

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

DÉMONSTRATION DE LA PRÉSENCE DE CELLULES SOUCHES DANS L'ÉPIDIDYME ADULTE

Par
Laurie Pinel

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pre. Géraldine Delbès
INRS – Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Pr. Jacques-J. Tremblay
Université Laval

Examineur externe

Dr. Fabrice Saez
Université Clermont Auvergne

Directeur de recherche

Pr. Daniel G. Cyr
INRS – Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

*« La connaissance est la seule chose qui
s'accroît lorsqu'on la partage »
Sachâ Boudjema*

*« La qualité d'un homme se calcule à sa démesure ;
tentez, essayez, échouez même, ce sera votre réussite »
Jacques Brel*

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Pr. Daniel Cyr, de m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour sa confiance et son encadrement. Grace à nos nombreux échanges et discussions, j'ai appris beaucoup lors de ces dernières années. Merci de m'avoir laissé prendre des initiatives sur mon projet de recherche tout en m'aidant dans les moments plus difficiles. Je vous remercie également de m'avoir donné de nombreuses opportunités pour présenter mes travaux lors de congrès au Québec et à l'international.

Je remercie Julie, sans qui ces années au sein du laboratoire n'auraient pas été les mêmes. Merci d'avoir partagé avec moi tes connaissances et tes astuces de travail en laboratoire ainsi que tes idées et avis. Merci de ton aide, de ton encouragement mais surtout de ton amitié.

Merci également à Mary, pour votre aide, vos conseils précieux ainsi que vos gâteaux et chocolats qui font partie intégrante de la vie de doctorat ! Merci aussi à Christine, Tifen et Sylvie et tous les étudiants du laboratoire que j'ai pu côtoyer ces dernières années et qui m'ont encouragé. Merci également à Jessy Tremblay pour ses conseils.

Je tiens également à remercier les membres du jury d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail. Merci pour vos avis et conseils qui m'ont permis d'améliorer ce document.

De tout cœur, je remercie mes amis de "Mini-PRF" : Adeline, Alex, Anaïs, Bélinda, Claudia, Clément, Gabriel, Hélène, Josianne, Juliette, Léa, Léna, Mustapha, Richard, Rita, Vincent, Wesley, Zoé... Merci pour tous ces moments à parler de science mais aussi et souvent pas de science, pour ces lunchs ensemble, ces soirées et ces chalets. Je me suis sentie chanceuse et bien entourée et je suis convaincue que cela m'a aidé et m'a permis d'avancer dans les moments difficiles. Un merci tout particulier à Richard, qui a relu ce document et qui m'a (beaucoup) écouté et conseillé ces derniers mois.

Je pense aussi à mes amis d'ici (Fabien, Daphnée, Sarah, Arlette, Alex, Nath et Ludivine) et d'ailleurs (Justine, Jade, Romain, Yam, Amandine, Aurélie, Loriane, Pauline et Rachel). Merci d'avoir demandé des nouvelles, d'avoir été à l'écoute et pour ces moments partagés ensemble.

Je remercie bien évidemment ma famille, de m'avoir encouragée et aidée et sans qui je n'aurais pas pu aller si loin. Je pense fort à vous et vous me manquez énormément mais merci d'être restés proches malgré la distance.

Enfin, je remercie Guillaume qui est présent depuis le tout début de cette aventure. Merci de m'avoir écouté. Te savoir à mes côtés toutes ces années m'a énormément aidé et apaisé. Un grand merci.

RÉSUMÉ

L'épididyme est un organe du système reproducteur masculin permettant le transport et la maturation des spermatozoïdes. Il est constitué d'une lumière, où transitent les spermatozoïdes et d'un épithélium composé majoritairement de cellules principales qui entourent la lumière mais aussi d'autres types cellulaires dont les cellules basales. Plusieurs données indiquent que des cellules souches (CS) pourraient être présentes dans l'épididyme, cependant leur existence est une controverse depuis de nombreuses années.

L'hypothèse émise dans ce projet de recherche est qu'il existe une population de CS, localisée à la base de l'épithélium, au sein de l'épididyme. Les objectifs sont la démonstration de la présence de CS dans l'épididyme, la création d'un modèle d'organoïde d'épididyme de rat et l'identification d'un marqueur spécifique associé à ces cellules.

La mise en culture en 3D de cellules basales d'épididyme de rats a permis d'observer la formation d'organoïdes exprimant plusieurs marqueurs de cellules basales. Ces organoïdes sont formés à partir d'une seule cellule et se maintiennent sur plusieurs générations démontrant la capacité d'auto-renouvellement des cellules basales. Après 14 jours de culture, l'apparition de cellules principales au sein des organoïdes a été observée par immunofluorescence, par microscopie électronique ainsi que par analyse de l'expression génique confirmant ainsi la capacité de différenciation des cellules basales. La présence de clusterine, une protéine impliquée dans la maturation des spermatozoïdes a également été observée au sein des organoïdes d'épididyme.

Un marqueur exprimé par les CS adultes de nombreux organes, nommé LGR5, identifie une population spécifique de cellules localisées à la base de l'épithélium dans tous les segments de l'épididyme de rat adulte. La co-localisation de LGR5 et p63, un facteur de transcription spécifique aux cellules basales, nous a également permis de distinguer la présence de 3 types de cellules basales dans l'épididyme. Une augmentation de LGR5 et une diminution de p63 ont été observées après altération de l'épithélium à la suite d'une orchidectomie. De plus, tous les organoïdes formés par les cellules basales sont composés de cellules positives pour LGR5 et p63 alors que leurs expressions diminuent lors de la différenciation des organoïdes.

Ce projet a ainsi permis de démontrer la présence d'une population de CS au sein des cellules basales de l'épididyme de rat en établissant pour la première fois leur capacité d'auto-

renouvellement et de différenciation. Ce projet a également permis de proposer des marqueurs de ces CS et de développer un modèle unique d'organoïdes épидидymaire de rat.

Mots-clés : Epididyme ; Epithelium ; Cellules Basales ; Cellules Souches ; Organoïdes ; LGR5 ; TP63 ; Prolifération ; Différenciation

ABSTRACT

The epididymis is a reproductive organ part of the male excurrent duct system that enables the transport and maturation of sperm. It is composed by a lumen, through which spermatozoa transit, and an epithelium composed mainly by the principal cells that surround the lumen but also by other cell types including basal cells. Several data indicate that stem cells (SC) could be present in the epididymis, however their existence has been controversial for many years.

The hypothesis of this research project is the presence of a population of SC, located at the base of the epithelium, within the epididymis. The objectives are the demonstration of the presence of SC in the epididymis, the creation of a rat epididymal organoid model, and the identification of a specific marker of these cells.

The 3D culturing of basal epididymal cells from rats resulted in the formation of organoids expressing several basal cell markers. These organoids are formed from a single cell and can be maintained for several generations, demonstrating the ability of basal cells to self-renew. After 14 days of culture, the appearance of principal cells within the organoids was observed by immunofluorescence, electron microscopy as well as by analysis of gene expression confirming the ability of basal cells to differentiate. The presence of clusterin, a protein involved in sperm maturation was also observed in epididymal organoids.

A marker expressed by adult SC in many organs, called LGR5 identifies a specific population of cells located at the base of the epithelium in all segments of the adult epididymis. The co-localization of LGR5 and p63, a transcription factor specific to basal cells, also allowed us to distinguish the presence of 3 types of basal cells in the epithelium. An increase in LGR5 protein level and a decrease in p63 protein level were observed after an epididymal alteration causes by orchiectomy. Moreover, all organoids formed by basal cells are composed of LGR5 and p63 positive cells while their expressions decrease during organoid differentiation.

This project demonstrated the existence of an epididymal SC population by establishing for the first time the capacity for self-renewal and differentiation of basal epididymal cells in rats. This project also made it possible to propose markers for this population and to develop a unique model of rat epididymal organoids.

Keywords: Epididymis; Epithelium; Basal cells; Stem cells; Organoids; LGR5; TP63; Prolifération; Differentiation

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XVII
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	5
1 L'EPIDIDYME ET SON EPITHELIUM.....	7
1.1 STRUCTURE DE L'EPIDIDYME	7
1.2 FONCTIONS DE L'EPIDIDYME	8
1.2.1 <i>Maturation des spermatozoïdes</i>	8
1.2.2 <i>Protection des spermatozoïdes</i>	10
1.2.3 <i>Transport des spermatozoïdes</i>	11
1.2.4 <i>Entreposage des spermatozoïdes</i>	11
1.3 L'EPITHELIUM EPIDIDYMAIRE.....	12
1.3.1 <i>Les types cellulaires</i>	12
1.3.2 <i>La formation de l'épithélium</i>	18
1.3.3 <i>Les jonctions cellulaires</i>	20
2 LES CELLULES SOUCHES.....	23
2.1 DEFINITION.....	23
2.2 LA REGULATION DES CELLULES SOUCHES	25
2.2.1 <i>La niche des cellules souches</i>	25
2.2.2 <i>Les voies de signalisation</i>	28
2.3 METHODE D'IDENTIFICATION DES CELLULES SOUCHES ADULTES	33
2.3.1 <i>Etude de la prolifération et transplantation cellulaire</i>	33
2.3.2 <i>Traçage de lignée</i>	34
2.3.3 <i>Marqueurs de cellules souches</i>	35

2.3.4	<i>Organoïdes</i>	39
3	CELLULES SOUCHES ET EPIDIDYME ADULTE	44
3.1	PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION	44
3.1.1	<i>Etat homéostatique</i>	44
3.1.2	<i>Après altérations tissulaires</i>	45
3.2	MARQUEURS DE CELLULES SOUCHES AU SEIN DE L'EPIDIDYME	46
3.3	ETUDES <i>IN VITRO</i> ET TRAÇAGE DE LIGNEE	47
3.4	REGULATION DE LA PROLIFERATION ET DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE	49
3.4.1	<i>Facteurs</i>	49
3.4.2	<i>Voies de signalisation</i>	54
3.4.3	<i>Le facteur de transcription TP63</i>	57
4	HYPOTHESE DE RECHERCHE	61
5	PREMIER ARTICLE: SELF-RENEWAL AND DIFFERENTIATION OF RAT EPIDIDYMAL BASAL CELLS USING A NOVEL <i>IN VITRO</i> ORGANOID MODEL	63
5.1	ABSTRACT.....	66
5.2	INTRODUCTION	67
5.3	MATERIALS AND METHODS	69
5.4	RESULTS.....	75
5.5	DISCUSSION	89
5.6	ACKNOWLEDGMENTS	93
5.7	REFERENCES	93
6	DEUXIEME ARTICLE: EXPRESSION OF THE STEM CELL MARKERS LGR5 AND P63 IN THE BASAL CELLS OF THE RAT EPIDIDYMIS	101
6.1	ABSTRACT.....	104
6.2	INTRODUCTION	104
6.3	MATERIALS AND METHODS	106
6.4	RESULTS.....	113
6.5	DISCUSSION.....	122
6.6	ACKNOWLEDGEMENTS	125
6.7	REFERENCES	125
7	DISCUSSION GÉNÉRALE	131
7.1	CREATION D'UN MODELE D'ORGANOÏDES D'EPIDIDYME DE RAT.....	131
7.1.1	<i>Mise en place et caractérisation du modèle</i>	131

7.1.2	<i>Applications du modèle</i>	133
7.2	IDENTIFICATION DES CELLULES SOUCHES DE L'EPIDIDYME.....	134
7.2.1	<i>LGR5 : un marqueur candidat des cellules souches de l'épididyme</i>	134
7.2.2	<i>Existence de sous-populations de cellules basales</i>	138
7.3	MECANISMES DE REGULATION DES CELLULES BASALES	139
7.4	PERSPECTIVES.....	142
8	CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES	145
9	BIBLIOGRAPHIE.....	147
10	ANNEXE I : TRACAGE DE LA LIGNEE LGR5 POSITIVE	175
10.1	INTRODUCTION ET MISE EN CONTEXTE	175
10.2	MATERIEL ET METHODES	177
10.3	RESULTATS.....	179
10.4	DISCUSSION.....	184
10.5	RÉFÉRENCES	186

LISTE DES FIGURES

1. Revue de littérature : l'épididyme et son épithélium

FIGURE 1.1. SCHEMA REPRESENTATIF D'UN EPIDIDYME HUMAIN.....	8
FIGURE 1.2. L'EPITHELIUM EPIDIDYMAIRE.....	12
FIGURE 1.3. DEVELOPPEMENT DE L'EPITHELIUM EPIDIDYMAIRE CHEZ LE RAT.	18

2. Revue de littérature : les cellules souches

FIGURE 2.1. CLASSIFICATION DES CELLULES SOUCHES SELON LEUR ORIGINE ET LEUR CAPACITE DE DIFFERENCIATION.	24
FIGURE 2.2. REPRESENTATION DES DIFFERENTS COMPOSANTS DE LA NICHE DES CELLULES SOUCHES.....	26
FIGURE 2.3. REPRESENTATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/ B-CATENINE.....	29
FIGURE 2.4. REPRESENTATION DES VOIES DE SIGNALISATIONS TGF-B ET BMP.....	31
FIGURE 2.5. REPRESENTATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH.....	32
FIGURE 2.6. REPRESENTATION DU SYSTEME D'EXPRESSION CONDITIONNELLE CRE-LOX.	35
FIGURE 2.7. ROLE DE LGR5 AU SEIN DU COMPLEXE WNT/FRIZZLED.	36
FIGURE 2.8. REPRESENTATION DE LA FORMATION D'ORGANOÏDE A PARTIR D'UNE CELLULE SOUCHE.....	39
FIGURE 2.9. NOMBRE DE CITATIONS POUR LE TERME « ORGANOIDS » DANS PUBMED EN FONCTION DU TEMPS. .	40
FIGURE 2.10. REPRESENTATION DES DIFFERENTS ORGANOÏDES OBTENUS A PARTIR DE CELLULES SOUCHES ADULTES.	41

5. Premier article : Self-renewal and differentiation of rat epididymal basal cells using a novel in vitro organoid model

FIGURE 5.1 : RESUME GRAPHIQUE DE L'ARTICLE PUBLIE DANS LE JOURNAL « BIOLOGY OF REPRODUCTION »	66
FIGURE 5.2: FORMATION OF ORGANOIDS BY TOTAL EPIDIDYMAL CELLS.	80
FIGURE 5.3: FORMATION OF ORGANOIDS FROM ITGA6-NEGATIVE AND POSITIVE EPIDIDYMAL CELL FRACTIONS...	81
FIGURE 5.4: FORMATION OF ORGANOIDS IN THE ITGA6-NEGATIVE AND POSITIVE CELL FRACTIONS.....	82
FIGURE 5.5: ASSESSMENT OF SELF-RENEWAL ABILITY OF BASAL CELLS.	83
FIGURE 5.6: ANALYSIS OF ORGANOIDS IN THE ITGA6-POSITIVE CELL FRACTION AFTER 7 AND 14 DAYS OF CULTURE.....	84
FIGURE 5.7: ELECTRON MICROGRAPHS OF EPIDIDYMAL ORGANOIDS.....	85
FIGURE 5.8: FORMATION OF ORGANOIDS FROM ITGA6-POSITIVE CELLS ISOLATED FROM THE PROXIMAL AND DISTAL ADULT EPIDIDYMIS.	86
FIGURE 5.9: ASSESSMENT OF CLEAR/NARROW CELLS IN CULTURED ORGANOIDS.....	88

6. Deuxième article : Expression of the stem cell markers LGR5 AND P63 in the basal cells of the rat epididymis

FIGURE 6.1. CHARACTERIZATION OF LGR5 IN THE EPIDIDYMIS DURING POSTNATAL DEVELOPMENT.	117
FIGURE 6.2. CHARACTERIZATION OF LGR5 IN THE DIFFERENT SEGMENTS OF THE ADULT EPIDIDYMIS.....	118
FIGURE 6.3. IDENTIFICATION OF DIFFERENT POPULATIONS OF BASAL CELLS.....	119
FIGURE 6.4. EFFECT OF ORCHIDECTOMY ON LGR5 AND P63 EXPRESSION LEVELS.....	120
FIGURE 6.5. ISOLATION OF THE BASAL CELLS OF THE ADULT EPIDIDYMIS AND FORMATION OF ORGANIDS.	121

7. Discussion

FIGURE 7.1 : SCHEMA REPRESENTATIF DES CARACTERISTIQUES SOUCHES DES CELLULES DE L'EPIDIDYME	136
FIGURE 7.2 : APPROCHES POSSIBLES POUR L'ISOLEMENT DES CELLULES BASALES EXPRIMANT LGR5	137

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. LISTE NON EXHAUSTIVE DES DIFFERENTS MARQUEURS UTILISES POUR IDENTIFIER LES TYPES CELLULAIRES DE L'EPIDIDYME..... 17

TABLEAU 2. COMPARAISON DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTS MODELES D'ETUDE BIOLOGIQUE..... 42

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D	2 Dimensions
3D	3 Dimensions
ABP	<i>Androgen Binding Protein</i>
AMH	<i>Anti-Müllerian Hormone</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
AQP9	Aquaporine 9
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BHE	Barrière hémato-épididymaire
BMP	<i>Bone Morphogenic Proteins</i>
BrdU	Bromodésoxyuridine
b-Trcp	<i>β-Transducin repeats-containing proteins</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CDH1	Cadhérine 1 (Cadhérine E)
CDH2	Cadhérine 2 (Cadhérine N)
CDH3	Cadhérine 3 (Cadhérine P)
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance</i>
CK1α	<i>Casein Kinase 1</i>
COX1	Cyclo-oxygénase 1
CRABP	<i>Cellular Retinoic Acid Binding Protein</i>
CRBP	<i>Cellular Retinoid Binding Protein</i>
CRISP-1	<i>Cysteine Rich Secretory Protein 1</i>
CS	Cellule(s) souche(s)
Cx	Connexine
DHT	Dihydrotestostérone

EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
E-RABP	<i>Epididymal retinoic acid-binding protein</i>
FACS	<i>Fluorescence Activating Cell Sorting</i>
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
Fzd	<i>Frizzled</i>
GDF	<i>Growth Differentiation Factors</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 β</i>
Itga6	Intégrine- α 6
JAM	<i>Junction Adhesion Molecules</i>
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
KRT5	Cytokératine 5
KRT14	Cytokératine 14
LGR	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor</i>
LRP	<i>Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
MACS	<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PGE2	<i>Prostaglandines E2</i>
RA	Acide rétinoïque
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
Rb	<i>Retinoblastoma tumor suppressor</i>
RBP	<i>Retinoid Binding Proteins</i>
RXR	Récepteurs de rétinoïdes X
RXRE	Eléments de réponse des rétinoïdes
SGP-2	<i>Sulfated Glycoprotein-2</i>

SOX2	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TCF	<i>T-cell factor</i>
TGB	<i>Thyroxin Binding Globuline</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TP63	Tumor Protein 63
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt	<i>Wingless-Int</i>
ZO-1	<i>Zonula occludens</i>

INTRODUCTION

L'épididyme est un organe du système reproducteur masculin qui fait suite aux testicules et qui permet la maturation, la protection, le transport ainsi que le stockage des spermatozoïdes (Amann & Howards, 1980; Bedford, 1967; Guiton *et al.*, 2013; Orgebin-Crist, 1967).

Chez le rongeur, il est divisé en 4 segments : le segment initial, la tête, le corps et la queue alors qu'il ne comprend pas de segment initial chez l'homme (Turner *et al.*, 2003). Il est composé d'une lumière où transitent les spermatozoïdes ainsi que d'un épithélium pseudo-stratifié formé de plusieurs types cellulaires (Sun & Flickinger, 1979). Les cellules principales entourent la lumière du tubule et sont les cellules majoritaires de cet épithélium. Elles participent de façon importante à la sécrétion de protéines impliquées dans la maturation des spermatozoïdes (Abe *et al.*, 1983). L'épithélium est également composé de cellules basales qui représentent 20 à 25% des cellules totales ainsi que de cellules claires, apicales, étroites, halo et dendritiques. Ces cellules sont réparties de façon différente selon les segments de l'épididyme et selon leurs rôles et créent une barrière hémato-épididymaire grâce à la formation de plusieurs types de jonctions cellulaires (Cyr *et al.*, 2002; Rinaldi *et al.*, 2020a).

Les cellules basales sont de petites cellules de forme pyramidale qui sont présentes à la base de l'épithélium dans tous les segments de l'épididyme et qui possèdent des projections cytoplasmiques pouvant atteindre la lumière des tubules. Ces cellules interagissent avec d'autres types cellulaires, expriment différentes protéines de jonctions cellulaires et jouent un rôle de micro-senseur de l'environnement luminal, de transport de fluide ainsi que de protection contre le stress oxydatif (Arrighi, 2014; Kim *et al.*, 2015; Shum *et al.*, 2011; Veri *et al.*, 1993).

Un rôle de cellules souches (CS) des cellules basales de l'épididyme a récemment été proposé (Mandon *et al.*, 2015; Pinel *et al.*, 2019). En effet, les cellules basales de nombreux épithéliums jouent un rôle de CS telles que celles de la prostate, la glande mammaire et l'urothélium (Santos *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015a; Zhang *et al.*, 2017a). Dans l'épididyme, des orchidectomies et des ligatures de canaux efférents réalisées sur des rongeurs ont permis d'observer une augmentation de l'apoptose des cellules principales et basales suivie d'une augmentation de la prolifération des cellules basales, une modification de leur morphologie ainsi que le maintien de l'intégrité de l'épithélium épididymaire suggérant la présence de CS au sein de cet organe (Hermo & Papp, 1996; Kim *et al.*, 2015; Martan & Risley, 1964). Une étude réalisée dans notre laboratoire a permis de développer un protocole permettant d'isoler la population de cellules basales d'épididyme de rat (Mandon *et al.*, 2015). Cette étude indique que ces cellules

partagent des propriétés communes avec des CS adultes. En effet, des analyses micro-réseaux ont montré qu'elles expriment différents marqueurs de CS adultes et des cultures en 2 dimensions (2D) ont indiqué qu'elles semblent se différencier dans le temps. La culture en 2D est cependant limitante pour reproduire l'environnement des cellules et ne peut pas permettre leur différenciation à long terme.

Un nouveau modèle permettant d'étudier les CS, appelé organoïde a cependant vu le jour en 2009 (Sato *et al.*, 2009). Les organoïdes sont des structures en 3 dimensions (3D) formés par la prolifération et la différenciation d'une unique CS dans une matrice extracellulaire en présence d'un milieu approprié. Ils sont formés de plusieurs types cellulaires et reproduisent de façon spontanée la morphologie et certaines fonctions de l'organe dont est issue la CS (Clevers, 2016; Lancaster & Knoblich, 2014).

Différentes études ont permis d'obtenir des structures ressemblant à des organoïdes à partir de cellules basales d'épididyme (Leir *et al.*, 2020b; Mou *et al.*, 2016). Dans une première étude, réalisée sur la souris, des cellules basales d'épididymes ont été isolées puis cultivées en 2D puis en 3D permettant la formation d'organoïdes. Ces structures étaient composées de cellules basales et claires suggérant la capacité de différenciation des cellules basales (Mou *et al.*, 2016). Dans une seconde étude, réalisée à partir d'épididyme humain, des cellules épидидymaires ont été cultivées en 3D et ont permis la formation de structures composées majoritairement de cellules basales mais aussi de cellules principales et de rares cellules claires (Leir *et al.*, 2020b). Aucun modèle d'organoïdes de rat n'avait cependant été développé avant ce travail.

Une des difficultés dans l'identification des CS est l'absence de marqueurs spécifiques à ces cellules. En effet, les CS de différents tissus expriment des marqueurs différents et une combinaison de plusieurs marqueurs est souvent nécessaire pour isoler une population spécifique de CS (Morrison & Spradling, 2008). Des marqueurs utilisés pour identifier des CS de divers tissus sont exprimés au sein de l'épithélium épидидymaire, cependant aucun n'a permis jusqu'à présent de distinguer une population de CS adultes dans cet organe. Une étude de 2007 a néanmoins permis d'identifier un marqueur spécifique aux CS adultes dans de nombreux tissus, nommé LGR5 (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*) (Barker *et al.*, 2007). Ce marqueur a été découvert dans l'intestin où il est spécifique à une population de CS et a ensuite été observé dans les CS de l'estomac, du colon, du foie, du rein, du follicule pileux, de la prostate, de la glande mammaire et des glandes utérines (Leung *et al.*, 2018). L'étude de ce marqueur n'a cependant jamais été réalisée au sein de l'épididyme.

L'hypothèse émise dans ce projet de recherche est qu'il existe, au sein de l'épididyme, une sous-population de cellules basales capables de s'auto-renouveler et de se différencier. Les objectifs spécifiques sont la démonstration de la présence de CS dans l'épididyme adulte, la création d'un modèle unique d'organoïde d'épididyme de rat et l'identification d'un marqueur spécifique associé à ces CS.

La première partie de ce manuscrit est une revue de littérature sur l'état actuel des connaissances. La structure, les fonctions et le développement de l'épididyme et de son épithélium sont tout d'abord présentés suivi d'une section sur les caractéristiques des CS, leurs régulations ainsi que les méthodes utilisées pour les identifier. Cette revue se termine par une présentation des données disponibles quant à l'existence de CS dans l'épididyme.

La deuxième partie de ce manuscrit est composée de 2 articles rédigés à partir des résultats obtenus au cours de mon doctorat. Le premier article est publié dans le journal « Biology of Reproduction » et présente un modèle unique d'organoïde d'épididyme de rat adulte. Le deuxième manuscrit décrit l'expression de LGR5 et p63 dans l'épididyme et les propose comme marqueurs des CS dans cet organe.

Enfin, la troisième partie est composée d'une discussion générale sur ce projet, d'une conclusion ainsi que d'une partie qui présente la contribution de ces travaux à l'avancement des connaissances.

REVUE DE LITTERATURE

1 L'ÉPIDIDYME ET SON ÉPITHÉLIUM

L'épididyme fait partie des principaux organes reproducteurs masculins. Son nom provient du grec *epi* (sur) et *didymoi* (testicule). L'épididyme permet la maturation et la protection ainsi que le transport et l'entreposage des spermatozoïdes. Ces fonctions sont rendues possibles grâce aux différentes cellules qui composent son épithélium.

1.1 Structure de l'épididyme

L'épididyme est un long tubule contourné formé de la réunion des canaux efférents. Il s'étend de la face postérieure du testicule jusqu'à son pôle inférieur où il devient le canal déférent (Figure 1.1). Chez l'homme, lors de la différenciation sexuelle qui a lieu pendant la 7^{ème} semaine de gestation, les canaux de Müller régressent alors que le canal de Wolff (le canal méso-néphrotique) prolifère pour donner naissance aux organes reproducteurs masculins tels que l'épididyme, les canaux efférents et les vésicules séminales (Hannema & Hughes, 2007; Hinton *et al.*, 2011; Sainio *et al.*, 1997). La longueur de l'épididyme varie selon les espèces ; il mesure environ 6 mètres de long chez l'humain, 3 mètres chez le rat et 1 mètre chez la souris (Hinton *et al.*, 2011; Robaire & Hermo, 1988). Il est entouré de cellules musculaires lisses appelées les cellules myoïdes et est composé d'un épithélium pseudo-stratifié et polarisé entourant la lumière du tubule où transitent les spermatozoïdes. Chez la plupart des mammifères, l'épididyme peut être divisé en 4 segments selon des critères morphologiques et fonctionnels : le segment initial, la tête (caput), le corps (corpus) et la queue (cauda) (Reid, 1957). Le segment initial est présent chez le rongeur mais est absent chez l'homme (Yeung *et al.*, 1991). Une étude de 2007 qui évalue l'expression globale des gènes dans les différents segments de l'épididyme humain a révélé que 2980 gènes sont différentiellement exprimés entre les segments (Dube *et al.*, 2007). Des données plus récentes spécifient que les transcriptomes du corps et de la queue sont proches alors que celui de la tête est plus distinct (Browne *et al.*, 2016). Chaque segment est également formé de plusieurs sous-segments séparés par un septum de tissu conjonctif qui maintient l'épididyme. Une étude de 2003 a ainsi déterminé que l'épididyme de rat et de souris est composé de 13 et 6 sous-segments respectivement (Turner *et al.*, 2003). Chez l'homme, les septums sont peu organisées et ne permettent pas de distinguer des sous-segments (Sullivan *et al.*, 2019). La composition cellulaire et la fonction de l'épithélium varient ainsi en fonction des segments et sous-segments de l'épididyme (Browne *et al.*, 2016; Johnston *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2003).

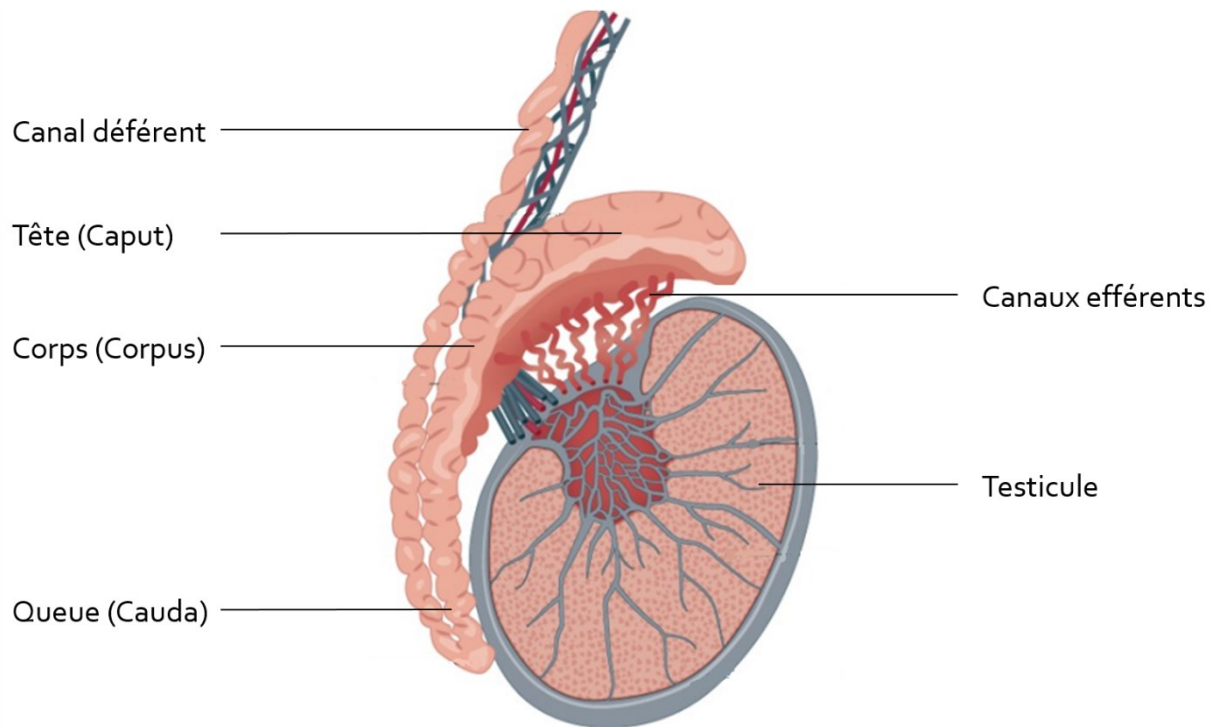


Figure 1.1. Schéma représentatif d'un épидидyme humain.

L'épididyme, situé sur la face dorsolatérale du testicule est composé de 3 segments chez l'humain : la tête (caput), le corps (corpus) et la queue (cauda). Il fait suite aux canaux efférents et précède le canal déférent. Adaptée de Tiwana and Leslie (2021). Autorisé par la Licence internationale Creative Commons Attribution 4.0.

1.2 Fonctions de l'épididyme

A la sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont ni mobiles, ni féconds. L'épididyme joue un rôle primordial dans l'obtention de spermatozoïdes fonctionnels en assurant leur maturation, spécialement dans la partie proximale, leur entreposage dans la partie distale ainsi que leur protection et leur transport le long du tubule.

1.2.1 Maturation des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes évoluent au sein de la lumière du tubule de l'épididyme dans un microenvironnement spécifique leur permettant une maturation morphologique et fonctionnelle (Bedford, 1967). En effet, la principale cause de maturation des spermatozoïdes n'est pas leur simple passage dans l'épididyme mais leur exposition à son environnement luminal (Orgebin-Crist, 1967). Cette maturation débute dès leur entrée dans l'épididyme et est progressive le long du tubule ; sa durée variant selon les espèces (Amann & Howards, 1980; Robb *et al.*, 1978). Les

changements de composition du microenvironnement le long de l'épididyme sont créés grâce à des phénomènes de réabsorption et de sécrétion de protéines assurés par les cellules de l'épithélium, principalement au niveau de sa partie proximale (Hinton & Howards, 1981). Entre la tête de l'épididyme et le canal déférent, on note notamment une réabsorption de 50% du fluide épидидymaire ainsi qu'une réabsorption de sodium et une sécrétion de potassium (Levine & Marsh, 1971). Dans l'épididyme, les modifications d'organites et de la membrane plasmique des spermatozoïdes ainsi que l'acquisition de différentes protéines aboutissent à l'acquisition de leur mobilité et de leur pouvoir fécondant, c'est-à-dire leur capacité à reconnaître et à se lier à la zone pellucide de l'ovocyte (Dacheux *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 2002; Toshimori, 2003).

Les protéines présentes dans la lumière varient selon les espèces mais les plus abondantes sont la clusterine, la protéine de sécrétion riche en cystéine (CRISP-1) et la protéine épидидymaire liée à l'acide rétinoïque (E-RABP) (Dacheux *et al.*, 2009).

La **clusterine**, aussi appelée SGP-2 (*sulfated glycoprotein-2*) est une glycoprotéine sécrétée majoritairement dans la tête de l'épididyme par les cellules principales. Sa fonction de protéine chaperonne pourrait empêcher la précipitation des nombreuses protéines présentes dans l'environnement luminal alors qu'elle pourrait également jouer un rôle dans la capacitation et la mobilité des spermatozoïdes en se fixant sur leur membrane plasmique (Han *et al.*, 2012; Saewu *et al.*, 2017). Cette protéine est régulée de façon segment dépendante par les androgènes tel que la testostérone et les facteurs testiculaires (Blaschuk *et al.*, 1983; Cyr & Robaire, 1992; Hermo *et al.*, 1991; Saewu *et al.*, 2017).

CRISP-1 est une glycoprotéine qui se lie aux spermatozoïdes avec des affinités différentes. D'une part, elle se lie aux spermatozoïdes jusqu'à capacitation où elle joue un rôle dans la motilité des spermatozoïdes et d'autre part elle reste liée aux spermatozoïdes après capacitation et intervient dans la formation de leur acrosome et dans l'interaction du spermatozoïde avec l'ovule (Brooks, 1982; Curci *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2018; Roberts *et al.*, 2008; Weigel Muñoz *et al.*, 2019).

E-RABP, nommée également lipocaline 5 est une protéine chaperonne permettant le transport de protéines hydrophobes comme les rétinoïdes au sein de l'épididyme (Newcomer, 1993). Elle est spécifique à l'épididyme et est majoritairement présente dans la tête (Lareyre *et al.*, 1998).

Les spermatozoïdes issus de la tête proximale de l'épididyme ont donc une capacité de fécondation moindre par rapport à ceux provenant des autres segments alors que leur mobilité augmente de façon progressive le long de l'épididyme (Orgebin-Crist, 1967; Yeung *et al.*, 1993).

1.2.2 Protection des spermatozoïdes

L'épididyme apporte également une protection immunitaire aux spermatozoïdes car ces derniers constituent un « défi immunologique pour le mammifère mâle qui les fabrique » (Guiton *et al.*, 2013). En effet, ceux-ci sont reconnus comme du non soi par le système immunitaire et ne doivent donc pas être en contact avec le système sanguin pour prévenir toute réaction auto-immune (Domagala *et al.*, 1996).

De nombreux acteurs clefs interviennent afin de conserver ce statut immunologique particulier accordé aux spermatozoïdes. Un de ces acteurs est la **barrière hémato-épididymaire** (BHE). Il s'agit d'une barrière physique, composée de jonctions serrées et de jonctions adhérentes entre les cellules qui permet d'isoler les spermatozoïdes du système sanguin. Cette barrière a été décrite pour la première fois en 1972 dans l'épididyme de rat (Friend & Gilula, 1972). Tout au long de l'épididyme, l'étendue des jonctions serrées diminuent alors que le nombre de desmosomes augmente (Cyr *et al.*, 1995). La BHE permet l'obtention d'une différence de milieu et de concentration protéique entre la circulation sanguine et la lumière de l'épididyme mais aussi entre les différents segments de l'épididyme (Hinton, 1995). Chez le rat, il a été montré qu'une altération de la BHE en association avec un âge avancé entraîne une augmentation de cellules immunitaires présentes dans l'épithélium (Levy & Robaire, 1999). Une étude de 1987 a dévoilé la présence d'anticorps anti-spermatozoïde dans le fluide séminal de patients infertiles, démontrant que cette barrière peut parfois être endommagée et confirmant son rôle primordial dans la fertilité masculine (Pattinson & Mortimer, 1987). Des études plus récentes ont également montré que cette barrière était altérée chez certains patients atteints d'azoospermie obstructive et non obstructive (Dube *et al.*, 2008; Dube *et al.*, 2010).

Un autre acteur clef de la protection des spermatozoïdes est la présence de **cellules immunitaires** au sein de l'épididyme et dont les caractéristiques et rôles seront évoqués plus loin (Pierucci-Alves *et al.*, 2018). Certaines cellules composant l'épithélium de l'épididyme sécrètent également une enzyme immunosuppressive, l'Indoleamine 2,3-dioxygénase I qui est impliquée dans le contrôle de l'environnement immun de l'épididyme (Jrad-Lamine *et al.*, 2013). De nombreuses défensines jouant un rôle antibactérien et de modulation de la réponse immunitaire sont aussi présentes au sein de l'épididyme (Xin *et al.*, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2002; Yudin *et al.*, 2005). Ces défensines interviennent également dans la maturation des spermatozoïdes (Aram *et al.*, 2020; Björkgren *et al.*, 2016). Enfin, les spermatozoïdes sont également protégés des dommages causés par les espèces oxygénées réactives grâce aux enzymes glutathion S-transférase (Veri *et al.*, 1993), CuZn-superoxyde dismutase (Nonogaki *et al.*, 1992),

métallothionéines (Cyr *et al.*, 2001), peroxyrédoxine (Shi *et al.*, 2018) et glutathion peroxydase 5 (Vernet *et al.*, 1997) exprimées par les cellules de l'épithélium.

1.2.3 Transport des spermatozoïdes

A la sortie du testicule les spermatozoïdes sont immobiles et donc incapables de se déplacer par eux même. Ils entrent dans l'épididyme avec le mouvement du fluide testiculaire, plus important dans la tête proximale que dans la queue de l'épididyme et grâce aux cellules cillées des canaux efférents (Turner *et al.*, 1990). Les cellules de l'épididyme sont quant à elles composées de stéréocils immobiles et c'est par l'intermédiaire d'une activité péristaltique de l'épididyme que le transport des spermatozoïdes est assuré. Cette activité est créée par les contractions des fibres musculaires lisses (Jaakkola & Talo, 1982), une pression hydrostatique intraluminaire (Johnson & Howards, 1975) et une variation de la réabsorption et de l'absorption du fluide luminal (Levine & Marsh, 1971). Le temps de transport des spermatozoïdes dans l'épididyme varie d'une espèce à l'autre ; il est de 9 à 13 jours chez l'humain et de 8 à 9 jours chez le rat (Amann & Howards, 1980). Plusieurs études ont montré que ce temps de transport est influencé par différents facteurs hormonaux ou neuronaux tels que les androgènes, les œstrogènes, les prostaglandines et les peptides nommés ocytocine et vasopressine (Cosentino *et al.*, 1984; Din-Udom *et al.*, 1985; Meistrich *et al.*, 1975; Studdard *et al.*, 2002; Sujarit & Pholpramool, 1985).

1.2.4 Entreposage des spermatozoïdes

L'épididyme permet également de stocker les spermatozoïdes. Après leur passage au sein du tubule, les spermatozoïdes qui sont désormais mobiles et fécondants sont entreposés dans la queue de l'épididyme dans un état métabolique latent jusqu'à éjaculation (Wade *et al.*, 2003). L'épididyme de rat peut ainsi stocker jusqu'à 295 millions de spermatozoïdes dans la tête et le corps et jusqu'à 440 millions dans la queue (Robb *et al.*, 1978). Cette fonction de stockage des spermatozoïdes nécessite la présence d'un microenvironnement spécifique dans la queue de l'épididyme, tels qu'un pH particulier (Shum *et al.*, 2009) et la présence d'immobiline chez le rat (Hermo *et al.*, 1994a; Hermo *et al.*, 1992b; Usselman & Cone, 1983).

En plus de sa fonction de stockage, l'épididyme pourrait également permettre d'éliminer les spermatozoïdes atteints d'anomalies structurales ou fonctionnelles. En effet, une étude de 1997 a montré que le nombre de spermatozoïdes anormaux diminue le long de l'épididyme (Yeung *et al.*, 1997). Le contrôle de la qualité des spermatozoïdes pourrait également faire

intervenir, chez les mammifères, un système dépendant de l'ubiquitine induisant la phagocytose (Baska *et al.*, 2008; Sutovsky *et al.*, 2001). De plus, une glycoprotéine sécrétée particulière qui se lie spécifiquement aux spermatozoïdes anormaux a été mise en évidence chez le hamster (Olson *et al.*, 2004). Cependant, la phagocytose de spermatozoïdes est un processus qui semble rare dans des conditions physiologiques normales (Ramos-Ibeas *et al.*, 2013). Des études supplémentaires doivent encore être réalisées pour comprendre ce phénomène.

1.3 L'épithélium épидидymaire

1.3.1 Les types cellulaires

L'épithélium de l'épididyme est un épithélium **pseudo-stratifié** de type cylindrique. Il est composé de sept types cellulaires différents : les cellules principales, basales, claires, étroites, apicales, halo et dendritiques (Figure 1.2) (Adamali & Hermo, 1996; Rinaldi *et al.*, 2020b). Les cellules sont réparties de façons différentes selon les segments de l'épididyme et leurs rôles respectifs (Clermont & Flannery, 1970).

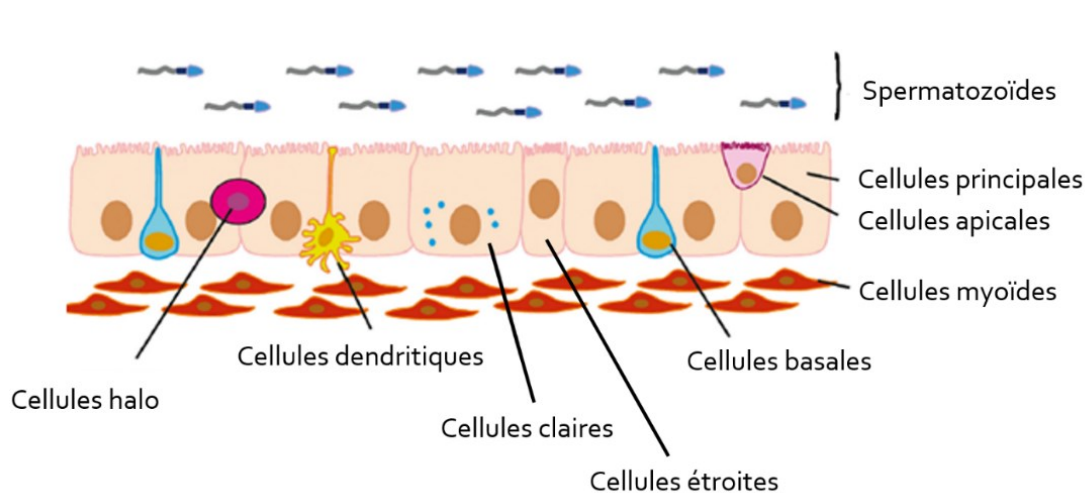


Figure 1.2. L'épithélium épидидymaire.

L'épithélium épидидymaire de rat encercle la lumière où circulent les spermatozoïdes et est entouré de plusieurs couches de cellules myoïdes. Les cellules principales sont les cellules majoritaires de l'épithélium qui est également formé de cellules claires, basales, étroites, apicales, dendritiques et halo. Tirée de Pinel *et al.* (2019). Autorisé par John Wiley and Sons, licence 5272130337983.

- **Les cellules principales**

Les cellules principales représentent 65 à 80% des cellules de l'épithélium et sont ainsi les cellules majoritaires. Elles sont présentes tout le long de l'épididyme mais leur structure et fonction varient selon le segment où elles sont localisées ; par exemple leur taille diminue le long de l'épididyme et leur profil d'expression génique varie selon les segments (Abe *et al.*, 1983; Rinaldi *et al.*, 2020a; Vendrely & Dadoune, 1988). Ce sont de grandes cellules cylindriques qui s'étendent de la base de l'épithélium jusqu'à sa partie apicale où elles forment des microvillosités (Sun & Flickinger, 1979). Elles possèdent un appareil sécrétoire développé (appareil de Golgi très dense, réticulum endoplasmique vésiculaire distribué dans le cytoplasme, granules de sécrétions) mais aussi un appareil d'endocytose important (lysosomes et endosomes) (Adamali & Hermo, 1996; Hermo *et al.*, 1998; Hermo & Robaire, 2002).

Ces cellules permettent la majeure partie des sécrétions et absorptions de protéines et glycoprotéines impliquées dans la maturation des spermatozoïdes (Hermo *et al.*, 1992a) mais aussi le passage d'eau par la présence de l'aquaporine 9 (AQP9) (Badran & Hermo, 2002; Elkjaer *et al.*, 2000; Hermo *et al.*, 2004; Pastor-Soler *et al.*, 2001; Pastor-Soler *et al.*, 2002). L'AQP9 est exprimée par les stéréocils des cellules principales et est régulée par les androgènes tel que la dihydrotestostérone (DHT) (Oliveira *et al.*, 2005; Pastor-Soler *et al.*, 2002; Picciarelli-Lima *et al.*, 2006). Les cellules principales libèrent également des vésicules appelées épидидyosomes enfermant des protéines principalement hydrophobes et des petits ARN non codants. Ces vésicules jouent un rôle dans la maturation des spermatozoïdes mais aussi dans la communication entre les cellules de l'épithélium (Fornés *et al.*, 1995; James *et al.*, 2020; Nixon *et al.*, 2019; Reilly *et al.*, 2016; Rejraji *et al.*, 2006; Sullivan, 2015). Enfin, les cellules principales expriment également des protéines liant les androgènes, permettant la fixation de testostérone provenant des testicules qui est ensuite réduite en DHT, la forme la plus active au sein de l'épididyme (Robaire & Hamzeh, 2011; Robaire B., 2006).

- **Les cellules basales**

Les cellules basales constituent environ 20% de l'épithélium de l'épididyme de rat adulte. Elles sont présentes dans tous les segments de l'épididyme mais sont plus nombreuses au niveau de la queue de l'épididyme (Seiler *et al.*, 1998). Elles apparaissent après les premières semaines de développement dans l'épididyme de rat et présentent une certaine plasticité lors du développement postnatal (Gregory & Cyr, 2018; Shum *et al.*, 2013). Ce sont de petites cellules

adhérentes à la base de l'épithélium, de forme pyramidale et avec un faible ratio cytoplasme/noyau. Elles possèdent quelques mitochondries, un appareil de golgi peu développé et des projections basales et apicales qui atteignent la lumière du tubule. Ces projections ont un mouvement oscillatoire individuel à chaque cellule et sont régulées par les facteurs testiculaires autres que les androgènes (Kim *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2016). Ces projections sont aussi retrouvées au niveau des cellules basales de la prostate, de la trachée, du rein ou encore du larynx et semblent jouer un rôle de senseur du microenvironnement tubulaire (Shum *et al.*, 2008). Les cellules basales interagissent notamment avec les cellules principales de l'épithélium. En effet, elles expriment la cyclo-oxygénase 1 (COX-1) permettant la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2) dans la lumière déclenchant la sécrétion de bicarbonates HCO_3^- via le canal membranaire CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) des cellules principales (Leung *et al.*, 2004).

D'anciennes études suggèrent que les cellules basales ont un rôle immunitaire car des marqueurs de monocytes et de macrophages ont été détectés au sein de ces cellules (Yeung *et al.*, 1994). Cependant la découverte plus récente de cellules dendritiques qui sont présentes à la base de l'épithélium et qui expriment ces marqueurs a permis de réfuter cette théorie (Shum *et al.*, 2014).

Les cellules basales jouent également un rôle dans la protection de l'épithélium. Ces cellules expriment la sous unité Yf de la glutathion S-transférase et la CuZn-superoxyde dismutase, des enzymes qui permettent une protection contre le stress oxydatif en catalysant la conjugaison du glutathion avec des composés électrophiles pour les rendre moins toxiques (Andonian & Hermo, 1999; Andonian & Hermo, 2003; Hermo *et al.*, 1994b; Veri *et al.*, 1993).

Les cellules basales pourraient aussi être impliquées dans le transport de fluide transépithélial. Chez le rat, elles expriment certaines protéines membres de la famille des aquaporines. Grâce à ces aquaporines, et notamment à l'aquaporine 3, les cellules basales pourraient ainsi être engagées dans le transport d'eau, de glycérol et de solutés à travers l'épithélium (Herme *et al.*, 2004).

Enfin, un rôle de CS des cellules basales de l'épididyme a récemment été proposé (Mandon *et al.*, 2015; Mou *et al.*, 2016; Pinel & Cyr, 2021; Pinel *et al.*, 2019). Ce rôle sera décrit dans la 3^{ème} partie de cette revue de littérature.

- **Les cellules claires**

Les cellules claires sont présentes dans toutes les parties de l'épididyme, excepté dans le segment initial et sont plus nombreuses dans la queue de l'épididyme (Breton *et al.*, 1999). Elles possèdent des vésicules, des lysosomes, des endosomes ainsi que des gouttelettes lipidiques (Hermo *et al.*, 1992a). Ces cellules ont une activité importante d'endocytose. Elles sont en effet impliquées dans la réabsorption des contenus cytoplasmiques relâchés par les spermatozoïdes lors de leur maturation telle que la gouttelette cytoplasmique (Hermo *et al.*, 1998). Elles jouent également un rôle important dans l'acidification du fluide luminal à l'aide de pompes à protons V-ATPase (Breton *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2017; Shum *et al.*, 2009). Ces pompes à protons sont composées de plusieurs sous-unités et sont divisées en 2 parties ; une partie membranaire (V0) et une partie cytoplasmique (V1) (Breton *et al.*, 1999; Pietrement *et al.*, 2006). Des études récentes démontrent que les gènes codant pour les sous-unités D2 et A4 de la partie transmembranaire et les sous-unités G3, A et B de la partie cytoplasmique sont exprimés spécifiquement par les cellules claires pouvant ainsi être utilisés comme marqueurs de ces cellules (Leir *et al.*, 2020a; Rinaldi *et al.*, 2020a).

La régulation de l'acidité du milieu par les cellules claires est influencée par les cellules principales et les cellules basales. En effet, la sécrétion de bicarbonate via le canal CFTR des cellules principales entraîne une augmentation du pH luminal qui permet l'accumulation de V-ATPase dans les cellules claires afin d'augmenter la sécrétion d'ions H⁺ (Pastor-Soler *et al.*, 2003). Quant aux cellules basales, leurs projections expriment le récepteur à l'angiotensine II qui permet d'évaluer l'acidité du milieu luminal. L'activation de ces récepteurs induit une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de monoxyde d'azote dans l'environnement luminal. Le monoxyde d'azote atteint les cellules claires et permet l'accumulation de V-ATPase induisant une augmentation de la sécrétion de protons par les cellules claires (Shum *et al.*, 2008).

- **Les cellules étroites**

Chez le rongeur, les cellules étroites sont uniquement présentes dans le segment initial. Elles possèdent une morphologie bien spécifique ; ce sont de minces cellules allongées présentes sur toute la hauteur de l'épithélium entre les cellules principales (Adamali & Hermo, 1996). Ces cellules possèdent un appareil d'endocytose très développé et sont impliquées dans la réabsorption des gouttes cytoplasmiques relâchées par les spermatozoïdes (Hermo *et al.*, 1992a). De plus, les cellules étroites expriment différentes sous-unités de pompes à protons et sécrètent

ainsi des ions H⁺ dans la lumière du tubule pour en réguler l'acidité (Pietrement *et al.*, 2006). Les cellules étroites sont peu étudiées mais elles semblent avoir le même rôle et exprimer de nombreux marqueurs identiques à ceux des cellules claires (Blomqvist *et al.*, 2006).

- **Les cellules halo**

Les cellules halo sont présentes dans tous les segments de l'épididyme. Ce sont de petites cellules rondes localisées le plus souvent à la base de l'épithélium entre les cellules principales. Elles sont riches en mitochondries, granules denses et vésicules apicales (Hermo *et al.*, 1992a). Des études utilisant des marquages immunologiques ont permis d'établir que ces cellules sont des lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques ainsi que des monocytes (Serre & Robaire, 1999). Le nombre de cellules halo est plus élevé dans la partie distale de l'épididyme et augmente en fonction de l'âge. Ceci est corrélé avec l'augmentation de la quantité de spermatozoïdes dégradés chez les sujets âgés et dans la queue de l'épididyme (Wang & Holstein, 1983).

- **Les cellules apicales**

Les cellules apicales sont présentes dans tout l'épididyme mais sont majoritairement localisées au niveau du segment initial. Comme leur nom l'indique, le noyau de ces cellules est présent dans la partie apicale de l'épithélium alors qu'une mince ramification cytoplasmique permet leur contact avec la membrane basale. Peu d'études existent sur ces cellules mais elles semblent être impliquées dans les processus d'endocytose et de protection du stress oxydatif (Adamali & Hermo, 1996).

- **Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques sont les dernières cellules découvertes de l'épididyme (Da Silva *et al.*, 2011). Elles ont une morphologie dendroforme, expriment des marqueurs de cellules immunitaires et sont présentes à la base de l'épithélium, tout le long de l'épididyme. Ces cellules projettent de nombreuses dendrites entre les cellules de l'épithélium, en direction de la lumière, surtout au niveau du segment initial chez la souris. Elles jouent un rôle immunitaire en tant que cellules présentatrices d'antigènes (Da Silva *et al.*, 2011). Une étude de 2014 a également montré lors d'une expérience de ligature des canaux efférents que les cellules dendritiques sont capables

de phagocyter les cellules en apoptose (Smith *et al.*, 2014). Enfin, une étude plus récente a montré que ces cellules interviennent dans la tolérance immunitaire de l'épithélium épидидymaire envers les spermatozoïdes (Pierucci-Alves *et al.*, 2018).

Le tableau ci-dessous rassemble une liste de marqueurs utilisés afin d'identifier les différents types de cellules de l'épididyme.

Tableau 1. Liste non exhaustive de différents marqueurs utilisés pour identifier les types cellulaires de l'épididyme.

Types cellulaires	Marqueurs	Références
Cellules Principales	AQP9	Pastor-Soler <i>et al.</i> , 2001 Badran <i>et al.</i> , 2002 Da Silva <i>et al.</i> , 2006
	CFTR	Ruz <i>et al.</i> , 2004 Ruan <i>et al.</i> , 2012
	CRISP-1	Moore <i>et al.</i> , 1994 Leir <i>et al.</i> , 2020
	Clusterine / SGP-2	Hermo <i>et al.</i> , 1991 Cyr <i>et al.</i> , 1992 Han <i>et al.</i> , 2012 Saewu <i>et al.</i> , 2017
Cellules Basales	KRT5	Shum <i>et al.</i> , 2013
	ITGA6 / CD49f	Mandon <i>et al.</i> , 2015
	COX1 / PTGS1	Leung <i>et al.</i> , 2004 Shum <i>et al.</i> , 2008
	TP63	Hayashi <i>et al.</i> , 2004 Gregory <i>et al.</i> , 2018
	CLDN-1	Gregory <i>et al.</i> , 2001 Shum <i>et al.</i> , 2008
	LGR5	Pinel & Cyr, en cours
Cellules Claires et Etroites	Sous-unités ATPase	Breton <i>et al.</i> , 1999 Hermo <i>et al.</i> , 2000 Pietrement <i>et al.</i> , 2006 Rinaldi <i>et al.</i> , 2020
	FOXI1	Blomqvist <i>et al.</i> , 2006 Rinaldi <i>et al.</i> , 2020
Cellules Halo	CD4	Serre & Robaire, 1999
	CD8	Serre & Robaire, 1999
	ED1	Serre & Robaire, 1999
Cellules dendritiques	CD11c	Da Silva <i>et al.</i> , 2011
	CX3CR1	Da Silva <i>et al.</i> , 2011

1.3.2 La formation de l'épithélium

L'épididyme ainsi que les autres organes de l'appareil urogénital masculin sont dérivés du mésoderme intermédiaire qui forme dès les premiers jours embryonnaires un conduit mésonéphrique appelé canal de Wolff. Chez le mâle, la partie proximale de ce canal s'allonge et s'enroule pour former l'épididyme alors que la partie distale forme le canal déférent (Sainio *et al.*, 1997).

Après la naissance, la formation de l'épithélium épидидymaire de rat se déroule en trois phases : une première phase où les cellules sont indifférenciées (de la naissance jusqu'au jour 14), une période de différenciation (jour 14 au jour 40) et une période d'expansion (à partir du jour 40) (Herms *et al.*, 1992a; Sun & Flickinger, 1979). Les principales étapes sont représentées dans la figure 1.3.

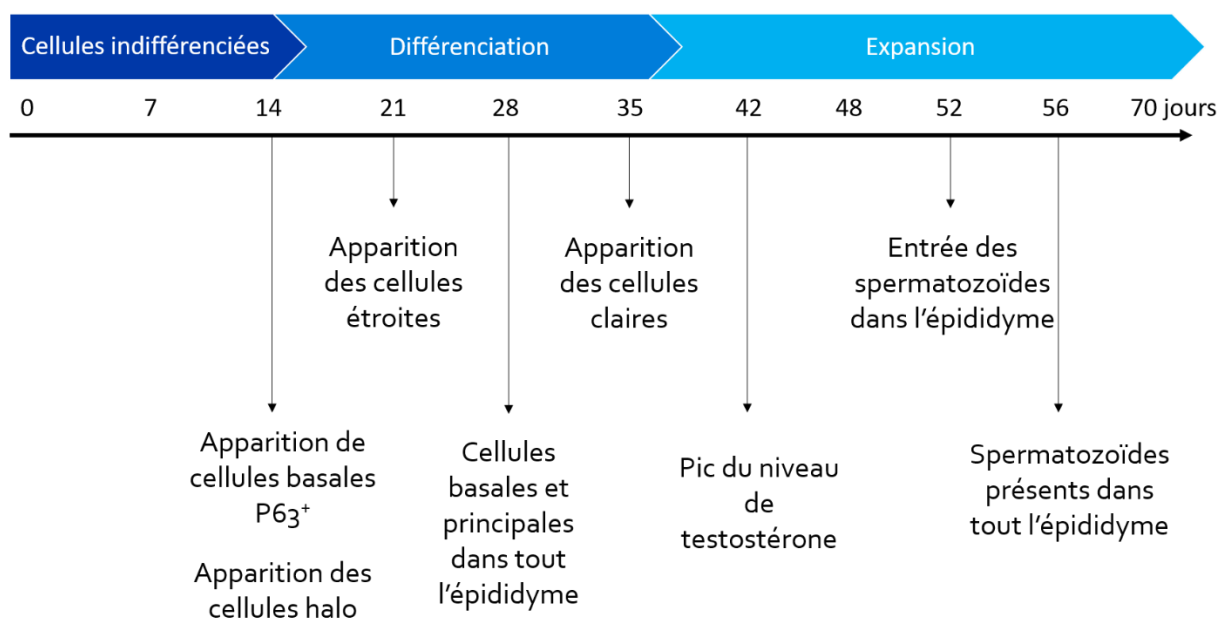


Figure 1.3. Développement de l'épithélium épидидymaire chez le rat.

La formation de l'épithélium épидидymaire de rat se déroule en trois périodes : une première période où les cellules sont indifférenciées, une période de différenciation et une période d'expansion. Créée par L. Pinel

De la naissance jusqu'au jour 14, l'épithélium possède une apparence uniforme et est constitué d'une simple rangée de cellules indifférenciées morphologiquement : les cellules

colonnaires. Ces cellules sont présentes dans tous les segments de l'épididyme et contiennent de nombreuses figures mitotiques (Sun & Flickinger, 1979).

Malgré le fait que ces cellules semblent encore toutes identiques morphologiquement au jour 14, des analyses par immunofluorescence ont montré que toutes ces cellules n'ont pas le même profil d'expression protéique à ce stade. En effet, certaines cellules colonnaires, notamment dans la queue de l'épididyme expriment le facteur de transcription TP63 (Tumor Protein 63) (Gregory & Cyr, 2018; Hayashi *et al.*, 2004). Ce facteur de transcription est exprimé par les cellules basales de l'épithélium suggérant un début de différenciation des cellules basales dès le jour 14. Au jour 21, les cellules étroites apparaissent et la BHE devient étanche (Agarwal & Hoffer, 1989). Au jour 28, les cellules basales et les cellules principales sont présentes dans tout l'épididyme alors que les cellules claires apparaissent au jour 35 (Sun & Flickinger, 1979).

Différentes études ont suggéré que les cellules colonnaires sont les précurseurs des cellules étroites, principales, claires et basales (Kumar & Tanwar, 2017; Sun & Flickinger, 1982). Lors d'une étude de 1982, de la thymidine marquée a été injectée dans des épididymes de rats de 10 et 21 jours qui ont ensuite été euthanasiés et analysés à 16 et 28 jours. Des cellules étroites ainsi que des cellules basales et principales marquées à la thymidine ont été observées au jour 16 et au jour 28 respectivement (Sun & Flickinger, 1982). Une autre étude a été réalisée sur des souris transgéniques exprimant une protéine fluorescente, la GFP (*Green Fluorescent Protein*), dans les cellules actives pour la voie de signalisation Wnt. Dans ce modèle toutes les cellules colonnaires exprimaient la GFP avant la différenciation de l'épididyme et les 4 types de cellules différenciées l'exprimaient également après différenciation. Ces résultats démontrent donc une activité de la voie de signalisation Wnt dans ces cellules et suggèrent que les cellules colonnaires soient à l'origine des autres types cellulaires (Kumar & Tanwar, 2017).

Enfin, lors de la période d'expansion, les principaux événements sont un pic de testostérone au jour 42 et l'apparition des spermatozoïdes entre les jours 45 et 52 alors que les changements cellulaires sont mineurs (Herms *et al.*, 1992a; Scheer & Robaire, 1980).

Chez l'homme, l'étude de l'épididyme et de son épithélium est limitée par la nécessité d'obtenir des tissus intacts et bien préservés. Le laboratoire du Pr. Sullivan, en collaboration avec le programme de transplantation d'organe a cependant réussi à obtenir plusieurs épididymes provenant de patients adultes permettant de publier différents articles et revues quant à l'épididyme humain (Légaré & Sullivan, 2020; Sullivan *et al.*, 2019; Sullivan *et al.*, 2011; Sullivan & Mieusset, 2016; Thimon *et al.*, 2007). Il a notamment été montré que l'épithélium épididymaire humain est formé de cellules principales, de cellules basales, de cellules dendritiques ainsi que

de cellules positives pour des marqueurs V-ATPase avec une morphologie plus proche des cellules étroites que des cellules claires (Duan *et al.*, 2016; Sullivan *et al.*, 2019)

1.3.3 Les jonctions cellulaires

Les différentes cellules formant l'épithélium de l'épididyme communiquent entre elles grâce à l'établissement de plusieurs types de jonctions cellulaires : les jonctions communicantes, serrées et adhérentes. Plusieurs de ces jonctions permettent la formation de la BHE, importante pour maintenir un environnement adapté à la maturation et à la protection des spermatozoïdes (Cyr *et al.*, 2018).

- **Les jonctions communicantes**

Les jonctions communicantes, aussi appelées jonctions lacunaires ou jonctions gap, sont essentielles pour coordonner les fonctions cellulaires dans un épithélium complexe. Elles permettent une communication directe entre cellules voisines nécessaire à différents phénomènes biologiques telles que la prolifération et la différenciation cellulaire. Ces jonctions sont formées par des canaux entre les cellules adjacentes qui permettent un passage bidirectionnel et sélectif de petites molécules (<1 kDa) (Unwin & Zampighi, 1980). Ces canaux, appelés connexons sont composés de l'assemblage de 6 protéines transmembranaires : **les connexines**, qui sont nommées selon leurs poids moléculaires. Les connexons peuvent être formés de connexines identiques ou distinctes (Bruzzone *et al.*, 1994; Sosinsky, 1995).

Chez le rat, 5 connexines différentes ont en premier lieu été identifiées au niveau de l'épididyme (Dufresne *et al.*, 2003) ; la connexine 26 présente principalement chez les jeunes animaux au niveau de la membrane apicale des cellules colonnaires; la connexine 32 exprimée uniquement entre les cellules principales ; la connexine 43 retrouvée entre les cellules basales et les cellules principales et entre les cellules basales et les cellules claires (Cyr *et al.*, 1996) et les connexines 30.3 et 31.1 qui semblent être exprimées par les cellules basales (Mandon *et al.*, 2015). Deux études de 2013 ont ensuite détecté les ARNm de 4 connexines supplémentaires (les connexines 31, 40, 45 et 37) dans des épидидymes de rats sans déterminer leur localisation (Han & Lee, 2013; Lee, 2013). Les niveaux d'ARNm des connexines varient au cours du développement post-natal ; ceux des connexines 26 et 43 diminuent alors que les niveaux des connexines 32, 30.3 et 31.1 augmentent (Dufresne *et al.*, 2003).

Tous les mécanismes de régulation de l'expression des connexines ne sont pas encore établis à l'heure actuelle, cependant différentes données indiquent que la phosphorylation de la connexine 43 (Cx43) est régulée par EGF (*Epidermal Growth Factor*) et que les hormones telles que la testostérone et la dihydrotestostérone peuvent intervenir dans ces mécanismes de régulation (Adam & Cyr, 2016; Dube *et al.*, 2012). Les œstrogènes pourraient aussi être impliqués dans leur régulation (Lee, 2014; Lee & Lee, 2015). Le rôle des différentes connexines dans la maturation de l'épididyme n'est pas encore totalement connu, mais la présence d'une grande variété de connexines dans l'épididyme suggère une communication cellulaire importante au sein de son épithélium.

La Cx43 est aussi présente dans le testicule et l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques avec mutation du gène codant la Cx43 indique que ces souris présentent une diminution de la mobilité et du nombre de spermatozoïdes suggérant un rôle critique de cette Cx43 dans la spermatogenèse mais aussi dans la maturation épидидymaire (Gregory *et al.*, 2011; Risley, 2000).

- **Les jonctions serrées**

Les jonctions serrées permettent une perméabilité sélective entre deux cellules et sont donc essentielles à la composition de la BHE afin de créer un microenvironnement spécifique à la maturation des spermatozoïdes. Le nombre et la localisation des jonctions serrées varient le long de l'épididyme ; elles sont plus extensives dans la tête que dans la queue de l'épididyme (Cyr *et al.*, 2007; Cyr *et al.*, 1995). Ces jonctions sont principalement formées de deux familles de protéines transmembranaires : l'occludine et les claudines.

L'**occludine** est la première protéine transmembranaire identifiée dans les jonctions serrées (Furuse *et al.*, 1993). La liaison de deux occludines exprimées par des cellules voisines permet la formation de la jonction. Chez le rat, elle est localisée au niveau apical des cellules principales et dans quelques cellules claires, excepté dans le segment initial où elle est localisée au niveau des cellules étroites (Cyr *et al.*, 1999).

Les **claudines**, quant à elles, font partie d'une famille composée de 20 protéines transmembranaires qui ont été découvertes plus récemment. Elles sont localisées entre les cellules adjacentes et peuvent être présentes seules ou en colocalisation avec l'occludine. Chez le rat et la souris, les claudines 1 à 10 sont exprimées dans l'épididyme (Gregory & Cyr, 2006; Guan *et al.*, 2005; Inai *et al.*, 2007). La claudine 1 est présente au sein des jonctions serrées dans

tous les segments de l'épididyme, plus précisément entre les cellules principales au niveau apical mais aussi entre les cellules basales et principales et au niveau de la membrane basale (Gregory *et al.*, 2001).

Les jonctions serrées sont également composées d'autres protéines telles que la **tricelluline** (Ikenouchi *et al.*, 2005; Mandon & Cyr, 2015), la **protéine JAM** (Junction Adhesion Molecule) (Bazzoni *et al.*, 2000; Martin-Padura *et al.*, 1998) et la **protéine ZO-1** (Zonula occludens-1) (DeBellefeuille *et al.*, 2003). L'expression et la distribution des protéines de jonctions serrées sont notamment régulées par la voie de signalisation MAPK/ERK (Kim & Breton, 2016).

- **Les jonctions adhérentes**

Les jonctions adhérentes sont, comme leur nom l'indique, responsables de l'adhésion des cellules entre elles et de l'adhésion des cellules à la membrane basale. Elles sont aussi impliquées dans la reconnaissance cellulaire et la signalisation intracellulaire.

Ces jonctions sont composées de protéines appartenant à la famille des **cadhérines**, qui sont des molécules d'adhésion calcium dépendantes. Elles se forment grâce à l'interaction de deux cadhérines de deux cellules adjacentes. La cadhérine 3 (CDH3 ; cadhérine P) et la cadhérine 1 (CDH1 ; cadhérine E) sont exprimées au sein de l'épididyme (Cyr & Robaire, 1991). La cadhérine E est surtout exprimée dans la tête et le corps de l'épididyme où elle est localisée au niveau des cellules principales (Andersson *et al.*, 1994; Cyr *et al.*, 1993). Elle semble être régulée par la testostérone car une orchidectomie bilatérale chez le rat entraîne une diminution de son ARNm. Cette diminution est suivie d'une augmentation dose dépendante après ajout de testostérone chez ces mêmes animaux (Cyr *et al.*, 1992). Enfin, la CDH1 semble diminuer ou être localisée différemment chez des patients atteints d'azoospermie obstructive (Dube *et al.*, 2010). La CDH3 est quant à elle exprimée de façon identique le long de l'épididyme et est majoritaire chez les jeunes animaux de 7 à 14 jours (Cyr & Robaire, 1991).

Les **caténines** sont des protéines cytoplasmiques qui participent également à la formation de la BHE (Cyr *et al.*, 2007). Au sein de l'épididyme les trois isoformes de caténines (α , β et p120) ont été détectées au niveau des membranes plasmiques entre les cellules principales mais aussi entre les cellules principales, étroites et apicales au niveau du segment initial et entre les cellules principales et les cellules claires dans le reste du tubule. La β -caténine se lie à la protéine ZO-1 et participe à la formation des complexes jonctionnels au sein de l'épididyme (DeBellefeuille *et al.*, 2003).

2 LES CELLULES SOUCHES

2.1 Définition

Les CS sont définies en 1990 par le Pr. Potten et son équipe comme « des cellules indifférenciées caractérisées par leur capacité (1) de prolifération, (2) d'auto-renouvellement, (3) de production de plusieurs types de cellules différenciées fonctionnelles, (4) de régénération d'un tissu après un dommage et (5) d'utilisation de ces différentes options de façon alternée » (Potten & Loeffler, 1990).

L'**auto-renouvellement** d'une CS est sa capacité à proliférer indéfiniment tout en conservant un état indifférencié. Les CS peuvent subir plusieurs types de divisions ; des divisions symétriques c'est-à-dire qu'une CS génère deux CS filles identiques à la cellule mère permettant de générer un stock de cellules et des divisions asymétriques où une CS génère une CS et une cellule progénitrice permettant la différenciation cellulaire (Li & Clevers, 2010; Ratajczak *et al.*, 2012).

Selon leur potentiel de **différenciation**, il existe plusieurs types de CS (Alison *et al.*, 2002; Sobhani *et al.*, 2017) (Figure 2.1) :

- Totipotentes, capable d'engendrer un organisme entier, elles se retrouvent uniquement dans l'ovocyte fécondé lors des premières divisions cellulaires ;
- Pluripotentes, capable de se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) mais pas en trophoblaste ; ces cellules sont issues de la masse cellulaire interne du blastocyste ;
- Multipotentes, capable de se différencier en plusieurs types cellulaires spécialisés d'une même lignée ;
- Unipotentes, capable de se différencier en un seul type cellulaire.

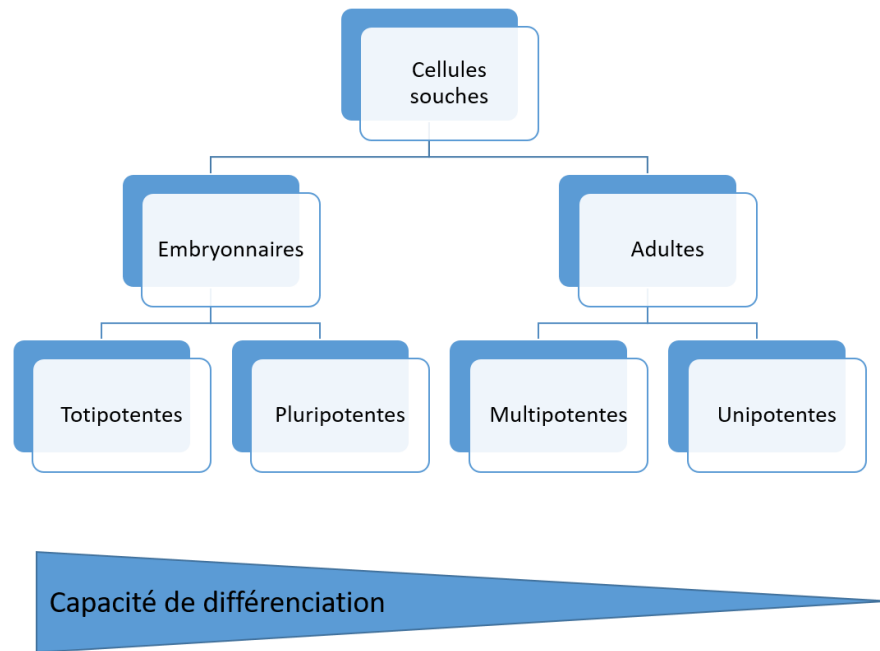


Figure 2.1. Classification des cellules souches selon leur origine et leur capacité de différenciation.

Les cellules souches provenant d'un tissu embryonnaire sont des cellules souches totipotentes et pluripotentes c'est-à-dire qu'elles peuvent engendrer soit un organisme entier soit des cellules des trois feuillets embryonnaires respectivement. Les cellules souches adultes ont des capacités de différenciation limitées et peuvent se différencier en plusieurs ou un seul type cellulaire et sont appelées cellules multipotentes ou unipotentes respectivement. Créée par L. Pinel.

Nous nous intéresserons ici uniquement aux CS uni- et multipotentes. Elles sont aussi couramment appelées CS adultes à l'inverse des CS pluri- et totipotentes qui sont usuellement appelées CS embryonnaires (Figure 2.1). Les CS adultes permettent de remplacer les cellules mortes et de conserver une homéostasie tissulaire grâce à l'auto-renouvellement des cellules composant le tissu. Des CS adultes sont présentes dans des tissus avec un fort taux de renouvellement tels que l'intestin ou la peau mais aussi dans des tissus qui se renouvellent peu tels que le rein ou la prostate (Barker *et al.*, 2012; Barker *et al.*, 2007; Jaks *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015a). Ces cellules sont également primordiales dans les processus de développement, régénération et de défense tissulaire (Sobhani *et al.*, 2017). Elles ne représentent généralement qu'un faible pourcentage des cellules dans un organe (Alison *et al.*, 2002). A titre d'exemple, les CS du rein et de la prostate ne représente que 2 et 5% respectivement des cellules totales du tissu (Romagnani, 2009; Schmelz *et al.*, 2005; Yeung *et al.*, 2012).

Les CS adultes ont également la capacité d'être présentes dans un état de **quiescence** au sein d'un organe (Mohammad *et al.*, 2019). L'état de quiescence correspond à une phase de « dormance » réversible lors de laquelle les cellules ne se divisent pas afin de se protéger des radiations, de produits toxiques ou d'un stress oxydatif tout en conservant la capacité de se diviser lorsque nécessaire. Cet état permet d'avoir un stock constant de CS dans un tissu (Terzi *et al.*, 2016). En effet, les cellules quiescentes restent en phase G1 du cycle cellulaire et ne rentrent pas dans la phase S car le facteur Rb (*retinoblastoma tumor suppressor*), un régulateur négatif de la prolifération cellulaire est hypophosphorylé et donc actif ce qui empêche la formation du complexe CDK2/Cycline E qui favorise la progression du cycle cellulaire (Giacinti & Giordano, 2006). De plus, il a été montré que l'état de quiescence n'est pas uniquement un état passif mais est aussi un phénomène actif lors duquel les cellules expriment des gènes empêchant la différenciation (Coller *et al.*, 2006). Enfin, une étude de 2017 a permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs facteurs de la niche cellulaire dans la quiescence de CS de différents tissus (So & Cheung, 2018). Il est également possible qu'il co-existent des CS actives et des CS quiescentes dans un même organe (Li & Clevers, 2010). Dans l'intestin par exemple, les cellules à la base des cryptes sont actives et assurent le renouvellement de l'épithélium cellulaire en état d'homéostasie alors que les cellules appelées « +4 » sont plus résistantes aux agressions et s'activent pour induire une régénération du tissu (Montgomery *et al.*, 2011; Richmond *et al.*, 2016).

La régulation entre auto-renouvellement, différenciation et quiescence des CS est influencée par des facteurs et des voies de signalisation provenant de la niche des CS.

2.2 La régulation des cellules souches

2.2.1 La niche des cellules souches

Une étude de 1978 sur les CS hématopoïétiques introduit le terme de « niche » pour nommer le **microenvironnement** spécifique et dynamique dans lequel se trouvent les CS (Schofield, 1978). Cette niche est un environnement physique qui permet à la cellule d'obtenir de l'énergie, des nutriments, une protection et une régulation de sa différenciation et de son auto-renouvellement (Figure 2.2).

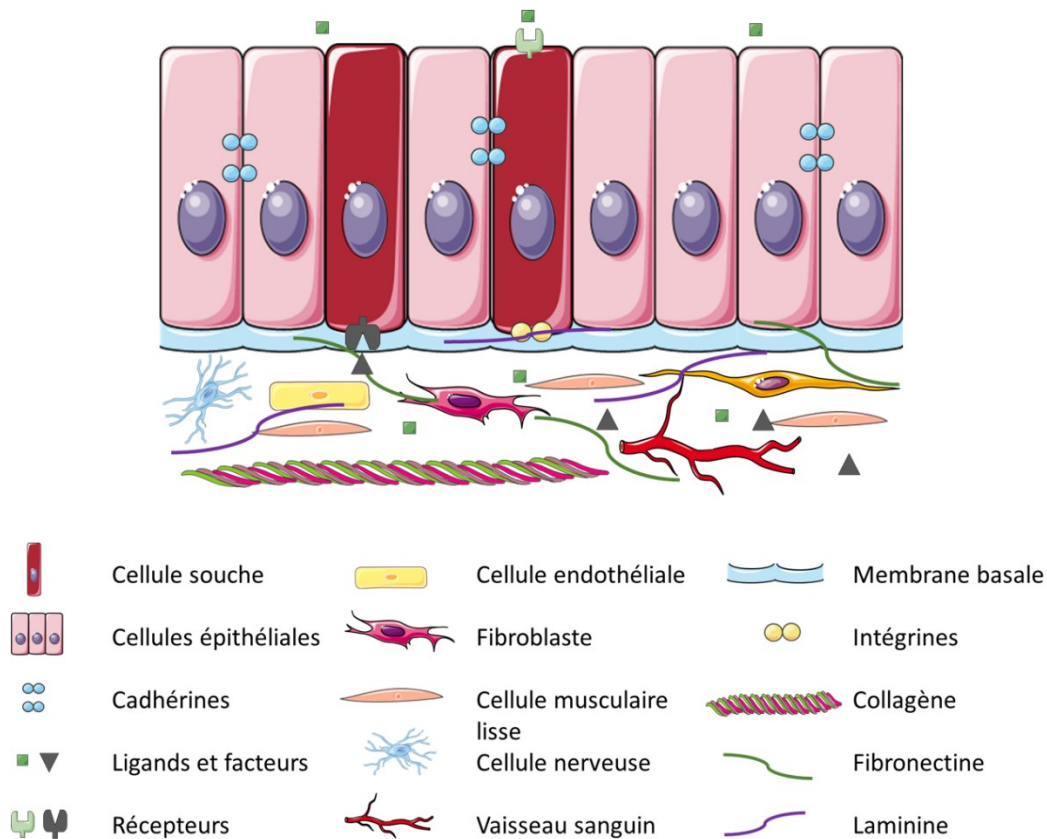


Figure 2.2. Représentation des différents composants de la niche des cellules souches.

La niche des cellules souches est composée d'un environnement cellulaire formé notamment des cellules souches elles-mêmes, des cellules épithéliales, endothéliales, musculaires, fibroblastiques, nerveuses et sanguines. Elle repose sur un support physique qui est la matrice extra-cellulaire composée de la membrane basale, de collagène, d'intégrine, de fibronectine et de laminine. Enfin la communication au sein de cette niche est réalisée par des jonctions cellulaires, des facteurs et des composants de plusieurs voies de signalisation. Créée par L. Pinel

La nature et la localisation de cette niche varient selon le tissu mais elle possède des caractéristiques communes évoquées dans plusieurs revues (Li & Xie, 2005; Singh *et al.*, 2019). Elle est composée :

- d'une structure physique telle qu'une matrice extracellulaire (fibronectine, collagène, laminine, intégrine, etc...) qui permet la structuration et l'organisation de la niche ;
- d'une structure cellulaire (les CS elles-mêmes, les cellules voisines, les fibroblastes, les myofibroblastes, les cellules endothéliales, etc...) ;
- de vaisseaux sanguins permettant la circulation des cellules et facteurs de signalisation ;
- de fibres nerveuses permettant la communication au sein de la niche.

La **communication** au sein de la niche permet le bon fonctionnement des CS. Elle est réalisée par un contact intercellulaire et par contact entre les cellules et la matrice extra-cellulaire.

Le contact entre les cellules est réalisé grâce à la formation de jonctions adhérentes composées de cadhérines. Dans l'estomac, il a été montré que la CDH1 joue un rôle dans l'homéostasie des CS. En effet, l'inactivation *in vivo* du gène codant pour cette cadhérine entraîne une apoptose p53-dépendante des CS et donc une altération de l'homéostasie de l'épithélium chez les souris mutantes (Tang *et al.*, 2019). Dans le système hématopoïétique, une population de CS de réserve est maintenue dans une niche enrichie en cellules stromales exprimant la cadhérine 2 (CDH2 ; cadhérine N). L'inhibition de cette dernière au sein de la niche entraîne une diminution du nombre de CS ainsi qu'une altération de l'homéostasie et de la régénération du système hématopoïétique (Zhao *et al.*, 2019).

Le contact des CS avec la membrane basale composant la matrice extra-cellulaire est quant à lui réalisé en majeure partie via des intégrines. Les intégrines sont une famille de récepteurs d'adhésion cellulaire constitués de protéines transmembranaires dont une extrémité interagit avec des protéines de la matrice extracellulaire (Raymond *et al.*, 2009). L'intégrine $\alpha 6$ (Itga6), appelée également CD49f est une intégrine qui se lie à la laminine et est exprimée dans de nombreuses populations de CS telles que les CS de la prostate, de la trachée, de la glande mammaire et de l'urothelium (Garraway *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2011; Krebsbach & Villa-Diaz, 2017; Santos *et al.*, 2019; Stingl *et al.*, 2006). Il a été mis en évidence que l'Itga6 participe à l'auto-renouvellement des CS du muscle squelettique alors que l'intégrine $\beta 1$ est essentielle à l'auto-renouvellement des CS de la glande mammaire (Olabi *et al.*, 2018; Rayagiri *et al.*, 2018).

De nombreux **facteurs de signalisation** sont également présents au sein de cette niche. Ceux-ci varient selon l'organe mais l'on peut par exemple citer des cytokines, des facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), des TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et des biomolécules telles que l'acide rétinoïque, l'activine A, l'oxide nitrique (Redondo *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019). Une étude de 2014 a par exemple démontré que l'interleukine 6, majoritairement sécrétée par les cellules du stroma lors de la régénération favorise la différenciation des CS en cellules ciliées au dépend des cellules sécrétrices dans l'épithélium respiratoire (Tadokoro *et al.*,

2014). Dans la prostate, il a été montré que le récepteur de type 2 au FGF est exprimé par les cellules basales de l'épithélium qui sont une population de CS dans cet organe. Une inhibition de ce récepteur entraîne une différenciation des cellules basales en cellules luminales et ainsi une altération du développement postnatal de la prostate (Huang *et al.*, 2015).

Au sein de cette niche, c'est la communication cellulaire, les facteurs de signalisation et différents stimuli qui déterminent, via différentes voies de signalisation, le devenir de la CS, c'est-à-dire si elle reste quiescente, s'auto-renouvelle ou se différencie.

2.2.2 Les voies de signalisation

La régulation des CS fait intervenir principalement la β -caténine qui permet l'activation de gènes cibles régulant la prolifération et la différenciation de ces cellules. Les voies de signalisation Wnt (*Wingless-Int*) et BMP (*Bone morphogenetic protein*) sont les voies de signalisation principales qui participent à la régulation des CS adultes suivies par les voies de signalisation TGF- β et Notch.

La **voie de signalisation Wnt** (de *wingless* et *integration site*) joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques tels que l'embryogenèse, la morphogenèse et la programmation cellulaire. Les ligands de cette voie sont les protéines Wnt, une famille de 19 glycoprotéines sécrétées et riches en résidus cystéine alors que les récepteurs sont des protéines de la famille Frizzled (Fzd) composées de sept domaines transmembranaires et un domaine N-terminal extracellulaire (MacDonald & He, 2012). Une protéine Wnt peut se lier à différents récepteurs Fzd et vice-versa et cette liaison entraîne la formation d'un complexe comprenant le ligand, le récepteur ainsi qu'un corécepteur LRP5/6 (*lipoprotein receptor-related protein*) (Clevers, 2006; de Lau *et al.*, 2014). L'activation de la voie de signalisation entraîne une accumulation nucléaire de la β -caténine qui se lie à des facteurs cellulaires TCF (*T cell factor*) afin d'entraîner l'activation de gènes cibles. Lorsque la voie est inactive, la β -caténine est phosphorylée par un complexe composé d'axine, de GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*), de CK1 α (Casein Kinase 1) et de l'APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) puis ubiquitinée par β -Tcrp (*β -transducin repeats-containing proteins*) et dégradée par le protéasome (Figure 2.3). Lors de l'activation de la voie, l'axine se lie aux corécepteurs LRP5/6 entraînant une désintégration du complexe empêchant la dégradation de la β -caténine et entraînant son accumulation nucléaire. (Kretzschmar & Clevers, 2017; MacDonald *et al.*, 2009). Cette voie précédemment décrite est appelée la voie canonique

ou β -caténine alors qu'il existe deux autres voies moins étudiées ; une voie indépendante de la β -caténine appelée voie non canonique et une voie appelée Wnt/ Ca^{2+} .

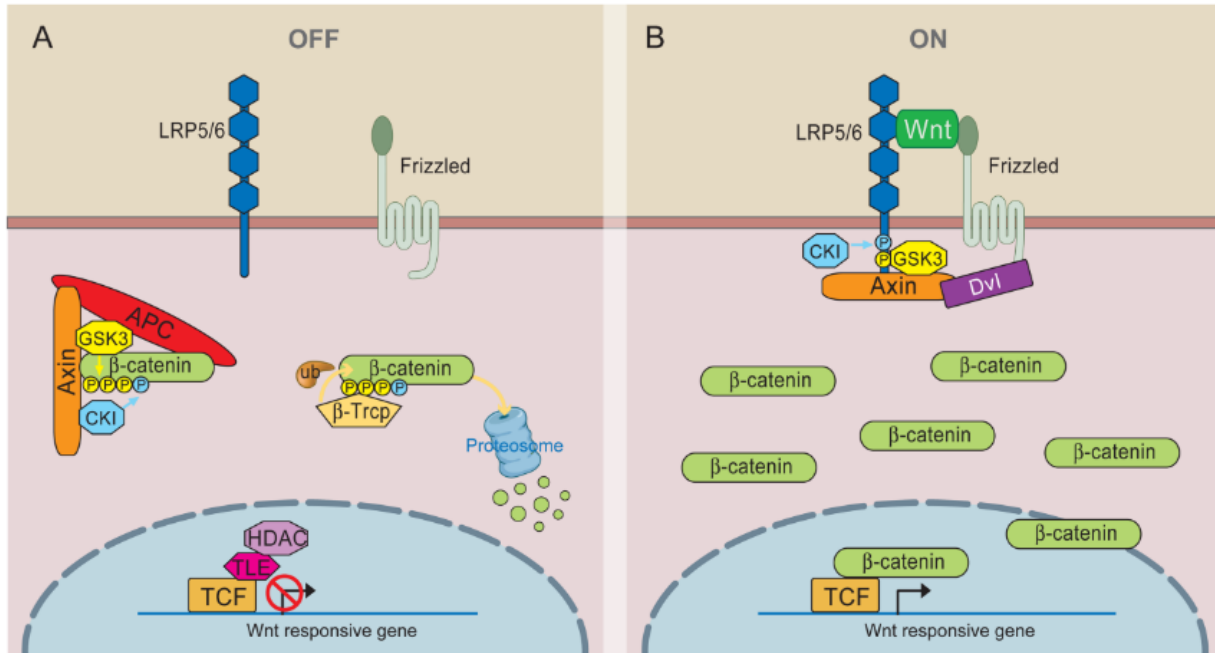


Figure 2.3. Représentation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

L'inactivation de la voie de signalisation Wnt entraîne une dégradation de la β -caténine grâce à un complexe formé de l'APC. L'activation de cette voie permet au contraire l'accumulation de β -caténine dans le noyau et sa fixation à des facteurs TCF afin d'activer les gènes cibles. Tirée de MacDonald *et al.* (2009). Autorisé par Elsevier, licence 5274940026963.

Dans de nombreux tissus l'activation de la voie Wnt semble favoriser la prolifération et l'auto-renouvellement des CS adultes plutôt que leur différenciation, cependant certaines études démontrent que cette voie peut aussi être impliquée dans les processus de différenciation. Un modèle dans lequel l'effet de la β -caténine dépend de son association avec des co-activateurs a été plus récemment proposé. Dans ce modèle l'association de la β -caténine avec le co-activateur CBP (*CREB-binding protein*) entraîne la prolifération cellulaire et inhibe la différenciation cellulaire alors que son association avec p300 permet d'initier la différenciation (Ring *et al.*, 2014). La voie de signalisation Wnt peut donc réguler la balance entre auto-renouvellement et différenciation des CS en fonction du contexte cellulaire et environnemental et non du tissu (Kahn, 2018).

La **voie de signalisation TGF- β** (*Transforming Growth Factor β*) joue un rôle important dans la préservation de l'homéostasie tissulaire. Elle peut être divisée en 2 voies, la voie TGF- β et la voie BMP (Figure 2.4).

Les ligands de la voie TGF- β sont les cytokines telles que les TGF- β 1, 2 et 3, les activines, les inhibines, les GDF (*Growth Differentiation Factors*), les myostatines et les protéines nommées nodal et lefty. Ces cytokines se fixent à des récepteurs de type II qui induisent la phosphorylation des récepteurs de type I. Cette liaison induit ensuite l'activation par phosphorylation des protéines Smad 2 et 3 qui recrutent Smad 4 et se rendent au noyau afin de réguler l'expression des gènes.

De nombreuses études ont démontré que l'activation de cette voie TGF- β au sein des cellules épithéliales entraîne un arrêt du cycle cellulaire et donc un arrêt de prolifération et de croissance cellulaire alors qu'à l'opposé l'inhibition de cette voie permet la promotion du cycle cellulaire (Mou *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017b). Cependant dans certains autres types cellulaires, l'activation de la voie TGF- β permet la prolifération cellulaire comme dans les fibroblastes de rein où TGF- β induit l'expression de FGF-2 entraînant la prolifération des CS (Strutz *et al.*, 2001).

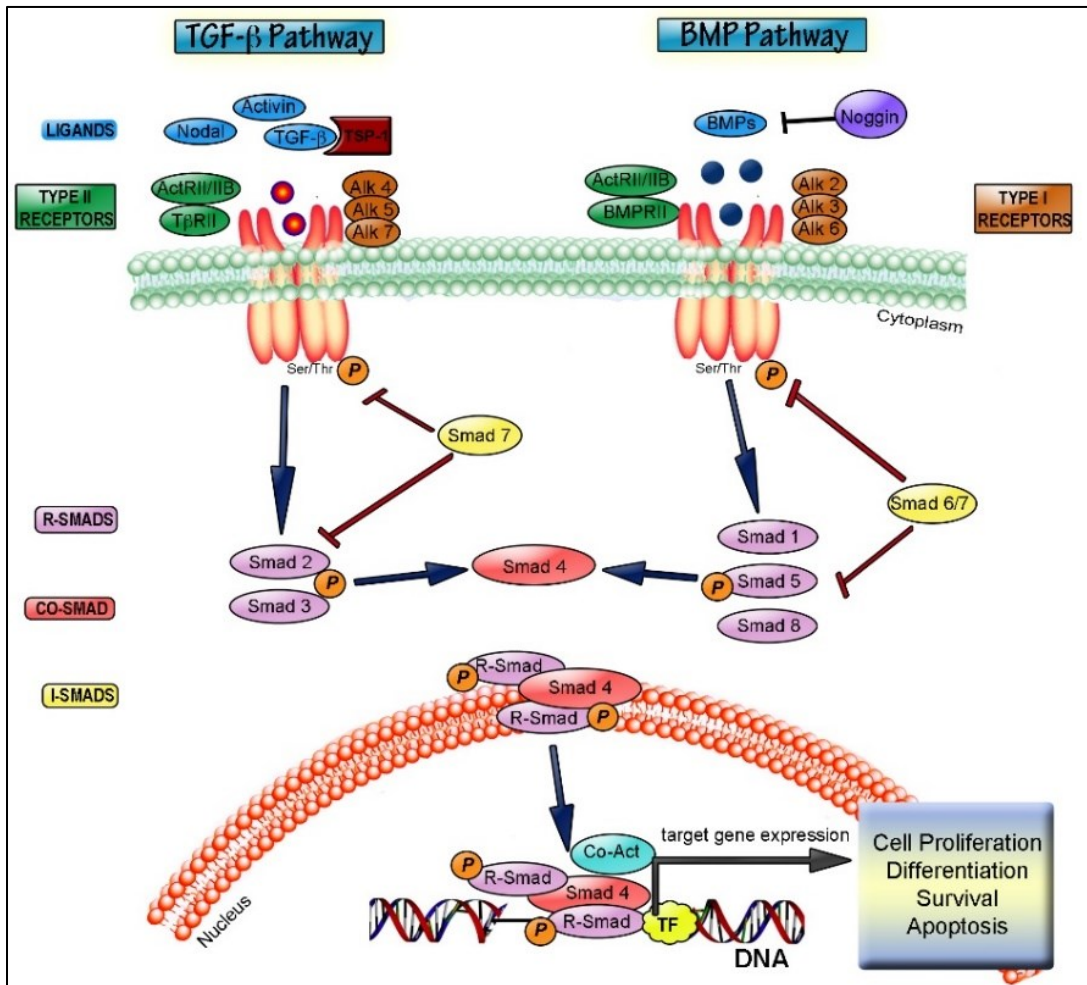


Figure 2.4. Représentation des voies de signalisations TGF- β et BMP.

Les cytokines de la voie TGF- β peuvent être divisées en 2 groupes ; celles de la voie TGF- β comprenant principalement les ligands TGF- β , activines et nodal et ceux de la voie BMP. Les ligands se fixent sur différents récepteurs de type I et II permettant la phosphorylation de différents Smad aboutissant au recrutement de Smad 4 et à son passage dans le noyau afin d'activer l'expression de gènes. Tirée de Villapol (2013). Autorisé par la Licence Creative Commons Attribution 3.0.

La **voie de signalisation BMP** (*Bone Morphogenetic Proteins*) est composée de protéines de la famille des TGF- β . Les ligands de cette voie sont les protéines BMP, les GDH et l'AMH (*Anti-Müllerian Hormone*). De la même façon que pour la voie TFG- β , la fixation des ligands aux récepteurs de type I et II entraîne une cascade de phosphorylation des protéines Smad 1, 5 et 8 qui recrutent ensuite Smad 4, atteignent le noyau et régulent l'expression de gènes cibles.

Une étude de 2016 a montré que l'inhibition des voies TGF- β et BMP favorisait l'expansion des cellules de divers épithéliums tels que celui de la trachée, de la peau et de la glande mammaire (Mou *et al.*, 2016).

La **voie de signalisation Notch** intervient dans la communication cellulaire juxtacrine mais aussi dans la régulation des CS où elle a un rôle dans la différenciation et le « devenir cellulaire ». Chez les mammifères cette voie est composée de 4 récepteurs Notch 1 à 4 et de 5 ligands (Delta-like 1, 3, 4 et Jagged 1 et 2). La fixation d'un ligand à un récepteur entraîne le clivage de la partie intracellulaire de ce dernier. La forme clivée du récepteur migre au noyau et s'intègre à un complexe transcriptionnel afin d'induire l'expression des gènes cibles (Mayeuf & Relaix, 2011) (Figure 2.5).

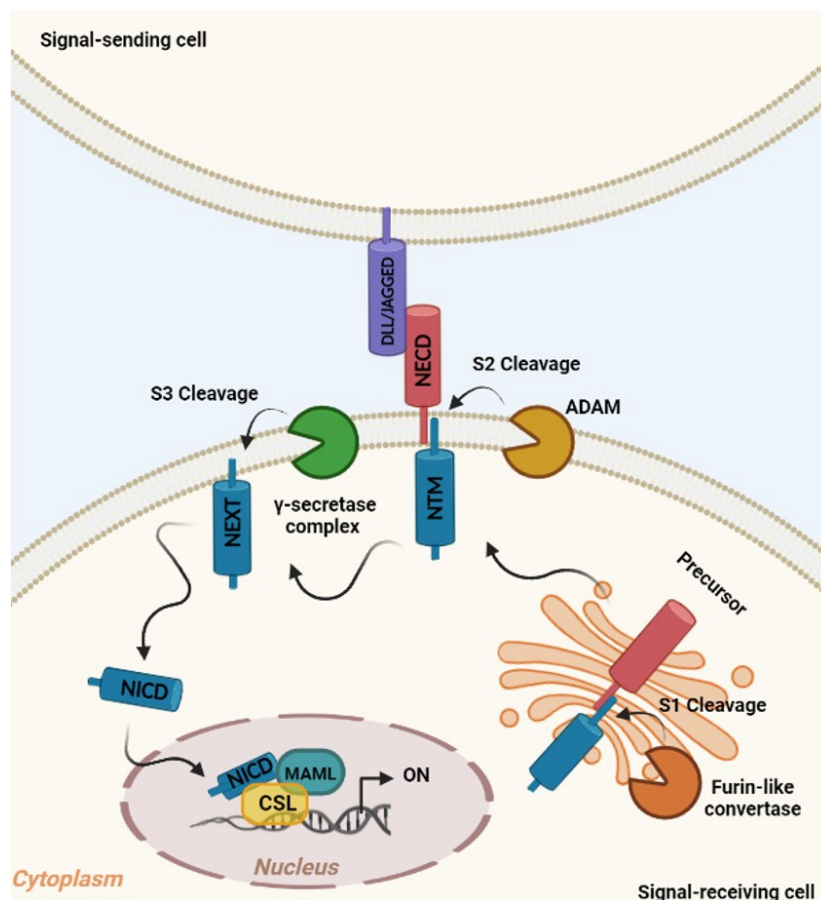


Figure 2.5. Représentation de la voie de signalisation Notch.

L'activation de la voie de signalisation a lieu par contact entre le ligand d'une cellule et le récepteur d'une cellule voisine ce qui entraîne le clivage du récepteur qui migre au noyau afin de moduler l'expression de gènes. Tirée de Giulu *et al.* (2021). Autorisé par la licence internationale Creative Commons Attribution 4.0.

L'activation de cette voie permet l'auto-renouvellement des CS hématopoïétiques, neuronales et musculaires lisses alors qu'à l'inverse elle induit la différenciation des CS de la peau et de la glande mammaire (Ali *et al.*, 2017; Androutsellis-Theotokis *et al.*, 2006; Bouras *et al.*, 2008; Conboy *et al.*, 2003; Duncan *et al.*, 2005; Yalcin-Ozuysal *et al.*, 2010). L'effet de la voie Notch sur les CS adultes est donc dépendant du tissu mais semble aussi dépendre du contexte (Koch *et al.*, 2013; Siebel & Lendahl, 2017).

2.3 Méthode d'identification des cellules souches adultes

L'identification des CS adultes au sein d'un organe peut être complexe car celles-ci ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules formant le tissu. Les méthodes de détection ont évolué depuis plusieurs années et de nouveaux outils sont désormais disponibles afin d'identifier et caractériser ces cellules (Morrison & Spradling, 2008).

2.3.1 Etude de la prolifération et transplantation cellulaire

Les premières méthodes à avoir été utilisées pour identifier les CS se basent sur le principe que les CS en état de quiescence se divisent moins fréquemment que les autres types cellulaires présents dans un tissu. Afin d'identifier ces cellules, des analogues de nucléotides (bromodésoxyuridine (BrdU) ou thymidine marquée) sont injectés dans le tissu afin que ceux-ci s'insèrent dans l'ADN des cellules en phase de réplication (Phase S du cycle cellulaire). Les animaux sont ensuite euthanasiés après différents temps. Les cellules qui se divisent fréquemment perdent le marquage rapidement alors que les CS en quiescence le conservent. Cette technique a par exemple permis d'identifier des populations de CS dans l'intestin et le follicule pileux (Cairnie *et al.*, 1965; Rodriguez & Nguyen, 2018). Cependant les CS qui ne sont pas en état de quiescence ne sont donc pas identifiables par cette technique.

Des expériences de transplantation de CS sont également utilisées pour les identifier. En effet, les CS de la glande mammaire sont capables de générer différents types cellulaires différenciés lorsqu'elles sont injectées dans une glande dénuée de cellules (Smith & Medina, 1988). De même, les CS de la trachée peuvent se différencier et régénérer un épithélium si elles sont injectées dans une trachée démunie d'épithélium (Randell *et al.*, 1991). Ces techniques nécessitent cependant la possibilité d'obtenir un tissu dénué d'épithélium avant de réaliser la transplantation permettant de conserver une partie de la niche cellulaire. Alternativement une transplantation des CS sous la peau ou dans la capsule rénale peut également être réalisée.

2.3.2 Traçage de lignée

L'utilisation de souris transgéniques combinée à l'utilisation des systèmes d'expression conditionnelle ont permis d'améliorer la compréhension de la régulation des CS adultes. Le système Cre-lox est un des systèmes les plus utilisés pour le traçage de lignée des CS (Fan *et al.*, 2019). De plus, l'utilisation d'une recombinaise Cre inducible dans ce système permet de débiter le traçage à un temps précis et donc par exemple de le débiter à l'âge adulte afin d'étudier spécifiquement les CS adultes (Blanpain & Simons, 2013).

Dans ce système représenté en figure 2.6, des souris expriment une Cre recombinaise inducible couplée à un récepteur aux œstrogènes muté qui lie spécifiquement le tamoxifène et non son ligand naturel. Cette Cre-recombinaise est exprimée dans un seul type cellulaire grâce à l'utilisation de promoteurs spécifiques. Ces souris sont croisées avec des souris exprimant un gène rapporteur dans le locus ROSA26. Les gènes rapporteurs les plus souvent utilisés sont ceux codant pour une protéine fluorescente ou colorimétrique. L'administration de tamoxifène aux souris résultantes entraîne l'activation de la Cre-recombinaise uniquement dans le type cellulaire d'intérêt, ce qui entraîne l'expression du gène rapporteur de façon permanente dans les cellules positives mais aussi dans leur descendance (Fan *et al.*, 2019).

Cette méthode permet donc de cibler spécifiquement un type cellulaire et de tracer cette cellule *in vivo* ou *in vitro* ainsi que sa descendance cellulaire dans un organisme vivant en utilisant un gène rapporteur sans perturber les fonctions physiologiques des cellules (Kretschmar & Watt, 2012). Ce système a notamment été utilisé dans l'étude des CS de l'intestin, de l'estomac, du rein, de la glande mammaire, des glandes utérines et du testicule (Barker *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 2012; Barker *et al.*, 2007; de Visser *et al.*, 2012; Nakagawa *et al.*, 2007; Seishima *et al.*, 2019). L'utilisation de ce système nécessite cependant de connaître un marqueur spécifique à la population de CS étudiée pour en utiliser le promoteur.

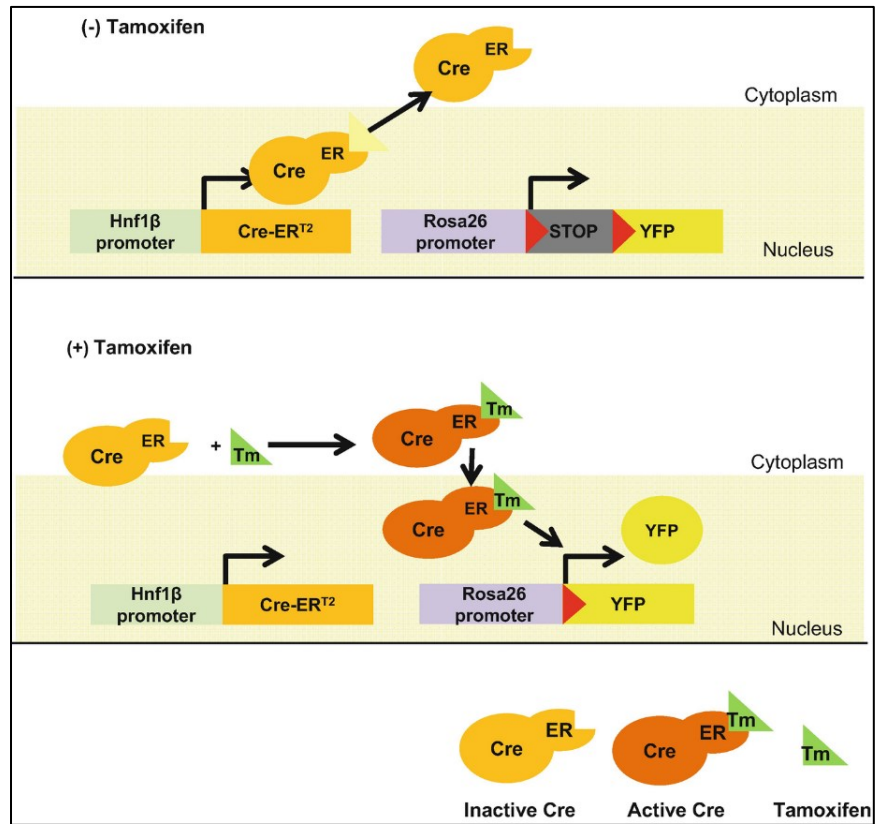


Figure 2.6. Représentation du système d'expression conditionnelle Cre-lox.

Les souris expérimentales issues du système d'expression Cre-lox expriment une Cre-recombinase couplée à un récepteur aux œstrogènes (ER) dans des cellules exprimant un promoteur particulier. En absence de tamoxifène, la Cre-recombinase est inactive et ne peut pas se rendre au noyau. A l'inverse, une injection de tamoxifène entraîne l'activation de la Cre recombinase via le récepteur aux œstrogènes ce qui permet à la Cre recombinase de se rendre au noyau et de permettre l'expression d'un gène codant pour une protéine rapporteur telle que la protéine YFP. Cette protéine sera exprimée de façon permanente dans les cellules et leur descendance. Tirée de Rubio-Tomás *et al.* (2019). Autorisé par Springer Nature, licence 5272131185912.

2.3.3 Marqueurs de cellules souches

L'utilisation de la combinaison de plusieurs antigènes afin d'identifier les populations de CS adultes est une des raisons de la difficulté à reconnaître ces cellules. En effet, jusqu'à très récemment, aucun marqueur spécifique des CS n'était identifié. Par exemple, les CS de la prostate étaient désignées comme les cellules $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{CD133}^+ \text{CD44}^+ \text{CD117}^+$ et celles de la glande mammaire comme les cellules $\text{Lin}^- \text{CD29}^{\text{high}} \text{CD24}^+$ (Leong *et al.*, 2008; Shackleton *et al.*, 2006).

Une étude de 2007 a cependant démontré qu'un gène codant pour un co-récepteur couplé à une protéine G de la voie de signalisation Wnt identifie spécifiquement une des deux populations de CS de l'intestin (Barker *et al.*, 2007). Ce gène nommé *Lgr5* (*Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*) et ses homologues *Lgr4* et *Lgr6* codent pour des récepteurs aux facteurs de croissance R-spondin 1, 2, 3 et 4 et permettent de potentialiser la voie de signalisation Wnt/ β caténine en stabilisant le complexe Wnt/Fzd (Carmon *et al.*, 2012; de Lau *et al.*, 2011; de Lau *et al.*, 2014) (Figure 2.7). Une étude récente propose cependant quelques différences mécanistiques aboutissant cependant à la même action (Park *et al.*, 2020).

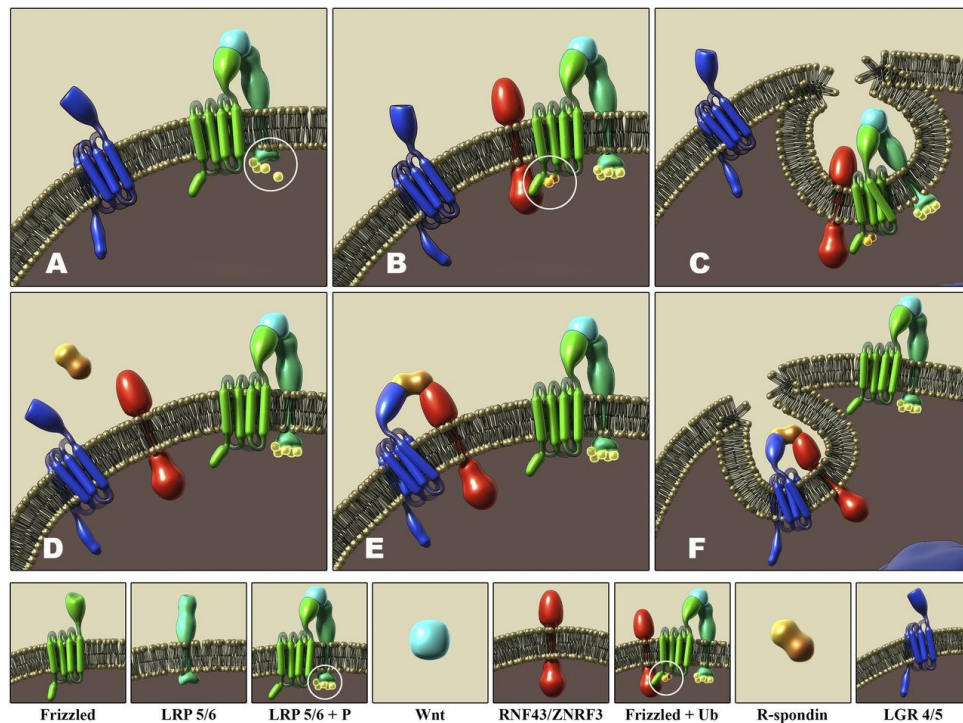


Figure 2.7. Rôle de Lgr5 au sein du complexe Wnt/Frizzled.

(A) L'association de ligand Wnt au complexe Fzd/LRP entraîne l'activation de gènes cibles codant notamment pour les protéines Lgr5 et les ligases transmembranaires Rnf43 et Znf3. (B) L'interaction enzymatique entre Rnf43/Znf3 et le complexe Fzd/LRP entraîne une polyubiquitination des loupes intracellulaires d'un domaine de Fzd entraînant une endocytose du complexe Fzd/LRP abolissant la voie de signalisation Wnt (C). (D-E) La présence de R-spondin entraîne le recrutement du récepteur Lgr5 ainsi que du complexe Rnf43/Znf3 permettant ainsi la persistance du complexe Wnt/Fzd/Lrp à la membrane et donc la potentialisation de la voie Wnt (F). Tirée de de Lau *et al.*, (2014). Autorisé par la licence internationale Creative Commons Attribution non-commerciale 4.0.

Dans l'intestin, LGR5 est exprimée dans un nombre limité de cellules colonnaires à la base des cryptes. Ces cellules sont positives pour le marqueur de prolifération Ki67 et peuvent s'auto-

renouveler à long terme majoritairement via des divisions asymétriques. Elles peuvent également se différencier en autres types cellulaires spécifiques à l'intestin (Barker *et al.*, 2007; Basak *et al.*, 2017; Snippert *et al.*, 2010). Il a été montré plus tard que les cellules de Paneth, présentent entre les cellules LGR5⁺ composent la niche de ces cellules en sécrétant des facteurs tels que l'EGF, le TGF α ou le ligand Wnt3 (Sato *et al.*, 2011).

En plus de l'intestin, LGR5 est également spécifiquement exprimée par les CS adultes de l'estomac, du colon, du foie, du rein, du follicule pileux, de la prostate, de l'utérus, de l'endomètre, de la glande mammaire et des glandes utérines (Barker *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 2012; Cervelló *et al.*, 2017; de Visser *et al.*, 2012; Huch *et al.*, 2013; Jaks *et al.*, 2008; Seishima *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015a; Yui *et al.*, 2012). LGR5 est ainsi désormais reconnue comme un marqueur de CS adultes (Barker & Clevers, 2010; Leung *et al.*, 2018).

Au sein de l'épithélium de prostate adulte, LGR5 est exprimée dans une population spécifique de cellules basales et lumbales. Ces cellules LGR5⁺ sont résistantes à la castration et des études de suivi de lignée ont démontré qu'elles sont essentielles à la régénération du tissu. Elles sont dites multipotentes car elles sont capables de régénérer différents types cellulaires de la prostate après transplantation dans la capsule rénale de souris immunodéprimées (Wang *et al.*, 2015a). Dans le foie adulte, la protéine LGR5 n'est pas détectée en état d'homéostasie tissulaire alors qu'elle est détectable dans une population restreinte de cellules lors d'une altération tissulaire. Des analyses de traçage de lignée de ces cellules LGR5⁺ après altération ont démontré que ces cellules étaient capables de générer des hépatocytes ainsi que le canal biliaire (Huch *et al.*, 2013). Dans le rein, LGR5 est exprimée dès le jour embryonnaire 14 chez la souris alors que son expression est interrompue à partir du jour post-natal 7 et qu'elle n'est donc pas détectée chez l'adulte. Des analyses de traçage de lignée ont permis de montrer que les cellules LGR5⁺ présentes la première semaine après la naissance contribue à la formation de la structure rénale observée 13 mois plus tard (Barker *et al.*, 2012). Il a été montré plus tard que la présence de Rspodin1 et Rspodin3 est essentielle au maintien de cette population de cellules (Vidal *et al.*, 2020).

LGR5 est également exprimée par les cellules souches de différents organes de l'appareil reproducteur féminin (Chang *et al.*, 2020). LGR5 est fortement exprimée dans l'épithélium d'utérus

de souris embryonnaires et immatures alors que son expression diminue lorsque les souris commencent leur cycle œstral. Les cellules LGR5⁺ présentes à l'âge embryonnaire contribuent au développement de l'épithélium de l'oviducte, de l'utérus et du vagin supérieur alors que les cellules LGR5⁺ présentes à l'âge adulte semblent peu s'auto-renouveler et donc peu contribuer à l'homéostasie tissulaire (Seishima *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2009). Au sein de l'endomètre la présence de cellules LGR5 a été observée. Celles-ci représentent environ 1% des cellules totales de l'épithélium et sont également présentes dans le stroma, cependant leur capacité de reconstruction après transplantation est faible et celles-ci sont encore peu caractérisées (Cervelló *et al.*, 2017; de Miguel-Gómez *et al.*, 2021; Gil-Sanchis *et al.*, 2013; Tempest *et al.*, 2018). Enfin, LGR5 est également exprimée dans une sous population de cellules basales au sein de la glande mammaire adulte (de Visser *et al.*, 2012). Ces cellules, lorsque transplantées dans une glande mammaire dénuée d'épithélium sont capables de régénérer un épithélium composé des différents types cellulaires de la glande mammaire ainsi que d'exprimer une protéine du lait appelée la caséine β (Plaks *et al.*, 2013).

Plusieurs mécanismes et voies de signalisation sont connues pour réguler la prolifération et la différenciation des cellules LGR5⁺. Dans l'intestin, une inhibition des récepteurs à l'EGF ainsi qu'une inhibition de la voie de signalisation MAPK entraîne une diminution de la prolifération des cellules LGR5⁺ et induit leur quiescence (Basak *et al.*, 2017; Riehl *et al.*, 2020). Les prostaglandines E2, sécrétées par les macrophages semblent ainsi capables de se fixer aux récepteurs à l'EGF présents sur les cellules LGR5⁺ afin de réguler leur prolifération (Riehl *et al.*, 2020). La voie de signalisation Hippo est également impliquée dans la régulation des cellules LGR5⁺ de l'intestin. Une étude de 2015 a démontré que Yap, un des effecteurs de la voie Hippo est essentiel à la régénération de l'épithélium intestinal après radiation et que ce mécanisme fait également intervenir la voie de signalisation EGF (Gregorieff *et al.*, 2015). Dans l'épithélium olfactif, il a été montré que la régulation des cellules souches basales LGR5⁺ est quant à elle régulée par la voie de signalisation Notch alors qu'une inhibition de cette voie favorise une différenciation des cellules LGR5⁺ en cellules neuronales (Dai *et al.*, 2018).

Des protéines d'adhésion et de jonctions cellulaires participent également à réguler l'expression de LGR5. Dans l'estomac, une inhibition de la protéine d'adhésion E-Cadhérine dans les cellules LGR5⁺ entraîne une apoptose de ces cellules induisant une altération de l'homéostasie tissulaire (Tang *et al.*, 2019). Enfin, plusieurs études ont également mis en avant le rôle de

certaines hormones sur la prolifération et la différenciation de ces cellules (Sun *et al.*, 2009). L'analyse de tissu endométrial provenant de femmes sans traitement hormonal, sous traitement hormonal oral ou local ont permis de montrer que les niveaux d'ARNm de LGR5 sont diminués lors d'un traitement à la progestérone. Il a de plus été confirmé que le promoteur du gène LGR5 possède un site de fixation du récepteur à la progestérone (Tempest *et al.*, 2018). En ce qui concerne la régulation de son expression par les androgènes, peu d'étude existe. Une étude sur les cellules LGR5⁺ de la prostate permet cependant de montrer qu'il existe dans cet organe de rares cellules LGR5⁺ résistantes à la castration participant à la régénération de l'épithélium (Wang *et al.*, 2015a)

2.3.4 Organoïdes

La définition du terme organoïde a évolué dans le temps. Le terme a été rapporté à partir de 1946 et était utilisé en oncologie avant que celui-ci soit utilisé à partir des années 1960 en biologie du développement pour décrire des structures lors d'expériences de dissociation et réagrégation cellulaire (Clevers, 2016; Lancaster & Knoblich, 2014). Ces expériences consistaient à mettre en culture en 2D ou en 3D des cellules différenciées et à observer la façon dont celles-ci se regroupaient afin de reconstituer la morphologie d'un tissu ; le terme organoïde était ainsi utilisé pour décrire « une structure qui ressemble à un organe » (Lancaster & Knoblich, 2014). La compréhension des mécanismes de régulation de l'auto-renouvellement et de la différenciation des CS a ensuite permis la création de modèle d'organoïdes répondant à la définition actuelle à partir de ces cellules. Depuis les années 2010, de nombreux articles et revues scientifiques ont ainsi précisé l'importance de donner une nouvelle définition précise au terme « Organoïde » (Clevers, 2016; Huch & Koo, 2015; Kretschmar & Clevers, 2016; Lancaster & Knoblich, 2014). Ce terme définit désormais des structures en 3 dimensions (3D) provenant d'une unique CS qui s'auto-renouvelle et se différencie afin de former une structure composée de différents types cellulaires. Cette structure reproduit l'organisation morphologique et certaines fonctions de l'organe de façon spontanée (Figure 2.8).

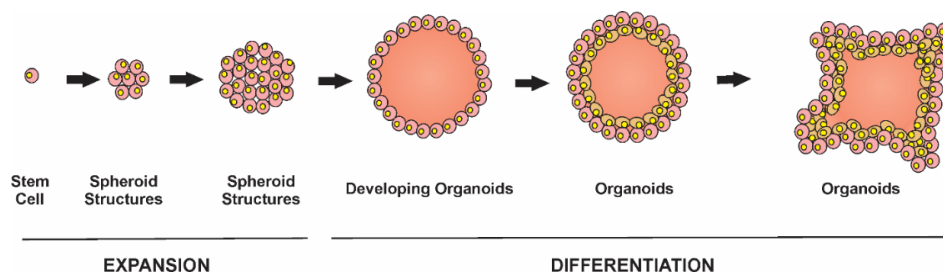


Figure 2.8. Représentation de la formation d'organoïde à partir d'une cellule souche.

La formation d'un organoïde débute par la prolifération d'une cellule souche permettant de former des structures en sphéroïdes composé d'un type cellulaire. Ces cellules sont ensuite capables de se différencier en un ou plusieurs autres types cellulaires et de s'organiser de façon à reproduire la morphologie de l'organe d'origine. Les organoïdes formés peuvent également reproduire certaines fonctions des organes dont sont issus les cellules souches. Tirée de Pinel *et al.* (2019). Autorisé par John Wiley and Sons, licence 5272130337983.

Certaines études continuent cependant d'utiliser ce terme pour nommer des cultures en 3D de cellules déjà différenciées ou de lignées cellulaires entraînant parfois une confusion dans la littérature. Dans ce manuscrit le terme « organoïde » sera utilisé lorsque celui-ci répond à la définition la plus récente évoquée plus haut. Une recherche du terme « Organoids » sur Pubmed permet d'observer une évolution du nombre de citations pour ce terme en corrélation avec une évolution de sa définition. Depuis les années 2010, une augmentation importante du nombre de citations est observée (Figure 2.9).

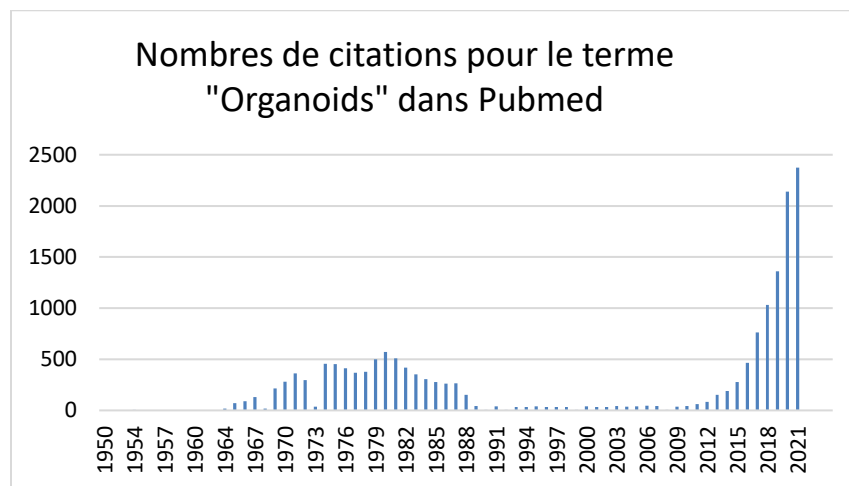


Figure 2.9. Nombre de citations pour le terme « Organoids » dans Pubmed en fonction du temps.

Le terme « organoids » a été rapporté pour la première fois en 1946 où il désigne des tératomes en oncologie. A partir des années 1960 ce terme est utilisé pour décrire des structures ressemblant à un organe après des expériences de réagrégation de cellules différenciées. Depuis 2009, ce terme est désormais utilisé pour décrire des structures en 3D provenant d'une unique CS et est associé à une forte augmentation du nombre de citations dans Pubmed. Créé par L. Pinel.

En pratique, la culture de ces organoïdes est réalisée en 3D à l'aide d'hydrogel reproduisant la composition d'une matrice extracellulaire et de milieu de culture optimisé pour chaque tissu afin de favoriser l'auto-renouvellement et/ou la différenciation des CS. Un des

premiers modèles d'organoïde décrit dans la littérature est un modèle intestinal développé à partir de cellules LGR5⁺ (Sato *et al.*, 2009). Dans ce modèle, les cellules LGR5⁺ sont cultivées en 3D dans une matrice riche en laminine appelée Matrigel[®] et dans un milieu composé d'EGF, d'activateur de la voie Wnt (R-spondin 1) et d'inhibiteur de la voie BMP (Noggin). Les composants de ce milieu sont désormais utilisés dans de nombreux milieux de culture d'organoïdes et forment un milieu appelé « milieu générique des organoïdes » (Boretto *et al.*, 2017). La culture de ces cellules dans ce milieu, qui a pour but de reproduire la niche des CS a permis la formation d'organoïdes composés d'une lumière entourée d'un épithélium formé de 4 types de cellules intestinales (Sato *et al.*, 2009). Depuis des organoïdes ont été développés à partir de nombreuses CS adultes tels que des cellules de foie, pancréas, estomac, poumons, glande mammaire, trompes de Fallope et prostate (Figure 2.10) (Kretschmar & Clevers, 2016).

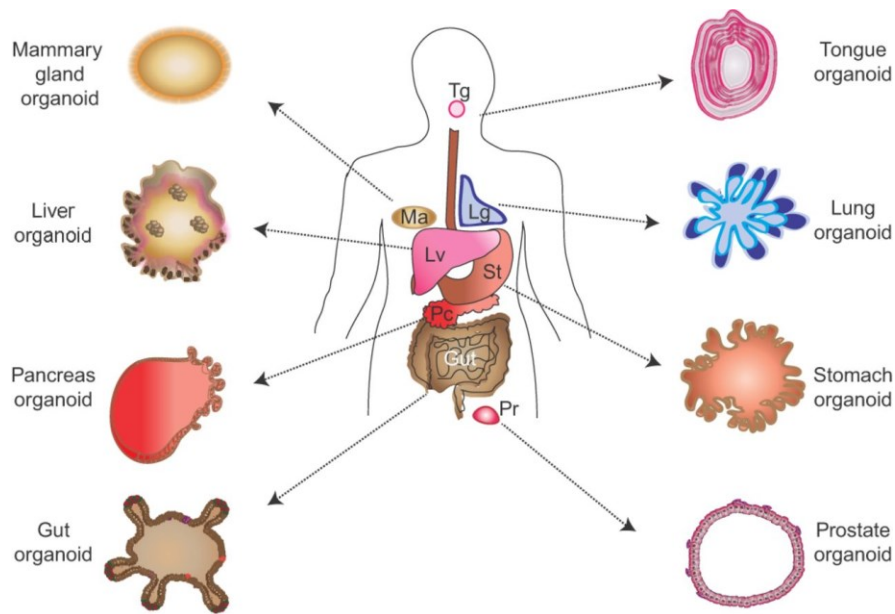


Figure 2.10. Représentation des différents organoïdes obtenus à partir de cellules souches adultes.

Des organoïdes ont été obtenu après culture en 3D de cellules souches adultes de langue, glande mammaire, foie, pancreas, intestin, poumon, estomac et prostate. Ces organoïdes présentent des morphologies différentes selon l'organe. Tirée de Huch and Koo (2015). Autorisé par Copyright Clearance Center, licence 1201346-1.

L'objectif et le plus grand avantage des organoïdes est leur capacité à reproduire la morphologie et certaines fonctions de l'organe dont sont issues les CS. Ceci permet d'obtenir un modèle pour étudier l'organe d'intérêt mais le processus permettant le passage d'une unique CS à un organoïde composé de plusieurs types cellulaires différenciés permet également l'étude du développement et de la différenciation de cet organe (Huch *et al.*, 2017). Afin d'évaluer les similitudes entre l'organe et l'organoïde plusieurs techniques peuvent être réalisées telles que l'utilisation de marqueurs de différents types cellulaires, la reconstitution en 3D ou 4D de la morphologie des organoïdes, l'évaluation de l'expression des gènes ainsi que la détection de protéines importantes dans la fonction de l'organe (Lehmann *et al.*, 2019). Des organoïdes murin de thyroïde sont ainsi capables de sécréter des hormones thyroïdiennes alors que des organoïdes murin de glande mammaire sont capables de sécréter du lait (Saito *et al.*, 2018; Sumbal *et al.*, 2020). Une étude de 2015 réalisant un séquençage de cellules uniques sur des organoïdes murin d'intestin a également permis la découverte de deux types cellulaires jamais détectés auparavant (Grün *et al.*, 2015).

Les organoïdes sont donc considérés comme un nouveau modèle d'étude qui s'ajoute à la culture en 2D, la culture en 3D, la culture organotypique ainsi que les modèles animaux. Le tableau ci-dessous permet de comparer une liste non exhaustive d'avantages et d'inconvénients de ces différents modèles.

Tableau 2. Comparaison des avantages et inconvénients des différents modèles d'étude biologique.

	Culture 2D	Culture 3D	Culture organotypique	Organoïdes	Modèles animaux
Reproduit l'hétérogénéité cellulaire	x	x	✓	✓	✓
Reproduit l'environnement cellulaire	x	✓	✓	✓	✓
Tissu humain	✓	✓	✓	✓	x
Suivi du développement tissulaire à partir d'une CS	x	x	x	✓	✓
Facilité d'utilisation	✓	✓	✓	✓	x
Durée des expériences	✓	✓	✓	✓	x
Prix et ressources	✓	✓	✓	✓	x
Réduire, Raffiner, Remplacer	✓	✓	✓	✓	x
Récapitule les interactions biologiques entre organes	x	x	x	x	✓

✓ Avantage ; x Inconvénient

Liste non exhaustive de différents avantages et inconvénients des modèles d'études biologiques les plus utilisés. Créé par L. Pinel.

Malgré les différents avantages que possède le modèle des organoïdes, celui-ci présente également plusieurs inconvénients. Ce modèle permet de reproduire partiellement la physiologie d'un tissu mais ne permet pas de reproduire le comportement d'un organisme complet. De plus, un manque de vascularisation et par conséquent un manque de cellules du système immunitaire est aussi à noter. Cependant des études de transplantation des organoïdes dans des capsules rénales de rongeurs et la co-culture d'organoïdes avec des cellules endothéliales ou immunitaires ont permis de proposer des solutions à certains de ces inconvénients (Nozaki *et al.*, 2016; Taguchi *et al.*, 2014; Takebe *et al.*, 2013).

Enfin, de nombreuses applications listées dans plusieurs revues sont possibles avec ce nouveau modèle de culture en plus des études développementales (Clevers, 2016; Huch & Koo, 2015; Kretzschmar & Clevers, 2016; Lehmann *et al.*, 2019). Celui-ci permet également de tester la toxicité de composés, de modéliser des maladies génétiques ou des cancers ainsi que de tester des médicaments. Des organoïdes d'intestins obtenus à partir de tissus humains de patients atteints de fibrose kystique permettent ainsi d'identifier les thérapies les moins toxiques et les plus réussies d'engendrer une réponse (Dekkers *et al.*, 2013).

3 CELLULES SOUCHES ET EPIDIDYME ADULTE

3.1 Prolifération et différenciation

Dans l'épididyme la présence de CS est controversée depuis de nombreuses années. Lors de mon doctorat j'ai contribué à l'écriture d'une revue sur ce sujet qui a été publiée en 2019 dans le journal « *Andrology* » (Pinel *et al.*, 2019).

3.1.1 Etat homéostatique

Le professeur Ludford, à partir d'observation microscopique émit en premier l'hypothèse de la présence de CS dans l'épididyme. Il suggéra que les cellules basales sont capables de remplacer les cellules mortes éliminées dans la lumière car celles-ci augmentent la taille de leur noyau et leur nombre de figures mitotiques lorsque l'épithélium semble présenter un besoin de nouvelles cellules (Ludford, 1925).

Cette hypothèse de présence de CS dans l'épididyme a cependant été réfutée dans plusieurs études. Une première étude qui vise à déterminer la fréquence des figures mitotiques dans l'épididyme par injection de thymidine radioactive à des animaux adultes indique qu'il existe un faible index mitotique au sein des cellules épithéliales de l'épididyme adulte et que ce faible taux ne corrèle donc pas avec l'hypothèse de la présence de CS (Clermont & Flannery, 1970). Lors de cette étude, les chercheurs ont proposé de catégoriser l'épithélium d'épididyme comme un épithélium en expansion et non en renouvellement (Clermont & Flannery, 1970). D'après la classification employée, un épithélium en expansion possède un faible nombre de figure mitotique associé à un noyau longtemps marqué alors qu'il s'agit de l'inverse pour un épithélium en renouvellement (Clermont & Flannery, 1970). Une nouvelle étude a ensuite été réalisée pour évaluer le taux de prolifération des cellules de l'épithélium d'épididyme de rats à différents âges (Sun & Flickinger, 1982). Cette étude a été réalisée sur des rats de 14, 21, 28, 35 et 51 jours injectés avec de la thymidine marquée et sacrifiés 2 heures après injection. Les résultats ont indiqué que les cellules colonnaires prolifèrent chez les jeunes animaux alors que les cellules basales et principales prolifèrent chez les adultes ; les cellules basales proliférant de façon plus importante chez les animaux de 28 jours. Les taux de prolifération cellulaire observés chez les adultes étaient cependant faibles et ont conduit les auteurs à rejeter l'hypothèse de la présence de CS au sein de l'épithélium chez les adultes (Sun & Flickinger, 1982).

La prolifération cellulaire dans l'épididyme de hamster adulte a également été étudiée en utilisant la colchicine pour arrêter la division cellulaire et évaluer les cellules en métaphase (Nagy

& Edmonds, 1975). Les résultats indiquaient que l'activité mitotique des cellules principales est dépendante du cycle diurne et qu'il y a un nombre insuffisant de figures mitotiques dans les cellules basales pour permettre une évaluation robuste de leur prolifération (Nagy & Edmonds, 1975). Ramirez et al. (1999) ont examiné la prolifération cellulaire de l'épididyme en utilisant le marquage avec du BrdU et ont observé que les cellules basales prolifèrent chez les rats pubères et que leur prolifération diminue chez les rats adultes, cependant, ils ont noté que le taux de prolifération dans les cellules basales était inférieur à celui des cellules principales. Dans une autre étude sur l'épididyme de rat adulte, des injections au BrdU et l'analyse d'un marqueur de prolifération nucléaire (PCNA ; *proliferating cell nuclear antigen*) ont révélé que la majorité de la prolifération se produit dans les cellules principales puis par les cellules basales, étroites, halo et claires selon le segment (Hamzeh & Robaire, 2009).

L'évaluation de l'index de figures mitotiques n'a cependant pas été réalisée dans un contexte d'altération et/ou de régénération dans les études citées précédemment, suggérant qu'il est possible qu'en état d'homéostasie des CS quiescentes et donc en faible activité mitotique soient présentes (Li & Clevers, 2010).

3.1.2 Après altérations tissulaires

De nombreuses études ont été réalisées au sein de l'épididyme à la suite d'orchidectomie et de ligatures des canaux efférents afin d'observer les effets d'une inhibition de la testostérone circulante et/ou des facteurs testiculaires sur l'épithélium (Abe & Takano, 1989a; Abe & Takano, 1989b; Abe *et al.*, 1982; Abe *et al.*, 1984; Fan & Robaire, 1998; Hamzeh & Robaire, 2009; Hermo & Papp, 1996; Kim & Breton, 2019; Kim *et al.*, 2015; Martan & Risley, 1964; Smith *et al.*, 2014; Turner & Riley, 1999).

L'hypothèse de Ludford de la présence de CS dans l'épididyme est partagée par une autre équipe de chercheurs quelques années plus tard (Martan & Risley, 1964). Au sein de l'épithélium de rats adultes, qu'ils décrivent composé de cellules basales et de cellules « holocrines », ces chercheurs ont observé après orchidectomie la présence de cellules basales à structure triangulaire qu'ils ont nommé « cellules basales activées ». D'après leurs observations, ces cellules deviennent ovales et perpendiculaires à la membrane basale afin de s'étendre et de se différencier ensuite en cellules holocrines (Martan & Risley, 1964). Ces cellules qu'ils nomment « holocrines » semblent être les cellules que l'on dénomme aujourd'hui cellules principales.

À la suite d'une ligature des canaux efférents, il a été observé une dégénération des cellules principales ainsi que la disparition des figures mitotiques dans les 24 heures suivant la

chirurgie puis une augmentation des figures mitotiques au sein de l'épithélium dans les 2 et 3^{ème} jours après altération (Abe & Takano, 1989a; Abe & Takano, 1989b; Abe *et al.*, 1984; Turner & Riley, 1999). L'orchidectomie est quant à elle responsable d'une diminution du poids de l'épididyme d'environ 80% chez le rat. Cette perte de poids est associée à une augmentation de l'apoptose des cellules principales dans tous les segments de l'épididyme (Fan & Robaire, 1998). Après cette vague d'apoptose, l'intégrité de l'épithélium et de la BHE est cependant préservée, et ce en l'absence d'un stock de cellules colonnaires suggérant la présence de CS au sein de l'épididyme (Kim *et al.*, 2015).

En effet, une étude plus récente démontre qu'après ligature des canaux efférents, il est observé une augmentation de l'apoptose de 6 fois par rapport aux conditions homéostatique mais aussi une augmentation de la prolifération d'une population de cellules basales qui ont survécues, suggérant que celles-ci pourraient avoir un rôle à jouer dans la régénération du tissu (Kim *et al.*, 2015). Des analyses microscopiques ont aussi montré que les cellules basales changent de morphologie après ligature des canaux efférents ou après orchidectomie (Hamzeh & Robaire, 2009; Hermo & Papp, 1996). Elles adoptent en effet une position plus apicale dans l'épithélium ainsi qu'une apparence plus triangulaire rappelant la morphologie des cellules basales dites « activée » décrites par Martan & Risley (Hermo & Papp, 1996; Martan & Risley, 1964).

Ces études suggèrent donc que les cellules basales joueraient un rôle de régénération de l'épithélium dans l'épididyme comme c'est le cas dans les épithéliums de la trachée, de la prostate, de la glande mammaire ou dans l'urothélium par exemple (Dontu *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Musah *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2019).

3.2 Marqueurs de cellules souches au sein de l'épididyme

Plusieurs marqueurs de CS adultes ont été identifiés au sein de l'épididyme dans différentes études.

Le facteur de transcription **OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4)** aussi appelé POU5F1 est un membre de la famille des protéines POU (*Pic-Oct-Unc*). Il est impliqué dans l'auto-renouvellement et le maintien des CS pluripotentes (Pan *et al.*, 2002; Tai *et al.*, 2005). OCT4 permet la régulation des CS en coopérant avec un autre facteur de transcription appelé **SOX2 (Sex determining region Y-box 2)**. La présence des transcrits et des protéines OCT4 et SOX2 a été rapportée dans l'épithélium d'épididyme humain (Kristensen *et al.*, 2010), cependant les marquages immunohistochimiques indiquent que les protéines sont localisées dans toutes les cellules de l'épithélium et entraînent un doute sur la spécificité des anticorps utilisés. Lorsque les

cellules basales dissociées sont cultivées en 2D, celles-ci forment des sphères qui maintiennent l'expression génique d'OCT4 et SOX2 après 20 jours de culture. Un traitement avec de l'acide rétinoïque induit cependant une diminution de l'expression génique d'OCT4 suggérant un rôle potentiel de cet acide dans la régulation des cellules de l'épididyme (Kristensen *et al.*, 2010). Il est cependant important de souligner le fait que la spécificité d'OCT4 en tant que marqueur de CS est questionnée. En effet, certaines études ont montré qu'il est également exprimé dans des cellules somatiques et que les anticorps anti-OCT4 manquent de spécificité ce qui peut rendre l'interprétation des résultats difficile (Lengner *et al.*, 2007; Zangrossi *et al.*, 2007).

KLF4 (Krüppel-like factor 4) est un autre facteur de transcription jouant un rôle important dans la régulation des CS embryonnaires (Kim *et al.*, 2008; Nandan & Yang, 2009). Il fait partie, avec OCT4, SOX2 et c-myc des facteurs essentiels à la reprogrammation des cellules somatiques en cellules pluripotentes (Takahashi & Yamanaka, 2006). Des études évaluant son expression au sein de l'épididyme ont montré qu'il est exprimé dans le noyau et le cytoplasme des cellules de la tête distale, du corps et de la queue de l'épididyme humain (Godmann *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013a).

CD133 (Promini-1) est également exprimé dans les sphères formées par les cellules épидидymaires humaines en culture (Kristensen *et al.*, 2010). Son expression a également été observée par immunohistochimie et microscopie électronique dans l'épididyme de souris adulte où il est localisé sur la surface apicale des cellules principales de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme (Fargeas *et al.*, 2004). CD133 a été utilisé comme marqueur de CS adultes dans la prostate, le cerveau, l'intestin et la moelle osseuse (Leong *et al.*, 2008; Li, 2013; Richardson *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2009).

Une étude de 2015 permettant d'isoler la population de cellules basales d'épididyme de rat a permis de comparer l'expression génique des cellules basales et des cellules non basales (Mandon *et al.*, 2015). De nombreux marqueurs de CS adultes d'autres tissus sont sur-représentés dans les cellules basales de l'épididyme suggérant encore une fois que ces cellules pourraient représenter une population de CS dans l'épididyme. Cependant aucun marqueur n'a permis d'identifier une population spécifique de CS adultes dans l'épididyme (Yeung *et al.*, 2012).

3.3 Etudes *in vitro* et traçage de lignée

Une étude de 2015 effectuée au sein de notre laboratoire a permis l'isolement des cellules basales d'épididyme de rats afin de faciliter leur caractérisation (Mandon *et al.*, 2015). Ces cellules

ont été isolées par séparation magnétique grâce à leur expression spécifique de la protéine Itga6. Les cellules basales isolées ont ensuite été cultivées en 2D où elles se regroupent en acini sphériques, comportement adopté par les CS et aussi observé dans des cultures de cellules d'épididyme humain (Kristensen *et al.*, 2010). Lors des 14 jours de culture, une diminution de l'expression de KRT5 (cytokeratine 5), un marqueur de cellules basales et une apparition de l'expression de la connexine 26, marqueur de cellules colonnaires ont été observés, suggérant que ces cellules ont la capacité de se différencier (Mandon *et al.*, 2015). Ce résultat a permis de proposer un modèle dans lequel les cellules basales seraient capables de se différencier en cellules colonnaires puis ensuite en cellules principales lors de la régénération d'un tissu (Pinel *et al.*, 2019).

Des chercheurs développant un protocole d'expansion des cellules basales de différents épithéliums se sont également intéressés aux cellules basales de l'épididyme (Mou *et al.*, 2016). Dans cette étude des cellules basales d'épididyme de souris transgéniques exprimant la protéine Tomato spécifiquement dans les cellules KRT5⁺ ont été isolées par FACS (*Fluorescence Activating Cell Sorting*). Ces cellules ont ensuite été mises en culture en 2D dans un milieu développé pour la culture de cellules issues des épithéliums respiratoires afin d'évaluer leur capacité d'auto-renouvellement. Cette étude démontre que les cellules basales d'épididyme peuvent être maintenues en culture pendant au moins 10 passages tout en conservant l'expression de marqueurs qui leur sont spécifiques. Ces cellules basales isolées ont ensuite été cultivées en 3D et ont permis la formation d'organoïdes composés de cellules basales et de cellules claires (Mou *et al.*, 2016). Elles ont également été transplantées de façon sous-cutanée à des souris immunodéficientes et ont permis de former des greffons qui ont été prélevés 40 jours après la transplantation et qui étaient formés de tubules composés de cellules basales et principales. Cette étude démontre ainsi la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules basales KRT5⁺ de souris en cellules principales et claires (Mou *et al.*, 2016).

Une étude de 2020 a ensuite décrit le développement d'un modèle de culture en 3D de cellules d'épididyme humain (Leir *et al.*, 2020b). Dans cette étude des cellules épithéliales différenciées d'épididymes humains ont été obtenues après digestion tissulaire et ont permis la formation d'acini sphériques après 7 à 10 jours de culture en 3D. La composition de la suspension cellulaire de départ a été analysée lors d'études ultérieures et a permis de montrer que cette suspension est composée majoritairement de cellules principales (Leir *et al.*, 2015). Une analyse de séquençage de cellule unique a cependant indiqué que les acini sphériques étaient formés majoritairement de cellules basales puis de cellules principales et de quelques rares cellules

claires, suggérant que ces structures pourraient être formées par les cellules basales comme c'est le cas chez la souris. L'absence de suivi de la formation de ces acini sphériques à partir d'une seule cellule ne permet cependant pas de conclure quant à l'identité des cellules qui en sont à l'origine.

3.4 Régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire

3.4.1 Facteurs

Différentes hormones et facteurs interviennent dans la prolifération et la différenciation des cellules de l'épithélium épididymaire.

- **Les androgènes**

Les androgènes ont un rôle dans la formation de l'épididyme et de son épithélium mais aussi dans le maintien de sa structure et de ses fonctions à l'âge adulte. Nous nous intéressons ici plus particulièrement au rôle des androgènes sur l'épithélium adulte.

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes comprenant la testostérone et son métabolite la DHT qui se lie de façon plus importante aux récepteurs aux androgènes. Dans l'épididyme la testostérone possède 2 points d'entrée distincts. Le premier est via les canaux efférents où la testostérone est majoritairement couplée à une protéine de transport appelée ABP (*Androgen-binding protein*) alors que le second est via la circulation générale (French & Ritzén, 1973; Robaire & Hamzeh, 2011). La testostérone, une fois liée à l'ABP se fixe sur les récepteurs aux androgènes et est absorbée par les cellules principales du segment initial et de la tête de l'épididyme où elle est réduite en DHT grâce à une réaction enzymatique faisant intervenir la réductase 5 α (Henderson *et al.*, 2006; Robaire *et al.*, 1977; Viger & Robaire, 1994). Les effets des androgènes dans l'épididyme sont donc majoritairement effectués via l'intermédiaire de la DHT (Orgebin-Crist *et al.*, 1976).

Le rôle important des androgènes dans le maintien de l'épithélium est observé lors d'études impliquant des ligatures de canaux efférents ou des orchidectomies. Ces procédures entraînent une vague d'apoptose au sein de l'épididyme associé à un changement morphologique des cellules, une dégénération des cellules principales et de l'épithélium ainsi qu'une diminution de la prolifération cellulaire (Abe & Takano, 1989b; Abe *et al.*, 1982; Fan & Robaire, 1998; Hamzeh & Robaire, 2009; Kim & Breton, 2019; Kim *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2014; Turner & Riley, 1999).

Après ligature des canaux efférents une augmentation de la prolifération est observée principalement au niveau des cellules basales alors que celle-ci est atténuée à la suite d'un traitement avec un antagoniste des récepteurs aux androgènes (Kim & Breton, 2019; Kim *et al.*, 2015). Après orchidectomie l'injection de testosérone est nécessaire à une augmentation de la prolifération cellulaire démontrant le rôle des androgènes dans la prolifération de l'épithélium (Hamzeh & Robaire, 2009; Kim *et al.*, 2015). Des études réalisant l'inhibition du récepteur aux androgènes dans les cellules principales de l'épididyme de souris grâce à l'utilisation d'une Cre recombinase exprimée sous l'influence d'un promoteur spécifique à ces cellules ont mis en évidence l'apparition d'une hypoplasie ainsi qu'une hypotrophie de l'épithélium entraînant une azoospermie obstructive des animaux confirmant un rôle direct des androgènes sur l'épididyme (Krutskikh *et al.*, 2011; O'Hara *et al.*, 2011)

Après ligature et orchidectomie un changement morphologique des cellules basales est également observé. Celles-ci semblent se « détacher » de la membrane basale et afficher une position plus apicale ainsi que moins de projections latérales suggérant une régulation de ces cellules par les androgènes mais aussi par les facteurs testiculaires (Herms & Papp, 1996). Une étude plus récente a démontré que ce sont plus précisément les facteurs testiculaires et non les androgènes qui jouent un rôle dans la capacité des cellules basales de l'épididyme à engendrer des projections cytoplasmiques (Kim *et al.*, 2015).

De plus, la suppression de l'expression des récepteurs aux androgènes dans l'épididyme grâce à un modèle de souris transgéniques exprimant la Cre recombinase a montré que les androgènes sont essentiels à la différenciation post-natale des cellules de l'épithélium (Murashima *et al.*, 2011). Dans ce modèle, l'épithélium adulte est composé d'une seule rangée de cellules irrégulières à la place de l'épithélium pseudo-stratifié observé chez les souris contrôles. Les analyses de cet épithélium montrent une absence d'AQP9, marqueur de cellules principales, une diminution de p63 dans la tête, marqueur de cellules basales et une augmentation de p63 dans la queue ainsi qu'une expression non modifiée des marqueurs de cellules claires et étroites (Murashima *et al.*, 2011).

Toutes ces données indiquent donc que les androgènes jouent un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules de l'épithélium et notamment des cellules basales et principales.

- **Les glucocorticoïdes**

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes secrétées par les glandes surrénales qui interviennent dans différents processus biologiques. Le cortisol est la principale forme sécrétée chez l'homme alors qu'il s'agit de la corticostérone chez le rongeur. Ces hormones se fixent aux récepteurs aux glucocorticoïdes qui migrent alors au noyau afin de recruter des cofacteurs pour réguler l'expression des gènes (Zhou & Cidlowski, 2005).

Au sein de l'épididyme les récepteurs aux glucocorticoïdes sont localisés dans le cytoplasme et le noyau des cellules de l'épithélium ainsi que dans les cellules musculaires lisses et interstitielles (Silva *et al.*, 2010). Dans l'épithélium, ce récepteur semble plus précisément localisé au niveau des cellules principales, basales, étroites et apicales et est plus fortement exprimé lors de la différenciation épithéliale (Gladstones *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont mis en évidence une interaction entre les glucocorticoïdes et les androgènes. En effet, un niveau élevé de glucocorticoïdes entraîne une inhibition des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse générant une diminution des niveaux de testostérone (Gao *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2010). A l'inverse, une diminution des taux de glucocorticoïdes induite par adrenalectomie est suivie par une augmentation des niveaux de testostérone via une hausse de l'expression des récepteurs aux androgènes dans une première étude alors qu'elle n'entraîne aucun effet significatif dans une seconde étude (Gao *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2010). Des expériences d'orchidectomie ont permis d'observer une élévation des niveaux d'ARNm des récepteurs aux glucocorticoïdes dans la tête et la queue de l'épididyme (Silva *et al.*, 2010). Cette augmentation est réprimée par l'injection de testostérone confirmant la régulation des glucocorticoïdes par les androgènes.

Enfin, une étude plus récente a été réalisée afin d'évaluer l'effet de la bétaméthasone, un glucocorticoïde utilisé en clinique, sur le développement de l'épididyme de rats descendants de mères traitées lors de la gestation (Kempinas *et al.*, 2019). À la suite du traitement, un délai dans la différenciation de la queue de l'épididyme ainsi qu'une diminution de la protéine de jonctions Cx43 ont été observés dans les rats 45 jours après la naissance alors que l'épithélium des rats adultes est comparable à celui des rats non traités (Kempinas *et al.*, 2019).

- **Les hormones thyroïdiennes**

Les hormones thyroïdiennes comprennent la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3) qui sont biosynthétisées par la thyroïde à partir d'iode et de tyrosine. La T4, qui est une pro-hormone est la forme majoritairement produite mais la moins active. Elle est convertie en T3 grâce à une enzyme appelée thyroxine 5'-déiodinase. Une fois sécrétée, les hormones thyroïdiennes qui sont lipophiles sont transportées dans le sang par des protéines de transport telles que la TGB (*Thyroxin Binding Globuline*). Elles se fixent ensuite aux récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR- α et TR- β) au niveau nucléaire afin de se lier à l'ADN et exercer leur effet sur l'expression des gènes (Pascual & Aranda, 2013).

Au sein de l'épididyme, il a été montré que l'hormone T3 se fixe aux noyaux des cellules de l'épithélium avec une haute affinité suggérant que ces cellules possèdent un récepteur aux hormones thyroïdiennes (Del Rio *et al.*, 2000). L'expression de récepteurs aux hormones thyroïdiennes a ensuite été confirmée au sein de l'épididyme et a été observé dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau des cellules principales et basales (De Paul *et al.*, 2008).

Des expériences d'ablation de la thyroïde de rats adultes males ont entraîné une diminution du nombre de mitose, une réduction de la taille des noyaux et une décondensation de la chromatine dans les cellules de l'épithélium épидидymaire (del Rio *et al.*, 1979). Lors de ces expériences une baisse de la mobilité des spermatozoïdes reversée par injection de T3 a également été observée suggérant un rôle de cette hormone dans la fonction de l'épididyme (Del Rio & Quiros, 1983). Une inhibition de la synthèse de T3 via l'utilisation de propylthiouacile a également entraîné une diminution des protéines de jonctions cellulaires β -caténine et Cx43 dans l'épididyme démontrant son rôle dans le maintien de la BHE (St-Pierre *et al.*, 2003).

- **Les rétinoïdes**

Les rétinoïdes sont des dérivés de la vitamine A qui participent à de nombreux processus biologiques. Les rétinoïdes naturels comprennent le rétinol qui est la vitamine A et tous ses dérivés métaboliques tels que des esters et les formes actives qui sont l'acide tout trans-rétinoïque et l'acide 9-cis rétinoïque. Les rétinoïdes sont des molécules hydrophobes qui sont transportées par des protéines chaperonnes telles que les CRBP I et II (*Cellular Retinoid Binding Protein type I and II*), les CRABP (*Cellular Retinoic Acid Binding Protein type I and type II*), la RBP (*Retinoid Binding Proteins*) et la lipocaline 5 ou E-RABP (*epididymal retinoic acid binding protein*). Les récepteurs

aux rétinoïdes sont des récepteurs nucléaires composés de sous types α , β , and γ et appelés récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) et récepteur de rétinoïde X (RXR). La liaison du ligand aux récepteurs déclenche la formation d'hétérodimères de RAR et RXR et la fixation du complexe aux éléments de réponse des rétinoïdes (RXRE) permettant la modulation de l'expression des gènes. Les RXR peuvent également se coupler à d'autres récepteurs nucléaires comme les récepteurs des hormones thyroïdiennes afin de former des hétérodimères (Zhang *et al.*, 1992).

Au sein de l'épididyme, la majorité des composants de la signalisation des rétinoïdes sont présents. Les formes identifiées sont majoritairement le rétinol, le rétinyl-esters, le RA (*retinoic acid*) et l'acide 9-cis rétinoïque. Les formes actives sont majoritaires dans la queue de l'épididyme alors que les autres formes sont majoritaires dans la tête (Pappas *et al.*, 1993). Concernant les protéines chaperonnes, celles-ci sont présentes à une grande concentration dans l'épididyme avec une répartition segment dépendante. La CRBP est particulièrement exprimée dans les cellules principales de la tête alors que la CRABP II est majoritaire dans la queue et que la CRABP I est présente dans les cellules musculaires lisses de la queue de l'épididyme (Porter *et al.*, 1983). La lipocaline 5 est quant à elle exprimée dans les spermatozoïdes et dans les cellules principales le long de l'épididyme (Nishiwaki *et al.*, 1991; Porter *et al.*, 1985). Une analyse par hybridation *in situ* suivi de marquages immunohistochimiques ont permis de montrer que la forme α du RAR est majoritairement exprimée dans la tête et la queue de l'épididyme de rat (Akmal *et al.*, 1996). Des marquages par immunohistochimie semblent indiquer une expression de RAR α dans les cellules principales, basales mais aussi périvitubulaires.

L'utilisation de souris transgéniques exprimant une mutation négative du RAR α entraîne une diminution de la fertilité chez les mâles (Costa *et al.*, 1997; Jauregui *et al.*, 2018). La tête et le corps de l'épididyme semblent de morphologie normale alors que l'épithélium de la queue de l'épididyme est transformé en épithélium stratifié squameux kératinisé et qu'une forte augmentation du nombre de cellules interstitielles est observée (Costa *et al.*, 1997). Ce changement morphologique semble être lié à une inflammation chronique qui entraîne un blocage de l'épididyme. Cette inflammation pourrait être la conséquence de la rupture de certains tubules entraînant le contact des spermatozoïdes avec le milieu extra-luminal (Costa *et al.*, 1997). Le phénotype observé dans l'épididyme est cependant partiellement réprimé par l'ajout d'implant de testostérone suggérant un phénotype causé par une combinaison d'un faible niveau de testostérone et une inhibition du récepteur RAR α (Jauregui *et al.*, 2018).

La présence des nombreux composants de la voie des rétinoïdes au sein de l'épididyme et l'impact morphologique et fonctionnel de leurs inhibitions sur cet organe suggère un rôle

important des rétinoïdes sur l'épididyme malgré le fait qu'à l'heure actuelle ce rôle n'est pas encore totalement élucidé.

3.4.2 Voies de signalisation

- **La voie Wnt**

Au sein de l'épididyme adulte la β -caténine est exprimée à la membrane entre les cellules principales de l'épithélium et son expression est plus importante dans le corps et la queue de l'épididyme. A la suite d'orchidectomie, la β -caténine migre dans le cytoplasme des cellules alors que l'ajout de testostérone permet de rétablir le marquage membranaire de celle-ci, suggérant l'implication des androgènes dans sa localisation (DeBellefeuille *et al.*, 2003).

La présence de Wnt1, 2, 2b, 3, 3a, 4, 9b et 10a a également été détectée dans l'épididyme (Deshpande *et al.*, 2009; Koch *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015b; Wang *et al.*, 2013b). Des études ont montré que les cellules principales de l'épididyme sécrètent, via les épидидyosomes, des ligands Wnt actifs notamment Wnt2b et Wnt10a, plus exprimés dans la partie proximale de l'épididyme et que les spermatozoïdes sont sensibles à cette voie de signalisation (Cheng *et al.*, 2018; Koch *et al.*, 2015). Des essais *in vitro* ont également établi que le ligand Wnt3a permet d'augmenter la mobilité des spermatozoïdes (Koch *et al.*, 2015). Wnt9b est quant à lui présent dans les canaux de Wolff chez la souris entre les jours embryonnaires 9.5 et 14.5. L'analyse de souris mutantes males négatives pour Wnt9b a indiqué que ces souris ne possédaient pas d'épididyme et de canal déférent à la naissance (Carroll *et al.*, 2005). De plus, une compétition entre les voies non canoniques impliquant Wnt4 et la voie canonique a été observée au sein de l'épididyme (Deshpande *et al.*, 2009).

Une étude de 2016 a aussi mis en évidence le rôle de la voie Wnt dans l'enroulement de l'épididyme, un phénomène causé par la prolifération des cellules des canaux de Wolff (Kumar *et al.*, 2016). Lors de la différenciation des canaux de Wolf, la voie Wnt est très active dans tout l'épithélium et une inhibition de cette voie sur des cellules en culture entraîne une diminution de la prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire. Afin de confirmer ces résultats, un modèle de souris transgéniques avec inactivation inductible de la β -caténine spécifiquement dans les canaux de Wolff a été utilisé. L'analyse des souris adultes a permis de mettre en évidence une baisse de la prolifération et une augmentation de la mort cellulaire associées à une absence d'enroulement de l'épididyme. Les mêmes observations ont été réalisées après activation constitutive de la voie Wnt (Kumar *et al.*, 2016). Enfin, une étude de

2017 a permis de montrer que la voie Wnt semble favoriser la prolifération des cellules de l'épithélium et non leur différenciation dans l'épididyme. En effet l'inhibition de la β -caténine entraîne une diminution du marqueur de prolifération cellulaire Ki67 tout en conservant la structure d'un épithélium stratifié comprenant des cellules basales, principales, claires et étroites (Kumar & Tanwar, 2017).

- **La voie TGF- β /BMP**

Une étude récente a permis la détection et localisation des différents ligands et récepteurs de la voie TGF- β au sein de l'épididyme (Voisin *et al.*, 2020). L'activité de la voie TGF- β , mesurée par la phosphorylation des smads semble être plus importante dans le corps de l'épididyme où TGF- β 3 en est le ligand majoritaire alors que TGF- β 2 est minoritaire. Les ligands et récepteurs sont exprimés dans les cellules de l'interstitium et dans les cellules de l'épithélium, notamment dans les cellules principales, claires, étroites et basales (Voisin *et al.*, 2020).

Dans l'épididyme il a été montré que la voie TGF- β intervient dans la régulation de la BHE et dans l'immunotolérance (Pierucci-Alves *et al.*, 2018; Stammler *et al.*, 2013). En effet, dans un modèle *in vitro* reproduisant la BHE, TGF- β induit une augmentation significative de la perméabilité paracellulaire ainsi qu'une diminution de la claudine 1 (Stammler *et al.*, 2013). De plus une diminution de la voie TGF- β dans les cellules dendritiques de souris entraîne une réponse immunitaire envers les spermatozoïdes et une leucocytose démontrant une altération de l'immunotolérance de l'épididyme (Pierucci-Alves *et al.*, 2018).

Au sein de l'épididyme adulte, des analyses d'expression de l'ARNm ont permis de détecter les ligands Bmp 2, 3, 3b, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b et 15 et les récepteurs Bmpr1a, 1b et 2 (Ciller *et al.*, 2016). L'inhibition de Bmp8a dans des souris entraîne dans une petite proportion d'animaux la dégénération de l'épithélium de l'épididyme alors que ce phénotype est exacerbé par la mutation de Bmp7 suggérant que la voie BMP joue un rôle dans la régulation de cet épithélium (Zhao *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 1998). L'inhibition de Bmp4 entraîne quant à elle une diminution de la mobilité des spermatozoïdes suggérant une altération de la fonction de l'épididyme (Hu *et al.*, 2004).

L'inhibition des voies TGF- β et BMP a également permis l'expansion à long terme de cellules basales d'épididyme de souris en culture confirmant un rôle de ces voies dans la régulation de l'épithélium épидидymaire (Mou *et al.*, 2016).

- **La voie Notch**

Dans l'épididyme, les transcrits des ligands Notch 1 à 3, Jagged1 et des récepteurs Dll1 et 4 ont été détecté (Murta *et al.*, 2016). Notch 1 est exprimé dans les cellules principales, apicales, étroites et basales du segment initial alors que Notch 2 et 3 semble être exprimés dans tous les types cellulaires. De plus, des composés de la voie Notch ont été retrouvés dans les épидидyosomes présents dans la lumière du tubule (Murta *et al.*, 2016). Jagged 1 est quant à lui exprimé dans les cellules principales et basales le long de l'épididyme mais aussi dans les cellules étroites et apicales dans la queue. Le récepteur Dll1 est localisé au niveau des cellules principales le long de l'épididyme et des cellules basales dans le corps et la queue alors que Dll4 est localisé dans les cellules principales, étroites, claires et basales dans tout le tubule (Hayashi *et al.*, 2004; Murta *et al.*, 2016). Enfin, Jagged 2 est surexprimés dans les cellules basales d'épididyme par rapport aux autres types cellulaires (Mandon *et al.*, 2015).

L'expression constitutive de Notch 1 chez la souris entraîne une hyperplasie de l'épithélium de l'épididyme associée à une absence de différenciation cellulaire dans la majorité des segments de l'épididyme (Lupien *et al.*, 2006). L'inhibition de Notch via un traitement au DAPT entraîne une diminution de la mobilité des spermatozoïdes sans altérer leur fertilité (Murta *et al.*, 2016).

- **Autres voies de régulation**

Différentes études se sont également intéressées au rôle de la voie ERK au sein de l'épididyme et ont démontré que cette voie est impliquée dans la prolifération et la différenciation de l'épithélium du segment initial de l'épididyme lors du développement mais aussi dans la survie des cellules qui le composent à l'âge adulte (Jung *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2010; Zhang & Liu, 2002).

Enfin, une étude de 1996 démontre que le récepteur à la tyrosine kinase nommé c-ros est aussi impliqué dans la différenciation de l'épididyme. En effet, l'épididyme des animaux dont le récepteur est invalidé pour ce récepteur ne comprend pas de segment initial (Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 1996).

Toutes ces données nous confirment que de nombreuses hormones et voies de signalisation interviennent dans la prolifération et la différenciation de l'épithélium épидидymaire. La connaissance et la compréhension de celles-ci sont primordiales afin de déterminer comment

un épithélium composé de nombreux types cellulaires différenciés se forme à partir d'une population de cellules souches.

3.4.3 Le facteur de transcription TP63

Le facteur de transcription TP63 fait partie de la famille des facteurs de transcription suppresseur de tumeur p53 (Yang *et al.*, 1998). Le gène TP63 code deux isoformes, Tap63 qui est majoritairement exprimé dans le tissu embryonnaire et Δ Np63 qui est majoritairement exprimé dans les tissus adultes. TP63 est exprimé dans les cellules basales des épithéliums stratifiés et pseudo-stratifiés tels que l'épididyme, l'épiderme, la prostate, les voies respiratoires, la glande mammaire et l'épithélium olfactif mais est absent dans les épithéliums simples (Arason *et al.*, 2014; Chakrabarti *et al.*, 2014; Hayashi *et al.*, 2004; Koster & Roop, 2004; Packard *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 1998).

Au sein de l'épididyme adulte, des études ont confirmé que la forme Δ Np63 est majoritaire dans l'épithélium (Hayashi *et al.*, 2004). Des analyses de détection de l'ARN messager dans des épididymes de rats ont montré que Δ Np63 est présent dès 14 jours dans la queue puis dès 16 jours dans le corps et la tête du tubule (Hayashi *et al.*, 2004). Des analyses par immunohistochimie ont confirmé la présence de p63 dans l'épithélium épididymaire à partir de 14 jours. A cet âge l'épithélium est composé de cellules colonnaires possédant toutes la même morphologie alors que seulement certaines d'entre elles expriment p63 (Gregory & Cyr, 2018; Hayashi *et al.*, 2004). A partir de 21 jours et jusqu'à l'âge adulte p63 est uniquement exprimé par les cellules basales le long de l'épididyme (Gregory & Cyr, 2018).

Une étude de 2011 a montré que p63 est essentiel à la différenciation des cellules basales mais pas des autres types cellulaires (Murashima *et al.*, 2011). Attribué au fait que les souris invalidées de p63 meurent rapidement à la naissance par déshydratation, des épididymes embryonnaires de souris invalidées pour p63 ont été prélevés et transplantés dans la capsule rénale de souris immunodéprimées. Un mois après la transplantation l'épithélium épididymaire issu des souris mutées est composé d'une seule rangée de cellules formée de cellules principales, claires et étroites mais dépourvue de cellules basales (Murashima *et al.*, 2011). Les auteurs suggèrent donc que p63 est primordial pour la différenciation des cellules basales mais que les cellules basales ne seraient pas nécessaires à la différenciation des autres types cellulaires de l'épididyme.

Cependant, dans une étude où des rats nouveau-nés ont été traités avec une dose élevée de diéthylstilbestrol, un œstrogène de synthèse, une diminution du nombre de cellules basales dans la queue de l'épididyme et le canal déférent semble responsable d'anomalies épithéliales, y compris une augmentation de la prolifération cellulaire. Les cellules basales semblent donc être essentielles du bon développement de l'épithélium de la queue de l'épididyme et du canal déférent (Atanassova *et al.*, 2005).

Des résultats indiquent que l'expression de p63 est régulée par les androgènes. En effet, l'expression de p63 est diminuée de façon significative au sein de souris transgéniques n'exprimant pas les récepteurs aux androgènes alors qu'un traitement à la DHT favorise la transcription de $\Delta Np63$ dans des cellules de peau humaines adultes transfectées avec des récepteurs aux androgènes (Murashima *et al.*, 2011). Une étude de 2008 a également montré que le gène codant la claudine 1, une protéine de jonction serrée importante dans l'épithélium épididymaire est un gène cible régulé par TP63 (Lopardo *et al.*, 2008).

Le rôle de TP63 au sein des autres épithéliums (pseudo)-stratifiés a également été étudié. Dans l'épiderme Tap63 est nécessaire pour l'initiation de la stratification mais inhibe la différenciation qui est régulée par $\Delta Np63$ (Koster *et al.*, 2004). Dans les poumons et la trachée, TP63 est impliqué dans la formation et le maintien de l'épithélium pseudo-stratifié (Arason *et al.*, 2014). Dans la glande mammaire, $\Delta Np63$ augmente l'activité des CS alors que dans la prostate p63 semble essentiel à la différenciation des cellules basales mais pas des autres types cellulaires (Chakrabarti *et al.*, 2014; Kurita *et al.*, 2004). Plusieurs hypothèses ont également proposé qu'une diminution de p63 au sein des cellules basales entraînent leur détachement de la membrane basale, leur migration ainsi que leur différenciation (Carroll *et al.*, 2006; Packard *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2012; Yalcin-Ozuyisal *et al.*, 2010). En effet, une inhibition de l'expression de TP63 dans les cellules épithéliales de la glande mammaire entraîne une diminution de l'expression des gènes d'adhésion cellulaire alors que l'inhibition de la forme $\Delta Np63$ dans des souris transgéniques entraîne une différenciation prématurée des cellules de l'épiderme (Carroll *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2012)

Une étude de traçage de lignée des cellules p63⁺ de la prostate a permis de mettre en évidence 7 populations de cellules basales selon leur profil d'expression de p63 et des cytokératines 5 et 14. Les cellules basales positives pour p63 au sein de la prostate sont capables de s'auto-renouveler mais aussi de se différencier en autres types cellulaires de l'épithélium, les cellules luminales et neuroendocrines (Lee, 2014).

Aucune étude de traçage de lignée n'a été réalisée sur les cellules p63 positives de l'épididyme et des études supplémentaires semblent donc indispensables pour comprendre son rôle au sein de l'épithélium.

4 HYPOTHESE DE RECHERCHE

L'épididyme joue donc un rôle essentiel dans la maturation, la protection, le transport et le stockage des spermatozoïdes. Ces fonctions sont assurées par les différents types cellulaires qui composent son épithélium. Les cellules principales participent à la sécrétion de protéines impliquées dans la maturation des spermatozoïdes ; les cellules basales ont un rôle de micro-senseur et de protection du stress oxydatif ; les cellules claires et étroites participent à l'endocytose et la régulation de l'acidité alors que les cellules halo et dendritiques ont un rôle immunitaire. Elles participent également ensemble à la formation de la BHE afin de protéger les spermatozoïdes du système sanguin.

Même si la composition de l'épithélium épидидymaire est connue à l'heure actuelle, il persiste une interrogation quant à la présence de CS au sein de cet organe. En effet, les cellules colonnaires qui sont présentes lors des premières phases de différenciation de l'épithélium et qui sont considérées comme les cellules à l'origine des cellules différenciées ne sont pas présentes dans l'épithélium adulte. Malgré cette absence de stock de cellules colonnaires, un épithélium et une BHE intacte sont observés après ligature des canaux efférents et orchidectomie suggérant un mécanisme de régénération et donc la présence de CS.

Différentes études permettent d'émettre l'hypothèse que ce sont les cellules basales qui possèdent cette caractéristique. Tout d'abord, ces cellules sont présentes dans de nombreux épithéliums et possèdent une capacité de régénération du tissu dans ces derniers. De plus, au sein de l'épididyme ces cellules prolifèrent fortement et changent de morphologie après altération du tissu. Leur isolation a permis de démontrer qu'elles partagent des caractéristiques communes avec les CS adultes, qu'elles peuvent se différencier en cellules claires et principales et qu'elles semblent être à l'origine de la formation d'organoïdes chez la souris et l'homme.

En regroupant ces informations, notre hypothèse était que les cellules basales jouent un rôle de CS au sein de l'épididyme adulte. L'objectif principal de ce doctorat était de créer un modèle unique d'organoïdes d'épididyme de rat. Pour cela, trois sous-objectifs étaient nécessaires : (1) Démontrer la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules basales ; (2) Développer un modèle d'épididyme d'organoïdes reproduisant la morphologie de l'épithélium ; (3) Etudier l'expression d'un marqueur reconnu (LGR5) de CS au sein de l'épididyme.

5 PREMIER ARTICLE: SELF-RENEWAL AND DIFFERENTIATION OF RAT EPIDIDYMAL BASAL CELLS USING A NOVEL *IN VITRO* ORGANOID MODEL

Auto-renouvellement et différenciation des cellules basales d'épididymes de rat en utilisant un nouveau modèle d'organoïdes *in vitro*

Auteurs :

Laurie PINEL & Daniel G. CYR

Laboratoire de toxicologie de la reproduction, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, University of Quebec, Laval, QC, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Biology of Reproduction. 2021 Oct 11;105(4):987-1001; DOI: 10.1093/biolre/ioab113

Contribution des auteurs :

LP : Planification et réalisation des expériences, analyse et interprétation des données et rédaction de l'article

DC : Interprétation des données et rédaction de l'article

Mise en contexte :

Les cellules souches sont caractérisés par leur capacité à s'auto-renouveler, se différencier mais aussi leur capacité à former des organoïdes, c'est-à-dire des structures en 3 dimensions formés à partir d'une seule cellule souche et capable de reproduire la morphologie et certaines fonctions d'un organe. Dans ce chapitre, un tout nouveau modèle d'organoïde d'épididyme de rat est décrit. Ce modèle démontre que les cellules basales d'épididyme de rat sont capables de s'auto-renouveler sur plusieurs générations, de se différencier en cellules principales et de former des organoïdes composés de plusieurs types de cellules capables de former des jonctions cellulaires et de sécréter une protéine impliquée dans la maturation des spermatozoïdes.

Les résultats de ces travaux ont été présentés par l'intermédiaire de présentations **orales** et d'affiches au congrès Armand-Frappier en 2019, à la journée de l'axe Toxicologie et Pharmacologie de l'INRS en 2019, aux journées ReproSciences en 2019, au congrès de la Société Américaine pour la Biologie Cellulaire en 2018, à la 7eme conférence internationale sur l'Epididyme en 2018 et lors de la journée de recherche du Centre de Recherche en Reproduction et Développement en 2018.

Auteurs : **Laurie Pinel**, Nick Barker et Daniel Cyr
Titre : Study and Characterization of Epididymis Stem Cells
Congrès Armand-Frappier, Saint-Sauveur, QC, 28 au 31 Octobre 2019

Auteurs : **Laurie Pinel**, Nick Barker et Daniel Cyr
Titre : Demonstration of the Presence of Stem Cells in the Epididymis
Journée de l'axe Toxicologie et Pharmacologie de l'INRS, Montréal, QC, 22 Mai 2019

Auteurs : Laurie Pinel, Nick Barker and Daniel Cyr
Titre : Identification of Epididymis Stem Cells
Journées ReproSciences, Toulouse, France, 24 au 26 Avril 2019

Auteurs : Laurie Pinel et Daniel G. Cyr
Titre : Identification of a novel epididymal stem cell
American Society for Cell Biology, San Diego, CA 8 au 12 Décembre 2018

Auteurs : Laurie Pinel et Daniel G. Cyr
Titre : Development and characterization of epididymal organoids from the rat epididymis
7th Conférence International sur l'Epididymis, Montréal, QC, 20 au 23 Septembre 2018

Auteurs : Laurie Pinel et Daniel G. Cyr
Titre : Development and characterization of a novel epididymal organoids from rat epididymis
10th Journée de recherche annuelle du CRRD de Mc Gill, Montreal, QC, May 15, 2018

Résumé en Français :

L'épididyme est composé d'un épithélium pseudostratifié formés de différents types cellulaires. Des études ont montré que les cellules basales d'épididyme de rat partagent des propriétés communes avec les cellules souches adultes et commencent à se différencier *in vitro* en réponse au facteur de croissance des fibroblastes et à la 5 α -dihydrotestostérone. La caractérisation des cellules basales de rat est donc nécessaire pour bien comprendre le rôle de ces cellules. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer la capacité des cellules basales à développer des organoïdes à partir de cellules uniques et d'évaluer leur capacité à s'auto-renouveler et à se différencier *in vitro*. Nous avons isolé des cellules basales d'épididyme de rat et établi des cultures cellulaires tridimensionnelles à partir des fractions cellulaires basales et non basales. Les organoïdes ont été formés par des cellules basales épидидymaires adultes uniques. Les organoïdes ont été dissociés en suspension de cellules basales, capables de reformer de nouveaux organoïdes qui se sont maintenus sur 10 générations. La culture à long terme d'organoïdes a révélé que ces cellules peuvent se différencier en cellules exprimant les marqueurs de cellules principales aquaporine 9 et le régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR). Les analyses par microscopie électronique ont montré que les organoïdes étaient composés de plusieurs types de cellules polarisées présentant des microvillosités et ayant la capacité de former des jonctions serrées. De plus, des organoïdes ont pu être formés par des cellules basales de la région proximale et distale de l'épididyme et sont capables de sécréter la clustérine, une protéine impliquée dans la maturation des spermatozoïdes. Ces données indiquent que les cellules basales de rat peuvent être utilisées pour la formation d'organoïdes épидидymaires et confirment davantage l'hypothèse que celles-ci représentent une population de cellules souches dans l'épididyme.

5.1 Abstract

The epididymis is composed of a pseudostratified epithelium that is comprised of various cell types. Studies have shown that rat basal cells share common properties with adult stem cells and begin to differentiate *in vitro* in response to fibroblast growth factor and 5 α -dihydrotestosterone. The characterization of rat basal cells is therefore necessary to fully understand the role of these cells. The objectives of this study were to assess the ability of single basal cells to develop organoids and to assess their ability to self-renew and differentiate *in vitro*. We isolated basal cells from the rat epididymis and established three-dimensional cell cultures from the basal and nonbasal cell fractions. Organoids were formed by single adult epididymal basal cells. Organoids were dissociated into single basal cells, which were able to reform new organoids, and were maintained over 10 generations. Long-term culture of organoids revealed that these cells could be differentiated into cells expressing the principal cell markers aquaporin 9 and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Electron microscopy demonstrated that organoids were composed of several polarized cell types displaying microvilli and the ability to form tight junctions. Additionally, organoids could be formed by basal cells from either the proximal or distal region of the epididymis and are able to secrete clusterin, a protein implicated in the maturation of spermatozoa. These data indicate that rat basal cells can be used to derive epididymal organoids and further support that notion that these may represent a stem cell population in the epididymis.

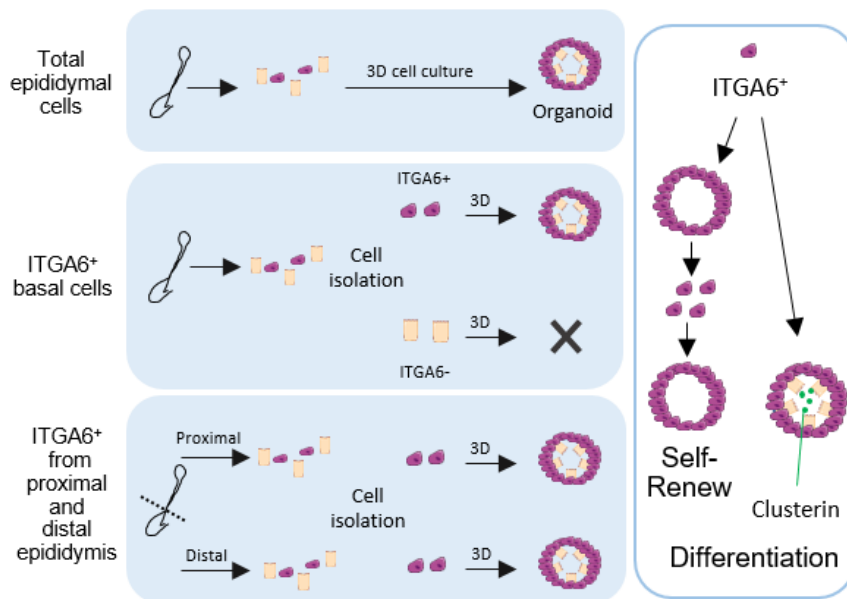


Figure 5.1 : Résumé graphique de l'article publié dans le journal « Biology of Reproduction »

5.2 Introduction

The epididymis is responsible for the acquisition of sperm motility and the ability to fertilize [1–3]. It is divided into four segments in the rodent: the initial segment, the caput, the corpus, and the cauda [4]. The epithelium is composed of various cell types, including principal, basal, clear, narrow, apical, dendritic, and halo cells [5, 6]. Principal cells are the predominant cell type. They line the lumen of the epididymis, have microvilli, and are responsible for the secretion of proteins that can bind to sperm for sperm maturation [3, 7]. Principal cells, along with clear and basal cells, contribute to the formation of the blood-epididymis barrier [8–10]. Basal cells are small cells located at the base of the epithelium and are in contact with the basement membrane [11, 12]. They are present throughout the epididymis and represent up to 20% of the total number of cells in the epithelium [11]. Clear and narrow cells are implicated in endocytosis and acidification of the lumen. Narrow cells are present only in the initial segment, while clear cells are present in the other segments of the epididymis [13–15].

The development of the epithelium has been well characterized in the rat and is divided into three stages [13, 16]. During the initial stage of proliferation, from birth until approximately postnatal day 14, the epithelium is composed of undifferentiated columnar cells. The period of differentiation begins with the development of halo cells at day 14 and the appearance of a few basal cells in the cauda epididymis which are present throughout the epididymis by day 21 [17, 18]. Principal cells can be identified morphologically at day 28, while clear and apical cells are present by day 35. Finally, there is a period of expansion of all cell types from day 44 to adulthood. While the timing of the appearance of different cell types in the epididymis is well established, there is little information regarding the origin of these different cell types and on the mechanisms regulating the differentiation of the epithelium.

The presence of stem cells in the adult epididymis has been a source of controversy [19]. Early morphological studies suggested that stem cells were present at the base of the epithelium and that these differentiated into columnar cells and subsequently into holocrine cells [20]. However, the presence of holocrine cells and the extent of cellular differentiation in the epididymis have not been reported in subsequent studies. Based on observations under the light microscope, studies of Clermont and Flannery reported that in adult rats treated with tritiated thymidine, cell division in the epididymis occurred in both principal and basal cells, but that the low mitotic indices

suggested the absence of stem cells [21]. However, many studies have subsequently indicated that quiescent stem cells may be present in epithelia of various tissues and that these become activated following tissue damage [22–24].

Studies using efferent duct ligation and orchidectomy showed that basal cells survive and change morphology following loss of seminal fluid input from the testis [25–27]. Furthermore, it has been shown that principal and basal cells degenerate by apoptosis following efferent duct ligation in the mouse, but a subset of basal cells survives. These cells exhibit increased proliferation 2 days after the ligation and the epithelium returns to normal by 5 days after surgery [25, 28]. In another study, it was observed that following efferent duct ligation, apoptotic principal cells were replaced by new principal cells, which preserved epithelial integrity [27]. Similar results were also noted following hypophysectomy in the rat, suggesting that hormones may be implicated in initiating changes in basal cells [26]. These regeneration mechanisms imply the presence of progenitor or stem cells in the epididymis.

In the human, epididymal cells can form spheroid structures, a characteristic of stem cells [29]. Using microarray analysis of purified basal cells from rat, our laboratory has shown that these cells share common properties with adult stem cells. These cells express stem cell markers, are able to form acini, and can differentiate *in vitro* [30]. Following 14 days of culture, these cells began to lose the expression of cytokeratin 5 (KRT5), a basal cell marker, and expressed connexin 26 (GJB2), a marker of undifferentiated columnar cells [30, 31]. However, culture of basal cells under two-dimensional (2D) conditions is limited and cannot maintain long-term differentiation of cells.

In recent years, the development and use of 3D cell culture models have indicated that these are more representative of the *in vivo* system. The culture of stem cells in 3D allows cells to proliferate and differentiate to form mini-organs, or organoids [32]. Organoids mimic the early development of an organ into its adult stage or the regeneration of a tissue and can be formed by embryonic or adult stem cells [33]. Organoids have been derived from stem cells of numerous tissues including the intestine, colon, stomach, pancreas, esophagus, prostate, liver, lung, fallopian tube, and mammary gland [34]. There are multiple studies that have used a broader definition of the term organoid, in which differentiated cells are cultured under 3D conditions and

used to form physiologically functional mini-organ systems. This latter approach has been reported in the testis and in the epididymis [35–40].

Organoids thus represent novel tools to characterize the physiological, cellular, and molecular regulation of organs [33, 41]. Prostate-derived organoids have been used to understand how intercellular communication between the basal and luminal cells regulates the differentiation of prostate basal cells, while an olfactory epithelium organoid model has demonstrated the role of Notch signaling in regulation of proliferation and terminal differentiation of leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5)-positive olfactory stem cells [42, 43]. In a variety of epithelia, including urothelial, vaginal, mammary, and airway, studies have shown that basal cells are responsible for the formation of organoids *in vitro* [44–47]. In the mouse epididymis, KRT5-positive basal cells were able to form organoids composed of basal and clear cells [39]. When injected subcutaneously into nude mice, these basal cells were able to form spheroid structures composed of basal and principal cells [39].

Previous studies from our laboratory have shown that rat basal cells share common properties with adult stem cells [19, 30]. The objectives of the present study were to determine whether or not isolated rat basal cells have the ability to form organoids in 3D culture, if these cells can self-renew, and whether or not they can differentiate under *in vitro* culture conditions.

5.3 Materials and methods

Animals and tissues collection

Male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Laboratories, Inc. (Saint-Constant, QC; Fairfield, New Jersey) and acclimated for 1 week under a constant photoperiod (12L:12D), with food and water ad libitum. At the time of sampling, rats (48 days) were euthanized by CO₂ exposure and cervical dislocation. Epididymides were collected and dissected free from testis and fat. Tissues used for immunofluorescence were frozen in OCT compound (ThermoFisher Canada, Ottawa, ON) on dry ice and stored at –80°C until sectioning. Epididymides used for RNA extraction were frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Tissues used for cell culture were collected under aseptic conditions and placed in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)/nutrient F12 Ham culture media (Gibco, ThermoFisher) containing

penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON). All animal protocols used in this study were approved by the University Animal Care Committee.

Epithelial cell isolation

Under aseptic conditions, total epididymides or proximal (initial segment, caput, and corpus) and distal (cauda) epididymides were cut into small fragments (2–3 mm) and placed in DMEM/nutrient F12 Ham medium (Gibco, ThermoFisher) containing antibiotics and digested with two successive incubations (50 min) with collagenase (2 mg/ml; Gibco, ThermoFisher) at 37°C in a shaking water bath. Cells were dissociated by gently pipetting the small tissue fragments and allowing the cells to settle to the bottom of the flask. The supernatant was then replaced with fresh digestion medium. Following the second digestion, tissue fragments were placed in culture medium containing 0.05% trypsin-tetrasodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate (trypsin-EDTA; Gibco, ThermoFisher) for 10 min at 37°C in a shaking water bath. Trypsin activity was stopped by the addition of DMEM/HAM F12 medium (Gibco, ThermoFisher) containing antibiotics and 5% fetal bovine serum (FBS; Sigma Aldrich). Cells were collected by centrifugation (34g) for 5 min, resuspended in cold DMEM/HAM F12 medium, and successively passed through three nylon filters of 100, 70, and 40 µm. An aliquot of cells was then counted using a hemocytometer. Total epididymal cells were used for magnetic-activated cell sorting (MACS) or for cell culture as described below.

Magnetic-activated cell sorting

Cell populations were isolated as previously described [30]. Briefly, cells were centrifuged and suspended in filtered, cold, MACS buffer (2 mM EDTA, 0.5% BSA in PBS, pH 7.2), and incubated with a monoclonal antibody against integrin-α6 (ITGA6; 1 µg/10⁶ estimated basal cells; Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON) on ice for 20 min. Cells were washed in MACS buffer, collected by centrifugation, and incubated for 15 min on ice with anti-mouse IgG microbeads (20 µl of beads in 80 µl of cold MACS buffer; Miltenyi Biotec, Cambridge, MA). Cells were washed, suspended in cold MACS buffer, and placed on a MACS MS separation column (Miltenyi Biotec). The column was placed in a magnetic stand (Miltenyi Biotec). Cells that were eluted through the column first were considered the ITGA6-negative cell fraction. The column was then rinsed with MACS buffer, removed from the magnetic stand, and the cells were eluted in fresh MACS buffer (1 ml). This was designated as the ITGA6-positive cell fraction, which contained an enriched

population of basal cells. The cells collected in the ITGA6-positive cell fraction were further purified by a second passage through a magnetic separation column. The number and viability of cells were verified using Trypan Blue exclusion, and an aliquot of cells was placed on a glass microscope slide to evaluate the purity of the preparation using KRT5 immunostaining, a specific marker of basal cells, as previously described [30]. Using this approach, we were able to consistently obtain an $87.0 \pm 4.7\%$ enrichment of KRT5-positive basal cells while only $3.6 \pm 2.4\%$ of KRT5-positive cells were present in the ITGA6-negative cell fraction.

Cell culture

A total of 25 000–50 000 viable cells from each fraction or from total cells was centrifuged at 300g for 5 min and suspended in 50 μ l of culture medium containing a 1:1 ratio of cold Gibco-Advanced DMEM/F12 (ThermoFisher)/Growth Factor d Matrigel (Phenol red free; Corning, Lowell, MA). Homogeneous suspensions were deposited as 50 μ l drops in the middle of a well in a 24-well cell culture plate and placed upside down in a 37°C incubator for 30 min to allow the Matrigel to solidify. Culture medium (see below) was added to the drops and cells were maintained at 32°C in a CO₂ incubator. Half of the medium was replaced every 2–3 days.

The culture medium was composed of Advanced DMEM/F12 medium, epidermal growth factor (EGF; 10 ng/ml, Gibco, ThermoFisher), basic fibroblast growth factor (bFGF; 10 ng/ml, Sino Biotechnologies, Wayne, PA), heparin (4 μ g/ml, Gibco, ThermoFisher), dihydrotestosterone (DHT; 10 nM, Sigma-Aldrich), hydrocortisone (80 ng/ml, Sigma-Aldrich), cAMP (10 ng/ml, Sigma-Aldrich), Glutamax (1X, Gibco, ThermoFisher), HEPES (10 mM, Biobasic, Markham, ON), N-acetylcysteine (1.25 mM, Sigma-Aldrich), tocopherol (200 ng/ml, Sigma-Aldrich), and a selective inhibitor of TGF- β type I receptor ALK5 kinase (A83-01; 250 nM, Sigma-Aldrich). DHT, EGF, bFGF, and heparin were shown previously as being required for the formation of spheroid acinar structures in 2D cell cultures [30]. A8301 has been used to maintain the proliferation of various types of stem cells in culture [48, 49].

Cells were passaged every 8–10 days as follows. Medium was removed and organoids were incubated at 37°C with 1 ml of dispase (1 mg/ml, Gibco, ThermoFisher) until the Matrigel was completely dissociated. Organoids were collected by centrifugation (300g) for 7 min and suspended in trypsin-EDTA (0.05% W/V) for 10 min at 37°C. Trypsin activity was stopped with the addition of DMEM/HAM F12 medium containing antibiotics and 5% FBS. Cells were collected by centrifugation (300g) for 7 min, suspended in DMEM/HAM F12 medium, and passed through

a 27-gauge needle until a single cell suspension was obtained. An aliquot of cells was then counted with a hemocytometer. After passage, cells were cultured in culture medium with the addition of an inhibitor of the ROCK signaling pathway (Y27632; 10 μ M, Peprotech, Rocky Hill, NJ), cholera toxin (100 ng/ml, Sigma-Aldrich), an activator of the WNT pathway (R-spondin1; 500 ng/ml, Peprotech), and/or an inhibitor of the BMP pathway (noggin; 100 ng/ml, Peprotech). Noggin and R-spondin1 have been shown to induce the proliferation of various stem cells and the development of organoids and have been used in numerous organoid culture models [22, 50–54], while the inhibition of ROCK signaling prevents the dissociation-induced apoptosis of stem cells [55–58]. Cholera toxin has also been reported to be important for allowing self-renewal of corneal, mammary, and limbal stem cells [59–61].

Microscopy

Organoids were counted with a Nikon Eclipse Ti-S microscope (Nikon, Mississauga, ON) equipped with a Ds-Ri2 camera (Nikon). To evaluate the number of organoids, two parameters were used: (1) the total number of organoids counted in three different fields of view per drop and/or (2) the number of large organoids (diameter greater than 40 μ m) per drop. Organoids ($n = 50$) with a diameter greater than 40 μ m were measured per drop to evaluate their size. To follow specific organoids over time, a Cytation 5 Imaging Multi-Mode Reader (Biotek, Winooski, VT) was used, in which defined coordinates of the organoids were monitored and tracked throughout the organoid period of culture.

Immunofluorescence staining of tissue sections

Cryosections (10 μ m) of epididymides were fixed in ice-cold methanol for 10 min at -20°C . After rehydration in PBS, sections were permeabilized in a solution of 0.3% Triton X-100 (Fisher Scientific, Ottawa, ON) in PBS at room temperature for 15 min. Sections were incubated with blocking solution (5% bovine serum albumin [BSA] in PBS) for 30 min and subsequently incubated with primary antibody (Supplemental Table 1) diluted in blocking solution overnight at 4°C . Sections were washed three times with PBS and then incubated with an anti-mouse Alexa 594 (4 μ g/ml; Life Technologies, ThermoFisher) or an anti-rabbit Alexa 488-conjugated secondary antibody (4 μ g/ml; Life Technologies, ThermoFisher) at room temperature for 30 min in blocking buffer containing Hoechst dye (1 μ g/ml; Biotium, Scarborough, ON). Finally, sections were washed three times with PBS and mounted with Fluoromount (Southern Biotech, Birmingham,

USA). Tissues incubated without primary antibody were used as a negative control. Immunofluorescence was examined under a Nikon A1Plus confocal microscope and images analyzed with the NIS-Elements AR software (Nikon).

Immunofluorescence staining of organoids

Organoid culture drops were rinsed with PBS and fixed with ice-cold methanol for 20 min at -20°C . Cells were then rinsed three times with 0.75% glycine (ThermoFisher) in PBS for 10 min, permeabilized with 0.3% Triton-X-100 (ThermoFisher) in PBS for 15 min, and incubated in blocking solution (5% BSA in PBS-Glycine or 5% Donkey Serum in PBS-Glycine for the clusterin staining) for 90 min. Immunolabeling was done using different primary antibodies (Supplemental Table 1) diluted in blocking solution and incubated overnight at 4°C . Organoids were washed in PBS and incubated at room temperature for 90 min with an anti-mouse Alexa Fluor 594-conjugated antibody (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Life Technologies, ThermoFisher), an anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated antibody (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Life Technologies, ThermoFisher), or an anti-goat Alexa 647-conjugated antibody (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) containing Hoechst dye (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Biotium). Slides were mounted in Fluoromount (Southern Biotech). Organoids incubated without primary antibody were used as a negative control. Immunofluorescence was examined under a Nikon A1Plus confocal microscope, and images were analyzed with the NIS-Elements AR software (Nikon).

Electron microscopy

Matrigel was digested with 1 ml of dispase (1 mg/ml, Gibco, ThermoFisher) at 37°C , and organoids were collected by centrifugation (300g) for 7 min. Organoids were then washed and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) (Mecalab, Montreal, QC) overnight at 4°C . Fixed organoids were washed three times for 15 min with 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 3% sucrose (Sigma-Aldrich). Organoids were post-fixed in 1.33% osmium tetroxide (Mecalab) in Collidine buffer (EMS, Burlington, ON), washed, and dehydrated with graded acetone and propylene oxide. The samples were then embedded in SPURR (Ted Pella, Redding, CA) and polymerized at 60°C for 24 h. Thin sections (50 nm) were cut with an ultramicrotome and stained with uranyl acetate (15 min) and lead citrate (5 min). Grids were examined using a Hitachi H-7100 transmission electron microscope equipped with an AMT XR100 camera.

Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total cellular RNA was isolated from proximal (initial segment, caput and corpus) and distal (cauda) adult rat epididymis. Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. An aliquot of RNA (20 ng) was reverse transcribed using qScript cDNA SuperMix (Quanta BioSciences, Beverly, MA) and RT-qPCR was performed using the PerfeCTa SYBR Green SuperMix (Quanta Biosciences). RT-qPCR was done using a Rotor-Gene RG3000 (Corbett Life Science, Mortlake, NSW, Australia). Primers were designed using Primer Blast software (NCBI) and Oligo Primer Analyses Software (Molecular Biology Insights, Cascade, CO). The sequences of the primers are listed in Supplemental Table 2. Standard curves using appropriate cDNA were created for all genes examined and used to calculate relative expression levels. Relative mRNA levels of target genes of interest were normalized to the 18S rRNA. All samples were done in triplicate.

For cultured organoids, medium was removed and Matrigel containing organoids was incubated at 37°C with 1 ml of dispase (1 mg/ml, Gibco, ThermoFisher) until the Matrigel was dissociated. Organoids were collected by centrifugation (300g) for 7 min and suspended in PBS. They were then centrifuged and washed twice in PBS and subsequently lysed in 350 µl of lysis buffer (Macherey-Nagel). RNA was then isolated, reversed transcribed, and used for RT-qPCR as described above.

Statistics

Each experiment contained three replicates and was repeated at least twice unless otherwise indicated. Statistical analyses were done using GraphPad Prism (version 6; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Values are presented as mean ± SEM. Statistical significance was calculated using a Student t-test when two conditions were compared and an ANOVA test with a Holm-Sidak multiple comparison test when more than two conditions were compared. P values ≤0.05 were considered significant.

5.4 Results

Epididymal cells can form organoids

Culture of dispersed total epididymal cells under 3D conditions in Matrigel resulted in the formation of cellular spheres, consistent with the structures of organoids reported in other tissues (Figure 5.2). These organoids formed a lumen and could grow to a diameter of 500 μm after 13 days in culture. To determine whether or not epididymal organoids originated from the basal or the non basal cellular compartments of the epithelium, we isolated basal cells from the epididymis using magnetic separation of ITGA6-positive basal cells [30].

3D cell cultures were established from both ITGA6-positive and negative cell fractions (Figure 5.3A). Organoids were first observed after 2 and 7 days of culture, respectively (Figure 5.3D), while organoids exceeding 40 μm in diameter were observed only after 4 and 7 days of culture, respectively (Figure 5.3E). Following 9 days of culture, organoids were more numerous in the ITGA6-positive cell fraction (Figure 5.3B and C). After 11 days of culture, only 2.1 ± 0.8 organoids per field of view were observed in the ITGA6-negative cell fraction, compared with 36.0 ± 0.7 organoids in the ITGA6-positive cell fraction (Figure 5.3D). Following 11 days of culture, 23.7 ± 2.9 organoids displayed a diameter greater than 40 μm in the drops from the ITGA6-negative cell fraction, as compared to 671 ± 57 organoids in the drops from the ITGA6-positive cell fraction (Figure 5.3E).

Organoids are derived from single basal cell of the epithelium

Using coordinate positioning of different cells and following them over time, we confirmed that epididymal organoids were derived from a single cell and were not the result of cell clusters (Figure 5.4A). Furthermore, organoids derived from ITGA6-positive cells were generally larger than those in the ITGA6-negative cell fraction, although there were insufficient organoids in the ITGA6-negative cell fraction to allow a robust evaluation of their size. We did not observe any other gross morphological differences between the organoids of the two isolated cellular fractions (Figure 5.4A).

To confirm that organoids were derived from basal cells, immunofluorescence staining of organoids at 7 days of culture in the ITGA6-negative and positive cell fractions was done (Figure

5.4B). All early organoid structures observed in both cell fractions stained positively for three different markers of basal cells: KRT5, TP63 (tumor protein 63), and connexin43 (GJA1) [12, 17, 18, 62]. There was no staining for the principal cell marker, aquaporin 9 (AQP9) [63, 64] (Figure 5.4B). This suggested that organoids derived from cells in the ITGA6-negative cell fraction were derived from residual basal cells. There was no immunostaining observed in the negative controls.

Self-renewal of epididymal organoids

To study the self-renewal of basal cells, organoids in the ITGA6-positive cell fraction were dissociated into single-cell suspensions. We were able to maintain newly formed organoids for at least 13 passages, demonstrating the ability of these basal cells to self-renew (Figure 5.5A), a characteristic of stem cells. No apparent gross morphological differences between organoids generated from different passages were observed (Figure 5.5A). However, single cells were unable to reinitiate the formation of organoids when cultured in the same medium (Figure 5.5B). Organoids cultured in medium supplemented with Y27632 (iROCK), an inhibitor of the ROCK signaling pathway, cholera toxin, R-spondin1, and noggin, were able to stimulate the formation of new organoids. Interestingly, the use of each of these factors individually was not sufficient to reinitiate organoid formation, but they were effective as a mixture (Figure 5.5B). The number of organoids derived from similar numbers of seeded cells did not vary between passages (Figure 5.5C). These results indicate that basal cells of the epididymis have the ability to self-renew under 3D culture conditions.

Differentiation of epididymal organoids

Immunofluorescent staining of organoids derived from the ITGA6-positive cell fraction and cultured for 7 days indicated that most organoids did not display a defined lumen. All of these organoids, however, were composed of cells that were immunopositive for KRT5, TP63, GJA1, and Claudin-1 (CLDN1), all markers of basal cells. None of the organoids that were examined displayed AQP9 immunostaining, a well-defined marker of principal cells (Figure 5.6A). The cells of the organoids also stained positively for the proliferative cell nuclear antigen (PCNA), tight junction protein 1 (TJP1, also known as Zonula Occludens 1 [ZO1]), and many of the organoids displayed mitotic figures, indicating that the cells within the organoids were proliferating. After 14 days of culture, a well-defined lumen was observed in the organoids. Many, but not all, of the cells maintained PCNA immunostaining, while most of the cells were KRT5 positive (Figure 5.6A).

Immunostaining for KRT5, TP63, GJA1, and CLDN1 was localized at the periphery of the organoids. A small decrease in the number of cells positive for TP63 in organoids was observed at this time (Figure 5.6B). After 14 days of culture, approximately 40% of organoids superior to 40 μm in size displayed AQP9 immunostaining in the apical region of the cells of the inner cell structure (Figure 5.6C), suggesting that some basal cells had begun to differentiate into principal cells. qPCR analysis confirmed this differentiation of basal cell, with increased mRNA levels of AQP9 and CFTR, which are both markers of principal cells (Figure 5.5D and E).

Transmission electron microscopy of organoids after 14 days of culture confirmed the presence of different cell layers surrounding the lumen of the organoid (Figure 5.7A). Three types of cells could be identified by electron microscopy: basal cells with small round-shaped nuclei, basal cells with irregularly shaped small nuclei, and principal cells with large oval-shaped nuclei (Figure 5.7A). The cells surrounding the lumen of organoids appeared to be polarized, displayed an extensive number of microvilli, and exhibited tight junctions between neighboring cells (Figure 5.7B and C).

Basal cells from proximal and distal epididymis are able to form organoids

To assess whether or not basal cells of different regions of the epididymis had the ability to form organoids, epididymides were subdivided in two regions (proximal [initial segment, caput, and corpus] and distal [cauda]) prior to epithelial cell isolation and MACS.

3D cell cultures were established with basal cells from both proximal and distal regions. Organoids exceeding 40 μm in diameter were first observed in cells derived from both regions after 4 days in culture (Figure 5.8A). Following 14 days of culture, 390 ± 6 organoids displayed a diameter greater than 40 μm in the drops from the proximal region, as compared to 651 ± 43 organoids in the drops from the distal region (Figure 5.7A). Organoids formed from basal cells of the proximal region have a larger diameter than those formed from the distal region (Figure 5.8B). No other morphological differences were observed between organoids from the two regions (Figure 5.8C and D).

To determine if the differentiation of basal cells into principal cells varied between the two regions, relative mRNA levels of three principal cell markers (AQP9, CFTR, and Clusterin [CLU]) were assessed in both epididymal tissue and in organoids derived from basal cells of the proximal and distal epididymis following 7 and 14 days of culture (Figure 5.8E and F). Levels of CLU, CFTR, and AQP9 transcripts were significantly higher in the proximal region of adult rat

epididymis compared to the distal region (Figure 5.8E). In organoids, there was an increase in relative mRNA levels of these three principal cell markers at the day 14 as compared to those at day 7 of culture, confirming the differentiation of basal cells into principal cells from both regions of the epididymis (Figure 5.8F). Interestingly, while there were no differences in relative mRNA levels of AQP9 and CFTR between organoids derived from the proximal and distal epididymis after both 7 and 14 days of culture, there were significantly and reproducibly lower levels of CLU mRNA in organoids derived from distal epididymis after 14 days of culture (Figure 5.8F).

Unlike AQP9 and CFTR, CLU is a secreted protein that binds to developing spermatozoa during epididymal transit. Immunofluorescence staining of CLU indicates that the protein is present in the cytoplasm of some cells surrounding the lumen, as well in the lumen of differentiated organoids from both the proximal and distal epididymis. This suggests that the principal cells of the organoids are physiologically functional. No staining was observed in the negative control (Figure 5.8G–I).

Presence of clear/narrow cells in organoids

To evaluate the ability of basal cells to differentiate into clear/narrow cells, we measured the expression levels of three markers of clear/narrow cells in proximal and distal regions of adult rat epididymis and in organoids after 7 and 14 days of culture. The relative mRNA levels of FOXI1 and ATP6V0D2 were higher in the distal region of adult rat epididymis compared to the proximal region while there were no significant differences in the relative mRNA levels of ATP6V1G3 (Figure 5.9A). In organoids, we observed a decrease in the relative mRNA levels of FOXI1, ATP6V0D2, and ATP6V1G3 between days 7 and 14 of culture. mRNA levels of FOXI1 and ATP6V0D2 were higher in the distal region at day 7 when compared to levels in the proximal region while there were no region-specific differences at day 14. There were no differences in mRNA levels of ATP6V1G3 between regions at day 7 and 14 (Figure 5.9B). To determine whether or not clear/narrow cells detected on day 7 are cells differentiated from basal cells or residual clear/narrow cells present in the ITGA6-positive cell fraction, we performed immunofluorescence staining of cells after sorting (d0) with a clear/narrow cell marker (Figure 5.9C). The results demonstrated the presence of approximately 5% of residual clear/narrow cells in the ITGA6-positive cell fraction. Few of these cells, however, were found within differentiating organoids, as the vast majority (approximately >97%) of organoids after 7 and 14 days of culture were negative for ATP6V1B2, suggesting that the residual clear/narrow cells present in the ITGA6-positive cell

fraction were not derived from basal cells and that these cells could not be maintained under culture conditions (Figure 5.9D).

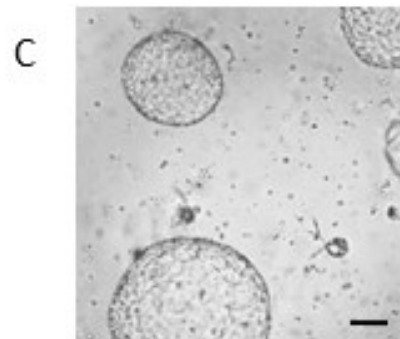
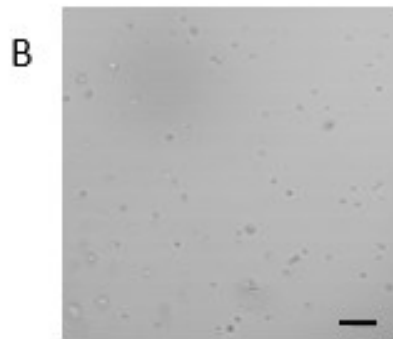
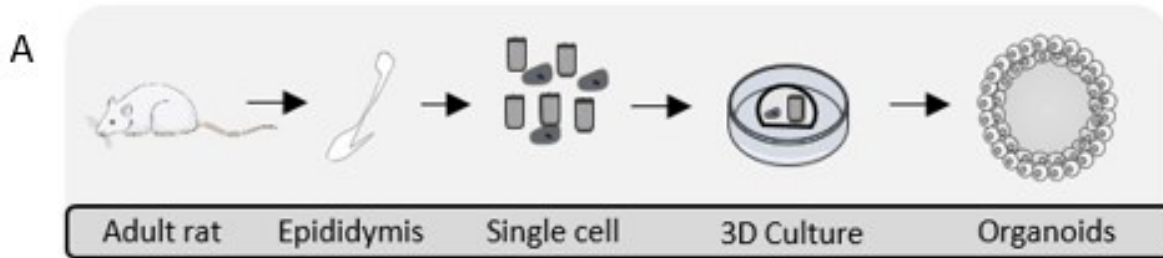


Figure 5.2: Formation of organoids by total epididymal cells.

(A) Epididymides from adult rats were sampled and enzymatically digested to obtain a single-cell suspension. Cells were cultured in Matrigel under 3D conditions to generate organoids. (B, C) Bright-field images of epididymal cells on the first day of culture (B; day 0) and after 13 days (C). Typical organoids displayed a morphology consistent with organoids reported for other tissues (Scale bar, 300 μ m).

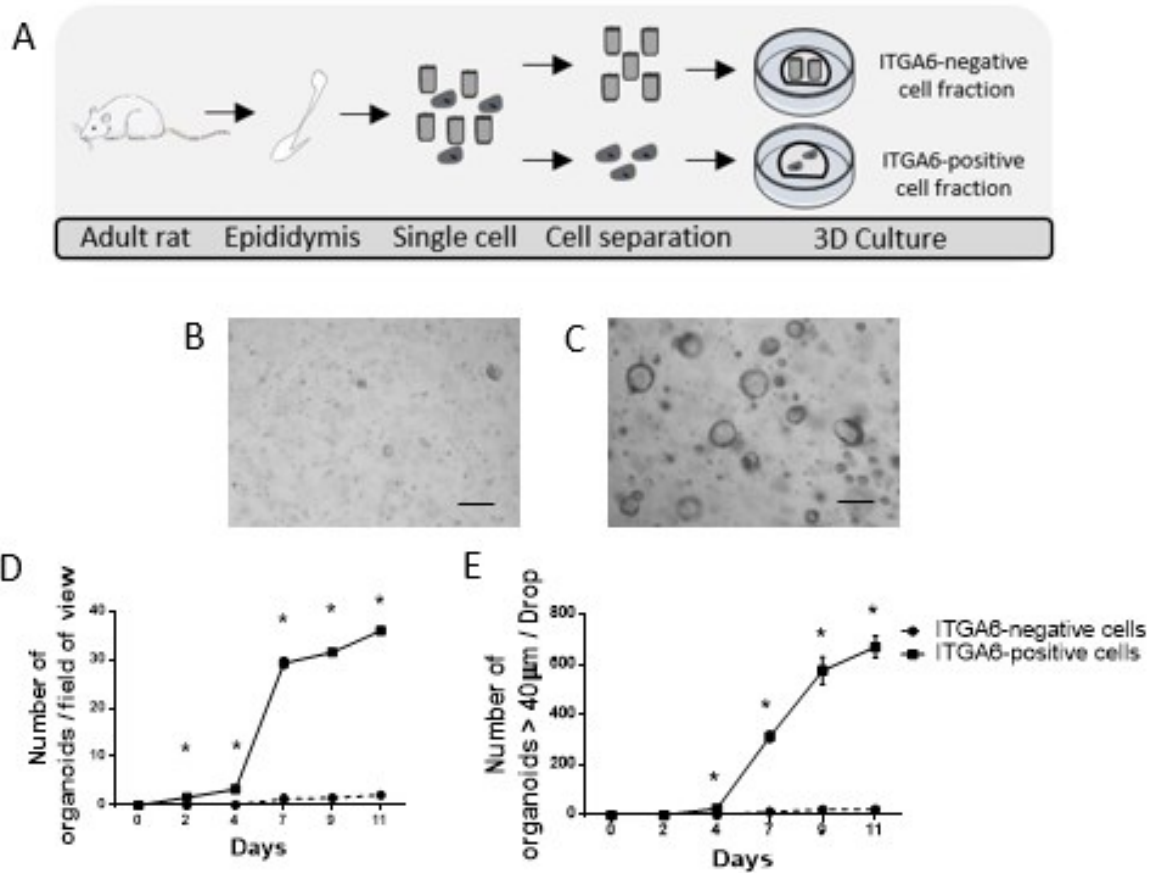


Figure 5.3: Formation of organoids from ITGA6-negative and positive epididymal cell fractions.

(A) Epididymides from adult rats were sampled and enzymatically digested to obtain single-cell suspensions. Magnetic separation using an ITGA6 antibody yielded ITGA6-negative and ITGA6-positive cells. Cells were cultured in Matrigel under 3D conditions. (B, C) Bright-field photomicrographs of organoids derived from the ITGA6-negative (B) and ITGA6-positive (C) cell fractions after 9 days of culture (Scale bar, 300 μm). Very few organoids were observed in the ITGA6-negative cell fraction, whereas many organoids were observed in the ITGA6-positive cell fraction. Number of organoids per field of view (D) and number of organoids greater than 40 μm in diameter per drop (E; $n = 3$ per time point). Experiments were repeated three times. *Multiple t test, $P < 0.05$.

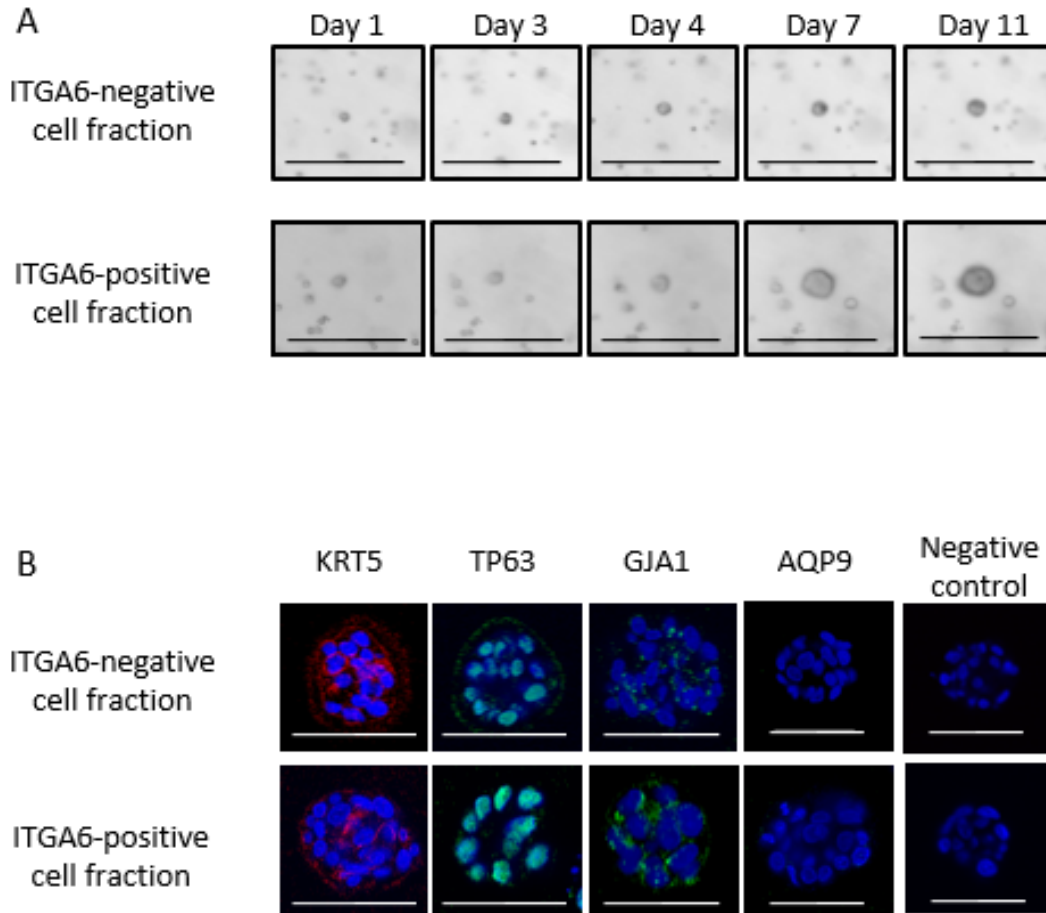


Figure 5.4: Formation of organoids in the ITGA6-negative and positive cell fractions.

(A) Single cells from the ITGA6-negative and positive cell fractions were cultured in Matrigel under 3D conditions. Bright-field illumination shows the development of organoids from a single cell from either the ITGA6-negative or ITGA6-positive cell fraction (Scale bar, 300 μ m). (B) Confocal microscopy images of organoids immunostained after 7 days of culture with three basal cell markers (KRT5, TP63, GJA1) and the principal cell marker (AQP9) (Scale bar, 50 μ m). Epididymal organoids in the two fractions expressed all three basal cell markers and did not express the principal cell marker.

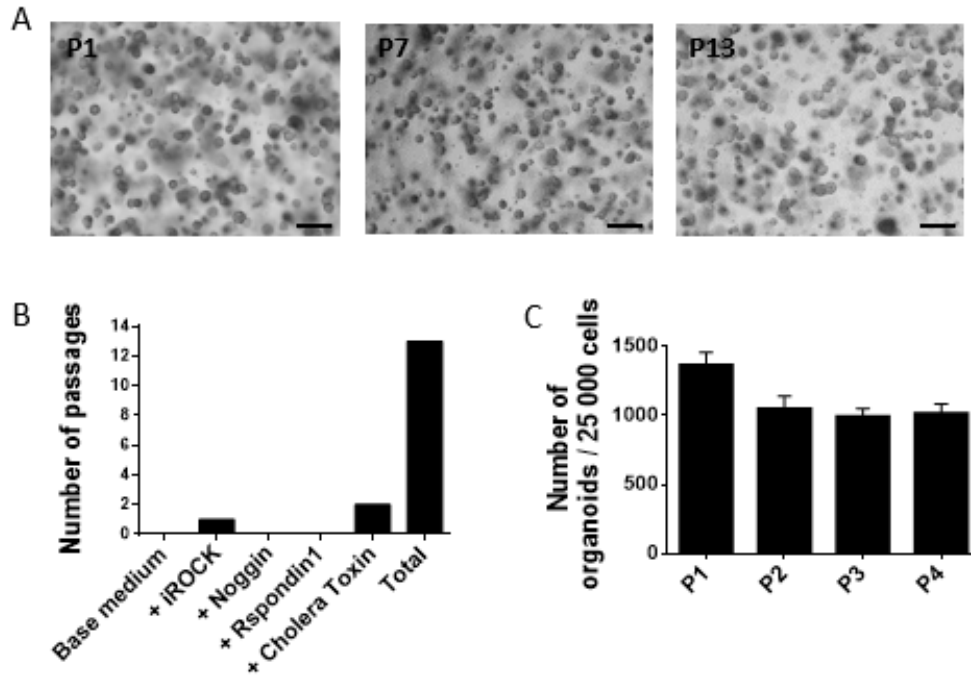


Figure 5.5: Assessment of self-renewal ability of basal cells.

(A) Bright-field photomicrographs of organoids at different passages (1, 7, and 13) (Scale bar, 300 μm). No morphological differences were observed between different passages. (B) Number of passages of epididymal basal cells in culture according to the composition of the medium. The base medium supplemented with a ROCK inhibitor, noggin, R-spondin1, and cholera toxin generated 13 passages of organoids from a primary basal cell culture (complete medium). (C) Number of organoids per drop after 7 days of culture in complete medium in different passages ($n = 3$ per passage). No significant differences between passages were observed.

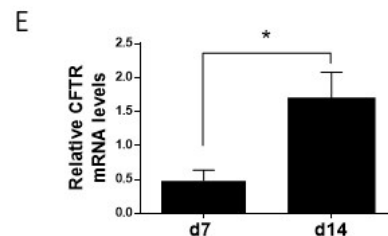
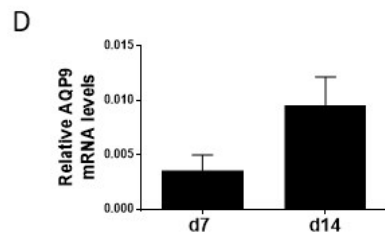
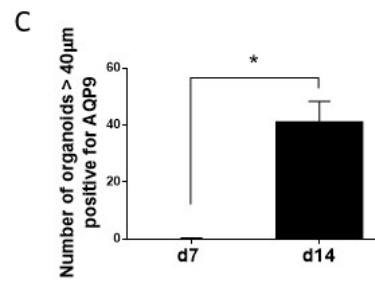
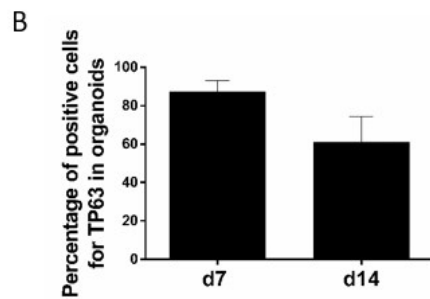
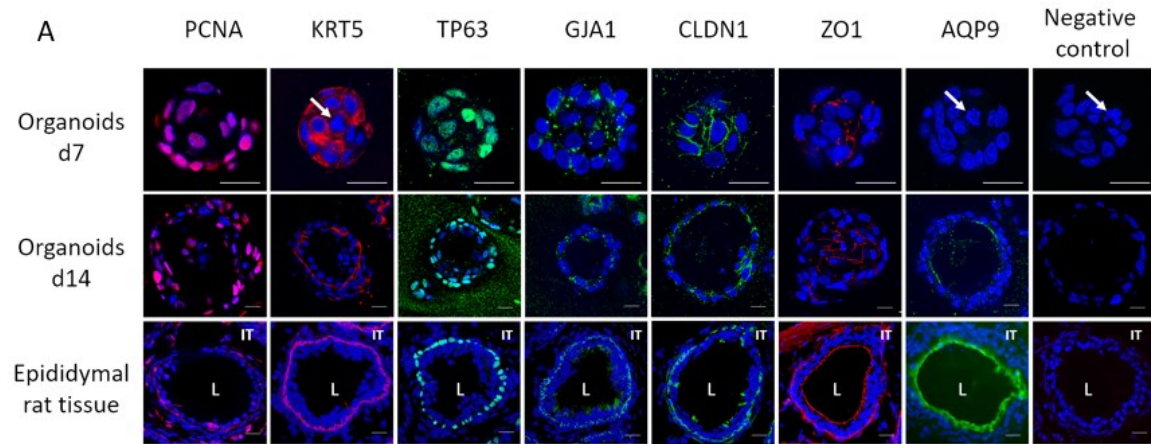


Figure 5.6: Analysis of organoids in the ITGA6-positive cell fraction after 7 and 14 days of culture.

(A) Confocal microscopy images of organoids derived from the ITGA6-positive cell fraction immunostained with PCNA, KRT5, TP63, GJA1, CLDN1, TJP1, and AQP9. Organoids were immunostained after 7 and 14 days of culture. Arrows indicate mitotic figures. After 7 days of culture, the organoids were small, lacked a lumen, and expressed markers of basal cells (KRT5, TP63, and GJA1, CLDN1). After 14 days of culture, the organoids were larger, displayed a lumen, and showed an AQP9 immunoreaction in some organoids, while markers for basal cells appeared localized to the base of the organoids, similar to that observed in epididymides of 48-day-old rats (Scale bar, 20 μ m). (B) Percentage of TP63-positive cells in organoids (20 organoids were analyzed in three different drops per time point). The experiment was repeated twice. (C) Number of organoids greater than 40 μ m in size that were positive for AQP9 (all organoids were analyzed in three different drops per time point). The experiment was repeated three times. (D, E) mRNA levels of CFTR and AQP9 after 7 and 14 days of culture (n = 3 per time point). The experiment was repeated three times. *Student test, P < 0.05.

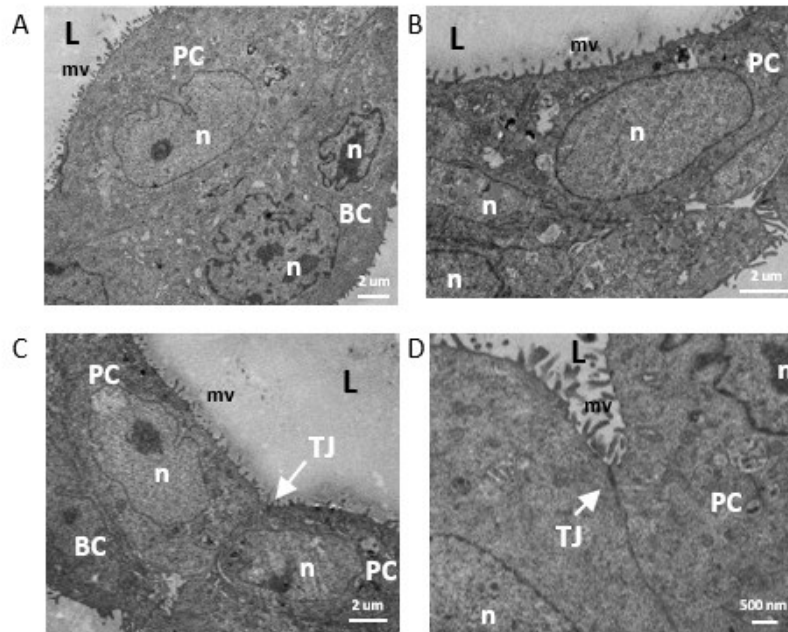


Figure 5.7: Electron micrographs of epididymal organoids.

Organoids generated from ITGA6-positive cells were analyzed after 14 days in culture. (A, B) Single basal cells were able to proliferate and differentiate into organoids with a lumen (L) and different cell layers composed of basal cells (BC) and principal cells (PC). The apical surface lining the lumen contained abundant microvilli (mv), which were generally absent at the base of the organoid. These cells displayed a well-developed Golgi apparatus, smooth and rough endoplasmic reticulum, mitochondria, endosomes, and lysosomes. (C) Some of the cells that lined the lumen of the organoid had irregular-shaped nuclei (n) and appeared to form tight junctions (TJ). (D) High magnification photomicrographs showing a tight junctional complex between two adjacent cells lining the organoid lumen.

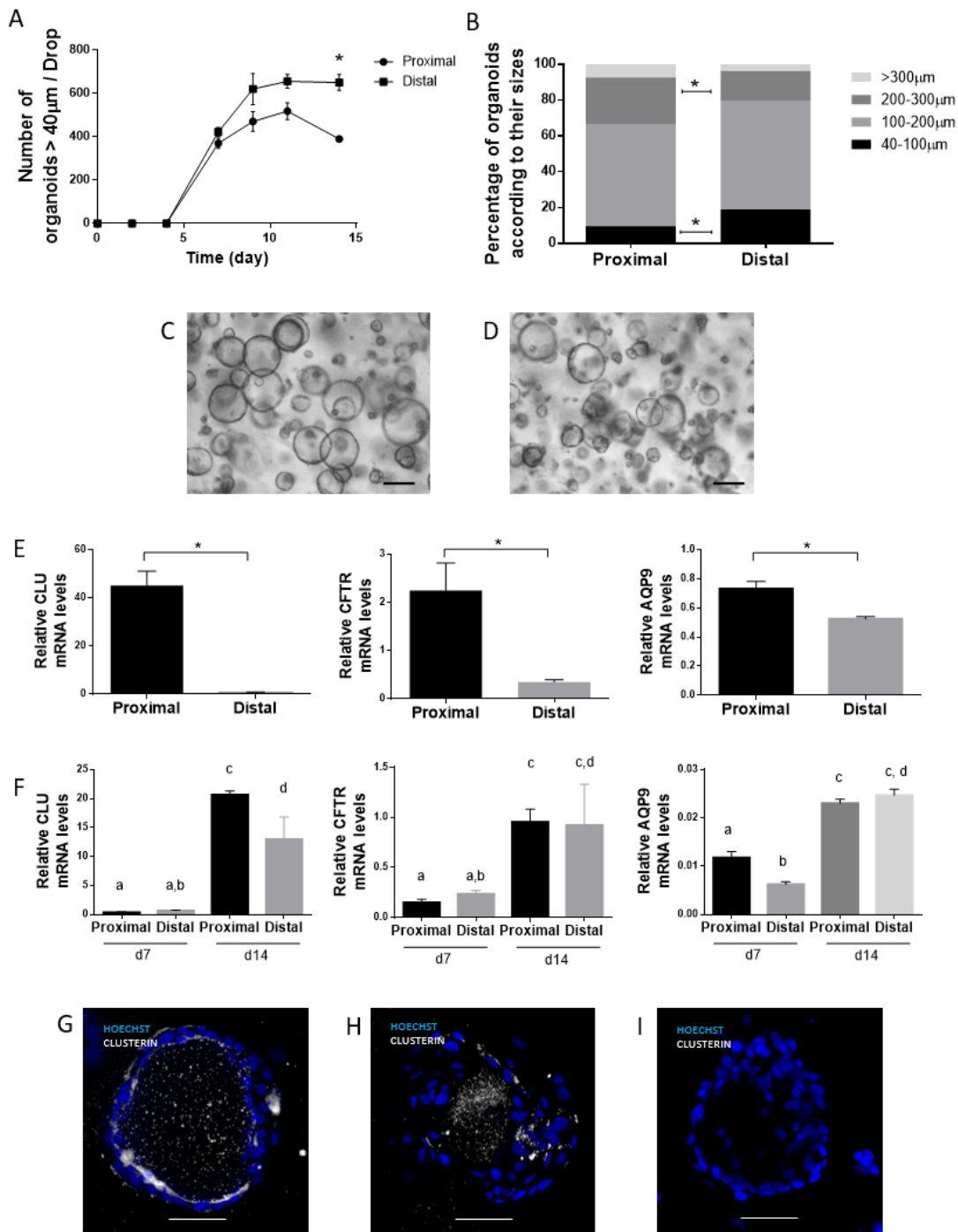


Figure 5.8: Formation of organoids from ITGA6-positive cells isolated from the proximal and distal adult epididymis.

(A) Number of organoids greater than 40 μm in diameter, in the different regions of the epididymis (n = 3 per time point). The experiment was repeated twice. *Multiple t test, P < 0.05. (B) Size of organoids greater than 40 μm in diameter from the proximal and distal regions of the epididymis. A total of 50 organoids with a diameter greater than 40 μm in three separate culture drops were used to assess diameters. *Multiple t test, P < 0.05. Bright-field photomicrographs

of organoids derived from the ITGA6-positive cells of proximal (C) and distal (D) adult epididymis after 14 days of culture (Scale bar, 300 μm). (E) mRNA levels of CLU, CFTR, and AQP9 in epididymis from 48-day-old rats (n = 3; *Student test, P < 0.05). (F) CLU, CFTR, and AQP9 mRNA levels after 7 and 14 days of 3D basal cell culture from proximal and distal epididymal regions (n = 3 per time point). *ANOVA and Holm-Sidak multiple comparisons test, P < 0.05. Immunofluorescent staining of CLU in organoids formed by the basal cells from the proximal (G) and (H) distal regions of rat epididymis after 14 days of culture. (I) Organoids incubated in the absence of primary antibody were considered as negative controls (Scale bar, 50 μm).

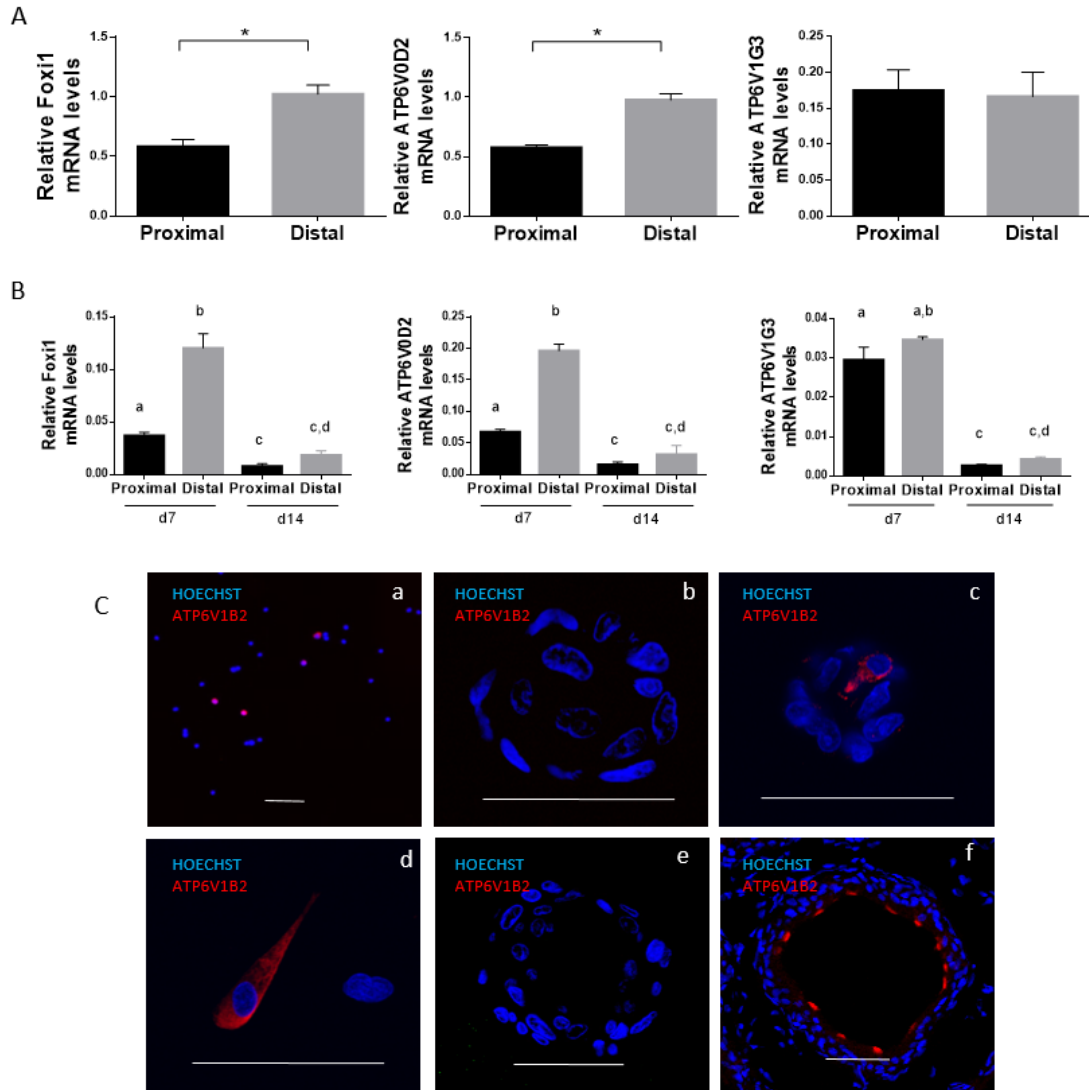


Figure 5.9: Assessment of clear/narrow cells in cultured organoids.

(A) mRNA levels of FOXI1, ATP6V0D2, and ATP6V1G3 in the epididymis from 48-day-old rats ($n = 3$; *Student test, $P < 0.05$). (B) mRNA levels of FOXI1, ATP6V0D2, and ATP6V1G3 after 7 and 14 days of culture of basal cells from the proximal and distal epididymal regions ($n = 3$ per time point; *ANOVA and Holm-Sidak multiple comparisons test, $P < 0.05$). (D) Immunofluorescence staining for ATP6V1B2 in ITGA6-positive cell fraction at day 0 (a); organoids after 7 days of culture (b) and (c); in cells that did not form organoids after 7 days (d); in organoids after 14 days of culture (e); and in epididymal tissue sections (f) (Scale bar, 50 μ m).

5.5 Discussion

Basal cells are present in all pseudo-stratified epithelia, and their ability to proliferate and differentiate has been demonstrated in various organs, including the mammary gland, trachea, and prostate [65–69]. Previous studies have demonstrated that isolated rat basal cells share common properties with adult stem cells [30]. Furthermore, KRT5-positive basal cells implanted subcutaneously in nude mice for 40 days could differentiate into AQP9-positive principal cells [39].

Enzymatically dispersed total rat epididymal cells cultured in 3D with Matrigel and Advanced DMEM/F12 rapidly formed organoid structures, as we have shown previously for cells cultured in Prostagult cell culture medium [19]. To further characterize the properties of rat epididymal basal cells, we investigated whether or not these cells could form organoids under 3D culture conditions. Isolation of basal cells using magnetic separation and an ITGA6 antibody indicated that the formation of organoids was associated with isolated ITGA6-positive basal cells and that few cells in the ITGA6-negative cell fraction had the ability to form organoid structures. Furthermore, the few cells in the ITGA6-negative cell fraction that did form organoids expressed markers of basal cells, indicating that they were derived from basal cells that had not been selected out by the cell isolation protocol. Similar results were observed in urothelial cells in which basal cells, with a high expression of ITGA6 were able to form organoids *in vitro* with higher efficiency than cells expressing low levels of ITGA6 [44]. In another study, murine epididymal KRT5-positive basal cells isolated from KRT5ERCre:Isl-Td Tomato transgenic animals were cultured under 3D conditions and also developed organoid structures [39]. As such, results from the present study further support the notion that epididymal basal cells share common characteristics associated with resident stem cell populations observed in other types of epithelia.

To determine whether or not the organoids that were observed in 3D cell cultures were derived from a single cell, the development of organoids from a single cell in both ITGA6-positive and ITGA6-negative cell fractions was monitored over 11 days of culture. The results confirmed that epididymal organoids could be derived from a single cell. Previous studies had reported that under 2D culture conditions, principal cells could bind together into spherical structures; however, this differs from the present study, in which isolated basal cells were cultured in 3D conditions

and organoids were derived from a single cell [70]. Cells from the ITGA6-positive cell fraction appeared to form larger organoids than those in the ITGA6-negative cell fraction, suggesting that factors originating from other basal cells may influence the growth and development of epididymal basal cell organoids. Furthermore, not all epididymal basal cells formed organoids, suggesting that only a subpopulation of basal cells have the ability to proliferate and differentiate. Based on the efficiency of the basal cell isolation, the number of seeded cells, and the number of organoids greater than 40 μm formed at the end of the culture, it is estimated that approximately 1.8% of the basal cells have the ability to form organoids. This has also been reported in other tissues, in which only 2% of renal cells and 5% of prostate cells represent stem cells [71–73]. This suggests the existence of a subpopulation of basal cells with stem cell ability in the epididymis, comparable to previous reports of a subpopulation of basal cells in the murine and human prostate [74].

ITGA6-positive basal cell-derived organoids were dissociated into single-cell suspensions and were able to maintain their ability to form new organoids in culture in the presence of R-spondin1 and cholera toxin, and inhibition of the ROCK and BMP signaling pathways. Previous studies using stem cells from the human endometrium have shown that the long-term passage of adult stem cells requires the presence of Wnt3a, R-spondin1, Noggin, and EGF. Studies with stem cells of the intestine, the liver, and prostate have reported that either Noggin, R-spondin1, or Rock inhibitors was necessary for stem cell renewal [22, 52, 56, 75]. In the present study, isolated basal cells were able to maintain organoid formation for at least 13 passages, reflecting the ability of these cells to self-renew. We did not observe any morphological changes between organoids of different passages. Similar observations have been reported for organoids derived from stem cells in the intestine, liver, prostate, and endometrium [22, 39, 52, 75, 76]. While previous studies have suggested that there exists a low index of cell proliferation in the epididymis [19], the present data indicate that basal cells under 3D cell culture conditions have the ability to self-renew.

After 14 days of culture, 40% of the organoids were composed of basal cells, which had differentiated into principal cells. These cells expressed two principal cell markers (CFTR and AQP9), while several basal cell markers (P63, KRT5, CLDN1) were expressed by cells at the periphery of the organoids. These organoids resembled the same pattern of immunostaining as is observed in adult rat epididymis. A similar pattern of protein expression was observed with human epididymal epithelial cells grown under 3D conditions [40]. These organoids expressed KRT5, CLDN1, and TJP1 and were comprised primarily of basal cells [39, 40]. In the present

study, qPCR analysis and electron microscopy confirmed the presence of principal cells within our organoid model. Furthermore, cells displayed microvilli and formed tight junctions with neighboring cells. Interestingly, some of the cells which lined the lumen of the organoid displayed irregular nuclei. These are also present at the base of the epididymal epithelium and may represent a population of developing principal cells [30].

In the mouse, organoids cultured in the absence of androgens and derived from KRT5-positive basal cells were composed of basal and clear cells. In the same study, they observed the differentiation of basal cells into principal cells in organoids transplanted subcutaneously in a nude mouse and examined after 40 days [39]. In the present study, the medium contained DHT at a concentration comparable to that found in the epididymis, and which was previously shown to be important for the formation of acini in 2D basal cell culture [30]. In this medium, using ITGA6-positive basal cells, we observed the differentiation of basal cells into principal cells but not into clear/narrow cells after 14 days of culture. The presence of DHT in the medium may explain why basal cells in the present study differentiated primarily in principal cells. In the mouse, subcutaneous transplantation of basal cells would be exposed to circulating androgens, which may explain the differentiation of basal cells into principal cells. The differences observed between the two studies may also be related to species, the selection of basal cells using different cell markers, and/or the composition of the culture medium. The factors necessary for the differentiation of clear cells are indeed still poorly understood at the present time. Although studies have indicated that androgens and expression of FOXI1 are essential for the normal development of clear/narrow cells in the epididymis, it has been shown that basal cells may differentiate into clear cells in the absence of androgens [77, 78]. In a recent study using single-cell RNAseq, Leir et al. [79] reported that the gene expression profile of clear cells was similar to that of pulmonary ionocytes [80, 81], suggesting that clear cells represent a population of epididymal ionocytes. In the trachea, Notch signaling is necessary for the differentiation of ionocytes from basal cells [81]. In kidney, the differentiation of intercalated cells, which express some of the same markers as clear cells and which share similar functions in regulating urinary acidification, is also regulated by Notch signaling [82]. Whether or not the differentiation of clear cells in the epididymis also requires Notch signaling remains to be established.

Based on single-cell RNAseq, it has been reported that in the murine epididymis there may exist three different populations of basal cells [83]. At the moment, we do not know if all three

populations of basal cells represent unique adult stem cells, different cell types, or if these represent cells in various stages of differentiation. As such, the possibility exists that the selection of KRT5-positive cells as previously reported, and ITGA6-positive cells in the present study, selectively enriched for different basal cell subpopulations. Studies in adult mouse airways and alveoli have shown that P63+/KRT5+ and P63+/KRT5- basal cells differentiate into different cell types [84].

To assess the ability of basal cells from different regions of the epididymis to form organoids, we isolated basal cells from the proximal and distal regions of the epididymis. Basal cell formed organoids from both regions and demonstrated the ability to differentiate into principal cells, as shown by the expression of AQP9 and CFTR. Multiple studies have reported segment-specific gene expression and regulation in the epididymis [83, 85]. In order to understand if the basal cells from the different regions of the epididymis are genetically predisposed to differentiate into subtypes of principal cells, or if region-specific gene expression is regulated by intrinsic environmental factors, we performed qPCR analysis of three principal cell markers on epididymal tissue and epididymal organoids. Transcript levels of AQP9, CFTR, and CLU in the epididymis were significantly higher in the proximal regions of the epididymis than in the distal region. However, there were no differences in relative mRNA levels of AQP9 and CFTR from organoids derived from basal cells isolated from either the proximal or distal epididymis, suggesting that the region-specific expression pattern is likely to result from regulatory factors along the epididymis and not from region-specific origin of basal cells. Interestingly, relative mRNA levels of CLU were significantly higher in organoids derived from basal cells isolated in the proximal versus distal epididymis. This suggests that there may be genetic factors implicated in the regulation of CLU that originate from the differentiation of basal cells. Further studies are needed to understand this regulation.

Data from our studies provide evidence that the principal cells derived from basal cells are functional. These include the expression of specific principal cell markers, and the presence of tight junctions which, *in vivo*, are responsible for the formation of the blood-epididymis barrier [86]. Furthermore, immunofluorescence data indicate that CLU, a secreted protein in the epididymis, which binds to maturing spermatozoa [87], was found in both cytoplasm of cells and lumen of the epididymal organoids. Together these strongly support the notion that principal cells derived from basal cells are physiologically functional.

In conclusion, results from the present study provide evidence for the existence of a stem cell population at the base of the rat epididymal epithelium. This is further supported by the present data, which show that rat epididymal basal cells can form organoids in 3D cell cultures and that these cells can self-renew over a long period of time. This supports the notion that these basal cells behave like stem cells rather than progenitor cells which, by definition, have a limited capacity for self-renewal [88]. Furthermore, we showed that basal cells can differentiate into principal cells *in vitro*, thereby further displaying characteristics associated with adult stem cells. The presence of stem cells in the epididymis and their regulation and differentiation under normal and pathological conditions could open a new area of research in epididymal biology, as well as providing insight into how alterations in these may lead to infertility.

5.6 Acknowledgments

Julie Dufresne, Mary Gregory, and Christine Kirady (INRS) are thanked for their suggestions and assistance. Dr. Gail Prins (Univ Illinois) is thanked for advice on organoid culture. LP was supported in part by a studentship from the Centre Interdisciplinaire de Recherche en Reproduction (CIRD), the Fonds de Recherche du Québec en Nature et Technologie (FRQNT)-Réseau de Recherche Québécois en Reproduction (RQR).

5.7 References

1. Orgebin-Crist MC. Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 1967; 7:373–389.
2. Olson GE, Nagdas SK, Winfrey VP. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In: Robaire B, Hinton BT (eds.), *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York: Plenum Press; 2002: 371–387.
3. Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 2005; 63:319–341.
4. Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen QA. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 2003; 125:871–878.

5. Hermo L, Robaire B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton BT (eds.), *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York: Plenum Press; 2002: 81–102.
6. Robaire B, Hinton BT. The Epididymis. In: Plant TM, Zeleznik A.J. (ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, vol. 1. Elsevier; Amsterdam, 2015: 691–771.
7. Vendrely E, Dadoune JP. Quantitative ultrastructural analysis of the principal cells in the human epididymis. *Reprod Nutr Dev* 1988; 28:1225–1235.
8. Cyr D, Finnon KW, Dufresne J, Gregory M. Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. In: Robaire B, Hinton BT (eds.), *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York: Plenum Press; 2002: 103–118.
9. Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod* 2011; 84:851–858.
10. Agarwal A, Hoffer AP. Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. *J Androl* 1989; 10:425–431.
11. Seiler P, Wenzel I, Wagenfeld A, Yeung CH, Nieschlag E, Cooper TG. The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. *J Androl* 1998; 21:217–226.
12. Shum WW, Hill E, Brown D, Breton S. Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. *Reproduction* 2013; 146:455–469.
13. Hermo L, Barin K, Robaire B. Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. *Anat Rec* 1992; 233:205–228.
14. Breton S, Smith PJ, Lui B, Brown D. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat Med* 1996; 2:470–472.
15. Adamali HI, Apical HL. Narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J Androl* 1996; 17:208–222.
16. Sun EL, Flickinger CJ. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am J Anat* 1979; 154:27–56.
17. Hayashi T, Yoshinaga A, Ohno R, Ishii N, Kamata S, Yamada T. Expression of the p63 and Notch signaling systems in rat testes during postnatal development: comparison with
18. Gregory M, Cyr DG. Effects of prostaglandin E2 on gap junction protein alpha 1 (GJA1) in the rat epididymis. *Biol Reprod* 2018; 100:123–132.
19. Pinel L, Mandon M, Cyr DG. Tissue regeneration and the epididymal stem cell. *Andrology* 2019; 7:618–630.
20. Martan J, Risley PL. Holocrine secretory cells of the rat epididymis. *Fertil Steril* 1964; 15:180–187.
21. Clermont Y, Flannery J. Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. *Biol Reprod* 1970; 3:283–292.
22. Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG et al. *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 2013; 494:247–250.

23. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 2010; 327:542–545.
24. Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY, Su N, Luo Y, Heilshorn SC, Amieva MR, Sangiorgi E, Capecchi MR et al. The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:466–471.
25. Kim B, Roy J, Shum WW, Da Silva N, Breton S. Role of testicular luminal factors on basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 2015; 92:9.
26. Hermo L, Papp S. Effects of ligation, orchidectomy, and hypophysectomy on expression of the Yf subunit of GST-P in principal and basal cells of the adult rat epididymis and on basal cell shape and overall arrangement. *Anat Rec* 1996; 244:59–69.
27. 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; 2:755–762.
28. Kim B, Breton S. Androgens are essential for epithelial cell recovery after efferent duct ligation in the initial segment of the mouse epididymis. *Biol Reprod* 2019; 102:76–83.
29. Kristensen DM, Nielsen JE, Kalisz M, Dalgaard MD, Audouze K, Larsen ME, Jacobsen GK, Horn T, Brunak S, Skakkebaek NE, Leffers H. OCT4 and downstream factors are expressed in human somatic urogenital epithelia and in culture of epididymal spheres. *Mol Hum Reprod* 2010; 16:835–845.
30. Mandon M, Hermo L, Cyr DG. Isolated rat epididymal basal cells share common properties with adult stem cells. *Biol Reprod* 2015; 93:115–130.
31. Dufresne J, Finnsen KW, Gregory M, Cyr DG. Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. *Cell Physiology* 2003; 284:33–43.
32. Eisenstein M. Organoids: the body builders. *Nat Methods* 2018; 15:19–22.
33. Huch M, Knoblich JA, Lutolf MP, Martinez-Arias A. The hope and the hype of organoid research. *Development* 2017; 144:938–941.
34. Kretzschmar K, Clevers H. Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish. *Dev Cell* 2016; 38:590–600.
35. Sakib S, Uchida A, Valenzuela-Leon P, Yu Y, Valli-Pulaski H, Orwig K, Ungrin M, Dobrinski I. Formation of organotypic testicular organoids in microwell culture. *Biol Reprod* 2019; 100:1648–1660.
36. Pendergraft SS, Sadri-Ardekani H, Atala A, Bishop CE. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity *in vitro*. *Biol Reprod* 2017; 96:720–732.
37. Alves-Lopes JP, Soder O, Stukenborg JB. Testicular organoid generation by a novel *in vitro* three-layer gradient system. *Biomaterials* 2017; 130:76–89.
38. Baert Y, De Kock J, Alves-Lopes JP, Soder O, Stukenborg JB, Goossens E. Primary human testicular cells self-organize into organoids with testicular properties. *Stem Cell Reports* 2017; 8:30–38.
39. Mou H, Vinarsky V, Tata PR, Brazauskas K, Choi SH, Crooke AK, Zhang B, Solomon GM, Turner B, Bihler H, Harrington J, Lapey A et al. Dual SMAD signaling inhibition enables long-term expansion of diverse epithelial basal cells. *Cell Stem Cell* 2016; 19:217–231.

40. Leir SH, Yin S, Kerschner JL, Xia S, Ahmadi S, Bear C, Harris A. An organoid model to assay the role of CFTR in the human epididymis epithelium. *Cell Tissue Res* 2020; 381:327–336.
41. Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell* 2016; 165:1586–1597.
42. Horton C, Liu Y, Yu C, Xie Q, Wang ZA. Luminal-contact-inhibition of epithelial basal stem cell multipotency in prostate organogenesis and homeostasis. *Biol Open* 2019; 8:bio045724.
43. Dai Q, Duan C, Ren W, Li F, Zheng Q, Wang L, Li W, Lu X, Ni W, Zhang Y, Chen Y, Wen T et al. Notch signaling regulates Lgr5(+) olfactory epithelium progenitor/stem cell turnover and mediates recovery of lesioned olfactory epithelium in mouse model. *Stem Cells* 2018; 36:1259–1272.
44. Santos CP, Lapi E, Martinez de Villarreal J, Alvaro-Espinosa L, Fernandez-Barral A, Barbachano A, Dominguez O, Laughney AM, Megias D, Munoz A, Real FX. Urothelial organoids originating from Cd49f(high) mouse stem cells display Notch-dependent differentiation capacity. *Nat Commun* 2019; 10:4407.
45. Ali A, Syed SM, Jamaluddin MFB, Colino-Sanguino Y, Gallego-Ortega D, Tanwar PS. Cell lineage tracing identifies hormone-regulated and Wnt-responsive vaginal epithelial stem cells. *Cell Rep* 2020; 30:1463–1477.
46. Zhang L, Adileh M, Martin ML, Klingler S, White J, Ma X, Howe LR, Brown AM, Kolesnick R. Establishing estrogen-responsive mouse mammary organoids from single Lgr5(+) cells. *Cell Signal* 2017; 29:41–51.
47. Tadokoro T, Gao X, Hong CC, Hotten D, Hogan BL. BMP signaling and cellular dynamics during regeneration of airway epithelium from basal progenitors. *Development* 2016; 143:764–773.
48. Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, Kajimoto T, Saitoh M, Miyazono K, Node M, Imamura T. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci* 2005; 96:791–800.
49. Gurung S, Werkmeister JA, Gargett CE. Inhibition of transforming growth factor-beta receptor signaling promotes culture expansion of undifferentiated human endometrial mesenchymal stem/stromal cells. *Sci Rep* 2015; 5:15042.
50. Huch M, Koo BK. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 2015; 142:3113–3125.
51. Kessler M, Hoffmann K, Brinkmann V, Thieck O, Jackisch S, Toelle B, Berger H, Mollenkopf HJ, Mangler M, Sehouli J, Fotopoulou C, Meyer TF. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat Commun* 2015; 6:8989.
52. Boretto M, Cox B, Noben M, Hendriks N, Fassbender A, Roose H, Amant F, Timmerman D, Tomassetti C, Vanhie A, Meuleman C, Ferrante M et al. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development* 2017; 144:1775–1786.
53. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S et al. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units *in vitro*. *Cell Stem Cell* 2010; 6:25–36.

54. Basak O, Beumer J, Wiebrands K, Seno H, van Oudenaarden A, Clevers H. Induced quiescence of Lgr5+ stem cells in intestinal organoids enables differentiation of hormone-producing enteroendocrine cells. *Cell Stem Cell* 2017; 20:177–190.
55. Nakamura K, Yoshimura A, Kaneko T, Sato K, Hara Y. ROCK inhibitor Y-27632 maintains the proliferation of confluent human mesenchymal stem cells. *J Periodontal Res* 2014; 49:363–370.
56. Zhang L, Valdez JM, Zhang B, Wei L, Chang J, Xin L. ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increases their cloning efficiency. *PLoS One* 2011; 6:e18271.
57. Chapman S, Liu X, Meyers C, Schlegel R, McBride AA. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *J Clin Invest* 2010; 120:2619–2626.
58. Chua CW, Shibata M, Lei M, Toivanen R, Barlow LJ, Bergren SK, Badani KK, McKiernan JM, Benson MC, Hibshoosh H, Shen MM. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol* 2014; 16:951–961.
59. Stampfer MR. Cholera toxin stimulation of human mammary epithelial cells in culture. *In vitro* 1982; 18:531–537.
60. Ma X, Shimmura S, Miyashita H, Yoshida S, Kubota M, Kawakita T, Tsubota K. Long-term culture and growth kinetics of murine corneal epithelial cells expanded from single corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:2716–2721.
61. Yu M, Bojic S, Figueiredo GS, Rooney P, de Havilland J, Dickinson A, Figueiredo FC, Lako M. An important role for adenine, cholera toxin, hydrocortisone and triiodothyronine in the proliferation, self-renewal and differentiation of limbal stem cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 2016; 152:113–122.
62. Cyr D, Hermo L, Laird DW. Immunocytochemical localization and regulation of Connexin43 in the adult rat epididymis. *Endocrinology* 1996; 137:1474–1484.
63. Schimming BC, Pinheiro P, de Matteis R, Machado CM, Domeniconi RF. Immunolocalization of aquaporins 1 and 9 in the ram efferent ducts and epididymis. *Reprod Domest Anim* 2015; 50:617–624.
64. Pastor-Soler N, Bagnis C, Sabolic I, Tyszkowski R, McKee M, Van Hoek A, Breton S, Brown D. Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biol Reprod* 2001; 65:384–393.
65. Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev* 2002; 16:693–706.
66. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006; 439:84–88.
67. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol* 2004; 164:577–588.
68. Musah S, Chen J, Hoyle GW. Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury. *Respir Res* 2012; 13:107–119.
69. Collins AT, Habib FK, Maitland NJ, Neal DE. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci* 2001; 114:3865–3872.

70. Moore HD, Curry MR, Penfold LM, Pryor JP. The culture of human epididymal epithelium and *in vitro* maturation of epididymal spermatozoa. *Fertil Steril* 1992; 58:776–783.
71. Yeung CH, Wang K, Cooper TG. Why are epididymal tumours so rare? *Asian J Androl* 2012; 14:465–475.
72. Romagnani P. Toward the identification of a “renopietic system”? *Stem Cells* 2009; 27:2247–2253.
73. Schmelz M, Moll R, Hesse U, Prasad AR, Gandolfi JA, Hasan SR, Bartholdi M, Cress AE. Identification of a stem cell candidate in the normal human prostate gland. *Eur J Cell Biol* 2005; 84:341–354.
74. Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Sun W, Garraway IP, Witte ON. Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:20882–20887.
75. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; 459:262–265.
76. Xin L, Lukacs RU, Lawson DA, Cheng D, Witte ON. Self-renewal and multilineage differentiation *in vitro* from murine prostate stem cells. *Stem Cells* 2007; 25:2760–2769.
77. Fisher JS, Pastor-Soler N, Sharpe RM, Breton S. Modulation of the onset of postnatal development of H(+)-ATPase-rich cells by steroid hormones in rat epididymis. *Biol Reprod* 2002; 67:1106–1114.
78. Blomquist SR, Vidarsson H, Soder O, Enerback S. Epididymal expression of the forkhead transcription factor Foxi1 is required for male fertility. *EMBO J* 2006; 25:4131–4141.
79. Leir SH, Yin S, Kerschner JL, Cosme W, Harris A. An atlas of human proximal epididymis reveals cell-specific functions and distinct roles for CFTR. *Life Sci Alliance* 2020; 3:e202000744.
80. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE, Yuan F, Chen S, Leung HM, Villoria J, Rogel N, Burgin G et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 2018; 560:319–324.
81. Plasschaert LW, Zilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, Klein AM, Jaffe AB. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 2018; 560:377–381.
82. Al-Awqati Q, Gao XB. Differentiation of intercalated cells in the kidney. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26:266–272.
83. Rinaldi VD, Donnard E, Gellatly KJ, Rasmussen M, Kucukural A, Yukselen O, Garber M, Sharma U, Rando OJ. An atlas of cell types in the mammalian epididymis and vas deferens. *elife* 2020; 9:e55474.
84. Yang Y, Riccio P, Schotsaert M, Mori M, Lu J, Lee DK, Garcia-Sastre A, Xu J, Cardoso WV. Spatial-temporal lineage restrictions of embryonic p63(+) progenitors establish distinct stem cell pools in adult airways. *Dev Cell* 2018; 44:752–761.e754.
85. Abe K, Takano H, Ito T. Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. *Arch Histol Jpn* 1983; 46:51–68.
86. Cyr DG, Dufresne J, Gregory M. Cellular junctions in the epididymis, a critical parameter for understanding male reproductive toxicology. *Reprod Toxicol* 2018; 81: 207–219.

87. Saewu A, Kadunganattil S, Raghupathy R, Kongmanas K, Diaz-Astudillo P, Hermo L, Tanphaichitr N. Clusterin in the mouse epididymis: possible roles in sperm maturation and capacitation. *Reproduction* 2017; 154:867–880.
88. Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci* 2003; 26:125–131.

Supplemental Table 1. List of primary antibodies used in this study.

Antibody	Manufacturer	Catalog No.	Concentration (µg/ml)	Research Resource Identifier
KRT5	Santa Cruz Biotechnology	sc32721	1.0	AB_627852
AQP9	Alpha Diagnostic	AQP91-A	10.0	AB_1609295
TP63	Proteintech	12143-1-AP	2.4	AB_10597397
GJA1	Sigma Aldrich	C6219	0.64	AB_476857
PCNA	Santa Cruz Biotechnology	sc56	4.0	AB_628110
Cldn1	Thermo Fisher Scientific	51-9000	2.5	AB_2533916
ZO1	Thermo Fisher Scientific	33-9100	2	AB_2533147
Clusterin	Novus Biologicals	NBP1-06027	5	AB_1556289
ATP6V1B2	ABclonal	A3754	0.5	AB_2765252

Supplemental Table 2. List of primers used in this study.

Gene	Primers	Tm
RNA18S	F : GCGGAAAATAGCCTTCGCT R : AGCCCTCTTGGTGAGGTC	57.0
AQP9	F : TCCATTCATATCCACGCCAGG R : GCCAGAGTTGAGTCCGAGAG	55.0
CFTR	F : TCTAAGACAAGCCTTCGCTGG R : TCTTCTCGCTCAGAAGTGCC	55.0
CLUSTERIN	F : TCCAGGGGGTGAAGCACATA R : CAGGGCTTACACTCTTCCCAG	55.0
ATP6V0D2	F : CCTTTGTTTGACGCCGTAGG R : TGGAATTGCCTGTTGAACGC	55.0
ATP6V1G3	F : AAAGACAAGCTGGATGAGGCA R : GCATTCTGTACTGGTCGGTCT	52.0
FOX11	F : CAGAACTCCATCCGCCACAA R : TTCTCAGAAGCCAAGGAGCC	55.0

6 DEUXIEME ARTICLE: EXPRESSION OF THE STEM CELL MARKERS LGR5 AND P63 IN THE BASAL CELLS OF THE RAT EPIDIDYMIS

Expression des marqueurs de cellules souches LGR5 et p63 dans les cellules basales d'épididyme de rat

Auteurs :

Laurie PINEL & Daniel G. CYR

Laboratoire de toxicologie de la reproduction, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, University of Quebec, Laval, QC, Canada

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Des expériences d'orchidectomie sont en cours afin d'ajouter des marquages de LGR5 et p63 notamment pour compléter les données obtenues par western-blot. Ceux-ci permettront de finir l'article avant de le soumettre.

Contribution des auteurs :

LP : Planification et réalisation des expériences, analyse et interprétation des données et rédaction de l'article

DC : Interprétation des données et rédaction de l'article

Mise en contexte :

La présence de cellules souches au sein de l'épididyme a été démontré au sein de l'épididyme de rat et de souris, cependant aucun marqueur n'a encore permis d'identifier spécifiquement ces cellules dans cet organe. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'expression de LGR5 dans l'épididyme. LGR5 est un récepteur de la voie de signalisation Wnt et est un marqueur de cellules souches adultes dans de très nombreux tissus. Nous avons donc étudié son expression géniques et protéiques dans les différents segments de l'épididyme et lors du développement post-natal. Nous avons également évalué les effets d'une orchidectomie sur son expression protéique et observé son expression au sein des organoïdes d'épididyme.

Les résultats de ces travaux ont été présentés par présentations **orales** ou affiches aux rencontres Annuelles de la société pour l'étude de la reproduction en 2021, 2020 et 2019, au congrès Armand-Frappier 2021 et aux symposiums du réseau Québécois en reproduction en 2021, 2019 et 2018.

Auteurs : **Laurie Pinel**, Nick Barker et Daniel Cyr

Titre : Epididymal Basal Cells Expressing LGR5 Participate in the Self-Renewal of the Epithelium of the Epididymis

Symposium du Réseau Québécois en reproduction, Québec, QC, 5 et 6 Novembre 2019

Auteurs : **Laurie Pinel**, Nick Barker et Daniel Cyr

Titre : Epididymal Stem / Progenitor Basal Cells Express LGR5 and can Differentiate into Principal Cells

Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, San Jose, CA, 19 Juillet 2019

Auteurs : **Laurie Pinel** et Daniel Cyr

Titre : LGR5: a Marker of Stem Cell in the Epididymis

Symposium du Réseau Québécois en reproduction, Montréal, QC, 6 et 7 Novembre 2018

Auteurs : Laurie Pinel et Daniel G. Cyr.

Titre : Epididymal basal cells express the adult stem cell marker LGR5.

Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Virtuel, 15 au 18 Décembre 2021

Auteurs : Laurie Pinel et Daniel G. Cyr.

Title: Epididymal basal cells express the adult stem cell marker LGR5.

Symposium du Réseau Québécois en reproduction, Virtuel, 14 et 15 Octobre 2021

Auteurs: Laurie Pinel et Daniel G. Cyr.

Titre : Epididymal basal cells express the adult stem cell marker LGR5.

Congrès Armand Frappier reproduction, Virtuel, QC, 8 au 12 Novembre, 2021

Auteurs: Laurie Pinel et Daniel G. Cyr

Titre : Epididymal Basal Cells Expressing LGR5 Are Multipotent Adult Stem Cells

Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Virtual, 9 au 12 Juillet, 2020

Résumé en français :

La récente démonstration de l'existence d'une population de cellules souches dans l'épididyme soulève des questions quant à leur identité. La régulation du développement épидидymaire prénatal et postnatal précoce par la signalisation WNT nous a conduit à évaluer le profil d'expression de LGR5 dans l'épididyme. LGR5 est un marqueur connu des cellules souches adultes dans divers tissus et est régulé par R-Spondin, un membre de la voie de signalisation WNT. Nous avons évalué l'expression de LGR5 dans l'épididyme, sa régulation à la fois *in vivo* et *in vitro* à l'aide d'organoïdes dérivés de cellules basales. LGR5 est exprimé dans les cellules colonnaires indifférenciées de l'épithélium à PND7. Au fur et à mesure que l'épithélium se différencie, l'expression de LGR5 diminue et la protéine se localise à la base de l'épithélium tandis que son ARNm est détecté dans toutes les cellules de l'épithélium. Dans l'épididyme adulte, LGR5 est exprimé dans toutes les régions de l'épididyme mais ses niveaux d'ARNm sont plus élevés dans la région proximale alors que ses niveaux de protéines ne sont pas significativement différents entre les segments. La co-localisation de LGR5 avec les marqueurs de cellules basales p63 et ITGA6 dans l'épididyme adulte indique l'existence de 3 sous-populations de cellules basales : ITGA6⁺/LGR5⁺/p63⁺, ITGA6⁺/LGR5⁺/p63⁻ et ITGA6⁺/LGR5⁻/p63⁺. Les niveaux de protéines de LGR5 augmentent à la suite d'une orchidectomie alors que ceux de p63 diminuent. Tous les organoïdes épидидymaires précoces formés par les cellules basales ITGA6⁺ sont positifs pour LGR5 et p63 alors que leurs expressions diminuent au cours de la différenciation. L'inhibition de p63 dans les cellules basales ITGA6⁺ cultivées *in vitro* induit une diminution de la prolifération et de l'auto-renouvellement des cellules basales. Ensemble, ces résultats suggèrent que LGR5 et p63 représentent des marqueurs pour les cellules souches épидидymaires.

6.1 Abstract

The recent demonstration of the existence of a stem cell population in the epididymis raises questions regarding their identity. The regulation of prenatal and early postnatal epididymal development by the WNT signaling led us to evaluate the expression profile of LGR5 in the epididymis. LGR5 is a known marker of adult stem cells in various tissue and is regulated by R-Spondin, a member of the WNT signaling pathway. We assessed the expression of LGR5 in the epididymis and its regulation both in vivo and in vitro using basal cell derived organoids. LGR5 was expressed in undifferentiated columnar cells of the epithelium at PND7. As the epithelium underwent differentiation, the expression of LGR5 decreased and the protein became localized to the base of the epithelium while its mRNA was detected throughout the cells of the epithelium. In the adult epididymis, LGR5 was expressed in all regions of the epididymis but its mRNA levels were higher in the proximal region while its protein levels were not significantly different between the segments. Co-localization of LGR5 with the basal cell markers p63 and ITGA6 in the adult epididymis indicated the existence of 3 basal cell sub-populations: ITGA6+/LGR5+/p63+, ITGA6+/LGR5+/p63- and ITGA6+/LGR5-/p63+. Protein levels of LGR5 were upregulated by orchidectomy while p63 protein levels were downregulated. All early epididymal organoids formed by ITGA6+ basal cells were positive for LGR5 and p63 while their expression decreased during differentiation. The inhibition of p63 in ITGA6+ basal cells cultured in vitro induced a decrease of basal cell proliferation and self-renewal. Together these results suggest that LRG5 and p63 represent markers for epididymal stem cells.

6.2 Introduction

Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (LGR5), a member of the Wnt signaling pathway, has received attention in recent years as a marker of an adult stem cell populations in the small intestine and colon [1]. Since then, LGR5 has been identified as a stem cell marker in various adult tissues such as mammary gland, prostate, kidney and liver [2-6]. LGR5 belongs to a family of glycoprotein hormone receptors. It is a plasma membrane receptor that binds R-spondin, a secreted protein that enables the maintenance of the Wnt receptor complex thus potentiating the Wnt signaling implicated in the regulation of stem cells [7, 8].

The epididymis is formed by the coiling of the proximal part of the Wolffian duct, and its epithelium is composed by unique columnar cells in the first days after birth [9-11]. In the adult, the epithelium of the epididymis is pseudo-stratified and composed by 7 different cell types including basal and principal cells [12-14]. Wnt signaling is known to play a major role throughout

the development of the epididymis as different components of the WNT pathway are expressed in this organ and deletions of Wnt ligands induce morphological defects in the development of the epididymis [15-21]. Wnt signaling is highly active before birth throughout the epithelium and drive cell proliferation necessary for the coiling of the Wolffian duct into formation of the epididymis [22]. In the first few weeks after birth, the Wnt pathway also plays an important role in the proliferation of undifferentiated epithelial cells which through the use of genetic cell lineage tracing transgenic mouse models have been shown to differentiate into the epithelial cell types observed in the adult epididymis [18]. The basal cells are the first cells to differentiate during postnatal epididymal development (Day 14 in the rat) while the differentiation of principal, clear, and narrow cells occur subsequently to basal cells [10, 23].

In the mouse and rat adult epididymis, basal cells expressing cytokeratin 5 (KRT5) and integrin- α 6 (ITGA6) have been shown to form organoid structures in 3D cell culture. These cells can self-renew and differentiate into principal cells in vitro and in vivo, demonstrating that these cells, or a sub-population of these cells represent a stem cell population located at the base of the epithelium [24, 25]. Basal cells express several gap and tight junction proteins and different components of Hedgehog, WNT and Notch signaling pathway [26-29]. They also possess cytoplasmic projection that reach the lumen, and which have been suggested to act as sensor of the luminal microenvironment [30]. Efferent duct ligation has been shown to induce a 6-fold increase in apoptosis compared to homeostatic conditions as well as an increase in the proliferation of a basal cells population that survived, suggesting these may have a crucial role in tissue regeneration in the epididymis [31].

Epididymal basal cells also express the transcription factor p63, a member of the p53 family expressed in various stratified and pseudo-stratified epithelium and essential for the differentiation of the basal cell [32, 33]. In tissues such as trachea, prostate and mammary glands, basal cells regenerate the epithelium following cellular injury and a major regulator of this process is p63 [34-36]. In the epididymis, p63 is essential for the formation of basal cells and deletion of p63 results in the formation of an epithelium lacking basal cells [33]. In the prostate 7 populations of basal cells were observed according to the expression profile of p63 and several cytokeratins [37]. In this organ, lineage tracing of p63+ basal cells indicate that these cells can self-renew and differentiate into other cell types of the epithelium [37].

Similar to p63, LGR5 is also important in the regulation of tissue regeneration. In the adult prostate, basal and luminal cells expressing LGR5 were resistant to castration and were essential for the regeneration of various prostate cell types after transplantation under the renal capsules

of immunosuppressed mice [6]. In the liver, LGR5 was not detected in healthy adult liver while it was detectable in a small population during tissue damage, suggesting an “activation” of these cells by tissue alteration. Lineage tracing experiment revealed that these rare positive cells were able to generate hepatocytes and bile ducts in vivo and to form organoids in vitro [38].

The presence of stem cells in the epididymis raises questions with regards to whether or not all basal cells are stem cells or there exists a sub-population of basal cells that are stem cells. The identification of such cells is necessary in order to better characterize these cells and to understand their regulation. The objective of this study was to determine the expression profile of LGR5 in the epididymis and to assess whether or not these cells are associated with p63+ basal cells, another marker of stem cells in various tissues.

6.3 Materials and methods

Animals and tissues collection

Male Sprague-Dawley rats (7, 14, 21, 28, 42 and 90 days of age) were purchased from Charles River Laboratories, Inc. (Saint-Constant, QC ; Fairfield, New Jersey) and were acclimated for at least 1 week under a constant photoperiod (12L:12D) and received food and water ad libitum. At the time of sampling, rats were euthanized with CO₂.

For immunofluorescence, epididymides were collected, cleared of testis and fat and frozen in OCT compound (ThermoFisher Canada, Ottawa, ON) on dry ice and stored at -86°C until sectioning. For in situ hybridization, epididymides were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at room temperature. For qPCR and western-blot, epididymides were collected, cleared of testis and fat, separated according to the segment, and stored at -86°C until RNA and protein isolation. For cell culture, epididymides were collected from animals under aseptic conditions and were placed in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)/nutrient F12 Ham culture media (Gibco, ThermoFisher) containing penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml) (SigmaAldrich, Mississauga, ON) until the epithelial cell dissociation.

All the animal protocols used in this study were approved by the Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) university animal care committee according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

RT-qPCR

Isolation of total RNA from 14-, 42- and 91-days old rat epididymis was done using frozen tissues. RNA from epididymides (n=4) was pooled from 3 individual rats of 14 days of age, whereas RNA from one epididymis from an individual rat was used for 42 and 91 days of age. Total RNA isolation was also done from ITGA6-negative and ITGA6-positive cell fractions (n=4 pools from 2 rats) obtained following magnetic separation of cells from epididymides of 48 day-old rats. Total RNA was extracted by using the NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) according to the manufacturer's instructions. The isolated RNA was treated with DNase (1 U/ug of RNA, DNase I, amplification grade; SigmaAldrich) to remove any DNA contamination. An aliquot of 400 ng of RNA was reverse transcribed using qScript® cDNA SuperMix (Quanta BioSciences, Beverly, MA). Real-time RT-PCR was performed using the PerfeCTa™ SYBR Green SuperMix (Quanta Biosciences). Primers were designed using Primer Blast (NCBI) and Oligo Primer Analyses Software (Molecular Biology Insights, Cascade, CO). Primer sequences are listed in Supplemental Table 1. All samples were done in duplicate. Standard curves using appropriate cDNA were created for all genes examined and used to calculate relative expression levels. Relative mRNA levels of target genes were normalized to GAPDH. Melting curves were obtained for each PCR amplification; specificity and predicted amplicon size products were verified by running PCR products on a 1.5% agarose gel. Gels were visualized and analyzed using a GelDoc system and Image Lab software (ver. 4.0; Bio Rad Laboratories, Oakville, ON). PCR amplicons were commercially sequenced by Sanger sequencing (Genome Quebec, Montreal, QC).

Immunofluorescence staining of epididymis sections

Sections were fixed in ice cold-methanol for 10 min at -20°C, rinsed in PBS, and subsequently in a solution of 0.75% glycine in PBS, and 0.3% Triton X-100 in PBS at room temperature for 15 min. Sections were then incubated with blocking solution (5% BSA and 10% donkey serum in Tris-buffered saline-Tween 20 buffer (TBS-T; 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween20, pH 7.4)) for 1hr. Sections were subsequently incubated with an LGR5 antibody diluted in blocking solution for 4 hrs at room temperature. All primary and secondary antibody used are listed in Supplementary Table 2. Sections were washed three times with TBS-T with agitation and incubated with an anti-mouse secondary antibody in blocking buffer at room temperature for 45 min. Sections were then incubated with the two others primary antibodies (p63 and a conjugated-ITGA6 antibody) for 2 hrs at room temperature and with an anti-rabbit

secondary antibody in blocking buffer containing Hoechst dye (1 µg/ml; Biotium, Scarborough, ON) at room temperature for 45 min. Finally, sections were washed twice in TBS-T and once in TBS and mounted with Fluoromount (Southern Biotech, Birmingham, USA). Negative controls were done in absence of primary antibody. Immunolabeled sections were examined under a Nikon A1Plus confocal microscope, and images were analyzed using the NIS-Elements AR software (Nikon Canada, Mississauga, ON).

In Situ Hybridization

Tissues were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at room temperature, dehydrated, embedded in paraffin, and sections were cut at 5µm. In situ hybridization (ISH) was performed using RNAscope® 2.5 High-Definition Brown assay according to the manufacturer's instructions (Advanced Cell Diagnostics, Harward, CA). Briefly, slides were baked at 60°C 1h and were deparaffinized with successive bath of histoclear (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) and 100% alcohol. Slides were treated with RNAscope® hydrogen peroxide for 10min at RT and washed with distilled water. Target retrieval was then performed with RNAscope® target retrieval reagents for 15 min at mild boil temperature and was followed by several wash steps in distilled water and 100% alcohol. A barrier was created around the sections using a hydrophobic barrier pen (ImmEdge, Vector Laboratory, Burlingame, CA) and RNAscope® Protease Plus was applied for 30min at 40°C. Probes were then hybridize for 2 hrs at 40°C and signal were amplified using RNAscope® 2.5 HD AMP 1 to 6 according to the manufacturer's instructions. RNAscope® probes were designed specifically for targeted rat genes by the manufacturer. Probes were designed for Lgr5 (NM_001106784.1, region 200-1245, catalogue number 403731), p63 (NM_001127344.1, region 2-1015, catalogue number 54736), Ppib (positive control probe, NM_022536.2, region 95-830, catalogue number 313921) and DapB (negative control probe, EF191515, region 414-862, catalogue number 310043). The signal was detected using RNAscope® DAB for 10 min at RT and slides were counterstained using hematoxylin (Leica biosystem, Buffalo Grove, IL) and 0.02% ammonia water. Sections were examined under a Nikon Eclipse E800 with a Retina Exi camera (Q Imagine, Teledyne Photometrics, Tucson, AZ), and images were analyzed using the QC capture pro software (Q Imagine, Teledyne Photometrics).

Orchidectomy

Orchidectomy experiments were performed as previously described [39]. Adult Sprague-Dawley rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine/acepromazine (50/5/2.5 mg/kg) and a subcutaneous injection of analgesic (buprenorphine; 0.3 mg/kg). Rats were either sham-operated (n = 4; controls), bilaterally orchidectomized via an abdominal incision (n = 4), or orchidectomized and given three subcutaneous implants of testosterone (3 x 6.2 cm; n = 4), as previously described to maintain epididymal testosterone levels [40]. Testosterone-filled polydimethylsiloxane implants were prepared, as previously described [41] and have well-characterized steroid release rates [42]. The animals were euthanized 7 days after surgery and epididymides were removed and subdivided into caput, corpus and cauda regions before being flash frozen in liquid nitrogen. Paired epididymides, seminal vesicles and ventral prostates were weighed to assess testosterone implant efficacy [43].

Western-blot

Total proteins were extracted from caput, corpus, and cauda epididymides of adult rats (n=4) and frozen in liquid nitrogen and stored at -86°C. Tissues were crushed in liquid nitrogen using a mortar and pestle and homogenized in 3 ml/g of tissue in cold RIPA lysis buffer (PBS, 1% Igepal, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 µg phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100 µM sodium orthovanadate, protease inhibitor cocktail, and phosphatase inhibitor cocktail; PhosStop 1X, Roche, Laval, QC). The homogenate was then placed on ice for 30 min followed by centrifugation at 10 000g for 10 min at 4°C and the supernatant was collected. The protein concentration of the samples was determined with the Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), aliquoted, and stored at -86°C. A 50 µg aliquot of total protein was denatured in Laemmli buffer (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, and 0.01% bromophenol blue) containing 100 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) for 15 min at room temperature or for 5 min at 95°C and subjected to electrophoresis on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes using a semidry transfer apparatus (Trans-Blot Turbo Transfer System; Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario). The efficiency of the transfer was determined by staining the blots with Ponceau red (0.6%w/v in 1% acid acetic) for 5 min. The membranes were then rinsed and blocked in TBS-T containing 5% non-fat dry milk (TBST-M) for 60 min. The membranes were then incubated with

anti-LGR5 antibody (Origene, TA503316, 10 ug/ml) or anti-TP63 antibody (Proteintech, 12143-1-AP, 0,3 ug/ml) diluted in TBST-M, overnight at 4°C. Blots were then washed three times with TBS-T at room temperature and incubated with an anti-mouse HRP (abcam, ab6728, 0.4 ug/ml) or an anti-rabbit HRP (abcam, ab6721, 0.4 ug/ml) in TBST-M for 1 hr. The blots were then washed three times with TBS-T and one time with TBS, and the signal of the immune complexes was detected with eClarity Western enhanced chemiluminescence substrate (BioRad Laboratories). The membranes were then incubated with anti-tubulin antibody (abcam, ab4074, 0.2 ug/ml) for 1hr and with an anti-rabbit HRP (abcam, ab6721, 0.4 ug/ml). Data were analyzed with a ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad Laboratories).

Epithelial cell isolation

Under aseptic conditions, epididymides were cleared of fat and cut into small fragments (2–3mm). Tissue fragments were placed in DMEM/nutrient F12 Ham (Gibco, ThermoFisher) containing antibiotics and digested with two successive incubations of 50 min in collagenase (2 mg/ml; Life Technologies Inc., Burlington, ON) at 37°C using a shaking water bath. Cells were dissociated by gently pipetting the small tissue fragments and allowing the cells to settle to the bottom of the tube. The supernatant was then replaced with fresh digestion medium. Following the second digestion, tissue fragments were placed in culture medium containing trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 0.25% W/V) for 10 min at 37°C in a shaking water bath. Trypsin activity was stopped with the addition of DMEM/HAM F12 medium (Gibco, ThermoFisher) containing antibiotics and fetal bovine serum (FBS; 5%; Fraction V; Sigma Aldrich). Cells were collected by centrifugation (34g) for 5 min, suspended in cold DMEM/HAM F12 medium (Gibco, ThermoFisher) and successively passed through three nylon filters of 100, 70, and 40 µm. An aliquot of cells was then counted using a hemocytometer.

Magnetic-Activated Cell Sorting

Basal cells were then isolated as previously described [27]. Briefly, cells were centrifuged and suspended in filtered, cold, magnetic-activated cell sorting (MACS) buffer (2 mM EDTA, 0.5% BSA in PBS, pH 7.2) and incubated with a monoclonal antibody against integrin- α 6 (ITGA6; 1 µg/106 cells; Abd Serotec, Kidlington, UK) on ice for 20 min. Cells were washed in MACS buffer, collected by centrifugation and then incubated for 15 min on ice with anti-mouse IgG microbeads (20 µl of beads in 80 µl of cold MACS buffer/107 cells; Miltenyi Biotec, Cambridge, MA). Cells

were washed, suspended in cold MACS buffer, and placed on a MACS MS separation column (Miltenyi Biotec). The column was placed in a magnetic stand (Miltenyi Biotec) and cells that were first eluted through the column were considered as being the ITGA6-negative fraction. The column was then rinsed with MACS buffer and removed from the magnetic stand. MACS buffer (1 ml) was then used to elute the cells retained on the column. This was designated as ITGA6-positive cell fraction that contained an enriched population of basal cells. The cells collected in the ITGA6-positive cell fraction were further purified by a second passage on a magnetic separation column. The number and viability of cells were verified by using trypan blue and an aliquot of cells was placed on a glass microscope slide to evaluate the purity using the basal-cell-specific staining for KRT5, a specific marker of basal cells. Cells were then used for RNA isolation or for cell culture as described below.

3D Cell culture

A total of 25 000 viable basal cells were centrifuged at 300g for 5 min and suspended in 50µl of culture medium containing a 1:1 ratio of cold advanced DMEM/F12 (Gibco, ThermoFisher) / Growth Factor Reduced Matrigel (Phenol red free; Corning, Lowell, MA). Drops of 50µl of the homogeneous suspensions were deposited in the middle of a well in a 24-well cell culture plate and placed upside down in a 37°C incubator for 30 min to allow the Matrigel to solidify. Culture medium (see below) was added to the drop and cells were kept at 32°C in a CO₂ incubator. Half of the medium was refreshed every 2 to 3 days. The medium was composed of advanced DMEM/F12 (Gibco, ThermoFisher), EGF (10ng/ml, SigmaAldrich), bFGF (10ng/ml, Sino Biotechnologies, Wayne, PA), heparin (4ug/ml, Gibco, ThermoFisher), DHT (10nM, SigmaAldrich), hydrocortisone (80ng/ml, SigmaAldrich), Glutamax (100X, Gibco, ThermoFisher), HEPES (10mM, Biobasic, Markham, ON), a selective inhibitor of TGF-β type I receptor ALK5 kinase name A83-01 (250nM, SigmaAldrich), N-acetylcysteine (1.25mM, SigmaAldrich), tocopherol (200ng/ml, Sigma Aldrich) and cAMP (10ng/ml, Sigma Aldrich).

Immunofluorescence staining of organoids

Organoid culture drops were rinsed in PBS and fixed with ice-cold methanol for 20 min at -20°C. Cells were then rinsed three times with 0.75% glycine in PBS for 10 min, permeabilized with 0.3% Triton-X-100 in PBS for 15 min and incubated in blocking solution (5% BSA in PBS-Glycine) for 90 min. Immunolabelling was done using different antibodies (listed in Supplemental

Table 2) diluted in blocking solution and incubated overnight at 4°C. Organoids were washed in PBS and incubated at room temperature with a solution containing secondary antibodies and Hoechst dye (1 µg/ml; Biotium). Slides were mounted in Fluoromount (Southern Biotech). Negative controls were done in absence of primary antibody. Immunofluorescence was examined under a Nikon A1Plus confocal microscope, and images were analyzed with the NIS-Elements AR software (Nikon).

Lentiviral transduction of small hairpin RNAs (shRNA)

After 6 days of culture in 3D as described above, medium was removed and organoids were incubated at 37°C with 1 ml of dispase (1mg/ml, Gibco, ThermoFisher) until the Matrigel was completely dissociated. Cells were collected by centrifugation (300g) for 7 min and suspended in trypsin-EDTA (0.05% W/V) for 10 min at 37°C. Trypsin activity was stopped with the addition of DMEM/HAM F12 medium containing antibiotics and 5% FBS. Cells were collected by centrifugation (300g) for 7 min, suspended in DMEM/HAM F12 medium and passed through a 27-gauge needle to obtain a single cell suspension. In the same time, a mix composed by the medium described above with the addition of an inhibitor of the ROCK signaling pathway (Y27632; 10 µM, Peprotech, Rocky Hill, NJ), cholera toxin (100 ng/ml, Sigma-Aldrich), an activator of the WNT pathway (R-spondin1; 500 ng/ml, Peprotech), and an inhibitor of the BMP pathway (noggin; 100 ng/ml, Peprotech) was incubated 20 min at room temperature with polybrene (8µg/ml, MilliporeSigma) and shRNA LV particles non targeting or directed against TP63 (MOI=10, SMART vector shRNA LV particles, mCMV Turbo GFP, Horizon Discovery, Denver, CO). The mix was added to the cell pellet and the cell suspension was then deposit in the middle of a well in a 24-well cell culture plate coated with 1:1 ratio of advanced DMEM/F12 (Gibco, ThermoFisher) / Growth Factor Reduced Matrigel (Phenol red free; Corning). The slides were incubated at 32°C in a CO2 incubator. Fresh medium was added 3 days after the transfection and the efficiency of the transduction was monitored by counting the number of EGFP positive cells and the number of total cells in several field of view. Finally, the cells were dissociated and were cultured in 3D as described above.

Statistics

Each experiment contained at least 3 biological replicates and two technical replicates unless otherwise indicated. Values are presented as mean ± SEM. Analysis were realized by

using GraphPad Prism (version 6; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A Student t-test was done to compare two conditions and a one-way ANOVA with a Holm-Sidak's multiple comparisons test was done to compare more than two conditions. P values ≤ 0.05 were considered significant.

6.4 Results

LGR5 is expressed during postnatal development.

To assess whether or not epididymal LGR5 mRNA levels varied during the differentiation of the epididymis, LGR5 mRNA was evaluated in the proximal (initial segment, caput, and corpus) and distal (cauda) regions of the epididymis of 14-, 42- and 91-days old rats (Fig 6.1A). LGR5 mRNA levels in the proximal epididymis was high on day 14, when cells of the epididymis are undifferentiated, and decreased on day 42 to remained stable in adults. In the distal region of the epididymis, there were no significant differences in LGR5 mRNA levels according to the age of the rats. In the young rat, LGR5 mRNA levels was significantly higher in the proximal epididymis than in the distal epididymis, while there was no difference in rats of 42 and 90 days (Fig. 6.1A).

To assess if LGR5 was expressed in basal cells, co-localization of LGR5 with a specific marker of basal cell, p63, was done in epididymides from rats ranging in age from postnatal day 7 (PND7) to PND42 (Fig. 6.1B). LGR5 was present in the columnar cells of the undifferentiated epididymis of PND7 rat and localized along the lateral margins of the cells that line the lumen of the epididymis at this age, prior to the appearance of basal cells. LGR5 was present throughout the epithelium and there was no staining for p63, as previously reported [23, 32, 44]. By PND14, there was a decrease in the number of cells that were positive for LGR5 while p63 was present in some of the epithelial of the epididymis. From PND21 and until adulthood, LGR5 and p63 were both localized in cells at the base of the epithelium (Fig. 6.1B). There were no differences in immunostaining along the length of the epididymis.

LGR5 is expressed in all epididymal segments.

In the adult (day 91) epididymis, transcripts for LGR5 were present in all the segment of the epididymis and levels were significantly higher in the initial segment compared to the other segments (Fig. 6.2A). In situ hybridization indicated that LGR5 transcripts were present in all the segments of the epididymis, in cells at the base of the epithelium but also in other cell types (Fig. 6.2B). In the initial segment, some tubules showed the presence of rare LGR5 transcripts in basal

and narrow cells while most tubules showed a high level of LGR5 transcripts through the epithelium. LGR5 transcript were also observed in the basal cell of adult rat prostate tissue as previously described [6] (Fig. 6.2B).

Co-localization of LGR5 and p63 indicated that they are expressed in all segments of the epididymis and are restricted in the basal cell of the epithelium suggesting that there may exist a post-transcriptional regulation of LGR5. In the corpus and cauda epididymis, we observed projections of basal cells positive for LGR5 that reached the lumen of the tubules (Fig. 6.2C). Western blot analyses demonstrated that there was no significant difference in the protein level of LGR5 between the segments of the epididymis (Fig. 6.2D).

In situ hybridization of p63 transcripts indicated that unlike LGR5, p63 mRNA were exclusively localized in basal cells of the epididymis (Fig 6.2E). This indicates that the regulation of p63 likely differs from LGR5 at the level of transcription throughout the epididymis.

Identification of three populations of basal cells

To evaluate the different population of basal cells that comprise the adult epididymis, we examined the colocalization of ITGA6 (Cd49f) with LGR5 and p63. Antibodies against CD49f have been used to isolate both basal cells in the adult and columnar cells in young rats [21, 27]. Using co-localization of these three proteins we were able to distinguish 3 different immunostaining patterns of basal cells in the epithelium of the adult epididymis: ITGA6+/LGR5+/TP63+, ITGA6+/LGR5+/TP63- and ITGA6+/LGR5-/TP63+ (Fig. 6.3A). Quantification of the immunostaining patterns indicated that in all segments, most of cells are positive for the three markers (94.34 % in the initial segment, 87.31 ± 3.41 % in the caput, 91.41 ± 4.29 % in the corpus and 94.97 ± 1.98 % in the cauda). However, some of the cells were ITGA6+/LGR5+/TP63- (3.77 % in the initial segment, 11.20 ± 5.21 % in the caput, 8.59 ± 4.29 % in the corpus and 2.73 ± 1.55 % in the cauda) and a small percentage of the cells were ITGA6+/LGR5-/TP63+ (1.89 % in the initial segment, 1.49 ± 1.81 % in the caput, none in the corpus and 2.30 ± 2.27 % in the cauda) (Fig. 6.3B). We also did co-localization of LGR5 with two other basal cell markers; cyclooxygenase 1 (COX1) and cytokeratin 5 (KRT5) and a clear/narrow cell marker (ATP6V1B2). LGR5 co-localized with COX1 and KRT5 confirming its expression in the basal cells of the epididymis (Fig. 6.3C and D). We also observed some sporadic double positive cells for LGR5 and ATP6V1B2 in the proximal part of the epididymis (Fig. 6.3E), however there were too few of these to quantify.

The expression of LGR5 and p63 change after orchidectomy

Orchidectomy in rat results in a wave of apoptosis that begins in the initial segment and propagates to the cauda epididymidis and which results in rapid regeneration of the epithelium. While androgen reduce this effect, it does not overcome this process [45, 46]. To assess the effects of orchidectomy on LGR5 and p63 rats were either sham-operated (controls), orchidectomized or orchidetomized and given testosterone implants and were sampled 7 days after surgery. Seminal vesicle and ventral prostate weights confirmed the efficiency of the orchidectomy and testosterone maintenance [43]. In all three segments of the epididymis, there was an increase in the expression of LGR5 after orchidectomy (3,0-fold increase in the caput and cauda and 3,4-fold increase in the corpus) while orchidectomy plus testosterone maintenance reduced LGR5 levels relative to the control group in the caput and cauda of the epididymis (1,2-fold increase in the caput and 1,3-fold increase in the cauda) (Fig. 6.4). At the opposite, there was a decrease in the expression of p63 after orchidectomy in all three segments of the epididymis (4,1-fold decrease in the caput, 3,5 -fold decrease in the corpus and 2,2-fold decrease in the corpus) while orchidectomy plus testosterone maintenance reduced the decrease of p63 levels relative to the control group in the cauda of the epididymis (1.3-fold decrease) (Fig. 6.4). This suggests that the epithelial damage is associated with an increase in LGR5 levels and a decrease in p63 levels.

LGR5 is expressed in epididymal basal cells and organoids derived from basal cells

To evaluate the mRNA expression of LGR5 in the basal and non-basal cell fraction of the epididymis, a magnetic isolation of basal cells expressing ITGA6 was done [27] (Fig. 6.5A). Analysis of mRNA levels of the basal cell marker KRT5 allowed us to evaluate the efficiency of the isolation. A 24-fold increase in KRT5 mRNA levels was observed between the ITGA6+ and ITGA6- cell fractions (Fig. 6.5A). We subsequently analyzed the expression of LGR5 in the two cell fractions. Results indicated the presence of LGR5 mRNA in the two fractions while ITGA6+ cells overexpressed LGR5 compare than ITGA6- cells (Fig. 6.5A).

Isolated basal cells were then cultured in Matrigel under 3D conditions. As previously reported, single ITGA6+ basal cells rapidly proliferated to form spherical organoid structures [47]. Immunofluorescence staining of LGR5, p63, KRT5 and AQP9 was assessed in organoids after 7 days of culture and after 14 days of culture (Fig. 6.5B). After 7 days of culture early organoids showed no differentiation and were all positive for both LGR5, p63 and KRT5 while there were all

negative for AQP9. After 14 days of culture some ITGA6+ basal cells differentiate into principal cells as shown by the expression of AQP9. At this timepoint, organoids showed a decrease in membrane-localized LGR5 and an increased cytoplasmic localization of LGR5 [47] (Fig. 6.5B).

To assess the role of p63 in basal cell regulation, we inhibited its expression using lentiviral particles to deliver shRNA into basal cells grown in 2D culture. Three days after transfection, there was a transfection efficiency of 67% for the non-targeting shRNA and 68% for the p63 shRNA. We noted a lower proliferation 6 days after transduction for the basal cells transfected with the p63 shRNA compared to the control. We then obtained a single-cell suspension of basal cells and cultured them in 3D and observed a lower number of organoids for the cells transduced by the p63 shRNA compared to the non-targeting shRNA (Fig. 6.5C-D).

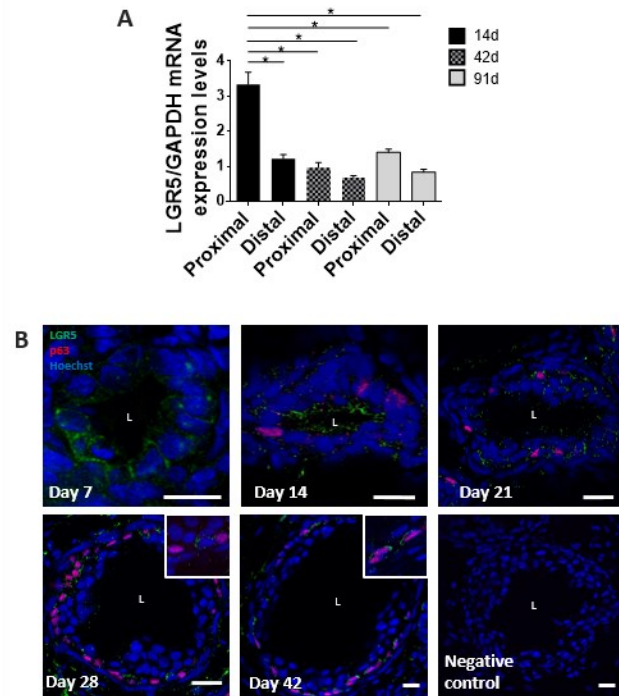


Figure 6.1. Characterization of LGR5 in the epididymis during postnatal development.

(A) LGR5 mRNA levels detected by qPCR in the proximal (initial segment, caput, and corpus) and distal (cauda) regions of the epididymis of 14, 42 and 91-day old rats. *ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparisons test, $p < 0.05$. B) Immunolocalization of LGR5 (green) and p63 (red) in the corpus epididymis of 7, 14, 21, 28, 42-day old rats. Immunostaining in other regions of the epididymis was similar to that observed in the corpus epididymidis. (IT indicates the interstitium and L indicates the lumen) (Scale bar, $10\mu\text{m}$).

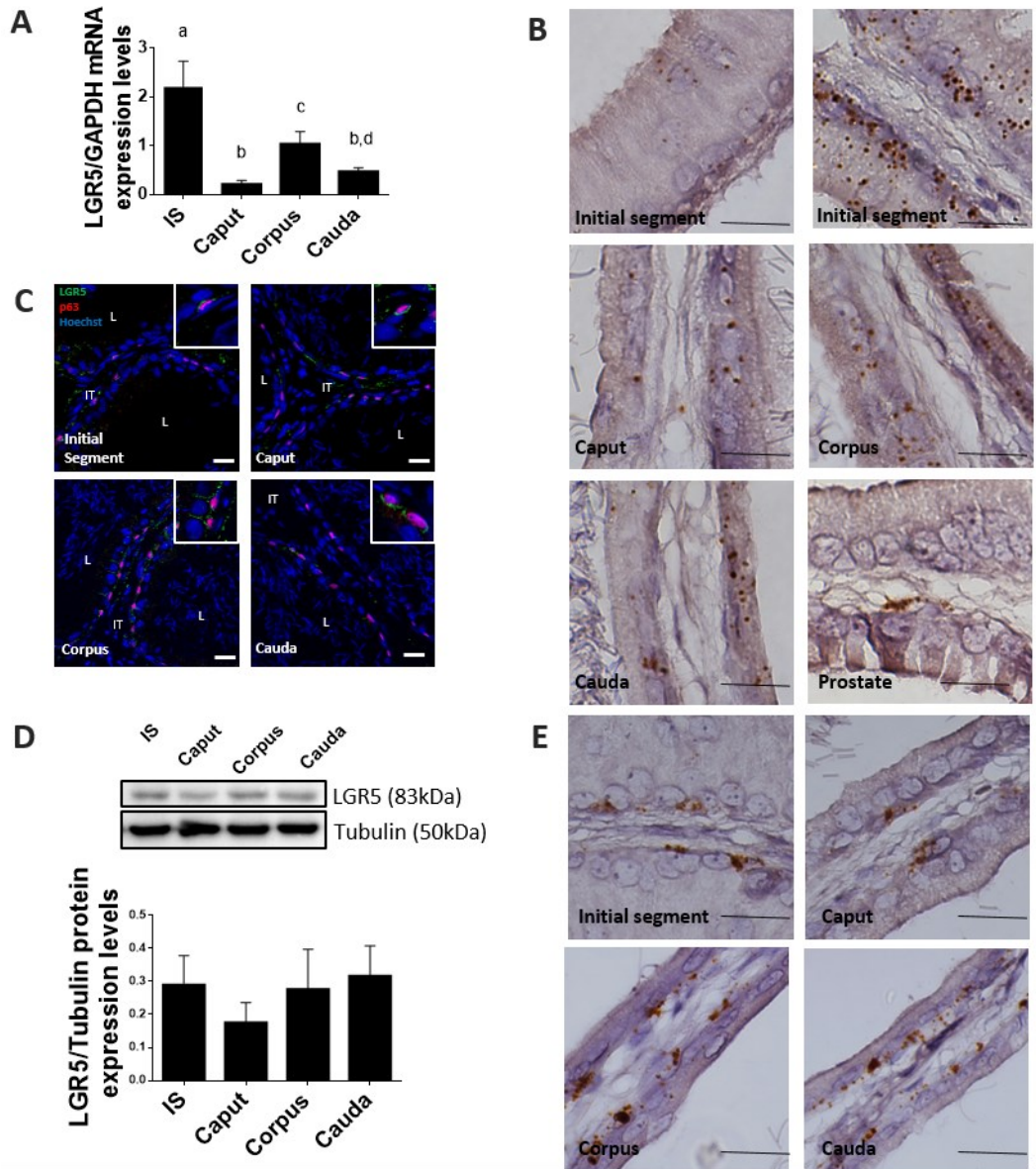


Figure 6.2. Characterization of LGR5 in the different segments of the adult epididymis.

(A) LGR5 mRNA levels detected by qPCR in the initial segment, caput, corpus and cauda regions of the epididymis. *ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparisons test, $p < 0.05$. B) Localization of LGR5 mRNA detected by in situ hybridization in different segments of adult rat epididymis and in the prostate (Scale bar, $50\mu\text{m}$). C) Immunolocalization of LGR5 (green) and p63 (red) in the initial segment, caput, corpus and cauda epididymidis of adult rats (IT indicates the interstitium and L indicates the lumen) (Scale bar, $10\mu\text{m}$). D) LGR5 protein levels quantified by western blot in the initial segment, caput, corpus and cauda regions of the epididymis of adult rats. *ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparisons test, $p < 0.05$. E) Localization of p63 mRNA detected by in situ hybridization in different segments of adult rat epididymis (Scale bar, $50\mu\text{m}$).

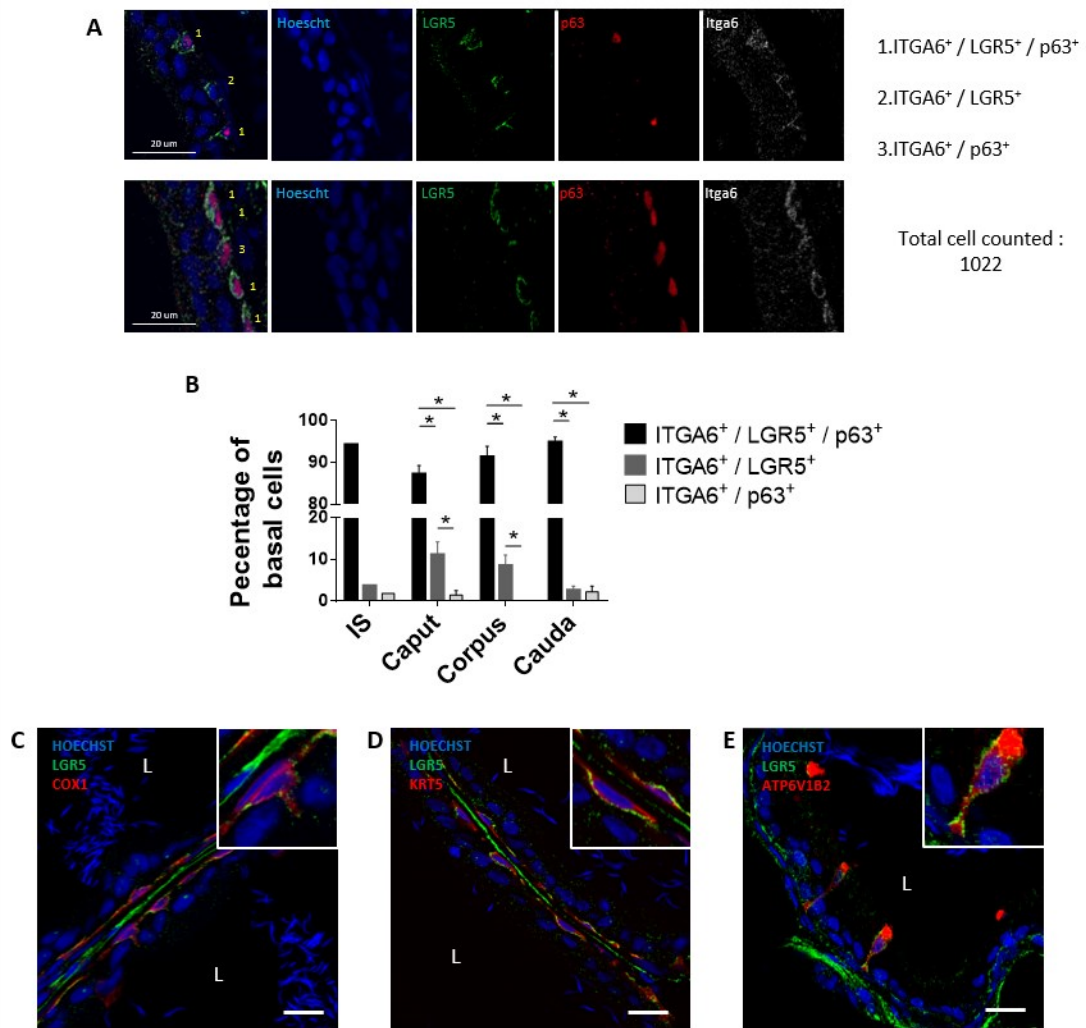


Figure 6.3. Identification of different populations of basal cells.

(A) Co-localization of LGR5 (green), p63 (red) and ITGA6 (grey) in epididymis of adult rats (L indicate the lumen). (B) Cells positives for ITGA6 were classified as basal cells and their frequencies evaluated according to their LGR5 and p63 expression (Scale bar, 20 μ m). (C-E) Co-localization of LGR5 (green) with KRT5 (C), COX1 (D) and ATP6V1B2 (E) in epididymis of adult rats (L indicate the lumen) (Scale bar, 20 μ m).

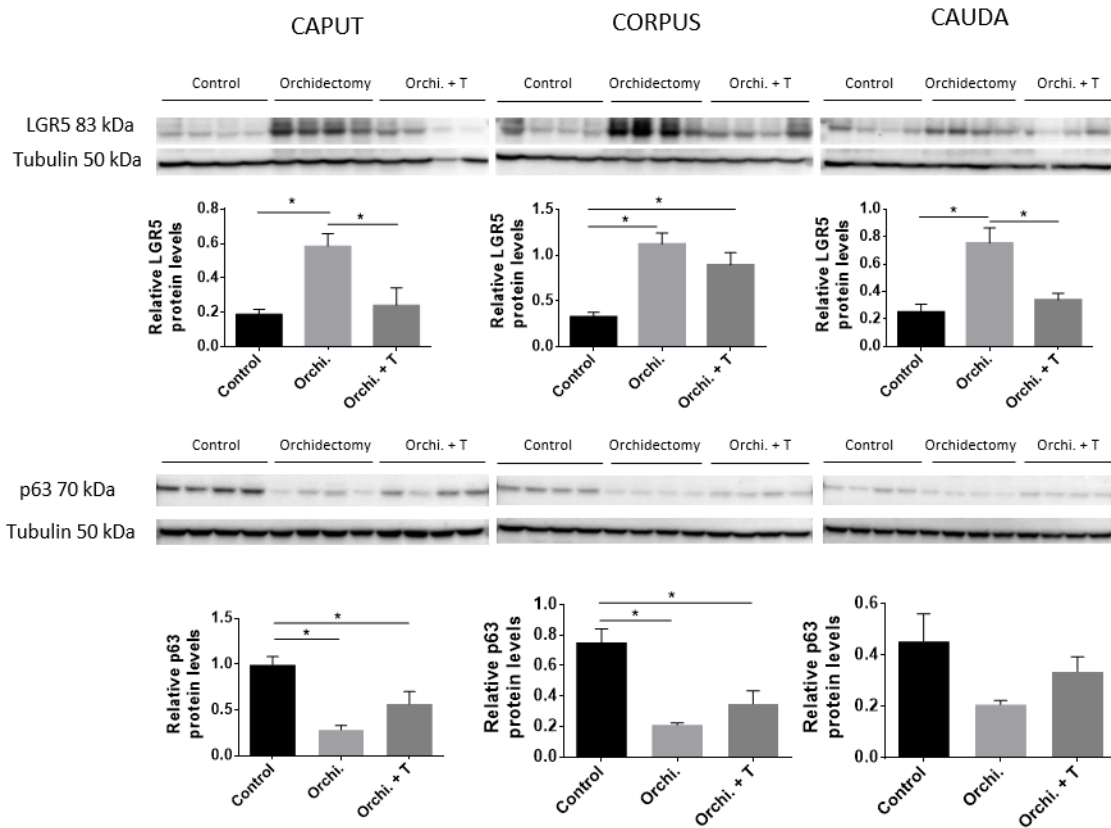


Figure 6.4. Effect of orchidectomy on LGR5 and p63 expression levels.

Adult rats were either sham-operated (n = 4) and served as controls, bilaterally orchidectomized via an abdominal incision (n = 4), or orchidectomized and given three subcutaneous implants of testosterone (T) (n = 4) to maintain epididymal testosterone levels. Rats were euthanized 7 days after surgery and epididymal proteins were used to detect the relative LGR5 and p63 protein levels. *ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparisons test, $p < 0.05$.

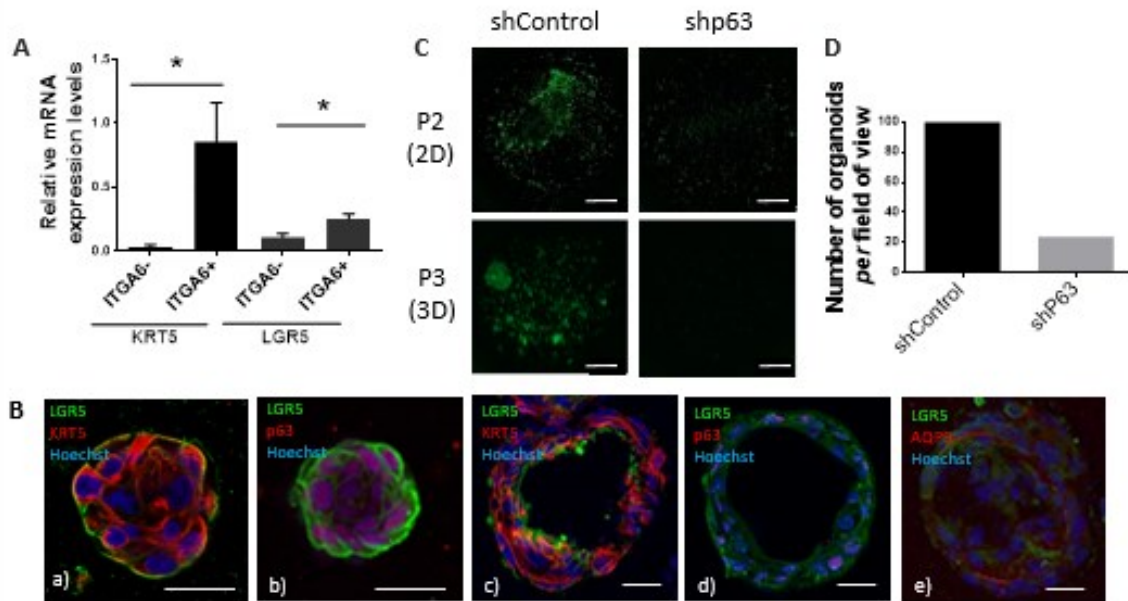


Figure 6.5. Isolation of the basal cells of the adult epididymis and formation of organoids.

Isolation of the basal cells of the adult epididymis and formation of organoids. A) KRT5 (marker of basal cells) and LGR5 mRNA levels in ITGA6-negative and ITGA6-positive (basal cells) epididymal cells. (n = 4) *Student t test, p<0.05. B) Immunofluorescence staining of LGR5, KRT5, p63 and AQP9 in organoids derived from ITGA6-positive cells. Panel a) and b) shows LGR5, KRT5 and p63 immunostaining after 7 days of culture; panel c), d) and e) shows LGR5, KRT5, p63 and AQP9 immunostaining in organoids after 14 days of culture. Nuclei were stained with a Hoechst dye (Scale bar = 50µm). C) EGFP fluorescence detected in basal cells after transduction with a non-targeting shRNA and a shRNA against p63. Photos were representative of several wells at day 6 of passages 2 and 3 (Scale 1000µm). D) Number of organoids per field of view after 7 days of culture in 3D.

6.5 Discussion

The existence of a stem cell population in the basal cell compartment of the epididymis was demonstrated in the rat and the mouse, however, no epididymal stem cells markers have yet been identified [24, 25, 48, 49]. In the current study, we observed the presence of LGR5-positive cells at the base of the epididymal epithelium. LGR5 is a receptor of the WNT signaling pathway and is implicated in the regulation of stem cell proliferation and development, including that of the prostate, the kidney and the urogenital system [3, 6-8, 20, 22, 50].

Early in postnatal development (PND7), undifferentiated columnar cells express only LGR5 and, as previously reported, p63 begins to be expressed in some of the columnar cells by postnatal day 14 [23, 32, 44, 51]. During development, the cells that express p63 migrate, or are pushed, towards the basal compartment of the epithelium and subsequently referred to as basal cells, while the other columnar cells subsequently differentiate into mature epithelial cells (principal, narrow, clear, and apical cells) [11]. A recent study from Dufresne and others showed that columnar cells can differentiate into basal, clear, and principal cells when cultured in 3D [21]. The expression of LGR5 that we observed by columnar cells collaborates their function as stem cell and suggests that basal cells represent a quiescent stem cell population derived from these columnar cells and which remain dormant unless the tissue needs them.

In situ hybridization experiments revealed the presence of LGR5 mRNA in the basal cells of the epididymis and in other cell types throughout the epithelium. In the initial segment, the mRNA profile of LGR5 is heterogeneous, with most tubules showing many mRNAs through their epithelia while some tubules show sparse mRNA in basal and narrow cells. The initial segment is uniquely regulate compared to the other segment and it was previously demonstrated that this segment is divided in 4 regions in the rat while it was suggested that it may be composed by different cell population [52-54]. The LGR5 mRNA localization in the epididymis profile was different to the one observed in the prostate where clusters of staining were observed in basal and luminal cells suggesting different regulation between these two pseudo-stratified epithelia [6]. This profile was also different to the one observed with p63 where p63 transcripts were present exclusively in basal cells. Analysis of the basal and non-basal cell fraction confirmed the presence of LGR5 mRNA in the two fractions while it was more present in the basal cell fraction. These results differ from protein levels in which LGR5 is localized in basal cells. The presence of LGR5 mRNA in terminally differentiated luminal epithelial cells suggests that either the transcript remains present in cell during differentiation or that these markers continue to be expressed in differentiated cells of the epididymis such as it is proposed in the uterine epithelium [55]. Similar

results were observed in the murine epididymis (not shown). The fact that LGR5 protein is not present in these cells may also suggest that LGR5 undergo post-transcriptional regulation to suppress the translation of LGR5 transcript. In the intestine the Neuronal precursor cell developmentally downregulated protein 4 (NEDD4) and its homologue NEDD4L, members of HECT-type E3 ubiquitin ligases target LGR5 for lysosomal and proteasomal degradation [56].

A recent study detected at least 3 basal cell populations in mouse epididymis using single cell sequencing [14]. These subpopulations expressed ITGA6 and cytokeratin 14 and revealed few diversities in their gene expression profile. Four basal cell clusters, all positive for KRT5, were also observed by single cell sequencing performed on 3D cultures of human epididymal cells [57]. In the human epididymis, the presence of TP63 was noted in a specific sub-population of KRT5-positive cells [58]. In the present study, we identified three separate populations of basal cells (ITGA6+) based on the expression of LGR5 and p63. These include ITGA6+/p63+/LGR5-; ITGA6+/p63+/LGR5+; and ITGA6+/p63-/LGR5+ cells. In the adult epididymis, ITGA6+/LGR5+/p63+ cells are the most common basal cell sub-population and the differential expression of p63 and LGR5 in basal cells may reflect cells undergoing different stages of differentiation. In the prostate, p63 is also expressed by cells at the base of the epithelium and is involved in the commitment of progenitor cells [34, 59]. In the epidermis, it has been proposed that the expression of p63 preserves the proliferation potential of basal cells and prevents the differentiation of these cells [60]. If this is the case in the epididymis, then one would expect that p63+ subpopulations of basal cells to remain undifferentiated. Murashima, et al. [33] reported that transplanted epididymides from p63 knockout mice do not form any basal cells but were composed by other cell types of the epididymis, thereby suggesting that in absence of p63 all columnar cells differentiate into principal, narrow, clear, and apical cells. The inhibition of the transcription factor p63 that we carried out on basal cells in vitro led to a decrease in the proliferation and self-renewal of these cells, in correlation with the previous data indicating that p63 is essential for the maintenance of basal cells [33]. However, we could not evaluate the effect of this inhibition on the differentiation of basal cells into other cell types since the formation of our organoid model to study differentiation was prevented.

We also observed sporadically positive cells for LGR5 and ATP6V1B2; the latter being recognized as a marker of clear and narrow cells [61]. However, the proximal localization of the cell and their morphology that we observed in the tissue seems particular to narrow cells with an apical nucleus and a connection to the basement membrane by a ramification. In situ hybridization also confirm the presence of LGR5 mRNA in these cells. Cells positive for ATP6V1B2 were also

observed in undifferentiated organoids derived from columnar cells and double positive cells for KRT5 and B1-VATPase in the epididymis of cattle were also detected [21, 62]. These cells could then represent an intermediary population of cells or differentiated narrow/clear cells that conserved their basal expression of LGR5/KRT5 in the adult tissue.

Studies have shown that orchidectomy or efferent duct ligation results in a wave of apoptosis in the epididymis and that the tissue rapidly regenerates with an increase in mitotic figures 2 to 3 days after efferent duct ligation and the proliferation of a basal cell population that survive after orchidectomy [31, 63-65]. Our results indicate that LGR5 was increased 7 after orchidectomy. Interestingly, androgen maintenance did not maintain LGR5 levels to that of controls in the corpus of the epididymis. Fan and Robaire [46] observed that while testosterone implants decreased apoptosis that testosterone could not prevent apoptosis and that other unidentified testicular factors also played a role in preventing apoptosis, our results supporting these observations [45]. In the prostate, LGR5-positive cells were resistant to castration and can proliferate and differentiate in vivo and in vitro [6]. In the epididymis lineage tracing of basal cell expressing LGR5 have yet to be reported to confirm their ability to regenerate the epithelium in vivo. We also observed a decrease of the protein level of p63 following orchidectomy. This decrease of p63 after injury was also observed in the olfactory epithelium and was associated with an activation of the reserve stem cell population [66]. Inhibition of p63 expression in epithelial cells of the mammary gland led to a decrease in cell adhesion genes, while inhibition of the Δ Np63 form in transgenic mice led to premature differentiation of epidermal cells. suggesting that the decrease in p63 is a key step towards the differentiation of basal cells into other cell types [67, 68]. In the prostate it has been shown, via lineage tracing studies that p63+ cells are able to differentiate while in the epididymis lineage tracing of basal cell expressing p63 have yet to be reported [37].

It was demonstrated in previous studies that population of basal cells were able to form epididymal organoids [24, 25]. In the present study organoids derived from ITGA6+ basal cells and culture for 7 days under 3D conditions were all comprised of LGR5+/p63+ cells suggesting that p63 and the LGR5/WNT signaling pathway play a role in the activation and differentiation of basal stem cells and that both are markers of basal stem cells implicated in the formation of organoids [6, 38, 69]. In the regenerative mammary ducts, myoepithelial cells positives for both LGR5 and TP63 were observed and were believed to be implicated in the regeneration of the tissue [70]. In colorectal cancer cells, two binding sites of TP63 in LGR5 promoter regions were identified and the study showed that the form TAp63 α target LGR5 to promote stemness of these

cells [71]. Further studies are needed to understand the link between these factors in basal epididymal stem cells.

In conclusion, the results from this study reveal that LGR5 is expressed in undifferentiated columnar cells and in adult epididymal basal cells. The expression of LGR5 and p63 allows the identification of several populations of basal cells and highlight the importance of these factors in the regulation of basal cells. We believe that the suggestion of LGR5/p63 as markers of epididymal stem cells will thus facilitate their isolation, characterization and the understanding of their regulation and differentiation.

6.6 Acknowledgements

Julie Dufresne and Mary Gregory (INRS) are thanked for their suggestions and assistance. The study was supported by grants to DGC from the Canadian Institute for Health Sciences, Natural Sciences and Engineering Research Council NSERC, and the Canada Research Chair in Reproductive Toxicology. LP was supported in part by a studentship from the Centre Interdisciplinaire de Recherche en Reproduction (CIRD) and the Réseau de Recherche Québécois en Reproduction (RQR).

6.7 References

1. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007; 449:1003-1007.
2. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, et al. *Lgr5*(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 2010; 6:25-36.
3. Barker N, Rookmaaker MB, Kujala P, Ng A, Leushacke M, Snippert H, van de Wetering M, Tan S, Van Es JH, Huch M, Poulsom R, Verhaar MC, et al. *Lgr5*(+ve) stem/progenitor cells contribute to nephron formation during kidney development. *Cell Rep* 2012; 2:540-552.
4. de Visser KE, Ciampricotti M, Michalak EM, Tan DW, Speksnijder EN, Hau CS, Clevers H, Barker N, Jonkers J. Developmental stage-specific contribution of LGR5(+) cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *J Pathol* 2012; 228:300-309.
5. Plaks V, Brenot A, Lawson DA, Linnemann JR, Van Kappel EC, Wong KC, de Sauvage F, Klein OD, Werb Z. *Lgr5*-expressing cells are sufficient and necessary for postnatal mammary gland organogenesis. *Cell Rep* 2013; 3:70-78.

6. Wang BE, Wang X, Long JE, Eastham-Anderson J, Firestein R, Junttila MR. Castration-resistant Lgr5(+) cells are long-lived stem cells required for prostatic regeneration. *Stem Cell Reports* 2015; 4:768-779.
7. de Lau W, Peng WC, Gros P, Clevers H. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev* 2014; 28:305-316.
8. Park S, Wu L, Tu J, Yu W, Toh Y, Carmon KS, Liu QJ. Unlike LGR4, LGR5 potentiates Wnt- β -catenin signaling without sequestering E3 ligases. *Sci Signal* 2020; 13.
9. Hannema SE, Hughes IA. Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res* 2007; 67:142-151.
10. Hermo L, Barin K, Robaire B. Structural Differentiation of the Epithelial Cells of the Testicular Excurrent Duct System of Rats During Postnatal Development. *The Anatomical Record* 1992; 233:205-228.
11. Sun EL, Flickinger CJ. Development of Cell Types and of Regional Differences in the Postnatal Rat Epididymis. *Am. J. Anat.* 1979; 154:27-56.
12. Browne JA, Yang R, Leir SH, Eggener SE, Harris A. Expression profiles of human epididymis epithelial cells reveal the functional diversity of caput, corpus and cauda regions. *Mol Hum Reprod* 2016; 22:69-82.
13. Dube E, Chan PT, Hermo L, Cyr DG. Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. *Biol Reprod* 2007; 76:1034-1044.
14. Rinaldi VD, Donnard E, Gellatly KJ, Rasmussen M, Kucukural A, Yukselen O, Garber M, Sharma U, Rando OJ. An atlas of cell types in the mammalian epididymis and vas deferens. *Elife* 2020; 9:e55474.
15. Wang K, Li N, Yeung CH, Cooper TG, Liu XX, Liu J, Wang WT, Li Y, Shi H, Liu FJ. Comparison of gene expression of the oncogenic Wnt/beta-catenin signaling pathway components in the mouse and human epididymis. *Asian J Androl* 2015; 17:1006-1011.
16. Koch S, Acebron SP, Herbst J, Hatiboglu G, Niehrs C. Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation. *Cell* 2015; 163:1225-1236.
17. Wang K, Li N, Yeung CH, Li JY, Wang HY, Cooper TG. Oncogenic Wnt/beta-catenin signalling pathways in the cancer-resistant epididymis have implications for cancer research. *Mol Hum Reprod* 2013; 19:57-71.
18. Kumar M, Tanwar PS. Canonical Wnt/beta-Catenin Signaling Regulates Postnatal Mouse Epididymal Development But Does Not Affect Epithelial Cell Differentiation. *Endocrinology* 2017; 158:4286-4299.
19. Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell* 2005; 9:283-292.
20. Marose TD, Merkel CE, McMahon AP, Carroll TJ. Beta-catenin is necessary to keep cells of ureteric bud/Wolffian duct epithelium in a precursor state. *Dev Biol* 2008; 314:112-126.
21. Dufresne J, Gregory M, Pinel L, Cyr D. Differential Gene Expression and Hallmarks of Stemness in Epithelial Cells of the Developing Rat Epididymis. *Research Square* 2022; PREPRINT (Version 1).
22. Kumar M, Syed SM, Taketo MM, Tanwar PS. Epithelial Wnt/betacatenin signalling is essential for epididymal coiling. *Dev Biol* 2016; 412:234-249.

23. Gregory M, Cyr DG. Effects of prostaglandin E2 on gap junction protein alpha 1 (GJA1) in the rat epididymis. *Biol Reprod* 2018; 100:123-132.
24. Mou H, Vinarsky V, Tata PR, Brazauskas K, Choi SH, Crooke AK, Zhang B, Solomon GM, Turner B, Bihler H, Harrington J, Lapey A, et al. Dual SMAD Signaling Inhibition Enables Long-Term Expansion of Diverse Epithelial Basal Cells. *Cell Stem Cell* 2016; 19:217-231.
25. Pinel L, Cyr DG. Self-renewal and differentiation of rat Epididymal basal cells using a novel in vitro organoid model. *Biol Reprod* 2021.
26. Girardet L, Augière C, Asselin MP, Belleannée C. Primary cilia: biosensors of the male reproductive tract. *Andrology* 2019; 7:588-602.
27. Mandon M, Hermo L, Cyr DG. Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common Properties with Adult Stem Cells. *Biol Reprod* 2015; 93:115-130.
28. Cyr D, Hermo L, Laird DW. Immunocytochemical Localization and Regulation of Connexin43 in the Adult Rat Epididymis. *Endocrinology* 1996; 137:1474-1484.
29. Gregory M, Dufresne J, Hermo L, Cyr D. Claudin-1 Is Not Restricted to Tight Junctions in the Rat Epididymis. *Endocrinology* 2001; 142:854-863.
30. Shum WW, Da Silva N, McKee M, Smith PJ, Brown D, Breton S. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 2008; 135:1108-1117.
31. Kim B, Roy J, Shum WW, Da Silva N, Breton S. Role of testicular luminal factors on Basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 2015; 92:9.
32. Hayashi T, Yoshinaga A, Ohno R, Ishii N, Kamata S, Yamada T. Expression of the p63 and Notch signaling systems in rat testes during postnatal development: comparison with their expression levels in the epididymis and vas deferens. *J Androl* 2004; 25:692-698.
33. Murashima A, Miyagawa S, Ogino Y, Nishida-Fukuda H, Araki K, Matsumoto T, Kaneko T, Yoshinaga K, Yamamura K, Kurita T, Kato S, Moon AM, et al. Essential roles of androgen signaling in Wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. *Endocrinology* 2011; 152:1640-1651.
34. Signoretti S, Pires MM, Lindauer M, Horner JW, Grisanzio C, Dhar S, Majumder P, McKeon F, Kantoff PW, Sellers WR, Loda M. p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:11355-11360.
35. Rock JR, Randell SH, Hogan BL. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech* 2010; 3:545-556.
36. Yalcin-Ozuysal O, Fiche M, Guitierrez M, Wagner KU, Raffoul W, Brisken C. Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death Differ* 2010; 17:1600-1612.
37. Lee DK, Liu Y, Liao L, Wang F, Xu J. The prostate basal cell (BC) heterogeneity and the p63-positive BC differentiation spectrum in mice. *Int J Biol Sci* 2014; 10:1007-1017.
38. Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG, et al. In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 2013; 494:247-250.
39. Turmel P, Dufresne J, Hermo L, Smith CE, Penuela S, Laird DW, Cyr DG. Characterization of pannexin1 and pannexin3 and their regulation by androgens in the male reproductive tract of the adult rat. *Mol Reprod Dev* 2011; 78:124-138.

40. DeBellefeuille S, Hermo L, Gregory M, Dufresne J, Cyr DG. Catenins in the rat epididymis: their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. *Endocrinology* 2003; 144:5040-5049.
41. Stratton LG, Ewing LL, Desjardins C. Efficacy of testosterone-filled polydimethylsiloxane implants in maintaining plasma testosterone in rabbits. *J Reprod Fertil* 1973; 35:235-244.
42. Brawer J, Schipper H, Robaire B. Effects of long term androgen and estradiol exposure on the hypothalamus. *Endocrinology* 1983; 112:194-199.
43. Cyr DG, Dufresne J, Pillet S, Alfieri TJ, Hermo L. Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. *J Androl* 2001; 22:124-135.
44. Shum WW, Hill E, Brown D, Breton S. Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. *Reproduction* 2013; 146:455-469.
45. Nicander L, Osman DI, Ploen L, Bugge HP, Kvisgaard KN. Early effects of efferent ductule ligation on the proximal segment of the rat epididymis. *Int J Androl* 1983; 6:91-102.
46. Fan X, Robaire B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology* 1998; 139:2128-2136.
47. Pinel L, Cyr DG. Self-renewal and differentiation of rat epididymal basal cells using a novel in vitro organoid model. *Biol Reprod* 2021; 105:987-1001.
48. Age-, Cell- and Region-Specific Immunoexpression of Estrogen Receptor α (But Not Estrogen Receptor β) during Postnatal Development of the Epididymis and Vas Deferens of the Rat and Disruption of This Pattern by Neonatal Treatment with Diethylstilbestrol*.
49. Pinel L, Mandon M, Cyr DG. Tissue regeneration and the epididymal stem cell. *Andrology* 2019; 7:618-630.
50. Kretzschmar K, Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Dev Biol* 2017; 428:273-282.
51. Atanassova N, McKinnell C, Fisher J, Sharpe RM. Neonatal treatment of rats with diethylstilboestrol (DES) induces stromal-epithelial abnormalities of the vas deferens and cauda epididymis in adulthood following delayed basal cell development. *Reproduction* 2005; 129:589-601.
52. Domeniconi RF, Souza AC, Xu B, Washington AM, Hinton BT. Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side? *Biol Reprod* 2016; 95:10.
53. Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP, Nguyen QA. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 2003; 125:871-878.
54. Tomsig JL, Usanovic S, Turner TT. Growth factor-stimulated mitogen-activated kinase (MAPK) phosphorylation in the rat epididymis is limited by segmental boundaries. *Biol Reprod* 2006; 75:598-604.
55. Sun X, Jackson L, Dey SK, Daikoku T. In pursuit of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-5 regulation and function in the uterus. *Endocrinology* 2009; 150:5065-5073.
56. Novellasdemunt L, Kucharska A, Jamieson C, Prange-Barczynska M, Baulies A, Antas P, van der Vaart J, Gehart H, Maurice MM, Li VS. NEDD4 and NEDD4L regulate Wnt signalling and intestinal stem cell priming by degrading LGR5 receptor. *Embo j* 2020; 39:e102771.

57. Leir SH, Yin S, Kerschner JL, Xia S, Ahmadi S, Bear C, Harris A. An organoid model to assay the role of CFTR in the human epididymis epithelium. *Cell Tissue Res* 2020; 381:327-336.
58. Leir SH, Yin S, Kerschner JL, Cosme W, Harris A. An atlas of human proximal epididymis reveals cell-specific functions and distinct roles for CFTR. *Life Sci Alliance* 2020; 3:e202000744.
59. Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F, Loda M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol* 2000; 157:1769-1775.
60. Koster MI, Roop DR. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J Dermatol Sci* 2004; 34:3-9.
61. Pietrement C, Sun-Wada GH, Silva ND, McKee M, Marshansky V, Brown D, Futai M, Breton S. Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol Reprod* 2006; 74:185-194.
62. Kim SW, Kim B. Vacuolar H(+)-ATPase is not restricted to clear cells of the epididymal epithelium in cattle. *J Anim Sci Technol* 2021; 63:262-271.
63. Abe K, Takano H. Early degeneration of the epithelial cells in the initial segment of the epididymal duct in mice after efferent duct cutting. *Arch Histol Cytol* 1989; 52:299-310.
64. Turner TT, Riley TA. p53 independent, region-specific epithelial apoptosis is induced in the rat epididymis by deprivation of luminal factors. *Mol Reprod Dev* 1999; 53:188-197.
65. Shum WW, Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Roy JW, Hill E, Pittet MJ, Breton S, Da Silva N. Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 2014; 90:90.
66. Packard A, Schnittke N, Romano RA, Sinha S, Schwob JE. DeltaNp63 regulates stem cell dynamics in the mammalian olfactory epithelium. *J Neurosci* 2011; 31:8748-8759.
67. Carroll DK, Carroll JS, Leong CO, Cheng F, Brown M, Mills AA, Brugge JS, Ellisen LW. p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006; 8:551-561.
68. Romano RA, Smalley K, Magraw C, Serna VA, Kurita T, Raghavan S, Sinha S. DeltaNp63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation. *Development* 2012; 139:772-782.
69. Shin K, Lee J, Guo N, Kim J, Lim A, Qu L, Mysorekar IU, Beachy PA. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* 2011; 472:110-114.
70. Lee HJ, Myung JK, Kim HS, Lee DH, Go HS, Choi JH, Koh HM, Lee SJ, Jang B. Expression of LGR5 in mammary myoepithelial cells and in triple-negative breast cancers. *Sci Rep* 2021; 11:17750.
71. Chen Y, Wang MH, Zhu JY, Xie CF, Li XT, Wu JS, Geng SS, Han HY, Zhong CY. TAp63 α targeting of Lgr5 mediates colorectal cancer stem cell properties and sulforaphane inhibition. *Oncogenesis* 2020; 9:89.

Supplemental Table 1. List of primers used in this study.

Gene	Primers	T _m
LGR5	F : GAGCATTCGTAGGCAACCCT R : GCGAGGCACCATTCAAAGTC	52.0
KRT5	F : GATCCAGAGGCTGAGATCCG R : AGTGACGACAGAGATGTTGACC	58.4
GAPDH	F : TGCCAGCCTCGTCTCA R : AACTTGCCGTGGGTAGAGTC	57.2

Supplemental Table 2. List of primary antibodies used in immunofluorescence in this study.

Antibody	Provider	Catalog No.	Concentration (µg/ml)	RRID
LGR5	Origene	TA503316	10	AB_2622395
P63	Proteintech	12143-1-AP	2.4	AB_10597397
ITGA6-Alexa Fluor 647	Bio-Rad	MCA2034A647	17.8	AB_2128298
AQP9	Alpha Diagnostic	AQ91-A	10	AB_1609295
COX1	Abcam	ab109025	5	AB_10865291
KRT5	Santa Cruz Biotechnology	SC-32721	1	AB_627852
ATP6V1B2	ABClonal	A3754	8.6	AB_2765252
Donkey Anti-Rabbit Rhodamine Red-X	Jackson Immunoresearch Laboratories	711-295-152	6	AB_2340613
Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488	Jackson Immunoresearch Laboratories	715-545-151	6	AB_2341099

7 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'épididyme est un organe du système reproducteur masculin impliqué dans la maturation des spermatozoïdes. Il est cependant peu étudié et la présence de cellules souches au sein de cet organe est une controverse depuis de nombreuses années (Pinel *et al.*, 2019). Des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont cependant permis de montrer que les cellules basales de l'épithélium épидидymaire partagent des propriétés communes avec des cellules souches et que la culture en 2D permet d'observer un début de différenciation de ces cellules (Mandon *et al.*, 2015).

Les expériences réalisées lors de mon doctorat sont la suite directe de ces travaux et ont consisté à la mise en culture des cellules basales d'épididyme de rats en 3D. Dans ces conditions, les cellules basales sont capables de s'auto-renouveler sur plus de 10 générations et de se différencier en cellules principales, elles-mêmes capables de sécréter la clustérine, une protéine jouant un rôle majeur dans la maturation des spermatozoïdes. Les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation de ces cellules basales ont ainsi permis de créer le premier modèle d'organoïde d'épididyme de rat qui reproduit la morphologie et certaines fonctions de l'épithélium épидидymaire (Pinel & Cyr, 2021).

7.1 Création d'un modèle d'organoïdes d'épididyme de rat

7.1.1 Mise en place et caractérisation du modèle

La première étape de notre modèle d'organoïde de rat consiste à isoler des cellules basales exprimant Itga6 (CD49f). Cette protéine d'adhésion cellulaire est exprimée au niveau de la membrane des cellules basales et permet d'obtenir, après tri magnétique, une fraction positive composée d'environ 90% de cellules basales (Mandon *et al.*, 2015). L'Itga6 est également exprimée dans de nombreuses cellules basales d'autres épithéliums mais aussi dans plus de 30 populations de CS suggérant ainsi qu'elle pourrait avoir un rôle important dans la régulation de ces cellules (Krebsbach & Villa-Diaz, 2017). Les intégrines possèdent différentes affinités avec des composants de la matrice extracellulaire tels que la laminine et la fibronectine et sont impliquées dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose cellulaire (Krebsbach & Villa-Diaz, 2017). Au sein des CS mésenchymateuses par exemple, les facteurs OCT4 et SOX2 se fixent au promoteur de CD49f afin de favoriser son activité et maintenir leurs caractéristiques de CS. Dans les CS embryonnaires, l'expression de CD49f empêche l'activation de la voie de signalisation $\beta 1$

permettant ainsi de conserver l'expression d'OCT4 et SOX2 (Yu *et al.*, 2012). Au sein de la prostate et de la glande mammaire, les cellules basales exprimant CD49f et CD24 sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier (Lawson *et al.*, 2007; Shackleton *et al.*, 2006). Une étude de 2019 a également permis la formation d'organoïdes à partir de cellules basales de l'urothélium exprimant CD49f, tel que c'est le cas pour l'épididyme (Santos *et al.*, 2019). Dans cette étude les cellules CD49^{f^{high}} triés par FACS sont capables de former des organoïdes à l'inverse des cellules CD49^{f^{low}}. Ces organoïdes sont formés à partir d'une cellule unique et récapitulent également la différenciation et la fonction de l'urothélium (Santos *et al.*, 2019). Dans l'épididyme, la présence de population de cellules CD49^{f^{high}} et CD49^{f^{low}} n'a cependant pas encore été étudiée.

Au sein de notre modèle d'organoïdes nous avons détecté la présence de cellules basales mais aussi de cellules principales. Environ 40% des organoïdes sont composés de cellules principales après 14 jours de culture. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le fait que tous les organoïdes ne possèdent pas de cellules principales à ce stade. En effet, chaque organoïde est une entité indépendante et ces derniers peuvent nécessiter des temps de prolifération et de différenciation différents ; cependant la limite imposée par le Matrigel® ne permet pas de maintenir nos cultures plus longtemps selon notre protocole actuel. Augmenter la durée possible de culture des cellules en 3D pourrait ainsi être une piste d'optimisation de notre modèle et pourrait être réalisé en utilisant des matrices extra-cellulaires de synthèse ou des systèmes de micro-fluidique par exemple. Une autre hypothèse est la présence de sous-population de cellules basales possédant des capacités de différenciation différentes. De plus, aucune cellule claire n'a été observée dans notre modèle. La différenciation des cellules basales de l'épididyme en cellules claires a cependant déjà été observée dans un modèle d'organoïde de souris formé à partir de cellules basales KRT5⁺ (Mou *et al.*, 2016). Les compositions de notre milieu et de celui de l'étude en question étant différentes il est ainsi difficile de conclure si c'est le milieu, l'espèce ou l'identité des cellules de départ qui explique cette différence entre les 2 modèles.

Dans notre étude, des organoïdes ont pu être formés à partir des cellules basales issues de la partie proximale et de la partie distale de l'épididyme mais nous avons observé la formation d'organoïdes plus nombreux et plus grands à partir des cellules de la partie proximale (Pinel & Cyr, 2021). Nous n'avons cependant pas observé de différence significative des niveaux protéiques de LGR5 entre les segments de l'épididyme pouvant expliquer cette disparité. De plus, nous avons observé que les organoïdes issus de la partie proximale expriment d'avantage la clustérine que ceux issus de la partie distale, reproduisant ainsi le profil observé dans le tissu.

Néanmoins, les organoïdes issus des deux segments présentent le même profil d'expression de CFTR et AQP9, ne reproduisant pas le profil observé *in vitro*, suggérant ainsi qu'une certaine pré-disposition quant à la différenciation des CS existent mais que l'environnement des CS intervient également dans leur différenciation. Plusieurs études ont réalisé la formation de modèles d'organoïdes à partir de cellules humaines provenant de différents segments de l'estomac et de l'intestin. Des analyses par séquençage de cellule unique sur ces organoïdes ont permis de montrer qu'ils conservent l'expression des ARNm spécifiques aux segments d'origine (Kayisoglu *et al.*, 2021; Middendorp *et al.*, 2014). Ces données suggèrent ainsi que l'expression génique spécifique à l'emplacement est intrinsèquement programmée dans les CS adultes de ces organes et que leur destin de différenciation est indépendant des signaux extracellulaires spécifiques à l'emplacement. En ce qui concerne l'épididyme, des études supplémentaires semblent nécessaire pour conclure.

7.1.2 Applications du modèle

Le modèle d'organoïdes développé dans cette thèse peut avoir plusieurs applications. Ce modèle pourrait, par exemple être utilisé en parallèle à des modèles animaux et de cultures cellulaires en 2D pour évaluer les effets de composés toxiques sur cet organe. L'épididyme est sensible aux composés toxiques et aux perturbateurs endocriniens, notamment à cause de la plasticité et du renouvellement de la BHE (Cyr *et al.*, 2018; Klinefelter & Suarez, 1997). Par exemple, en 2013, l'exposition de l'épididyme à un produit chimique organique appelé polychlorobiphényles chez la souris a entraîné une diminution de la mobilité des spermatozoïdes de l'épididyme, une altération de l'expression des protéines de jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité de la BHE (Cai *et al.*, 2013). Des retards de différenciation des cellules basales et un retard de différenciation du tubule associé à une diminution de la prolifération cellulaire ont également été observés à la suite de traitement par diéthylstilbestrol ou L-cystéine respectivement (Atanassova *et al.*, 2005; Atanassova *et al.*, 2001; Sawamoto *et al.*, 2003). Des modèles d'organoïdes d'autres tissus tels que la prostate et le foie ont par exemple déjà été utilisés pour évaluer l'effet de médicaments ou de perturbateurs endocrinien tels que le bisphénol A (Hu *et al.*, 2011; Shinozawa *et al.*, 2021).

Le modèle que nous avons développé reproduit deux fonctions principales de l'épididyme : la création de jonctions participant à la BHE et la sécrétion de protéines impliquées dans la maturation des spermatozoïdes. Il serait donc envisageable d'utiliser ce modèle pour étudier la capacité de maturation des spermatozoïdes *in vitro*. Il pourrait tout d'abord s'agir de

micro-injecter des spermatozoïdes prélevés dans le testicule de rats donneurs et d'observer si un changement de mobilité et des changements morphologiques sont observés après culture, de façon similaire à une étude réalisée avec des spermatozoïdes et des fragments d'épithélium épидидymaire humain (Moore, 1992). Seule la présence de la clustérine a été évaluée dans notre modèle et au vu du grand nombre de protéines sécrétées par l'épididyme et impliquées dans la maturation des spermatozoïdes, il est possible que des protéines supplémentaires se retrouvent dans notre modèle mais que certaines autres soient absentes. De plus, la fonction de barrière des organoïdes pourrait être testée en micro-injectant un colorant à l'intérieur de la lumière de l'organoïde et en observant la diffusion du colorant dans le milieu de culture comme cela a été décrit dans un modèle d'organoïde d'urothélium (Santos *et al.*, 2019). Les études de maturation de spermatozoïde *in vitro* à partir de tissus testiculaires ne permettent à l'heure actuelle d'obtenir qu'un faible rendement de spermatozoïdes possédant une capacité de fécondation (Abe *et al.*, 2020; Ibtisham & Honaramooz, 2020; Yuan *et al.*, 2020). L'association de ces 2 modèles de culture pourraient éventuellement, à long terme, permettre d'améliorer ce rendement.

7.2 Identification des cellules souches de l'épididyme

Lors de la culture des cellules basales de l'épididyme, nous avons cependant observé que seule une minorité des cellules basales sont capables de former des organoïdes, suggérant ainsi que seule une sous population de cellules basales possède ces caractéristiques de CS, comme cela est observé dans d'autres organes tels que la prostate et le rein (Romagnani, 2009; Schmelz *et al.*, 2005). Nous nous sommes ainsi donnés pour second objectif d'identifier un marqueur qui nous permettrait de distinguer et d'étudier spécifiquement ces cellules. La combinaison 1) d'analyses *in-silico* réalisées sur des données de micro-réseaux obtenues ultérieurement dans le laboratoire, 2) de recherches bibliographiques de marqueurs de CS identifiés dans d'autres organes, 3) de marquages par immunofluorescence, nous ont amené à nous intéresser à l'expression de LGR5 dans l'épididyme.

7.2.1 LGR5 : un marqueur candidat des cellules souches de l'épididyme

LGR5 est un récepteur de la voie de signalisation Wnt et permet d'identifier spécifiquement les cellules souches dans un très grand nombre d'organe (Leung *et al.*, 2018).

L'expression de LGR5 observée dans les cellules colonnaires chez les animaux de 7 jours est en corrélation avec les conclusions d'un article de 1982 (Sun & Flickinger, 1982). Dans cet article, il a été montré que les cellules colonnaires sont les précurseurs des cellules basales,

principales et étroites démontrant ainsi leur capacité de différenciation et suggérant leur nature de cellules souches. Des données en cours de publication au sein du laboratoire confirment également que les cellules colonnaires ont la capacité de former des organoïdes et de se différencier en cellules étroites/clairées lorsqu'elles sont cultivées en 3D. Les cellules formant ces organoïdes expriment également LGR5 lors des premiers jours de culture (Dufresne *et al.*, 2022 ; soumis). Il a été observé, au sein du tissu, qu'à partir de 14 jours certaines cellules colonnaires commencent à exprimer p63 et que ces cellules migrent à la base de l'épithélium à partir de 21 jours et sont ainsi considérées comme des cellules basales à partir de ce stade (Gregory & Cyr, 2018). D'après ces différentes données, il est possible d'émettre l'hypothèse que les cellules colonnaires n'exprimant pas p63 se différencient en cellules principales et en cellules étroites alors que celles exprimant p63 se différencient en cellules basales. Dans ce modèle aucun stock de cellules colonnaires ne persiste dans l'épithélium à l'âge adulte et ce sont donc les cellules basales qui ont la capacité de se différencier en cellules principales (Figure 7.1). Ce modèle que nous avons proposé au sein du laboratoire évoque également le fait que les cellules basales pourraient se « dé-différencier » en cellules colonnaires exprimant la Cx26 avant de se redifférencier en cellules principales exprimant la Cx32 (Mandon *et al.*, 2015; Pinel *et al.*, 2019). Cette hypothèse doit cependant encore être confirmée.

L'expression de LGR5 dans la majorité des cellules basales de l'épididyme adulte est surprenante (Leung *et al.*, 2018). En effet, entre 87 et 94 % des cellules basales expriment LGR5 selon le segment. Dans la majorité des organes, les CS ne représentent qu'une petite partie des cellules totales du tissu et dans les épithéliums elles représentent une petite proportion des cellules basales (Barker *et al.*, 2007; Huch *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015a; Zhang *et al.*, 2017a). Il a cependant été montré dans l'urothélium que l'expression de LGR5 n'est pas restreinte à un certain type cellulaire et qu'une majorité de cellules peuvent exprimer LGR5 sous certaines conditions tissulaires (Sun *et al.*, 2009). Les données que nous avons recueillies quant à ce pourcentage de cellules LGR5 positives se basent sur l'utilisation d'un anticorps. L'anticorps que nous avons utilisé est monoclonal, est un des anticorps commerciaux le plus utilisé et permet d'obtenir une bande au bon poids moléculaire lorsque utilisé en western-blot. Nous avons également utilisé des tissus en tant que contrôle négatif et positif lors des expériences d'immunofluorescence. Les expériences présentées en annexe de cette thèse confirment également l'expression de LGR5 dans de nombreuses cellules basales de l'épithélium de souris.

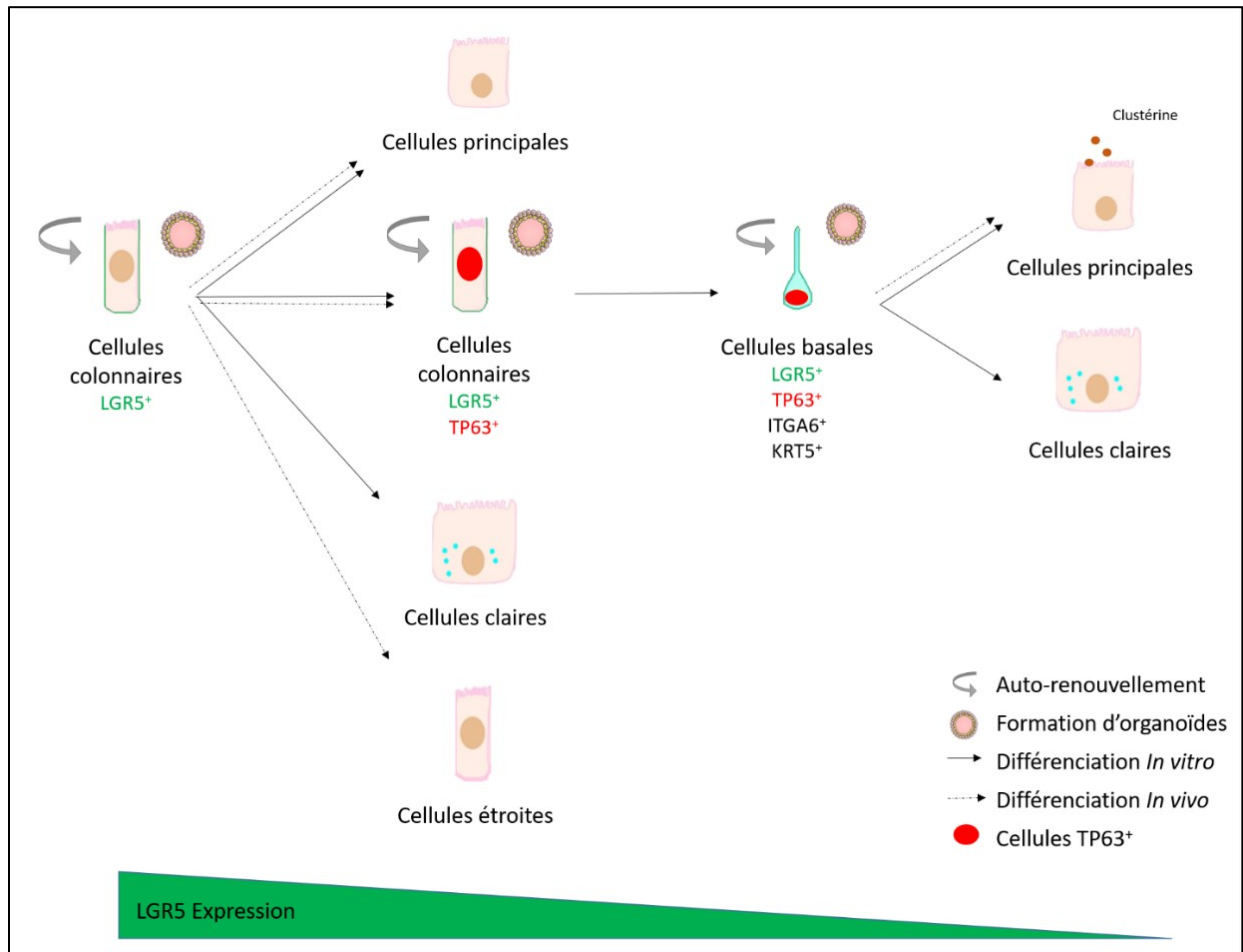


Figure 7.1 : Schéma représentatif des caractéristiques souches des cellules de l'épididyme

Les données obtenues dans ces travaux de thèse associées aux données disponibles dans la littérature permettent de proposer un schéma récapitulatif la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules épithéliales de l'épididyme. Les travaux réalisés par Sun & Flickinger en 1982 à l'aide de thymidine marquée ont permis de montrer que les cellules colonnaires sont à l'origine des cellules étroites, basales et principales alors que les travaux réalisés par Dufresne et al. en 2022 ont démontré que les cellules colonnaires peuvent se différencier en cellules basales, claires et principales lorsqu'elles sont cultivées en 3D. Des marquages par immunofluorescence ont aussi montré que les cellules colonnaires exprimant p63 migrent vers la membrane basale et deviennent ainsi des cellules basales. Les données obtenues par l'équipe de Mou et al. en 2016 ont quant à eux permis de démontrer que les cellules basales KRT5⁺ sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules claires *in vitro* et en cellules principales *in vivo*. Enfin, les données obtenues au cours de mon doctorat ont permis de montrer que les cellules basales Itga6⁺ sont capables de s'auto-renouveler et se différencier en cellules principales capables de sécréter la clustérine *in vitro*. De plus nous avons démontré que des cellules colonnaires et basales expriment LGR5 et p63. Créé par L. Pinel.

Différentes approches peuvent être envisagés pour isoler les cellules basales exprimant LGR5 afin de faciliter leur caractérisation. Nous pensons que ces approches doivent combiner l'utilisation du marqueur Itga6 qui permet d'obtenir une population de cellules basales déjà caractérisées dans une étude précédente au sein du laboratoire et l'utilisation du marqueur candidat LGR5. Un protocole de MACS est déjà mis au point pour trier les cellules Itga6⁺ mais celles-ci peuvent également être triées par FACS avec le même anticorps par exemple. Pour les cellules LGR5, des protocoles de tri par FACS ou MACS peuvent être développés. Nous avons réalisé des expériences de MACS grâce à des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-LGR5 alors que des expériences de FACS ont été réalisées avec le même anticorps que celui utilisé dans nos expériences de marquage et de western-blot. Les expériences de MACS nous ont permis d'obtenir une fraction négative composée de 2.7% de cellules LGR5⁺ et une fraction positive composée de 45% de cellules LGR5⁺. Un taux de mortalité cellulaire très élevé a cependant été observé dans la fraction positive (85%). Afin d'augmenter les taux de pureté tout en diminuant les taux de mortalité des optimisations ont été réalisées mais n'ont pas, à l'heure actuelle, permis d'améliorer l'efficacité du tri. Quant à l'expérience de FACS réalisée, celle-ci a permis d'obtenir un très faible nombre de cellules dans la fraction positive ce qui n'a pas permis de réaliser d'analyse subséquente pour vérifier le tri cellulaire. Des optimisations devraient ainsi permettre de vérifier l'efficacité des futurs tris cellulaire. Les approches possibles pour ces futurs tris sont présentées en figure 7.2.

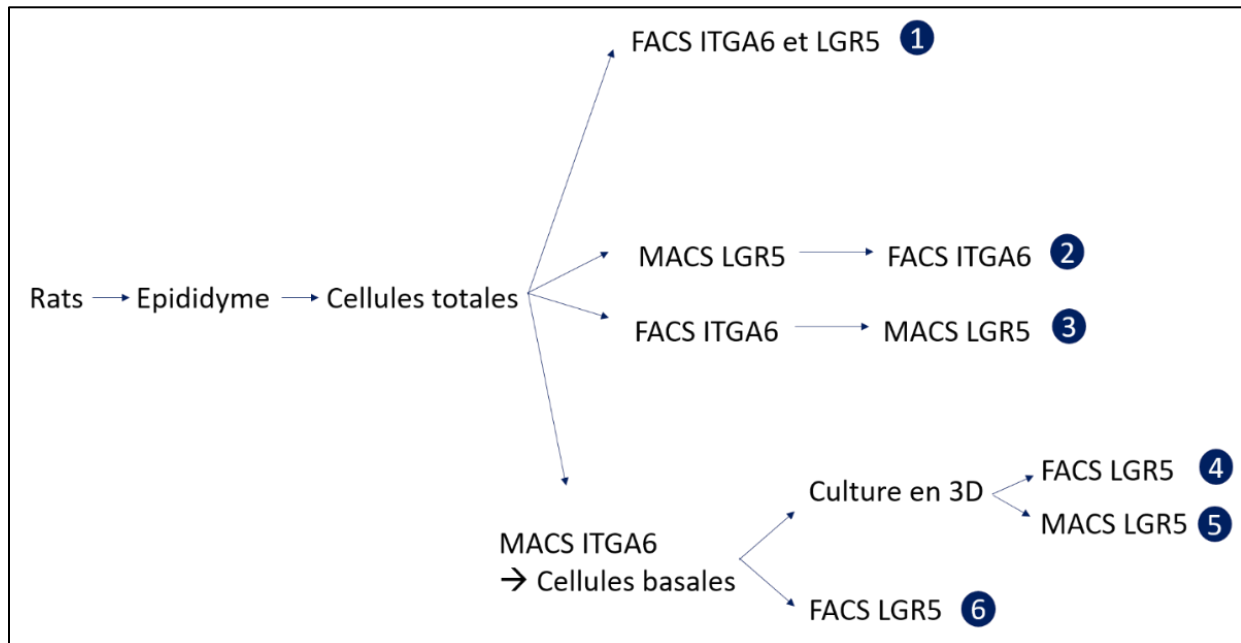


Figure 7.2 : Approches possibles pour l'isolement des cellules basales exprimant LGR5

Différentes approches expérimentales peuvent être envisagées afin d'isoler les cellules ITGA6⁺/LGR5⁺. Plusieurs avantages et contraintes sont liés à ces approches. Utiliser l'approche 1 et trier directement par FACS les cellules LGR5 à partir d'une population de cellules totales nécessiterait une quantité trop importante d'anticorps (évalué via titration à 120ul par essai) afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules. Nous avons réalisé plusieurs expériences utilisant l'approche 2 mais celles-ci, comme évoqué plus haut, ont entraîné une mortalité très élevée et une pureté faible après l'étape du MACS avec LGR5. Le risque des approches 4 et 5 est le changement de « phénotype » que pourrait entraîner la culture des cellules et qui a été déjà observé lors de la culture des cellules du colon (Dame *et al.*, 2018; Shimokawa *et al.*, 2017). Les approches 3 et 6 nécessitent de réaliser une digestion des tissus suivie de 2 tris subséquents. Ces approches, malgré le fait qu'elles entraînent de long temps de manipulation des cellules qui risque ainsi d'affecter leur vitalité, semblent cependant les plus pertinentes. Créé par L. Pinel

7.2.2 Existence de sous-populations de cellules basales

La présence de sous-population de cellules basales au sein de l'épididyme a précédemment été observée. Une étude de 2021 a permis d'identifier au moins 3 populations de cellules basales dans l'épididyme de souris en utilisant le séquençage de cellule unique (Rinaldi *et al.*, 2020b). Ces sous-populations expriment ITGA6 et la cytokératine 14 (KRT14) et semblent exprimer peu de diversité dans leur profil d'expression génique. Quatre groupes de cellules basales, tous positifs pour KRT5, ont été observés par séquençage de cellule unique réalisé sur des cultures en 3D de cellules d'épididyme humain (Leir *et al.*, 2020b). Il a aussi été observé, dans l'épididyme humain la présence de TP63 dans seulement une population de cellules positives pour KRT5 (Leir *et al.*, 2020a). Lors de nos travaux, nous avons démontré la capacité d'une population de cellules basales exprimant ITGA6 chez le rat à former des organoïdes et à se différencier en cellules principales *in vitro* (Pinel & Cyr, 2021). Une autre étude réalisée chez la souris démontre la capacité de cellules exprimant KRT5 à former des organoïdes et à se différencier en cellules claires *in vitro* et en cellules principales *in vivo* (Mou *et al.*, 2016). De plus, les cellules capables de former des organoïdes dans notre modèle sont toutes positives pour LGR5 et p63. Dans le tissu, nous avons observé la présence de 3 types de cellules basales au sein des cellules exprimant ITGA6 : la majorité de ces cellules est LGR5⁺ / p63⁺ alors qu'une minorité de ces cellules est LGR5⁺ / p63⁻ et LGR5⁻ / p63⁺. Des expériences de tri cellulaire et de marquages de lignée cellulaire seraient ainsi intéressantes à réaliser afin de déterminer si toutes ces populations de cellules partagent les mêmes capacités de CS et si elles représentent des cellules à différentes étapes de différenciation. Au sein de nombreux organes, l'utilisation de plusieurs marqueurs cellulaires permet d'identifier spécifiquement les CS et ceci pourrait également être le cas au sein de l'épididyme. Dans la prostate par exemple il a été identifié au moins 7 populations de cellules basales grâce à l'utilisation de 3 marqueurs (Lee *et al.*, 2014). Dans la trachée, 2 populations de

cellules basales de morphologie identique ont été identifiées ; une population de CS et une population de cellules précurseurs déjà engagées dans la différenciation (Watson *et al.*, 2015).

7.3 Mécanismes de régulation des cellules basales

La présence de CS au sein de la population de cellules basales de l'épididyme suggère l'existence de plusieurs mécanismes de régulation de ces cellules comme c'est le cas au sein de plusieurs épithéliums tels que celui de la prostate, de la trachée ou de la glande mammaire (Tadokoro *et al.*, 2016; Toivanen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017a). Au sein de l'épididyme, les cellules basales prolifèrent peu en condition d'homéostasie mais prolifèrent à la suite d'altérations entraînées par une ligation des canaux efférents suggérant ainsi que les CS de l'épididyme pourraient être en état de quiescence (Kim *et al.*, 2015).

- Le facteur de transcription TP63

Le facteur de transcription TP63 semble jouer un rôle important dans le processus de différenciation des cellules basales. TP63 est membre de la famille suppresseur de tumeur p53 et est exprimé au sein des épithéliums stratifiés et pseudostratifiés (Yang *et al.*, 1998). Il est nécessaire à la formation des cellules basales dans l'épididyme mais aussi dans l'épithélium de la peau, de la prostate, de la glande mammaire et dans l'épithélium olfactif (Arason *et al.*, 2014; Koster & Roop, 2004; Lee *et al.*, 2014; Murashima *et al.*, 2011; Packard *et al.*, 2011). Dans notre étude, tous les organoïdes observés après 7 jours de culture sont composés de cellules positives pour p63 alors que seules les cellules en périphérie sont positives pour TP63 dans les organoïdes après 14 jours de culture confirmant le rôle clef de ce facteur dans la régulation des cellules basales. Des études de traçage des cellules p63⁺ au sein de la prostate ont démontré que ces cellules sont à l'origine des cellules luminales et neuroendocrines (Lee *et al.*, 2014; Pignon *et al.*, 2013). Certaines hypothèses indiquent que la perte de TP63 induirait la différenciation des cellules basales ou du moins ferait partie du processus de différenciation (Haas 2019). Les expériences d'inhibition de p63 que nous avons réalisés dans les cellules basales en culture ont entraîné une baisse de leur prolifération et auto-renouvellement. L'utilisation d'animaux transgéniques dont les cellules sont inhibées pour p63 a démontré une absence de cellules basales dans l'épididyme, confirmant son rôle dans la formation des cellules basales mais a également montré une augmentation du nombre de cellules principales pouvant suggérer une différenciation des cellules basales en cellules principales lorsqu'elles perdent TP63 (Murashima *et al.*, 2011).

- Les protéines de jonctions

La communication cellulaire via les connexines est également impliquée dans la régulation des CS (Esseltine *et al.*, 2020; Todorova *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2012). Au sein de notre modèle d'organoïde épидидymaire de rat, nous avons démontré une forte expression de la Cx43 entre les différentes cellules qui forment l'organoïde. Une inhibition de la Cx43 au sein de CS embryonnaires entraîne une diminution de l'expression d'OCT4 et Nanog et une augmentation de marqueur de différenciation, démontrant ainsi que la Cx43 permet de maintenir le potentiel souche de certaines CS (Todorova *et al.*, 2008).

- Les projections cytoplasmiques

Les cellules basales possèdent des projections cytoplasmiques qui atteignent la lumière du tubule et qui jouent un rôle de senseur de l'environnement (Shum *et al.*, 2008). Il est ainsi possible d'émettre l'hypothèse que c'est grâce à ces projections et les signaux perçus par leur intermédiaire que les cellules basales « prennent connaissance » d'une altération et provoquent leur prolifération et/ou différenciation. Dans l'épididyme, nos expériences d'immunofluorescence permettant de détecter LGR5 nous ont montré que cette protéine est bien présente au sein des projections cytoplasmiques des cellules basales. Au sein de la prostate, il a été montré qu'il existe un mécanisme d'action appelé « inhibition par contact luminal » afin de réguler la différenciation des cellules basales. En effet, une altération des cellules luminales de l'épithélium via un système Cre-lox inducible couplé à un système de suivi de lignée a permis de montrer une réactivation des cellules basales. Des études *in vitro* réalisées à partir de différents ratios de cellules basales et luminales ont également permis de confirmer que le contact des cellules basales souches avec les cellules différenciées permet de limiter leur différenciation (Horton *et al.*, 2019).

- Les cils primaires

Il a également été montré que les cellules basales possèdent des cils primaires à leur surface (Bernet *et al.*, 2018). Ces cils, non mobiles jouent un rôle de mécanosenseurs et d'antennes de signalisation pour la voie de signalisation Hedgehog (Girardet *et al.*, 2019; Singla & Reiter, 2006). Des données en cours de publication indiquent que l'inhibition de ces cils dans un modèle de souris transgéniques entraîne une perturbation de l'homéostasie épидидymaire via une diminution du nombre de cellules basales et une augmentation du nombre de cellules principales. Ces mêmes résultats avaient également été observés lorsque des épидидymes

provenant d'animaux transgéniques inhibés pour TP63, un marqueur de cellules basales avait été transplanté dans la capsule rénale d'animaux receveurs, confirmant que les cellules basales jouent un rôle dans l'homéostasie de l'épididyme (Murashima *et al.*, 2011). Des expériences de ligations de canaux efférents sur les animaux inhibés pour le cil primaire des cellules basales démontrent une diminution de la régénération de l'épithélium comparativement aux animaux contrôles, confirmant ainsi un rôle des cellules basales dans la régénération de l'épithélium. Des données de traçage de lignée sont cependant nécessaires pour confirmer le rôle de ces cellules *in vivo* en situation d'homéostasie ou d'altération de l'épithélium. Il pourrait également être possible d'injecter des cellules basales d'épididyme de rat sous la peau ou dans la capsule rénale de rats immunodéficients afin d'observer leur capacité à régénérer un épithélium épидидymaire à partir de cellules basales contrôles et à partir de cellules basales inhibées pour le cil primaire.

- Les voies de signalisations

Les CS sont présentes au sein de niche cellulaire dans les organes. Les cellules basales possèdent des récepteurs de la voie de signalisation Hedgehog via les cils primaires, des récepteurs de la voie WNT via LGR5 et des récepteurs de la voie Notch via Notch 1 à 3 et expriment également des connexines permettant la communication entre les cellules (Girardet *et al.*, 2019; Mandon *et al.*, 2015). Dans nos données obtenues à partir du modèle d'organoïdes, nous avons observé que les organoïdes entourés de cellules basales semblent plus larges que les organoïdes entourés de cellules non basales. Ces résultats suggèrent donc que les cellules basales pourraient elle-même faire partie de la niche des CS et réguler leur prolifération et différenciation. Des modèles de culture en 3D de cellules basales avec des inserts de cellules non basales pourraient également être réalisés afin d'évaluer plus précisément l'impact des autres types cellulaires dans la régulation des cellules basales. On pourrait aussi par exemple imaginer une culture de cellules basales provenant de la partie proximale avec des cellules non basales de la partie distale et vice-versa afin d'évaluer l'impact de la segmentation de l'épididyme. Il est de plus connu que certaines protéines Wnt sont sécrétées par les cellules principales via les épидидyosomes (Cheng *et al.*, 2018). De plus, le besoin que nous avons observé d'ajouter des facteurs tels que R-spondin et Noggin dans le milieu de culture des cellules basales pour permettre leur auto-renouvellement confirment que celles-ci sont régulées par des voies de signalisation telles que la voie Wnt et la voie BMP (Pinel & Cyr, 2021).

7.4 Perspectives

Différentes perspectives peuvent découler de ces travaux de recherche.

Le modèle d'organoïde que nous avons développé permet de diminuer l'utilisation d'animaux en utilisant à notre avantage la capacité d'auto-renouvellement des cellules basales mais celui-ci utilise le Matrigel® afin de reproduire l'environnement de ces cellules. Le Matrigel® est composé de protéines de la matrice extra-cellulaire sécrétées par les cellules de sarcome de souris Engelbreth-Holm-Swarm. Il contient principalement de la laminine, du collagène IV mais aussi des facteurs de croissance tels que l'EGF et le FGF (Vukicevic *et al.*, 1992). Sa provenance d'un tissu cancérigène hétérogène entraîne cependant des variations de concentrations de protéines entre différents lots de Matrigel® (Talbot & Caperna, 2015). De nouvelles alternatives au Matrigel® se sont développées depuis quelques années telles que le VitroGel® et permettent de ne pas utiliser de protéines dérivées de l'animal mais d'utiliser à la place des protéines de synthèse. Le modèle d'organoïde d'épididyme pourrait ainsi être optimisé en utilisant ces alternatives afin de limiter l'utilisation de protéines animales. Une augmentation du temps de culture des cellules sans avoir besoin de les « passer » afin de renouveler la matrice extra-cellulaire pourrait également être testé avec ces protéines de synthèse.

Une étude micro-réseau comparant le profil d'expression génique de l'épididyme à différentes périodes de développement a été récemment réalisée au sein du laboratoire (Dufresne *et al.*, 2022 ; soumis). Cette étude pourrait ainsi permettre d'identifier un ou des marqueurs spécifiques aux cellules colonnaires, ce qui pourrait permettre de vérifier l'hypothèse de la « dé-différenciation » des cellules basales en cellules colonnaires évoquée précédemment. En effet, le manque de marqueur spécifique aux cellules colonnaires ne nous a pas permis d'élaborer cette partie. De plus, il est possible en utilisant le modèle d'organoïde de rat de modifier le milieu de culture en testant différents suppléments afin d'étudier les facteurs et voies de signalisation qui favorisent la prolifération ou la différenciation des cellules basales vers différents types cellulaires. Ceci pourrait ainsi permettre d'obtenir par exemple des cellules claires en plus des cellules basales et principales au sein du modèle. Dans les organoïdes d'intestin par exemple, la différenciation des CS intestinales en cellules rares nommées cellules entéroendocrine a nécessité plusieurs modifications du milieu de culture original avec l'inhibition combiné de plusieurs voies de signalisation (Basak *et al.*, 2017).

Afin de continuer la caractérisation des CS de l'épididyme et d'obtenir des données fonctionnelles, les prochaines étapes sont d'une part le tri des cellules LGR5⁺ et p63⁺ tel

qu'évoqué plus haut mais aussi l'utilisation de modèle de souris transgéniques pour effectuer le traçage de ces lignées. Un modèle exprimant une protéine fluorescente sous influence du promoteur LGR5 permettrait ainsi de confirmer la localisation de LGR5 au sein de l'épididyme mais aussi de faciliter l'isolement de ces cellules sans dépendre d'anticorps. Des souris exprimant une Cre-recombinase inductible sous influence du promoteur LGR5 pourrait quant à elle permettre de réaliser un suivi de la lignée LGR5⁺ chez des animaux adultes dans des conditions d'homéostasie et d'altération tissulaire. Des expériences sur de tels modèles ont été réalisées lors de ce projet mais n'ont cependant pas permis d'obtenir de résultats définitifs. Les détails et discussions de ces expériences sont détaillées en annexe 1 de ce document.

L'existence de différentes sous-populations de cellules basales exprimant LGR5 et p63 ainsi que l'expression de ces deux marqueurs dans tous les organoïdes en prolifération indiquent une importance de LGR5 mais aussi de p63 dans la régulation et/ou l'identification des cellules souches de l'épididyme. Des expériences d'inhibition de p63 ont permis de démontrer que celui-ci est primordial dans la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules basales. Ces expériences doivent être reproduites et des expériences supplémentaires pourraient également permettre de mieux comprendre son rôle dans la différenciation de l'épithélium.

Enfin, les cellules basales font parties de la BHE et il a déjà été démontré par le passé qu'une altération de cette barrière peut entraîner des répercussions sur la fertilité (Dube & Cyr, 2012; Dube *et al.*, 2012; Dube *et al.*, 2008; Dube *et al.*, 2010; Elbashir *et al.*, 2021; Pattinson & Mortimer, 1987). La présence de CS impliquées dans la régénération de l'épithélium au sein de l'épididyme pourrait ainsi être une nouvelle piste afin de comprendre les causes d'infertilité idiopathique ou pour offrir des pistes pour développer de nouvelles stratégies pour le traitement de certains types d'infertilités dont l'azoospermie obstructive qui est associée à une dégénération du tissu près du site d'obstruction.

8 CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Les résultats obtenus lors de ce doctorat ont permis l'avancement des connaissances sur l'épithélium épидидymaire de plusieurs façons.

La création d'un modèle unique d'organoïde épидидymaire de rat a ainsi permis d'obtenir un nouvel outil d'étude de l'épididyme. La caractérisation de ce modèle a en effet montré que celui-ci reproduit la morphologie et certaines fonctions de l'épididyme et pourrait donc être utilisé à long terme pour plusieurs applications telles que la toxicologie de la reproduction, la compréhension fondamentale de cet organe ou encore la maturation de spermatozoïde *in vitro*. Ce modèle permet également l'auto-renouvellement des cellules basales d'épididyme et donc d'obtenir plusieurs générations de cellules à partir de cellules primaires ainsi que de congeler et décongeler ces cellules, contribuant ainsi à réduire l'utilisation d'animaux et de répondre à la règle des 3 R visant à améliorer l'expérimentation en recherche scientifique.

Ce modèle a également permis de confirmer l'existence de CS au sein de l'épididyme de rat. Cette existence a été un sujet de controverse au sein de la communauté scientifique. Une seule étude avant la nôtre avait permis de démontrer la capacité de différenciation de ces cellules chez la souris et notre étude a ainsi permis de confirmer et d'appuyer ces données mais aussi de caractériser leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation.

Notre projet a également permis de proposer un marqueur pour identifier spécifiquement la population de cellules souches épидидymaires. Une combinaison d'analyse *in silico*, de recherches bibliographiques et de marquage par immunofluorescence nous ont permis de proposer LGR5. LGR5 est exprimé dans les cellules colonnaires et les cellules basales de l'épididyme et son expression diminue au cours de la différenciation alors qu'elle augmente à la suite d'altérations de l'épithélium causées par une ligation des canaux efférents. LGR5 est également exprimé dans les cellules à l'origine des organoïdes. Enfin, l'expression de LGR5 et p63 nous ont permis de mettre en évidence la présence de sous-populations de cellules basales au sein de l'épididyme.

En conclusion, la démonstration de la présence de CS au sein de l'épididyme est une étape importante pour améliorer notre compréhension de la régulation de cet organe dans des conditions homéostatiques et pathologiques.

9 BIBLIOGRAPHIE

- Abe K & Takano H (1989a) Cytological response of the principal cells in the initial segment of the epididymal duct to efferent duct cutting in mice. *Archives of histology and cytology* 52(4):321-326.
- Abe K & Takano H (1989b) Early degeneration of the epithelial cells in the initial segment of the epididymal duct in mice after efferent duct cutting. *Archives of histology and cytology* 52(3):299-310.
- Abe K, Takano H & Ito T (1982) Response of the epididymal duct in the corpus epididymidis to efferent or epididymal duct ligation in the mouse. *Journal of reproduction and fertility* 64(1):69-72.
- Abe K, Takano H & Ito T (1983) Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. *Archivum histologicum japonicum* 46(1):51-68.
- Abe K, Takano H & Ito T (1984) Interruption of the luminal flow in the epididymal duct of the corpus epididymidis in the mouse, with special reference to differentiation of the epididymal epithelium. *Archivum histologicum japonicum* 47(2):137-147.
- Abe T, Nishimura H, Sato T, Suzuki H, Ogawa T & Suzuki T (2020) Transcriptome analysis reveals inadequate spermatogenesis and immediate radical immune reactions during organ culture in vitro spermatogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 530(4):732-738.
- Adam C & Cyr DG (2016) Role of Specificity Protein-1 and Activating Protein-2 Transcription Factors in the Regulation of the Gap Junction Protein Beta-2 Gene in the Epididymis of the Rat. *Biology of reproduction* 94(6):120.
- Adamali HI & Hermo L (1996) Apical and Narrow Cells Are Distinct Cell Types Differing in Their Structure, Distribution, and Functions in the Adult Rat Epididymis. *Journal of Andrology* 17(3):208-222.
- Agarwal A & Hoffer AP (1989) Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. *Journal of Andrology* 10(6):425-431.
- Akmal KM, Dufour JM & Kim KH (1996) Region-specific localization of retinoic acid receptor-alpha expression in the rat epididymis. *Biology of reproduction* 54(5):1111-1119.
- Ali N, Zirak B, Rodriguez RS, Pauli ML, Truong HA, Lai K, Ahn R, Corbin K, Lowe MM, Scharschmidt TC, Taravati K, Tan MR, Ricardo-Gonzalez RR, Nosbaum A, Bertolini M, Liao W, Nestle FO, Paus R, Cotsarelis G, Abbas AK & Rosenblum MD (2017) Regulatory T Cells in Skin Facilitate Epithelial Stem Cell Differentiation. *Cell* 169(6):1119-1129 e1111.
- Alison MR, Poulosom R, Forbes S & Wright NA (2002) An introduction to stem cells. *The Journal of pathology* 197(4):419-423.
- Álvarez-Aznar A, Martínez-Corral I, Daubel N, Betsholtz C, Mäkinen T & Gaengel K (2020) Tamoxifen-independent recombination of reporter genes limits lineage tracing and mosaic analysis using CreER(T2) lines. *Transgenic research* 29(1):53-68.
- Amann RP & Howards SS (1980) Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *The Journal of Urology* 124(2):211-215.

- Andersson AM, Edvardsen K & Skakkebaek NE (1994) Expression and localization of N- and E-cadherin in the human testis and epididymis. *International journal of andrology* 17(4):174-180.
- Andonian S & Hermo L (1999) Immunocytochemical localization of the Ya, Yb1, Yc, Yf, and Yo subunits of glutathione S-transferases in the cauda epididymidis and vas deferens of adult rats. *J Androl* 20(1):145-157.
- Andonian S & Hermo L (2003) Immunolocalization of the Yb1 subunit of glutathione S-transferase in the adult rat epididymis following orchidectomy and efferent duct ligation. *J Androl* 24(4):577-587.
- Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R & McKay RD (2006) Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* 442(7104):823-826.
- Aram R, Chan PTK & Cyr DG (2020) Beta-defensin126 is correlated with sperm motility in fertile and infertile men. *Biology of reproduction* 102(1):92-101.
- Arason AJ, Jonsdottir HR, Halldorsson S, Benediktsdottir BE, Bergthorsson JT, Ingthorsson S, Baldursson O, Sinha S, Gudjonsson T & Magnusson MK (2014) deltaNp63 has a role in maintaining epithelial integrity in airway epithelium. *PLoS One* 9(2):e88683.
- Arrighi S (2014) Are the basal cells of the mammalian epididymis still an enigma? *Reproduction, Fertility and Development* 26(8):1061-1071.
- Atanassova N, McKinnell C, Fisher J & Sharpe RM (2005) Neonatal treatment of rats with diethylstilboestrol (DES) induces stromal-epithelial abnormalities of the vas deferens and cauda epididymis in adulthood following delayed basal cell development. *Reproduction* 129(5):589-601.
- Atanassova N, McKinnell C, Williams K, Turner KJ, Fisher JS, Saunders PT, Millar MR & Sharpe RM (2001) Age-, cell- and region-specific immunoexpression of estrogen receptor alpha (but not estrogen receptor beta) during postnatal development of the epididymis and vas deferens of the rat and disruption of this pattern by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Endocrinology* 142(2):874-886.
- Badran HH & Hermo LS (2002) Expression and regulation of aquaporins 1, 8, and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. *Journal of Andrology* 23(3):358-373.
- Barker N & Clevers H (2010) Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* 138(5):1681-1696.
- Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R & Clevers H (2010) Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6(1):25-36.
- Barker N, Rookmaaker MB, Kujala P, Ng A, Leushacke M, Snippert H, van de Wetering M, Tan S, Van Es JH, Huch M, Poulsom R, Verhaar MC, Peters PJ & Clevers H (2012) Lgr5(+ve) stem/progenitor cells contribute to nephron formation during kidney development. *Cell reports* 2(3):540-552.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ & Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449(7165):1003-1007.

- Basak O, Beumer J, Wiebrands K, Seno H, van Oudenaarden A & Clevers H (2017) Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell Stem Cell* 20(2):177-190.
- Baska KM, Manandhar G, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, Yi YJ & Sutovsky P (2008) Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *Journal of Cellular Physiology* 215(3):684-696.
- Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S & Dejana E (2000) Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *The Journal of biological chemistry* 275(27):20520-20526.
- Bedford JM (1967) Effect of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *Journal of experimental Zoology* 166:271-282.
- Belleannee C, Thimon V & Sullivan R (2012) Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell and tissue research* 349(3):717-731.
- Bernet A, Bastien A, Soulet D, Jerczynski O, Roy C, Bianchi Rodrigues Alves M, Lecours C, Tremblay M, Bailey JL, Robert C & Belleannée C (2018) Cell-lineage specificity of primary cilia during postnatal epididymal development. *Human reproduction* 33(10):1829-1838.
- Björkgren I, Alvarez L, Blank N, Balbach M, Turunen H, Laajala TD, Toivanen J, Krutskikh A, Wahlberg N, Huhtaniemi I, Poutanen M, Wachten D & Sipilä P (2016) Targeted inactivation of the mouse epididymal beta-defensin 41 alters sperm flagellar beat pattern and zona pellucida binding. *Molecular and cellular endocrinology* 427:143-154.
- Blanpain C & Simons BD (2013) Unravelling stem cell dynamics by lineage tracing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(8):489-502.
- Blaschuk O, Burdzy K & Fritz IB (1983) Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* 258(12):7714-7720.
- Blomqvist SR, Vidarsson H, Soder O & Enerback S (2006) Epididymal expression of the forkhead transcription factor Foxi1 is required for male fertility. *EMBO Journal* 25(17):4131-4141.
- Boretto M, Cox B, Noben M, Hendriks N, Fassbender A, Roose H, Amant F, Timmerman D, Tomassetti C, Vanhie A, Meuleman C, Ferrante M & Vankelecom H (2017) Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability. *Development* 144(10):1775-1786.
- Bouras T, Pal B, Vaillant F, Harburg G, Asselin-Labat ML, Oakes SR, Lindeman GJ & Visvader JE (2008) Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell* 3(4):429-441.
- Breton S, Smith PJ, Lui B & Brown D (1996) Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nature medicine* 2(4):470-472.
- Breton S, Tyszkowski R, Sabolic I & Brown D (1999) Postnatal development of H⁺ ATPase (proton-pump)-rich cells in rat epididymis. *Histochemistry and cell biology* 111(2):97-105.
- Brooks DE (1982) Purification of rat epididymal proteins "D" and "E", demonstration of shared immunological determinants, and identification of regional synthesis and secretion. *International Journal of Andrology* 5(5):513-524.
- Brown D, Lui B, Gluck S & Sabolic I (1992) A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epididymis. *American journal of Physiological Society* 263(4 Pt 1):C913-916.

- Brown D, Smith PJ & Breton S (1997) Role of V-ATPase-rich cells in acidification of the male reproductive tract. *The Journal of experimental biology* 200(Pt 2):257-262.
- Browne JA, Yang R, Leir SH, Eggener SE & Harris A (2016) Expression profiles of human epididymis epithelial cells reveal the functional diversity of caput, corpus and cauda regions. *Molecular human reproduction* 22(2):69-82.
- Bruzzone R, White TW & Paul DL (1994) Expression of chimeric connexins reveals new properties of the formation and gating behavior of gap junction channels. *Journal of cell science* 107 (Pt 4):955-967.
- Cai J, Wang C, Huang L, Chen M & Zuo Z (2013) A novel effect of polychlorinated biphenyls: impairment of the tight junctions in the mouse epididymis. *Toxicological Sciences* 134(2):382-390.
- Cairnie AB, Lamerton LF & Steel GG (1965) Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. II. Theoretical aspects. *Experimental Cell Research* 39(2):539-553.
- Carmon KS, Lin Q, Gong X, Thomas A & Liu Q (2012) LGR5 interacts and cointernalizes with Wnt receptors to modulate Wnt/beta-catenin signaling. *Molecular Biology of the Cell* 32(11):2054-2064.
- Carroll DK, Carroll JS, Leong CO, Cheng F, Brown M, Mills AA, Brugge JS & Ellisen LW (2006) p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nature cell biology* 8(6):551-561.
- Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A & McMahon AP (2005) Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Developmental cell* 9(2):283-292.
- Cervelló I, Gil-Sanchis C, Santamaría X, Faus A, Vallvé-Juanico J, Díaz-Gimeno P, Genolet O, Pellicer A & Simón C (2017) Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5-positive cells in the endometrial stem cell niche. *Fertility and sterility* 107(2):510-519.e513.
- Chakrabarti R, Wei Y, Hwang J, Hang X, Andres Blanco M, Choudhury A, Tiede B, Romano RA, DeCoste C, Mercatali L, Ibrahim T, Amadori D, Kannan N, Eaves CJ, Sinha S & Kang Y (2014) DeltaNp63 promotes stem cell activity in mammary gland development and basal-like breast cancer by enhancing Fzd7 expression and Wnt signalling. *Nature cell biology* 16(10):1004-1015, 1001-1013.
- Chang YH, Chu TY & Ding DC (2020) Human fallopian tube epithelial cells exhibit stemness features, self-renewal capacity, and Wnt-related organoid formation. *Journal of biomedical science* 27(1):32.
- Cheng JM, Tang JX, Li J, Wang YQ, Wang XX, Zhang Y, Chen SR & Liu YX (2018) Role of WNT signaling in epididymal sperm maturation. *Journal of assisted reproduction and genetics* 35(2):229-236.
- Ciller IM, Palanisamy SK, Ciller UA & McFarlane JR (2016) Postnatal expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in the mouse testis. *Physiological research* 65(4):673-682.
- Clermont Y & Flannery J (1970) Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. *Biology of Reproduction* 3:283-292.
- Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127(3):469-480.
- Clevers H (2016) Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165(7):1586-1597.

- Coller HA, Sang L & Roberts JM (2006) A new description of cellular quiescence. *PLoS biology* 4(3):e83.
- Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM & Rando TA (2003) Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302(5650):1575-1577.
- Cosentino MJ, Takihara H, Burhop JW & Cockett AT (1984) Regulation of rat caput epididymidis contractility by prostaglandins. *Journal of Andrology* 5(3):216-222.
- Costa SL, Boekelheide K, Vanderhyden BC, Seth R & McBurney MW (1997) Male infertility caused by epididymal dysfunction in transgenic mice expressing a dominant negative mutation of retinoic acid receptor alpha 1. *Biology of reproduction* 56(4):985-990.
- Curci L, Brukman NG, Weigel Muñoz M, Rojo D, Carvajal G, Sulzyk V, Gonzalez SN, Rubinstein M, Da Ros VG & Cuasnicú PS (2020) Functional redundancy and compensation: Deletion of multiple murine Crisp genes reveals their essential role for male fertility. *FASEB journal* 34(12):15718-15733.
- Cyr D, Finnon KW, Dufresne J & Gregory M (2002) Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, Robaire B & Hinton BT (Édit.) Plenum Press, New York. p 103-118.
- Cyr D, Hermo L & Laird DW (1996) Immunocytochemical Localization and Regulation of Connexin43 in the Adult Rat Epididymis. *Endocrinology* 137(4):1474-1484.
- Cyr DG, Dufresne J & Gregory M (2018) Cellular junctions in the epididymis, a critical parameter for understanding male reproductive toxicology. *Reproductive Toxicology* 81:207-2019.
- Cyr DG, Dufresne J, Pillet S, Alfieri TJ & Hermo L (2001) Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. *Journal of Andrology* 22(1):124-135.
- Cyr DG, Gregory M, Dube E, Dufresne J, Chan PT & Hermo L (2007) Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian journal of andrology* 9(4):463-475.
- Cyr DG, Hermo L, Blaschuk OW & Robaire B (1992) Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. *Endocrinology* 130(1):353-363.
- Cyr DG, Hermo L, Egenberger N, Mertineit C, Trasler JM & Laird DW (1999) Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology* 140(8):3815-3825.
- Cyr DG, Hermo L & Robaire B (1993) Developmental changes in epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin during postnatal epididymal development in the rat. *Endocrinology* 132(3):1115-1124.
- Cyr DG & Robaire B (1991) Developmental regulation of epithelial- and placental-cadherin mRNAs in the rat epididymis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 637:399-408.
- Cyr DG & Robaire B (1992) Regulation of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) messenger ribonucleic acid in the rat epididymis. *Endocrinology* 130(4):2160-2166.
- Cyr DG, Robaire B & Hermo L (1995) Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microscopy Research and Technique* 30(1):54-66.
- Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirski FK, Pittet MJ & Breton S (2011) A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141(5):653-663.

- Dacheux JL, Belleanne C, Jones R, Labas V, Belghazi M, Guyonnet B, Druart X, Gatti JL & Dacheux F (2009) Mammalian epididymal proteome. *Molecular and cellular endocrinology* 306(1-2):45-50.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL & Dacheux F (2005) Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63(2):319-341.
- Dai Q, Duan C, Ren W, Li F, Zheng Q, Wang L, Li W, Lu X, Ni W, Zhang Y, Chen Y, Wen T, Yu Y & Yu H (2018) Notch Signaling Regulates Lgr5(+) Olfactory Epithelium Progenitor/Stem Cell Turnover and Mediates Recovery of Lesioned Olfactory Epithelium in Mouse Model. *Stem Cells* 36(8):1259-1272.
- Dame MK, Attili D, McClintock SD, Dedhia PH, Ouillette P, Hardt O, Chin AM, Xue X, Laliberte J, Katz EL, Newsome GM, Hill DR, Miller AJ, Tsai YH, Agorku D, Altheim CH, Bosio A, Simon B, Samuelson LC, Stoerker JA, Appelman HD, Varani J, Wicha MS, Brenner DE, Shah YM, Spence JR & Colacino JA (2018) Identification, isolation and characterization of human LGR5-positive colon adenoma cells. *Development* 145(6):dev153049.
- de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, Kujala P, Haegebarth A, Peters PJ, van de Wetering M, Stange DE, van Es JE, Guardavaccaro D, Schasfoort RB, Mohri Y, Nishimori K, Mohammed S, Heck AJ & Clevers H (2011) Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476(7360):293-297.
- de Lau W, Peng WC, Gros P & Clevers H (2014) The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes & development* 28(4):305-316.
- de Miguel-Gómez L, López-Martínez S, Francés-Herrero E, Rodríguez-Eguren A, Pellicer A & Cervelló I (2021) Stem Cells and the Endometrium: From the Discovery of Adult Stem Cells to Pre-Clinical Models. *Cells* 10(3).
- De Paul AL, Mukdsi JH, Pellizas CG, Montesinos M, Gutierrez S, Susperreguy S, Del Rio A, Maldonado CA & Torres AI (2008) Thyroid hormone receptor alpha 1-beta 1 expression in epididymal epithelium from euthyroid and hypothyroid rats. *Histochemistry and cell biology* 129(5):631-642.
- de Visser KE, Ciampricotti M, Michalak EM, Tan DW, Speksnijder EN, Hau CS, Clevers H, Barker N & Jonkers J (2012) Developmental stage-specific contribution of LGR5(+) cells to basal and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *The Journal of pathology* 228(3):300-309.
- DeBellefeuille S, Hermo L, Gregory M, Dufresne J & Cyr DG (2003) Catenins in the rat epididymis: their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. *Endocrinology* 144(11):5040-5049.
- Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, Brandsma AM, de Jong NW, Bijvelds MJ, Scholte BJ, Nieuwenhuis EE, van den Brink S, Clevers H, van der Ent CK, Middendorp S & Beekman JM (2013) A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nature medicine* 19(7):939-945.
- Del Rio AG, Blanco AM, Pignataro O, Niepomniszcz H, Juvenal G & Pisarev MA (2000) High-affinity binding of T3 to epididymis nuclei. *Archives of andrology* 44(3):187-191.
- Del Rio AG & Quiros MC (1983) Thyroid gland and epididymal function in rats. II. Sperm motile efficiency. *Archives of Andrology* 11(1):25-28.
- del Rio AG, Valdez Toledo CL & Quiros MC (1979) Thyroid gland and epididymal function in rats-histological study. *Archives of Andrology* 3(1):19-22.

- Deshpande SN, Vijayakumar G & Rao AJ (2009) Oestrogenic regulation and differential expression of WNT4 in the bonnet monkey and rodent epididymis. *Reproductive biomedicine online* 18(4):555-561.
- Din-Udom A, Sujarit S & Pholpramool C (1985) Short-term effect of androgen deprivation on intraluminal pressure and contractility of the rat epididymis. *Journal of reproduction and fertility* 73(2):405-410.
- Domagala A, Kasprzak M & Kurpisz M (1996) [Immunologic response against spermatozoa in the human genital tract]. *Ginekologia Polska* 67(6):304-308.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ & Wicha MS (2003) In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & development* 17(10):1253-1270.
- Duan YG, 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(4):431-440.
- Dube E, Chan PT, Hermo L & Cyr DG (2007) Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. *Biology of reproduction* 76(6):1034-1044.
- Dube E & Cyr DG (2012) The blood-epididymis barrier and human male fertility. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 763:218-236.
- Dube E, Dufresne J, Chan PT & Cyr DG (2012) Epidermal growth factor regulates connexin 43 in the human epididymis: role of gap junctions in azoospermia. *Human reproduction* 27(8):2285-2296.
- Dube E, Hermo L, Chan PT & Cyr DG (2008) Alterations in gene expression in the caput epididymides of nonobstructive azoospermic men. *Biology of reproduction* 78(2):342-351.
- Dube E, Hermo L, Chan PT & Cyr DG (2010) Alterations in the human blood-epididymis barrier in obstructive azoospermia and the development of novel epididymal cell lines from infertile men. *Biology of reproduction* 83(4):584-596.
- Dufresne J, Finnon KW, Gregory M & Cyr DG (2003) Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. *Cell Physiology* 284(1):33-43.
- Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N & Reya T (2005) Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nature Immunology* 6(3):314-322.
- Elbashir S, Magdi Y, Rashed A, Henkel R & Agarwal A (2021) Epididymal contribution to male infertility: An overlooked problem. *Andrologia* 53(1):e13721.
- Elkjaer M, Vajda Z, Nejsun LN, Kwon T, Jensen UB, Amiry-Moghaddam M, Frokiaer J & Nielsen S (2000) Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochemical and biophysical research communications* 276(3):1118-1128.
- Esseltine JL, Brooks CR, Edwards NA, Subasri M, Sampson J, Séguin C, Betts DH & Laird DW (2020) Dynamic regulation of connexins in stem cell pluripotency. *Stem Cells* 38(1):52-66.
- Fan H, Liu X, Shen Y, Chen S, Huan Y, Shan J, Zhou C, Wu S, Zhang Z & Wang Y (2019) In Vivo Genetic Strategies for the Specific Lineage Tracing of Stem Cells. *Current stem cell research & therapy* 14(3):230-238.

- Fan X & Robaire B (1998) Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology* 139(4):2128-2136.
- Fargeas CA, Joester A, Missol-Kolka E, Hellwig A, Huttner WB & Corbeil D (2004) Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis. *Journal of cell science* 117(Pt 18):4301-4311.
- Fornés MW, Barbieri A & Cavicchia JC (1995) Morphological and enzymatic study of membrane-bound vesicles from the lumen of the rat epididymis. *Andrologia* 27(1):1-5.
- French FS & Ritzén EM (1973) A high-affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. *Endocrinology* 93(1):88-95.
- Friend DS & Gilula NB (1972) Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *The Journal of cell biology* 53(3):758-776.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S & Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology* 123(6 Pt 2):1777-1788.
- Gao HB, Shan LX, Monder C & Hardy MP (1996) Suppression of endogenous corticosterone levels in vivo increases the steroidogenic capacity of purified rat Leydig cells in vitro. *Endocrinology* 137(5):1714-1718.
- Gao HB, Tong MH, Hu YQ, You HY, Guo QS, Ge RS & Hardy MP (2003) Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Molecular and cellular endocrinology* 199(1-2):153-163.
- Garraway IP, Sun W, Tran CP, Perner S, Zhang B, Goldstein AS, Hahm SA, Haider M, Head CS, Reiter RE, Rubin MA & Witte ON (2010) Human prostate sphere-forming cells represent a subset of basal epithelial cells capable of glandular regeneration in vivo. *Prostate* 70(5):491-501.
- Ghosh M, Helm KM, Smith RW, Giordanengo MS, Li B, Shen H & Reynolds SD (2011) A single cell functions as a tissue-specific stem cell and the in vitro niche-forming cell. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45(3):459-469.
- Giacinti C & Giordano A (2006) RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25(38):5220-5227.
- Gil-Sanchis C, Cervelló I, Mas A, Faus A, Pellicer A & Simón C (2013) Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (Lgr5) as a putative human endometrial stem cell marker. *Molecular human reproduction* 19(7):407-414.
- Girardet L, Augière C, Asselin MP & Belleannée C (2019) Primary cilia: biosensors of the male reproductive tract. *Andrology* 7(5):588-602.
- Gladstones GH, Burton PJ, Mark PJ, Waddell BJ & Roberts P (2012) Immunolocalisation of 11beta-HSD-1 and -2, glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor and Na⁺ K⁺-ATPase during the postnatal development of the rat epididymis. *Journal of anatomy* 220(4):350-362.
- Godmann M, Kosan C & Behr R (2010) Kruppel-like factor 4 is widely expressed in the mouse male and female reproductive tract and responds as an immediate early gene to activation of the protein kinase A in TM4 Sertoli cells. *Reproduction* 139(4):771-782.
- Gregorieff A, Liu Y, Inanlou MR, Khomchuk Y & Wrana JL (2015) Yap-dependent reprogramming of Lgr5(+) stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature* 526(7575):715-718.

- Gregory M & Cyr DG (2006) Identification of multiple claudins in the rat epididymis. *Molecular reproduction and development* 73(5):580-588.
- Gregory M & Cyr DG (2018) Effects of prostaglandin E2 on gap junction protein alpha 1 (GJA1) in the rat epididymis. *Biology of reproduction* 100(1):123-132.
- Gregory M, Dufresne J, Hermo L & Cyr D (2001) Claudin-1 Is Not Restricted to Tight Junctions in the Rat Epididymis. *Endocrinology* 142(2):854-863.
- Gregory M, Kahiri CN, Barr KJ, Smith CE, Hermo L, Cyr DG & Kidder GM (2011) Male reproductive system defects and subfertility in a mutant mouse model of oculodentodigital dysplasia. *International journal of andrology* 34(6 Pt 2):e630-641.
- Grün D, Lyubimova A, Kester L, Wiebrands K, Basak O, Sasaki N, Clevers H & van Oudenaarden A (2015) Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature* 525(7568):251-255.
- Guan X, Inai T & Shibata Y (2005) Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Archives of Histology and Cytology* 68(3):213-225.
- Guiton R, Henry-Berger J & Drevet JR (2013) The immunobiology of the mammalian epididymis: the black box is now open! *Basic and clinical andrology* 23:8.
- Hamzeh M & Robaire B (2009) Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *Journal of andrology* 30(2):200-212.
- Han S-Y & Lee K-H (2013) The Expression Patterns of Connexin Isoforms in the Rat Caput Epididymis During Postnatal Development. *Journal of Animal Science and Technology* 55(4):249-255.
- Han Z, Wang Z, Cheng G, Liu B, Li P, Li J, Wang W, Yin C & Zhang W (2012) Presence, localization, and origin of clusterin in normal human spermatozoa. *Journal of assisted reproduction and genetics* 29(8):751-757.
- Hannema SE & Hughes IA (2007) Regulation of Wolffian duct development. *Hormone Research* 67(3):142-151.
- Hayashi T, Yoshinaga A, Ohno R, Ishii N, Kamata S & Yamada T (2004) Expression of the p63 and Notch signaling systems in rat testes during postnatal development: comparison with their expression levels in the epididymis and vas deferens. *Journal of andrology* 25(5):692-698.
- Henderson NA, Cooke GM & Robaire B (2006) Region-specific expression of androgen and growth factor pathway genes in the rat epididymis and the effects of dual 5alpha-reductase inhibition. *The Journal of endocrinology* 190(3):779-791.
- Hermo L, Barin K & Oko R (1994a) Developmental expression of immobilin in the rat epididymis. *The Anatomical Record* 240(1):86-103.
- Hermo L, Barin K & Oko R (1998) Androgen binding protein secretion and endocytosis by principal cells in the adult rat epididymis and during postnatal development. *Journal of Andrology* 19(5):527-541.
- Hermo L, Barin K & Robaire B (1992a) Structural Differentiation of the Epithelial Cells of the Testicular Excurrent Duct System of Rats During Postnatal Development. *The Anatomical Record* 233:205-228.

- Hermo L, Krzeczunowicz D & Ruz R (2004) Cell specificity of aquaporins 0, 3, and 10 expressed in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats. *Journal of Andrology* 25(4):494-505.
- Hermo L, Oko R & Robaire B (1992b) Epithelial cells of the epididymis show regional variations with respect to the secretion of endocytosis of immobilin as revealed by light and electron microscope immunocytochemistry. *The Anatomical Record* 232(2):202-220.
- Hermo L & Papp S (1996) Effects of ligation, orchidectomy, and hypophysectomy on expression of the Yf subunit of GST-P in principal and basal cells of the adult rat epididymis and on basal cell shape and overall arrangement. *The Anatomical record* 244(1):59-69.
- Hermo L, Papp S & Robaire B (1994b) Developmental expression of the Yf subunit of glutathione S-transferase P in epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the rat. *Anat Rec* 239(4):421-440.
- Hermo L & Robaire B (2002) Epididymal cell types and their functions. *The Epididymis: from Molecules to Clinical Practice*, Robaire B & Hinton BT (Édit.) Plenum Press, Nex York. p 81-102.
- Hermo L, Wright J, Oko R & Morales CR (1991) Role of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Biology of Reproduction* 44(6):1113-1131.
- Hinton BT, Galdamez MM, Sutherland A, Bomgardner D, Xu B, Abdel-Fattah R & Yang L (2011) How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? *Journal of Andrology* 32(6):558-564.
- Hinton BT & Howards SS (1981) Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymidis. *Journal of reproduction and fertility* 63(1):95-99.
- Hinton BT, Palladino, M.A. (1995) Epididymal epithelium: Its Contribution to the Formation of a Luminal Fluid Microenvironment. *Microscopy Research and Technique* 30:67-81.
- Horton C, Liu Y, Yu C, Xie Q & Wang ZA (2019) Luminal-contact-inhibition of epithelial basal stem cell multipotency in prostate organogenesis and homeostasis. *Biology open* 8(10):bio045724.
- Hu J, Chen YX, Wang D, Qi X, Li TG, Hao J, Mishina Y, Garbers DL & Zhao GQ (2004) Developmental expression and function of Bmp4 in spermatogenesis and in maintaining epididymal integrity. *Developmental biology* 276(1):158-171.
- Hu J, Merriner DJ, O'Connor AE, Houston BJ, Furic L, Hedger MP & O'Bryan MK (2018) Epididymal cysteine-rich secretory proteins are required for epididymal sperm maturation and optimal sperm function. *Molecular human reproduction* 24(3):111-122.
- Hu WY, Shi GB, Lam HM, Hu DP, Ho SM, Madueke IC, Kajdacsy-Balla A & Prins GS (2011) Estrogen-initiated transformation of prostate epithelium derived from normal human prostate stem-progenitor cells. *Endocrinology* 152(6):2150-2163.
- Huang Y, Hamana T, Liu J, Wang C, An L, You P, Chang JY, Xu J, Jin C, Zhang Z, McKeehan WL & Wang F (2015) Type 2 Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Preserves Stemness and Prevents Differentiation of Prostate Stem Cells from the Basal Compartment. *The Journal of biological chemistry* 290(29):17753-17761.
- Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG, Grompe M & Clevers H (2013) In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494(7436):247-250.

- Huch M, Knoblich JA, Lutolf MP & Martinez-Arias A (2017) The hope and the hype of organoid research. *Development* 144(6):938-941.
- Huch M & Koo BK (2015) Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 142(18):3113-3125.
- Ibtisham F & Honaramooz A (2020) Spermatogonial Stem Cells for In Vitro Spermatogenesis and In Vivo Restoration of Fertility. *Cells* 9(3).
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S & Tsukita S (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *The Journal of cell biology* 171(6):939-945.
- Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H & Shibata Y (2007) Claudin-7 expressed on lateral membrane of rat epididymal epithelium does not form aberrant tight junction strands. *Anatomical Record* 290(11):1431-1438.
- Jaakkola UM & Talo A (1982) Relation of electrical activity to luminal transport in the cauda epididymidis of the rat in vitro. *Journal of reproduction and fertility* 64(1):121-126.
- Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es JH, Snippert HJ, Clevers H & Toftgard R (2008) Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature genetics* 40(11):1291-1299.
- James ER, Carrell DT, Aston KI, Jenkins TG, Yeste M & Salas-Huetos A (2020) The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International journal of molecular sciences* 21(15).
- Jauregui EJ, Mitchell D, Topping T, Hogarth CA & Griswold MD (2018) Retinoic acid receptor signaling is necessary in steroidogenic cells for normal spermatogenesis and epididymal function. *Development* 145(13):dev160465.
- Johnson AL & Howards SS (1975) Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. *American Journal of Physiology* 228(2):556-564.
- Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS & Turner TT (2005) The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biology of reproduction* 73(3):404-413.
- Jrad-Lamine A, Henry-Berger J, Damon-Soubeyrand C, Saez F, Kocer A, Janny L, Pons-Rejraji H, Munn DH, Mellor AL, Gharbi N, Cadet R, Guiton R, Aitken RJ & Drevet JR (2013) Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (ido1) is involved in the control of mouse caput epididymis immune environment. *PLoS One* 8(6):e66494.
- Jung HJ, Roy J, Smith TB, Wood LB, Lane K, Woolfenden S, Punko D, Bronson RT, Haigis KM, Breton S & Charest A (2014) ROS1 signaling regulates epithelial differentiation in the epididymis. *Endocrinology* 155(9):3661-3673.
- Kahn M (2018) Wnt Signaling in Stem Cells and Cancer Stem Cells: A Tale of Two Coactivators. *Progress in molecular biology and translational science* 153:209-244.
- Kayisoglu O, Weiss F, Niklas C, Pierotti I, Pompaiah M, Wallaschek N, Germer CT, Wiegering A & Bartfeld S (2021) Location-specific cell identity rather than exposure to GI microbiota defines many innate immune signalling cascades in the gut epithelium. *Gut* 70(4):687-697.
- Kempinas WG, Borges CS, Leite GAA, Figueiredo TM, Gregory M & Cyr DG (2019) Prenatal exposure to betamethasone causes intergenerational impairment of epididymal development in the rat. *Andrology* 7(5):719-729.

- Kim B & Breton S (2016) The MAPK/ERK-Signaling Pathway Regulates the Expression and Distribution of Tight Junction Proteins in the Mouse Proximal Epididymis. *Biology of reproduction* 94(1):22.
- Kim B & Breton S (2019) Androgens are essential for epithelial cell recovery after efferent duct ligation in the initial segment of the mouse epididymis. *Biology of reproduction* 102(1):76-83.
- Kim B, Roy J, Shum WW, Da Silva N & Breton S (2015) Role of testicular luminal factors on Basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis. *Biology of reproduction* 92(1):9.
- Kim J, Chu J, Shen X, Wang J & Orkin SH (2008) An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132(6):1049-1061.
- Klinefelter GR & Suarez JD (1997) Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. *Reproductive toxicology* 11(4):511-519.
- Koch S, Acebron SP, Herbst J, Hatiboglu G & Niehrs C (2015) Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation. *Cell* 163(5):1225-1236.
- Koch U, Lehal R & Radtke F (2013) Stem cells living with a Notch. *Development* 140(4):689-704.
- Koo BK & Clevers H (2014) Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5. *Gastroenterology* 147(2):289-302.
- Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ & Roop DR (2004) p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes & development* 18(2):126-131.
- Koster MI & Roop DR (2004) The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *Journal of dermatological science* 34(1):3-9.
- Krebsbach PH & Villa-Diaz LG (2017) The Role of Integrin alpha6 (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem cells and development* 26(15):1090-1099.
- Kretzschmar K & Clevers H (2016) Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Developmental cell* 38(6):590-600.
- Kretzschmar K & Clevers H (2017) Wnt/beta-catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Developmental biology* 428(2):273-282.
- Kretzschmar K & Watt FM (2012) Lineage tracing. *Cell* 148(1-2):33-45.
- Kristensen DM, Nielsen JE, Kalisz M, Dalgaard MD, Audouze K, Larsen ME, Jacobsen GK, Horn T, Brunak S, Skakkebaek NE & Leffers H (2010) OCT4 and downstream factors are expressed in human somatic urogenital epithelia and in culture of epididymal spheres. *Molecular human reproduction* 16(11):835-845.
- Krutsikh A, De Gendt K, Sharp V, Verhoeven G, Poutanen M & Huhtaniemi I (2011) Targeted inactivation of the androgen receptor gene in murine proximal epididymis causes epithelial hypotrophy and obstructive azoospermia. *Endocrinology* 152(2):689-696.
- Kumar M, Syed SM, Taketo MM & Tanwar PS (2016) Epithelial Wnt/betacatenin signalling is essential for epididymal coiling. *Developmental biology* 412(2):234-249.
- Kumar M & Tanwar PS (2017) Canonical Wnt/beta-Catenin Signaling Regulates Postnatal Mouse Epididymal Development But Does Not Affect Epithelial Cell Differentiation. *Endocrinology* 158(12):4286-4299.
- Kurita T, Medina RT, Mills AA & Cunha GR (2004) Role of p63 and basal cells in the prostate. *Development* 131(20):4955-4964.

- Kwon OJ, Zhang L, Ittmann M & Xin L (2014) Prostatic inflammation enhances basal-to-luminal differentiation and accelerates initiation of prostate cancer with a basal cell origin. *PNAS* :592-600.
- Lancaster MA & Knoblich JA (2014) Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345(6194):283-293.
- Lareyre JJ, Zheng WL, Zhao GQ, Kasper S, Newcomer ME, Matusik RJ, Ong DE & Orgebin-Crist MC (1998) Molecular cloning and hormonal regulation of a murine epididymal retinoic acid-binding protein messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 139(6):2971-2981.
- Lawson DA, Xin L, Lukacs RU, Cheng D & Witte ON (2007) Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *PNAS* 104(1):181-186.
- Lee DK, Liu Y, Liao L, Wang F & Xu J (2014) The prostate basal cell (BC) heterogeneity and the p63-positive BC differentiation spectrum in mice. *International journal of biological sciences* 10(9):1007-1017.
- Lee K-H (2013) Differential Expression of Multiple Connexins in Rat Corpus and Cauda Epididymis at Various Postnatal Stages. *Journal of Animal Science and Technology* 55(6):521-530.
- Lee K-H (2014) Expressional Modulation of Connexin Isoforms in the Initial Segment of Male Rat treated with Estradiol Benzoate or Flutamide. *Development & Reproduction* 18(4):293-300.
- Lee SK & Lee KH (2015) Aberrant Expression of Connexin Isoforms in the Corpus Epididymis of the Adult Rat by Exposure to Estradiol Benzoate or Flutamide at the Weaning Age. *Development & Reproduction* 19(4):217-226.
- Légaré C & Sullivan R (2020) Differential gene expression profiles of human efferent ducts and proximal epididymis. *Andrology* 8(3):625-636.
- Lehmann R, Lee CM, Shugart EC, Benedetti M, Charo RA, Gartner Z, Hogan B, Knoblich J, Nelson CM & Wilson KM (2019) Human organoids: a new dimension in cell biology. *Molecular Biology of the Cell* 30(10):1129-1137.
- Leir SH, Browne JA, Eggener SE & Harris A (2015) Characterization of primary cultures of adult human epididymis epithelial cells. *Fertility and sterility* 103(3):647-654.e641.
- Leir SH, Yin S, Kerschner JL, Cosme W & Harris A (2020a) An atlas of human proximal epididymis reveals cell-specific functions and distinct roles for CFTR. *Life Science Alliance* 3(11):e202000744.
- Leir SH, Yin S, Kerschner JL, Xia S, Ahmadi S, Bear C & Harris A (2020b) An organoid model to assay the role of CFTR in the human epididymis epithelium. *Cell and tissue research* 381(2):327-336.
- Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, Scholer HR, Tomilin A & Jaenisch R (2007) Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 1(4):403-415.
- Leong KG, Wang BE, Johnson L & Gao WQ (2008) Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* 456(7223):804-808.
- Leung C, Murad KBA, Tan ALT, Yada S, Sagiraju S, Bode PK & Barker N (2020) Lgr5 Marks Adult Progenitor Cells Contributing to Skeletal Muscle Regeneration and Sarcoma Formation. *Cell reports* 33(12):108535.

- Leung C, Tan SH & Barker N (2018) Recent Advances in Lgr5(+) Stem Cell Research. *Trends in cell biology* 28(5):380-391.
- Leung GP, Cheung KH, Leung CT, Tsang MW & Wong PY (2004) Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Molecular and cellular endocrinology* 216(1-2):5-13.
- Leushacke M, Tan SH, Wong A, Swathi Y, Hajamohideen A, Tan LT, Goh J, Wong E, Denil S, Murakami K & Barker N (2017) Lgr5-expressing chief cells drive epithelial regeneration and cancer in the oxyntic stomach. *Nature cell biology* 19(7):774-786.
- Levine N & Marsh DJ (1971) Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *The Journal of Physiology* 213(3):557-570.
- Levy S & Robaire B (1999) Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biology of reproduction* 60(6):1392-1401.
- Li L & Clevers H (2010) Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 327(5965):542-545.
- Li L & Xie T (2005) Stem cell niche: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* 21:605-631.
- Li Z (2013) CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Experimental hematology & oncology* 2(1):17.
- Lopardo T, Lo Iacono N, Marinari B, Giustizieri ML, Cyr DG, Merlo G, Crosti F, Costanzo A & Guerrini L (2008) Claudin-1 is a p63 target gene with a crucial role in epithelial development. *PLoS One* 3(7):e2715.
- Ludford RJ (1925) Cell organs during secretion in the epididymis. *The Royal Society* 98(690).
- Lupien M, Dievert A, Morales CR, Hermo L, Calvo E, Kay DG, Hu C & Jolicoeur P (2006) Expression of constitutively active Notch1 in male genital tracts results in ectopic growth and blockage of efferent ducts, epididymal hyperplasia and sterility. *Developmental biology* 300(2):497-511.
- MacDonald BT & He X (2012) Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/beta-catenin signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(12):a007880.
- MacDonald BT, Tamai K & He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* 17(1):9-26.
- Mandon M & Cyr DG (2015) Tricellulin and its role in the epididymal epithelium of the rat. *Biology of reproduction* 92(3):66.
- Mandon M, Hermo L & Cyr DG (2015) Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common Properties with Adult Stem Cells. *Biology of reproduction* 93(5):115-130.
- Martan J & Risley PL (1964) Holocrine secretory cells of the rat epididymis. *Fertility and Sterility* 15(2):180-187.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D & Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *The Journal of cell biology* 142(1):117-127.

- Mayeuf A & Relaix F (2011) [Notch pathway: from development to regeneration of skeletal muscle]. *Medecine sciences* 27(5):521-526.
- Meistrich ML, Hughes TH & Bruce WR (1975) Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. *Nature* 258(5531):145-147.
- Middendorp S, Schneeberger K, Wiegerinck CL, Mokry M, Akkerman RD, van Wijngaarden S, Clevers H & Nieuwenhuis EE (2014) Adult stem cells in the small intestine are intrinsically programmed with their location-specific function. *Stem Cells* 32(5):1083-1091.
- Mohammad K, Dakik P, Medkour Y, Mitrofanova D & Titorenko VI (2019) Quiescence Entry, Maintenance, and Exit in Adult Stem Cells. *International journal of molecular sciences* 20(9).
- Montgomery RK, Carlone DL, Richmond CA, Farilla L, Kranendonk ME, Henderson DE, Baffour-Awuah NY, Ambruzs DM, Fogli LK, Algra S & Breault DT (2011) Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *PNAS* 108(1):179-184.
- Morrison SJ & Spradling AC (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132(4):598-611.
- Mou H, Vinarsky V, Tata PR, Brazauskas K, Choi SH, Crooke AK, Zhang B, Solomon GM, Turner B, Bihler H, Harrington J, Lapey A, Channick C, Keyes C, Freund A, Artandi S, Mense M, Rowe S, Engelhardt JF, Hsu YC & Rajagopal J (2016) Dual SMAD Signaling Inhibition Enables Long-Term Expansion of Diverse Epithelial Basal Cells. *Cell Stem Cell* 19(2):217-231.
- Murashima A, Miyagawa S, Ogino Y, Nishida-Fukuda H, Araki K, Matsumoto T, Kaneko T, Yoshinaga K, Yamamura K, Kurita T, Kato S, Moon AM & Yamada G (2011) Essential roles of androgen signaling in Wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. *Endocrinology* 152(4):1640-1651.
- Murta D, Batista M, Silva E, Trindade A, Henrique D, Duarte A & Lopes-da-Costa L (2016) Notch signaling in the epididymal epithelium regulates sperm motility and is transferred at a distance within epididymosomes. *Andrology* 4(2):314-327.
- Musah S, Chen J & Hoyle GW (2012) Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury. *Respiratory Research* 13(1):107-119.
- Nagy F & Edmonds RH (1975) Cellular proliferation and renewal in the various zones of the hamster epididymis after colchicine administration. *Fertility and Sterility* 26(5):460-468.
- Nakagawa T, Nabeshima Y & Yoshida S (2007) Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Developmental cell* 12(2):195-206.
- Nandan MO & Yang VW (2009) The role of Krüppel-like factors in the reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Histology and histopathology* 24(10):1343-1355.
- Newcomer ME (1993) Structure of the epididymal retinoic acid binding protein at 2.1 Å resolution. *Structure* 1(1):7-18.
- Nishiwaki S, Kato M, Okuno M, Moriwaki H, Kanai M & Muto Y (1991) Purification and partial characterization of rat epididymal retinoic acid-binding protein, and its immunohistochemical localization. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 37(5):461-471.

- Nixon B, De Iuliis GN, Hart HM, Zhou W, Mathe A, Bernstein IR, Anderson AL, Stanger SJ, Skerrett-Byrne DA, Jamaluddin MFB, Almazi JG, Bromfield EG, Larsen MR & Dun MD (2019) Proteomic Profiling of Mouse Epididymosomes Reveals their Contributions to Post-testicular Sperm Maturation. *Mol Cell Proteomics* 18(Suppl 1):S91-s108.
- Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Shiotani M, Mori T, Matsuda T & Yoshida O (1992) Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Human Reproduction* 7(1):81-85.
- Nozaki K, Mochizuki W, Matsumoto Y, Matsumoto T, Fukuda M, Mizutani T, Watanabe M & Nakamura T (2016) Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes. *Journal of gastroenterology* 51(3):206-213.
- O'Hara L, Welsh M, Saunders PT & Smith LB (2011) Androgen receptor expression in the caput epididymal epithelium is essential for development of the initial segment and epididymal spermatozoa transit. *Endocrinology* 152(2):718-729.
- Olabi S, Ucar A, Brennan K & Streuli CH (2018) Integrin-Rac signalling for mammary epithelial stem cell self-renewal. *Breast Cancer Research* 20(1):128.
- Oliveira CA, Carnes K, Franca LR, Hermo L & Hess RA (2005) Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. *Biology of the cell* 97(6):385-395.
- Olson GE, Nagdas SK & Winfrey VP (2002) Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, Robaire B & Hinton BT (Édit.) Plenum Press, New York. p 371-387.
- Olson GE, Winfrey VP, NagDas SK & Melner MH (2004) Region-specific expression and secretion of the fibrinogen-related protein, fgl2, by epithelial cells of the hamster epididymis and its role in disposal of defective spermatozoa. *The Journal of biological chemistry* 279(49):51266-51274.
- Orgebin-Crist MC (1967) Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis: fertilizing ability and embryonic mortality in does inseminated with epididymal spermatozoa. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique* 7(4):373-389.
- Orgebin-Crist MC, Jahad N & Hoffman LH (1976) The effects of testosterone, 5alpha-dihydrotestosterone, 3alpha-androstenediol, and 3beta-androstenediol on the maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture. *Cell and tissue research* 167(4):515-525.
- Packard A, Schnittke N, Romano RA, Sinha S & Schwob JE (2011) DeltaNp63 regulates stem cell dynamics in the mammalian olfactory epithelium. *The Journal of neuroscience* 31(24):8748-8759.
- Pan GJ, Chang ZY, Scholer HR & Pei D (2002) Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell research* 12(5-6):321-329.
- Pappas RS, Newcomer ME & Ong DE (1993) Endogenous retinoids in rat epididymal tissue and rat and human spermatozoa. *Biology of reproduction* 48(2):235-247.
- Park S, Wu L, Tu J, Yu W, Toh Y, Carmon KS & Liu QJ (2020) Unlike LGR4, LGR5 potentiates Wnt- β -catenin signaling without sequestering E3 ligases. *Science signaling* 13(660).
- Park YJ, Battistone MA, Kim B & Breton S (2017) Relative contribution of clear cells and principal cells to luminal pH in the mouse epididymis. *Biology of reproduction* 96(2):366-375.

- Pascual A & Aranda A (2013) Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830(7):3908-3916.
- Pastor-Soler N, Bagnis C, Sabolic I, Tyszkowski R, McKee M, Van Hoek A, Breton S & Brown D (2001) Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biology of reproduction* 65(2):384-393.
- Pastor-Soler N, Beaulieu V, Litvin TN, Da Silva N, Chen Y, Brown D, Buck J, Levin LR & Breton S (2003) Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *The Journal of biological chemistry* 278(49):49523-49529.
- Pastor-Soler N, Isnard-Bagnis C, Herak-Kramberger C, Sabolic I, Van Hoek A, Brown D & Breton S (2002) Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. *Biology of reproduction* 66(6):1716-1722.
- Pattinson HA & Mortimer D (1987) Prevalence of sperm surface antibodies in the male partners of infertile couples as determined by Immunobead**Biorad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada. screening. *Fertility and Sterility* 48(3):466-469.
- Picciarelli-Lima P, Oliveira AG, Reis AM, Kalapothakis E, Mahecha GA, Hess RA & Oliveira CA (2006) Effects of 3-beta-diol, an androgen metabolite with intrinsic estrogen-like effects, in modulating the aquaporin-9 expression in the rat efferent ductules. *Reproductive biology and endocrinology* 4:51.
- Pierucci-Alves F, Midura-Kiela MT, Fleming SD, Schultz BD & Kiela PR (2018) Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dendritic Cells Is Required for Immunotolerance to Sperm in the Epididymis. *Frontiers in immunology* 9.
- Pietrement C, Sun-Wada GH, Silva ND, McKee M, Marshansky V, Brown D, Futai M & Breton S (2006) Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biology of reproduction* 74(1):185-194.
- Pignon JC, Grisanzio C, Geng Y, Song J, Shivdasani RA & Signoretti S (2013) p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. *PNAS* 110(20):8105-8110.
- Pinel L & Cyr DG (2021) Self-renewal and differentiation of rat epididymal basal cells using a novel in vitro organoid model. *Biology of reproduction* 105(4):987-1001.
- Pinel L, Mandon M & Cyr DG (2019) Tissue regeneration and the epididymal stem cell. *Andrology* 7(5):618-630.
- Plaks V, Brenot A, Lawson DA, Linnemann JR, Van Kappel EC, Wong KC, de Sauvage F, Klein OD & Werb Z (2013) Lgr5-expressing cells are sufficient and necessary for postnatal mammary gland organogenesis. *Cell reports* 3(1):70-78.
- Porter SB, Fraker LD, Chytil F & Ong DE (1983) Localization of cellular retinol-binding protein in several rat tissues. *PNAS* 80(21):6586-6590.
- Porter SB, Ong DE, Chytil F & Orgebin-Crist MC (1985) Localization of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding protein in the rat testis and epididymis. *Journal of Andrology* 6(3):197-212.
- Potten CS & Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110(4):1001-1020.

- Ramos-Ibeas P, Pericuesta E, Fernandez-Gonzalez R, Ramirez MA & Gutierrez-Adan A (2013) Most regions of mouse epididymis are able to phagocytose immature germ cells. *Reproduction* 146(5):481-489.
- Randell SH, Comment CE, Ramaekers FC & Nettesheim P (1991) Properties of rat tracheal epithelial cells separated based on expression of cell surface alpha-galactosyl end groups. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 4(6):544-554.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Poniewierska A, Suszynska M & Ratajczak J (2012) Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Advances in Medical Sciences* 57(1):1-17.
- Rayagiri SS, Ranaldi D, Raven A, Mohamad Azhar NIF, Lefebvre O, Zammit PS & Borycki AG (2018) Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nature communications* 9(1):1075.
- Raymond K, Deugnier MA, Faraldo MM & Glukhova MA (2009) Adhesion within the stem cell niches. *Current opinion in cell biology* 21(5):623-629.
- Redondo PA, Pavlou M, Loizidou M & Cheema U (2017) Elements of the niche for adult stem cell expansion. *Journal of tissue engineering* 8:2041731417725464.
- Reid BL, Cleland, KW., (1957) The structure and the function of the epididymis I the histology of the rat epididymis. *Australian Journal of Zoology* 5.
- Reilly JN, McLaughlin EA, Stanger SJ, Anderson AL, Hutcheon K, Church K, Mihalas BP, Tyagi S, Holt JE, Eamens AL & Nixon B (2016) Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Scientific reports* 6:31794.
- Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, Vericel E, Grizard G, Vernet P & Drevet JR (2006) Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biology of reproduction* 74(6):1104-1113.
- Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ & Collins AT (2004) CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *Journal of cell science* 117(Pt 16):3539-3545.
- Richmond CA, Shah MS, Carlone DL & Breault DT (2016) An enduring role for quiescent stem cells. *Developmental dynamics* 245(7):718-726.
- Riehl TE, Alvarado D, Ee X, Ciorba MA & Stenson WF (2020) Hyaluronic acid promotes Lgr5(+) stem cell proliferation and crypt fission through TLR4 and PGE(2) transactivation of EGFR. *American journal of physiology* 319(1):G63-g73.
- Rinaldi VD, Donnard E, Gellatly KJ, Rasmussen M, Kucukural A, Yukselen O, Garber M, Sharma U & Rando OJ (2020a) An atlas of cell types in the mammalian epididymis and vas deferens. 10.1101/2020.01.24.918979.
- Rinaldi VD, Donnard E, Gellatly KJ, Rasmussen M, Kucukural A, Yukselen O, Garber M, Sharma U & Rando OJ (2020b) An atlas of cell types in the mammalian epididymis and vas deferens. *Elife* 9:e55474.
- Ring A, Kim YM & Kahn M (2014) Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Reviews and Reports* 10(4):512-525.
- Risley MS (2000) Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biology of reproduction* 62(3):748-754.

- Robaire B, Ewing LL, Zirkin BR & Irby DC (1977) Steroid delta4-5alpha-reductase and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis. *Endocrinology* 101(5):1379-1390.
- Robaire B & Hamzeh M (2011) Androgen action in the epididymis. *Journal of Andrology* 32(6):592-599.
- Robaire B & Hermo L (1988) *Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulations*. Raven Press, New York
- Robaire B, HBT, Orgebin-Crist M-C. (2006) The Epididymis. *The physiology of the reproduction*, Neill JD (Édit.) Raven Press, New York. p 1072-1148.
- Robb GW, Amann RP & Killian GJ (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of reproduction and fertility* 54(1):103-107.
- Roberts KP, Ensrud-Bowlin KM, Piehl LB, Parent KR, Bernhardt ML & Hamilton DW (2008) Association of the protein D and protein E forms of rat CRISP1 with epididymal sperm. *Biol Reprod* 79(6):1046-1053.
- Rodriguez CN & Nguyen H (2018) Identifying Quiescent Stem Cells in Hair Follicles. *Methods in molecular biology* 1686:137-147.
- Romagnani P (2009) Toward the identification of a "renopietic system"? *Stem Cells* 27(9):2247-2253.
- Romano RA, Smalley K, Magraw C, Serna VA, Kurita T, Raghavan S & Sinha S (2012) DeltaNp63 knockout mice reveal its indispensable role as a master regulator of epithelial development and differentiation. *Development* 139(4):772-782.
- Roy J, Kim B, Hill E, Visconti P, Krapf D, Vinegoni C, Weissleder R, Brown D & Breton S (2016) Tyrosine kinase-mediated axial motility of basal cells revealed by intravital imaging. *Nature communications* 7.
- Rubio-Tomás T, Aguilar-Bravo B & Sancho-Bru P (2019) Genetic Lineage Tracing of Biliary Epithelial Cells. *Methods in molecular biology* 1905:45-57.
- Saewu A, Kadunganattil S, Raghupathy R, Kongmanas K, Diaz-Astudillo P, Hermo L & Tanphaichitr N (2017) Clusterin in the mouse epididymis: possible roles in sperm maturation and capacitation. *Reproduction* 154(6):867-880.
- Sainio K, Hellstedt P, Kreidberg JA, Saxén L & Sariola H (1997) Differential regulation of two sets of mesonephric tubules by WT-1. *Development* 124(7):1293-1299.
- Saito Y, Onishi N, Takami H, Seishima R, Inoue H, Hirata Y, Kameyama K, Tsuchihashi K, Sugihara E, Uchino S, Ito K, Kawakubo H, Takeuchi H, Kitagawa Y, Saya H & Nagano O (2018) Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system. *Biochemical and biophysical research communications* 497(2):783-789.
- Santos CP, Lapi E, Martinez de Villarreal J, Alvaro-Espinosa L, Fernandez-Barral A, Barbachano A, Dominguez O, Laughney AM, Megias D, Munoz A & Real FX (2019) Urothelial organoids originating from Cd49f(high) mouse stem cells display Notch-dependent differentiation capacity. *Nature communications* 10(1):4407.
- Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M & Clevers H (2011) Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469(7330):415-418.

- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ & Clevers H (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459(7244):262-265.
- Sawamoto O, Yamate J, Kuwamura M, Kotani T & Kurisu K (2003) Development of sperm granulomas in the epididymides of L-cysteine-treated rats. *Toxicologic Pathology* 31(3):281-289.
- Scheer H & Robaire B (1980) Steroid delta 4-5 alpha-reductase and 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis during development. *Endocrinology* 107(4):948-953.
- Schimming BC, Pinheiro P, de Matteis R, Machado CM & Domeniconi RF (2015) Immunolocalization of Aquaporins 1 and 9 in the Ram Efferent Ducts and Epididymis. *Reproduction in domestic animals* 50(4):617-624.
- Schmelz M, Moll R, Hesse U, Prasad AR, Gandolfi JA, Hasan SR, Bartholdi M & Cress AE (2005) Identification of a stem cell candidate in the normal human prostate gland. *European journal of cell biology* 84(2-3):341-354.
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4(1-2):7-25.
- Seiler P, Wenzel I, Wagenfeld A, Yeung CH, Nieschlag E & Cooper TG (1998) The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. *Journal of Andrology* 21:217-226.
- Seishima R, Leung C, Yada S, Murad KBA, Tan LT, Hajamohideen A, Tan SH, Itoh H, Murakami K, Ishida Y, Nakamizo S, Yoshikawa Y, Wong E & Barker N (2019) Neonatal Wnt-dependent Lgr5 positive stem cells are essential for uterine gland development. *Nature communications* 10(1):5378.
- 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. *Biology of Reproduction* :705-714.
- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ & Visvader JE (2006) Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439(7072):84-88.
- Shi H, Liu J, Zhu P, Wang H, Zhao Z, Sun G & Li J (2018) Expression of peroxiredoxins in the human testis, epididymis and spermatozoa and their role in preventing H₂O₂-induced damage to spermatozoa. *Folia histochemica et cytobiologica* 56(3):141-150.
- Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S, Sugimoto S, Kanai T & Sato T (2017) Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells. *Nature* 545(7653):187-192.
- Shinozawa T, Kimura M, Cai Y, Saiki N, Yoneyama Y, Ouchi R, Koike H, Maezawa M, Zhang RR, Dunn A, Ferguson A, Togo S, Lewis K, Thompson WL, Asai A & Takebe T (2021) High-Fidelity Drug-Induced Liver Injury Screen Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Gastroenterology* 160(3):831-846.e810.
- Shum WW, Da Silva N, Brown D & Breton S (2009) Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of experimental biology* 212(Pt 11):1753-1761.

- Shum WW, Da Silva N, McKee M, Smith PJ, Brown D & Breton S (2008) Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 135(6):1108-1117.
- Shum WW, Hill E, Brown D & Breton S (2013) Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. *Reproduction* 146(5):455-469.
- Shum WW, Ruan YC, Da Silva N & Breton S (2011) Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *Journal of Andrology* 32(6):576-586.
- Shum WW, Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Roy JW, Hill E, Pittet MJ, Breton S & Da Silva N (2014) Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. *Biology of reproduction* 90(5):90.
- Siebel C & Lendahl U (2017) Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiological reviews* 97(4):1235-1294.
- Silva EJ, Queiroz DB, Honda L & Avellar MC (2010) Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Molecular and cellular endocrinology* 325(1-2):64-77.
- Singh A, Yadav CB, Tabassum N, Bajpeyee AK & Verma V (2019) Stem cell niche: Dynamic neighbor of stem cells. *European journal of cell biology* 98(2-4):65-73.
- Singla V & Reiter JF (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313(5787):629-633.
- Smith GH & Medina D (1988) A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *Journal of Cell Science* 90 (Pt 1):173-183.
- Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Hill E, Pittet MJ & Da Silva N (2014) Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology* 2(5):755-762.
- Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, Barker N, Klein AM, van Rheenen J, Simons BD & Clevers H (2010) Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 143(1):134-144.
- So WK & Cheung TH (2018) Molecular Regulation of Cellular Quiescence: A Perspective from Adult Stem Cells and Its Niches. *Methods in molecular biology* 1686:1-25.
- Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S & Sargolzaei Aval F (2017) Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta medica Iranica* 55(1):6-23.
- Sonnenberg-Riethmacher E, Walter B, Riethmacher D, Gödecke S & Birchmeier C (1996) The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. *Genes & development* 10(10):1184-1193.
- Sosinsky G (1995) Mixing of connexins in gap junction membrane channels. *PNAS* 92(20):9210-9214.
- St-Pierre N, Dufresne J, Rooney AA & Cyr DG (2003) Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. *Biology of reproduction* 68(4):1232-1240.
- Stammler A, Muller D, Tabuchi Y, Konrad L & Middendorff R (2013) TGFbetas modulate permeability of the blood-epididymis barrier in an in vitro model. *PLoS One* 8(11):e80611.

- Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li HI & Eaves CJ (2006) Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439(7079):993-997.
- Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C & Müller G (2001) TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney international* 59(2):579-592.
- Studdard PW, Stein JL & Cosentino MJ (2002) The effects of oxytocin and arginine vasopressin in vitro on epididymal contractility in the rat. *International journal of andrology* 25(2):65-71.
- Sujarit S & Pholpramool C (1985) Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. *Journal of reproduction and fertility* 74(2):497-502.
- Sullivan R (2015) Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian journal of andrology* 17(5):726-729.
- Sullivan R, Legare C, Lamontagne-Proulx J, Breton S & Soulet D (2019) Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology* 7(5):748-757.
- Sullivan R, Legare C, Thabet M & Thimon V (2011) Gene expression in the epididymis of normal and vasectomized men: what can we learn about human sperm maturation? *Journal of Andrology* 32(6):686-697.
- Sullivan R & Mieusset R (2016) The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human reproduction update* 22(5):574-587.
- Sumbal J, Chiche A, Charifou E, Koledova Z & Li H (2020) Primary Mammary Organoid Model of Lactation and Involution. *Frontiers in cell and developmental biology* 8:68.
- Sun EL & Flickinger CJ (1979) Development of Cell Types and of Regional Differences in the Postnatal Rat Epididymis. *American Journal of Anatomy* 154:27-56.
- Sun EL & Flickinger CJ (1982) Proliferative activity in the rat epididymis during postnatal development. *The Anatomical Record* 203(2):273-284.
- Sun X, Jackson L, Dey SK & Daikoku T (2009) In pursuit of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-5 regulation and function in the uterus. *Endocrinology* 150(11):5065-5073.
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE & Schatten G (2001) A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of cell science* 114(Pt 9):1665-1675.
- Suzuki D, Pinto F & Senoo M (2017) Inhibition of TGF-β signaling supports high proliferative potential of diverse p63(+) mouse epithelial progenitor cells in vitro. *Scientific reports* 7(1):6089.
- Tadokoro T, Gao X, Hong CC, Hotten D & Hogan BL (2016) BMP signaling and cellular dynamics during regeneration of airway epithelium from basal progenitors. *Development* 143(5):764-773.
- Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH & Hogan BL (2014) IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *PNAS* 111(35):E3641-3649.
- Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H & Nishinakamura R (2014) Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14(1):53-67.

- Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK & Trosko JE (2005) Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26(2):495-502.
- Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676.
- Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y & Taniguchi H (2013) Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499(7459):481-484.
- Talbot NC & Caperna TJ (2015) Proteome array identification of bioactive soluble proteins/peptides in Matrigel: relevance to stem cell responses. *Cytotechnology* 67(5):873-883.
- Tang Y, Yang G, Zhang J, Li X, Zhang C, Wang Y, Xu J, Chen Y, Teng Y & Yang X (2019) E-cadherin is Required for the Homeostasis of Lgr5(+) Gastric Antral Stem Cells. *International journal of biological sciences* 15(1):34-43.
- Tempest N, Baker AM, Wright NA & Hapangama DK (2018) Does human endometrial LGR5 gene expression suggest the existence of another hormonally regulated epithelial stem cell niche? *Human reproduction* 33(6):1052-1062.
- Terzi MY, Izmirli M & Gogebakan B (2016) The cell fate: senescence or quiescence. *Molecular biology reports* 43(11):1213-1220.
- Thimon V, Koukoui O, Calvo E & Sullivan R (2007) Region-specific gene expression profiling along the human epididymis. *Molecular human reproduction* 13(10):691-704.
- Tiwana MS & Leslie SW (2021) Anatomy, Abdomen and Pelvis, Testicle. *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Todorova MG, Soria B & Quesada I (2008) Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state. *Journal of Cellular Physiology* 214(2):354-362.
- Toivanen R, Mohan A & Shen MM (2016) Basal Progenitors Contribute to Repair of the Prostate Epithelium Following Induced Luminal Anoikis. *Stem Cell Reports* 6(5):660-667.
- Toshimori K (2003) Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy Research and Technique* 61(1):1-6.
- Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP & Nguyen QA (2003) Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125(6):871-878.
- Turner TT, Gleavy JL & Harris JM (1990) Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. *Journal of Andrology* 11(5):422-428.
- Turner TT & Riley TA (1999) p53 independent, region-specific epithelial apoptosis is induced in the rat epididymis by deprivation of luminal factors. *Molecular reproduction and development* 53(2):188-197.
- Unwin PN & Zampighi G (1980) Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 283(5747):545-549.
- Usselman MC & Cone RA (1983) Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin," a high molecular weight glycoprotein. *Biology of Reproduction* 29(5):1241-1253.

- Vendrey E & Dadoune JP (1988) Quantitative ultrastructural analysis of the principal cells in the human epididymis. *Reproduction, nutrition, developpement* 28(5):1225-1235.
- Veri JP, Hermo L & 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. *Journal of Andrology* 14(1):23-44.
- Vernet P, Faure J, Dufaure JP & Drevet JR (1997) Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol Reprod Dev* 47(1):87-98.
- Vidal VP, Jian-Motamedi F, Rekima S, Gregoire EP, Szenker-Ravi E, Leushacke M, Reversade B, Chaboissier MC & Schedl A (2020) R-spondin signalling is essential for the maintenance and differentiation of mouse nephron progenitors. *Elife* 9.
- Viger RS & Robaire B (1994) Immunocytochemical localization of 4-ene steroid 5 alpha-reductase type 1 along the rat epididymis during postnatal development. *Endocrinology* 134(5):2298-2306.
- Villapol SL, T.T. & Symes, A. (2013) Role of TGF- β signaling in neurogenic regions after brain injury. *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision*, Wislet-Gendebien S (Édit.) IntechOpen.
- Voisin A, Damon-Soubeyrand C, Bravard S, Saez F, Drevet JR & Guiton R (2020) Differential expression and localisation of TGF- β isoforms and receptors in the murine epididymis. *Scientific reports* 10(1):995.
- Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS & Reddi AH (1992) Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Experimental cell research* 202(1):1-8.
- Wade MA, Jones RC, Murdoch RN & Aitken RJ (2003) Motility activation and second messenger signalling in spermatozoa from rat cauda epididymidis. *Reproduction* 125(2):175-183.
- Wang BE, Wang X, Long JE, Eastham-Anderson J, Firestein R & Junttila MR (2015a) Castration-resistant Lgr5(+) cells are long-lived stem cells required for prostatic regeneration. *Stem Cell Reports* 4(5):768-779.
- Wang K, Li N, Yeung CH, Cooper TG, Liu XX, Liu J, Wang WT, Li Y, Shi H & Liu FJ (2015b) Comparison of gene expression of the oncogenic Wnt/ β -catenin signaling pathway components in the mouse and human epididymis. *Asian journal of andrology* 17(6):1006-1011.
- Wang K, Li N, Yeung CH, Li JY, Wang HY & Cooper TG (2013a) Oncogenic Wnt/ β -catenin signalling pathways in the cancer-resistant epididymis have implications for cancer research. *Molecular human reproduction* 19(2):57-71.
- Wang YF & Holstein AF (1983) Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell and tissue research* 233(3):517-521.
- Wang ZA, Mitrofanova A, Bergren SK, Abate-Shen C, Cardiff RD, Califano A & Shen MM (2013b) Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity. *Nature cell biology* 15(3):274-283.

- Watson JK, Rulands S, Wilkinson AC, Wuidart A, Ousset M, Van Keymeulen A, Göttgens B, Blanpain C, Simons BD & Rawlins EL (2015) Clonal Dynamics Reveal Two Distinct Populations of Basal Cells in Slow-Turnover Airway Epithelium. *Cell reports* 12(1):90-101.
- Weigel Muñoz M, Carvajal G, Curci L, Gonzalez SN & Cuasnicu PS (2019) Relevance of CRISP proteins for epididymal physiology, fertilization, and fertility. *Andrology* 7(5):610-617.
- Xiao YC, Huang YD, Hardy DO, Li XK & Ge RS (2010) Glucocorticoid suppresses steroidogenesis in rat progenitor Leydig cells. *Journal of andrology* 31(4):365-371.
- Xin A, Zhao Y, Yu H, Shi H, Diao H & Zhang Y (2015) Characterization of beta-defensin 42 expressed in principal cells at the initial segment of the rat epididymis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 47(11):861-869.
- Xu B, Abdel-Fattah R, Yang L, Crenshaw SA, Black MB & Hinton BT (2011) Testicular lumicrine factors regulate ERK, STAT, and NFKB pathways in the initial segment of the rat epididymis to prevent apoptosis. *Biology of reproduction* 84(6):1282-1291.
- Xu B, Washington AM & Hinton BT (2014) PTEN signaling through RAF1 proto-oncogene serine/threonine kinase (RAF1)/ERK in the epididymis is essential for male fertility. *PNAS* 111(52):18643-18648.
- Xu B, Washington AM & Hinton BT (2016) Initial Segment Differentiation Begins During a Critical Window and Is Dependent upon Lumicrine Factors and SRC Proto-Oncogene (SRC) in the Mouse. *Biology of reproduction* 95(1):15.
- Xu B, Yang L, Lye RJ & Hinton BT (2010) p-MAPK1/3 and DUSP6 regulate epididymal cell proliferation and survival in a region-specific manner in mice. *Biology of reproduction* 83(5):807-817.
- Yalcin-Ozuysal O, Fiche M, Guitierrez M, Wagner KU, Raffoul W & Briskin C (2010) Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell death and differentiation* 17(10):1600-1612.
- Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H & Ouchi Y (2002) Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *The Journal of Immunology* 169(5):2516-2523.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D & McKeon F (1998) p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular cell* 2(3):305-316.
- Yeung CH, Cooper TG, Bergmann M & Schulze H (1991) Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. *American Journal of Anatomy* 191(3):261-279.
- Yeung CH, Cooper TG, Oberpenning F, Schulze H & Nieschlag E (1993) Changes in movement characteristics spermatozoa along the length of the epididymis. *Biology of Reproduction* 49:274-280.
- Yeung CH, Nashan D, Sorg C, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E & Cooper TG (1994) Basal Cells of the Human Epididymis-Antigenic and Ultrastructural Similarities to Tissue-Fixed Macrophages. *Biology of reproduction* 50:917-926.
- Yeung CH, Pérez-Sanchez F, Soler C, Poser D, Kliesch S & Cooper TG (1997) Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Human Reproduction Update* 3:205-213.

- Yeung CH, Wang K & Cooper TG (2012) Why are epididymal tumours so rare? *Asian journal of andrology* 14(3):465-475.
- Yu KR, Yang SR, Jung JW, Kim H, Ko K, Han DW, Park SB, Choi SW, Kang SK, Schöler H & Kang KS (2012) CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. *Stem Cells* 30(5):876-887.
- Yuan Y, Li L, Cheng Q, Diao F, Zeng Q, Yang X, Wu Y, Zhang H, Huang M, Chen J, Zhou Q, Zhu Y, Hua R, Tian J, Wang X, Zhou Z, Hao J, Yu J, Hua D, Liu J, Guo X, Zhou Q & Sha J (2020) In vitro testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids. *Cell reports* 30(3):244-255.
- Yudin AI, Generao SE, Tollner TL, Treece CA, Overstreet JW & Cherr GN (2005) Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. *Biology of reproduction* 73(6):1243-1252.
- Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H & Watanabe M (2012) Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell. *Nature medicine* 18(4):618-623.
- Yun SP, Ryu JM, Park JH, Kim MO, Lee JH & Han HJ (2012) Prostaglandin E(2) maintains mouse ESC undifferentiated state through regulation of connexin31, connexin43 and connexin45 expression: involvement of glycogen synthase kinase 3beta/beta-catenin. *Biology of the cell* 104(7):378-396.
- Zangrossi S, Marabese M, Brogginini M, Giordano R, D'Erasmo M, Montelatici E, Intini D, Neri A, Pesce M, Rebulli P & Lazzari L (2007) Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells* 25(7):1675-1680.
- Zhang L, Adileh M, Martin ML, Klingler S, White J, Ma X, Howe LR, Brown AM & Kolesnick R (2017a) Establishing estrogen-responsive mouse mammary organoids from single Lgr5(+) cells. *Cellular signalling* 29:41-51.
- Zhang W & Liu HT (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research* 12(1):9-18.
- Zhang XK, Hoffmann B, Tran PB, Graupner G & Pfahl M (1992) Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 355(6359):441-446.
- Zhang Y, Alexander PB & Wang XF (2017b) TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9(4).
- Zhao GQ, Chen YX, Liu XM, Xu Z & Qi X (2001) Mutation in Bmp7 exacerbates the phenotype of Bmp8a mutants in spermatogenesis and epididymis. *Developmental biology* 240(1):212-222.
- Zhao GQ, Liaw L & Hogan BL (1998) Bone morphogenetic protein 8A plays a role in the maintenance of spermatogenesis and the integrity of the epididymis. *Development* 125(6):1103-1112.
- Zhao M, Tao F, Venkatraman A, Li Z, Smith SE, Unruh J, Chen S, Ward C, Qian P, Perry JM, Marshall H, Wang J, He XC & Li L (2019) N-Cadherin-Expressing Bone and Marrow Stromal Progenitor Cells Maintain Reserve Hematopoietic Stem Cells. *Cell reports* 26(3):652-669.
- Zhou J & Cidlowski JA (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70(5-7):407-417.

Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, Poppleton H, Zakharenko S, Ellison DW & Gilbertson RJ (2009) Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457(7229):603-607.

10 ANNEXE I : TRACAGE DE LA LIGNEE LGR5 POSITIVE

10.1 Introduction et mise en contexte

L'épididyme est un organe du système reproducteur masculin permettant la maturation et le transport des spermatozoïdes (Bedford, 1967). Il est divisé en 4 segments chez le rongeur et est composé d'une lumière où transitent les spermatozoïdes et d'un épithélium (Sun & Flickinger, 1979; Turner *et al.*, 2003). Cet épithélium est majoritairement composé de cellules principales, importantes pour la maturation des spermatozoïdes mais aussi de cellules claires et étroites importantes pour réguler l'environnement luminal et de cellules basales (Rinaldi *et al.*, 2020b). Il a récemment été montré qu'il existe une population de cellules souches au sein des cellules basales épидидymaire. En effet, une étude a montré que certaines cellules basales KRT5⁺ isolées d'épididyme de souris ont la capacité de former des organoïdes et de se différencier en cellules claires *in vitro* mais aussi de se différencier en cellules principales *in vivo* (Mou *et al.*, 2016). Dans une étude plus récente certaines cellules basales ITGA6⁺ de rats ont également pu former des organoïdes composés de cellules principales capable de sécréter une protéine essentielle à la maturation des spermatozoïdes (Pinel & Cyr, 2021).

Il n'existe cependant pas encore de marqueur connu permettant d'identifier précisément et de caractériser cette population de cellules souches au sein de l'épididyme. Des données obtenues lors de mon doctorat permettent cependant de proposer LGR5 comme marqueur pour ces cellules. En effet, LGR5 est un récepteur de la voie de signalisation Wnt et est un marqueur de cellules souches adultes dans de nombreux tissus (Barker *et al.*, 2007; Koo & Clevers, 2014; Leung *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2020). De plus, nos données confirment que LGR5 est exprimé au sein de l'épididyme dans les cellules basales et que son expression augmente lors d'une altération tissulaire. Afin de confirmer que LGR5 identifie une sous-population de cellules basales capable de s'auto-renouveler et de se différencier en un ou plusieurs autres types cellulaires *in vivo*, nous nous sommes donnés pour objectif de réaliser le traçage des cellules LGR5⁺. Le traçage de lignée est une technique couramment utilisée lors de l'étude des cellules souches et a été utilisée pour l'étude des cellules LGR5 dans plusieurs organes tels que la prostate, le foie, la grande mammaire et le rein (Barker *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 2012; Barker *et al.*, 2007; de Visser *et al.*, 2012; Huch *et al.*, 2013; Jaks *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2020; Leushacke *et al.*, 2017; Seishima *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015a).

Afin de réaliser ce traçage de lignée LGR5, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de modèles de souris transgéniques combinant le promoteur de LGR5 et le système Cre-Lox. A

l'heure actuelle et à notre connaissance deux modèles différents sont utilisés dans la littérature et un de ces modèles est commercialisé via « The Jackson Laboratory ».

Le modèle commercialisé, nommé Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 permet l'expression de la protéine EGFP et d'une Cre-recombinase couplée à un récepteur aux estrogènes spécifiquement dans les cellules positives à LGR5. Ces souris peuvent ensuite être croisées avec des souris exprimant un gène rapporteur de façon ubiquitaire flanqué à des séquences Lox. L'injection de tamoxifène, un agoniste des récepteurs aux estrogènes aux souris issues du croisement permet l'activation de la Cre-recombinase qui se rend au noyau et « coupe » les séquences Lox afin de permettre l'expression du gène reporteur dans les cellules LGR5 et leur descendance. Ce modèle a été utilisé afin d'effectuer le traçage des cellules LGR5 dans différents organes tels que l'intestin, l'estomac, le follicule pileux, le rein, la glande mammaire ou le foie (Barker *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 2012; Barker *et al.*, 2007; de Visser *et al.*, 2012; Huch *et al.*, 2013; Jaks *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2018). Cependant, l'expression du transgène semble hétérogène pour certains tissus dans ce modèle et la fonction du gène LGR5 est abolie, ainsi un nouveau modèle a été créé pour palier à ce problème.

Le second modèle n'est pas commercialisé et est nommé Lgr5-2A-CreERT2. Il utilise également le système Cre-Lox, le promoteur de LGR5 et l'injection de tamoxifène mais il permet la synthèse d'une protéine LGR5 fonctionnelle et maintient ainsi les niveaux d'expression physiologiques de LGR5. Il a été utilisé afin d'effectuer le traçage des cellules LGR5⁺ dans l'estomac, la glande utérine et le muscle squelettique (Leung *et al.*, 2020; Leushacke *et al.*, 2017; Seishima *et al.*, 2019).

Au cours de mon doctorat, nous avons collaboré avec une équipe de chercheurs travaillant sur le 2^{ème} modèle afin de réaliser l'étude des cellules LGR5⁺ dans l'épididyme de souris. Les matériels et méthodes utilisés ainsi que les données obtenues dans le cadre de cette collaboration sont présentées ci-dessous. Il est important de préciser que ces données, en l'état actuel, ne permettent pas une interprétation définitive des expériences réalisées et ne peuvent donc pas contribuer à l'écriture d'un article scientifique. Ces expériences sont présentées et discutées ici avec prudence afin de rendre compte de l'effort fourni lors de ce doctorat pour obtenir des données de traçage de lignée.

10.2 Matériel et Méthodes

Souris et traçage de lignée

Des échantillons de souris transgéniques Lgr5-2A-EGFP-IRES-creERT2 obtenues comme décrit précédemment ont été utilisés (Leushacke *et al.*, 2017; Seishima *et al.*, 2019). Les épидидymes de ces souris ont été échantillonnés à 8 semaines pour vérifier la localisation de LGR5 dans l'épididyme. Des souris adultes Lgr5-2A-EGFP-IRES-creERT2 ont ensuite été croisées avec des souris Rosa26-dTom commercialisées par « The Jackson Laboratory ». Des injections intrapéritonéales de tamoxifène (3 mg, Sigma) dilué dans de l'huile de maïs ont été réalisées chez les souris adultes (8 semaines) résultantes du croisement pour activer la Cre-recombinase et permettre l'expression de la protéine dTomato dans les cellules LGR5 positives et leurs descendances. Des souris contrôles ont été injectées avec de l'huile de maïs seul. Les souris ont été échantillonnées à 7 jours, 1 mois, 9 mois et 1 an après l'injection de tamoxifène. Après prélèvement, les épидидymes de souris ont été fixés avec 4% de paraformaldéhyde une nuit à 4°C avant d'être enrobés de paraffine.

Hybridation In situ

Des expériences d'hybridation in situ ont été réalisées sur des coupes d'épididyme de souris adultes de 6 mm déparaffinées et réhydratées et à l'aide du kit RNAscope 2.0 FFPE (Advanced Cell Diagnostics, ACD, Harward, CA). Toutes les procédures ont été effectuées conformément aux instructions du fabricant. Les sondes utilisées dans cette étude étaient : Lgr5 (C1, C2). Des sections d'épididyme ont été hybridées pour DapB comme contrôle négatif et PPIB comme contrôle positif pour chaque expérience. Toutes les procédures ont été effectuées conformément aux instructions du fabricant.

Marquage immunohistochimique

Des coupes d'épididymes de 7µm ont été réhydratées à l'aide d'histoclear et d'une série de bains d'éthanol (100 à 50 %). Les sections ont également été incubées dans 300 mM de glycine (ThermoFisher) pendant 5 min pour bloquer les aldéhydes libres, et lavées dans du TBS-Tween (0,1 % ; TBST). Un démasquage d'épitope induit par la chaleur a été effectué pendant 10 min dans un tampon Tris-EDTA (base Tris 10 mM, solution EDTA 1 mM, 0,05 % de Tween 20, pH 9,0), suivie de plusieurs rinçages dans de l'eau. Les coupes ont été bloquées par incubation

dans du TBST contenant 5 % de BSA pendant 30 min à 37°C, puis incubées avec les anticorps primaires (tableau 1) pendant une nuit à 4 °C. Les lames ont été rincées avec du TBS-T, incubées avec de l'H₂O₂ 0,3% pendant 20 minutes et rincées avec de l'eau et du TBS-T. Les tissus ont ensuite été incubés 45 minutes avec un anticorps secondaire à 37°C (tableau 1). La détection a été réalisée avec un kit « DAB Substrate Kit » (Abcam, Cambridge, MA) selon les instructions du fabricant et les noyaux ont été colorés avec du bleu de méthylène. Des contrôles négatifs ont été effectués en l'absence d'anticorps primaire.

Marquage par immunofluorescence

Les coupes ont été fixées dans du méthanol froid pendant 10 min à -20°C. Après réhydratation dans du PBS, les coupes ont été perméabilisées dans une solution de 0.3% de Triton X-100 (ThermoFisher) préparé dans du PBS à température ambiante pendant 15 min. Les coupes ont ensuite été incubées avec une solution de blocage (5 % d'albumine de sérum bovin [BSA] dans du PBS) pendant 30 min et incubées avec un anticorps primaire dilué dans une solution de blocage pendant une nuit à 4°C. Les coupes ont été lavées trois fois avec du PBS et ensuite incubées avec un anticorps secondaire à température ambiante pendant 45 min dans le tampon de blocage. Les coupes ont ensuite été rincées, incubées avec un autre anticorps primaire pendant une nuit à 4°C puis incubées avec un autre anticorps secondaire contenant le Hoechst (1 ug/ml ; Biotium, Scarborough, ON). Tous les anticorps primaires et secondaires utilisés sont répertoriés dans le tableau 1. Enfin, les coupes ont été lavées trois fois avec du PBS et montées avec du Fluoromount (Southern Biotech, Birmingham, USA). Des contrôles négatifs ont été effectués en l'absence d'anticorps primaire. Les marquages par immunofluorescence ont été examinés avec un microscope confocal Nikon A1Plus et les images ont été analysées avec le logiciel NIS-Elements AR (Nikon).

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés

Anticorps	Compagnie	N° de catalogue	Dilutions
AQP9	Alpha Diagnostic	AQ91-A	1.200
ATP6V1B2	ABClonal	A3754	1.600
RFP	Rockland	600-401-379	1.200
RFP	Abcam	ab125244	1.200
GFP	Abcam	ab290	NA
Rhodamine Red-X Donkey anti-mouse	Jackson Immunoresearch Laboratories	715-295-151	1.250
Alex Fluor 488 Goat anti-Rabbit	Invitrogen	A11008	1.500
Rabbit Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	Abcam	ab6728	1.250
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	Abcam	ab6721	1.250

10.3 Résultats

Localisation de l'ARN messager de LGR5

Des sondes dirigées contre l'ARNm de LGR5 nous ont permis d'observer sa localisation au sein de l'épithélium de souris adulte (Figure 1). Celui-ci est localisé dans des cellules présentes à la base de l'épithélium et possédant un noyau allongé, ce qui semble donc correspondre à la description des cellules basales. Des cellules possédant un noyau localisé de façon plus apical expriment aussi l'ARNm de LGR5 suggérant ainsi sa présence dans d'autres types cellulaires.

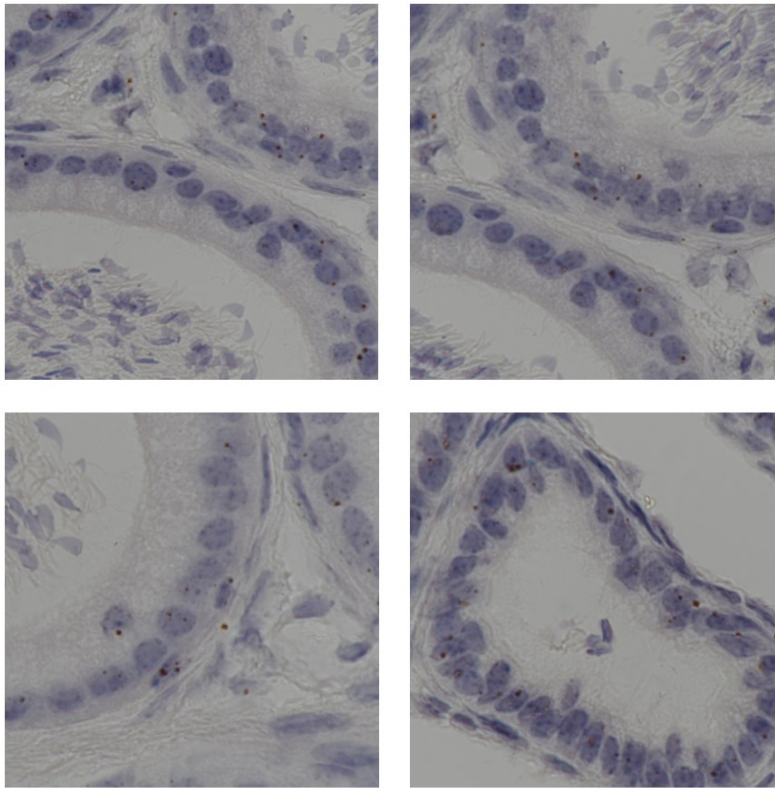


Figure 1 : Hybridation in situ de LGR5 dans des épидидymes de souris adultes

L'ARN messager de LGR5 a été détecté par hybridation in situ sur des coupes d'épididyme adultes. Celui-ci semble être localisé dans les cellules basales mais aussi dans d'autres types cellulaires de l'épithélium.

Expression de la GFP dans les souris adultes LGR5-2A-eGFP

Afin de localiser la protéine LGR5 au sein de l'épididyme de souris, des marquages par immunohistochimie contre la protéine GFP ont été réalisés dans des épидидymes de souris adultes (8 semaines) LGR5-2A-eGFP. L'expression de la GFP, représentative de celle de LGR5 dans ce modèle varie selon les segments de l'épididyme. Son expression semble faible dans la partie proximale de l'épididyme alors qu'un marquage plus important est observé dans la partie distale. Des photos à fort grossissement permettent de montrer que le marquage semble localisé au niveau des cellules basales de l'épithélium (Figure 2). Des marquages supplémentaires ont été réalisés au sein de notre laboratoire sur des tissus que nous avons reçus de souris LGR5-2A-eGFP afin d'analyser les profils d'expression de LGR5 dans les 4 segments de l'épididyme mais ces marquages n'ont pas permis de reproduire les résultats de la figure 2 ci-dessous, malgré l'utilisation de plusieurs anticorps anti-GFP et l'utilisation de kit d'amplification du signal.

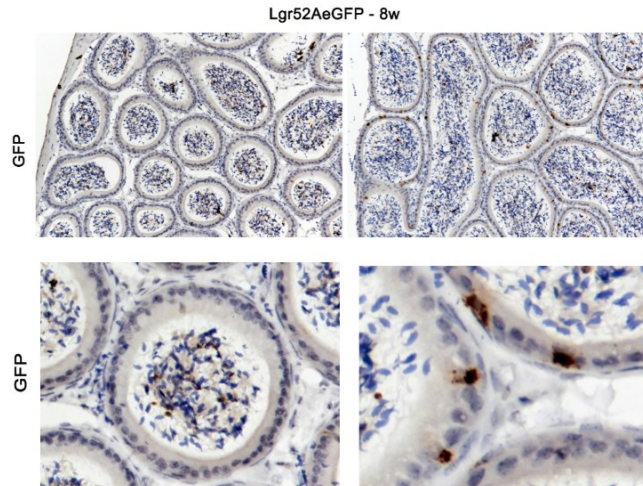


Figure 2 : Immunolocalisation de la protéine GFP dans des épидидymes de souris adultes LGR5-2A-eGFP

Les marquages obtenus avec un anticorps anti-GFP ont permis de localiser l'expression de LGR5 dans des épидидymes de souris adultes. Son expression semble différente entre les segments de l'épididyme et elle semble être localisée au niveau des cellules basales de l'épithélium.

Traçage de lignée dans les souris adultes

Pour déterminer le devenir des cellules basales LGR5 positives, des souris adultes Lgr5-2A-EGFP-IRES-creERT2 ont été croisées avec des souris Rosa26-RFP. Les souris obtenues ont été injectées à l'âge adulte avec du tamoxifène (1 fois ou 4 fois 3mg) et leurs épидидymes ont été prélevés et marqués avec un anticorps anti-RFP à différents temps après injection (Figure 3). Sept jours après injection, de très rares cellules possédant un noyau au niveau apical sont positives à la RFP dans le segment initial alors que ce nombre de cellules augmente par tubule dans la tête de l'épididyme. Dans le corps de l'épididyme, ces cellules sont également positives ainsi que des groupes de cellules possédant un noyau localisé plus bas dans l'épithélium. Enfin, dans la queue de l'épididyme, la majorité des cellules de l'épithélium est marquée. Les épидидymes échantillonnés à 1 mois, 9 mois et 1 an après l'injection de tamoxifène possèdent un profil de marquage identique. Des souris injectées avec 4 doses de tamoxifène comportent les mêmes cellules positives à la RFP mais présentent une intensité de marquage plus importante, confirmant ainsi que l'expression de la RFP est liée à l'injection de tamoxifène. Aucune coloration n'a été observée dans les coupes d'épididymes incubées sans anticorps primaire. Un marquage a cependant été observé dans les coupes de souris non-induites, c'est-à-dire des souris qui n'ont pas été injectées au tamoxifène (Figure 3).

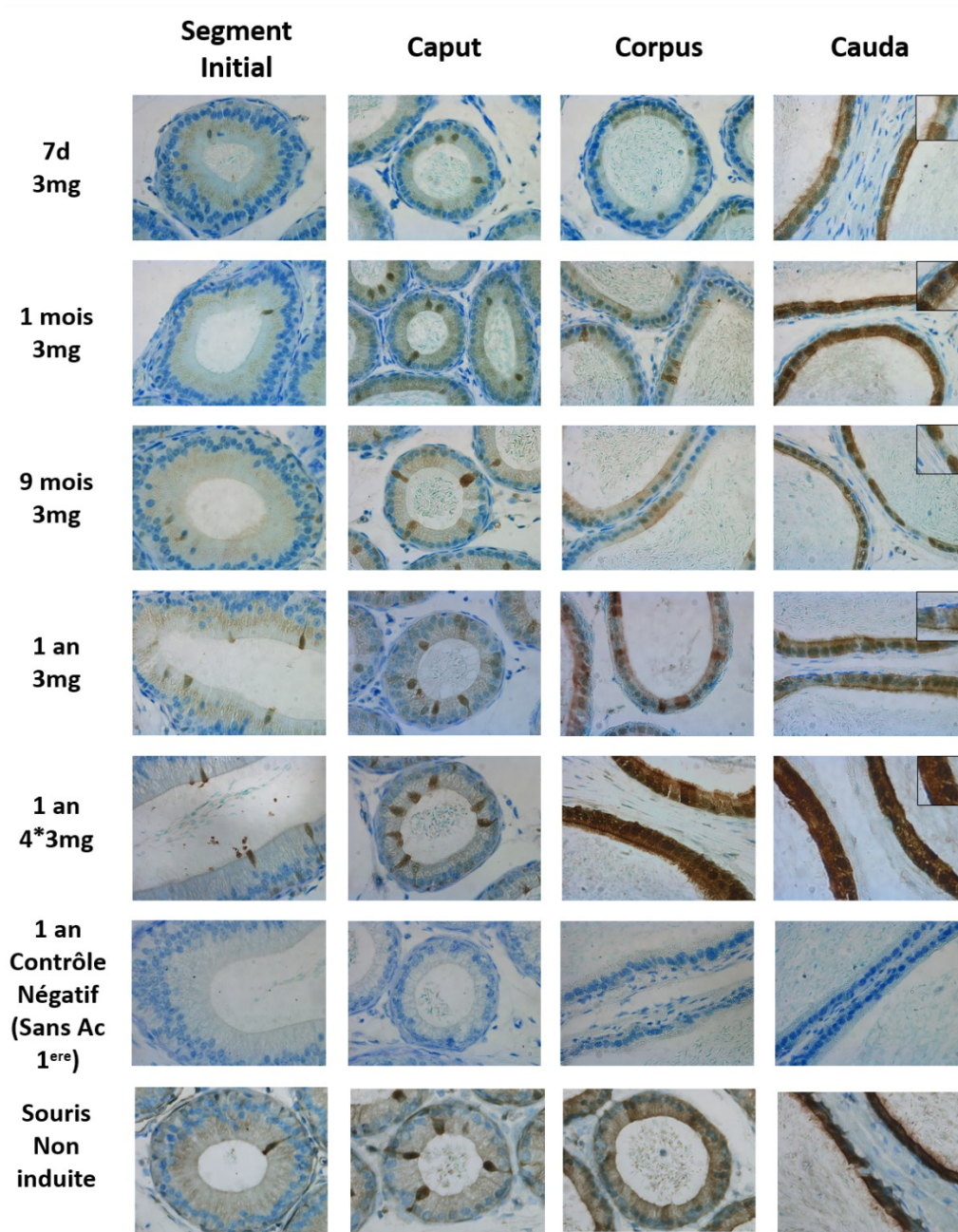


Figure 3: Immunolocalisation de la protéine RFP dans des épидидymes de souris adultes Lgr5-2A-EGFP-IRES-creERT2 prélevés 7 jours, 1 mois, 9 mois et 1 an après administration de tamoxifène.

L'injection de tamoxifène a été réalisée chez des souris adultes qui ont été euthanasiées 7 jours, 1 mois, 9 mois et 1 an après injection. L'utilisation d'un marquage avec un anticorps anti-RFP permet de localiser les cellules LGR5 ainsi que leur descendance. Les profils d'expression de RFP sont semblables aux différents temps post-injection. Quelques rares cellules allongées sont marquées dans le segment initial alors que leur fréquence augmente dans la tête de l'épididyme. Dans le corps des regroupements de cellules sont marqués mais avec des intensités de marquage différentes alors que la majorité des cellules de l'épithélium est marquée dans la queue de l'épididyme.

Identification des cellules positives au traçage de lignée

Pour déterminer les types cellulaires qui expriment la RFP après l'induction du traçage de la lignée, nous avons utilisé des épидидymes de souris prélevés 1 an après injection de tamoxifène afin de réaliser des doubles marquages contre la RFP et contre des marqueurs de différents types cellulaires (Figure 4). Dans un premier temps, nous avons marqué la RFP et l'aquaporine-9 (AQP9), un marqueur de cellules principales (Pastor-Soler *et al.*, 2001; Schimming *et al.*, 2015). Aucune co-localisation de RFP et AQP9 n'est observée dans la tête et le corps de l'épididyme alors que la majorité des cellules de la queue co-expriment la RFP et l'AQP9 (Figure 3). Dans un deuxième temps, nous avons marqué la RFP et la sous-unité B de l'ATPase du proton de type V (ATP6V1B2), un marqueur de cellules claires et étroites (Pietrement *et al.*, 2006). Des cellules co-exprimant la RFP et l'ATP6V1B2 ont été observées dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme (Figure 4).

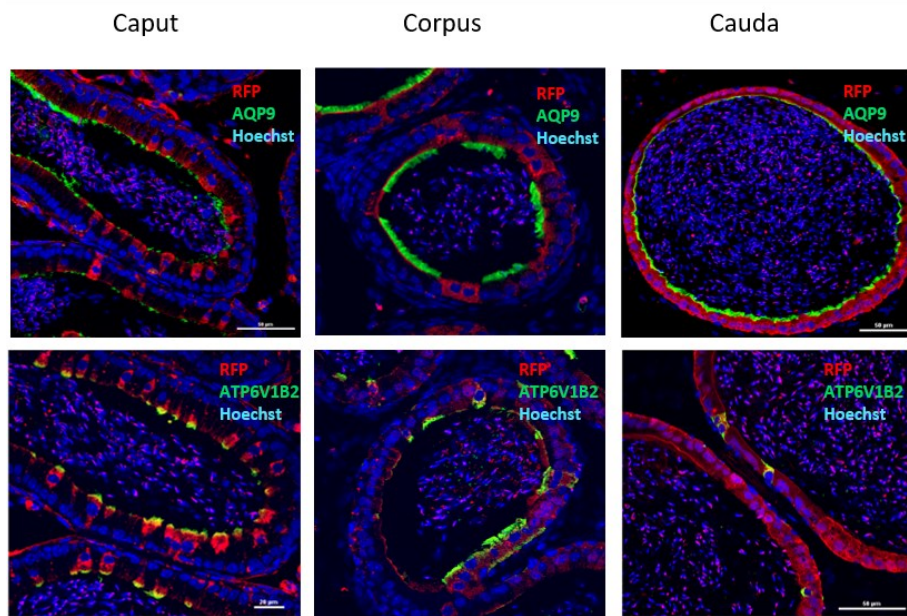


Figure 4: Colocalisation par immunofluorescence des protéines RFP, AQP9 et ATP6V1B2 dans des épидидymes de souris adultes *Lgr5-2A-EGFP-IRES-creERT2* prélevés 1 an après administration de tamoxifène.

Les photos du haut représentent des colocalisations par immunofluorescence de RFP avec le marqueur de cellules principales AQP9. Aucune colocalisation n'est observée dans la tête et le corps de l'épididyme alors que la majorité des cellules est doublement positive dans la queue de l'épididyme. Les photos du bas sont des colocalisations de RFP avec le marqueur de cellules claires/étroites ATP6V1B2. Dans la tête et le corps de l'épididyme sont présents des cellules qui expriment les 2 marqueurs ou aucun des marqueurs alors que seule une minorité de cellules est doublement marquée dans la queue de l'épididyme.

10.4 Discussion

Afin de confirmer que les cellules qui expriment LGR5 dans l'épididyme sont une sous-population de cellules basales capables de s'auto-renouveler et de se différencier, nous avons utilisé des épididymes issus d'un modèle de souris transgénique *Lgr5-2A-EGFP-IRES-creERT2*.

La réalisation d'expérience d'hybridation *in situ* sur des coupes d'épididyme de souris adulte nous a permis de confirmer les résultats obtenus sur des coupes d'épididyme de rat. En effet, dans ces 2 espèces nous avons détecté l'ARN messager de LGR5 dans plusieurs types cellulaires de l'épithélium.

Des marquages par immunohistochimie nous ont ensuite permis de confirmer que LGR5 est exprimé dans l'épididyme de souris et qu'il est localisé au niveau des cellules basales de l'épithélium. Lors de mon doctorat nous avons également observé le marquage de LGR5 dans les cellules basales d'épididyme de rat et de souris grâce à l'utilisation d'un anticorps commercial. Dans les épithéliums de glande mammaire et de prostate, qui sont également des épithéliums pseudo-stratifiés, il a également été observé que les cellules basales expriment LGR5. Cependant, dans la prostate, il existe également une population de cellules luminales exprimant LGR5 (Plaks *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015a). Les marquages anti-GFP au sein des épididymes de souris transgéniques ont cependant indiqué un profil d'expression distinct entre les segments. Les fonctions des différentes parties de l'épididyme et leur composition cellulaire étant différentes, il a déjà été montré que de nombreuses protéines et gènes sont différenciellement exprimés entre les segments (Belleannee *et al.*, 2012; Dacheux *et al.*, 2009; Dube *et al.*, 2007). A partir de ce constat, nous avons souhaité réaliser de nouveaux marquages sur des épididymes de plusieurs animaux afin de confirmer cette disparité entre les segments. Les marquages que nous avons réalisés en utilisant le même anticorps et en suivant le même protocole que ceux utilisés par l'équipe qui a réalisé la figure 1 ne nous ont cependant pas permis d'obtenir de marquage. Des anticorps anti-GFP différents ainsi que des kits d'amplification du signal ont également été testés en vain. Le problème de reproductibilité du marquage GFP pourrait ainsi s'expliquer par une variabilité inter-laboratoire ou une variation de l'expression de la GFP entre les souris de même génération ou entre les souris de différentes générations. Une étude de 2007 comparant plusieurs souches de souris transgéniques exprimant la GFP a en effet démontré qu'il existe une variabilité considérable de l'expression de GFP au sein même d'une souche de souris transgénique (Swenson *et al.*, 2007).

Les analyses de traçage de lignée nous ont permis d'obtenir un marquage RFP dans les cellules de l'épithélium épididymaire cependant ce marquage est également observé dans les

souris non-induites et ceci en utilisant différents anticorps anti-RFP et différents protocoles de marquage. Des marquages immunohistochimiques, qui se sont révélés négatifs, ont également été réalisés sur des épидидymes de souris non transgéniques afin de confirmer que les anticorps utilisés ne reconnaissent pas des protéines non spécifiques au sein de l'épididyme. Deux hypothèses peuvent expliquer ce marquage dans les souris non induites.

L'hypothèse la plus probable est l'existence d'un niveau basal d'activité de la Cre-recombinase qui est indépendante du tamoxifène. Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature dans des modèles de souris Cre-Lox et est appelé « leaky Cre » (Álvarez-Aznar *et al.*, 2020). Selon cette hypothèse, les résultats semblent donc indiquer que les marquages que nous observons sont bien attribués à des cellules LGR5 qui se sont différenciées car seules ces cellules expriment la Cre-recombinase, cependant le traçage de la lignée n'a pas forcément débuté lors de l'injection de tamoxifène mais a pu débuter avant, compliquant ainsi l'interprétation des résultats. En effet, nous avons démontré que les cellules colonnaires, formant les épithéliums d'épididyme des rats de 7 et 14 jours, expriment-elles aussi LGR5 ce qui laisse ainsi la possibilité que les cellules marquées observées proviennent de ces cellules.

La deuxième hypothèse est l'utilisation de souris « contrôles » non adaptée. En effet, les tissus disponibles des souris induites et des souris non-induites sont issus d'animaux d'environ 10 à 15 générations d'écart d'après nos informations. Il est ainsi possible que les épидидymes des souris non-induites soient des souris de générations trop avancées dans la lignée et que des altérations génétiques soient intervenues par rapport aux souris de plus faibles générations qui elles ont été utilisées pour le traçage de lignée (Mahajan *et al.*, 2016).

En considérant que la première hypothèse est exacte et avec beaucoup de prudence, il est ainsi possible de penser que ces résultats indiquent que les cellules exprimant LGR5, que ce soient les cellules colonnaires ou les cellules basales, ont la capacité de se différencier *in vivo* et cette conclusion serait en accord avec les données de la littérature. En effet, concernant les cellules colonnaires, il a été montré que ces cellules semblent à l'origine des cellules étroites, principales, claires et basales et qu'elles sont capables de former des organoïdes lorsqu'elles sont cultivées en 3D (Dufresne *et al.*, 2022. soumis ; Kumar & Tanwar, 2017; Sun & Flickinger, 1982). Concernant les cellules basales, il a également été démontré que celles-ci sont capables de former des organoïdes et de se différencier *in vivo* et *in vitro* en cellules principales et cellules claires (Mou *et al.*, 2016; Pinel & Cyr, 2021).

Nous avons ainsi réalisé des co-marquages de RFP et un marqueur de cellules principales ainsi qu'un marqueur de cellules claires et étroites. Les marquages obtenus indiquent que les

cellules LGR5 seraient capables de se différencier en cellules claires et étroites dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme alors qu'elles pourraient se différencier en cellules principales uniquement dans la queue de l'épididyme. Ces données sont ainsi en accord avec les données obtenues *in vivo* et *in vitro* dans lesquelles les cellules basales sont capables de se différencier en cellules principales et en cellules claires (Mou *et al.*, 2016; Pinel & Cyr, 2021). Il a cependant été montré *in vitro* les cellules basales issues de la partie proximale de l'épididyme sont autant capables de se différencier en cellules principales que celle issues de la queue ce qui ne semble pas le cas *in vivo* suggérant un rôle de l'environnement des cellules sur leur processus de différenciation (Pinel & Cyr, 2021).

S'il venait à être confirmé, ce résultat impliquerait donc que les cellules LGR5 de l'épididyme sont multipotentes. L'utilisation d'un autre modèle de souris transgénique afin de réaliser un traçage de lignée est cependant primordiale pour conclure quant à l'étude des cellules LGR5 *in vivo*.

10.5 Références

- Bedford JM (1967) Effect of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *Journal of experimental Zoology* 166:271-282.
- Álvarez-Aznar A, Martínez-Corral I, Daubel N, Betsholtz C, Mäkinen T & Gaengel K (2020) Tamoxifen-independent recombination of reporter genes limits lineage tracing and mosaic analysis using CreER(T2) lines. *Transgenic Research*. 29(1):53-68.
- Belleannee C, Thimon V & Sullivan R (2012) Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Research*. 349(3):717-731.
- Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R & Clevers H (2010) Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units *in vitro*. *Cell Stem Cell* 6(1):25-36.
- Barker N, Rookmaaker MB, Kujala P, Ng A, Leushacke M, Snippert H, van de Wetering M, Tan S, Van Es JH, Huch M, Poulsom R, Verhaar MC, Peters PJ & Clevers H (2012) Lgr5(+ve) stem/progenitor cells contribute to nephron formation during kidney development. *Cell reports* 2(3):540-552.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ & Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449(7165):1003-1007.
- Dacheux JL, Belleannee C, Jones R, Labas V, Belghazi M, Guyonnet B, Druart X, Gatti JL & Dacheux F (2009) Mammalian epididymal proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 306(1-2):45-50.
- de Visser KE, Ciampricotti M, Michalak EM, Tan DW, Speksnijder EN, Hau CS, Clevers H, Barker N & Jonkers J (2012) Developmental stage-specific contribution of LGR5(+) cells to basal

- and luminal epithelial lineages in the postnatal mammary gland. *Journal of Pathology*. 228(3):300-309.
- Dube E, Chan PT, Hermo L & Cyr DG (2007) Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. *Biology of Reproduction*. 76(6):1034-1044.
- Dufresne J, Gregory M, Pinel L & Cyr DG (2022) Differential Gene Expression and Hallmarks of Stemness in Epithelial Cells of the Developing Rat Epididymis. (PREPRINT available at Research Square)
- Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG, Grompe M & Clevers H (2013) *In vitro* expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494(7436):247-250.
- Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es JH, Snippert HJ, Clevers H & Toftgard R (2008) Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature Genetics* 40(11):1291-1299.
- Koo BK & Clevers H (2014) Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5. *Gastroenterology* 147(2):289-302.
- Leung C, Tan SH & Barker N (2018) Recent Advances in Lgr5(+) Stem Cell Research. *Trends in Cell Biology*. 28(5):380-391.
- Leung C, Murad KBA, Tan ALT, Yada S, Sagiraju S, Bode PK & Barker N (2020) Lgr5 Marks Adult Progenitor Cells Contributing to Skeletal Muscle Regeneration and Sarcoma Formation. *Cell reports* 33(12):108535.
- Leushacke M, Tan SH, Wong A, Swathi Y, Hajamohideen A, Tan LT, Goh J, Wong E, Denil S, Murakami K & Barker N (2017) Lgr5-expressing chief cells drive epithelial regeneration and cancer in the oxyntic stomach. *Nature Cell Biology* 19(7):774-786.
- Mou H, Vinarsky V, Tata PR, Brazauskas K, Choi SH, Crooke AK, Zhang B, Solomon GM, Turner B, Bihler H, Harrington J, Lapey A, Channick C, Keyes C, Freund A, Artandi S, Mense M, Rowe S, Engelhardt JF, Hsu YC & Rajagopal J (2016) Dual SMAD Signaling Inhibition Enables Long-Term Expansion of Diverse Epithelial Basal Cells. *Cell Stem Cell* 19(2):217-231.
- Park S, Wu L, Tu J, Yu W, Toh Y, Carmon KS & Liu QJ (2020) Unlike LGR4, LGR5 potentiates Wnt- β -catenin signaling without sequestering E3 ligases. *Science signaling* 2020 Dec 1;13(660):eaaz4051.
- Pastor-Soler N, Bagnis C, Sabolic I, Tyszkowski R, McKee M, Van Hoek A, Breton S & Brown D (2001) Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biology of Reproduction*. 65(2):384-393.
- Pietrement C, Sun-Wada GH, Silva ND, McKee M, Marshansky V, Brown D, Futai M & Breton S (2006) Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biology of Reproduction* 74(1):185-194.
- Pinel L & Cyr DG (2021) Self-renewal and differentiation of rat epididymal basal cells using a novel *in vitro* organoid model. *Biology of Reproduction* 105(4):987-1001.
- Plaks V, Brenot A, Lawson DA, Linnemann JR, Van Kappel EC, Wong KC, de Sauvage F, Klein OD & Werb Z (2013) Lgr5-expressing cells are sufficient and necessary for postnatal mammary gland organogenesis. *Cell reports* 3(1):70-78.

- Rinaldi VD, Donnard E, Gellatly KJ, Rasmussen M, Kucukural A, Yukselen O, Garber M, Sharma U & Rando OJ (2020) An atlas of cell types in the mammalian epididymis and vas deferens. *eLife*, 9, e55474.
- Schimming BC, Pinheiro P, de Matteis R, Machado CM & Domeniconi RF (2015) Immunolocalization of Aquaporins 1 and 9 in the Ram Efferent Ducts and Epididymis. *Reproduction in domestic animals* 50(4):617-624.
- Seishima R, Leung C, Yada S, Murad KBA, Tan LT, Hajamohideen A, Tan SH, Itoh H, Murakami K, Ishida Y, Nakamizo S, Yoshikawa Y, Wong E & Barker N (2019) Neonatal Wnt-dependent Lgr5 positive stem cells are essential for uterine gland development. *Nature communications* 10(1):5378.
- Sun EL & Flickinger CJ (1979) Development of Cell Types and of Regional Differences in the Postnatal Rat Epididymis. *American Journal of Anatomy*. 154:27-56.