diemer, T., Linn, T., Weidner, W., and Altinkilic, B. (2013). Acute epididymitis in ultrasound: results of a prospective study with baseline and follow-up investigations in 134 patients. *Eur J Radiol* 82, e762-768.
- Pilatz, A., Hossain, H., Kaiser, R., Mankertz, A., Schüttler, C.G., Domann, E., Schuppe, H.-C., Chakraborty, T., Weidner, W., and Wagenlehner, F. (2015). Acute epididymitis revisited: impact of molecular diagnostics on etiology and contemporary guideline recommendations. *Eur. Urol.* 68, 428–435.
- Proetzel, G., Pawlowski, S.A., Wiles, M.V., Yin, M., Boivin, G.P., Howles, P.N., Ding, J., Ferguson, M.W., and Doetschman, T. (1995). Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat. Genet.* 11, 409–414.
- Pulendran, B., and Ahmed, R. (2006). Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 124, 849–863.
- Quinn, S.R., Mangan, N.E., Caffrey, B.E., Gantier, M.P., Williams, B.R.G., Hertzog, P.J., McCoy, C.E., and O'Neill, L.A.J. (2014). The role of Ets2 transcription factor in the induction of microRNA-155 (miR-155) by lipopolysaccharide and its targeting by interleukin-10. *J. Biol. Chem.* 289, 4316–4325.
- R. Jones (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 73–84.
- Ram, P.A., Cardullo, R.A., and Millette, C.F. (1989). Expression and topographical localization of cell surface fucosyltransferase activity during epididymal sperm maturation in the mouse. *Gamete Res* 22, 321–332.
- Ranges, G.E., Figari, I.S., Espevik, T., and Palladino, M.A. (1987). Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 166, 991–998.

- Redfern, T.R., English, P.J., Baumber, C.D., and McGhie, D. (1984). The aetiology and management of acute epididymitis. *Br J Surg* 71, 703–705.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 476–483.
- Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J.-M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., and Drevet, J.R. (2006). Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 74, 1104–1113.
- Ribot, J.C., deBarros, A., Pang, D.J., Neves, J.F., Peperzak, V., Roberts, S.J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A.C., Pennington, D.J., et al. (2009). CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat. Immunol.* 10, 427–436.
- Richardson, R.T., Sivashanmugam, P., Hall, S.H., Hamil, K.G., Moore, P.A., Ruben, S.M., French, F.S., and O’Rand, M. (2001). Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. *Gene* 270, 93–102.
- Riond, J., Rodriguez, S., Nicolau, M.-L., al Saati, T., and Gairin, J.E. (2009). In vivo major histocompatibility complex class I (MHCI) expression on MHCIIlow tumor cells is regulated by gammadelta T and NK cells during the early steps of tumor growth. *Cancer Immun.* 9, 10.
- Ritchie, A.W., Hargreave, T.B., James, K., and Chisholm, G.D. (1984). Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens? *Br J Urol* 56, 79–83.
- Robaire, B., and Hales, B.F. (1982). Regulation of epididymal glutathione S-transferases: effects of orchidectomy and androgen replacement. *Biol. Reprod.* 26, 559–565.
- Robaire, B., and Hermo, L. (1988). *The physiology of Reproduction* (New York).
- Robaire, B., Hinton, B.T., and Orgebin-Crist, M.-C. (2006). *Knobil and Neill’s Physiology of reproduction* (Saint Louis, USA: Jimmy D.Neill).
- Robson, N.C., Phillips, D.J., McAlpine, T., Shin, A., Svobodova, S., Toy, T., Pillay, V., Kirkpatrick, N., Zanker, D., Wilson, K., et al. (2008). Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* 111, 2733–2743.
- Rodrigues, A., Queiróz, D.B.C., Honda, L., Silva, E.J.R., Hall, S.H., and Avellar, M.C.W. (2008). Activation of toll-like receptor 4 (TLR4) by in vivo and in vitro exposure of rat epididymis to lipopolysaccharide from Escherichia Coli. *Biol. Reprod.* 79, 1135–1147.
- Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909–928.
- Ronger-Savle, S., Valladeau, J., Claudy, A., Schmitt, D., Peguet-Navarro, J., Dezutter-Dambuyant, C., Thomas, L., and Jullien, D. (2005). TGFbeta inhibits CD1d expression on dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 124, 116–118.
- Rosendahl, A., Checchin, D., Fehniger, T.E., ten Dijke, P., Heldin, C.H., and Sideras, P. (2001). Activation of the TGF-beta/activin-Smad2 pathway during allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 60–68.
- Rossato, M., Curtale, G., Tamassia, N., Castellucci, M., Mori, L., Gasperini, S., Mariotti, B., De Luca, M., Mirolo, M., Cassatella, M.A., et al. (2012). IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E3101-3110.

- Rowbottom, A.W., Lepper, M.A., Garland, R.J., Cox, C.V., and Corley, E.G. (1999). Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation. *Immunology* 98, 80–89.
- Rowley, M.J., Teshima, F., and Heller, C.G. (1970). Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertil. Steril.* 21, 390–396.
- Ruegemer, J.J., Ho, S.N., Augustine, J.A., Schlager, J.W., Bell, M.P., McKean, D.J., and Abraham, R.T. (1990). Regulatory effects of transforming growth factor-beta on IL-2- and IL-4-dependent T cell-cycle progression. *J. Immunol.* 144, 1767–1776.
- Rumke P.H. (1954). The presence of sperm antibodies in the serum of two patients with oligospermia. *Vox Sang* 4, 135-140
- Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 323–370.
- Rusz, A., Pilatz, A., Wagenlehner, F., Linn, T., Diemer, T., Schuppe, H.C., Lohmeyer, J., Hossain, H., and Weidner, W. (2012). Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World J Urol* 30, 23–30.
- Saito, A., Motomura, N., Kakimi, K., Narui, K., Noguchi, N., Sasatsu, M., Kubo, K., Koezuka, Y., Takai, D., Ueha, S., et al. (2008). Vascular allografts are resistant to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through indoleamine 2,3-dioxygenase in a murine model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 136, 159–167.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* 11, 4131–4142.
- Salaman, M.R. (2003). A two-step hypothesis for the appearance of autoimmune disease. *Autoimmunity* 36, 57–61.
- Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124, 2659–2670.
- Santana, M.A., and Esquivel-Guadarrama, F. (2006). Cell biology of T cell activation and differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 250, 217–274.
- Santin, A.D., Hermonat, P.L., Ravaggi, A., Bellone, S., Pecorelli, S., Roman, J.J., Parham, G.P., and Cannon, M.J. (2000). Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 74, 4729–4737.
- Sawyer, D.E., Mercer, B.G., Wiklendt, A.M., and Aitken, R.J. (2003). Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat. Res.* 529, 21–34.
- Scarlett, C.J., Lin, M., and Aitken, R.J. (2001). Actin polymerisation during morphogenesis of the acrosome as spermatozoa undergo epididymal maturation in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *J. Anat.* 198, 93–101.
- Schandené, L., Alonso-Vega, C., Willems, F., Gérard, C., Delvaux, A., Velu, T., Devos, R., de Boer, M., and Goldman, M. (1994). B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J. Immunol.* 152, 4368–4374.

- Schiessler, H., Fink, E., and Fritz, H. (1976). Acid-stable proteinase inhibitors from human seminal plasma. *Meth. Enzymol.* 45, 847–859.
- Schlitzer, A., and Ginhoux, F. (2014). Organization of the mouse and human DC network. *Curr. Opin. Immunol.* 26, 90–99.
- Schröter, S., Osterhoff, C., McArdle, W., and Ivell, R. (1999). The glycocalyx of the sperm surface. *Hum. Reprod. Update* 5, 302–313.
- Scully, N.F., Shaper, J.H., and Shur, B.D. (1987). Spatial and temporal expression of cell surface galactosyltransferase during mouse spermatogenesis and epididymal maturation. *Dev. Biol.* 124, 111–124.
- Seemüller, U., Arnhold, M., Fritz, H., Wiedenmann, K., Machleidt, W., Heinzel, R., Appelhans, H., Gassen, H.G., and Lottspeich, F. (1986). The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor. *FEBS Lett.* 199, 43–48.
- Segerer, S.E., Müller, N., Brandt, J. van den, Kapp, M., Dietl, J., Reichardt, H.M., Rieger, L., and Kämmerer, U. (2008). The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 17.
- Seiler, P., Wenzel, I., Wagenfeld, A., Yeung, C.H., Nieschlag, E., and Cooper, T.G. (1998). The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. *Int. J. Androl.* 21, 217–226.
- Seiler, P., Cooper, T.G., Yeung, C.H., and 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.
- Seiler, P., Cooper, T.G., and 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.
- Semitekolou, M., Alissafi, T., Aggelakopoulou, M., Kourepini, E., Kariyawasam, H.H., Kay, A.B., Robinson, D.S., Lloyd, C.M., Panoutsakopoulou, V., and Xanthou, G. (2009). Activin-A induces regulatory T cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease. *J. Exp. Med.* 206, 1769–1785.
- Seo, N., Tokura, Y., Takigawa, M., and Egawa, K. (1999). Depletion of IL-10- and TGF-beta-producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells. *J. Immunol.* 163, 242–249.
- Sergerie, M., Bleau, G., Teulé, R., Daudin, M., and Bujan, L. (2005). [Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility]. *Gynecol Obstet Fertil* 33, 89–101.
- Serre, V., and 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, 705–714.
- 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.

- Sgadari, C., Angiolillo, A.L., and Tosato, G. (1996). Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 87, 3877–3882.
- Shevach, E.M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25, 195–201.
- Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroyama, T., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Endo, Y., Fujita, T., et al. (2000). Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat. Immunol.* 1, 441–446.
- Shugars, D.C. (1999). Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity. *J. Infect. Dis.* 179 Suppl 3, S431–435.
- Shugars, D.C., Alexander, A.L., Fu, K., and Freel, S.A. (1999). Endogenous salivary inhibitors of human immunodeficiency virus. *Arch. Oral Biol.* 44, 445–453.
- Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., and Calvin, D. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693–699.
- Shum, W.W., Smith, T.B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L.S., Roy, J.W., Hill, E., Pittet, M.J., Breton, S., and Da Silva, N. (2014). Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. *Biol. Reprod.* 90, 90.
- Shum, W.W.C., Da Silva, N., Brown, D., and Breton, S. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J. Exp. Biol.* 212, 1753–1761.
- Shum, W.W.C., Hill, E., Brown, D., and Breton, S. (2013). Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. *Reproduction* 146, 455–469.
- Silva-Santos, B., Serre, K., and Norell, H. (2015). $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 683–691.
- Simms, I., Fleming, D.M., Lowndes, C.M., Smith, G.E., and Chapman, R.S. (2006). Surveillance of sexually transmitted diseases in general practice: a description of trends in the Royal College of General Practitioners Weekly Returns Service between 1994 and 2001. *Int J STD AIDS* 17, 693–698.
- Sipilä, P., Cooper, T.G., Yeung, C.-H., Mustonen, M., Penttinen, J., Drevet, J., Huhtaniemi, I., and Poutanen, M. (2002). Epididymal dysfunction initiated by the expression of simian virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 16, 2603–2617.
- Sivashanmugam, P., Hall, S.H., Hamil, K.G., French, F.S., O’Rand, M.G., and Richardson, R.T. (2003). Characterization of mouse Eppin and a gene cluster of similar protease inhibitors on mouse chromosome 2. *Gene* 312, 125–134.
- Smith, T.B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L.S., Hill, E., Pittet, M.J., and Da Silva, N. (2014). Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology* 2, 755–762.
- Smyth, M.J., Strobl, S.L., Young, H.A., Ortaldo, J.R., and Ochoa, A.C. (1991). Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *J. Immunol.* 146, 3289–3297.

- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* 192, 755–760.
- Smyth, M.J., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* 13, 459–463.
- Sochacki, K.A., Barns, K.J., Bucki, R., and Weisshaar, J.C. (2011). Real-time attack on single *Escherichia coli* cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, E77–81.
- Soler, C., Yeung, C.H., and Cooper, T.G. (1994). Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int. J. Androl.* 17, 271–278.
- Soranzo, L., Dadoune, J.P., and Fain-Maurel, M.A. (1982). [Segmentation of the epididymal duct in mouse: an ultrastructural study]. *Reprod Nutr Dev* 22, 999–1012.
- Stammler, A., Müller, D., Tabuchi, Y., Konrad, L., and Middendorff, R. (2013). TGFβs modulate permeability of the blood-epididymis barrier in an in vitro model. *PLoS ONE* 8, e80611.
- Stern, J.E., Gardner, S., Quirk, D., and Wira, C.R. (1992). Secretory immune system of the male reproductive tract: effects of dihydrotestosterone and estradiol on IgA and secretory component levels. *J. Reprod. Immunol.* 22, 73–85.
- Stöcklin, E., Botteri, F., and Groner, B. (1993). An activated allele of the c-erbB-2 oncogene impairs kidney and lung function and causes early death of transgenic mice. *J. Cell Biol.* 122, 199–208.
- Stone, T.W., and Darlington, L.G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1, 609–620.
- Suarez, S.S., and Pacey, A.A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update* 12, 23–37.
- Sullivan, R. (2004). Male fertility markers, myth or reality. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 341–347.
- Sullivan, R., Frenette, G., and Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J. Androl.* 9, 483–491.
- Sun, E.L., and Flickinger, C.J. (1980). Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. *Anat. Rec.* 196, 285–293.
- Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W.E., and Schatten, G. (2001). A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J. Cell. Sci.* 114, 1665–1675.
- Suzuki, F. (1982). Microvasculature of the mouse testis and excurrent duct system. *Am. J. Anat.* 163, 309–325.
- Suzuki, F., and Nagano, T. (1978). Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. *Dev. Biol.* 63, 321–334.
- Syntin, P., and Cornwall, G.A. (1999). Immunolocalization of CRES (Cystatin-related epididymal spermatogenic) protein in the acrosomes of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 60, 1542–1552.

- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655–669.
- Takano, H., Abe, K., and Ito, T. (1981). [Changes in the mouse epididymis after ligation of the ductuli efferentes or proximal epididymal duct: qualitative and quantitative histological studies (author's transl)]. *Kaibogaku Zasshi* 56, 79–90.
- Takeda, K., and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1–14.
- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.* 195, 161–169.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376.
- Takikawa, O., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Yoshida, R., and Truscott, R.J. (1999). Interferon-gamma-dependent/independent expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. Studies with interferon-gamma-knockout mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 467, 553–557.
- Tanaka, K., Fujisawa, M., Arakawa, S., and Kamidono, S. (1995). Local expression of cytokine messenger RNA in rat model of *Escherichia coli* epididymitis. *J. Urol.* 154, 2179–2184.
- Tang, Y.Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C.J., Ouellette, A.J., and Selsted, M.E. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 286, 498–502.
- Tauber, P.F., Zaneveld, L.J., Propping, D., and Schumacher, G.F. (1976). Components of human split ejaculates. II. Enzymes and proteinase inhibitors. *J. Reprod. Fertil.* 46, 165–171.
- Taylor, P.J., and Collins, J.A. (1992). Unexplained infertility. Oxford University Press, Oxford, UK, pp.128-131
- Terness, P., Bauer, T.M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 196, 447–457.
- Territo, M.C., Ganz, T., Selsted, M.E., and Lehrer, R. (1989). Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84, 2017–2020.
- Thompson, L.A., Barratt, C.L., Bolton, A.E., and Cooke, I.D. (1992). The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *Am. J. Reprod. Immunol.* 28, 85–89.
- Tollner, T.L., Yudin, A.I., Treece, C.A., Overstreet, J.W., and Cherr, G.N. (2004). Macaque sperm release ESP13.2 and PSP94 during capacitation: the absence of ESP13.2 is linked to sperm-zona recognition and binding. *Mol. Reprod. Dev.* 69, 325–337.
- Tollner, T.L., Yudin, A.I., Treece, C.A., Overstreet, J.W., and Cherr, G.N. (2008). Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Hum. Reprod.* 23, 2523–2534.
- Tomee, J.F., Hiemstra, P.S., Heinzl-Wieland, R., and Kauffman, H.F. (1997). Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J. Infect. Dis.* 176, 740–747.

- Tomlinson, M.J., White, A., Barratt, C.L., Bolton, A.E., and Cooke, I.D. (1992). The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Hum. Reprod.* 7, 517–522.
- Tomsig, J.L., Usanovic, S., and Turner, T.T. (2006). Growth factor-stimulated mitogen-activated kinase (MAPK) phosphorylation in the rat epididymis is limited by segmental boundaries. *Biol. Reprod.* 75, 598–604.
- Toshimori, K. (1998). Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res.* 293, 177–187.
- Tosic, J., and Walton, A. (1950). Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. *Biochem. J.* 47, 199–212.
- Tozzo, P.J. (1968). Semen analysis in unilateral epididymitis. *N Y State J Med* 68, 2769–2770.
- Trasler, J.M., Hermo, L., and Robaire, B. (1988). Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. *Biol. Reprod.* 38, 463–479.
- Travis, M.A., and Sheppard, D. (2014). TGF- β activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 51–82.
- Trojan, T.H., Lishnak, T.S., and Heiman, D. (2009). Epididymitis and orchitis: an overview. *Am Fam Physician* 79, 583–587.
- Tulsiani, D.R.P. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250, 58–65.
- Tulsiani, D.R., Orgebin-Crist, M.C., and Skudlarek, M.D. (1998). Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 85–97.
- Turner, T.T. (1991). Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 637, 364–383.
- Turner, T.T., Bomgardner, D., Jacobs, J.P., and Nguyen, Q. a. T. (2003). Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125, 871–878.
- Turner, T.T., Johnston, D.S., Finger, J.N., and Jelinsky, S.A. (2007). Differential gene expression among the proximal segments of the rat epididymis is lost after efferent duct ligation. *Biol. Reprod.* 77, 165–171.
- Turner, T.T., Mammen, T., Kavoussi, P., Lysiak, J.J., and Costabile, R.A. (2011). Cytokine responses to *E. coli*-induced epididymitis in the rat: blockade by vasectomy. *Urology* 77, 1507.e9-14.
- Usselman, M.C., and Cone, R.A. (1983). Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by “immobilin,” a high molecular weight glycoprotein. *Biol. Reprod.* 29, 1241–1253.
- Vazquez-Levin, M.H., Marín-Briggiler, C.I., and Veaute, C. (2014). Antisperm antibodies: invaluable tools toward the identification of sperm proteins involved in fertilization. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 206–218.

- Veeramachaneni, D.N., Schanbacher, B.D., and Amann, R.P. (1989). Immunolocalization and concentrations of inhibin alpha in the ovine testis and excurrent duct system. *Biol. Reprod.* 41, 499–503.
- Veräjänkorka, E., Pöllänen, P., Hänninen, A., Martikainen, M., Sundström, J., and Antola, H. (2002). IL-10 is highly expressed in the cryptorchid cryptepididymal epithelium: a probable mechanism preventing immune responses against autoantigenic spermatozoa in the epididymal tubule. *Int. J. Androl.* 25, 129–133.
- Veri, J.P., Hermo, L., and Robaire, B. (1993). Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. *J. Androl.* 14, 23–44.
- Vernet, P., Britan, A., Gueux, E., Mazur, A., and Drevet, J.R. (2004). Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse caput epididymidis. *Biochim. Biophys. Acta* 1675, 32–45.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 523–532.
- Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G.D., Valenzuela, J.P., Jorgez, C.J., Alvarez, J.G., and Kopf, G.S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J. Biol. Chem.* 274, 3235–3242.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., and de Vries, J.E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209–1220.
- Wang, Y.F., and Holstein, A.F. (1983). Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell Tissue Res.* 233, 517–521.
- Wang, G., Wu, Y., Zhou, T., Guo, Y., Zheng, B., Wang, J., Bi, Y., Liu, F., Zhou, Z., Guo, X., et al. (2013). Mapping of the N-linked glycoproteome of human spermatozoa. *J. Proteome Res.* 12, 5750–5759.
- Wang, L., Yuan, Q., Chen, S., Cai, H., Lu, M., Liu, Y., and Xu, C. (2012). Antimicrobial activity and molecular mechanism of the CRES protein. *PLoS ONE* 7, e48368.
- Weidner, W., Garbe, C., Weissbach, L., Harbrecht, J., Kleinschmidt, K., Schiefer, H.G., and Friedrich, H.J. (1990). [Initial therapy of acute unilateral epididymitis using ofloxacin. I. Clinical and microbiological findings]. *Urologe A* 29, 272–276.
- Wheeler, K., Tardif, S., Rival, C., Luu, B., Bui, E., Del Rio, R., Teuscher, C., Sparwasser, T., Hardy, D., and Tung, K.S.K. (2011). Regulatory T cells control tolerogenic versus autoimmune response to sperm in vasectomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7511–7516.
- Wijayarathna, R., de Kretser, D.M., Sreenivasan, R., Ludlow, H., Middendorff, R., Meinhardt, A., Loveland, K.L., and Hedger, M.P. (2018). Comparative analysis of activins A and B in the adult mouse epididymis and vas deferens. *Reproduction* 155, 15–23.
- Wilson, L. (1954). Sperm agglutinins in human semen and blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85, 652–655.

- Winnall, W.R., Wu, H., Sarraj, M.A., Rogers, P.A.W., de Kretser, D.M., Girling, J.E., and Hedger, M.P. (2013). Expression patterns of activin, inhibin and follistatin variants in the adult male mouse reproductive tract suggest important roles in the epididymis and vas deferens. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 570–580.
- Witkin, S.S., Jeremias, J., Bongiovanni, A.M., and Munoz, M.G. (1996). Immune regulation in the male genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* 4, 131–135.
- Wolfraim, L.A., Walz, T.M., James, Z., Fernandez, T., and Letterio, J.J. (2004). p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF-beta-mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness. *J. Immunol.* 173, 3093–3102.
- Xie, S., Xu, J., Ma, W., Liu, Q., Han, J., Yao, G., Huang, X., and Zhang, Y. (2013). Lcn5 promoter directs the region-specific expression of cre recombinase in caput epididymidis of transgenic mice. *Biol. Reprod.* 88, 71.
- Xing, Y., and Hogquist, K.A. (2012). T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Yakirevich, E., Yanai, O., Sova, Y., Sabo, E., Stein, A., Hiss, J., and Resnick, M.B. (2002). Cytotoxic phenotype of intra-epithelial lymphocytes in normal and cryptorchid human testicular excurrent ducts. *Hum. Reprod.* 17, 275–283.
- Yamagiwa, S., Gray, J.D., Hashimoto, S., and Horwitz, D.A. (2001). A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J. Immunol.* 166, 7282–7289.
- Yamaguchi, Y., Tsumura, H., Miwa, M., and Inaba, K. (1997). Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 15, 144–153.
- Yamaguchi, Y., Nagase, T., Makita, R., Fukuhara, S., Tomita, T., Tominaga, T., Kurihara, H., and Ouchi, Y. (2002). Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J. Immunol.* 169, 2516–2523.
- Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1967). Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J. Biol. Chem.* 242, 5260–5266.
- Yang, D., Chertov, O., and Oppenheim, J.J. (2001). Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J. Leukoc. Biol.* 69, 691–697.
- Yeaman, M.R., and Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27–55.
- Yenugu, S., Hamil, K.G., Birse, C.E., Ruben, S.M., French, F.S., and Hall, S.H. (2003). Antibacterial properties of the sperm-binding proteins and peptides of human epididymis 2 (HE2) family; salt sensitivity, structural dependence and their interaction with outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 372, 473–483.
- Yenugu, S., Hamil, K.G., Radhakrishnan, Y., French, F.S., and Hall, S.H. (2004a). The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an antimicrobial beta-defensin. *Endocrinology* 145, 3165–3173.

- Yenugu, S., Hamil, K.G., French, F.S., and Hall, S.H. (2004b). Antimicrobial actions of the human epididymis 2 (HE2) protein isoforms, HE2alpha, HE2beta1 and HE2beta2. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 61.
- Yenugu, S., Hamil, K.G., Grossman, G., Petrusz, P., French, F.S., and Hall, S.H. (2006a). Identification, cloning and functional characterization of novel sperm associated antigen 11 (SPAG11) isoforms in the rat. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 23.
- Yenugu, S., Hamil, K.G., French, F.S., and Hall, S.H. (2006b). Antimicrobial actions of human and macaque sperm associated antigen (SPAG) 11 isoforms: influence of the N-terminal peptide. *Mol. Cell. Biochem.* 284, 25–37.
- Yenugu, S., Chintalgattu, V., Wingard, C.J., Radhakrishnan, Y., French, F.S., and Hall, S.H. (2006c). Identification, cloning and functional characterization of novel beta-defensins in the rat (*Rattus norvegicus*). *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 7.
- Yeung, C.H., Cooper, T.G., Weinbauer, G.F., Bergmann, M., Kleinhans, G., Schulze, H., and Nieschlag, E. (1989). Fluid-phase transcytosis in the primate epididymis in vitro and in vivo. *Int. J. Androl.* 12, 384–394.
- Yeung, C.H., Nashan, D., Sorg, C., Oberpenning, F., Schulze, H., Nieschlag, E., and Cooper, T.G. (1994). Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol. Reprod.* 50, 917–926.
- Yeung, C.-H., Wang, K., and Cooper, T.G. (2012). Why are epididymal tumours so rare? *Asian J. Androl.* 14, 465–475.
- Yokoyama, W.M. (2000). Now you see it, now you don't! *Nat. Immunol.* 1, 95–97.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., et al. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* 175, 2851–2858.
- Yoshida, R., Nukiwa, T., Watanabe, Y., Fujiwara, M., Hirata, F., and Hayaishi, O. (1980). Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 343–351.
- Yoshinaga, K., Tanii, I., Oh-oka, T., and Toshimori, K. (2001). Changes in distribution and molecular weight of the acrosomal protein acrin2 (MC41) during guinea pig spermiogenesis and epididymal maturation. *Cell Tissue Res.* 303, 253–261.
- Young, K.J., Kay, L.S., Phillips, M.J., and Zhang, L. (2003). Antitumor activity mediated by double-negative T cells. *Cancer Res.* 63, 8014–8021.
- Yu, C.C., Huang, J.K., Chiang, H., Chen, M.T., and Chang, L.S. (1992). Papillary cystadenocarcinoma of the epididymis: a case report and review of the literature. *J. Urol.* 147, 162–165.
- Yu, L., Wang, L., and Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2592–2603.
- Yudin, A.I., Tollner, T.L., Li, M.-W., Treece, C.A., Overstreet, J.W., and Cherr, G.N. (2003). ESP13.2, a member of the beta-defensin family, is a macaque sperm surface-coating protein involved in the capacitation process. *Biol. Reprod.* 69, 1118–1128.

- Yudin, A.I., Treece, C.A., Tollner, T.L., Overstreet, J.W., and Cherr, G.N. (2005). The carbohydrate structure of DEFB126, the major component of the cynomolgus Macaque sperm plasma membrane glycocalyx. *J. Membr. Biol.* 207, 119–129.
- Zaballos, A., Villares, R., Albar, J.P., Martínez-A, C., and Márquez, G. (2004). Identification on mouse chromosome 8 of new beta-defensin genes with regionally specific expression in the male reproductive organ. *J. Biol. Chem.* 279, 12421–12426.
- Zhang, K., Gao, R., Zhang, H., Cai, X., Shen, C., Wu, C., Zhao, S., and Yu, L. (2005). Molecular cloning and characterization of three novel lysozyme-like genes, predominantly expressed in the male reproductive system of humans, belonging to the c-type lysozyme/alpha-lactalbumin family. *Biol. Reprod.* 73, 1064–1071.
- Zhang, T., Guo, C.X., Hu, Z.Y., and Liu, Y.X. (1997). Localization of plasminogen activator and inhibitor, LH and androgen receptors and inhibin subunits in monkey epididymis. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 945–952.
- Zhang, X., Oglęcka, K., Sandgren, S., Belting, M., Esbjörner, E.K., Nordén, B., and Gräslund, A. (2010). Dual functions of the human antimicrobial peptide LL-37-target membrane perturbation and host cell cargo delivery. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 2201–2208.
- Zhang, Z.X., Yang, L., Young, K.J., DuTemple, B., and Zhang, L. (2000). Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med.* 6, 782–789.
- Zhao, Y., Diao, H., Ni, Z., Hu, S., Yu, H., and Zhang, Y. (2011). The epididymis-specific antimicrobial peptide β -defensin 15 is required for sperm motility and male fertility in the rat (*Rattus norvegicus*). *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 697–708.
- Zhao, Y.-T., Guo, J.-H., Wu, Z.-L., Xiong, Y., and Zhou, W.-L. (2008). Innate immune responses of epididymal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection. *Immunol. Lett.* 119, 84–90.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587–596.
- Zheng, W., Wang, Chen, and Zhu (2017). Identification and function analysis of macrophages subsets in chronically inflamed human epididymis.
- Zhou, C.X., Zhang, Y.-L., Xiao, L., Zheng, M., Leung, K.M., Chan, M.Y., Lo, P.S., Tsang, L.L., Wong, H.Y., Ho, L.S., et al. (2004). An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat. Cell Biol.* 6, 458–464.
- Zhou, Y.S., Webb, S., Lettice, L., Tardif, S., Kilanowski, F., Tyrrell, C., Macpherson, H., Semple, F., Tennant, P., Baker, T., et al. (2013). Partial deletion of chromosome 8 β -defensin cluster confers sperm dysfunction and infertility in male mice. *PLoS Genet.* 9, e1003826.
- Zhu, W., Zhao, S., Liu, Z., Cheng, L., Wang, Q., Yan, K., Chen, Q., Wu, H., and Han, D. (2015). Pattern recognition receptor-initiated innate antiviral responses in mouse epididymal epithelial cells. *J. Immunol.* 194, 4825–4835.
- Zipori, D., and Barda-Saad, M. (2001). Role of activin A in negative regulation of normal and tumor B lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 69, 867–873.