Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Centre Armand-Frappier

ISOLEMENT DES CELLULES BASALES ÉPIDIDYMAIRES ET

CARACTÉRISATION DE NOUVELLES FONCTIONS

Par

Marion MANDON

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Dr Stéphane Lefrançois INRS-Institut Armand Frappier

Examinateur externe

Examinateur externe

Directeur de recherche

Dr Jacques Tremblay Université Laval

Dr Bruce Murphy Université de Montréal

Pr. Daniel G. Cyr INRS-Institut Armand Frappier

Manuscrit déposé le 18 août 2015

© Droits réservés de Marion Mandon, 2015

RESUME

L'épididyme joue un rôle important dans l'acquisition de la fertilité, en permettant aux spermatozoïdes d'acquérir mobilité et pouvoir fécondant lors de leur progression dans la lumière. Cette maturation ne peut se faire que grâce à un environnement spécifique qui garantit la protection des spermatozoïdes et est maintenu par la barrière hématoépididymaire. Cette barrière est formée de jonctions serrées entre les cellules de l'épithélium, et isole le compartiment luminal du compartiment basal.

Les cellules basales de l'épididyme sont localisées à la base de l'épithélium et possèdent des projections apicales minces régulées par des facteurs testiculaires, qui seraient capables de traverser la barrière hémato-épididymaire et d'atteindre la lumière du tubule, notamment au niveau des jonctions tripartites. En plus de la participation à la barrière hémato-épididymaire, il a été suggéré un rôle de détoxification, une fonction immunitaire et un rôle de régulation des fonctions d'autres cellules épithéliales. L'un des principaux obstacles à l'étude des cellules basales de l'épididyme est l'absence de protocole pour les isoler.

L'objectif principal de ce projet était de caractériser la participation des cellules basales à la barrière hémato-épididymaire via la jonction tricellulaire, et d'étudier les voies de signalisation pouvant être impliquées dans cette participation. Trois sous-objectifs étaient nécessaires : (1) Etudier l'expression et la localisation de la tricelluline dans l'épididyme et déterminer si les cellules basales participent à la barrière hémato-épididymaire par le biais de cette protéine. (2) Mettre au point une méthode pour isoler les cellules basales. (3) Etablir le profil d'expression génique des cellules basales afin de pouvoir étudier les gènes et voies de signalisation spécifiques à ces cellules.

Les résultats ont montré que la tricelluline était exprimée dans tous les segments de l'épididyme à des niveaux similaires, et que les niveaux de tricelluline augmentaient avec l'âge ; le marquage passe de cytoplasmique aux marges latérales de la membrane plasmique puis au niveau apical. La colocalisation de la tricelluline avec l'occludine a permis de vérifier que la tricelluline se situait bien au niveau des jonctions serrées. La colocalisation de la tricelluline de la tricelluline et d'un marqueur des cellules basales, la cytokératine 5 (ou KRT5), a démontré que la cellule basale ne participait pas à la jonction tricellulaire. Enfin, des expériences de knock-down par ARN interférent ont permis de montrer que la résistance transépithéliale décroît lorsqu'on inhibe l'expression de la tricelluline. On a également observé une diminution de l'expression d'autres protéines de jonction telles l'occludine, la claudine-1 et la claudine-3. D'autres protéines de jonction, comme ZO-1 et E-cadhérine, ne sont pas altérées. Nos résultats ont donc permis de démontrer le rôle de la tricelluline dans l'épididyme, et de montrer que les cellules basales n'étaient pas impliquées dans la jonction tricellulaire. Isoler les cellules basales était nécessaire pour étudier leurs fonctions.

Les différents protocoles retrouvés dans la littérature n'ont pas permis d'obtenir une population pure de cellules basales. Nous avons donc mis au point une méthode d'isolement par séparation magnétique basée sur l'intégrineα6. L'efficacité de cette séparation a été vérifiée par cytométrie en flux, immunofluorescence et PCR, prouvant un enrichissement de cellules basales d'environ 90%. De la microscopie électronique a permis de caractériser morphologiquement les cellules basales. Nous avons donc mis au point un protocole efficace et reproductible pour isoler les cellules basales, ce qui a permis d'effectuer ensuite leur profil d'expression génique.

A partir de l'ARN des différentes fractions obtenues par séparation magnétique, nous avons fait des expériences de microréseaux. Ces données ont permis de déterminer que 552 gènes, dont 45 avec un ratio de 5 fois ou plus, étaient enrichis dans les cellules basales par rapport aux autres cellules de l'épididyme. Ces gènes hautement exprimés ont été montrés comme codant pour des protéines impliquées entre autres dans l'adhésion cellulaire, le fonctionnement du cytosquelette, le transport d'ions, la signalisation cellulaire. Plusieurs gènes hautement exprimés ont été retrouvés dans des cellules progénitrices adultes, suggérant que les cellules basales pourraient représenter une population de cellules souches épididymaires. Ces fonctions de cellules souches dans l'épididyme ont été démontrées in vitro en cultivant les cellules basales pendant 14 jours, ce qui a permis de montrer une prolifération et une réorganisation des cellules basales ainsi que des modifications dans l'expression de certains marqueurs.

Les données obtenues dans ce travail de thèse permettent donc de montrer que (1) les cellules basales épididymaires ne sont pas impliquées dans la jonction serrée tricellulaire. (2) La séparation magnétique par l'intégrine- α 6 est une méthode reproductible et efficace pour isoler les cellules basales. (3) Le premier profil d'expression génique des cellules basales épididymaires de rat ainsi que le développement d'une méthode de culture de ces cellules suggèrent fortement que ces cellules pourraient agir comme des cellules progénitrices multipotentes de l'épithélium épididymaire.

<u>Mots-clefs</u> : appareil reproducteur mâle ; épididyme ; cellules basales ; barrière hématoépididymaire ; tricelluline ; isolement cellulaire ; cellules progénitrices.

ABSTRACT

The epididymis plays a critical role in fertilization by enabling spermatozoa to acquire motility and fertilization ability as they transit through the lumen. This maturation is accomplished by a specific luminal microenvironment in the epididymis, which protect spermatozoa from immune attack and which is maintained by the blood-epididymis barrier. This barrier is formed by tight junctions between epithelial cells, and partitions the epithelium into luminal and basal compartments.

Basal cells are epididymal epithelial cells localized at the base of the epithelium. They typically display thin apical projections, regulated by testicular factors, which may extend through the blood-epididymis barrier at tricellular junctions. While some epithelial cells have been well studied, basal cells are relatively unknown. In addition to participation in the blood-epididymis barrier, several other roles have been suggested, including detoxification, immune function, and regulation of other epithelial cell functions, either directly via apical projection or indirectly, via hormone synthesis, such as prostaglandins. One of principal difficulties limiting the study of basal cells is the absence of a valid isolation protocol.

The objective of this project was to characterize the participation of basal cells in the blood-epididymis barrier through tricellular tight junctions, and to study the pathways implicated in this participation. This objective was divided into three parts : (1) To study the expression and localization of tricellulin in the epididymis, and determine if basal cells participate in the blood-epididymis barrier through this protein. (2) To establish a reliable and reproducible method to isolate epididymal basal cells. (3) To establish the gene expression profile of epididymal basal cells and predict genes and pathways implicated in these cells.

Localization of tricellulin was studied in the adult rat epididymis as well as at various stages of postnatal development, by immunofluorescence. Protein localization changed during postnatal development from cytoplasmic to membrane-bound as a function of age. Tricellulin protein expression in the adult and during postnatal development was assessed by Western-blot. In addition, co-localization studies between tricellulin and occludin were conducted in order to verify the localization of tricellulin at tight junctions. Participation of basal cells in tricellular junctions was confirmed by co-localization between tricellulin and cytokeratin 5, a marker of basal cells. Finally, knockdown of tricellulin was achieved using small interfering RNA (siRNA) in our rat caput epididymal principal cell line. These experiments demonstrated a decrease of transepithelial resistance, which was correlated with decreased levels of claudin-1, claudin-3 and occludin. Zonula occludens 1 and cadherin1 levels were unchanged. Our results therefore demonstrate the role of tricellulin in epididymis, and show that basal cells are not necessarily involved in tricellular tight junction.

In order to elucidate basal cell functions, it was necessary to develop a reproducible protocol for the isolation of highly purified basal cells. Various isolation protocols reported previously in the literature (density gradients or magnetic separation) have not yielded a sufficiently pure population of basal cells. We have developed a new method, based on magnetic separation of basal cells using integrin- α 6 as a basal cell marker. The efficiency of this method was verified by flow cytometry, immunofluorescence and RT-PCR, all of which indicated a purity of the isolated basal cell fraction as close to 90%. Electron microscopy was also performed, in order to further characterize epididymal basal cell morphology. We are therefore satisfied that we have achieved an efficient and reproducible protocol to isolate epididymal basal cells, which has permitted us to elaborate basal cell morphology and further characterize their properties.

Using mRNA extracted from the different fractions obtained by magnetic separation (positive or basal cell, and negative or non-basal cell fractions), we performed microarray experiments. These data demonstrated that 552 genes were differentially expressed. Of these, 45 exhibited a ratio of 5 or more fold-change and were enriched in basal cells. These highly expressed genes coded for proteins implicated in cell adhesion, the cytoskeleton, ion transport, and cell signaling. Several genes were also implicated in progenitor functions, suggesting that basal cells may act as stem cells in the epididymis. In other tissues such as prostate or trachea, basal cells can be the origin of other cell types. We demonstrated that basal cells shared some of the features of multipotent stem cells by culturing isolated epididymal basal cells for 14 days. We observed a proliferation and a reorganization of basal cells, as well as modifications in cytokeratins expression.

All the data generated for this thesis show : (1) Epididymal basal cells are not implicated in tricellular junctions. (2) The development of a reproducible method to isolate a highly purified fraction of basal cells. (3) The first gene expression profile of rat epididymal basal cells. (4) The characterization of epididymal basal cells, which suggests that they may possess a progenitor function for epididymal epithelial cells.

<u>Keywords</u> : Male reproductive tract ; epididymis ; basal cells ; blood-epididymis barrier ; tricellulin ; cell isolation ; progenitor cells.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Daniel G. Cyr, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour mon doctorat, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce projet, ainsi que pour sa disponibilité, son encadrement et pour m'avoir toujours poussée à m'améliorer et à acquérir l'autonomie nécessaire.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour le temps consacré à l'évaluation de cette thèse.

Merci à Julie pour son aide dans le laboratoire, ses conseils judicieux, et ses explications, notamment en génomique. Merci également à Mary pour son aide, ses suggestions, surtout dans mon apprentissage en immunomarquage.

Je remercie Jessy Tremblay pour ses judicieux conseils et son expertise en microscopie confocale qui m'ont permis d'être autonome. Merci à Marlène Fortier pour l'aide en cytométrie en flux qu'elle m'a apportée. Merci également à Christophe Gonçalves pour son aide dans les données de microréseaux.

Je remercie également chaleureusement Géraldine Delbès et Isabelle Plante pour les conseils qu'elles ont eu la gentillesse de m'apporter au cours de mon doctorat.

Merci aux étudiants que j'ai côtoyés pendant ces quatre années au laboratoire et à l'institut.

Merci également à ma famille adoptive du Québec. Matt, Val, Florian, Elodie, Matthieu et Christine, Will, Audrey, Arnaud, Cécile, Ronan, Soizic, Lydie, David, Juliette, John, Christophe, Romain, Thibault, Laure, Elise, merci à vous pour m'avoir accueillie ici, tous les bons moments partagés et le soutien que vous m'avez apporté !

Merci aux amis éparpillés sur plusieurs continents pour être restés présents malgré mon expatriation. Une pensée particulière pour Jérôme pour sa présence, son soutien dans les bons et moins bons jours et les échanges quotidiens ou presque, même avec l'Atlantique au milieu. Laurie même si on s'est peu croisées ces dernières années, merci pour tes pensées et tes encouragements et pour l'intérêt montré à mon travail. Marc, merci de m'avoir permis d'envisager l'expatriation avec sérénité... On devrait se retrouver un peu plus proche que 14 000 km dans quelques temps. Marion, merci pour ton aide et tes conseils.

Enfin, merci à mes parents pour leurs encouragements et leur soutien dans mon projet un peu fou de changement de carrière et de pays, et à mon frère Bastien qui du coup aura pris exemple sur sa sœur dans ses choix de carrière.

TABLE DES MATIERES

RESUMEv
ABSTRACTvii
REMERCIEMENTS ix
TABLE DES MATIERES xi
LISTE DES ABREVIATIONS xvii
LISTE DES FIGURES xix
LISTE DES TABLES ET TABLEAUX xxi
INTRODUCTION
REVUE DE LA LITTERATURE
1. L'épididyme7
1.1. Structure de l'épididyme
1.2. Fonctions de l'epididyme
1.2.1. Transport des spermatozoïdes
1.2.2. Maintien et protection des spermatozoïdes
1.2.3. Maturation
1.2.4. Entreposage
1.3. L'épithélium épididymaire 11
1.3.1. Rôle de l'épithélium11
1.3.2. Composition
1.3.2.1. Cellules principales11
1.3.2.2. Cellules basales
1.3.2.3. Cellules claires
1.3.2.4. Cellules halo14
1325 Cellules átroites 14
1.5.2.5. Cellules ellolles

	1.3.2.7. Cellules dendritiques	15
	1.4. Développement de l'épididyme chez le rat	16
	1.5. Régulation des fonctions de l'épididyme	19
	1.5.1. La régulation hormonale	19
	1.5.1.1. Régulation par les androgènes	19
	1.5.1.2. La régulation par les œstrogènes	20
	1.5.1.3. La régulation par les hormones thyroïdiennes	22
	1.5.2. Les voies de signalisation impliquées dans les fonctions de l'épididyme	23
	1.5.2.1. La voie de signalisation Wnt	23
	1.5.2.2. Les voies de signalisation ERK et AKT	23
2.	Les jonctions cellulaires dans l'épididyme	24
	2.1. Les jonctions serrées et la barrière hémato-épididymaire	24
	2.1.1. Structure de la barrière hémato-épididymaire	24
	2.1.2. Formation de la barrière hémato-épididymaire	25
	2.1.3. Fonctions de la barrière hémato-épididymaire	25
	2.1.4. Composition de la barrière hémato-épididymaire	26
	2.1.4.1. Occludine	26
	2.1.4.2. Claudines	28
	2.1.4.3. Les protéines zonula occludens (ZOs)	29
	2.1.4.4. Les protéines JAMs (Junction Adhesion Molecules)	30
	2.1.5. Un type particulier de jonction serrée : la jonction tricellulaire 2.1.5.1. Organisation de la jonction tricellulaire	32 32
	2.1.5.2. La tricelluline	33
	2.1.6. Régulation de la formation et du maintien des jonctions serrées 2.2. Les jonctions lacunaires	34 36
	2.3. La jonction adhérente	38
	2.4. Relations entre les jonctions	40
3.	Les cellules basales	41
	3.1. Structure des cellules basales	41

3.1.1.	Morphologie générale	41
3.1.2.	Ultrastructure en microscopie électronique	41
3.2.1.	Théories sur l'origine des cellules basales	42
3.2.2.	Différenciation : rôle de p63	43
3.3. Ré	gulation hormonale des cellules basales	44
3.4. Rô	les proposés	45
3.4.1.	Immunitaire	45
3.4.2.	Protection contre le stress oxydant	46
3.4.3.	Modulation des fonctions épithéliales épididymaires	46
3.4.3	3.1. Communication intercellulaire : les jonctions Gap dans les ce	llules
basa	ales	46
3.4.3	3.2. Régulation des fonctions des cellules principales et des cellules c	laires
		47
3.4.4.	Participation à la barrière hémato-épididymaire par le biais de la trice	lluline 48
3.4.5.	Les cellules basales comme cellules progénitrices	49
3.5. Un	e limitation à l'étude des cellules basales : leur isolement	49
3.5.1.	Isolement des cellules basales par gradients de densité	49
3.5.2.	Isolement des cellules basales par séparation magnétique	50
3.6. Le	s cellules basales dans d'autres tissus	50
3.6.1.	Les cellules basales de la prostate	51
3.6.2.	Les cellules basales de la trachée	53
3.6.3.	Les cellules basales de la glande mammaire	54
3.6.4.	Caractéristiques communes aux cellules basales des autres tissus	56
DEUXIEME F	PARTIE	59
ARTICLES		59
TRICELLULI	N AND ITS ROLE IN THE EPIDIDYMAL EPITHELIUM OF THE RAT	61
1.1. Ré	sumé de l'article en français	61
1.2. Co	ntribution des auteurs	62

ISOL	ATEC	D RAT EPIDIDYMAL BASAL CELLS SHARE COMMON PROPERT	IES WITH
ADUI	LT ST	TEM CELLS	91
2	2.1. R	Résumé français de l'article	91
2	2.2. C	Contribution de l'étudiante	92
DISC	USSI	ION ET CONCLUSIONS	145
DISC	USSI	ION	147
1.	Isole	lement des cellules basales	147
1	I.1. I	Méthode de séparation par densité : gradients de Percoll	148
1	I.2. I	Isolement par séparation magnétique (MACS)	149
	1.2.	2.1. Trpc3	149
	1.2.	2.2. CD-44	150
	1.2.	2.3. ITGA6	150
	1.2. cellu	2.4. Comparaison de l'efficacité des différentes méthodes d'isole lules basales épididymaires	ment des 151
2.	Cara	actéristiques des cellules basales épididymaires	151
2	2.1. I	Les cellules basales et la participation à la barrière hémato-épic	lidymaire
			152
2	2.2. I	Les cellules basales comme cellules progénitrices garantes de	l'état de
ľ	'épith	hélium	153
	2.2.	2.1. Ancien modèle de la régulation des cellules claires par les cellule	s basales 153
	2.2.	2.2. Nouveau modèle de la fonction progénitrice des cellules basales	s 155
3.	Com	nparaison des cellules basales dans les différents tissus	158
3	3.1. (Caractéristiques communes aux cellules basales	160
	3.1.	.1. Les cellules basales comme cellules progénitrices	160
	3.1.	.2. La voie de signalisation Wnt	161
3	3.2.	Spécificités des cellules basales de l'épididyme	162

3.3. Existence de sous-populations de cellules basales	164
CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES	166
BIBLIOGRAPHIE	168
ANNEXE	211

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ABP	androgen binding protein
ACE	angiotensin-converting enzyme
ARNm	acide ribonucléique messager
AGTR2	angiotensin II receptor type 2
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
BrDU	Bromodéoxyuridine
BSA	bovine serum albumine
CDH	Cadhérine
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CREB	c-AMP response element binding protein
DHT	Dihydrotestostérone
E-cad	cadhérine épithéliale ou cadhérine 1
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	estrogen receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FHCE1	fertile human caput epididymis 1
GMPc	guanosine monosphosphate cyclique
GPER	G-protein coupled estrogen receptor
GST	glutathion-S-transférase
IGFR1	insulin-like growth factor receptor type 1
ILDR	immunoglobulin-like domain-containing receptor
ITGA6	intégrine-α6
JAM	junctional adhesion molecule

KRT	cytokératine
LSR	lipolysis-stimulated lipoprotein receptor
MDCK	madin-darby canine kidney
N-cad	cadhérine neurale ou cadhérine 2
P-cad	cadhérine placentaire ou cadhérine 3
PCR	polymerase chain reaction
PDZ	postsynaptic density/discs large/zonula occludens
PGE2	prostaglandine E2
PI3K	phosphatidyl inositol-3 phosphate
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTU	Propylthiouracile
SOD	superoxyde dismutase
SRC	steroid receptor coactivator
Т3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TAMPs	tight junction associated marvel proteins
TER	résistance électrique transépithéliale
TJP	tight junction protein
ZO	zonula occludens
μ	Micro

LISTE DES FIGURES

Première partie : Revue de la littérature

Figure 1	Schéma d'un épididyme de rat	6
Figure 2	Représentation de l'épithélium épididymaire	14
Figure 3	Frise de développement de l'épididyme chez le rat	16
Figure 4	Schéma de la composition d'une jonction serrée bicellulaire	29
Figure 5	Schéma d'une jonction serrée tricellulaire	30
Figure 6	Schéma d'une jonction lacunaire	35

Deuxième partie, article 1 : Tricellulin and its role in the epididymal epithelium of the rat

Figure 1	Expression et localisation de la tricelluline chez le rat adulte	72
Figure 2	Expression de la tricelluline au cours du développement	74
Figure 3	Localisation de la tricelluline au cours du développement	75
Figure 4	Colocalisation de la tricelluline et de l'occludine chez l'adulte	77
Figure 5	Colocalisation en vue Ortho de la tricelluline et de l'occludine	78
Figure 6	Colocalisation de la tricelluline et de Krt5	79
Figure 7	Rôle de la tricelluline dans la jonction serrée épididymaire	81
Figure 8	Effet de la diminution de la tricelluline sur d'autres protéines	
	de jonctions dans des cellules RCE	82

Deuxième partie, article 2 : Isolation and characterization of epididymal basal cells : are these the epididymal stem cells ?

Figure 1	Immunolocalisation de ITGA6 dans l'épididyme à 48 jours	107
Figure 2	Isolement des cellules basales par MACS avec itga6	109
Figure 3	Identification des gènes enrichis dans les cellules basales	113
Figure 4	Gènes enrichis dans les cellules basales et impliqués dans	
	les jonctions lacunaires, la synthèse des prostaglandines	
	et les cellules progénitrices	117
Figure 5	Localisation de Krt5, Krt8 et Cx26 dans les cellules basales	
	en culture	121
Figure S1	Immunolocalization of ITGA6 in the different regions of the	
	epididymis of a 90 day-old adult rat.	141
Figure S2	Immunolocalization of PTGS1 in the different regions of the	
	epididymis in 48-days old rat	142
Figure S3	Colocalization of ITGA6 (red) and PTGS1 (green) in the different	
	regions of the epididymis	143

Troisième partie : Discussion et conclusions

Figure 1	Modèle de régulation de la fonction des cellules claires par	
	les cellules basales	154
Figure 2	Modèle de différenciation des cellules basales épididymaires	157
Figure 3	Gènes en commun entre les cellules basales de l'épididyme	
	et d'autres épithéliums pseudostratifiés	160

ANNEXE

Figure 1	Comparaison des résultats de microréseaux et de PCR	210
----------	---	-----

LISTE DES TABLES ET TABLEAUX

Deuxième partie, article 2 : Isolation and characterization of epididymal basal cells : are these epididymal stem cells?

Table 1	Gènes enrichis dans les cellules basales avec un ratio ≥ 5	137
Table 2	Expression dans les cellules basales isolées de gènes	
	précédemment décrits dans les cellules basales	139
Table 3	Gènes enrichis dans les cellules basales sous le contrôle	
	de p63	140

Troisième partie : Discussion et conclusions

Tableau 1	Efficacité des différentes méthodes utilisées pour isoler les	
	cellules basales	151
Tableau 2	Gènes communs entre les différentes cellules basales	159

INTRODUCTION

L'épididyme est un organe qui joue un rôle essentiel dans la capacité de reproduction mâle. C'est en effet le lieu où a lieu la maturation des spermatozoïdes, leur permettant d'acquérir leur motilité et leur pouvoir fécondant (Cooper, 1998). Cette maturation est permise grâce au milieu spécifique hautement régulé qui se trouve dans la lumière. Ce milieu est créé notamment par la barrière hémato-épididymaire, composée de jonctions serrées entre les cellules épithéliales adjacentes qui bordent la lumière. Chez le rat, ces jonctions sont formées pendant le développement embryonnaire et deviennent imperméables durant le développement postnatal (Suzuki and Nagano, 1978). Les jonctions serrées de l'épididyme sont composées de plusieurs protéines, dont l'occludine et les claudines (Cyr et al., 2002; Dube and Cyr, 2012). Les claudines sont notamment essentielles, des études ayant montré que la perte d'une seule claudine peut compromettre la barrière hémato-épididymaire (Dube et al., 2010). L'expression et la localisation des claudines varient également selon le développement (Cyr et al., 2007). En plus des jonctions serrées bicellulaires, il a été montré que les cellules peuvent former des jonctions tricellulaires, et que ces types de jonctions sont formés d'une protéine spécifique, la tricelluline (Ikenouchi et al., 2005).

L'épithélium épididymaire est composé de plusieurs types cellulaires : les cellules principales, basales, claires, étroites, apicales et dendritiques. Les cellules basales représentent environ 20% des cellules de l'épithélium et possèdent des projections latérales et apicales (Shum et al., 2008; Veri et al., 1993). Ces projections sont régulées par des facteurs testiculaires (Kim et al., 2015) et il a été suggéré que les projections apicales sont capables de traverser la barrière hémato-épididymaire et d'atteindre la lumière, notamment au niveau des jonctions tricellulaires (Shum et al., 2008). Cependant, la tricelluline n'a jamais été étudiée dans l'épididyme.

1

Le rôle des cellules basales est encore mal connu à l'heure actuelle. En plus de la participation des cellules basales à la barrière hémato-épididymaire via la jonction tricellulaire, les cellules basales expriment également la claudine-1 ; il a été montré que cette claudine n'est pas uniquement localisée au niveau de la jonction serrée dans l'épididyme (Gregory et al., 2001). De plus, la connexine 43, une protéine de jonction lacunaire, est retrouvée entre les cellules basales et principales dans l'épididyme (Cyr et al., 1996). L'expression de ces protéines de jonctions suggère un rôle des cellules basales dans les interactions cellulaires.

Il a également été proposé un rôle dans le métabolisme des radicaux libres permettant de lutter contre le stress oxydant (Hermo and Papp, 1996; Nonogaki et al., 1992), ainsi qu'un rôle immunitaire, basé sur la morphologie des cellules basales semblable à celle des macrophages (Yeung et al., 1994). Cependant, la découverte récente d'un type de cellules immunitaires, les cellules dendritiques, au sein de l'épithélium, est venue controverser cette dernière hypothèse (Da Silva et al., 2011). Enfin, il a été proposé que les cellules basales permettent la régulation des fonctions d'autres cellules épithéliales. Shum et al. (2011) ont suggéré que les cellules basales, par le biais de leurs projections apicales, sont capables de capter le pH de l'environnement luminal et d'agir sur l'acidification via les cellules claires. Les cellules basales agissent également sur les cellules principales via la synthèse de prostaglandines (Cheung et al., 2005; Leung et al., 2004).

Il faut noter que les cellules basales ne sont pas une caractéristique unique de l'épididyme, mais sont également présentes dans d'autres épithéliums stratifiés (tels que l'épiderme) et pseudostratifiés (tels que la prostate, la trachée, et la glande mammaire) (Breeze and Wheeldon, 1977; Robinson et al., 1998; Stingl et al., 2006b). A la différence de l'épididyme, elles sont relativement bien connues dans la prostate, la glande mammaire et la trachée et ont des rôles similaires au sein de ces tissus ; ces cellules sont notamment des régulateurs de l'homéostasie et présentent également des fonctions progénitrices, pouvant induire la différenciation en d'autres types cellulaires afin de régénérer l'épithélium (Ford and Terzaghi-Howe, 1992; Robinson et al., 1998; Woodward

et al., 2005). Cette capacité a également été associée au développement de cancer au sein de ces épithéliums (Ribeiro-Silva et al., 2005; Rock et al., 2010; Wang et al., 2013b).

L'un des principaux obstacles à l'étude des cellules basales dans l'épididyme est d'obtenir une population pure de cellules basales. Plusieurs études ont présenté des modèles de purification des cellules basales via différentes techniques (Cheung et al., 2005; Finaz et al., 1991; Killian et al., 1976; Klinefelter and Amann, 1980). Cependant, l'absence de marqueurs spécifiques des cellules basales n'a pas permis de valider ces modèles.

L'hypothèse de ce projet était que les cellules basales jouent un rôle important dans l'épididyme, notamment via la tricelluline, et que certaines voies de signalisation spécifiques sont actives dans ces cellules. L'objectif principal de cette étude était donc d'isoler et de caractériser les cellules basales et d'identifier le profil d'expression génique et les voies de signalisation. Cet objectif comportait trois volets : (1) Déterminer si la cellule basale participe à la jonction tricellulaire. (2) Mettre au point une technique pour isoler les cellules basales. (3) Déterminer le profil d'expression génique des cellules basales pour comprendre leur rôle dans l'épididyme.

A travers une revue de la littérature, la première partie de cette thèse présente l'état des connaissances actuelles sur les grands thèmes de ce projet. La première section présente la structure et les fonctions de l'épididyme, l'épithélium épididymaire et son développement. La deuxième section présente la barrière hémato-épididymaire et les jonctions cellulaires de cet épithélium. La troisième section fait le point sur les connaissances sur les cellules basales.

La deuxième partie de cette thèse est composée de deux manuscrits rédigés à partir des résultats obtenus au cours de ce travail. Ces deux articles ont été publiés dans la revue «Biology of Reproduction».

Enfin, la troisième partie est composée d'une discussion générale sur ce projet. La contribution de ce travail aux connaissances sur les cellules basales de l'épididyme est également ajoutée.

3

PREMIERE PARTIE

REVUE DE LA LITTERATURE

1. L'épididyme

L'épididyme est l'organe responsable du transport, de la maturation, de la protection et de l'entreposage des spermatozoïdes à l'état latent. Il est situé sur la partie dorso-latérale du testicule. A la sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont en effet pas matures, c'est le transit à travers l'épididyme qui leur permet d'acquérir leur motilité et leur pouvoir fécondant.



<u>Figure 1 : Testicule et épididyme</u>. L'épididyme est accolé au testicule, sur sa partie dorsolatérale, et relié à lui par les canaux efférents. Adapté de Swisher et al., 2010.

1.1. Structure de l'épididyme

L'épididyme est constitué d'un long tubule unique et contourné, reliant les canaux efférents et déférents, qui peut mesurer de quelques mètres à 80 mètres selon les espèces. L'épididyme est constitué de deux compartiments : l'épithélium, bordé de cellules musculaires lisses, et la lumière. Chez la plupart des espèces, y compris le rat, il est généralement divisé en 4 segments anatomiques : le segment initial, la tête (caput), le corps (corpus) et la queue (cauda) (Robaire and Hinton, 2002) (figure 1). Cependant, l'observation de la morphologie par microscopie optique et électronique a permis de montrer que chez l'humain, il n'existe pas de segment initial (Yeung et al., 1991). Ce sont les canaux efférents qui semblent avoir les fonctions du segment initial. Des études de microdissection chez le rat et la souris ont identifié jusqu'à 19 segments différents (Jelinsky et al., 2007; Johnston et al., 2005). Ces segments intrarégionaux sont formés de lobules de canal épididymaire bordés par un septum de tissu conjonctif (Turner et al., 2003). Chaque région possède des types cellulaires distincts et répartis de façon hétérogène. Enfin, l'épaisseur de l'épithélium décroît le long de l'épididyme.

1.2. Fonctions de l'épididyme

L'épididyme possède un rôle important dans l'acquisition de la fertilité masculine ; ses fonctions principales sont le transport des spermatozoïdes, leur maintien et leur protection, leur maturation et leur entreposage avant éjaculation.

1.2.1. Transport des spermatozoïdes

Le temps de transport des spermatozoïdes à travers l'épididyme est variable selon les espèces. Il prend en moyenne entre 9 et 13 jours chez la plupart des espèces (Robaire and Hinton, 2002) et représente environ 8 à 9 jours chez le rat (Robb et al., 1978). A la sortie du testicule, les spermatozoïdes sont immobiles et ne sont pas capables de se déplacer seuls dans la lumière du tubule épididymaire. Leur transport est donc assuré par l'activité péristaltique du tubule due aux fibres musculaires lisses qui l'entourent, ainsi que par la pression hydrostatique intraluminale. Cette activité musculaire spontanée est augmentée par l'action de fibres nerveuses et d'hormones telles que la vasopressine, l'angiotensine et l'ocytocine provenant de la circulation sanguine (Robaire and Hinton, 2002).

1.2.2. Maintien et protection des spermatozoïdes

L'environnement luminal est indispensable à la survie et à la maturation des spermatozoïdes. Le fluide intraluminal épididymaire provient majoritairement du liquide testiculaire venant du rete testis (Clulow et al., 1994), du transport sélectif des constituants sériques (Cyr et al., 1995) et de la sécrétion de molécules par les cellules de l'épithélium épididymaire. La composition du liquide luminal varie le long de l'épididyme ; les fonctions d'absorption et de sécrétion de cet organe permettent en effet la sécrétion de protéines de façon région-dépendante au sein de l'épididyme (Dacheux et al., 2003).

De plus, le gamète mâle est facilement vulnérable aux cellules immunitaires. La barrière hémato-épididymaire de l'épithélium permet de le protéger en l'isolant du système immunitaire (Gregory and Cyr, 2014).

1.2.3. Maturation

Le passage des spermatozoïdes à travers l'épididyme va leur permettre d'acquérir graduellement leur capacité de fécondation ainsi que leur mobilité.

La durée de la maturation et le site d'acquisition du pouvoir fécondant varient d'une espèce à l'autre (Cooper et al., 2008). La capacité de fécondation des spermatozoïdes dépend de plusieurs protéines fixées à l'acrosome des gamètes ; l'interaction avec les protéines du fluide séminal épididymaire leur permettent d'acquérir les éléments nécessaires au pouvoir fécondant (Cooper, 1998).

Les gamètes sont de plus incapables de se déplacer seuls jusqu'au corps de l'épididyme, où les premiers spermatozoïdes mobiles sont observés (Yeung and Cooper,

2003). Cette capacité de mouvement est due à des modifications des organites cellulaires et de la membrane plasmique des spermatozoïdes. L'un des principaux changements morphologiques observés est la disparition de la gouttelette cytoplasmique, présente à l'arrière de leur tête, qui migre le long de la pièce intermédiaire durant le passage dans la partie proximale de l'épididyme (Cooper, 2005). On peut également citer la mise en place de l'hélice mitochondriale et de la forme définitive de l'acrosome (Robaire and Hinton, 2002).

De plus, la capacité de fécondation dépend également de la capacité du spermatozoïde à se fixer au niveau de la zone pellucide de l'ovocyte, ce qui dépend de la présence de protéines spécifiques au niveau de l'acrosome. Ce sont les interactions avec les sécrétions épididymaires qui permettent l'acquisition de nouvelles protéines (Cooper, 1998).

1.2.4. Entreposage

Les spermatozoïdes qui parviennent à la queue de l'épididyme sont donc motiles et capables de féconder l'ovocyte. Ils ont alors entreposés dans cette région de l'épididyme jusqu'à être éjaculés.

Une fois mobiles et matures, les spermatozoïdes sont maintenus dans un état métabolique latent, ce qui leur permet d'être viables un certain temps. Le stockage des spermatozoïdes dans cet état se fait grâce à différents facteurs tels qu'un pH bas, de faibles taux d'ions HCO₃⁻, Na₂⁺ et Ca₂⁺, un taux élevé d'ions K⁺ et des facteurs inhibant la motilité, notamment l'immobiline (Kirichok et al., 2006; Navarro et al., 2007). De plus, le nombre de spermatozoïdes élevés dans la queue de l'épididyme permet d'empêcher leur activation trop précoce (Axner, 2006; Fraser et al., 1993).

1.3. L'épithélium épididymaire

1.3.1. Rôle de l'épithélium

L'épithélium de l'épididyme joue un rôle essentiel dans la composition du fluide séminal. En effet, il est responsable de la réabsorption de liquide et de molécules dans la partie proximale de l'épididyme, ce qui permet d'augmenter la concentration en spermatozoïdes dès le début de l'épididyme (Robaire and Viger, 1995). L'épithélium sécrète également des ions et des protéines et est responsable de l'endocytose d'autres molécules (Hermo et al., 1994a), ce qui permet de créer un environnement spécifique pour la maturation des spermatozoïdes (Wong et al., 2002).

1.3.2. Composition

L'épithélium de l'épididyme est un épithélium pseudostratifié de type cylindrique, entouré de cellules musculaires lisses appelées cellules myoïdes. Plusieurs types cellulaires se retrouvent dans l'épithélium de l'épididyme. Chaque type cellulaire est retrouvé dans l'épithélium selon une distribution région-dépendante (figure 2).

1.3.2.1. Cellules principales

Les cellules principales représentent le type majoritaire des cellules épithéliales de l'épididyme, soit entre 65 et 80%. Leur structure varie selon la région de l'épididyme mais ont une forme allongée avec des microvillosités au pôle apical et possèdent des organites très développés tel que le Golgi ou le réticulum endoplasmique, suggérant une forte activité sécrétoire (Vendrely and Dadoune, 1988). Elles sont également impliquées dans l'absorption (Hermo and Robaire, 2002).

Les cellules principales expriment notamment l'aquaporine 9 (Badran and Hermo, 2002; Pastor-Soler et al., 2001). L'aquaporine 9 appartient à la famille des aquaporines

qui sont des canaux membranaires permettant le passage de l'eau. Outre le fait que cette aquaporine soit particulièrement enrichie dans les cellules principales (Hermo et al., 2008), elle est également exprimée selon un schéma région-dépendant (Badran and Hermo, 2002). Dans l'épididyme, elle permettrait la réabsorption du fluide luminal et serait régulée par les androgènes (Pastor-Soler et al., 2002). Dans le segment initial, les cellules principales sont également responsables de la réabsorption des bicarbonates HCO₃⁻ (Pastor-Soler et al., 2009).

Les cellules principales participent à la sécrétion de nombreuses protéines, surtout dans la partie proximale de l'épididyme (Dacheux et al., 2003). Cependant, quelques protéines spécifiques représentent la majorité des produits sécrétés. Les produits de sécrétion ne sont pas les mêmes chez toutes les espèces. Chez le rat, la clusterine, la protéine épididymaire liée à l'acide rétinoïque (re-RABP) et la protéine de sécrétion riche en cystéine (Crisp-1) sont les plus abondamment sécrétées (Dacheux and Dacheux, 2002). Chez les mammifères, Crisp-1 a pour rôle de supprimer la capacitation des spermatozoïdes et joue également un rôle dans la fusion de l'ovocyte et du spermatozoïde (Roberts et al., 2007). La clusterine joue un rôle dans le remodelage de la membrane plasmique lors de la maturation des spermatozoïdes. Elle a été montrée comme étant liée aux spermatozoïdes de morphologie anormale, et associée à une infertilité ; cependant, chez l'humain, une autre forme de clusterine a été découverte ultérieurement, qui serait impliquée dans la protection des spermatozoïdes contre le stress oxydant et qui aurait une activité anti-bactérienne (Han et al., 2012). Re-RABP se lie aux molécules hydrophobes et notamment à l'acide rétinoïque, indispensable à l'intégrité de l'épithélium (Orgebin-Crist et al., 2002).

Une communication existe entre les cellules principales, les cellules claires et les cellules basales. Cette communication est détaillée au paragraphe sur les cellules claires et le chapitre sur les cellules basales de cette revue de littérature.

1.3.2.2. Cellules basales

Les cellules basales adhèrent à la membrane basale. On les retrouve dans toutes les régions de l'épididyme. Les caractéristiques de ces cellules sont détaillées au chapitre 3 de cette revue de littérature.

1.3.2.3. Cellules claires

Les cellules claires sont situées dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme, et absentes dans le segment initial. Elles sont plus nombreuses dans la partie distale de l'épididyme et contiennent de nombreuses vésicules dans la région apicale, des lysosomes et des endosomes ainsi que des gouttelettes lipidiques (Robaire and Viger, 1995), ce qui suggère une fonction d'élimination active du matériel depuis la lumière épididymaire. Elles jouent également un rôle dans l'acidification du fluide luminal (Shum et al., 2009).

L'acidification du milieu intraluminal est essentielle au maintien des spermatozoïdes à un stade quiescent pendant leur maturation (Pastor-Soler et al., 2005). Excepté dans le segment initial, ce sont principalement les cellules claires, qui expriment la V-ATPase (Da Silva et al., 2007), qui sont impliquées dans le maintien d'un pH bas. La V-ATPase est une enzyme ubiquitaire agissant comme une pompe à protons et composée de plusieurs sous-unités. Les sous-unités A, B1, B2, C1, C2, G1, G3, E, a1, a4, d1 et d2 sont exprimées dans l'épididyme et les sous-unités A, B1, a4 et E2 sont particulièrement enrichies dans les cellules claires et dans les cellules étroites (Da Silva et al., 2006).

Un modèle présente une communication entre cellules claires et cellules principales pour réguler l'acidification du milieu intraluminal. Dans ce modèle, la sécrétion de bicarbonates HCO₃⁻ via le canal CFTR par les cellules principales entraîne une augmentation du pH du fluide luminal. Cette élévation du pH a pour conséquence une accumulation de V-ATPase dans les cellules claires (Pastor-Soler et al., 2003), ce qui

permet d'augmenter la sécrétion d'ions H⁺ et donc de maintenir l'acidité du milieu (Shum et al., 2011).

Il existe également une communication entre les cellules claires et les cellules basales de l'épididyme. Cette communication est détaillée au chapitre 3 de cette revue de littérature.

1.3.2.4. Cellules halo

Elles sont présentes tout au long de l'épididyme et sont situées à la base de l'épithélium (Robaire and Hinton, 2002). Ces cellules sont riches en mitochondries, en granules denses et en vésicules apicales (Hermo and Robaire, 2002). Il est établi que ces cellules correspondent à différents types de cellules immunitaires : les lymphocytes T et les monocytes (Serre and Robaire, 1999).

1.3.2.5. Cellules étroites

Les cellules étroites étaient auparavant regroupées avec les cellules apicales sous l'appellation cellules gobelet ; des études ont ensuite différencié les deux types cellulaires (Abou-Haila and Fain-Maurel, 1984). Les cellules étroites sont présentes uniquement dans le segment initial (Adamali and Hermo, 1996). Ces cellules possèdent de minces projections de cytoplasme qui atteignent la lame basale. Elles possèdent des vésicules impliquées dans l'endocytose, et auraient également un rôle d'acidification (Hermo and Robaire, 2002).

1.3.2.6. Cellules apicales

Les cellules apicales se retrouvent dans tout l'épididyme mais sont majoritaires au niveau du segment initial (Adamali and Hermo, 1996). Ces cellules jouent un rôle dans l'acidification du fluide intra-luminal et dans des fonctions d'absorption et sécrétion (Martinez-Garcia et al., 1995).
1.3.2.7. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques épididymaires ont été découvertes en 2011 (Da Silva et al., 2011). Ces cellules possèdent des marqueurs leucocytaires et réguleraient le système immunitaire au niveau de l'épididyme.

Dans d'autres tissus, les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes qui permettent la régulation de la réponse immunitaire (Helft et al., 2010; Steinman, 2007). Dans le système reproducteur mâle, des cellules dendritiques sont également présentes au niveau du testicule (Guazzone et al., 2011). Dans l'épididyme, elles forment un réseau localisé à la base de l'épithélium et projettent des dendrites entre les cellules épithéliales en direction de la lumière. Ces dendrites sont beaucoup plus nombreuses au niveau du segment initial, ce qui pourrait suggérer un rôle de cette région dans l'acquisition de la tolérance du système immunitaire envers les spermatozoïdes matures (Da Silva et al., 2011). En se basant sur l'analyse de plusieurs marqueurs de cellules immunitaires (CD11c, F4/80 et CD106), au moins quatre sous-populations ont été identifiées dans l'épididyme (Da Silva et al., 2011).

Récemment, il a été montré que les cellules dendritiques de l'épididyme jouent un rôle au niveau de la régulation des cellules apoptotiques. En effet, une ligature des canaux efférents, qui entraîne une apoptose massive des cellules principales de l'épididyme au niveau du segment initial, semble ne pas provoquer de changements morphologiques ni de désorganisation de la barrière hémato-épididymaire dans cette région (Smith et al., 2014). Cela serait dû à une phagocytose très efficace des corps apoptotiques par les cellules dendritiques du segment initial.



<u>Figure 2 : Épithélium épididymaire</u>. L'épithélium peut être divisé en 4 segments qui sont le segment initial, la tête, le corps et la queue. La hauteur de l'épithélium et la composition en types cellulaires diffèrent selon les segments. Modifié de Hinton, 1998, et de Breton, 2012.

1.4. Développement de l'épididyme chez le rat

L'épididyme dérive d'une structure embryonnaire appelée mésonéphros. A la naissance, l'épididyme est immature et les cellules épithéliales acquièrent leurs caractéristiques pendant la période postnatale (Marty et al., 2003; Sun and Flickinger, 1979). Le développement postnatal de l'épididyme peut se diviser en trois phases. La

première consiste en une phase indifférenciée, du jour postnatal 1 au jour 15, une phase de différenciation (jour 16 au jour 44) et une phase d'expansion après le jour 44 (Sun and Flickinger, 1979).

Pendant la période indifférenciée, des cellules nommées cellules en colonne sont présentes au sein de l'épithélium et se divisent activement. Ces cellules contiennent peu de mitochondries mais de nombreux ribosomes et polysomes (Hermo et al., 1992; Jiang et al., 1994). Les cellules en colonne expriment notamment la connexine 26 au niveau de la région apicale (Dufresne et al., 2003), et cette expression disparaît lorsque les cellules se différencient au profit des connexines 32 et 31.1 (Dufresne et al., 2003).

Entre les jours 16 et 44, l'épithélium se différencie et plusieurs types cellulaires apparaissent : les cellules principales, basales, claires et étroites (Hermo et al., 1992). Les premières cellules basales apparaissent au niveau de la queue de l'épididyme au jour 21, et sont présentes dans tous les segments au jour 28. Les cellules claires et étroites apparaissent au jour 35. Les niveaux de testostérone augmentent jusqu'à un pic au jour 42.

Après le jour 44, l'épididyme connaît une période d'expansion. La taille et le poids de l'épididyme augmentent et les spermatozoïdes apparaissent dans la lumière du tubule au jour 52 ; ils sont présents sur toute la longueur de l'épididyme au jour 56. Les principaux évènements du développement postnatal épididymaire chez le rat sont présentés dans la figure 3.



<u>Figure 3. Développement postnatal de l'épididyme chez le rat</u>. A la naissance l'épithélium est indifférencié et la barrière hémato-épididymaire n'est pas complète. Les premières cellules basales apparaissent au jour 21 au niveau de la queue, et sont présentes dans tout l'épididyme au jour 28. Les niveaux de testostérone augmentent au jour 42 et les spermatozoïdes arrivent dans l'épididyme au jour 52.

1.5. Régulation des fonctions de l'épididyme

1.5.1. La régulation hormonale

1.5.1.1. Régulation par les androgènes

L'épididyme est un organe sous la dépendance des androgènes. Il dérive de la structure embryonnaire appelée mésonéphros et a donc la même origine que le rein et le développement des canaux du mésonéphros pendant la vie embryonnaire est sous contrôle des androgènes, sécrétés par les cellules de Leydig du testicule (Hannema and Hughes, 2007).

Il est avéré depuis longtemps que les androgènes sont nécessaires pour le maintien de la structure et de la fonction de l'épididyme. Plusieurs études existent basées sur des méthodologies différentes : l'orchidectomie, la ligature des canaux efférents ou des traitements antagonistes des androgènes tels que le flutamide.

La privation d'androgènes entraîne une altération de la taille et de l'histologie de l'épididyme. L'orchidectomie entraîne une diminution de 25% du poids de l'épididyme en 2 semaines, ainsi que la diminution du diamètre du tubule et de la hauteur épithéliale, et l'augmentation de l'espace interstitiel (Hamzeh and Robaire, 2009; Robaire and Hinton, 2002). On retrouve également des modifications de la morphologie et de l'ultrastructure des cellules principales, telle qu'une diminution du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, une disparition des microvillosités et une accumulation des lysosomes (Moore and Bedford, 1979). Ces modifications pourraient indiquer une diminution de l'activité sécrétoire des cellules principales en l'absence d'androgènes. L'orchidectomie entraîne également une vague d'apoptose qui commence dans le segment initial 18 heures après l'opération puis qui se poursuit dans les autres segments. L'apoptose cesse après 7 jours (Fan and Robaire, 1998). La restauration du niveau des androgènes inverse les effets de l'orchidectomie, excepté au niveau du segment initial, ce qui indique une implication d'autres composants (Robaire and Hinton, 2002).

La régulation par les androgènes se fait par deux vois : luminale via les canaux efférents, et par transport par le fluide péritubulaire (Turner, 1991). Les cellules de Leydig du testicule sécrètent plusieurs androgènes tels que l'androstenedione, la testostérone et son métabolite issu de l'action de la 5- α -réductase, la dihydrotestostérone (DHT). Il existe plusieurs voies d'action des androgènes ; la première voie est dépendante de l'interaction entre le récepteur aux androgènes et l'ADN. Les androgènes sont transportés dans l'épididyme liés à une protéine, l'ABP (androgen binding protein), internalisés par les cellules principales du segment initial et de la tête puis ils se lient au récepteur aux androgènes, ce qui entraîne la dimérisation du récepteur et sa translocation au noyau (Rodriguez et al., 2001). Dans l'épididyme, les récepteurs aux androgènes sont présents dans les cellules principales et dans les cellules basales (Yamashita, 2004; Zhu et al., 2000), et sont légèrement plus exprimés au niveau de la tête et du corps (Yamashita, 2004).

Une autre voie d'action des androgènes a été découverte plus récemment. En effet, la DHT est capable d'activer très rapidement la voie de signalisation ERK par le biais du récepteur aux androgènes. La DHT va activer des kinases qui vont phosphoryler le coactivateur du récepteur aux stéroïdes (SRC pour steroid receptor co-activator). Cette activation va agir sur les cibles de SRC, les récepteurs EGFR et IGF1R, qui vont à leur tour agir sur ERK et le facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein) via des MAP kinases (Hamzeh and Robaire, 2011).

1.5.1.2. La régulation par les œstrogènes

Chez le mâle, l'estradiol est produit dans les tissus périphériques mais également dans certaines zones du tractus reproducteur, notamment dans les cellules de Sertoli, les cellules germinales et dans une moindre mesure dans les cellules de Leydig. Une enzyme, le cytochrome P450 19 (Cyp19 ou aromatase), catalyse la conversion de la testostérone en œstradiol. Dans le spermatozoïde, l'aromatase est exprimée dans la gouttelette cytoplasmique et représente la plus grande source d'œstradiol dans le tractus reproducteur mâle (Hess, 2003). L'épithélium épididymaire n'exprime pas l'aromatase (Schleicher et al., 1989).

L'œstradiol se lie aux récepteurs aux œstrogènes (ER pour estrogen receptor). Il existe deux sous-types de récepteurs : ER α et ER β . Les études divergent sur la localisation de ER α dans l'épididyme ; chez le rat, ER α a été décrit comme absent, exprimé uniquement dans le segment initial ou fortement dans le segment initial et faiblement dans les autres segments de l'épididyme (Zhou et al., 2002). Des souris déficientes pour ER α présentent une diminution de la réabsorption du fluide luminal dans la tête de l'épididyme, conduisant à une infertilité (Hess et al., 1997). Il semble en outre que l'excès d'œstrogènes entraîne le même effet (Carreau, 2003). La déficience en ER α entraîne également une apparition de cellules étroites, apicales et claires anormales et une infertilité, due à des problèmes de réabsorption du liquide au niveau de la partie proximale de l'épididyme (Hess et al., 2000). Des souris déficientes pour ER β semblent avoir une fertilité normale (Zhou et al., 2002).

ERβ est exprimé dans l'épididyme, plus fortement dans la région distale, et est présent dans tous les types cellulaires de l'épithélium excepté les cellules halo (Hess, 2003; Zhou et al., 2002).

Un troisième type de récepteur aux œstrogènes a été identifié plus récemment, il s'agit du récepteur aux œstrogènes couplé aux protéines G (GPER pour G-protein coupled estrogen receptor). GPER a été identifié dans plusieurs espèces dont l'humain et les rongeurs (Prossnitz and Barton, 2009; Sirianni et al., 2008). Ce récepteur, d'abord connu pour être exprimé par les cellules de Sertoli immatures, les spermatocytes au stade pachytène et les spermatides rondes (Chimento et al., 2011; Lucas et al., 2010), est également présent dans l'épididyme (Hess et al., 2011; Pereira et al., 2014). Chez le rat adulte, il est retrouvé dans le cytoplasme des cellules principales, surtout au niveau du corps et de la queue.

L'effet des œstrogènes sans ou avec orchidectomie a été étudié. Les effets de composés anti-œstrogéniques sont multiples et incluent une baisse de poids de l'épididyme, une baisse de la fertilité, une diminution du temps de transit des spermatozoïdes et des modifications dans les concentrations ioniques (Hess, 2003).

L'épididyme exprime également l'enzyme estrogen sulfotransférase (SULT1E1), qui permettrait de le protéger d'un excès d'œstrogènes (Frenette et al., 2009).

1.5.1.3. La régulation par les hormones thyroïdiennes

Chez le mâle, les hormones thyroïdiennes sont essentielles à la différenciation et à la maturation de l'appareil reproducteur (Cooke et al., 2004). Dans le testicule, ce sont des régulateurs majeurs du développement et de la prolifération des cellules de Sertoli (Buzzard et al., 2000; Holsberger and Cooke, 2005). De plus, le récepteur aux hormones thyroïdiennes est fortement exprimé dans les spermatogonies et les spermatocytes, ce qui suggère une participation essentielle des hormones thyroïdiennes à la spermatogenèse (Buzzard et al., 2000).

Des travaux ont montré qu'une hypothyroïdie néonatale induite par du propylthiouracile (PTU) chez le rat affectait la localisation de la connexine 43 au niveau du segment initial, de la tête et du corps (St-Pierre et al., 2003), ce qui suggère que les hormones thyroïdiennes agissent sur la communication intercellulaire dans l'épididyme.

La plupart des effets génomiques des hormones thyroïdiennes sont dus à l'interaction de T3 (ou 3,5,5'-tri-iodothyronine) avec le récepteur aux hormones thyroïdiennes (Bassett et al., 2003). Les effets biologiques de T3 peuvent être modulés par des modifications enzymatiques. Les enzymes responsables de la déiodination sont les déiodinases. Dans la famille des iodothyronines déiodinases, trois membres ont été identifiés, nommés Dio1, Dio2 et Dio3. Dio1 et Dio2 catalysent la conversion de T4 (pro-hormone thyroxine) en T3 et participe également à la conversion de T3 en 3,3'-T2. Dio3 inactive T4 et T3 en les convertissant respectivement en rT3 (reverse T3 qui est la forme inactive de T3) et 3,3'-T2.

Dio1 est retrouvée dans le foie, le rein et la thyroïde (Kaplan and Utiger, 1978) Leonard 80) et à moindre degré dans l'hypophyse (Baur et al., 1997), la glande mammaire pendant l'allaitement (Aceves and Valverde, 1989), l'intestin (Bates et al., 1999) et la prostate (Anguiano et al., 2006). Il s'agit également de la déiodinase la plus exprimée dans l'épididyme (Bianco et al., 2002; Kuiper et al., 2005). Dio2 est principalement localisée dans le cerveau (Kaplan et al., 1981), la graisse brune (Silva and Larsen, 1983), et le muscle (Mizuma et al., 2001; Salvatore et al., 1996). Dio3 est fortement exprimée dans le placenta et les tissus fœtaux, ainsi que chez le nouveau-né (Bates et al., 1999; Galton et al., 1999; Medina et al., 2011), ce qui suggère un rôle de cette isoforme dans le développement.

1.5.2. Les voies de signalisation impliquées dans les fonctions de l'épididyme

1.5.2.1. La voie de signalisation Wnt

Plusieurs composants de la voie de signalisation Wnt/ β caténine ont été identifiés dans l'épididyme par le biais d'expériences de microréseaux (Jelinsky et al., 2007; Johnston et al., 2005). Plusieurs de ces composants sont connus pour avoir un rôle important dans l'épididyme. Wnt9b jour un rôle dans le développement des canaux de Wolff (Carroll et al., 2005) ; Wnt4 permet de maintenir l'homéostasie de l'épithélium (Deshpande et al., 2009), tandis que β -caténine joue un rôle dans le développement postnatal de l'épididyme (DeBellefeuille et al., 2003; Wu et al., 2012) et dans le mainteni des jonctions cellulaires chez l'adulte (DeBellefeuille et al., 2003).

La voie de signalisation Wnt/ β caténine est souvent reliée à l'apparition de tumeurs solides. Malgré la très faible incidence de cancer au sein de l'épididyme, il existe de hauts niveaux d'expression de β -caténine dans l'épididyme. Il a donc été suggéré qu'il existe dans l'épididyme une inhibition de la voie Wnt/ β -caténine tumorigénique. Les gènes de nombreux inhibiteurs de cette voie de signalisation ainsi que des microARN la ciblant sont en effet retrouvés dans l'épididyme (Yeung et al., 2012).

1.5.2.2. Les voies de signalisation ERK et AKT

La voie de signalisation ERK joue également un rôle dans le développement de l'épididyme. Cette voie est une cascade de kinases qui phosphorylent chaque kinase suivante pour transmettre le signal. Son activité est différente suivant les segments de

l'épididyme ; en effet les plus hauts niveaux d'activité de la voie de signalisation ERK sont dans le segment initial (Xu et al., 2010), où elle joue un rôle dans la différenciation. La ligature des canaux efférents entraîne la diminution de l'expression des composants de la voie de signalisation ERK (Xu et al., 2011).

La génération de souris avec une délétion de PTEN au niveau de la partie proximale de l'épididyme entraîne une hypertrophie de l'épididyme et une activation de la voie de signalisation AKT. L'activation de la voie de signalisation AKT entraîne à son tour l'inactivation de plusieurs acteurs de la voie de signalisation ERK, notamment le protooncogène RAF1 et plusieurs kinases sérine/thréonine. Ces changements dans la signalisation cellulaire entraînent des altérations au niveau de la forme, de la taille et de l'organisation du segment initial de l'épididyme, ainsi que des altérations au niveau de la prolifération cellulaire. Ces changements provoquent également une infertilité progressive, dû à une maturation des spermatozoïdes compromise (Xu et al., 2014).

2. Les jonctions cellulaires dans l'épididyme

2.1. Les jonctions serrées et la barrière hémato-épididymaire

2.1.1. Structure de la barrière hémato-épididymaire

Chez les eucaryotes, il existe des barrières cellulaires permettant d'isoler des compartiments fonctionnels. Ces barrières sont composées de jonctions serrées, qui forment une ceinture continue et circonférentielle autour des cellules. L'environnement luminal de l'épididyme est hautement spécialisé avec des protéines, des ions et un pH spécifiques, qui sont nécessaires à la maturation spermatique. Les jonctions serrées entre les cellules épithéliales épididymaires forment ce que l'on appelle la barrière hémato-épididymaire, et régulent cet environnement luminal en le distinguant de la circulation sanguine.

Les jonctions serrées formant la barrière hémato-épididymaire sont situées à l'apex des cellules principales. Les caractéristiques ultrastructurales des complexes jonctionnels entre les cellules chez le rat adulte varient selon les régions de l'épididyme (Cyr et al., 1995). Dans le segment initial, le complexe est composé d'une jonction serrée qui s'étend sur une considérable longueur sur les membranes plasmiques adjacentes, mais contient relativement peu de desmosomes ; dans les autres régions de l'épididyme, la taille de la jonction serrée est réduite mais contient davantage de desmosomes.

2.1.2. Formation de la barrière hémato-épididymaire

Les brins de jonctions serrées ne rendent pas la barrière hémato-épididymaire étanche dès leur apparition. Chez de nombreuses espèces, la barrière complète n'apparaît qu'après la naissance. Chez la souris, les brins de jonctions serrées apparaissent au jour embryonnaire 12 mais leur complexité augmente jusqu'au jour postnatal 37 (Suzuki and Nagano, 1978). Chez le vison, la barrière est formée et pleinement efficace pendant la période embryonnaire (Pelletier, 1994).

Chez le rat, la barrière n'est pas étanche à la naissance. A l'aide de tests de perméabilité au lanthanum, il a été montré que la barrière était toujours incomplète au jour postnatal 11 ; sa maturation est ensuite segment-dépendante, la diminution de la perméabilité arrivant d'abord dans le segment initial et la tête de l'épididyme. La barrière ne devient étanche dans tout l'épididyme qu'au jour 21 (Agarwal and Hoffer, 1989). Chez la souris, les brins de jonction serrée deviennent continus et imperméables au lanthanum au jour postnatal 7 (Guan et al., 2005).

2.1.3. Fonctions de la barrière hémato-épididymaire

Les jonctions serrées de la barrière hémato-épididymaire ont donc un rôle de barrière physique et étanche qui isole le compartiment luminal de l'épididyme. Ces jonctions ont de plus une fonction de frontière entre les domaines apical et baso-latéral de la membrane plasmique, ce qui permet la création et le maintien d'une polarité cellulaire (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Enfin, la barrière hémato-épididymaire assure une perméabilité sélective qui permet de contrôler les passages d'eau, de protéines et d'ions entre la circulation sanguine et le compartiment luminal, ce qui permet de créer des microenvironnements spécifiques.

Il est à noter que la composition du fluide luminal varie selon les régions de l'épididyme, ce qui suggère que les caractéristiques de la barrière hémato-épididymaire pourraient varier selon ces mêmes régions. Plusieurs différences ont d'ailleurs été notées entre les différents segments. Chez le rat, il existe davantage de brins de jonctions serrées dans la tête de l'épididyme que dans la queue (Suzuki and Nagano, 1978). Cependant, il a également été montré que la résistance transépithéliale est plus importante au niveau de la queue de l'épididyme (Chan et al., 1995). Enfin, la taille des jonctions serrées diminuent vers le corps et la queue par rapport aux premiers segments, alors que le nombre de desmosomes augmente (Cyr et al., 1995).

2.1.4. Composition de la barrière hémato-épididymaire

La structure de la jonction serrée est schématisée à la figure 4.

2.1.4.1. Occludine

L'occludine a été la première protéine transmembranaire identifiée dans les jonctions serrées. C'est une protéine phosphorylée contenant quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires (Furuse et al., 1993; Hirase et al., 1997). Elle est exprimée dans de nombreux tissus épithéliaux et endothéliaux (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Au niveau de l'appareil reproducteur mâle, elle est présente dans les tubules séminifères du rat et de la souris, où sont localisées les jonctions serrées entre les cellules de Sertoli à la base de l'épithélium séminifère (Cyr et al., 1999), et dans les jonctions serrées de l'épididyme (Cyr et al., 1999; Levy and Robaire, 1999). Chez la souris, l'occludine est exprimée dans le mésonéphros au jour embryonnaire 13, mais n'apparaît dans les jonctions serrées qu'au jour embryonnaire 18 (Cyr et al., 1999).

La localisation de l'occludine au niveau de l'épididyme diffère selon les espèces. Chez le rat, elle est localisée au niveau des jonctions serrées entre les cellules principales adjacentes. Chez la souris, elle est localisée à la même place dans les canaux efférents, la tête, le corps et la queue de l'épididyme, mais pas dans le segment initial malgré la présence de jonctions serrées ; dans cette région, l'occludine est associé aux cellules étroites (Cyr et al., 1999).

Il a été montré que l'inactivation du gène codant pour l'occludine n'empêchait pas la différenciation en cellules épithéliales polarisées et que l'intégrité des jonctions serrées intercellulaires était maintenue. La localisation et le nombre des brins de jonction serrée ne varient pas dans les cellules n'exprimant pas l'occludine et les jonctions serrées sont normalement formées en l'absence d'occludine. De plus, l'absence d'occludine dans les jonctions serrées n'empêche pas non plus la fonction de barrière étanche de ces jonctions (Saitou et al., 1998), ni la perméabilité paracellulaire (Saitou et al., 2000).

Cependant, des études suggèrent que l'occludine est importante pour la fonction de barrière des jonctions serrées. La surexpression de l'occludine dans des cellules Madin-Darby canine kidney (MDCK) entraîne une augmentation du nombre de brins de jonctions serrées ainsi qu'une augmentation de la résistance transépithéliale (McCarthy et al., 1996). De même, l'introduction d'occludine tronquée dans ces mêmes cellules entraîne une augmentation des fuites paracellulaires des petites molécules (Balda et al., 1996; Chen et al., 1997). Certaines pathologies ont également pu être observées dans certains organes chez des souris n'exprimant pas l'occludine : pathologies inflammatoires notamment au niveau du tube digestif, anomalies du développement cérébral, calcifications, atrophie des tubules testiculaires et anomalies osseuses (O'Driscoll et al., 2010; Saitou et al., 2000).

L'occludine est capable d'interagir avec de nombreuses protéines cytoplasmiques : les protéines ZOs, la cinguline et l'actine (Clarke et al., 2000; Fanning et al., 1998). Son extrémité C-terminale contient également plusieurs sites de phosphorylation qui peuvent être modifiés par des kinases ou des phosphatases (Clarke et al., 2000). Il a été montré que l'occludine non phosphorylée est présente dans le

27

cytoplasme et le long des membranes baso-latérales, alors que la protéine phosphorylée est localisée aux jonctions serrées (Wong, 1997).

2.1.4.2. Claudines

Les protéines de la famille des claudines ont été identifiées après la découverte de la persistance des jonctions serrées en l'absence d'occludine (Furuse et al., 1998). Elles sont connues pour être la base moléculaire des jonctions serrées. Elles sont transportées dans les jonctions serrées entre les cellules adjacentes (Morita et al., 1999) et peuvent être colocalisées avec l'occludine.

L'expression exogène des claudines peut induire la formation de jonctions serrées dans des fibroblastes (Furuse et al., 1998) tout en participant à la création de pores cellulaires qui permettent une diffusion sélective des ions et des molécules à travers l'espace paracellulaire (Tsukita and Furuse, 2000; Van Itallie and Anderson, 2004). La perméabilité sélective de ces pores dépend de la concentration et du type de claudine exprimé par la cellule. De plus, il a été démontré que la première boucle extracellulaire des claudines est impliquée dans la fonction de barrière et la perméabilité sélective des jonctions serrées (Colegio et al., 2003). Certaines claudines sont surtout impliquées dans la fonction de barrière des jouent un rôle important dans la perméabilité sélective aux ions. Ces propriétés dépendent des claudines exprimées dans une même jonction et de la manière dont elles sont polymérisées (Krause et al., 2008).

Par leur extrémité C-terminale, les claudines interagissent avec d'autres protéines des jonctions serrées, comme les protéines ZO (Itoh et al., 1999a). Cette interaction permet un lien indirect avec l'actine et la stabilisation de la jonction serrée (Umeda et al., 2006).

Dans l'épididyme, de nombreuses claudines sont exprimées. On retrouve notamment les claudines 1 à 9 chez le rat et la souris (Gregory and Cyr, 2006; Guan et al., 2005). L'ARNm de la claudine 11 est également exprimée chez le rat (Jelinsky et al., 2007), cependant il n'est pas traduit en protéine (Gregory and Cyr, 2006). Certaines claudines sont exprimées de façon segment-spécifique, comme les claudines 11 et 16 qui sont uniquement retrouvées au niveau du segment initial (Gregory and Cyr, 2006). Ces variations suggèrent des différences dans la barrière hémato-épididymaire selon la région de l'épididyme. La localisation des claudines au niveau de l'épithélium varie également : chez le rat, on retrouve les claudines 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 et 10 au niveau des jonctions serrées entre cellules épithéliales, alors que la claudine 5 est exprimée par les cellules endothéliales (Cyr et al., 2007; Gregory and Cyr, 2006). Enfin, l'expression et la localisation des claudines dans l'épididyme varient également au cours du développement (Gregory and Cyr, 2006). Chez l'humain, il a été montré in vitro que la diminution d'expression des claudines 1, 3, 4 ou 7 entraînait une diminution de la résistance électrique transépithéliale (TER pour transepithelial electrical resistance) dans les cellules FHCE1 qui représentent une lignée de cellules humaines venant de la tête de l'épididyme (Dube et al., 2010).

2.1.4.3. Les protéines zonula occludens (ZOs)

Les protéines ZO sont des protéines qui interagissent directement avec les brins de jonctions serrées. Elles soutiennent les jonctions serrées et recrutent des protéines de structure, de signalisation et le cytosquelette d'actine. On trouve 3 protéines dans la famille ZO : ZO-1, ZO-2 et ZO-3. ZO-1 a été la première protéine constituante des jonctions serrées à être identifiée. Elle est localisée dans le cytoplasme des cellules épithéliales à proximité des jonctions serrées (Stevenson et al., 1989).

Les protéines ZO interagissent avec plusieurs protéines membranaires des jonctions serrées : les claudines (Itoh et al., 1999b) et l'occludine (Furuse et al., 1993). L'autre extrémité de ces protéines interagit avec le cytosquelette d'actine (Wittchen et al., 1999). ZO-1 est notamment responsable du recrutement des protéines membranaires (occludine et claudines) lors de la formation de la jonction serrée (Adachi et al., 2006; Umeda et al., 2006).

En plus de son rôle dans les jonctions serrées, ZO-1 est également capable d'agir sur la prolifération cellulaire et la différenciation via le facteur de transcription ZONAB (Balda and Matter, 2009). La suppression de ZO-1 chez des souris entraîne d'ailleurs un phénotype non-viable (Katsuno et al., 2008). Il a récemment été montré que ZO-1 interagit avec le canal CFTR au niveau des jonctions serrées ; l'inhibition de CFTR induit la translocation de ZONAB dans le noyau, ce qui entraîne l'activation de gènes codant pour la prolifération cellulaire et l'inhibition de gènes codant pour la différenciation (Ruan et al., 2014).

2.1.4.4. Les protéines JAMs (Junction Adhesion Molecules)

Les protéines JAMs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. A ce jour, six protéines ont été identifiées : JAM-1, JAM-2, JAM-3, JAM-4, CAR et ESAM. On retrouve JAM-2, -3, -4 et ESAM dans l'épididyme de rat et de souris, (Jelinsky et al., 2007; Johnston et al., 2005). Ces protéines interagissent avec d'autres protéines de jonctions serrées telles que ZO-1 et MAGI-1 (Mandell and Parkos, 2005), ce qui suggère un rôle dans la régulation des jonctions serrées. Il a également été montré que l'expression de JAM-1 est responsable du recrutement de ZO-1 et de l'occludine au niveau des jonctions serrées (Ebnet et al., 2000). Enfin, il a été montré que l'inhibition de JAM-1 affecte la résistance transépithéliale et la jonction serrée (Liu et al., 2000).



<u>Figure 4. Schéma d'une jonction serrée</u>. La jonction serrée permet de créer une barrière étanche entre deux cellules. Elle est composée de protéines transmembranaires et cytoplasmiques. Créé par Marion Mandon.

2.1.5. Un type particulier de jonction serrée : la jonction tricellulaire

2.1.5.1. Organisation de la jonction tricellulaire

La jonction serrée est composée d'une série de brins continus et anastomosés (Staehelin et al., 1969). Entre deux cellules, chaque brin de jonction serrée est associé avec le brin de la cellule adjacente (Tsukita et al., 2001), ce qui représente la jonction serrée bicellulaire, formée par l'occludine et les claudines. Il existe également des jonctions serrées entre trois cellules, qui constituent des jonctions spécialisées. A l'approche d'une jonction tricellulaire, le réseau de brins formant la jonction serrée s'étend de manière basolatérale, formant ainsi un tube central qui forme un point de «faiblesse» dans la barrière épithéliale (figure 5). La recherche d'une protéine spécifique de la jonction serrée tricellulaire a conduit à la découverte de la tricelluline, également connue sous le nom de MarveID2 (Ikenouchi et al., 2005).



<u>Figure 5. Représentation d'une jonction serrée tricellulaire</u>. La jonction se fait entre trois cellules et crée un tube central. Créé par Marion Mandon.

2.1.5.2. La tricelluline

La tricelluline appartient à la famille des TAMPs (tight-junction-associated marvel proteins). Elle présente quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires, les extrémités N et C terminales étant localisées dans le cytoplasme (Ikenouchi et al., 2005). La protéine est exprimée dans différents tissus comme le rein, l'intestin et l'estomac (Ikenouchi et al., 2005) ainsi que dans l'oreille interne (Riazuddin et al., 2006) et dans différentes lignées cellulaires (Krug et al., 2009). On la retrouve également en-dehors des épithéliums, comme dans les cellules de Schwann (Kikuchi et al., 2010), l'endothélium de la rétine (Iwamoto et al., 2014) et des cellules immunitaires (Mariano et al., 2011). Il est à présent admis qu'il s'agit d'une protéine ubiquitaire.

La diminution d'expression de la tricelluline entraîne une diminution de la résistance électrique transépithéliale et une augmentation de la perméabilité paracellulaire, ce qui montre que les contacts tricellulaires jouent un rôle crucial dans la barrière épithéliale et que la tricelluline est directement impliquée dans le mécanisme de la barrière (Ikenouchi et al., 2008). Le rôle de la tricelluline dans ces barrières, notamment la barrière hémato-encéphalique (Su et al., 2015), est maintenant avéré.

La protéine peut former des complexes homomériques (tricelluline-tricelluline) ou hétéromériques (tricelluline-claudine) (Westphal et al., 2010).

Il a également été montré que la tricelluline peut en partie compenser certaines fonctions de l'occludine (Ikenouchi et al., 2008). En effet, l'inhibition de l'occludine va conduire à des changements dans la localisation de la tricelluline, qui sera alors exprimée au niveau des jonctions bicellulaires. Des études analysant la fonction biologique de la tricelluline ont révélé que la présence de la protéine dans les jonctions serrées bicellulaires réduit les discontinuités des brins, augmente la résistance électrique paracellulaire et diminue la perméabilité aux ions (Krug et al., 2009). Il faut également noter que la tricelluline possède une similarité de séquence de 32% avec l'occludine (Ikenouchi et al., 2005).

La localisation de la tricelluline pendant le développement semble différer selon les études. Pendant la formation des jonctions serrées tricellulaires, la tricelluline se

retrouverait au niveau des jonctions bicellulaires (Ikenouchi et al., 2008) ; à l'inverse, une étude conduite par Raleigh (2010) a montré que la tricelluline était présente dans les jonctions bicellulaires et tricellulaires des épithéliums immatures.

La tricelluline est recrutée au niveau des jonctions tricellulaires par les protéines appartenant à la famille des angulines : lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR), Immunoglobulin-like domaine-containing receptor (ILDR) 1 et 2. Ces protéines sont des protéines transmembranaires et font partie de la jonction serrée tricellulaire. LSR et ILDR1 sont retrouvées dans la plupart des tissus et forment une barrière moins perméable qu'ILDR2.

Récemment, il a été découvert que les jonctions tricellulaires avaient un rôle dans l'audition (Higashi et al., 2013a). En effet, des mutations dans le gène qui code pour la tricelluline entraînent une surdité héréditaire (Riazuddin et al., 2006). Il a d'ailleurs été montré que des souris dans lesquelles une mutation avait été introduite dans le gène présentaient une surdité congénitale associée à une sénescence des cellules ciliées de la cochlée (Nayak et al., 2013). Des mutations dans le gène codant pour ILDR1 entraînent également une surdité (Borck et al., 2011). Il a été montré que la plupart des mutations associées à ces surdités sont responsables d'une mauvaise localisation d'ILDR1 (Higashi et al., 2013b). Cependant, un déficit en ILDR1 entraîne une surexpression en LSR, ce qui pourrait suggérer un rôle de compensation (Higashi et al., 2015). Cette compensation n'empêche cependant pas l'apparition d'une surdité ; il semblerait donc que les trois protéines de la famille des angulines ont en commun un rôle de recrutement de la tricelluline aux jonctions tricellulaires, mais que chaque protéine possède un rôle fonctionnel distinct.

2.1.6. Régulation de la formation et du maintien des jonctions serrées

Les jonctions serrées sont des structures dynamiques ; en effet, il existe un processus continu de polarisation cellulaire, recrutement des protéines de jonction, stabilisation (via des interactions avec le cytosquelette), maintien et désorganisation (Steed et al., 2010). Tout cela nécessite une régulation précise.

On peut notamment citer les protéines kinases A et C, et les phosphatases 1 et 2A qui entraînent la phosphorylation de résidus sérine ou thréonine ; cette phosphorylation agit sur différentes isoformes de la protéine kinase C et peut entraîner plusieurs effets. L'occludine et les claudines sont notamment la cible de phosphorylations (Dorfel and Huber, 2012; Dorfel et al., 2013; Schulzke et al., 2012). Rho, un membre de la superfamille des protéines Ras, et la voie de signalisation PI3K/Akt interviennent également dans la régulation des jonctions serrées. Enfin, les MAP kinases modulent le transport paracellulaire en régulant l'expression des protéines de jonction serrée (Gonzalez-Mariscal et al., 2008).

Les androgènes pourraient également jouer un rôle dans le maintien des jonctions serrées de l'épididyme, selon un mode segment-dépendant. En effet, l'orchidectomie chez des souris adultes entraîne une baisse du nombre de brins de jonctions serrées au niveau de la tête de l'épididyme (Suzuki and Nagano, 1978), ce qui suggère une régulation par des facteurs testiculaires. Une autre hypothèse est que cette baisse du nombre de brins proviendrait d'une dédifférenciation des cellules à la suite de la privation des androgènes (Suzuki and Nagano, 1978).

Dans l'épididyme, la claudine-1 n'est pas seulement présente au niveau de la barrière hémato-épididymaire mais également le long des membranes latérales des cellules ; elle se retrouve notamment entre les cellules basales et principales et pourrait agir comme molécule d'adhésion. L'expression du gène codant pour la claudine-1 est régulé par les androgènes et les hormones thyroïdiennes. En effet, chez le rat, l'orchidectomie entraîne des changements de localisation de la claudine-1 au niveau du segment initial alors que le remplacement des androgènes inverse cet effet (Cyr et al., 2007; Gregory et al., 2001). Les androgènes ne semblent en revanche pas réguler les jonctions serrées au niveau de la queue de l'épididyme (Turner et al., 1981).

Ces interactions permettent de réguler la formation et le désassemblage des jonctions serrées.

35

2.2. Les jonctions lacunaires

Les jonctions lacunaires, aussi appelées jonctions «gap», sont des composants qui permettent la communication directe entre cellules voisines. Elles sont retrouvées au niveau de la membrane de presque tous les types cellulaires (Bruzzonne et al., 1996). Leur rôle principal est de coordonner la communication intercellulaire et la réponse tissulaire lors de différents processus (Giepmans, 2004). Cette communication est essentielle pour plusieurs processus cellulaires, comme par exemple la diffusion de métabolites entre cellules adjacentes (Pointis et al., 2005), la propagation de messagers secondaires, et la régulation du développement embryonnaire. Les jonctions lacunaires sont donc indispensables au maintien de l'homéostasie cellulaire (Goodenough et al., 1996).

Les jonctions lacunaires sont formées par des demi-canaux appelés connexons. Chaque connexon est composé de six protéines appelées les connexines et permettent les passage d'ions et de petites molécules entre les cellules (Mese et al., 2007). Les connexons ne sont pas tous identiques et diffèrent selon les connexines qui les composent. Chez l'humain et les rongeurs, 21 connexines différentes ont été identifiées. Les connexons peuvent être composés du même type de connexine ou de différentes connexines (connexon homotypique ou hétérotypique). Ces différences permettent aux connexons d'avoir des propriétés sélectives de perméabilité et de régulation. La liaison de deux connexons permet la formation d'un pore aqueux entre deux cellules et la diffusion de petites molécules d'une cellule à l'autre (figure 6).



<u>Figure 6. La jonction lacunaire</u>. Les connexines sont des protéines transmembranaires qui s'assemblent par 6 pour former un connexon. Le connexon est inséré au niveau de la membrane et se lie à un connexon de la cellule adjacente pour former un canal de communication. Créé par Marion Mandon.

Les connexines sont des protéines transmembranaires possédant deux domaines extracellulaires, quatre domaines transmembranaires et des extrémités N- et C- terminales cytoplasmiques.

Dans l'épididyme, les jonctions lacunaires sont présentes au niveau apical des cellules épithéliales ainsi que dans le compartiment basal (Friend and Gilula, 1972). Il existe également des jonctions lacunaires entre les cellules principales et les cellules claires (Pelletier, 1995).

Plusieurs connexines ont été identifiées dans l'épididyme chez le rat : les connexines 26, 30.3, 31.1, 32 et 43 (Dufresne et al., 2003). La connexine 43, codée par le gène GJA1, a été la première identifiée dans l'épididyme (Cyr et al., 1996), et localisée entre les cellules basales et principales. L'absence de cette connexine entre les cellules

principales implique que les fonctions de l'épididyme dépendent d'une interaction directe avec les cellules basales. L'expression de la connexine 43 semble être régulée par les androgènes dans le segment initial (Cyr et al., 1996) et par les hormones thyroïdiennes dans la partie proximale de l'épididyme (St-Pierre et al., 2003). Le facteur de croissance EGF (epidermal growth factor) régule également la phosphorylation de la connexine 43 (Dube et al., 2012).

Dans la région proximale de l'épididyme, la connexine 26 est exprimée chez l'animal pendant le développement alors que l'épithélium est indifférencié et au stade des cellules en colonne (Dufresne et al., 2003). Il existe en effet une corrélation entre les niveaux de connexine 26 et le stade de différenciation (Dufresne et al., 2003; Hermo et al., 1992; Sun and Flickinger, 1979). La connexine 32 au contraire est exprimée chez l'adulte entre les cellules principales adjacentes et entre les cellules basales et principales (Dufresne et al., 2003). De manière générale, la connexine 26 est absente des épithéliums adultes et est un régulateur important de prolifération (Crespin et al., 2014). Ce switch entre les connexines 26 et 32 ou 31.1 existe également dans d'autres épithéliums, comme l'épiderme (Brissette et al., 1994).

2.3. La jonction adhérente

Les jonctions adhérentes permettent la cohésion cellulaire au sein du tissu. Elles sont responsables de l'adhésion cellulaire. Les principales protéines impliquées dans la jonction adhérente appartiennent à la superfamille des cadhérines, qui sont des molécules d'adhésion calcium-dépendantes (Braga, 2002). Les cadhérines sont des protéines transmembranaires ubiquitaires qui sont reliées au cytosquelette d'actine via d'autres protéines, les caténines (Imamura et al., 1999; Takeichi, 1988) l'actinine, la vinculine ou ZO-1.

La première cadhérine à avoir été identifiée est E-cadhérine (E-cad pour Epithelial cadherin, ou cadhérine-1). Ensuite la N-cadhérine (N-Cad ou cadhérine-2) et la P-cadhérine (P-cad ou cadhérine-3) ont été découvertes respectivement dans le tissu neural et le placenta (Takeichi, 1988, 1990). Plusieurs dizaines d'autres cadhérines ont ensuite

été identifiées et classées en plusieurs familles (Takeichi, 2007) : les cadhérines classiques ou de type I, les cadhérines atypiques ou de type II, les cadhérines desmosomales, les protocadhérines et les protéines reliées aux cadhérines (Nollet et al., 2000).

E-cad, N-cad et P-cad appartiennent à la famille des cadhérines classiques, ou cadhérines de type I (Junghans et al., 2005; Wheelock and Johnson, 2003). Leur domaine cytoplasmique interagit avec plusieurs protéines comme les caténines ou ZO-1 (Gumbiner, 1996; Imamura et al., 1999), ce qui permet de les relier au cytosquelette.

La jonction adhérente se forme par l'interaction de deux cadhérines de cellules adjacentes (Yap et al., 1997), selon un processus calcium-dépendant. Les cadhérines sont également impliquées dans plusieurs voies de signalisation cellulaire, ainsi que dans la polarité cellulaire et dans la morphogenèse tissulaire (Blaschuk et al., 1995). Il faut également noter que pendant la cancérogenèse, on peut souvent observer une diminution de l'expression de E-cad alors que l'expression de N-cad augmente (Kuefer et al., 2005). Les cadhérines jouent aussi un rôle essentiel dans le développement et permettent le maintien de l'intégrité des tissus (Honecker et al., 2004).

Dans l'épididyme, les cadhérines exprimées sont différentes de celles exprimées dans le testicule. En effet, E-cad est présente dans l'épididyme, contrairement au testicule (Cyr et al., 1992a), et est localisée entre les cellules principales. P-cad est également exprimée dans l'épididyme (Cyr et al., 1992b). E-cad est particulièrement exprimée au niveau de la tête et du corps de l'épididyme (Cyr et al., 1992b). En revanche, on ne retrouve pas N-cad au niveau de l'épididyme (Andersson et al., 1994). Dans l'épididyme, l'expression du gène codant pour E-cad est régulée par les androgènes, selon un schéma région-dépendant. Dans la partie proximale de l'épididyme, l'expression d'E-cad dépend de la conversion de la testostérone en DHT (Cyr et al., 1995) ; dans la queue cette corrélation n'existe pas.

Une régulation existe également selon l'âge. Chez le rat, le marquage d'E-cad disparaît à 24 mois (Levy and Robaire, 1999).

2.4. Relations entre les jonctions

La formation des jonctions intercellulaires implique la liaison de molécules d'adhésion formant la jonction adhérente. Ce phénomène est suivi du recrutement des protéines de jonctions qui forment les jonctions serrées et les jonctions lacunaires (Mege et al., 2006).

Si les jonctions adhérentes participent à la mise en place des jonctions serrées, ces dernières influencent également les jonctions adhérentes. Par exemple, la diminution de ZO-2 retarde la formation des deux types de jonctions (Hernandez et al., 2007) et l'expression exogène de ZO-3 affecte la localisation d'E-cad, de la β -caténine et de ZO-1 (Wittchen et al., 2000).

Plusieurs données suggèrent que les connexines participent à la signalisation intracellulaire et interagissent avec les composants des autres types de jonction (Stout et al., 2004). L'augmentation des points d'adhésion via E-cad entraîne une augmentation du nombre de jonctions lacunaires (Jongen et al., 1991). Il existe également une association entre la caténine p120, la connexine 43 et N-cad (Xu et al., 2001), ou entre la caténine β , et la connexine 43 (Wu et al., 2003). De plus, l'inhibition de N-cad empêche la formation des jonctions adhérentes et la communication cellulaire via les jonctions lacunaires (Meyer et al., 1992).

3. Les cellules basales

3.1. Structure des cellules basales

Les cellules basales sont localisées à la base de l'épithélium, et adhèrent à la lame basale. Elles sont présentes dans toutes les régions de l'épididyme mais ont une morphologie segment-spécifique.

La distribution des cellules basales le long de l'épididyme est hétérogène. Il existe une augmentation graduelle du nombre de cellules basales pendant le développement postnatal. Chez l'adulte, les cellules sont plus nombreuses au niveau de la queue de l'épididyme qu'au niveau de la tête et du corps (Seiler et al., 1998).

3.1.1. Morphologie générale

Les cellules basales n'ont pas une forme unique mais semblent au contraire avoir une certaine plasticité morphologique. Elles ont d'abord été décrites comme des cellules en forme de dôme sous les cellules épithéliales (Robaire and Viger, 1995; Veri et al., 1993), puis comme des cellules avec des projections cytoplasmiques en direction de la lumière du tubule (Shum et al., 2008). Ces projections ne sont présentes que dans certains segments de l'épididyme, le corps et la queue (Shum et al., 2013) et leur présence semble régulées par les androgènes (Kim et al., 2015). Les cellules basales possèdent en outre des projections latérales intercellulaires qui elles ne semblent pas sous le contrôle des androgènes, surtout au niveau du segment initial (Kim et al., 2015).

3.1.2. Ultrastructure en microscopie électronique

Les cellules basales apparaissent globalement assez peu différenciées (Arrighi, 2014). Le cytoplasme possède quelques mitochondries et un appareil de Golgi relativement petit. Des études ont montré que les cellules basales possèdent des puits

recouverts sur la face opposée à la membrane basale, ce qui suggère une capacité d'endocytose. De plus de nombreuses gouttelettes lipidiques sont présentes ainsi que des corps résiduels, qui indiquent une phagocytose et une dégradation de matériel exogène (Arrighi et al., 1993). Il existe également une accumulation de matériel sécrétoire dans les saccules de Golgi, et des granules sécrétoires dans le cytoplasme. Cela pourrait être dû â la régulation des fonctions des cellules principales par les cellules basales (Hermo and Robaire, 2002).

3.2. Origine des cellules basales

Chez plusieurs espèces telles que la souris, le rat et l'humain, les cellules basales ne sont pas présentes à la naissance. Chez le rat, elles commencent à apparaître au niveau de la queue de l'épididyme au jour postnatal 21 (Hermo et al., 1994b) et sont présentes dans tous les segments de l'épididyme au jour 28.

3.2.1. Théories sur l'origine des cellules basales

La première hypothèse sur l'origine des cellules basales a été formulée en 1982. Les cellules basales étaient alors considérées comme dérivant de précurseurs, les cellules en colonne (Sun and Flickinger, 1982).

En 2002, il a cependant été proposé que les cellules basales ne dérivaient pas de cellules indifférenciées mais avaient une origine extratubulaire (Holschbach and Cooper, 2002). Cette étude, effectuée chez la souris, suggérait cette hypothèse en se basant sur plusieurs observations : l'absence de figures mitotiques dans l'épididyme au niveau de la base de l'épithélium, l'observation de division circonférentielle et non radiale des cellules après marquage au BrdU et la détection de cytokines impliquées dans la migration.

La découverte plus récente de marqueurs des cellules basales tels que la cytokératine 5 (KRT5) a permis de localiser plus précisément les cellules basales plutôt qu'à partir de leur unique localisation près de la membrane basale. Cette localisation, la découverte des cellules dendritiques localisées également à la base de l'épithélium (Da

Silva et al., 2011) et l'absence de migration des cellules KRT5-positives ont finalement conduit à rejeter l'origine extracellulaire des cellules basales et à soutenir l'hypothèse que les cellules basales dérivent des cellules en colonnes moins différenciées (Shum et al., 2013)

3.2.2. Différenciation : rôle de p63

Il a été démontré qu'un facteur de transcription, p63, joue un rôle essentiel dans la différenciation et le maintien des cellules basales (Hayashi et al., 2004). p63 est un homologue du gène suppresseur de tumeur p53 (Yang et al., 1998).

p63 est spécifique des cellules basales des épithéliums stratifiés et pseudostratifiés tels que l'épiderme (Koster et al., 2004), la prostate (Yang et al., 1998), les voies aériennes (Arason et al., 2014), la glande mammaire (Chakrabarti et al., 2014) et l'épithélium olfactif (Packard et al., 2011). Il est en revanche absent des épithéliums simples (Yang et al., 1998). L'expression ectopique de p63 dans un épithélium simple entraîne une stratification (Koster et al., 2004).

Le gène codant pour p63 code pour deux isoformes, TAp63 et Δ Np63. L'isoforme TAp63 est exprimée durant l'embryogenèse alors que Δ Np63 est l'isoforme dominante dans les épithéliums matures (Liefer et al., 2000; Yang et al., 1998). Dans l'épiderme, il a été montré que TAp63 est requise pour l'initiation de la stratification de l'épithélium mais inhibe la différenciation, régulée par Δ Np63 (Koster et al., 2004). Dans les poumons et la trachée, p63 est fortement impliqué dans la formation et le maintien de l'épithélium pseudostratifié (Arason et al., 2014). Dans la glande mammaire, Δ Np63 augmente l'activité des cellules souches (Chakrabarti et al., 2014). Dans la prostate, p63 est essentiel à la différenciation des cellules basales mais pas pour la différenciation des autres types cellulaires (Kurita et al., 2004). Dans l'épididyme, il a été proposé que p63 est essentiel à la différenciation des cellules basales mais pas pour la différenciation des cellules principales, claires et étroites (Murashima et al., 2011).

Deux hypothèses ont été émises sur le rôle de p63 dans la stratification des épithéliums. Chez des souris déficientes en p63 (p63^{-/-}), Mills et al (1999) ont montré que

ces souris ne possédaient pas d'épithélium stratifié ni d'organes dépendants de ces épithéliums tels que les dents ou les glandes mammaires. Sur les mêmes souris, Yang et al. (1999) ont quant à eux noté une stratification mais une discontinuité de l'épiderme, qui correspondrait à une différenciation sans régénération. Enfin, chez la souris, la diminution d'expression de Δ Np63 dans des kératinocytes entraîne une diminution de l'expression de la claudine-1, et p63 est capable de se lier in vivo au promoteur de la claudine-1 (Lopardo et al., 2008).

La présence de p63 serait donc corrélée à une fonction progénitrice des cellules basales. De plus, p63 interagit avec plusieurs voies de signalisation.

De plus, il existe plusieurs voies de signalisation impliquées dans le maintien et le renouvellement et la différenciation des cellules progénitrices avec lesquelles p63 interagit. Parmi elle, on peut notamment citer Wnt, responsable du renouvellement et de la prolifération des cellules progénitrices (Nusse, 2005). p63 est également associé à la voie Notch, qui a été montré comme permettant la différenciation des kératinocytes dans l'épiderme (Nguyen et al., 2006) ; l'expression de p63 est en effet supprimée par l'activation de Notch1 (Nguyen et al., 2006). Il existe par ailleurs une corégulation entre les voies Wnt et Notch (Shahi et al., 2011). La voie Sonic Hedgehog, qui est impliquée dans la régulation des cellules souches adultes, serait également activée par p63 dans la glande mammaire (Memmi et al., 2015).

3.3. Régulation hormonale des cellules basales

Dans l'épididyme, le récepteur aux androgènes est exprimé dans les cellules principales et les cellules basales (Zaya et al., 2012). Après castration, la localisation des cellules basales reste inchangée mais les cellules se transforment en larges cellules en forme de dôme avec quelques courtes projections latérales (Hermo and Papp, 1996).

Le traitement néonatal de rat au diethylstilbestrol, un composé œstrogénique, entraîne de nombreuses anomalies de l'épithélium, notamment une diminution de l'expression du récepteur aux androgènes et un retard dans le développement des cellules basales (Atanassova et al., 2005). Ce traitement combiné avec l'ajout de testostérone annule les effets du diethylstilbestrol, ce qui suggère que c'est la balance entre androgènes et œstrogènes qui assure la différenciation des cellules basales (Atanassova et al., 2005).

Les androgènes sont nécessaires pendant l'embryogenèse pour assurer la transformation du canal de Wolff en épididyme (Murashima et al., 2011). Pendant le développement postnatal, les changements morphologiques des cellules basales interviennent alors que les niveaux de testostérone sont bas, ce qui suggère que ces niveaux sont suffisants pour initier et maintenir la différenciation (Shum et al., 2013).

Enfin, il a été montré que la ligature des canaux efférents entraînait une vague d'apoptose des cellules basales 24 heures après ligature, suivie par une prolifération de certaines cellules basales (Kim et al., 2015).

Il semble en outre que la régulation androgénique de la morphologie des cellules basales se fasse selon un schéma région-dépendant. En effet, il a été montré une diminution du nombre des cellules basales avec des projections luminales dans le corps de l'épididyme chez des rats traités avec du flutamide, un antagoniste des androgènes (Shum et al., 2013). De plus, un traitement avec un inhibiteur de la 5 α -réductase entraîne une diminution de l'expression de IGF1 et FGF10, mais seulement au niveau du corps et de la queue de l'épididyme (Henderson et al., 2006).

3.4. Rôles proposés

3.4.1. Immunitaire

Les cellules basales possèdent des similarités structurelles avec les macrophages (Yeung et al., 1994), et expriment également des molécules spécifiques des macrophages, telles que CD44 et Mac-1 (Seiler et al., 1998). Il a également été suggéré que les cellules basales réagissent en présence d'autoantigènes spermatiques en augmentant l'expression d'antigènes de cellules immunitaires (Seiler et al., 2000). Chez des souris traitées avec l'aflatoxine, un xénobiotique spermatotoxique, des cellules épithéliales pâles et vacuolées ont été observées ; il a été suggéré que ces cellules

particulières sont en fait des cellules basales ayant phagocyté les débris de cellules principales adjacentes, ce qui permettrait de maintenir une protection pour les spermatozoïdes (Agnes and Akbarsha, 2001). Enfin, une étude menée sur les effets du chrome hexavalent sur l'épididyme a montré une augmentation du nombre de cellules basales et de la lipofuscine, un pigment composé de débris moléculaires, dans ces cellules (Aruldhas et al., 2006), ce qui suggère un rôle de protection des cellules basales.

Il faut néanmoins noter que la découverte ultérieure des cellules dendritiques (Da Silva et al., 2011) peut amener à penser que les caractéristiques immunitaires des cellules basales sont en réalité des caractéristiques de cellules dendritiques.

3.4.2. Protection contre le stress oxydant

Les cellules basales expriment sélectivement la sous-unité Yf de la glutathion-Stransférase (GST), une enzyme qui catalyse la conjugaison entre le glutathion réduit et les xénobiotiques électrophiles, dans le corps et la queue de l'épididyme chez le rat adulte (Hermo et al., 1994b). Elles pourraient ainsi jouer un rôle dans la suppression de molécules électrophiles véhiculées par le sang et ainsi protéger l'épithélium. L'enzyme superoxyde dismutase (SOD), qui protège contre le stress oxydant, est également présente dans les cellules basales humaines (Nonogaki et al., 1992).

3.4.3. Modulation des fonctions épithéliales épididymaires

3.4.3.1. Communication intercellulaire : les jonctions Gap dans les cellules basales

La connexine 43 a été la première identifiée dans l'épididyme (Cyr et al., 1996) et est localisée entre les cellules basales et principales, ainsi qu'entre les cellules claires et les cellules basales. Cela suggère que les cellules basales sont directement impliquées dans les fonctions de l'épithélium et dans la communication intercellulaire.

D'autres connexines sont exprimées dans l'épididyme. Pendant le développement postnatal du rat, la différenciation des cellules se passe entre les jours 16 et 44 (Hermo et al., 1992). La différenciation est corrélée aux niveaux de connexine 26, qui diminuent alors que les niveaux de connexine 32 et 31.1 augmentent. Ce changement existe aussi dans d'autres tissus tels que l'épiderme (Brissette et al., 1994). Il pourrait donc exister un lien entre l'apparition des cellules basales et les changements dans les niveaux de connexine pendant la différenciation.

3.4.3.2. Régulation des fonctions des cellules principales et des cellules claires

Un rôle de régulation des fonctions épithéliales de l'épididyme par les cellules basales a également été proposé.

Il a précédemment été montré que l'angiotensine II entraînait une accumulation de V-ATPase au niveau des cellules claires et la sécrétion d'ions H+ dans la lumière (Shum et al., 2008). L'angiotensine II est une hormone produite à partir de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion ACE. Il existe deux formes de cette enzyme, une somatique et une germinale (Corvol et al., 1995; Sibony et al., 1994). L'ACE testiculaire est liée aux spermatozoïdes sortant du testicule et relâchée dans le fluide luminal le long de l'épididyme (Gatti et al., 1999; Thimon et al., 2005). Le récepteur de l'angiotensine II (AGTR2) a précédemment été détecté dans les cellules basales de l'épididyme (Shum et al., 2011). Le modèle proposé est donc que l'angiotensine II se lie au récepteur AGTR2 sur les cellules basales. Cette liaison entraîne la synthèse de monoxyde d'azote NO, qui diffuse hors des cellules basales pour atteindre les cellules claires où il active une guanylate cyclase spécifique des cellules claires (Shum et al., 2008). L'élévation subséquente de GMPc entraîne l'accumulation de V-ATPase au niveau des microvillosités des cellules claires.

Les cellules basales sont également capables d'agir au niveau des cellules principales via la bradykinine, qui entraîne une augmentation de la sécrétion d'anions dans les cellules principales (Leung et al., 2004).

La sécrétion du liquide séminal est sous contrôle de facteurs hormonaux tels que la sérotonine, l'angiotensine, la vasopressine et l'endothéline, qui augmentent la sécrétion par production locale de prostaglandines. Ces prostaglandines sont formées par la cyclooxygénase 1 (Cox-1) qui est présente uniquement dans les cellules basales (Leung et al., 2004; Wong et al., 1999). L'apparition de la prostaglandine E2 (PGE2) dans la matrice extracellulaire entraîne une augmentation d'AMPc par le récepteur couplé aux protéines G EP2/4 ; l'AMPc active le canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) des cellules principales, ce qui entraîne une augmentation de la sécrétion d'anions et d'eau.

Les cellules basales pourraient donc « capter » l'environnement luminal de l'épididyme et moduler les fonctions épithéliales par un mécanisme impliquant la communication avec d'autres cellules épithéliales.

Enfin, les cellules basales sont en contact avec les cellules principales (Gregory et al., 2001). Par leurs granules sécrétoires, les cellules basales pourraient interagir avec les cellules principales pour réguler les fonctions de l'épithélium. La co-culture des cellules basales et principales montre que les cellules basales sont essentielles pour la régulation du transport d'électrolytes par la sécrétion de facteurs paracrines, et pour la régulation des fonctions des cellules principales par PGE2 (Cheung et al., 2005).

3.4.4. Participation à la barrière hémato-épididymaire par le biais de la tricelluline

Dans l'épididyme, les molécules d'adhésion sont pour la plupart localisées au niveau des cellules principales. Cependant, plusieurs protéines des jonctions serrées sont retrouvées dans les cellules basales et principales, comme α -caténine ou certaines claudines (Les claudines -1, -3, -4, et la claudine-8 dans le segment du corps) (Cyr et al., 2007). La claudine-1 se retrouve d'ailleurs en forte proportion dans les cellules basales (Gregory et al., 2001). Shum et al (2008) ont suggéré que l'expression des claudines par les cellules basales leur permet de se lier aux claudines de la barrière hémato-épididymaire et de traverser la barrière pour atteindre la lumière. Les cellules basales

pourraient également participer à la barrière hémato-épididymaire par le biais des jonctions tricellulaires et de la tricelluline.

3.4.5. Les cellules basales comme cellules progénitrices

Il a été établi que dans plusieurs épithéliums pseudostratifiés, tels que la trachée (Cole et al., 2010; Rock et al., 2009), la glande mammaire (Shackleton et al., 2006) et la prostate (Rizzo et al., 2005), certaines cellules basales sont des cellules progénitrices. Dans l'épididyme, la fonction de cellules souches des cellules basales n'a pas été démontrée. Plusieurs études ont suggéré que les cellules basales ne sont pas requises pour la différenciation des cellules principales, claires et étroites chez la souris (Murashima et al., 2011) et chez le rat (Shum et al., 2013; Shum et al., 2011). Il a en outre été montré que les cellules épididymaires expriment certains marqueurs de cellules souches telles que Oct4, Nanog ou Sox2 (Kristensen et al., 2010). Les cellules totales de l'épididyme peuvent également former des sphères en culture, ce qui est une caractéristique de cellules souches ou progénitrices (Kristensen et al., 2010).

3.5. Une limitation à l'étude des cellules basales : leur isolement

Dans la littérature, on peut retrouver plusieurs essais de séparation des cellules basales de l'épididyme. Ces isolements ont été faites par deux méthodes, les gradients de densité ou la séparation magnétique à l'aide d'un anticorps spécifique.

3.5.1. Isolement des cellules basales par gradients de densité

Le premier essai d'isolement des cellules basales a été fait par gradient de BSA (bovine serum albumine) dans des populations de spermatozoïdes, d'érythrocytes et de plusieurs types de cellules nucléées (Killian et al., 1976). Après digestion enzymatique de la tête de l'épididyme, les cellules obtenues ont été séparées selon leur taille et la pureté des populations obtenues a été vérifiée par microscopie. Selon cette étude, le

pourcentage de cellules basales obtenues dans la population correspondante était de 76%.

Par la suite, des cellules basales ont été isolées par élutriation à partir d'épididymes complets (Klinefelter and Amann, 1980). L''efficacité de ces méthodes a été vérifiée par microscopie électronique selon des caractéristiques de taille et de forme des organites et la pureté de la fraction basale a été estimée entre 76 et 82%.

En 1991, une méthode basée sur gradients de densité au Percoll est utilisée, mais ne permet de purifier que les cellules épithéliales de l'épididyme (Finaz et al., 1991).

3.5.2. Isolement des cellules basales par séparation magnétique

En 2005, une nouvelle méthode d'isolement des cellules basales est proposée, basée sur le principe de la séparation magnétique. Le marqueur utilisé pour procéder à cette isolement était Trpc3 (pour Transient receptor potential cation channel, subfamily C member 3), décrit comme spécifique aux cellules basales (Cheung et al., 2005). L'efficacité de cette séparation a été vérifiée par l'utilisation du marqueur de cellules basales Cox-1 et a permis d'obtenir une population de cellules basales pure à 86%.

3.6. Les cellules basales dans d'autres tissus

Les cellules basales sont une caractéristique commune aux épithéliums pseudostratifiés comme celles des voies aériennes supérieures, la prostate et la glande mammaire. La comparaison des cellules basales de ces différents tissus permet de rechercher des caractéristiques communes à ces cellules, et de dégager d'éventuelles fonctions partagées.
3.6.1. Les cellules basales de la prostate

L'épithélium de la prostate est de type pseudostratifié et est composé de trois types cellulaires : les cellules basales, les cellules luminales et de rares cellules neuroendocrines.

Dans la prostate, les cellules basales sont caractérises par plusieurs marqueurs, tels que les KRT5 et 14, CD44, les intégrines $\alpha 6$ (ITGA6) et $\beta 1$, et le facteur de transcription p63 (Signoretti et al., 2005). Les cellules basales sont généralement considérées comme androgènes-indépendantes, bien que certaines études aient montré que le récepteur aux androgènes est présent mais en très faible quantité dans ces cellules (Bonkhoff et al., 1998; Wang et al., 2006). Les cellules luminales expriment les KRT8 et 18, le récepteur aux androgènes et l'antigène prostatique spécifique (PSA pour prostate specific antigen).

Chez l'humain et la souris, plusieurs études ont montré que certaines cellules basales sont capables de se différencier en cellules luminales et en cellules neuroendocrines (Burger et al., 2005; Lawson et al., 2007; Zhang et al., 2011).

Les cellules basales ont tout d'abord été suggérées comme étant des cellules souches à cause de leur résistance à l'absence d'androgènes (Isaacs and Kyprianou, 1987). Ensuite, il a été montré que le facteur de transcription p63, exprimé dans les cellules basales, est indispensable au développement de la prostate. En effet, des souris invalidées pour le gène p63 ne développent pas de prostate (Signoretti et al., 2000), ce qui suggère fortement une défaillance dans le maintien des cellules souches. Cela amène à émettre l'hypothèse qu'au moins certaines cellules basales sont des cellules souches.

Cette hypothèse de sous-population de cellules basales a été étudiée à l'aide de plusieurs marqueurs spécifiques. Goldstein et al. (2008) ont montré que Trop2 permettait de distinguer les cellules basales ayant une capacité progénitrice. De même, CD49f (ou ITGA6) permet d'isoler des cellules progénitrices capables de former des sphères (Garraway et al., 2010; Guo et al., 2012), comme Epcam (Guo et al., 2012), l'aldéhyde déshydrogénase (Burger et al., 2009) ou CD44 (Garraway et al., 2010).

Si le rôle progéniteur de certaines cellules basales est avéré, deux modèles de différenciation ont été suggérés dans la prostate : un modèle ou les cellules souches de la couche basale peuvent se différencier en cellules luminales matures (Lawson and Witte, 2007; Litvinov et al., 2006), et un modèle ramifié ou une sous-population de cellules basales peut former des cellules basales, luminales ou neuro-endocrines (Goldstein et al., 2008). Il faut noter que des cellules «intermédiaires» ont été identifiées dans l'épithélium prostatique. Ces cellules expriment à la fois KRT5 et 18, et pourraient représenter des cellules en cours de différenciation vers un phénotype luminal (Xue et al., 1998). De même, des cellules expriment KRT19 ont été identifiées à la fois dans la couche basale et la couche luminale, ce qui renforce l'hypothèse de l'existence de cellules «intermédiaires» (Hudson et al., 2001).

Plusieurs voies de signalisation interviennent dans la régulation des cellules basales de la prostate. L'induction de la voie de signalisation Wnt in vitro entraîne l'apparition de sphères de cellules qui expriment KRT5, KRT8 et p63 (Shahi et al., 2011). La voie de signalisation Sonic Hedgehog est importante pour la croissance et la différenciation des cellules de la prostate (Freestone et al., 2003). Enfin, la voie de signalisation Notch est essentielle au développement et la différenciation de la prostate et Notch1 est exprimé par les cellules basales (Brown et al., 2007; Shou et al., 2001).

La prostate est un organe qui peut être le siège de plusieurs types de cancer. Les cellules luminales sont généralement considérées comme les cellules à l'origine des tumeurs (Okada et al., 1992; Parsons et al., 2001), à cause de l'absence dans les tumeurs de marqueurs de cellules basales (Wojno and Epstein, 1995). Récemment cependant, il a été suggéré que l'initiation de la cancérogenèse dans la prostate chez la souris pourrait impliquer les cellules basales aussi bien que les cellules luminales (Iwata et al., 2010; Lawson et al., 2010; Ma et al., 2005; Wang et al., 2009). Une étude en 2013 a confirmé que les cellules basales peuvent former des tumeurs qui acquièrent un phénotype luminal ; cependant, il existe une signature moléculaire distincte et une différence d'agressivité entre les tumeurs d'origine luminale et celles d'origine basale. Il semble en effet que les tumeurs d'origine basale soient moins agressives et de meilleur pronostic que les tumeurs d'origine luminale (Wang et al., 2013b). Cependant, de nouvelles études viennent

contredire ces résultats en suggérant au contraire que les carcinomes prostatiques d'origine basale sont plus agressifs que ceux d'origine luminale (Simper et al., 2015).

3.6.2. Les cellules basales de la trachée

L'épithélium de la trachée contient trois types de cellules : les cellules basales, les cellules luminales sécrétoires et les cellules luminales ciliées (Rock et al., 2010). Des études utilisant des souris transgéniques ont permis de démontrer que les cellules basales de la trachée contiennent des cellules souches capables de s'autorenouveler et impliquées dans la croissance, l'homéostasie et la réparation des tissus (Cole et al., 2010; Rock et al., 2009).

L'étude de marqueurs spécifiques ont permis de différencier plusieurs population de cellules basales. Par exemple, seules certaines cellules basales expriment la KRT14, et il a été suggéré que cette sous-population représente des cellules unipotentes capables d'auto-renouvellement et impliquées dans l'homéostasie tissulaire (Ghosh et al., 2011a). Une autre sous-population a été proposée comme impliquée dans la réparation de l'épithélium après lésion (Ghosh et al., 2011a; Hong et al., 2004). Certaines cellules basales ont également été décrites comme capable de proliférer et de se différentier en cellules luminales exprimant la KRT8 tout en perdant l'expression de p63, via la voie de signalisation Notch (Paul et al., 2014; Rock et al., 2011). En confirmation, il a été montré qu'une sous-population de cellules basales, représentant environ 12% des cellules basales totales, semblent faiblement différenciées et sont capables de régénérer l'épithélium après lésion (Pardo-Saganta et al., 2015). De plus, une population appelée «cellules para-basales» a récemment été identifiée, représentant environ 25% des cellules basales totales. Ces cellules expriment à la fois KRT5 et KRT8 et seraient les précurseurs des cellules luminales et leur nombre est régulé par la voie de signalisation Notch (Mori et al., 2015).

Plusieurs facteurs ont été identifiés comme jouant un rôle dans la régulation des cellules basales des voies aériennes supérieures. L'epidermal growth factor (EGF), l'insuline, le fibroblast growth factor 7 (FGF7) ont des capacités mitogènes sur les cellules

basales (Lechner et al., 1981; Michelson et al., 1999; Wu et al., 1990) tandis que les interleukines 4 et 13 stimulent la différenciation en cellules sécrétoires (White et al., 2010). L'acide rétinoïque quant à lui semble promouvoir la différenciation en cellules luminales ciliées ou sécrétoires (Wu et al., 1997).

3.6.3. Les cellules basales de la glande mammaire

La glande mammaire est formée d'une couche intérieure de cellules luminales qui entourent les alvéoles et sont des cellules sécrétoires, et d'une couche extérieure de cellules basales, également appelées cellules myoépithéliales. Ces cellules ont des caractéristiques à la fois de cellules musculaires et de cellules épithéliales et sont responsables entre autres de l'éjection du lait. Ces caractéristiques contractiles sont acquises pendant le développement postnatal chez le rat (Deugnier et al., 1995), et ces changements sont accompagnés de modifications des systèmes d'adhésion comme des variations dans l'expression d'intégrines et de laminines (Deugnier et al., 1995). Chez l'adulte, les cellules luminales expriment les KRT8 et 18, et les marqueurs Epcam et MUC1, tandis que les cellules basales expriment la KRT14 et l'ITGA6 (Stingl et al., 2001). p63 est également exprimé uniquement dans les cellules basales (Barbareschi et al., 2001), de même que P-cad (Radice et al., 1997).

La régulation de la morphologie et de la fonction des cellules basales fait appel à de nombreuses molécules. EGFR notamment est fortement exprimé dans les cellules basales par rapport aux cellules luminales (Coleman et al., 1988; Moller et al., 1989), ce qui suggère un rôle important de la voie de signalisation de EGFR dans la régulation et le contrôle du phénotype basal. FGF2 semble également un facteur important de régulation (Gomm et al., 1997), de même que la voie de signalisation Wnt (Buhler et al., 1993).

Des études en microscopie électronique ont montré qu'en plus de ces cellules myoépithéliales, on retrouvait également d'autres cellules moins différenciées, qui pourraient représenter des cellules progénitrices (Smith and Medina, 1988). Par la suite, il a été montré que des cellules avec un phénotype basal (exprimant notamment KRT5 et l'ITGA6) sont capables de former des sphères (Dontu et al., 2003).

En 2006, les différentes populations cellulaires de l'épithélium de la glande mammaire ont pu être purifiées par cytométrie en flux (Shackleton et al., 2006; Sleeman et al., 2006; Stingl et al., 2006a). Les cellules basales expriment ainsi fortement les intégrines α 6 et β 1, alors que les cellules luminales expriment fortement le marqueur CD24. De plus, il existe deux populations distinctes parmi les cellules luminales, définies par la présence ou l'absence du marqueur Sca-1 (Sleeman et al., 2006; Sleeman et al., 2007). Les cellules luminales positives pour Sca-1 expriment le récepteur aux œstrogènes Er α . Les essais de transplantation des populations purifiées dans un coussin adipeux dépourvus de glande mammaire endogènes chez des souris prépubères ont montré que seules les cellules basales étaient capables de régénérer une glande mammaire comprenant des canaux et des alvéoles (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006a). De plus, ces études ont montré que le potentiel de régénération des cellules basales était maintenu à long terme. Ces travaux ont conclu que les cellules souches de la glande mammaire étaient localisées dans le compartiment basal et que ces cellules n'expriment pas les récepteurs hormonaux.

Des expériences plus récentes d'études de lignage des cellules ont montré qu'au cours du développement de la glande mammaire, les compartiments basal et luminal dérivent de cellules progénitrices qui expriment les marqueurs des deux types cellulaires (van Amerongen et al., 2012; Van Keymeulen et al., 2011). Ces cellules sont capables de régénérer un lobule complet (Rios et al., 2014; Van Keymeulen et al., 2011). Cependant, il semble que les cellules luminales ne sont pas capables de se différencier en cellules basales dans la glande mammaire normale (Rios et al., 2014; Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006a). Cependant, un stress oncogénique peut induire cette transformation (Hein et al., 2015).

La plupart des carcinomes mammaires ont pour origine une cellule luminale (Petersen et al., 2001). Les cellules basales mammaires sont d'ailleurs connues pour avoir un potentiel suppresseur de tumeur (Sternlicht et al., 1997). Cependant, il a été découvert que certaines tumeurs mammaires ont un phénotype basal ; ces tumeurs sont plus agressives et sont de moins bon pronostic que les tumeurs d'origine luminale (Jones et al., 2001; Perou et al., 2000). Par la suite, il a été montré que certains cancers ont un profil d'expression à la fois basal et luminal (Abd El-Rehim et al., 2004).

Dans la glande mammaire, plusieurs voies de signalisation ont été proposées comme impliquées dans les fonctions de cellules souches des cellules basales, notamment Wnt/β-caténine (Liu et al., 2004), Notch (Dontu et al., 2004) et Sonic Hedgehog (Garcia-Zaragoza et al., 2012). Il a également été suggéré que la voie de signalisation de l'EGF est responsable du développement des cellules BC44, qui sont des cellules épithéliales exprimant des margueurs de cellules basales (Deugnier et al., 2002).

3.6.4. Caractéristiques communes aux cellules basales des autres tissus

Les cellules basales de la prostate, de la trachée et de la glande mammaire possèdent donc certaines caractéristiques communes. Dans ces trois tissus, elles présentent des propriétés de cellules souches progénitrices et sont capables de se différencier en d'autres types cellulaires pour régénérer l'épithélium (Barclay et al., 2008; Cole et al., 2010; Guo et al., 2012; Prater et al., 2014; Rock et al., 2009). De plus, dans chaque tissu, les cellules basales peuvent être les cellules à l'origine de tumeurs (Ribeiro-Silva et al., 2005; Rock et al., 2010; Wang et al., 2013b).

HYPOTHESE DE RECHERCHE

A la suite de cette revue de la littérature, il est évident que l'épididyme joue un rôle fondamental dans l'acquisition de la fertilité mâle et que la régulation de son développement et de ses fonctions est complexe. L'isolement du compartiment luminal est critique pour la maturation des spermatozoïdes et se fait grâce à la barrière hématoépididymaire, composée de jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Cette barrière, en plus de former un compartiment étanche au niveau de la lumière, permet en outre la création et le maintien d'une polarité cellulaire entre les domaines baso-latéral et apical des cellules, ainsi qu'une perméabilité sélective pour les ions, l'eau et les protéines. Si les jonctions bicellulaires de la barrière hémato-épididymaire sont connues depuis plusieurs décennies, la jonction tripartite, l'expression de la tricelluline dans l'épididyme et la participation des cellules basales à cette jonction n'ont jamais été étudiées.

Les cellules basales font partie des différents types cellulaires retrouvés dans l'épithélium épididymaire. Elles sont localisées à la base de l'épithélium et ont des projections latérales qui forment une structure en panier. Il a été précédemment noté que ces cellules ont également des projections qui s'étendent en direction de la lumière de l'épididyme. Il n'y a actuellement que peu d'informations sur la fonction des cellules basales dans l'épididyme, à cause de la difficulté à les isoler pour obtenir une population pure de cellules basales. Plusieurs suggestions quant à leur rôle ont cependant été faites. Il a notamment été proposé que les cellules basales sont d'important régulateurs de la fonction des cellules adjacentes, en régulant la V-ATPase des cellules claires par le relargage d'oxyde nitrique, ou en agissant sur le transport d'ions chlore par les cellules principales *via* la sécrétion de prostaglandines.

Basée sur ces constatations, notre hypothèse était que les cellules basales jouent un rôle important dans les fonctions de l'épididyme. L'objectif principal de cette thèse de doctorat était d'isoler et de caractériser les cellules basales, en se serant potentiellement de la participation de la cellule basale à la jonction tricellulaire via la tricelluline. Pour cela, trois sous-objectifs étaient nécessaires : (1) Etudier l'expression et la localisation de la tricelluline dans l'épididyme à l'âge adulte et pendant le développement, ainsi que le lien entre la jonction tricellulaire et la cellule basale. (2) Développer un protocole d'isolement des cellules basales de l'épididyme. (3) Etudier le profil d'expression génique des cellules basales et en déduire leurs principales voies de signalisation.

L'étude de la tricelluline dans l'épididyme constitue le premier chapitre de la seconde partie de cette thèse, tandis que les deuxième et troisième sous-objectifs ont été regroupés dans un deuxième chapitre.

DEUXIEME PARTIE

ARTICLES

SECONDE PARTIE, SECTION 1

TRICELLULIN AND ITS ROLE IN THE EPIDIDYMAL EPITHELIUM OF THE RAT

Marion Mandon, Daniel G. Cyr

Biology of Reproduction, 92(3), 2015

1.1. Résumé de l'article en français

La tricelluline est une protéine de jonction serrée présente au niveau des jonctions serrées tricellulaires. Il a été suggéré que les cellules basales sont impliquées dans la barrière hémato-épididymaire. Les cellules basales expriment des claudines, qui sont des composantes des jonctions serrées. Cependant, il n'existe pas d'information sur l'architecture ou la régulation des interactions entre cellules basales et cellules principales. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer l'expression et la localisation de la tricelluline dans l'épididyme de rat en relation avec l'occludine, les interactions entre cellules basales et cellules principales et d'autres protéines de jonction. Les niveaux de tricelluline étaient similaires dans tous les segments de l'épididyme chez l'adulte et la protéine était localisée à la région apicale de l'épithélium. L'étude de développement postnatal a montré que les niveaux de tricelluline augmentaient avec l'âge et que la localisation passait de cytoplasmique à membranaire selon l'âge. La colocalisation avec l'occludine a indiqué que bien que les deux protéines sont présentes dans la région de la jonction serrée, dans le segment initial les protéines ne sont pas colocalisées, au contraire des autres régions de l'épididyme. La tricelluline n'a pas non plus été montrée comme colocalisant avec KRT5, un marqueur des cellules basales, dans aucune région de l'épididyme, même dans le corps et la queue où des projections apicales de cellules basales sont présentes. Les études de baisse d'expression de la tricelluline par ARN interférent dans des cellules épididymaires RCE ont montré une diminution de la résistance transépithéliale et une corrélation avec une diminution des niveaux de

claudine-3, claudine-1 et occludine. Les niveaux de ZO-1 et de cadhérine-1 ont été inchangés. Il s'agit de la première étude sur la tricelluline et l'interaction entre la tricelluline et d'autres protéines de jonction dans l'épididyme.

1.2. Contribution des auteurs

L'étudiante (Marion Mandon) a participé à la conception de l'étude. Elle a réalisé toutes les expériences présentées dans cet article, a participé à l'analyse critique des données. La première version de l'article a également été écrite par l'étudiante. Finalement, l'étudiante a participé à la version finale de l'article en apportant les corrections nécessaires et en participant au choix de journal de publication.

Le directeur de recherches (Daniel G. Cyr) a participé à la conception de l'étude, à l'analyse critique des données, et à l'écriture et la correction du manuscrit ainsi qu'au choix du journal de publication.

Tricellulin and its Role in the Epididymal Epithelium of the Rat

Marion Mandon and Daniel G. Cyr INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada, H2V1B7

<u>Running title:</u> Role of tricellulin in the blood-epididymis barrier

<u>Summary sentence</u>: Tricellulin is an essential protein for the function of the blood-epididymal barrier and appear to be implicated in principal-basal cells interactions.

Keywords: tricellulin, claudins, tight junctions, basal cells, epididymis

<u>Grant support:</u> This work was supported by a CIHR operating grant 84576 to DGC. MM was the recipient of a studentship from the Fondation Armand-Frappier

<u>Conference presentation:</u> This work was presented in part at the Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR), July 2013, Montreal, QC, Canada.

ABSTRACT

Tricellulin is a tight junction protein present at tricellular tight junctions. It has been suggested that basal cells are implicated in the blood-epididymis barrier (BEB). Basal cells express claudins (Cldns), a component of tight junctions: however, there is no information regarding the potential architecture or regulation of basal cell-principal cell interactions. The present objectives were to determine the expression and localization of tricellulin in rat epididymis in relation to occludin, basal cell-principal cell interactions and other junctional proteins. Tricellulin levels were similar in all segments of the adult epididymis and the protein was localized to the apical region of the epithelium. Postnatal development showed that tricellulin levels increased with age and localization changed from cytoplasmic to membrane-bound as a function of age. Co-localization with occludin indicated that while both proteins are in the region of the tight junction. In the initial segment the proteins did not co-localized as compared to region of the epididymis where they were both co-localized. Tricellulin did not co-localized with cytokeratin5, a marker of basal cells, in any region of the epididymis including the corpus and cauda epididymidis, where apical projections of basal cells were apparent. Tricellulin knock-down studies using siRNA in epididymal RCE cells resulted in decreased transepithelial resistance and was correlated with decreased levels of Cldn3, Cldn1 and occludin. Tight junction protein1 (also known as ZO-1) and cadherin1 levels were unchanged. This is the first report of tricellulin in the epididymis and on the interaction between tricellulin and other tight junction proteins.

INTRODUCTION

In the epididymis, the tight junctions between adjacent epithelial cells that line the lumen of the epididymis form a tissue barrier that is commonly referred to as the blood-epididymis barrier (BEB) [1]. The tight junctions in the epididymis are created during embryonic development and become less permeable during postnatal development [2]. In mink (*Mustela vison*), the barrier appears to be impermeable to lanthanum by the time of birth [3]. The BEB is associated with the protection of sperm from the immune system and provides a unique environment in the epididymal lumen that is critical for sperm maturation [4]. In addition to its barrier function, other components the BEB are involved in ion movement across the epithelium, secretion of small molecules, transport and excretion of molecules from epithelial cells, and as wells as immunoprotective properties [5-8].

Tight junctions of the epididymis are comprised of occludin and a large number of different claudins (CLDNS) [9, 10]. Human studies have reported that both obstructive and non-obstructive azoospermia is associated with a loss of CLDNS [11]. Furthermore, while the human epididymis contains a large number of CLDNS, the loss of a single CLDN is sufficient to cause a loss in the integrity of the tight junction and thus compromise the blood-epididymis barrier [11]. The localization and levels of various CLDNS have been shown to vary as a function of development; these levels may be regulated by the endocrine system and by cytokines [5].

The epithelium of the epididymis is composed of multiple cell types. These include epithelial principal cells, basal cells, clear cells, narrow cells and apical cells. Principal cells are responsible mainly for fluid transport and secretion/reabsorption [12, 13]. Apical, narrow and clear cells play a role in acidification of intraluminal fluid [14-16]. Basal cells are present at the base of the epithelium and have been implicated in regulation of principal cell functions [17, 18], and immune defense [19-22]. Recent studies have reported that dendritic cells are also present in the epithelium and that the immune functions attributed to basal cells may in fact be attributable to dendritic cells [23]. Whether or not this is the case, remains to be demonstrated. It has been reported that basal cells have both basal and apical projections [24, 25], and the latter have been shown to reach the lumen of the epididymis [25]. It has been suggested that these apical projections can

cross the blood-epididymis barrier. In addition to bicellular junctions, which are formed by occludin and CLDNS, studies have shown that cells can form tri-partite tight junctions and that these are mediated by a protein termed tricellulin, or MarvelD2 [26]. Tricellulin lies at the three corner contact sites of epithelial cells [26]. This protein contains a tetra-spanning MARVEL domain (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link) and has 32% homology with occludin [26]. Tricellulin has been identified in epithelial cells of the intestine, stomach, kidney [27], as well as in the stratified epithelium of epidermis [28], pancreatic duct epithelial cells [29], nasal epithelial cells [30] and immune cells [31]. Tricellulin is also necessary for hearing as mutations in tricellulin can lead to sensorial deafness [32]. There are no studies to date regarding the presence of tricellulin in the epididymis, or its role in mediating tight junctions between basal and principal cells.

The objective of this study was to determine the presence and localization of tricellulin in the rat epididymis, to determine whether or not it is regulated as a function of postnatal development, and to assess its role in the maintenance of epididymal tight junctions, using an *in vitro* approach.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Protocols

Animals: Male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Laboratories, Inc. (St. Constant, Canada). Different ages (14, 21, 42, 56 and 91 days postnatally; n=3-4 animals per age) were selected, based on the morphological and physiological development of the epididymis. By day 14, the blood-epididymis barrier is not complete and the epithelial cells are largely undifferentiated [33]; whereas by day 21, epithelial cells have differentiated into columnar principal cells, and the tight junctions are impermeable to lanthanum throughout the epididymis [34]. Rat epididymal epithelial cells are fully differentiated and testosterone levels have reached adult levels by day 42, but there are no spermatozoa in epididymis [33]. By day 56, spermatozoa are present throughout the epididymis [35]; day 91 is considered adult.

Rats were maintained under a constant photoperiod of 12h of light, 12h of darkness and received food and water *ad libitum*. At the time of sampling, rats were anaesthetized with CO₂ and killed by cervical dislocation. Depending on the experiment, epididymides were dissected and subdivided into either four (initial segment, caput, corpus and cauda) or two separate regions (initial segment-caput-corpus and cauda). Tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -86°C, or frozen in OCT compound for cryosections (Fisher Scientific, Ottawa, ON) on dry ice and stored at -86°C until sectioning. All animal protocols used in this study were approved by the university animal care committee.

Cell Culture

Rat caput epididymal principal cells (RCE) [36] were grown on 35mm petri dishes coated with 5% mouse collagen IV (BD Biosciences, Mississauga, ON) in Dulbecco's modified Eagle's medium/HAM F12 culture medium containing antibiotics (50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin), L-glutamine (2mM) and nutrients (10 μ g/mL insulin; 10 μ g/mL transferrin; 80ng/mL hydrocortisone; 10ng/mL epidermal growth factor; 10ng/mL cAMP and 5nM testosterone) at 32°C in a humidified chamber with 5% CO₂ (Dufresne et al., 2005).

Immunofluorescence

Cryopreserved rat epididymides were sectioned (10µm) with a cryostat and fixed in ice cold methanol for 20 min. at -20°C. After rehydration in PBS-Tween (0.05%), the sections were permeabilized in a solution of 0.3% Triton X-100 in PBS at room temperature for 20 min. Sections were blocked with PBS-BSA (5%) for 30 min. Sections were then incubated with a polyclonal anti-tricellulin antibody (1.25µg/mL; Life Technologies Inc., Burlington, ON) diluted in blocking solution at 4°C overnight, washed three times with PBS-Tween, and subsequently incubated with an anti-rabbit Alexa 488 (green) conjugated secondary antibody (20µg/mL, Life Technologies) at 37°C for 1h. Finally, sections were washed twice with PBS-Tween and once with PBS and mounted with Vectastain mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories, Burlington, ON). Sections were examined under a Leica DMRE microscope (Leica Microsystems, Inc, Concord, ON).

Co-localization experiments were done using cryosections prepared in the same fashion as described above. Sections were incubated with anti-tricellulin antisera (1.25 μ g/mL) overnight at 4°C, rinsed in PBS and subsequently incubated for 1 hr. at 37°C with Alexa 488-conjugated anti-rabbit antisera (20 μ g/mL; Life Technologies). Sections were then rinsed three times in PBS-Tween and incubated with one of the second primary antibodies: anti-occludin monoclonal antibody (1 μ g/mL; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) or anti-cytokeratin V monoclonal antibody (1 μ g/mL; Santa Cruz Biotechnology). Incubations were carried out for 2 hrs. at room temperature. Sections were subsequently washed three times in PBS-Tween and incubated for 1 hr. at 37°C with an Alexa 594 conjugated anti-mouse secondary antibody (20 μ g/mL; Life Technologies). Finally, sections were washed three times in PBS and mounted with Vectastain containing DAPI (Vector Laboratories). Sections were examined with a Leica DMRE fluorescent microscope.

Three-dimensional confocal microscopy was done using cryopreserved epididymal sections (20uM). Tissue sections were prepared in the same fashion as for fluorescent microscopy with the exception that lower antibody concentrations of anti-tricellulin and secondary were used (0.25ug/L, anti-tricellulin; 0.25ug/L Alexa 488-conjugated anti-rabbit

antisera). Nuclei were stained with Hoechst dye (1ug/ml) (Biotium, Hayward, CA) and mounted with Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL). Sections were examined under a Zeiss LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss Canada Ltée, Toronto, ON) and the data was analyzed using the Zen software (Zeiss). Movies were created with 150 total frames. Z-stack images were then exported in TIFF or AVI format.

Western Blots

Cells and tissues were lysed in cold RIPA lysis buffer (PBS, Igepal 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%) supplemented with 100ug/mL phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO), 100uM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich), a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and a phosphatase inhibitor cocktail (PhosStop 1X, Roche, Laval, QC). Samples were homogenized, briefly sonicated, and centrifuged at 10 000g at 4°C for 10 min to remove cellular debris. The supernatants were collected and protein concentrations were measured using a Pierce BCA Protein assay kit (Thermo Scientific, Waltham, MA). Proteins (50ug) were diluted in Laemmli loading buffer (60mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue), heated at 95°C for 5 min and loaded onto a 6, 10 or 15% polyacrylamide gel for separation by electrophoresis (140V) for 1hr. Proteins were then transferred onto a PVDF membrane at 25V and 2.5A for 10 min. (Turbo-Blotter, Bio-Rad, Mississauga, ON). The resulting blots were stained with 0.6% Ponceau red S to evaluate transfer efficiency. Membranes were blocked 1hr at room temperature with 5% non-fat dry milk diluted in Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5) and subsequently incubated overnight at 4°C or 2h at room temperature with either a polyclonal anti-tricellulin rabbit (1.25µg/mL, Life Technologies), a monoclonal antioccludin mouse antibody (1µg/mL, Santa Cruz Biotechnology), a rabbit polyclonal anticlaudin-3 (1.25µg/mL, Santa Cruz Biotechnology), a rabbit polyclonal anti-claudin-1 (1µg/mL, Life technologies), a rabbit polyclonal anti-cadherin1 (1µg/mL, Santa Cruz Biotechnology), or a rabbit polyclonal anti-zonula occludens-1 (0.5µg/mL, Life Technologies). Membranes were then washed three times in TBS with 0.05% Tween-20 (Fisher Scientific) for 10 min and probed with HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antisera (130ng/mL, Santa Cruz Biotechnology). The membranes were once again washed three times for 10 min in TBST. Detection was done using the Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Mississauga, ON) according to the manufacturer's instructions, and visualized using a Chemidoc scanner (Bio-Rad). Protein levels in each lane were normalized using a rabbit polyclonal anti-tubulin antibody (60ng/mL; Life Technologies).

Small Interfering RNA (siRNA)

Small interference RNAs (siRNA; 1.0μ M) against rat tricellulin (NM_001108936, XM_001062343, XM_345145; Qiagen, Toronto, ON) and a nonsense siRNA (Qiagen) were transfected into RCE cells cultured in DMEM on collagen IV-coated glass chamber slides (BD Biosciences) using Hi-Perfect Transfection Reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Cells were cultured for 48h under normal culture conditions (32°C and 5% CO₂), and then lysed for western blot analysis.

Transepithelial Resistance

RCE cells were seeded at a density of 5 x 10^4 cells/ml on Costar Transwell 12-mm cell culture inserts (polyester membrane; pore size 0.4 µm; Corning, New-York, USA) coated with mouse collagen IV (BD Biosciences) and cultured in DMEM/HAM's F12 culture medium containing antibiotics (50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin), 2 mM L-glutamine and 5% FBS. Cells were seeded onto inserts at the time of transfection and, once confluent, were exposed to 1.8 mM CaCl₂ for 48 hrs. Transepithelial resistance (TER) was measured in quadruplicate wells at regular intervals for 48h using an EVOM2 epithelial volt-ohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). TER was normalized to the area of the filter, after removal of background resistance of a blank filter that contained only medium, and calculated as Ohms x cm².

MTT Assay

Aliquots of 2500 cells per well were plated in 24-well culture plates coated with collagen IV. The number of cells was determined using Trypan blue staining and a hemocytometer (Invitrogen Inc.). The next day, once the cells had adhered, medium was changed, and this first time point was assigned as time zero. Each time point was done in

triplicate. Medium was changed every 24h. At different time points, the culture medium was removed from three of the wells and replaced with 20 μ l methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) solution (Sigma-Aldrich; 0.5 mg/ml in culture medium) to measure cellular proliferation (Dufresne et al., 2005). After 2.5hrs, the MTT solution was removed and the formazan crystals were solubilized in 200 μ l dimethylsulfoxide. Absorbance (570nm) was measured using a microtiter plate reader (Power Wave X; Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT).

Statistics

Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using a T-Test, or a one- or two-way ANOVA when appropriate. Significance was established as P \leq 0.05. For comparisons of protein expression by western blot analysis, a Student-Newman-Keuhls test for multiple comparisons or Dunnett test was done. For comparisons of TER, a Bonferroni post-hoc test was used. All analyses were performed using the GraphPadPrism Software (San Diego, CA).

RESULTS

Expression and localization of tricellulin in adult rat epididymis

To determine whether or not tricellulin was expressed in the epididymis, and to determine if levels were similar throughout the epididymis, western blot analyses were performed on the different segments (initial segment, caput, corpus and cauda) of adult rat epididymis (91 days, n=4). The results revealed that tricellulin was expressed in all segments of the epididymis, and that protein levels were similar between the different segments (Fig 1A). Tricellulin was localized to the apical margins of adjacent epididymal epithelial cells throughout the epididymis (Fig 1B, supplemental movie 1). The pattern of punctate immunostaining and localization of tricellulin remained consistent throughout the epididymis (Fig 1B).



Figure 1. Expression of tricellulin in the adult rat epididymis. A. Western blot analysis of tricellulin in the different segments (initial segment, caput, corpus, and cauda) of adult rat epididymis. Tricellulin levels were similar in all regions of the epididymis. Ticellulin level were normalized to α -tubulin which was used as a loading control. Data is expressed as the mean \pm SEM (n=4). B. Photomicrographs of tricellulin immunofluorescent localization in the different segments of the adult rat epididymis. Tricellulin (green; yellow arrow) was localized to the apical region of the epithelium in all region of the epididymis (A-initial segment; B-caput; C-corpus; D-cauda). A tripunctate tricellulin stining pattern was oberved (corpus inset) in the certain areas of the caput, corpus and cauda epididymidis. Nuclei were stained with DAPI (Blue). A dotted yellow line in the panel of the initial segment displays the area of a typical principal cell. P= principal cell; B=basal cell; L = lumen. S=Sperm

Levels and localization of Tricellulin during Postnatal Development

To correlate the expression and the localization of tricellulin with the development of the male reproductive tract, western blot analyses and immunofluorescent microscopy were done. Western blots analyses showed that tricellulin is already present at day 14, and that the levels increased as a function of age and peaked in the adult rat. The pattern of tricellulin levels as a function of age was similar in both the proximal and distal (cauda) regions of the epididymis (Fig. 2A and B).

Immunofluorescent microscopy showed differences in the localization of tricellulin during development. At day 14, the immunostaining was present both along the apical region of the epithelium as well as in the cytoplasm throughout the epididymis. At day 21, tricellulin was localized to the lateral margins of the plasma membranes of adjacent cells, although some cytoplasmic staining remained, especially in the initial segment. At day 42, the immunostaining was apical along the plasma membrane and became somewhat more intense by day 56, when the immunostaining was similar to that observed in the adult rat (Fig. 3) in all regions of the epididymis.

Colocalization of tricellulin and occludin

Merged images of occludin and tricellulin indicated that in the initial segment of the adult rat epididymis, tricellulin and occludin did not co-localize even though both proteins were present in the area of the blood-epididymis barrier (Fig. 4A). In other regions of the epididymis, both occludin and tricellulin co-localized in the region of the tight-junction of the blood-epididymis barrier, although some occludin immunostaining occurred independently of tricellulin (Fig. 4B-D). Vertical and horizontal sectional images were extensively analyzed using Z-stacked images generated by laser-scanning confocal microscopy. Three-dimensional reconstruction of epididymis was done using stacked images and the Ortho function in the Zen software (Zeiss). These data confirmed the colocalization of tricellulin with occludin in caput, corpus and cauda epididymidis, and showed that in the initial segment, there was greater separation of signal between tricellulin and occludin (Fig 5).



Figure 2. Expression of tricellulin at different ages. Western blot analyses of tricellulin in epididymidis from rats of 14, 21, 42 and 91 days of age was done. Epididymides were divided into two regions: proximal (initial segment, caput and corpus; upper panel) and distal (cauda; lower panel) region. Tricellulin levels were normalized to α -tubulin which was used as a loading control. Data are expressed as the mean ± SEM (n=4). Groups with the same letter indicate a statistical difference (p ≤ 0.05; ANOVA).



Figure 3. Immunolocalization of tricellulin during epididymal development. Photomicrographs of immunofluorescent localization of tricellulin (green) in the initial segment (IS), caput (CT), corpus (CS) and cauda (CA) epididymidis. At 14 days the blood-epididymis barrier tricellulin was present along the apical region of the epithelium as well in the cytoplasm of the cells lining the lumen (yellow arrow). At 21 days of age tricellulin was localized to the lateral margins of the plasma membrane, although there is still some staining in the cytoplasm, in particular in the initial segment (yellow arrow). By day 42 tricellulin was localized primarily to the apical lateral plasma membrane of the epithelium (yellow arrow). At day 56, the immunostaining appears more intense and localized to the apical lateral plasma membrane (yellow arrow). Nuclei are stained with Hoechst dye (blue). L-lumen; E-epithelium; P-principal cells; B-basal cells.

Co-localization of tricellulin and KRT5

Previous studies have reported that apical projections of basal cells could cross the tight junctions of the blood-epididymis barrier to reach the lumen of the epididymis in the corpus and cauda epididymidis [25]. To determine whether or not tricellulin was localized at contact points between basal and principal cells, co-localization experiments were done with tricellulin and cytokeratin 5 (KRT5), a marker of basal cells [37, 38].

In the initial segment and caput epididymidis, no apical projections of basal cells were detected and, as such, tricellulin and KRT5 were not co-localized (Fig. 6). In the corpus and cauda epididymidis, however, basal cell projections were observed, as previously reported [21]. Tricellulin and KRT5 were not co-localized at the sites where basal cells reached the apical region of the epithelium, suggesting that basal cells do not form tripartite cellular junctions with principal cells in the area of the tight junction (Fig. 6). Three-dimensional reconstructions confirmed the absence of colocalization between tricellulin and KRT5 in corpus and cauda where there were cytoplasmic projections of basal cells (Fig. 6, supplemental movie 2).

Transepithelial Resistance

To assess the role of tricellulin in the barrier function of epididymal tight junctions, we determined the TER in RCE cells in which the formation of tight junctions was stimulated using changes in calcium concentration (i.e., calcium switch) [39]. MTT assays were done to assess the viability of the cells treated with either nonsense or tricellulin siRNA. In all cases there were no significant differences in cell viability (data not shown) and tricellulin levels were decreased by approximately 65% (Fig. 7A). TER in cells treated with nonsense siRNA increased until 48h following the calcium switch (Fig 7B; approximately 180 Ω /cm²). In cells treated with tricellulin siRNA, the TER decreased significantly at 6 hrs and remained significantly less than in cells treated with nonsense siRNA at all subsequent time points (Fig 7B).

Effects of Tricellulin knockdown on Other Junctional Proteins

To determine the role of tricellulin in the expression of other junctional proteins, western blot analyses were done on cells treated with either nonsense or tricellulin



Figure 4: Colocalization of tricellulin and occludin in adult rat epididymis. Photomicrographs of tricellulin (green) and occludin (red) immunostaining in the adult rat epididymis. Merged images show that in the initial segment occludin and tricellulin do not overlap and appear to be present in different areas of the blood-epididymis barrier. In the caput, corpus and cauda epididymidis, merged images suggest colocalization of tricellulin and occludin in the apical area of the epithelium where tight junctions are localized, although some areas show occludin immunostaining without tricellulin. White arrows show tricellulin staining; yellow arrows show occludin staining. Nuclei are stained with DAPI (blue). L-lumen; P-principal cell; S-sperm; B-basal cells.

siRNA for 48 hrs. (Fig 8A). Tricellulin siRNA treatment significantly decreased tricellulin levels by approximately 40%. Likewise, levels of occludin, Cldn3 and Cldn1 were also decreased (Fig 8B). There were no significant differences in levels of either TJP1 or Cdh1 protein levels (Fig 8B).

DISCUSSION

Tricellular, or tripartite, tight junctions are structurally unique forms of tight junctions. Freeze-fracture electron microscopy micrographs have shown that the tight

Initial Segment

Corpus



Figure 5: Photomicrographs using confocal microscopy of tricellulin (green) and occludin (red) immunostaining in adult rat epididymis. Stacked images of initial segment and corpus are analyzed with the Ortho feature of the Zen software (upper panels). Corpus is used as representative of caput, corpus and cauda. Three-dimensional reconstructions (lower panels) show that in initial segment, tricellulin and occludin have distinct signals; in the corpus epididymidis, tricellulin colocalizes with occludin (white arrows). Nuclei are stained with Hoechst dye (blue). P-principal cells; B-basal cells.

junction belt around the cell is not continuous in the area of tricellular contacts. In this region, the long strands of apical tight junctions tend to bend in a basal direction [40]. These strands are connected with shorter strands which form a network at the contact points of the tricellular junction. Hence the architecture and protein composition of tricellular tight junctions differs from that of bicellular tight junctions [26, 41]. While occludin and claudins may occur in the area of the tricellular junction, tricellulin was the first protein identified that specifically concentrates at the level of the tricellular tight junction [26].



Figure 6: Confocal microscopy images of the colocalization of tricellulin and KRT5 in adult rat epididymis. Photomicrographs of tricellulin (green) and KRT5 (red) immunostaining in the adult rat epididymis (A-initial segment; B-Caput; C-Corpus; D-Cauda). Merged images show that in the initial segment and caput epididymidis KRT5 and tricellulin do not overlap as KRT5 is restrict to basal compartment of the epithelium while tricellulin is localized to apical region. In the corpus and cauda epididymidis, some KRT5 immunostaining was present in the apical region of the epithelium (Yellow arrow). White arrows indicate tricellulin staining. Tricellulin and KRT5 did not colocalize at areas where basal cell projection reach the lumen of the epididymis (yellow arrow; inserts). Stacked images (E) analyzed with the Ortho feature of the Zen software show that in the corpus epididymidis, KRT5 staining is not present in the same region as tricellulin (Panel E). Nuclei are stained with Hoechst dye (blue). IT-interstitium; L-lumen; S-sperm; P-principal cell; B-basal cells.

More recently the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) members of the angulin family of proteins (ILDR-1,-2) have also been shown to be important for tricellular tight junctions and, in particular, in the recruitment of tricellulin to these junctions [42, 43].

Our present data indicates that tricellulin is expressed along the entire length of the rat epididymis, in the apical region of the epithelium, and that the levels are similar between the different regions of the epididymis. This pattern differs from that of many of the Cldns or of occludin, which are present in bi-cellular tight junctions, and whose levels can vary dramatically between different regions of the epididymis [9, 11, 44]. It is, therefore, likely that the regulation of tricellulin is distinct from the regulation of other tight junction proteins, such Cldn10, Cldn8 or occludin, for example, which display segment-specific expression levels in the epididymis [45]. The immunolocalization of tricellulin revealed a tri-punctate staining that is more evident in the caput, corpus and cauda regions than in the initial segment. This tri-punctate staining has been observed in the liver and MTD-1A cells and is believed to be related to the localization of tricellulin at both edges of bicellular tight junctions [27, 46].

Postnatal developmental expression and localization of tricellulin varies significantly with age, based on our western blot and immunofluorescent data. In young rats (14 days), tricellulin levels were low and displayed cytoplasmic localization throughout the epididymis. Tricellulin levels increased as a function of age and by day 42, the immunostaining became increasingly localized to the apical region of the lateral plasma membrane. Previous studies have reported a similar change in immunolocalization of other tight junction proteins, including Cldn3, Cldn4, and Cldn10 [9, 44]. These data support the notion that the assembly of tight junctions is completed postnatally in the rat. While Guan et al [44] reported that the rat epididymis was impermeable to lanthanum by postnatal day 7, there is clearly a maturation of the tight junctions which occurs later during postnatal development. Suzuki and Nagano [2] reported that the strands of the tight junctions observed in freeze-fracture electron microscopy change as a function of age until day 42. The changes in localization of tricellulin in this study and previously reported changes in the cellular localization of Cldns may reflect the changes in the architecture of epididymal tight junctions as a function of age and development, and suggest a type of re-inforcement of the tight junction complex.



Figure 7: Role of tricellulin in maintaining the integrity of epididymal tight junctions. A. Western blot analyses were done on RCE cells treated with scramble and tricellulin siRNA (n=3). Tricellulin levels were decreased about 65% in cells treated with the tricellulin siRNA. B. Transepithelial resistance (TER) was measured in RCE cells at different time points after switching from low- to normal calcium- containing medium with a final concentration of 1.8 mM (n = 4). A peak in TER was seen 48 hrs. after calcium- switch. In cells treated with a tricellulin siRNA, TER was significantly (P≤0.05; ANOVA) lower from 6 hours onwards. Data are expressed as the Mean \pm SEM; the letter 'a' indicates a significant difference from controls.

В

Α





Figure 8: Effects of tricellulin knockdown on other junctional proteins in RCE cells. Western blot analyses were done on cells treated with scramble (Control) and tricellulin siRNA (n=4; for Cldn1 n=3). Tricellulin levels were decreased by almost 60% in cells treated with the tricellulin siRNA. There was a significant decreases in occludin, Claudin-1 and Claudin-3 levels in cells treated with the tricellulin siRNA. There were no significant differences in either TJP1 or Cadh1 levels. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA and Dunnett's post-test. Letters designate a significant difference from controls. (b= P \leq 0.01; c =P \leq 0.001).

Tricellulin and occludin share approximately 32% sequence homology, and have been shown to co-localize in the tight junctions of the human nasal mucosa [30]. In the

initial segment, occludin and tricellulin did not co-localize even though both proteins were present in the area of the tight junctions. Previous studies have reported differences in the expression and localization of occludin in the initial segment of the mouse, where levels are low or completely absent [10] as compared to other regions of the epididymis. Other studies have also reported differences in the regulation of junctional proteins in the initial segment relative to other segments [47, 48]. Co-localization studies of occludin and tricellulin in other segments indicate that there are overlapping and non-overlapping staining of the proteins within the area of the blood-epididymis barrier. While tricellulin appears to be present at the same region as occludin, there is occludin immunostaining that occurs in the absence of tricellulin. Since these proteins are localized to different areas of the tight junctions, these results are not necessarily surprising and are similar to those observed in a human pancreatic cell line (HPAC) *in vitro* [49].

Previous studies have reported that basal cell projections can migrate apically and reach the lumen of the epididymis [24, 25]. Shum et al [25] suggested that these projections cross the tight junctions of the blood-epididymis barrier. To determine if tricellulin was expressed at the apical contact points between basal and principal cells, co-localization of tricellulin and KRT5, a specific marker of basal cells [38, 50], was done. We did not observe any apical projections of basal cells in the initial segment and caput epididymidis; in the corpus and cauda epididymidis, where basal cell apical projections were noted, we there was no co-localization of KRT5 and tricellulin. These data suggest that basal cells do not appear to form tricellular tight junction in the epididymis.

To assess the role of tricellulin in the function of epididymal tight junctions, transepithelial resistance was assessed using rat epididymal RCE cells treated with siRNA against tricellulin. Knockdown of tricellulin caused a decrease in transepithelial resistance, indicating the importance of tricellulin in tight junction function. Similar results were observed in breast epithelial cells (Eph4 cells) [26], and more recently in HPAC cells [49]. Ikenouchi et al., [26] showed that tricellulin knockdown resulted in an increase in paracellular permeability of Eph4 cells. Furthermore, overexpression of human tricellulin-a (Tric-a), an isoform of tricellulin, increased transepithelial resistance by 3-fold in MDCK II cells (Mardin-Darby canine kidney cell line), which normally exhibit low levels of resistance [51]. To explain differences in tricellulin knockdown studies, it has been

proposed that the paracellular pathway can be divided into two separate pathways: a porous pathway (limited pore size of 4 Å) and a leaky pathway, which contributes to the passage of macromolecules between adjacent cells [52, 53]. Tri-cellular tight junctions appear to be responsible for regulating the leaky pathway [43]. Analysis of the physiological functions of tricellulin has revealed that it may also alter bi-cellular tight junctions by increasing paracellular electrical resistance and decreasing permeability of ions and larger solutes [51]. At tri-cellular contacts, tricellulin specifically seals epithelial cell sheets, thereby preventing the passage of macromolecules without affecting ion permeation [51]. Whether or not this is the case in the epididymis is currently not known; however, regulation of paracellular movement of ions and macromolecules across the tight junctions offers an intriguing mechanism by which tight junctions can regulate the luminal environment of the epididymis.

To further understand the mechanism by which tricellulin knockdown decreased the transepithelial resistance in RCE cells, we examined levels of other tight junction proteins. These experiments indicated that tricellulin knockdown resulted in decreased levels of occludin, Cldn3 and Cldn1. There were no effects on the levels of either TJP1 or Cdh1. The loss of occludin and of Cldns indicates that the composition of the epididymal tight junctions was altered by the loss of tricellulin. Ikenouchi et al [27] reported that tricellulin may be incorporated into claudin-based tight junctions and may play a role in the secondary organization, or structure, of tight junctional strands, and that it can interact with Cldn3, which we have shown to be present in the epididymis [9, 11]. Furthermore, co-transfection of cells with tricellulin and Cldn1 can alter the network of tight-junction strands [54]. Studies in HEK293 cells, which do not form tight junctions, have shown that tricellulin alone was not sufficient to induce the formation of tight junctions, but that cotransfection of Cldn1 and tricellulin resulted in an enrichment of tricellulin at the points of cellular contact, indicating that tricellulin interacts with Cldn-based junctions [54]. Interestingly, while tricellulin knockdown in RCE cells resulted in a decrease in both Cldn-3 and -1, studies in Caco-2 cells have reported that Cldn1 knockdown had no effect on levels of tricellulin [54].

Tricellulin knockdown did not cause any changes in either TJP1 or Cadh1 levels. It has been reported that tricellulin, unlike occludin or Cldns, does not require TJP1 at cell-

cell contacts to form a link with the cytoskeleton of the cell [27]. Hence, the loss of tricellulin is unlikely to result in changes in TJP1. Cadh1, a cell adhesion protein, was also not affected by tricellulin knockdown. We have previously shown that during the formation of tight junctions in the epididymis, the adherens junctions play a role in the localization of TJP1 [55]. It is therefore conceivable that the roles of Cdh1 and TJP1 are upstream from tricellulin, with respect to the formation of epididymal tight junctions.

In conclusion, tricellulin is implicated in the formation and maintenance of tight junctions of the blood-epididymal barrier. Its expression and localization are correlated with the development of the epididymis, and it interacts with both occludin and Cldn-based tight junctions of the epididymis. Through these interactions, and based on changes in TER following tricellulin knockdown by siRNA, tricellulin appears to be important for maintaining the integrity of epididymal tight junctions, based on changes in TER.

ACKNOWLEDGMENTS

Julie Dufresne, Mary Gregory, Jessy Tremblay, and Dr. Isabelle Plante (INRS) are thanked for their suggestions and assistance.

REFERENCES

- 1. Agarwal, A. and A.P. Hoffer. Ultrastructural studies on the development of the bloodepididymis barrier in immature rats. J Androl; 1989; 10:425-31.
- 2. Suzuki, F. and T. Nagano. Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. Dev Biol 1978; 63:321-34.
- Pelletier, R.M. Blood barriers of the epididymis and vas deferens act asynchronously with the blood barrier of the testis in the mink (Mustela vison). Microsc Res Tech 1994; 27:333-49.
- Cyr, D., K.W. Finnson, J. Dufresne, and M. Gregory, Cellular interactions and the bloodepididymal barrier. The epididymis : from molecules to clinical practice, ed. B. Robaire and B. Hinton. 2002, New-York: Plenum Press.
- Cyr, D.G., M. Gregory, E. Dube, J. Dufresne, P.T. Chan, and L. Hermo. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. Asian J Androl 2007; 9:463-75.

- 6. Mital, P., B.T. Hinton, and J.M. Dufour. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. Biol Reprod 2011; 84:851-8.
- 7. Jones, S.R. and D.G. Cyr. Regulation and characterization of the ATP-binding cassette transporter-B1 in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. Toxicol Sci 2011; 119:369-79.
- 8. Gregory, M. and D.G. Cyr. The blood-epididymis barrier and inflammation. Spermatogenesis 2014; in press.
- 9. Gregory, M. and D.G. Cyr. Identification of multiple claudins in the rat epididymis. Mol Reprod Dev 2006; 73:580-8.
- 10. Cyr, D.G., L. Hermo, N. Egenberger, C. Mertineit, J.M. Trasler, and D.W. Laird. Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. Endocrinology 1999; 140:3815-25.
- 11. Dube, E., J. Dufresne, P.T. Chan, L. Hermo, and D.G. Cyr. Assessing the role of claudins in maintaining the integrity of epididymal tight junctions using novel human epididymal cell lines. Biol Reprod 2010; 82:1119-28.
- 12. Vendrely, E. and J.P. Dadoune. Quantitative ultrastructural analysis of the principal cells in the human epididymis. Reprod Nutr Dev 1988; 28:1225-35.
- 13. Hermo, L. and B. Robaire, epididymal cell types and their functions. The epididymis : from molecular to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens. 2002, New York: Kluwer Academic / Plenum.
- 14. Martinez-Garcia, F., J. Regadera, P. Cobo, J. Palacios, R. Paniagua, and M. Nistal. The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. Andrologia 1995; 27:195-206.
- 15. Adamali, H.I. and L. Hermo. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. J Androl 1996; 17:208-22.
- Beaulieu, V., N. Da Silva, N. Pastor-Soler, C.R. Brown, P.J. Smith, D. Brown, and S. Breton. Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H+-ATPase recycling. J Biol Chem 2005; 280:8452-63.
- 17. Cheung, K.H., G.P. Leung, M.C. Leung, W.W. Shum, W.L. Zhou, and P.Y. Wong. Cellcell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. J Gen Physiol 2005; 125:443-54.
- 18. Leung, G.P., K.H. Cheung, C.T. Leung, M.W. Tsang, and P.Y. Wong. Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). Mol Cell Endocrinol 2004; 216:5-13.
- 19. Yeung, C.H., D. Nashan, C. Sorg, F. Oberpenning, H. Schulze, E. Nieschlag, and T.G. Cooper. Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. Biol Reprod 1994; 50:917-26.
- 20. Li, Z., Z.J. Sun, C.G. Liao, L. Ma, B.F. Ma, and Y.Q. Zhang. Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted originating from the epididymis differentially associates with viable and defective spermatozoa. Fertil Steril 2010; 93:2661-7.
- 21. Shum, W.W., E. Hill, D. Brown, and S. Breton. Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. Reproduction 2013; 146:455-69.
- 22. Hedger, M.P. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. J Androl 2011; 32:625-40.
- Shum, W.W., T.B. Smith, V. Cortez-Retamozo, L.S. Grigoryeva, J.W. Roy, E. Hill, M.J. Pittet, S. Breton, and N. Da Silva. Epithelial Basal Cells Are Distinct from Dendritic Cells and Macrophages in the Mouse Epididymis. Biol Reprod 2014; 90:1-10.
- 24. Veri, J.P., L. Hermo, and B. Robaire. Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. J Androl 1993; 14:23-44.
- 25. Shum, W.W., N. Da Silva, M. McKee, P.J. Smith, D. Brown, and S. Breton. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. Cell 2008; 135:1108-17.
- 26. Ikenouchi, J., M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, S. Tsukita, and S. Tsukita. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol 2005; 171:939-45.
- 27. Ikenouchi, J., H. Sasaki, S. Tsukita, M. Furuse, and S. Tsukita. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. Mol Biol Cell 2008; 19:4687-93.
- 28. Schluter, H., I. Moll, H. Wolburg, and W.W. Franke. The different structures containing tight junction proteins in epidermal and other stratified epithelial cells, including squamous cell metaplasia. Eur J Cell Biol 2007; 86:645-55.
- 29. Kojima, T., J. Fuchimoto, H. Yamaguchi, T. Ito, A. Takasawa, T. Ninomiya, S. Kikuchi, N. Ogasawara, T. Ohkuni, T. Masaki, K. Hirata, T. Himi, and N. Sawada. c-Jun N-terminal kinase is largely involved in the regulation of tricellular tight junctions via tricellulin in human pancreatic duct epithelial cells. J Cell Physiol 2010; 225:720-33.
- 30. Ohkuni, T., T. Kojima, N. Ogasawara, T. Masaki, T. Ninomiya, S. Kikuchi, M. Go, K. Takano, T. Himi, and N. Sawada. Expression and localization of tricellulin in human nasal epithelial cells in vivo and in vitro. Med Mol Morphol 2009; 42:204-11.
- 31. Mariano, C., S.L. Silva, P. Pereira, A. Fernandes, D. Brites, and M.A. Brito. Evidence of tricellulin expression by immune cells, particularly microglia. Biochem Biophys Res Commun 2011; 409:799-802.
- Riazuddin, S., Z.M. Ahmed, A.S. Fanning, A. Lagziel, S. Kitajiri, K. Ramzan, S.N. Khan, P. Chattaraj, P.L. Friedman, J.M. Anderson, I.A. Belyantseva, A. Forge, S. Riazuddin, and T.B. Friedman. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. Am J Hum Genet 2006; 79:1040-51.
- 33. Sun, E.L. and C.J. Flickinger. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. Am J Anat 1979; 154:27-55.
- 34. Hoffer, A.P. and B.T. Hinton. Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. Biol Reprod 1984; 30:991-1004.

- 35. Marty, M.S., R.E. Chapin, L.G. Parks, and B.A. Thorsrud. Development and maturation of the male reproductive system. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2003; 68:125-36.
- 36. Dufresne, J., N. St-Pierre, R.S. Viger, L. Hermo, and D.G. Cyr. Characterization of a novel rat epididymal cell line to study epididymal function. Endocrinology 2005; 146:4710-20.
- 37. Rock, J.R., M.W. Onaitis, E.L. Rawlins, Y. Lu, C.P. Clark, Y. Xue, S.H. Randell, and B.L. Hogan. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:12771-5.
- 38. Gusterson, B.A., D.T. Ross, V.J. Heath, and T. Stein. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. Breast Cancer Res 2005; 7:143-8.
- 39. Denker, B.M. and S.K. Nigam. Molecular structure and assembly of the tight junction. Am J Physiol 1998; 274:F1-9.
- 40. Furuse, M., Y. Oda, T. Higashi, N. Iwamoto, and S. Masuda. Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor: a novel membrane protein of tricellular tight junctions. Ann N Y Acad Sci 2012; 1257:54-8.
- 41. Furuse, M., Y. Izumi, Y. Oda, T. Higashi, and N. Iwamoto. Molecular organization of tricellular tight junctions. Tissue Barriers 2014; 2:e28960.
- 42. Masuda, S., Y. Oda, H. Sasaki, J. Ikenouchi, T. Higashi, M. Akashi, E. Nishi, and M. Furuse. LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. J Cell Sci 2011; 124:548-55.
- 43. Higashi, T., S. Tokuda, S. Kitajiri, S. Masuda, H. Nakamura, Y. Oda, and M. Furuse. Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. J Cell Sci 2013; 126:966-77.
- 44. Guan, X., T. Inai, and Y. Shibata. Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. Arch Histol Cytol 2005; 68:213-25.
- 45. Dube, E., P.T. Chan, L. Hermo, and D.G. Cyr. Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. Biol Reprod 2007; 76:1034-44.
- 46. Somoracz, A., A. Korompay, P. Torzsok, A. Patonai, B. Erdelyi-Belle, G. Lotz, Z. Schaff, and A. Kiss. Tricellulin Expression and its Prognostic Significance in Primary Liver Carcinomas. Pathol Oncol Res 2014; 20: 755-64.
- 47. Gregory, M., J. Dufresne, L. Hermo, and D. Cyr. Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. Endocrinology 2001; 142:854-63.
- 48. Cyr, D.G., L. Hermo, and D.W. Laird. Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. Endocrinology 1996; 137:1474-84.
- 49. Takasawa, A., T. Kojima, T. Ninomiya, M. Tsujiwaki, M. Murata, S. Tanaka, and N. Sawada. Behavior of tricellulin during destruction and formation of tight junctions under various extracellular calcium conditions. Cell Tissue Res 2013; 351:73-84.
- 50. Nagle, R.B., W. Bocker, J.R. Davis, H.W. Heid, M. Kaufmann, D.O. Lucas, and E.D. Jarasch. Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies

distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. J Histochem Cytochem 1986; 34:869-81.

- 51. Krug, S.M., S. Amasheh, J.F. Richter, S. Milatz, D. Gunzel, J.K. Westphal, O. Huber, J.D. Schulzke, and M. Fromm. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. Mol Biol Cell 2009; 20:3713-24.
- 52. Anderson, J.M. and C.M. Van Itallie. Physiology and function of the tight junction. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009; 1:a002584.
- 53. Shen, L., C.R. Weber, D.R. Raleigh, D. Yu, and J.R. Turner. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. Annu Rev Physiol 2011; 73:283-309.
- 54. Cording, J., J. Berg, N. Kading, C. Bellmann, C. Tscheik, J.K. Westphal, S. Milatz, D. Gunzel, H. Wolburg, J. Piontek, O. Huber, and I.E. Blasig. In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. J Cell Sci 2013; 126:554-64.
- 55. DeBellefeuille, S., L. Hermo, M. Gregory, J. Dufresne, and D.G. Cyr. Catenins in the rat epididymis: their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. Endocrinology 2003; 144:5040-9.

SECONDE PARTIE SECTION 2 :

ISOLATED RAT EPIDIDYMAL BASAL CELLS SHARE COMMON PROPERTIES WITH ADULT STEM CELLS

Marion Mandon, Louis Hermo et Daniel G. Cyr

Accepté à «Biology of Reproduction», septembre 2015, publié en ligne

2.1. Résumé français de l'article

Il existe peu d'informations sur la fonction des cellules basales de l'épididyme. Ces cellules sécrètent des prostaglandines, peuvent métaboliser les dérivés actifs de l'oxygène, et possèdent des projections apicales qui participent à la barrière hématoépididymaire. L'objectif de cette étude était de développer un protocole reproductible pour isoler les cellules basales épididymaires de rat et de caractériser leurs fonctions grâce au profil d'expression génique. L'ITGA6 étant localisées au niveau des cellules basales dans l'épididyme, une population hautement purifiée de cellules basales a été isolée par séparation magnétique en utilisant un anticorps anti-ITGA6. L'analyse par microréseaux a indiqué que les niveaux d'expression de 552 gènes étaient enrichis dans les cellules basales par rapport aux autres types cellulaires. Parmi ces gènes, 45 étaient exprimés à des ratios de 5 fois ou plus. Ces gènes hautement exprimés ont été montrés comme codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, les fonctions du cytosquelette, le transport d'ions, la signalisation cellulaire et les fonctions de l'épiderme, et incluant des protéases et anti-protéases, la transduction du signal et des facteurs de transcription. Plusieurs gènes hautement exprimés ont été retrouvés dans des cellules souches adultes, suggérant que les cellules basales pourraient représenter une population de cellules souches épididymaires. Ces données apportent un nouveau protocole d'isolement des cellules basales de l'épididyme, qui a permis la caractérisation du profil d'expression génique des cellules basales et de suggérer que ces cellules peuvent agir comme des cellules progénitrices multipotentes.

2.2. Contribution de l'étudiante

L'étudiante (Marion Mandon) a participé à la conception de l'étude et à l'analyse critique des données, et a réalisé la plupart des expériences. Elle a également rédigé la première version de l'article et a participé à la version finale ainsi qu'au choix du journal de publication.

Le deuxième auteur (Louis Hermo) a participé à la conception de l'étude. Il a mené les analyses de microscopie électronique et fourni les photos des tissus en microscopie électronique. Il a également participé à l'analyse des données et à l'écriture du manuscrit.

Le directeur de recherches (Daniel G. Cyr) a participé à la conception de l'étude et à l'analyse critique des résultats. Il a pris les photos des cellules en microscopie électronique et a participé à l'écriture du manuscrit et à la discussion, ainsi qu'au choix du journal de publication.

Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common Properties With Adult Stem Cells

Marion Mandon¹, Louis Hermo², and Daniel G. Cyr^{1,2}

¹Laboratory for Reproductive Toxicology, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada

²Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, QC, Canada

<u>Running title</u> : Isolation and characterization of rat epididymal basal cells

<u>Summary sentence</u> : Isolated epididymal basal cells share common properties with adult stem cells with respect to gene expression and in vitro differentiation.

<u>Keywords</u> : Epididymis, Cell Isolation, Genomics, integrin α -6, cell signaling, adult stem cells

Grant support : The study was funded by grants to DGC from the FRQNT (148108), CIHR (84576), and NSERC (155065-06). MM was the recipient of a studentship from the Fondation Armand-Frappier.

The data discussed in this publication have been deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (GEO, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) and are accessible through GEO accession number GSE52693.

Address for correspondence:

Dr. Daniel Cyr INRS-Institut Armand Frappier 245 boul. Des Prairies Laval, QC, H7V 3B7 Email: <u>daniel.cyr@iaf.inrs.ca</u> Tel. (450)687-5010 x 8833

ABSTRACT

There is little information on the function of epididymal basal cells. These cells secrete prostaglandins, can metabolize radical oxygen species, and have apical projections that are components of the blood-epididymis barrier. The objective of this study was to develop a reproducible protocol to isolate rat epididymal basal cells and to characterize their function by gene expression profiling. Integrin- α 6 (ITGA6) was used to isolate a highly purified population of basal cells. Microarray analysis indicated that expression levels of 552 genes were enriched in basal cells relative to other cell types. Among these genes, 45 were expressed at levels of 5-fold or greater. These highly expressed genes coded for proteins implicated in cell adhesion, cytoskeletal function, ion transport, cellular signaling, and epidermal function and included proteases and antiproteases, signal transduction, and transcription factors. Several highly expressed genes have been reported in adult stem cells, suggesting that basal cells may represent an epididymal stem cell population. A basal cell culture was established which showed that these basal cells can differentiate in vitro from KRT5 positive cells to cells the express KRT8 and connexin 26, a marker of columnar cells. These data provide novel information on epididymal basal cell gene expression and suggest that these cells can act as adult stem cells.

94

INTRODUCTION

In the adult rat epididymis, basal cells comprise approximately 20% of the total epithelial cell population, which also includes principal, clear, dendritic, apical and narrow cells [1, 2]. As their name implies, these cells are lodged at the base of the epithelium, where they are in contact with the basement membrane. Basal cells, with a low cytoplasm-to-nucleus ratio, have long processes that extend laterally along the basement membrane, where they form an incomplete layer. Thin apical projections extend from some basal cells towards the lumen of the epididymis [3, 4], where they cross the tight junctions of the blood-epididymis barrier, thereby contributing to the barrier [4]. Basally- and apically-located projections are regulated by androgens and other testicular factors [5-7].

In the rat, the epithelium of the epididymis at birth is characterized by undifferentiated columnar cells [8]. At this age, the epithelium contains numerous mitotic figures and expresses the gap junction protein beta-2 (GJB2; connexin 26 (Cx26)) [8, 9]. The epithelium begins to differentiate around postnatal day 16 [1]. Basal cells first appear in the cauda epididymal region at day 21 and are present throughout the epididymis at day 28 [10]. Concomitant with the decline of GJB2 expression at this age is the beginning of GJB1 (gap junction protein beta-1; Cx32) expression [9]. Sun and Flickinger [1] first proposed that basal cells were derived from columnar cells, in a manner similar to principal cell differentiation. Despite suggestions to the contrary, recent studies have supported the notion that basal cells are derived from columnar cells [11].

Murashima et al. [12] showed that the transcription factor TP63 (Tumor protein 63) is required for the differentiation of basal cells in the epididymis. TP63 is detected at postnatal day 14 in the cauda region of the epididymis and by day 18 in the caput region

[13]. The expression of TP63 in the proximal regions of the epididymis is dependent on androgen receptor signalling, while in the cauda region, this does not appear to be case, as TP63 levels are unaltered in androgen receptor (AR) knockout mice [12].

Although the role of basal cells in the epididymis remains unclear, several studies have reported the presence of enzymes implicated in metabolizing free oxygen radicals. Nonogaki et al [14] first reported the presence of Cu-Zn superoxide dismutase (SOD1) in epididymal basal cells. Several subunits of the glutathione-S-transferase family of proteins [15], as well as metallothionein (MTN1/2; [16]) were also shown to be expressed in epididymal basal cells. It has also been proposed that basal cells are stationary macrophage-like cells that protect spermatozoa from the immune system [17, 18]. However, the recent discovery of dendritic cells in the epididymal epithelium suggests that the immune functions originally attributed to basal cells may be due to dendritic cells localized in the same region at the base of the epithelium [19]. Basal cells have also been suggested to provide structural support to the epididymis [20].

Several studies have shown that basal cells interact directly with the other epithelial cells of the epididymis. Basal cells contain elevated levels of prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1; also known as cyclooxygenase-1) and secrete prostaglandins (PG) E2 and D, which can act on principal cells [21]. Cyr et al. [22] showed the presence of gap junction protein, alpha 1, (GJPA1; also known as Cx43) and gap junctions between basal cells and both adjacent principal and clear cells. Furthermore, Gregory et al. [23] showed that basal cells of the epididymis express the tight junction protein, claudin-1 (CLDN1). Such interactions may be relevant to principal cell functions.

Basal cells are present in most stratified and pseudostratified epithelia, including the trachea, prostate, and mammary gland [24-26]. In these tissues, basal cells make up between 6 and 30% of epithelial cells. Several studies on the trachea indicate that basal cells drive homeostasis of the epithelium [27-29]. In tissues such the trachea, and other organs, basal cells are multipotent stem cells that can be induced to differentiate into other cell types in order to regenerate the epithelium [30-34] but this has not yet been demonstrated for the epididymis. Alterations in basal cell proliferation and differentiation have been associated with the development of cancer in the trachea, prostate and mammary glands [35-37].

One of the main difficulties in understanding the function of basal cells has been the isolation of a purified basal cell population. While previous studies have reported purification of basal cells using either density gradients or magnetic separation [38-40], the absence of specific basal cell markers has limited the validity of the claims of isolation of highly purified basal cells. The objective of this study was to isolate and characterize a highly purified basal cell population, in order to assess the nature of these cells within the epididymal epithelium.

MATERIAL AND METHODS

Animals and tissues collection

Male Sprague-Dawley rats (48 and 90 days of age) were purchased from Charles River Laboratories, Inc. Rats were acclimated for at least one week under a constant photoperiod (12h light: 12h dark), and received food and water *ad libitum*. At the time of sampling, rats were anesthetized with CO₂ and killed by cervical dislocation. Epididymides

were dissected from the animals under aseptic conditions and placed in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)/HAM F12 culture media containing penicillin (50U/mL) and streptomycin (50µg/mL) (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON). For cryoblock preparation, epididymides were frozen in OCT compound (Fisher Scientific, Ottawa, ON) on dry ice and stored at -86°C until sectioning. All the animal protocols used in this study were approved by the Institut National de la Recherche Scientifique University animal care committee.

Immunofluorescence of Epididymal Sections

Frozen epididymal sections (10μm) were fixed in ice-cold methanol for 20 min at -20°C. After rehydration in PBS-Tween (0.05%), sections were permeabilized in a solution of 0.3% Triton X-100 in PBS at room temperature for 20 min. Sections were incubated with blocking solution (5% bovine serum albumin (BSA) in PBS) for 30 min and then incubated with a mouse monoclonal anti-integrin- α 6 antibody (1µg/mL; ITGA6, Abd Serotec, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON) or a rabbit monoclonal anti-PTGS1 antibody (0.3µg/mL, Abcam) diluted in blocking solution at room temperature for 1hr. Sections were washed three times with PBS-Tween and subsequently incubated with an anti-mouse Alexa 594 (red; Life Technologies) or an anti-rabbit Alexa 488 (green; Life Technologies) conjugated secondary antibody (2µg/mL) at room temperature for 30 min in blocking buffer containing a Hoechst blue dye (1µg/mL, Biotium). Finally, sections were washed twice with PBS-Tween and once with PBS and mounted with Fluoromount (Southern Biotech). Co-localization experiments were done using cryosections prepared in the same fashion as described previously. Sections were incubated with anti-ITGA6 antibody (1 µg/mL) for 1 hr at room temperature, rinsed in PBS and subsequently incubated for 30 min at room temperature with Alexa 594-conjugated anti-mouse antisera (2µg/mL). Sections were then rinsed three times in PBS-Tween and incubated with anti-PTGS1 antibody (0.30µg/mL) for 1 hr at room temperature. Sections were subsequently washed three times in PBS-Tween and incubated for 30 min at room temperature with an Alexa 488 conjugated anti-rabbit secondary antibody (2µg/mL) containing a Hoechst blue dye (1µg/mL) to stain the nuclei. Finally, sections were washed twice with PBS-Tween, once with PBS, and then mounted with Fluoromount.

Epithelial Cell Isolation

Epididymides from four rats (48 days of age) were used for each isolation. Tissues were cleared of fat and cut into small fragments (2-3 mm) with scissors. Tissue fragments were placed in DMEM/HAM F12 containing antibiotics and digested in two successive incubations (50 min) in collagenase (2mg/mL; Life Technologies Inc.) at 37°C using a shaking water bath. Epididymal cells were dissociated between digestions by gently pipetting the small tissue fragments and allowing the cells to sediment to the bottom of the tube. The supernatant was then replaced with fresh digestion medium. Following the second digestion, tissue fragments were placed in trypsin-EDTA (0.25% W/V) for 15 min at 37°C in a shaking water bath. Trypsin activity was stopped by the addition of DMEM/HAM F12 medium containing antibiotics, L-glutamine (2mM), insulin (10µg/mL), transferrin (10µg/mL), hydrocortisone (80ng/mL), epidermal growth factor EGF; 10ng/mL),

cAMP (10ng/mL) and fetal bovine serum (5%; FBS; Fraction V; Sigma-Aldrich). Cells were collected by centrifugation (34 x g) for 3 min, resuspended in culture media and successively passed through 3 nylon filters of 160, 100 and 70 μ m. An aliquot of cells was then counted with a hemocytometer.

Magnetic-Activated Cell Sorting

Cells were centrifuged at 1000 x g for 5 min and resuspended in filtered cold magnetic-activated cell sorting (MACS) buffer (2mM EDTA, 0.5% BSA in PBS, pH 7.2). Cells were then incubated with a monoclonal antibody against ITGA6 (also known as CD49f; 1µg/10⁶ cells; Abd Serotec) on ice for 20 min. Cells were washed twice in 2 mL of MACS buffer and collected by centrifugation (1000 x g for 10 min). Cells were then incubated for 15 min on ice with anti-mouse IgG microbeads (20µL of beads in 80µL of cold MACS buffer/10⁷ cells; Miltenyi Biotec, San Diego, CA). Cells were washed twice and resuspended in 500uL of 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 negative or non-basal cell 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 that were retained on the column. This was designated at the positive or basal cell fraction. The cells collected in the basal cell fraction were further purified by a second passage on a magnetic separation column.

Immunofluorescent Microscopy of Basal Cells

Following the magnetic separation, cells from each fraction were resuspended in PBS. The cell concentration was determined using a hemocytometer. An aliquot of 1x10⁵ cells in 100µL of PBS was placed on a glass microscope slide, dried for 40 min and immersed in ice-cold methanol overnight. After rehydration in PBS, cells were permeabilized in a solution of 0.3% Triton X-100 in PBS at room temperature for 15 min. Cells were blocked with PBS containing 5% BSA (blocking solution) for 30 min and then incubated with a monoclonal anti-Keratin (KRT) 5 antibody (1µg/mL; Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX) diluted in blocking solution at room temperature for 1 hr. Cells were washed three times in PBS-Tween and subsequently incubated with an antimouse Alexa 594 conjugated secondary antibody (2µg/mL, Life Technologies) at room temperature for 30 min. Slides were subsequently washed three times with PBS and mounted with Vectastain mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories, Burlington, ON). Cells were examined under a Leica DMRE microscope (Leica Microsystems, Inc.).

Flow Cytometry

Cells (1 x 10⁶) from the non-basal and basal cell fraction were fixed in paraformaldehyde (1% in PBS) for 24 hrs. Cells were washed twice with FACS buffer (1ml; 1% BSA in PBS) and recovered by centrifugation at 1000 x g for 10 min. The supernatant was removed and the cells were resuspended in a solution of Triton X-100 (0.3%) in PBS at room temperature for 15 min. Cells were then blocked in FACS buffer on ice for 30 min and incubated with an anti-PTGS1 monoclonal antibody conjugated with FITC (5µg/mL, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) for 1 hr. Cells were washed three times

with FACS buffer and resuspended in 500uL of PBS containing 1% paraformaldehyde prior to analysis. Flow cytometric analyses were done using a FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) with an air-cooled argon laser providing an excitation at 488nm and analyzed using the Cell Quest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA).

Electron Microscopy

Adult rats (n=4; 90 days of age) were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (Somnitol, MTC Pharmaceuticals). The testes and epididymides were fixed by retrograde perfusion through the abdominal aorta with 2.5% glutaraldehyde buffered in sodium cacodylate (0.1 M) containing 0.05% calcium chloride (pH 7.4). After 10 min of perfusion, epididymides were removed and cut into 4 major regions (initial segment, caput, corpus and cauda). Small 1mm³ pieces were cut from each of the 4 regions and placed in the same fixative for an additional 2 hr at 4°C. The tissue samples were subsequently rinsed three times in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 0.2M sucrose and then left in this buffer overnight. The following day, the samples were postfixed in ferrocyanide-reduced osmium tetroxide for 1 hr at 4°C, dehydrated in a graded series of ethanol and propylene oxide, and embedded in Epon. Semi-thin sections (0.5 mm) were cut with glass knives, stained with toluidine blue, and observed by light microscopy. Thin sections of selected regions of each block were cut with a diamond knife, placed on copper grids, and counterstained with uranyl acetate (5 min) and lead citrate (2 min). Sections were examined with either a Philips 400 or FEI Tecnai 12 120kV Transmission Electron Microscope (FEI Company, Hillsboro, OR).

Cells of the basal cell fraction were collected by centrifugation (300 x g), washed and resuspended in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer for 24h. The cells were then washed in PBS and prepared for electron microscopy as describe above.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Total cellular RNA was isolated from the cells using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturers' instructions. Total RNA (500ng) was reverse transcribed using an oligo (dT)16 primer. Specific transcripts were subsequently amplified by PCR. Primer sequences are listed in Table S1. PCR amplifications were done at 94°C for 5 mins, 25-35 cycles of 94°C for 30 sec; melting temperature (Tm) for 30 sec; 72°C for 30 sec and cooled at 4°C. PCR products were then separated on a 2% agarose gel and visualized using ethidium bromide (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). PCR amplifications were also done on untranscribed RNA to confirm that the sample was not contaminated with genomic DNA. PCR analyses were done in triplicate. Each experiment was done in triplicate using three different isolated basal cell fractions.

Microarray Processing

Total cellular RNA was isolated from the non-basal and basal cell fractions using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration was determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) while the quality of the RNA was verified using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Gene expression profiling was performed with commercially available rat oligonucleotide microarrays, GeneChip® Rat Gene 2.0 ST array, containing 23586 genome-wide transcripts (Affymetrix, Santa Clara, CA). Hybridizations were performed by Genome Québec's Innovation Centre (McGill University, Montréal, QC). Target RNA was reverse transcribed into cDNA and in-vitro transcription was performed to generate biotin-labeled cRNA. Hybridized target cRNA was labelled with streptavidin phycoerythrin and the arrays were scanned using a GeneChip Scanner (Affymetrix).

Microarray Analysis

The relative expression level of each transcript was obtained from three separate isolated fractions. Raw data were corrected for background using the Robust multi-array average (RMA) algorithm (Irizarry et al., 2003) and the Expression Console software (Affymetrix). Expression analysis was done according to MIAME (minimum information about a microarray experiment) standards (Brazma et al., 2001) using the GeneSpring 12X software (Agilent). Only genes showing a p-value ≤ 0.05 were considered for data analysis. Significant gene expression differences were determined with moderated t-test (significance level ≤ 0.05). Fold-changes were expressed as the ratio between basal and non-basal cell fractions. A 2-fold change cut-off value was used for the determination of differentially expressed genes. Genes with the same expression pattern were grouped in clusters using the K-means method with Pearson's correlation and a maximum of 50 iterations. Enriched genes were imported into the DAVID Bioinformatics Resources software (version 6.7; Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery; National Institute of Allergy and Infectious Disease, NIH; [43] to determine gene ontology. Calculations of enrichment scores were based on the Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) scores, which is a modified Fisher exact p-value [44]. Functional analysis for pathways were done using DAVID linked to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) databank with a cut-off of 1.5-fold change.

Basal Cell Culture

Immediately after separation, isolated basal cells were resuspended in Prostacult medium (Stemcell technologies) containing EGF (10ng/mL; (Sigma Aldrich), bFGF (10ng/mL; ReproCELL), heparin (4µg/mL; Life Technologies), FBS charcoal-stripped (5%; Wisent) according to the manufacturer's Instructions for stem cell culture. Experiments were done to determine whether or not bFGF and DHT were necessary for maintaining basal cells in culture. In these experiments, cells were cultured for up to 7 days in the presence or absence of bFGF (10ng/ml) and DHT (10nM, Sigma Aldrich). In all subsequent experiments DHT (10nM) was added to the culture medium. Cells were seeded on Labtek Nunc II (Thermo Fisher Scientific) coated with a thin layer (40µl/well) of phenol red-free high concentration Matrigel (Corning) diluted 1:1 in medium. Cells were incubated at 32°C with 5% CO₂. The medium (50%) was changed every 7 days.

Immunofluorescence of Cultured Cells

Cells were examined after 3, 7, 10, and 14 days of culture. Wells were rinsed twice with PBS and fixed with ice-cold methanol (KRT5) or paraformaldehyde (4%; for KRT8 and Cx26) for 10 min. Cells were then rinsed with Tween 0.05% in PBS for 5 min and permeabilized with 0.3% Triton-X-100 in PBS for KRT5. Immunolabeling was done as

described previously using a monoclonal anti-KRT5 antibody (Santa Cruz Biotechnology), a polyclonal anti-KRT8 antibody (Santa Cruz Biotechnology), or an anti-Cx26 antibody (Life Technologies) diluted in blocking solution and incubated at room temperature for 1.5hrs. Following washing, the cells were incubated at room temperature with an antimouse Alexa fluor 594-conjugated antibody (2µg/mL, Life Technologies) or an anti-rabbit Alexa fluor 488-conjugated antibody (2µg/mL, Life Technologies) containing Hoechst dye (1µg/mL, Biotium). Slides were mounted in Fluoromount. Immunofluorescence was examined under a Nikon A1Plus confocal microscope and images were analyzed with the NIS-Elements AR software (Nikon, Melville, NY).

Statistics

Data are presented as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA). Significance was established as $p \le 0.05$. Except for microarrays, all analyses were performed using the Graph Pad Prism Software (GraphPad Software, Inc.).

RESULTS

Localization of ITGA6 in the Epididymis

Immunofluorescence experiments indicated that ITGA6 is localized to the base of the epithelium in all regions of both 48 day-old (Figure 1, A-D) and adult (Supplemental Figure 1) rat epididymis. To confirm that ITGA6 was localized to epididymal basal cells, colocalization experiments with PTGS1, a marker of basal cells [21], were done. The specificity of the PTGS1 antibody for basal cells was determined by immunofluorescent microscopy, which indicated that PTGS1 was localized to basal cells throughout the epididymis (Supplemental Figure 2). The data showed that ITGA6 co-localized to the same cells as PTGS1, thus confirming that ITGA6 was indeed expressed by epididymal basal cells (Fig 1E; Supplemental Figure 3). Sections incubated in the absence of antibody were used as negative controls (Fig 1F).



Figure 1. Immunolocalization of ITGA6 in the different regions of the epididymis in a rat of 48 days of age. ITGA6 (red; arrow) was localized to the basal compartment of the epithelium in all regions (A-initial segment; B-caput; C-corpus; D-cauda) of the epididymis. Scale bar 10 μ m. ITGA6 (red) and PTGS1 (green) in the basal cells of the caput epididymidis (E). Merged image shows that ITGA6 and PTGS1 colocalize to basal cells (arrow). Similar results were observed in all other regions of the epididymis (Supplemental Figure 3). A negative control in which cells were incubated in the absence of primary antibody is included (F). Scale bar 5 μ m. Nuclei are stained with Hoechst dye (blue). B-basal cells; P-principal cell; L-lumen.

Isolation of Epididymal Basal Cells

Using the ITGA6 antibody, basal cells were isolated from epididymal cells using magnetic separation. Immunofluorescent localization of KRT5, another basal cell marker

[11], indicated that over 88.8 ± 1.7% of cells were positive for KRT5 (Fig 2A). Only 2% of

the cells isolated in the non-basal cell fraction tested positive for KRT5. To further confirm that cells isolated by magnetic separation and ITGA6 antibody were basal cells, a flow cytometric analysis was done using PTGS1 as a marker of basal cells. Since the PTGS1 antibody used for flow cytometry was coupled to FITC, we confirmed its specificity by immunofluorescence microscopy, which indicated that PTGS1 was localized to basal cells throughout the epididymis as expected (Supplemental Figure 2). Merged flow cytometric graphs of PTGS1 immunofluorescent peaks showed a clear shift between curves for cells present in the non-basal and basal cell fractions, demonstrating that there are two distinct cell fractions. Cell counts for immunostained cells indicated that $89.0 \pm 1.5\%$ of cells in the basal cell fraction were positive for PTGS1 (Fig 2B). Thus, both immunofluorescence microscopy, using KRT5, and flow cytometry, using PTGS1, indicated similar levels of basal cell purity.

Expression of Basal Cell Markers

RT-PCR was used to verify the presence of transcripts for several epididymal cell markers. *Krt5*, *Ptgs1*, *Krt14* [11, 40, 45], *Cldn1* and *Tp63* [12, 23] were used as markers for basal cells. All of these markers were present and were significantly enriched by 10-to 20-fold in the basal cell fraction (Fig 2C).

Krt18 and retinoic acid binding protein (*Rabp*) were used as markers for principal cells [35, 46]. H+ transporting lysosomal V0 subunit 4 (*Atp6V0a4*) was used as marker for clear cells and *CD11c* as a marker of dendritic cells [19, 47]. Total mRNA levels for each of the genes were significantly higher in the non-basal cell fraction as compared to the basal cell fraction (Fig. 2C), confirming the high degree of purity in the basal cell fraction.



Figure 2. A) KRT5 immunostaining in cells from the isolated basal cell fraction and non-basal cell fraction of the epididymis. Photomicrograph of KRT5 immunostaining (red) in the basal cell (upper panel) and non-basal cell (lower panel) fractions. Insert show high magnification of a typical cell in both fractions. Nuclei are stained with Hoechst dye (blue). Magnification x100, insets x400. Cell counts of immunopositive cells indicate that 88.8 ± 1.7% of cells in the basal cell fraction and less than 2% of cell in the non-basal cell fraction stained for KRT5 (n=3); *** indicate $p \le 0.001$ (ANOVA). B) Flow cytometric analysis of isolated cells immunostained with PTGS1. Comparison of PTGS1 immunostaining in the basal cell fraction and non-basal cell fraction using flow cytometry. Blue curve represents the PTGS1 immunostaining of non-basal cells, while red curve represents the immunostaining in the basal cell fraction. The data show a clear shift to the right in the basal cell fraction indicating increased immunostaining. Cell counts indicate that there is a significant increase in PTGS1-positive cells in the basal cell fraction relative to the non-basal cell fraction (n=3). *** indicate $p \le 0.001$ (ANOVA). C) Cellular mRNA levels (a) of genes expressed in epididymis (Lane B), non-basal cell fraction (Lane C), and basal cell fraction (Lane D). Lane A represents the negative control. RT-PCR of total cellular RNA indicate a significant increase (b) in mRNA levels in markers of basal cells (Krt5, Krt4, Ptgs1, Tp63, Cldn1) in the basal cell fraction versus the non-basal cell fraction. Principal cell markers (Rabp, Krt18), dendritic cell (Cd11c) and clear cell (Atp6V0a4) markers were significantly elevated in the non-basal cell fraction (white bars) as compared to the basal cell fraction (black bars). $ap \le 0.05$; $bp \le 0.01$; $cp \le 0.001$; ns- non-significant (ANOVA). D) Electron photomicrographs of basal cells in the epithelium of an adult rat epididymis and of isolated basal cells. D, A) An elongated basal cell contacts the basement membrane (BM) and shows a flattened nucleus with a Golgi apparatus (G) and a lipid droplet (Li); MY, myoid cell; P, principal cell; B, basal cell; N, nucleus (x15200). D, B) A basal cell with an irregular nucleus. Note the low cytoplasm-to-nucleus ratio and the well-developed Golgi apparatus including the presence of secretory granules (x15200). D, C) Two adjacent isolated basal cells showing a flattened nucleus; a low cytoplasm-to-nucleus ratio, and the presence of microvilli around the cell. Cell contact points between the cells suggest the presence of a junctional complex between the cells. N, nucleus; BM, basement membrane; G, Golgi; My, myoid cell; Li, lipid; P, principal cell; B, basal cell; Mi, microvilli; LD, lipid droplet; m, mitochondria (x29000).

Interestingly, there were no differences in the mRNA level tight junction protein, tricellulin (*MarvelD2*), between basal and non-basal cell fractions.

Analysis of Basal Cells Morphology

Ultrastructural analysis of basal cells *in situ* and in the basal cell fractions was done under the electron microscope (Fig 2D). Two morphologically distinct basal cells appear to be present at the base of the epithelium. All basal cells are in contact with the basement membrane (BM). Some show a flattened nucleus (Fig 2D, panel A) while others have an irregular nucleus and appear somewhat triangular in shape (Fig 2D, panel B). The cells have a low cytoplasm-to-nucleus ratio and the well-developed Golgi apparatus, including the presence of secretory granules. In electron microscopy images of the isolated basal cell fraction, the cells assumed a rounded appearance with an irregular nucleus and few microvilli projecting from the periphery. These cells revealed a small cytoplasm-to-nuclear ratio, and the cytoplasm showed few organelles, as noted for *in situ* basal cells. In cells that remained in contact with one another, small areas in close proximity were apparent (Fig 2D, panel C).

Gene Expression Profiling of Basal Cells

Microarray analyses were used to compare gene expression profiles for cells in the non-basal cell fraction and in the basal cell fraction. A rat oligonucleotide microarray containing 29 489 genes was used to assess gene expression levels. A total of 1470 genes with a greater than 2-fold changes in steady-state mRNA levels, were differentially expressed in basal cells, as compared to cells in the negative fraction. Hierarchical clustering using the k-means indicated that the basal and non-basal cell fractions were distinct, with clearly identifiable groups of genes that were over-expressed in the basal cell fraction relative to the non-basal cell fraction (Fig 3A). A volcano plot of mRNA levels for each gene revealed a large number of genes that were significantly ($p \le 0.05$) enriched (≥ 2) or under-represented (≤ 0.5) in the basal cell fraction as compared to the non-basal cell fraction (Fig. 3B).

Of the 1470 differentially expressed genes, 552 genes were up-regulated (i.e. enriched in basal cells) and 917 genes were down-regulated (enriched in non-basal cells). Among the enriched basal cell gene population, 163 genes were highly expressed, with mRNA levels of 3-fold higher than in non-basal cells, and 45 of these were expressed at levels of 5-fold of more (Fig. 3C). These highly expressed genes coded for proteins implicated in cell adhesion, cytoskeletal function, ion transport, proteases and antiproteases, signal transduction, transcription factors, cellular signaling, and epidermal function (Table 1). These data have been deposited in NCBL GEO (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo; access number GSE52693).

111

Specific Basal Cell Genes

Several genes previously defined as specific for basal cells were examined (Table 2). *Cldn1*, which we have shown to be present in basal and principal cells [23], was expressed at significantly higher levels in the basal cell fraction; two cytokeratins, *Krt14* and *Krt17*, were also highly expressed in basal cells. *Ptgs1* which was previously described in epididymal basal cells [21], *Tp63 [48]*, and *Cd44* [49] were all expressed at significantly higher levels in the basal cell fraction.

Certain genes previously suggested as being specific for epididymal basal cells were significantly lower in the basal cell fraction as compared to the non-basal cell fraction. These included *Agtr2* [4], *Aqp3* [50] and *Trpc3* [40].

Functional Classification of Genes Enriched in Epididymal Basal Cells

The genes that were differentially enriched in basal cells were classified into functional categories using gene ontology to predict biological processes, cellular components, and molecular functions of basal cell function (Fig 3D). There were 16 clusters of biological processes that were predicted in basal cells (Fig 3D), including biological adhesion, development and morphogenesis, cell motion, regulation of cell death, cell growth and cell proliferation, and response to endogenous stimuli. Highly expressed genes (4-fold or more) in basal cells could be grouped in three specific categories of genes associated with the plasma membrane, cellular junctions, and interaction with the extracellular matrix (Fig 3E).

112



Figure 3. Identification of basal cell fraction-enriched transcripts. (A) Heat map and hierarchical cluster analysis of genes expressed in the basal cell fraction (n=3) compared to non-basal cell

fraction (n=3). Genes expressed at levels above the average are represented in red, below average in green and average in black. (B) Volcano-plot comparing the transcriptome of cells in the basal cell fraction (n=3) and non-basal cell fraction (n=3). Red dots correspond to significantly upregulated probe sets in basal cells (fold-change ≥ 2 with a p-value ≤ 0.05); green dots represent significantly down-regulated probe sets in basal cells (fold-change ≥ 2 with a p-value ≤ 0.05); grey dots represent non-significant gene probe sets. (C) Number of genes that are significantly differentially expressed by 2-, 4- and 5-fold in the basal cell fraction compared to the non-basal cell fraction. (D) Differentially expressed genes in the isolated basal cell fraction and non-basal cell fraction of the epididymis. Genes were grouped according to predicted biological function using the DAVID application software. Enrichment score calculations were based on EASE score. Genes were considered differentially expressed when the difference was greater than 2-fold. (D) Genes grouped according to their biological processes. (E) Genes grouped according to the cellular components.

Genes Implicated in Gap Junctions

Several genes coding for gap junction proteins were expressed at significantly higher levels in basal cells. These included gap junction protein alpha-1 (*Gja1*; Cx43), *Gjb3* (Cx31), *Gjb4* (Cx30.3) and *Gjb5* (Cx31.1). These have all previously been shown to be expressed in the epididymis [9]. Interestingly, pannexin2 (*Pnx2*), which is expressed at high levels in the nervous system [51], was also present in basal cells (Fig. 4A). The large number of gap junction proteins suggests a highly regulated intercellular communication between basal and other cell types of the epididymis.

Genes Implicated in the Inflammatory Response

Some genes involved in the biosynthesis and secretion of prostaglandins, known to be implicated in the inflammatory response, were expressed at significantly higher levels in basal cells. These included: *Aloxe3*, which mediates leukotriene degradation; *Ptgs1*, which converts arachidonic acid into prostaglandin; and *Slco2a1* (solute carrier organic anion transporter family, member 2A1), which is the prostaglandin transporter. A number of anti-inflammatory genes were also expressed. *II-6* (interleukin-6) and *Il23a*, which are implicated in inflammation, were highly down-regulated, while *Il1r2*, which

suppresses IL-1 activity, was upregulated. *Mmp2* (matrix metallopeptidase 2), which degrades collagen IV and promotes inflammation, was also down-regulated. *Anxa1* (Annexin A1) has a potential anti-inflammatory activity via an inhibition of eicosanoid synthesis (Fig 4B).

Genes Implicated in Progenitor Cell Function

Some strongly expressed genes in basal cells are associated with adult multipotent stem cells in other tissues (Fig. 4C). Several ligands of known signaling pathways were present, including Shh (sonic hedgehog), the ligand of the Hedgehog pathway, required for embryonic stem cells and Jag2 (jagged 2), a ligand of Notch signaling . Several cytokines were also specific to basal cells: Lif, Kitlg (KIT ligand) and Csf3 (colony stimulating factor 3). Likewise, growth factors *Pdgf* (platelet derived growth factor; *Pdgfa*; *Pdgfb*; *Pdgfc*), *Epgn* (epithelial mitogen), *Hbegf* (heparin-binding EGF-like growth factor) and *Nrg1* (neuregulin 1) were all enriched in epididymal basal cells. Some receptors implicated in progenitor cell function were highly expressed in basal cells, including Cd44, Cd9, Tacstd2 tumor-associated calcium signal transducer 2), Ret (ret proto-oncogene), Egfr (epidermal growth factor receptor) and Epha2 (EPH receptor A2). Finally, some transcription factors associated with gene expression in progenitor cells were also expressed in basal cells (Gli3 (GLI family zinc finger 3), Klf5 (Kruppel-like factor 5), Sox6 (sex determining region Y-box 6), *Myc* (avian myelocytomatosis viral oncogene homolog) and Ovol1 (ovo-like zinc finger 1).

TP63-Dependent Genes

Several highly expressed genes in epididymal basal cells have been shown to be regulated by the transcription factor TP63 in other cell types (Table 3). Several of these genes are implicated in cell adhesion (*Itga3, Itga6, Cdh3* (cadherin3; P-Cadherin) and *Cldn1. Mdm2* (MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase), involved in the cell cycle, was also expressed at significantly higher levels in basal cells. *Ets1* (v-ETS; avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1) and *Trim29* (tripartite motif containing 29), which are implicated in cellular differentiation, were expressed at significantly higher levels, as were *Edar* (ectodysplasin A receptor), *Bmp7* (bone morphogenetic protein 7), *Irf6* (interferon regulatory factor 6) and *Jag2. Serpinb5* (serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5), *Aldh1a3* (aldehyde dehydrogenase 1 family, member 3), *Serpine1* and *Gpx2* (glutathione peroxidase 2) were all expressed at higher levels in basal cells. The large number of genes known to be regulated by TP63 suggests that it is a major regulator of basal cell function.

Intracellular Signaling Pathways

Several molecular pathways in epididymal basal cells were identified using the DAVID software. Using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), 16 different pathways were identified (Fig 4D).



Figure 4. Differentially expressed genes implicated in gap junctions, prostaglandins synthesis and multipotent stem cells in the basal cell fraction compared to the non-basal cell fraction. (A) mRNA levels, enriched in the basal cell fraction, for genes coding for gap junction proteins and pannexins. (B) mRNA levels, enriched in the basal cell fraction, for genes implicated in inflammatory response.

(C) mRNA levels, enriched in the basal cell fraction, for genes associated with multipotent adult stem cells. (D) Predicted canonical pathways implicated in basal cell function. DAVID software was used to predict main pathways implicated in epididymal basal cells transcriptome. Genes are considered enriched with a differential regulation greater than 1.5 fold change with a p-value \leq 0.05. Some of the KEGG pathways were related to structural components of the epithelium, and included pathways implicated in adherens and tight junctions, focal adhesion, extracellular matrix-receptor interactions, and cell adhesion molecules. Other pathways that were identified were related to signal transduction, such as those implicated in axon guidance, ErbB (Estrogen receptor β -2), WNT, and MAPK signaling. Surprisingly, signaling pathways implicated in cancer were strongly predicted in basal cells.

Cultured Epididymal Basal cells

Different methodologies were assessed to establish epididymal basal cell cultures. The cells did not adhere to either Cell +, or collagen IV coated plates. However, the cells adhered to Matrigel after 48 hrs of culture. The Matrigel was diluted 1:1 with culture medium, which has been used previously for culturing prostatic basal cells [52, 53]. Cell viability and maintenance of PTGS1 expression were assessed as indicators of basal cell health (Fig. 5A). bFGF (basic fibroblast growth factor) was found to be critical for maintaining the expression of PTGS1. In the absence of bFGF, PTGS1 immunostaining disappeared after 3 days of culture. Dihydrotestosterone (DHT) was also required for maintaining the expression of PTGS1 in the cells. In cells incubated with levels of DHT (10nM) equivalent to those present in the serum, the cells not only maintained the expression of PTGS1, but also formed spheroid acini (Fig. 5A). In the acini, KRT5-positive basal cells appeared to localize to the perimeter of the acini (Supplemental Movie 1). Cells grown in the presence of bFGF and DHT developed spheroid acinar structures (Fig 5B). In absence of bFGF and DHT the acinar structure were not observed.

Basal Cell Differentiation

To determine if basal cells could differentiate in vitro, basal cells were cultured for up to 14 days. After 3 days of culture, cells remained in a flat two-dimensional architecture. By 7 days, some spheroid acini began to appear. These spheroid acini became more prominent after 10 and 14 days of culture. While mitotic figures were observed outside the acini after 10 days of culture, these were not observed within the acinar structures. Immunostaining for the basal cell marker KRT5 indicated a progressive decrease in KRT5 immunostaining which decreased from over 90% of the cells after 3 days of culture to as little as 5% of the cells by day 14. This was particularly evident within the acini structures (Fig. 5C, supplemental movie 1). The decreased KRT5 immunostaining was accompanied by the appearance of KRT8 after 7 days of culture, which was not detected after 3 days of culture but increased to almost 90% of the cells by 14 days (Fig.5C, supplemental movie 2). Likewise, some of the cells also began expressing the gap junction protein Cx26 after 7 days of culture (Fig. 5C, supplemental movie 3).

DISCUSSION

The function of epididymal basal cells has remained an enigma. Studies have reported that the cells display endocrine properties with respect to the secretion of prostaglandins [21], and that they express a number of different proteins implicated in the metabolism of reactive oxygen species [10, 14]. However, there remains very limited information of the role of these cells in epididymal functions. While there have been several reports on the isolation of basal cells [38, 54, 55], many of these studies were done prior to the discovery of basal cell markers and the discovery of epididymal dendritic cells [56].

Based on studies examining basal cells in other epithelia, we examined the localization of ITGA6 in the epididymal epithelium in order to assess its potential utility in isolating epididymal basal cells [52, 57, 58]. ITGA6 was present at the base of the epithelium throughout the epididymis and appeared to be localized to basal cells. In epithelia such as the trachea, prostate, and mammary gland, basal cells act as adult stem cells and are immunopositive for ITGA6 [57, 59, 60]. These data support the notion that basal cells in the epididymis share certain similarities with basal cells from these other tissues.

Microarray analysis of isolated basal cells indicated clear differences in gene expression between basal cells and other cells of the epididymis. While several studies have examined gene expression profiles in the different regions of the epididymis in human, rat and mice [61-68], few have examined gene expression profiles in specific cell types. Dubé et al. [61] examined gene expression profiles in an immortalized principal cell line of an azoospermic infertile patient versus a principal cell line derived from a fertile patient. The present study is the first to specifically compare gene expression in basal cells relative to other epididymal cells.

120



Figure 5. A. Immunolocalization of KRT5 and PTGS1 in cells basal cells cultured for 3 days in medium containing both DHT (10 nm) and bFGF (10 ng/ml). Without DHT or bFGF, cells were unable to maintain the expression of PTGS1. Scale bar 20µm. B. After 7 days of culture the cells cultured with DHT and bFGF formed acini (arrow). Cells cultured in the absence of these failed to form acini. Scale bar 20µm. C. Immunolocalization of KRT5 (red, left panel), KRT8 (green, middle panel) and GJB2 (red, right panel) in basal cells after 3, 7, 10 and 14 days of culture. Cells progressively formed spheroid structures and KRT5 (arrows) disappeared from most of cells by day 14. In contrast, both KRT8 (arrows) and GJB2 (arrows) immunostaining appear by day 7 and remained expressed until day 14. Nuclei were stained with Hoechst blue dye. Scale bar = 20um. Insets represent high magnification representation of photomicrographs.

Gene expression profiles of epididymal basal cells indicated that most of the previously identified markers of basal cells were expressed in the isolated basal cells. Interestingly, some of the markers previously reported as expressed in basal cells were found to be expressed either at equivalent levels in basal and non-basal cell fractions, or were, in fact, present at much higher levels in the non-basal cell fraction. These differences suggest that the expression of certain genes, at least at the mRNA level, may be attributed to other cell types. AQP3 (aquaporin 3), was previously reported in basal cells by immunohistochemistry [50] but not by immunofluorescence [69]. Studies have reported that in other tissues, AQP3 is expressed in dendritic cells [70]. It is possible that in the epididymis, both cell types express Aqp3 and therefore differences in mRNA did not show an enrichment of gene expression for Aqp3 in the basal cell fraction. AGTR2 (angiotensin II receptor, type 2) has also been described as being specific to the basal cells in the epididymis [4]. However, in the present study Agtr2 expression was much lower in the basal cell fraction versus the non-basal cell fraction. Several studies have reported the presence of AGTR2 in dendritic cells [71, 72] and it may be possible that the localization of this protein, as well as AQP3, may not be to basal cells but rather to dendritic cells. Similarly, Trpc3 (transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3), previously suggested as being specific to epididymal basal cells [55], was not enriched in the basal cell population. *MarveID2* was precedently studied in epididymis [73] and it was showed that basal cells do not participate at tricellular tight junctions.

Previous studies have reported that gap junctions composed of GJA1 were present between basal cells and either principal or clear cells of the epididymis in multiple species (Cyr et al., 1996; Dube et al., 2012; Hejmej et al., 2007; Lydka et al., 2011). *Gja1* mRNA
levels were significantly higher in isolated basal cells, supporting previous reports of gap junctions in this tissue. Surprisingly, however, basal cells also contained significantly higher levels of *Gjb3*, *Gjb4* and *Gjb5*. This is the first report of *Gjb3*, *Gjb4* and *Gjb5* expression in basal cells. We previously showed that these connexins were expressed in the epididymis and that their mRNA levels increased as a function of postnatal development [9]. The contribution of basal cells to increasing expression levels of these connexins may be important. The fact that these four connexins are expressed in basal cells is suggestive of a close interaction/or communication between basal cells and other epididymal cell types. Since gap junctions are known to be important sensors of epithelial health, it is tempting to speculate that these interactions play a similar role in the epididymis [77].

Several genes implicated in the inflammatory response were also enriched in epididymal basal cells, including genes implicated in prostaglandin synthesis and secretion. Numerous studies have shown that PTGS1 is present in basal cells and that these cells can secrete prostaglandins [21, 40]. Inflammatory responses in other tissues have been shown to be important to stimulate differentiation of basal stem cells. In the prostate, inflammation enhances basal-to-luminal differentiation [78] while in the trachea, basal cell differentiation into undifferentiated epithelial cells for epithelial repair is initiated by the inflammation following injury [29, 79].

TP63 is a specific marker of basal cells in several epithelia, including the epididymis [48]. In prostate, TP63 is essential for differentiation of basal cells [80]. In pseudostratified and stratified epithelia, TP63 was among the first genes proposed to have a function in the maintenance of stem cell populations [81], and loss of TP63 resulted in a dramatic

epithelial phenotype during embryogenesis marked by the loss of stratification [82]. Furthermore, TP63 has been identified as a key determinant of the proliferative capacity of stem cells of stratified epithelia [83]. In the epididymis, Murashima et al [12] showed that TP63 was essential for the formation of basal cells. In our study, TP63 was strongly expressed in basal cells, and several of the highly expressed genes found in our basal cell fraction were previously reported as being TP63-dependent genes (Table 3), reinforcing the importance of TP63 in regulating epididymal basal cell function.

Canonical Wnt signaling has been reported in the epididymis [84]. This pathway causes an accumulation of β -catenin in the cytoplasm and its eventual translocation into the nucleus, where it acts as a transcription factor. Previous studies by our lab have reported the presence of catenins in the epididymis and showed that they are regulated as a function of postnatal development [85]. WNT proteins have critical roles in embryo development and in tissue homeostasis in the adult, including cell proliferation, polarity and cell differentiation [86]. In the present study, genes associated with the Wnt signaling pathway were found in basal cells, supporting our hypothesis that basal cells have a role in progenitor function.

Intracellular signaling pathway analyses indicated that cancer-related genes were among the most prevalent of the predicted pathways in isolated basal cells. Curiously, although there are very few cases of epididymal cancer [84], it would appear that epididymal basal cells have the capacity to promote cancer development. In other tissues, basal cells have been shown to play a significant role in the development of cancer and, in the case of breast cancer, is often associated with poor prognosis [87, 88]. Clearly,

124

however, the regulation of epididymal basal cells differs from that of basal cells in other tissues.

Several highly expressed genes in isolated basal cells are associated with multipotent stem cells in adult tissue (Fig 4C). These data support our hypothesis that epididymal basal cells are, in fact, epididymal stem cells. The differentiation of stem cells is dependent on cell-specific activation which is regulated by reciprocal signaling between basal cells and their niche [89]. Transcripts for various signaling ligands (*Bmp7, Jag1, Jag2, Ccl20, Pdgf*) and receptors (*Egfr, Epha2, Trop2, Bcam, Edar*) were all detected in the epididymal basal cell fraction, suggesting the potential for cellular differentiation.

In other epithelia, it is well established that basal cells act as multipotent stem cells [25, 30, 34, 90]. In the epididymis, Clermont and Flannery [91] reported that in the adult, basal cells have a very low mitotic index (1.4% for 2.5 months-old animals, and below 0.6% after 4 months). Later studies suggested that basal cell development during the perinatal period was a determinant for the development of the cauda epididymidis and vas deferens [6]. In culture, primary human epididymal epithelial cells can form spheres [92]; this formation is a common characteristic of stem or progenitor cells, suggesting that one or several cell types in the epididymis have progenitor abilities. However, it has been proposed that basal cells are not required for differentiation of principal, clear and narrow cells in the murine epididymis [12]. Shum et al. reported that epididymal basal cells are not progenitors of clear and principal cells during early development [11]. Based on the microarray analysis, we noted that epididymal basal cells have common characteristics with basal cells in other epithelia, and hypothesized that these included progenitor capacities. Our basal cell culture data show that basal cells can form spheroid structures

which are observed in embryonic stem cell cultures [93]. Our experiments also showed that basal cells differentiate *in vitro* from KRT5-positive cells to KRT8-positive cells. This is similar to basal cells from other tissues such as the prostate where basal cells give rise to cells which cells that express KRT8 [94]. In the trachea, basal cells can differentiate into specialized ciliated and secretory cells during epithelium repair [30].

In epididymis, GJB2 is a marker of columnar cells. As columnar cells differentiate into principal and other cell types, GJB2 levels dramatically decrease [9]. In our basal cell cultures, no staining for GJB2 was seen after 3 days, but was observed in cells within acini after 7, 10, and 14 days of culture. This suggests that basal cells can differentiate into cells that share the phenotype of columnar cells. In the trachea, ablation of ciliated cells with SO₂ activates basal cells to differentiate into undifferentiated progenitors, which then differentiate into ciliated and secretory cells, suggesting that differentiation occurs as a two-step process [95]. Our data would suggest a similar mechanism in the epididymis.

In conclusion, we have isolated epididymal basal cells and have shown, using gene expression profiling, that these cells are implicated in numerous epithelial functions, and may act as adult stem cells. Culture protocols support the notion that basal cells can differentiate in vitro and appear to differentiate into columnar cells. This indicates that regeneration of the epididymal epithelium may be possible and may explain the plasticity of this critical organ for male fertility.

126

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Mary Gregory, Julie Dufresne, Marlene Fortier, Christophe Gonçalves (INRS) and Jeannie Mui (McGill) for their helpful suggestions and assistance with this study.

REFERENCES

- 1. Sun EL, Flickinger CJ. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. Am J Anat 1979; 154:27-55.
- Hermo L, Robaire B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton B (eds.), The epididymis : from molecular to clinical practice. New York: Plenum Press; 2002: 81-102.
- Veri JP, Hermo L, Robaire B. Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. J Androl 1993; 14:23-44.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 8. Sun EL, Flickinger CJ. Proliferative activity in the rat epididymis during postnatal development. Anat Rec 1982; 203:273-284.
- Dufresne J, Finnson KW, Gregory M, Cyr DG. Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. Am J Physiol Cell Physiol 2003; 284:C33-43.
- Hermo L, Papp S, Robaire B. 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 1994; 239:421-440.
- 11. Shum WW, Hill E, Brown D, Breton S. Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. Reproduction 2013; 146:455-469.
- 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.
- 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.
- Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Shiotani M, Mori T, Matsuda T, Yoshida O. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. Hum Reprod 1992; 7:81-85.
- 15. Papp S, Robaire B, Hermo L. Immunocytochemical localization of the Ya, Yc, Yb1, and Yb2 subunits of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of adult rats. Microsc Res Tech 1995; 30:1-23.
- 16. 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.
- Li Z, Sun ZJ, Liao CG, Ma L, Ma BF, Zhang YQ. Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted originating from the epididymis differentially associates with viable and defective spermatozoa. Fertil Steril 2010; 93:2661-2667.

- Yeung CH, Nashan D, Sorg C, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E, Cooper TG. Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. Biol Reprod 1994; 50:917-926.
- 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.
- 20. Arrighi S. Are the basal cells of the mammalian epididymis still an enigma? Reprod Fertil Dev 2014; 26:1061-1071.
- Wong PY, Chan HC, Leung PS, Chung YW, Wong YL, Lee WM, Ng V, Dun NJ. Regulation of anion secretion by cyclo-oxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from the rat. J Physiol 1999; 514 (Pt 3):809-820.
- 22. Cyr DG, Hermo L, Laird DW. Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. Endocrinology 1996; 137:1474-1484.
- 23. 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.
- 24. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, Dexter T, Davies S, Bulmer K, Ford E, Parry S, Budroni M, et al. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. Cancer Res 2004; 64:3037-3045.
- Robinson EJ, Neal DE, Collins AT. Basal cells are progenitors of luminal cells in primary cultures of differentiating human prostatic epithelium. Prostate 1998; 37:149-160.
- 26. Breeze RG, Wheeldon EB. The cells of the pulmonary airways. Am Rev Respir Dis 1977; 116:705-777.
- Gomperts BN, Belperio JA, Fishbein MC, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. Keratinocyte growth factor improves repair in the injured tracheal epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2007; 37:48-56.
- Erjefalt JS, Sundler F, Persson CG. Epithelial barrier formation by airway basal cells. Thorax 1997; 52:213-217.
- 29. Musah S, Chen J, Hoyle GW. Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury. Respir Res 2012; 13:107.

- Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BL.
 Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:12771-12775.
- 31. Guo C, Liu H, Zhang BH, Cadaneanu RM, Mayle AM, Garraway IP. Epcam, CD44, and CD49f distinguish sphere-forming human prostate basal cells from a subpopulation with predominant tubule initiation capability. PLoS One 2012; 7:e34219.
- Prater MD, Petit V, Alasdair Russell I, Giraddi RR, Shehata M, Menon S, Schulte R, Kalajzic I, Rath N, Olson MF, Metzger D, Faraldo MM, et al. Mammary stem cells have myoepithelial cell properties. Nat Cell Biol 2014; 16:942-950.
- 33. Barclay WW, Axanova LS, Chen W, Romero L, Maund SL, Soker S, Lees CJ, Cramer SD. Characterization of adult prostatic progenitor/stem cells exhibiting selfrenewal and multilineage differentiation. Stem Cells 2008; 26:600-610.
- Cole BB, Smith RW, Jenkins KM, Graham BB, Reynolds PR, Reynolds SD. Tracheal Basal cells: a facultative progenitor cell pool. Am J Pathol 2010; 177:362-376.
- 35. Wang ZA, Mitrofanova A, Bergren SK, Abate-Shen C, Cardiff RD, Califano A, Shen MM. Lineage analysis of basal epithelial cells reveals their unexpected plasticity and supports a cell-of-origin model for prostate cancer heterogeneity. Nat Cell Biol 2013; 15:274-283.
- 36. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandao DF, Chahud F, Zucoloto S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. Histopathology 2005; 47:458-466.
- 37. 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.
- Killian GJ, Amann RP, Snyder J. Isolation of principal and basal cells from the epithelium of the hamster caput epididymidis by unit gravity sedimentation. Biol Reprod 1976; 15:266-279.

- Finaz C, Boue F, Meduri G, Lefevre A. Characterization of rat epithelial epididymal cells purified on a discontinuous Percoll gradient. J Reprod Fertil 1991; 91:617-625.
- 40. Leung GP, Cheung KH, Leung CT, Tsang MW, Wong PY. Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). Mol Cell Endocrinol 2004; 216:5-13.
- 41. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics 2003; 4:249-264.
- 42. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. Nat Genet 2001; 29:365-371.
- Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol 2003; 4:P3.
- 44. Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. Genome Biol 2003; 4:R70.
- 45. van Leenders GJ, Schalken JA. Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2003; 46 Suppl:S3-10.
- Suzuki K, Yu X, Chaurand P, Araki Y, Lareyre JJ, Caprioli RM, Orgebin-Crist MC, Matusik RJ. Epididymis-specific lipocalin promoters. Asian J Androl 2007; 9:515-521.
- 47. Brown D, Smith PJ, Breton S. Role of V-ATPase-rich cells in acidification of the male reproductive tract. J Exp Biol 1997; 200:257-262.
- Saito K, Kawakami S, Okada Y, Takazawa R, Koga F, Kageyama Y, Kihara K.
 Spatial and isoform specific p63 expression in the male human urogenital tract. J
 Urol 2006; 176:2268-2273.

- 49. 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. Int J Androl 1998; 21:217-226.
- 50. Hermo L, Krzeczunowicz D, Ruz R. Cell specificity of aquaporins 0, 3, and 10 expressed in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats. J Androl 2004; 25:494-505.
- 51. Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, et al. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. Genomics 2004; 83:706-716.
- 52. Garraway IP, Sun W, Tran CP, Perner S, Zhang B, Goldstein AS, Hahm SA, Haider M, Head CS, Reiter RE, Rubin MA, Witte ON. Human prostate sphere-forming cells represent a subset of basal epithelial cells capable of glandular regeneration in vivo. Prostate 2010; 70:491-501.
- 53. 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.
- 54. Klinefelter GR, Amann RP. Metabolism of testosterone by principal cells and basal cells isolated from the rat epididymal epithelium. Biol Reprod 1980; 22:1149-1154.
- 55. Cheung KH, Leung GP, Leung MC, Shum WW, Zhou WL, Wong PY. Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. J Gen Physiol 2005; 125:443-454.
- 56. Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirski FK, Pittet MJ, Breton S. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. Reproduction 2011; 141:653-663.
- 57. Ghosh M, Helm KM, Smith RW, Giordanengo MS, Li B, Shen H, Reynolds SD. A single cell functions as a tissue-specific stem cell and the in vitro niche-forming cell. Am J Respir Cell Mol Biol 2011; 45:459-469.
- 58. Ghebeh H, Sleiman GM, Manogaran PS, Al-Mazrou A, Barhoush E, Al-Mohanna FH, Tulbah A, Al-Faqeeh K, Adra CN. Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44high/CD24low phenotype as a predominant stem/progenitor

marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. BMC Cancer 2013; 13:289.

- Lawson DA, Xin L, Lukacs RU, Cheng D, Witte ON. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:181-186.
- Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li HI, Eaves CJ. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. Nature 2006; 439:993-997.
- 61. Dube E, Hermo L, Chan PT, Cyr DG. Alterations in gene expression in the caput epididymides of nonobstructive azoospermic men. Biol Reprod 2008; 78:342-351.
- Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, Turner TT. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. Biol Reprod 2005; 73:404-413.
- Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, Wilson E, Brown EL, Kopf GS, Johnston DS. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. Biol Reprod 2007; 76:561-570.
- 64. Turner TT, Johnston DS, Finger JN, Jelinsky SA. Differential gene expression among the proximal segments of the rat epididymis is lost after efferent duct ligation. Biol Reprod 2007; 77:165-171.
- Guyonnet B, Dacheux F, Dacheux JL, Gatti JL. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. J Androl 2011; 32:651-664.
- Dean MD, Good JM, Nachman MW. Adaptive evolution of proteins secreted during sperm maturation: an analysis of the mouse epididymal transcriptome. Mol Biol Evol 2008; 25:383-392.
- 67. Li JY, Wang HY, Liu J, Liu Q, Zhang JS, Wan FC, Liu FJ, Jin SH, Zhang YL. Transcriptome analysis of a cDNA library from adult human epididymis. DNA Res 2008; 15:115-122.

- Sullivan R, Legare C, Thabet M, Thimon V. Gene expression in the epididymis of normal and vasectomized men: what can we learn about human sperm maturation? J Androl 2011; 32:686-697.
- Da Silva N, Silberstein C, Beaulieu V, Pietrement C, Van Hoek AN, Brown D, Breton S. Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis. Biol Reprod 2006; 74:427-438.
- Song MG, Hwang SY, Park JI, Yoon S, Bae HR, Kwak JY. Role of aquaporin 3 in development, subtypes and activation of dendritic cells. Mol Immunol 2011; 49:28-37.
- 71. Nahmod KA, Vermeulen ME, Raiden S, Salamone G, Gamberale R, Fernandez-Calotti P, Alvarez A, Nahmod V, Giordano M, Geffner JR. Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II. FASEB J 2003; 17:491-493.
- 72. Nie W, Yan H, Li S, Zhang Y, Yu F, Zhu W, Fan F, Zhu J. Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells. Mol Immunol 2009; 46:355-361.
- Mandon M, Cyr DG. Tricellulin and its role in the epididymal epithelium of the rat.Biol Reprod 2015; 92:66.
- 74. Dube E, Dufresne J, Chan PT, Cyr DG. Epidermal growth factor regulates connexin
 43 in the human epididymis: role of gap junctions in azoospermia. Hum Reprod
 2012; 27:2285-2296.
- Hejmej A, Kotula-Balak M, Sadowska J, Bilinska B. Expression of connexin 43 protein in testes, epididymides and prostates of stallions. Equine Vet J 2007; 39:122-127.
- 76. Lydka M, Kopera-Sobota I, Kotula-Balak M, Chojnacka K, Zak D, Bilinska B. Morphological and functional alterations in adult boar epididymis: Effects of prenatal and postnatal administration of flutamide. Acta Vet Scand 2011; 53:12.
- 77. Cyr DG. Connexins and pannexins: Coordinating cellular communication in the testis and epididymis. Spermatogenesis 2011; 1:325-338.
- 78. Kwon OJ, Zhang L, Ittmann MM, Xin L. Prostatic inflammation enhances basal-toluminal differentiation and accelerates initiation of prostate cancer with a basal cell origin. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111:E592-600.

- 79. 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.
- 80. Kurita T, Medina RT, Mills AA, Cunha GR. Role of p63 and basal cells in the prostate. Development 2004; 131:4955-4964.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature 1999; 398:714-718.
- Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature 1999; 398:708-713.
- 83. Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F. p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. Cell 2007; 129:523-536.
- 84. Wang K, Li N, Yeung CH, Li JY, Wang HY, Cooper TG. Oncogenic Wnt/betacatenin signalling pathways in the cancer-resistant epididymis have implications for cancer research. Mol Hum Reprod 2013; 19:57-71.
- 85. 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.
- Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease.
 Annu Rev Cell Dev Biol 2004; 20:781-810.
- 87. Wang X, Kruithof-de Julio M, Economides KD, Walker D, Yu H, Halili MV, Hu YP, Price SM, Abate-Shen C, Shen MM. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. Nature 2009; 461:495-500.
- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. Cancer Cell 2007; 11:259-273.
- 89. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell 2008; 132:598-611.

- Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, Rock J, Sharma N, Dekoninck S, Blanpain C. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. Nature 2011; 479:189-193.
- 91. Clermont Y, Flannery J. Mitotic activity in the epithelium of the epididymis in young and old adult rats. Biol Reprod 1970; 3:283-292.
- 92. 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.
- 93. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphereformation as an assay for stem cells. Cell Stem Cell 2011; 8:486-498.
- 94. Rizzo S, Attard G, Hudson DL. Prostate epithelial stem cells. Cell Prolif 2005; 38:363-374.
- 95. Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH, Hogan BL. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111:E3641-3649.

 Table 1. List of genes enriched in the basal cell fraction with a greater than 5 fold-change.

Category	Gene Name	Gene Symbol	Fold Change	p-value
	Laminin,beta3	Lamb3	12.62	2.65E-04
	Integrin,alpha2	ltga2	7.50	1.09E-04
	Plakophilin1	Pkp1	7.23	1.32E-05
	Cadherin3	Cdh3	7.00	4.36E-05
	Integrin,beta4	ltgb4	7.05	5.43E-06
Adhesion	Fat tumor suppressor homolog2(Drosophila)	Fat2	7.26	6.07E-06
	Catenin(cadherin-associated protein),delta2	Otra a d D	E 44	
	(neuralplakophilin-relatedarm- repeatprotein)	Ctnnd2	5.44	7.13E-06
	Integrin,beta6	ltgb6	5.37	2.56E-07
	Keratin14	Krt14	10.54	9.25E-04
	Keratin15	Krt15	9.98	7.64E-05
Cytoskeleton	Keratin17	Krt17	6.51	8.98E-05
	Keratin7	Krt7	5.87	2.70E-06
	Keratin80	Krt80	5.22	8.24E-06
Epidermal Function	Small proline-rich protein1a	Sprr1a	5.71	7.91E-06
Extracellular Matrix	Lysyloxidase-like4	Loxl4	6.63	2.51E-04
lon Transport	Fxyd domain-containing ion transport regulator3	Fxyd3	9.12	1.28E-04
	Solute carrier family16,member12	SI016012	7 74	1.68E-06
	(monocarboxylic acid transporter12)	51010812	1.14	
	Chloride channel calcium activated2	Clca2	6.61	1.79E-04
	Solute carrier organic anion transporter family,Member2a1	Slco2a1	5.18	1.41E-05
Metabolism	Arachidonate lipoxygenase3	Aloxe3	7.02	7.23E-07

Protease/	Serpin peptidase inhibitor,clade b (ovalbumin), Member5	Serpinb5	9.41	2.64E-05
Antiprotease	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade b, Member1a	Serpinb1a	6.19	5.90E-04
Signaling Ligand	Neuregulin1	Nrg1	8.40	7.98E-05
	Ret proto-oncogene	Ret	6.78	7.18E-05
	Protein tyrosine phosphatase, receptor- type, Zpolypeptide1	Ptprz1	6.30	1.17E-04
Signal	Tumor associated calcium signal transducer2	Tacstd2	5.94	3.27E-05
Transduction	Epidermal growth factor receptor	Egfr	5.60	3.18E-04
	P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase6	Pak6	5.04	1.35E-05
	Epithelial mitogen homolog(mouse)	Epgn	5.31	3.75E-05
Transcription	Tumor protein p63	Тр63	8.58	3.20E-05
Factor	Metastasis associated in colon cancer1	Macc1	6.63	2.79E-05
	Ring finger protein39	Rnf39	8.64	5.17E-05
	Annexin a 8	Anxa8	8.34	2.33E-04
	Ankyrin repeat domain22	Ankrd22	7.79	3.63E-05
Other	ATP binding cassette, subfamily b (MDR/TAP), Member1b	Abcb1b	7.43	2.78E-04
	Proline rich G-carboxy glutamic acid4	Dread	5.91	2.85E-05
	(transmembrane)	Plig4		
	C2calcium-dependent domain containing4d	C2cd4d	5.67	7.06E-05
	Interleukin24	IL24	5.18	3.07E-05

Table 2. Expression level of previously described epididymal basal cell genes in the isolated basal cell fraction.

Gene description	Gene Symbol	Fold Change	p-value	accession number
Angiotensin II receptor	Agtr2	-9.93	1.01E-06	NM_012494
Aquaporin 3	Aqp3	-1.24	0.08	NM_031703
CD44	CD44	2.30	4.72E-04	NM_012924
Claudin-1	Cldn1	3.74	1.06E-04	NM_031699
Keratin 14	Krt14	10.65	3.10E-04	NM_001008751
Keratin 17	Krt17	6.54	1.77E-05	NM_212545
Cyclo-oxygenase 1	Ptgs1	4.12	2.91E-05	NM_017043
p63	Tp63	8.05	6.56E-06	NM_019221
Transient receptor potential channel 3	Trpc3	-1.27	0.04	NM_021771

Table 3. Differentially regulated genes expressed in the basal cell fraction and which are known to be regulated by TP63.

Category	Gene description	Gene Symbol	Fold- Change	p-value
	Tumor protein p63	Tp63	8.05	6.56E-06
	Perp ,tp53 apoptosis effector	PERP	2.56	2.81E-05
	Integrin alpha 3	ltga3	4.25	4.87E-06
	Integrin alpha 6	ltga6	4.30	2.16E-05
Cell Adhesion	Cadherin3	Cdh3	6.97	5.91E-06
	Collagen,type xvii, alpha1	Col17a1	2.08	8.32E-04
	Claudin-1	Cldn1	3.74	1.06E-04
Cell Cycle	E3 ubiquitin-protein ligase	MDM2	2.39	3.60E-05
Differentiation	V-ets erythroblastosis virus 26oncogene Homolog1(avian)	Ets1	2.89	2.42E-04
	Tripartite motif-containing29	Trim29	2.56	5.73E-06
	Ectodysplasin-A receptor	Edar	2.30	6.05E-05
Development	Bone morphogenic protein7	Bmp7	2.50	9.11E-07
Development	Interferon regulatory factor6	Irf6	4.12	7.05E-06
	Jagged2	JAG2	4.60	2.02E-08
Signal Transduction	Epidermal growth factor receptor	EGFR	5.32	1.74E-04
Metabolism/ Detoxification	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member a3	Aldh1a3	2.41	2.45E-04
	Serpin peptidase inhibitor, clade b (ovalbumin) Member5	Serpinb5	8.96	4.61E-06
	Serpin peptidase inhibitor, clade e (nexin, Plasminogen activator inhibitor type1), Member1	Serpine1	2.72	8.70E-04
	Glutathione peroxidase2	Gpx2	2.74	1.75E-04
Cytoskeleton	Keratin 14	Krt14	10.65	3.10E-04



Supplemental figure S1. Immunolocalization of ITGA6 in the different regions of the epididymis of a 90 days-old adult rat. ITGA6 (red; arrow) was localized to the basal compartment of the epithelium in all regions (A-initial segment; B-caput; C-corpus; D-cauda) of the epididymis. Bar = 10 μ m. Nuclei are stained with Hoechst dye (blue). B-basal cells; P-principal cells; L-lumen.



Supplemental figure 2. Immunolocalization of PTGS1 in the different regions of epididymis in 48 days-old rat (panels A-D). The results indicate that PTGS1 (green, arrow) was localized to the basal compartment of the epithelium in all regions of the epididymis (A-initial segment; B-caput; C-corpus; D-cauda). Panel E shows the immunolocalization of PTGS1 using a mouse monoclonal FITC-conjugated antibody that was used for flow cytometry. The results show that the antibody is specific for basal cells. A negative control in which sections were incubated in the absence of PTGS1 antisera shows no immunostaining (F).



Supplemental figure 3. Colocalization of ITGA6 (red) and PTGS1 (green) in the different regions of the epididymis (A-initial segment; B-caput; C-corpus; D-cauda). ITGA6 and PTGS1 are colocalized to basal cells (yellow arrow). Nuclei are stained with Hoechst blue dye. B-basal cells; P-principal cells.

Legends of supplemental movies

Supplemental Movie S1 - Three-dimensional reconstruction of an acinus of cells after 7 days of culture. KRT5 (red)-positive cells can be observed at the periphery of the acinus.

Supplemental Movie S3 - Three-dimensional reconstruction of an acinus immunostained for Cx26 after 7 days of culture. Some cells within the structure were positive for Cx26 (red).

Supplemental Movie S2 - Three-dimensional reconstruction of a spherical acini of cells after 14 days of culture. Spheres became larger with time of culture and the majority of the cells (90%) became KRT8-positive (green).

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Si différentes cellules de l'épithélium épididymaire ont été bien étudiées, les cellules basales restent relativement mal connues. Parmi les rôles suggérés, il a notamment été proposé un rôle dans le métabolisme des radicaux libres permettant de lutter contre le stress oxydant (Hermo and Papp, 1996; Nonogaki et al., 1992), un rôle immunitaire (Yeung et al., 1994), la participation des cellules basales à la barrière hémato-épididymaire et surtout un rôle de régulation des fonctions d'autres cellules épithéliales (Cheung et al., 2005; Leung et al., 2004; Shum et al., 2011). Cependant, la découverte récente d'un type de cellules immunitaires, les cellules basales sont des cellules immunitaires (Da Silva et al., 2011). Enfin, si les cellules basales sont considérées comme des cellules souches adultes multipotentes dans d'autres tissus comme la trachée (Rock et al., 2009), la glande mammaire (Van Keymeulen et al., 2011) et la prostate (Rizzo et al., 2005), aucune capacité progénitrice n'avait été mise en évidence dans les cellules basales. Or les résultats obtenus dans notre étude vont dans le sens d'une capacité progénitrice des cellules basales épididymaires.

1. Isolement des cellules basales

Dans la littérature, il existe plusieurs articles rapportant l'isolement des cellules basales épididymaires. Plusieurs méthodes ont d'ailleurs été utilisées pour parvenir à une pureté de population jugée satisfaisante. Cependant, pour la plupart de ces études, l'efficacité est estimée à partir de critères morphologiques des cellules, sans utilisation de marqueurs spécifiques des cellules basales. La découverte de certains de ces marqueurs, comme KRT5 (Shum et al., 2013), et la connaissance de la plasticité morphologique des cellules basales de l'épididyme, conduisent aujourd'hui à remettre en question l'efficacité de ces méthodes.

Dans ce travail de thèse, nous avons présenté l'isolement des cellules basales par séparation magnétique, à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre l'ITGA6, que nous avons montré comme étant exprimée uniquement dans les cellules basales. Cependant, nous avons essayé d'autres méthodes avant celle-ci, qui n'ont pas permis la séparation des cellules basales. L'efficacité de ces méthodes est résumée au tableau 1.

1.1. Méthode de séparation par densité : gradients de Percoll

Plusieurs études témoignent de séparation des cellules épithéliales de l'épididyme par des gradients de densité. L'étude de Kilian (1976) présente ainsi une séparation des cellules épididymaires par un gradient de BSA, permettant d'isoler les cellules basales avec une pureté allant de 68 à 86%. Dans cette étude, la pureté a été vérifiée en microscopie électronique uniquement, en se basant sur une morphologie type des cellules basales (noyau foncé et irrégulier, cytoplasme contenant peu d'organites). Cependant, depuis cette étude, la découverte de cellules dendritiques dans l'épithélium épididymaire (Da Silva et al., 2011) peut faire penser que d'autres cellules que les cellules basales peuvent avoir une morphologie semblable. En effet, les cellules dendritiques sont également situées à la base de l'épithélium et possèdent également des projections apicales en direction de la lumière (Da Silva et al., 2011). Il n'a jamais été effectué de microscopie électronique sur les cellules dendritiques de l'épididyme.

Quelques années plus tard, Klinefelter et al. (1980) reprennent cette technique, et également par microscopie électronique établissent une population de cellules basales pures de 76 à 82%. Enfin, une autre étude présente la séparation des cellules épithéliales et non épithéliales de l'épididyme à l'aide d'un gradient de Percoll (Finaz et al., 1991). Cette étude ne permet pas d'isoler les différents types de cellules épithéliales épididymaires mais uniquement de différencier les cellules épithéliales des cellules non-épithéliales. La KRT8 est utilisée comme marqueur de cellules épithéliales et la desmine comme marqueur de cellules non-épithéliales. Cependant, si KRT8 est ici considéré comme un marqueur de toutes les cellules épithéliales, l'expression et la localisation de KRT8 n'ont jamais été étudiées dans l'épididyme.

Dans notre étude, l'utilisation d'un gradient de Percoll a permis un certain enrichissement en cellules basales puisque nous avons obtenu jusqu'à 50% de cellules marquées après séparation, alors que le taux dans une population de cellules totales est d'environ 20%. Cependant, cette efficacité n'était pas assez importante pour pouvoir utiliser cette méthode.

1.2. Isolement par séparation magnétique (MACS)

La méthode de séparation magnétique nécessite un marqueur spécifique des cellules d'intérêt qui soit extracellulaire. Peu de marqueurs de cellules basales correspondant à cette définition étaient connus au début de ce projet. Afin d'évaluer l'efficacité des différentes méthodes, nous avons marqué les cellules isolées avec KRT5.

1.2.1. Trpc3

Le premier essai d'isolement de nos cellules d'intérêt s'est fait par séparation magnétique, en souhaitant utiliser le marqueur Trpc3. En effet, dans une étude précédente, ce marqueur semblait être utilisé avec succès pour séparer les cellules basales de l'épididyme, avec une pureté de population de 86% (Cheung et al., 2005). L'efficacité de la séparation a été vérifiée par immunohistochimie à l'aide d'un marqueur connu des cellules basales, Cox-1. Ce marqueur est connu pour être spécifique des cellules basales (Wong et al., 1999). Cependant, dans l'article de Cheung et al, le marquage de Cox-1 n'est pas celui attendu ; en effet, Cox-1 est une protéine cytoplasmique, alors que le marquage sur les photos est nucléaire.

A partir de la séquence peptidique donnée dans cet article, nous avons donc fait synthétiser un peptide puis un anticorps fabriqué chez le lapin et dirigé contre ce peptide. Cependant dans notre étude, le marquage de l'épithélium épididymaire avec Trpc3 en immunohistochimie n'a pas permis de mettre en évidence que ce marqueur était spécifique des cellules basales. En effet, nous n'avons obtenu après séparation que 20% des cellules positives pour KRT5, ce qui correspond au pourcentage de cellules basales dans une population de cellules avant isolement. Ce résultat a plus tard été confirmé avec

les microréseaux qui n'ont pas montré un enrichissement de Trpc3 dans les cellules basales (ratio basal/non basal1,28).

1.2.2. CD-44

Les cellules basales ont été montrées comme exprimant le marqueur CD-44, un récepteur de l'acide hyaluronique impliqué dans la réponse immunitaire et l'adhésion cellulaire (Terpe et al., 1994). L'utilisation de ce marqueur n'a pas permis de séparer efficacement les cellules basales chez le rat puisque seules 20% des cellules de la fraction positive étaient positives pour KRT5. Cependant, nos résultats de microréseaux ont finalement montré que CD44 est enrichi dans les cellules basales épididymaires (2,32 fois plus dans les cellules basales). L'inefficacité de cette méthode pourrait venir d'une absence de reconnaissance de la protéine par l'anticorps, ou d'un problème d'accessibilité de l'épitope. Malgré plusieurs ajustements techniques, l'utilisation de cet anticorps en immunofluorescence n'a pas non plus montré un marquage localisé au niveau des cellules basales.

1.2.3. ITGA6

La présence de l'ITGA6 n'avait pas été étudiée dans l'épididyme avant nos travaux. L'utilisation de ce marqueur a été basée sur la similarité entre les cellules basales de l'épididyme et les cellules basales d'autres épithéliums pseudostratifiés. En effet, ce marqueur est présent et spécifique des cellules basales de la prostate (Guo et al., 2012; Lawson et al., 2007), de la trachée (Ghosh et al., 2011a) et de la glande mammaire (Stingl et al., 2005). Comme plusieurs marqueurs spécifiques des cellules basales de l'épididyme sont également spécifiques des cellules basales de ces autres tissus (tels que p63 ou KRT5), nous avons émis l'hypothèse que ITGA6 pouvait également être un marqueur commun entre ces cellules.

La localisation de l'ITGA6 dans l'épididyme a montré que la protéine était présente à la base de l'épithélium, et la colocalisation avec Cox-1 a permis de déterminer qu'elle était spécifiquement exprimée par les cellules basales. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'ITGA6 avec une méthode de séparation magnétique a alors permis d'isoler efficacement les cellules basales (tableau 1); en effet, 89% de cellules isolées étaient positives pour KRT5, ce qui représente un très net enrichissement.

1.2.4. Comparaison de l'efficacité des différentes méthodes d'isolement des cellules basales épididymaires

Le tableau 1 présente les résultats des différentes expériences de séparation des cellules basales. L'efficacité de ces méthodes a été déterminée par immunofluorescence des différentes fractions cellulaires obtenues après séparation à l'aide de la KRT5.

Méthode de séparation des cellules basales	Nombre d'expériences d'isolement	Efficacité maximale obtenue (% de cellules basales dans la fraction positive)
Gradient de Percoll	7	50
Anticorps Trpc3 en MACS	4	20
Anticorps CD-44 en MACS	3	20
Anticorps ITGA6 en MACS	4	89

Tableau 1. Efficacité des différentes méthodes d'isolement des cellules basales

2. Caractéristiques des cellules basales épididymaires

Les travaux réalisés dans ce projet ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les caractéristiques des cellules basales, au niveau de leur

participation à la barrière hémato-épididymaire ainsi qu'au niveau de leurs fonctions au sein de l'épithélium.

2.1. Les cellules basales et la participation à la barrière hémato-épididymaire

Les cellules basales ont précédemment été décrites comme possédant des projections apicales minces se dirigeant vers la lumière de l'épididyme, dont certaines sont capables de traverser la barrière hémato-épididymaire et d'atteindre le compartiment luminal (Shum et al., 2008). Les cellules basales expriment également la claudine-1 (Gregory et al., 2001); il a été suggéré que cette expression pourrait permettre aux cellules basales de se lier aux claudines du complexe jonctionnel et ainsi de traverser la barrière hémato-épididymaire pour atteindre la lumière (Shum et al., 2008). Des études ont montré que l'expression et la localisation de la claudine-1 étaient régulée par les androgènes au niveau du segment initial mais pas des autres régions de l'épididyme, ce qui indique une régulation différente selon les segments (Gregory et al., 2001). Il a également été montré que le facteur de transcription p63 pouvait se lier au promoteur de la claudine-1 dans des kératinocytes (Lopardo et al., 2008). La claudine-1 est indispensable à la jonction serrée ; en effet, des souris invalidées pour la claudine-1 ne sont pas viables et meurent après quelques heures par déshydratation (Furuse et al., 2002). C'est également une cible importante de p63 indispensable au développement normal de l'épiderme (Lopardo et al., 2008) et potentiellement d'autres épithéliums. D'autres régulateurs de l'expression du gène codant pour la claudine-1 existent, notamment les facteurs de transcription SP1 et SP3 qui peuvent se lier au promoteur du gène de la claudine-1 et influencer son expression dans l'épididyme (Dufresne and Cyr, 2007).

Parmi les points de croisement entre cellules basales et jonctions serrées, c'est la jonction tricellulaire qui était citée comme le lieu préférentiel où la cellule basale traversait la barrière hémato-épididymaire (Shum et al., 2008). Cependant, les résultats de notre étude viennent clairement interroger cette hypothèse, puisque nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une colocalisation entre la tricelluline et KRT5 même dans le corps et la queue où les projections des cellules basales sont présentes. Nous n'avons

donc pas confirmé que les cellules basales participent à la jonction tricellulaire. Cependant, ces résultats ne permettent pas de conclure que les cellules basales ne participent pas à la barrière hémato-épididymaire ; en effet il est possible que la cellule basale soit capable de former une jonction bicellulaire.

L'architecture de la jonction serrée tricellulaire consiste en brins de jonction serrée entre chaque paire des trois cellules qui s'étendent vers le centre de la jonction tricellulaire ; ces brins s'orientent ensuite vers une direction basale (Staehelin, 1973). Ce type de jonction rend la barrière extrêmement résistante ; on peut supposer que le fait que la cellule basale ne participe pas à ce type de jonction lui confère une plus grande plasticité.

2.2. Les cellules basales comme cellules progénitrices garantes de l'état de l'épithélium

2.2.1. Ancien modèle de la régulation des cellules claires par les cellules basales

L'étude de Shum et al (Shum et al., 2008) présentait un modèle dans lequel les cellules basales épididymaires exprimaient spécifiquement AGTR2. L'activation de ce récepteur par l'angiotensine II serait capable de stimuler la sécrétion d'ions H+ par les cellules claires via une communication intercellulaire et la voie de signalisation NO/GMPc (figure 1). Cette communication permettrait de maintenir un pH luminal acide, essentiel à la maturation des spermatozoïdes (Shum et al., 2009).



Figure 1. Représentation de la régulation de la fonction des cellules claires par les cellules basales (modifié de Breton et al., 2012). Les cellules basales étendent des projections apicales entre les cellules épithéliales pour atteindre la lumière de l'épididyme, en formant une jonction serrée tricellulaire. La liaison de l'angiotensine II au récepteur AGTR2 induit la production de NO dans ces cellules, qui diffuse au niveau des cellules claires et agit localement via la production de cGMP pour induire une accumulation de V-ATPase au niveau des microvillosités et donc une augmentation de la sécrétion d'ions H⁺.

Cependant, le profil d'expression génique des cellules basales réalisé dans ce travail a montré qu'AGTR2 était très fortement enrichi dans la fraction non-basale (12,13 fois plus dans la fraction non-basale), et donc non présent dans les cellules basales. Plusieurs études ont rapporté la présence d'AGTR2 dans des cellules dendritiques (Nahmod et al., 2003; Nie et al., 2009). Or les cellules dendritiques de l'épididyme ont été découvertes après l'étude de Shum et al. montrant AGTR2 dans les cellules basales (Da Silva et al., 2011), et aucune étude n'est venue par la suite préciser la localisation exacte

d'AGTR2. L'absence d'AGTR2 dans les cellules basales vient controverser l'hypothèse d'une régulation des cellules claires par les cellules basales via ce récepteur.

2.2.2. Nouveau modèle de la fonction progénitrice des cellules basales

Notre étude a permis une évolution sur l'existence de cellules souches au sein de l'épididyme. En 1970, il a été suggéré que chez l'adulte, les cellules basales ne se divisaient pas et n'étaient pas des cellules souches (Clermont and Flannery, 1970). Toutefois, cette étude n'a été menée que dans des conditions normales, et l'existence de cellules souches pour régénérer un épithélium lésé par un stress, une infection ou une inflammation n'a jamais été recherchée. Malgré l'absence de caractère souche des cellules basales épididymaire, d'autres études ont ensuite montré que le développement des cellules basales semblait essentiel au développement de la queue de l'épididyme (Atanassova et al., 2005). Plus tard, il a été montré que des cultures primaires de cellules épithéliales étaient capables de former des sphères, ce qui suggère une capacité de cellules souches ou progénitrices au sein de l'épithélium (Kristensen et al., 2010). Cependant, ces caractéristiques n'avaient pour l'instant pas été attribuées aux cellules basales. En effet, il avait également été suggéré que les cellules basales n'étaient pas requises pour la différenciation des cellules principales, claires et étroites dans l'épididyme de souris (Murashima et al., 2011). Récemment, une autre étude concluait que les cellules basales n'avaient pas de capacités multipotentes (Shum et al., 2013), puisqu'ils n'observaient pas de co-expression transitoire entre un marqueur de cellules basales (KRT5) et un marqueur de cellules principales (l'aquaporine-9), ou entre KRT5 et un marqueur de cellules claires (V-ATPase) ; il faut néanmoins noter que cette absence de co-expression ne permet pas de démontrer l'absence de caractère progéniteur d'une cellule.

En 2009, Hamzeh et al (Hamzeh and Robaire, 2009) ont constaté qu'après orchidectomie, il existait une diminution de la prolifération cellulaire dans l'épididyme, alors qu'une restauration des apports en testostérone conduit à une réaugmentation de la prolifération, excepté dans le segment initial. Si la majorité du phénomène de prolifération concerne les cellules principales, il existe également une augmentation de la

prolifération des cellules basales. De même, chez la souris, la ligature des canaux efférents entraîne des changements dans la morphologie des cellules basales avec disparition des projections apicales et une apoptose de certaines cellules basales après 24 heures (Kim et al., 2015). Cependant, 48 heures après la ligature, on observe une prolifération des cellules basales, dépendante des androgènes. Ces études suggèrent que la rupture de l'homéostasie de l'épithélium épididymaire conduit à une stimulation des cellules basales pour reconstruire un épithélium.

Plusieurs connexines ont été identifiées dans l'épididyme chez le rat : les connexines 43, 30.3, 31.1 et 32, et la connexine 26 chez les jeunes animaux (Dufresne et al., 2003). Dans notre étude, plusieurs connexines sont enrichies dans les cellules basales par rapport aux autres types cellulaires de l'épithélium. Il s'agit des connexines 43 (GJA1), 31 (GJB3), 30.3 (GJB4) et 31.1 (GJB5). La connexine 43 a été la première identifiée dans l'épididyme, et a dès le début été localisée entre les cellules basales et les cellules principales, ou entre les cellules basales et les cellules claires (Cyr et al., 1996). Ces données ont permis de suggérer que certaines fonctions de l'épithélium impliquaient les cellules basales, ce que nos résultats viennent confirmer. Les connexines sont également bien connues pour exercer un effet de proximité (également appelé «bystander effect»). Cet effet consiste en l'expression par des cellules d'une réponse biologique à un signal venant des cellules adjacentes, et a notamment été étudié dans les phénomènes de cytotoxicité, de radiations ionisantes et de tumorigénèse. Plusieurs connexines ont été identifiées comme participant à cet effet, dont les connexines 43 (Kwak et al., 2001), 26 (Garcia-Rodriguez et al., 2011) et 32 (Tanaka et al., 2001). Les hauts niveaux de connexines dans les cellules basales épididymaires pourraient donc être liés à un rôle de «senseur» de la santé de l'épithélium.

Dans notre étude, les cellules basales en culture se réorganisent pour former des sphères et on observe une perte du marqueur de cellule basale KRT5 et une apparition des marqueurs KRT8 et connexine 26. La connexine 26 est un marqueur de cellules en colonnes dans l'épididyme (Dufresne et al., 2003). Dans la trachée, il a été montré que la lésion de l'épithélium entraînait une migration des cellules basales, puis une prolifération et une différenciation (Crespin et al., 2014). La prolifération des cellules basales induit l'expression de la connexine 26, qui va réguler négativement la prolifération puis

disparaître lors de la différenciation. Notre modèle de culture pourrait se rapporter à cette étude, avec une prolifération des cellules basales, une réorganisation, et l'apparition de la connexine 26 comme retour à un stade moins différencié. La connexine 26 était toujours exprimée par certaines cellules après 14 jours de culture ; maintenir la culture plus longtemps pourrait conduire à une disparition de la connexine 26 et l'acquisition de marqueurs de cellules principales, davantage différenciées.



Figure 2. Modèle de différenciation cellulaire dans l'épididyme adulte après une lésion de l'épithélium. Une rupture de l'homéostasie de l'épithélium (par exemple par inflammation ou infection) va stimuler les cellules basales via les connexines, qui vont alors se différencier en cellules en colonnes puis en cellules principales et claires afin de reformer un épithélium intact.

Pris ensemble, ces résultats permettent de proposer un modèle où les cellules basales agissent comme senseurs de la santé de l'épithélium et où en cas d'altérations, elles sont capables de se diviser et de se différencier pour reformer d'autres types cellulaires, voire de reconstituer un épithélium (Figure 2).

3. Comparaison des cellules basales dans les différents tissus

L'analyse du profil d'expression génique des cellules basales de l'épididyme a également permis d'effectuer des comparaisons avec les profils d'expression génique de cellules basales d'autres épithéliums pseudostratifiés ; en effet plusieurs études ont établi ces profils sur la prostate (Oudes et al., 2006), la trachée (Hackett et al., 2011; Rock et al., 2009) et la glande mammaire (Grigoriadis et al., 2006; Jones et al., 2004; Kendrick et al., 2008; Shipitsin et al., 2007). En comparant les différents résultats de ces études avec le transcriptome des cellules basales de l'épididyme, nous n'avons retrouvé que cinq gènes exprimés dans toutes les cellules basales. Il s'agit de KRT5, de P63, de MYC, d'ITGA6 et de COL17A1, qui est impliqué dans l'adhésion cellulaire. L'étude des profils d'expression génique des cellules basales a également permis de repérer sept gènes communs à la prostate, la trachée et la glande mammaire mais absents de l'épididyme : COL4A6, DST, FKBP14, GPR126, GPR87, HDGFRP3 et TFPI2 (tableau 2). Cependant ces gènes ne sont pas suffisants pour identifier une fonction qui serait spécifique aux cellules basales d'autres épithéliums mais absente des cellules basales épididymaires.
Gènes communs à toutes les cellules		Gènes communs aux cellules basales	
basales (épididyme, prostate, trachée		de prostate, trachée et glande	
et glande mammaire)		mammaire et absents de l'épididyme	
COL17A1	Collagène type XVII alpha1	COL4A6	Collagène type IV alpha 6
ITGA6	Intégrine-α6	DST	Dystonine
KRT5	Cytokératine 5	FKBP14	FK506 binding protein 14
MYC	c-myc	GPR126	G protein-coupled receptor 126
Tp63	Tumor protein p63	GPR87	G protein-coupled receptor 87
		HDGFR3	
		TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2

Tableau 2. Gènes communs entre différentes cellules basales

La figure 3 montre le nombre de gènes en commun entre les cellules basales de l'épididyme et d'autres épithéliums pseudostratifiés. Sur les 807 gènes considérés comme spécifiques des cellules basales de la glande mammaire, 58 étaient retrouvés dans les cellules basales de l'épididyme ; de même sur 452 gènes présents dans les cellules basales de la prostate, 36 étaient retrouvés dans les cellules basales de la prostate, 36 étaient retrouvés dans les cellules basales de la trachée étaient également dans les cellules basales de l'épididyme. Il existe donc des points communs entre les cellules basales des différents tissus.



Figure 3. Gènes en commun entre les cellules basales de l'épididyme et les cellules basales d'autres épithéliums pseudostratifiés

3.1. Caractéristiques communes aux cellules basales

3.1.1. Les cellules basales comme cellules progénitrices

A l'aide du profil d'expression génique, nous avons pu déterminer plusieurs fonctions des cellules basales de l'épididyme qui se retrouvent également dans les cellules basales d'autres épithéliums pseudostratifiés. Tout d'abord, ce profil et la culture de cellules basales établie ont permis de montrer la capacité de différenciation des cellules basales in vitro ; cette caractéristique existe également chez d'autres cellules basales telles que celles de la prostate (Garraway et al., 2010), de la trachée (Rock et al., 2009) et de la glande mammaire (Prater et al., 2014), ainsi que les cellules basales de l'épiderme (Senoo, 2013). Ensuite, nous avons vu que plusieurs gènes impliqués dans la réponse à l'inflammation était enrichis dans les cellules basales épididymaires ; or dans d'autres tissus, les réponses inflammatoires entraînent la stimulation des cellules basales

progénitrices et conduisent à une différenciation cellulaire, notamment dans la prostate (Kwon et al., 2014) et dans la trachée (Hong et al., 2004).

3.1.2. La voie de signalisation Wnt

La voie de signalisation Wnt a été identifiée dans nos microréseaux comme présente dans les cellules basales épididymaires. Trois voies de signalisation Wnt sont caractérisées : la voie canonique, qui joue un rôle dans la régulation de la transcription génique, la voie non-canonique Wnt/calcium qui régule le calcium dans les cellules et la voie non-canonique de polarité planaire des cellules, qui intervient au niveau du cytosquelette. Toutes les voies sont activées par la liaison d'une protéine Wnt à un récepteur.

La voie canonique de signalisation Wnt est la voie privilégiée, et est également appelée voie de signalisation Wnt/ β -caténine. La liaison d'une protéine Wnt à un récepteur Frizzled ou Lrp5/6 active la voie de signalisation, ce qui entraîne une accumulation de β -caténine dans le cytoplasme, et sa translocation dans le noyau pour agir comme coactivateur de facteurs de transcriptions. La β -caténine peut notamment agir sur le gène MYC. En l'absence de ligand, la β -caténine est dégradée par un complexe protéique incluant APC (adenomatous polyposis coli), axine, CKI (casein kinase I epsilon) et GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta).

La voie canonique Wnt est une des principales voies de signalisation impliquées dans la régulation des cellules souches (Brennan and Brown, 2004; Clevers and Nusse, 2012; Howe and Brown, 2004). Elle est également connue pour réguler le développement embryonnaire et l'homéostasie chez l'adulte (Brennan and Brown, 2004; Clevers and Nusse, 2012; Howe and Brown, 2004; Many and Brown, 2010; Nusse et al., 2008). Elle est présente dans les cellules basales de la glande mammaire (Many and Brown, 2014), de la prostate (Wang et al., 2008) et de la trachée (Lynch and Engelhardt, 2014), dans lesquels elle promeut la formation de sphères in vitro. Il semble donc que ce soit une caractéristique commune des cellules basales et progénitrices des épithéliums. Cette activité dans les comportements progéniteurs entraîne également une implication dans la cancérogenèse (Clevers and Nusse, 2012; Howe and Brown, 2012; Howe and Brown, 2004; Polakis, 2007).

La β -caténine est hautement exprimée dans l'épididyme (Wang et al., 2013a). Elle est notamment localisée le long de la membrane plasmique entre les cellules épithéliales adjacentes, où elle participe à la jonction adhérente (DeBellefeuille et al., 2003). L'orchidectomie chez des rats adultes entraîne une diminution de la β -caténine au niveau de la membrane plasmique et une augmentation dans le cytoplasme ; le remplacement de la testostérone bloque l'effet de l'orchidectomie, suggérant que dans l'épididyme l'expression et la localisation sont régulées par les androgènes (Lombardi et al., 2013). Il existerait également des interactions avec les œstrogènes ; en effet, un traitement avec un antagoniste du récepteur aux œstrogènes entraîne une diminution des niveaux d'expression de la protéine Wnt4 (Deshpande et al., 2009).

La voie non-canonique de polarité planaire des cellules active les GTPases RhoA (RAS homologue gene-family member A) et RAC1, qui activent la kinase JNK (Jun N-terminal kinase) et ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1), ce qui permet le remodelage du cytosquelette et des changements dans l'adhésion cellulaire. Récemment, il a été découvert que dans la glande mammaire, un mécanisme non-canonique est également impliqué dans la formation de mammosphères (Many and Brown, 2014).

L'implication des voies de signalisation Wnt dans les cellules basales épididymaires semble donc similaire à son existence dans les cellules basales d'autres épithéliums pseudostratifiés.

3.2. Spécificités des cellules basales de l'épididyme

Si les cellules basales des différents tissus présentent de grandes similarités, elles peuvent également avoir des propriétés spécifiques au sein d'un tissu. Par exemple, les cellules basales de la glande mammaire ont des propriétés contractiles et permettent l'éjection du lait (Deugnier et al., 1995).

La prostate, la trachée et la glande mammaire sont des tissus connus pour être le siège de cancérogenèse, alors que les tumeurs de l'épididyme sont particulièrement rares (Ganem et al., 1998; Jones et al., 1997; Yeung et al., 2012). Pourtant, le profil d'expression génique des cellules basales épididymaires révèle l'expression de plusieurs oncogènes, tels que MYC, MET, RET, et des voies de signalisation relatives à la cancérogenèse ont été identifiées dans ces cellules. Il semble donc qu'il existe une régulation différente au sein de l'épididyme par rapport aux autres tissus.

Plusieurs facteurs ont été suggérés comme expliquant l'extrême rareté des cancers de l'épididyme, présentés dans la revue de Yeung et al (Yeung et al., 2012). Il a notamment été évoqué l'activité de gènes suppresseurs de tumeurs dont le gène DUSP6 (Dual Specificity Phosphatase 6), connu pour avoir une activité pro-apoptotique et pour exercer un effet suppresseur de tumeurs sur des lignées de cellules cancéreuses pulmonaires (Zhang et al., 2010). Dans notre étude, ce gène est surexprimé dans les cellules basales de l'épididyme (ratio 4,12). Cependant, il est également retrouvé dans les cellules basales de la glande mammaire (Kendrick et al., 2008) et de la trachée (Hackett et al., 2011). De façon globale, les cellules basales des autres tissus semblent posséder des propriétés de suppression de tumeur (Sternlicht et al., 1997).

La suractivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est une caractéristique de plusieurs cancers (Goss and Kahn, 2011). Malgré les hauts taux de β -caténine relevés, l'incidence des cancers de l'épididyme est particulièrement faible. Plusieurs facteurs ont été suggérés comme interagissant avec la voie de signalisation Wnt pour permettre un haut niveau de régulation, notamment des inhibiteurs, des micro-ARNs, l'expression de la protéine de jonction adhérente E-cadhérine, qui se lie à la β -caténine et empêche donc sa translocation dans le noyau, des inhibiteurs de tumorigénèse (RNF43 et ZNRF3) et le facteur de transcription Klf4, qui limite l'activité transcriptionnelle de la β -caténine (Wang et al., 2013a).

Il serait donc possible que l'échappement de l'épididyme à la formation de tumeurs ne vienne pas des caractéristiques des cellules basales mais d'autres mécanismes. La faible taux de prolifération cellulaire dans l'épididyme a également été suggéré comme jouant un rôle dans le faible taux de cancer ; cependant, s'il est vrai que la dynamique de l'épithélium est différente au niveau de la glande mammaire (à cause de l'évolution cyclique) et de la trachée (à cause de l'exposition de l'épithélium), le taux de prolifération cellulaire au niveau de l'épididyme est similaire à celui de la prostate, soit inférieur à 2% (Berges et al., 1993; Clermont and Flannery, 1970; Sun and Flickinger, 1982), qui est pourtant le siège de nombreux cancers. Enfin, la présence de la barrière hémato-épididymaire et la protection immunitaire pourraient participer à la résistance de l'épididyme à la tumorigénèse. En effet, de nombreuses cellules immunitaires se situent au niveau de l'épididyme afin de garantir la protection des spermatozoïdes. Il est possible que les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques retrouvés dans l'épididyme participent à l'élimination précoce de cellules cancéreuses (Yeung et al., 2012).

Il faut noter que les méthodologies de microréseaux diffèrent selon les études, et que les espèces sont différentes. Il n'existe en effet à ce jour aucune étude sur les cellules basales des autres tissus chez le rat, les études étant dans la majorité des cas faites chez l'humain (Grigoriadis et al., 2006; Hackett et al., 2011; Jones et al., 2004; Oudes et al., 2006; Shipitsin et al., 2007), et parfois chez la souris (Kendrick et al., 2008; Rock et al., 2009). De plus, il existe des différences interespèces dans la composition des épithéliums. Par exemple, l'épithélium de la trachée est différent chez l'humain et la souris (Hackett et al., 2011). Une comparaison des transcriptomes de cellules basales de différents épithéliums pseudostratifiés selon la même méthodologie et au sein de la même espèce serait intéressante pour comprendre les réelles similarités et différences entre les cellules basales.

3.3. Existence de sous-populations de cellules basales

Dans différents épithéliums pseudostratifiés, il a plusieurs fois été mis en évidence l'existence de sous-populations de cellules basales. La capacité progénitrice ne serait pas une caractéristique de toutes les cellules basales mais seulement de certaines ; cette capacité serait en lien avec l'expression d'autres marqueurs retrouvés uniquement dans une petite proportion de cellules basales. Dans la glande mammaire, le marqueur EPCAM semble indispensable pour repérer les cellules progénitrices parmi les cellules positives pour l'ITGA6 (Sarrio et al., 2012). Dans la trachée, Schoch et al. (Schoch et al., 2004) distinguent au moins 2 populations distinctes de cellules basales. Dans la prostate, l'étude de Guo et al. (2012) utilise le marqueur CD44 en plus de l'ITGA6 pour repérer les cellules capables de former des sphères. Une autre étude utilise TACSTD2 (Goldstein et al., 2008), alors que Lee et al différencient 7 différentes sous-populations de cellules basales selon l'expression de KRT5, de KRT14 et de p63 (Lee et al., 2014).

Pris dans leur ensemble, les travaux présentés dans ce travail de thèse ont permis de faire évoluer les connaissances sur les cellules basales épididymaires en proposant un nouveau protocole reproductible et efficace d'isolement, et en apportant de nouvelles connaissances quant à leurs fonctions dans l'épididyme. En effet, nous avons montré que ces cellules ne participent pas à la jonction serrée tricellulaire malgré la présence de la claudine-1. En outre elles présentent des caractéristiques de cellules progénitrices en étant capables de se différencier in vitro. Un modèle plus général permet de présenter l'hypothèse que les cellules basales sont les garantes de l'homéostasie de l'épithélium épididymaire et que via les connexines, elles sont capables de sonder un stress qui va entraîner une activation des propriétés souches des cellules basales pour reconstruire un épithélium.

CONTRIBUTION A L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Les résultats obtenus au cours de ce travail de doctorat ont contribué à l'avancement des connaissances dans le domaine de plusieurs manières.

Tout d'abord, ils ont permis de montrer la présence de la tricelluline dans l'épididyme. Présente dans de nombreux tissus, cette protéine n'avait jamais été mise en évidence au sein de l'épididyme. Ils ont également permis de montrer une évolution dans l'expression et la localisation de la tricelluline au cours du développement, allant dans le sens d'une maturation de la barrière hémato-épididymaire pendant le développement postnatal. L'étude sur la tricelluline a également permis d'infirmer l'hypothèse de la participation des cellules basales à la barrière hémato-épididymaire par le biais de la jonction tricellulaire.

Une importante contribution a été faite avec l'isolement des cellules basales. En effet, si plusieurs études avaient auparavant proposé des méthodes de séparation pour obtenir une population pure de cellules basales, l'absence de marqueurs spécifiques à ces cellules pouvait poser des doutes quant à leur validation. Le développement d'une nouvelle méthode de séparation magnétique basée sur l'ITGA6 et reproductible a en effet permis l'étude beaucoup plus approfondie des cellules basales.

Etant donnée les difficultés à obtenir une population pure de cellules basales, le profil d'expression génique de ces cellules n'avait jamais été effectué. A partir de l'ARN des cellules purifiées, nous avons pu étudier les gènes fortement exprimés dans ces cellules par rapport aux autres cellules de l'épithélium épididymaire.

Ce travail a également permis une évolution dans la compréhension du rôle de la cellule basale dans l'épithélium épididymaire. Premièrement, la théorie de la projection apicale de la cellule basale permettant la régulation des autres types cellulaires via la jonction tricellulaire et AGTR2 a été infirmée par nos résultats. En effet, nous avons montré que la cellule basale ne participe pas à la jonction tricellulaire dans l'épididyme, mais également que certains gènes montrés comme spécifiques des cellules basales seraient en fait spécifiques d'un autre type cellulaire, probablement les cellules

dendritiques. Nos résultats de profil d'expression génique associés aux expériences de culture cellulaire nous ont permis de proposer un nouveau modèle, dans lequel la cellule basale agit comme senseur de l'épithélium et dans des conditions de rupture de l'homéostasie, est capable d'agir comme une cellule progénitrice multipotente et de se différencier en d'autres types cellulaires pour reformer un épithélium.

De façon générale, ce travail de thèse a permis de largement faire avancer les connaissances sur les cellules basales épididymaires de rat, et de mettre au point une méthode reproductible d'isolement de ces cellules.

BIBLIOGRAPHIE

Abd El-Rehim, D.M., Pinder, S.E., Paish, C.E., Bell, J., Blamey, R.W., Robertson, J.F., Nicholson, R.I., and Ellis, I.O. (2004). Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. The Journal of pathology *203*, 661-671.

Abou-Haila, A., and Fain-Maurel, M.A. (1984). Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. The Anatomical record *209*, 197-208.

Aceves, C., and Valverde, C. (1989). Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. Endocrinology *124*, 2818-2820.

Adachi, M., Inoko, A., Hata, M., Furuse, K., Umeda, K., Itoh, M., and Tsukita, S. (2006). Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. Molecular and cellular biology *26*, 9003-9015.

Adamali, H.I., and Hermo, L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. Journal of andrology *17*, 208-222.

Agarwal, A., and Hoffer, A.P. (1989). Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. Journal of andrology *10*, 425-431.

Agnes, V.F., and Akbarsha, M.A. (2001). Pale vacuolated epithelial cells in epididymis of aflatoxin-treated mice. Reproduction *122*, 629-641.

Andersson, A.M., Edvardsen, K., and Skakkebaek, N.E. (1994). Expression and localization of N- and E-cadherin in the human testis and epididymis. International journal of andrology *17*, 174-180.

Anguiano, B., Lopez, A., Delgado, G., Romero, C., and Aceves, C. (2006). Deiodinase type 1 activity is expressed in the prostate of pubescent rats and is modulated by thyroid hormones, prolactin and sex hormones. The Journal of endocrinology *190*, 363-371.

Arason, A.J., Jonsdottir, H.R., Halldorsson, S., Benediktsdottir, B.E., Bergthorsson, J.T., Ingthorsson, S., Baldursson, O., Sinha, S., Gudjonsson, T., and Magnusson, M.K. (2014). deltaNp63 has a role in maintaining epithelial integrity in airway epithelium. PloS one *9*, e88683.

Arrighi, S. (2014). Are the basal cells of the mammalian epididymis still an enigma? Reproduction, fertility, and development *26*, 1061-1071.

Arrighi, S., Romanello, M.G., and Domeneghini, C. (1993). Ultrastructure of epididymal epithelium in Equus caballus. Ann Anat *175*, 1-9.

Aruldhas, M.M., Subramanian, S., Sekhar, P., Vengatesh, G., Govindarajulu, P., and Akbarsha, M.A. (2006). In vivo spermatotoxic effect of chromium as reflected in the epididymal epithelial principal cells, basal cells, and intraepithelial macrophages of a nonhuman primate (Macaca radiata Geoffroy). Fertility and sterility *86*, 1097-1105.

Atanassova, N., McKinnell, C., Fisher, J., and Sharpe, R.M. (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*, 589-601.

Axner, E. (2006). Sperm maturation in the domestic cat. Theriogenology 66, 14-24.

Badran, H.H., and Hermo, L.S. (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*, 358-373.

Balda, M.S., and Matter, K. (2009). Tight junctions and the regulation of gene expression. Biochimica et biophysica acta *1788*, 761-767.

Balda, M.S., Whitney, J.A., Flores, C., Gonzalez, S., Cereijido, M., and Matter, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. The Journal of cell biology *134*, 1031-1049.

Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., *et al.* (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. Genomics *83*, 706-716.

Barbareschi, M., Pecciarini, L., Cangi, M.G., Macri, E., Rizzo, A., Viale, G., and Doglioni, C. (2001). p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. The American journal of surgical pathology *25*, 1054-1060.

Barclay, W.W., Axanova, L.S., Chen, W., Romero, L., Maund, S.L., Soker, S., Lees, C.J., and Cramer, S.D. (2008). Characterization of adult prostatic progenitor/stem cells exhibiting self-renewal and multilineage differentiation. Stem cells *26*, 600-610.

Bassett, J.H., Harvey, C.B., and Williams, G.R. (2003). Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. Molecular and cellular endocrinology *213*, 1-11.

Bates, J.M., St Germain, D.L., and Galton, V.A. (1999). Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. Endocrinology *140*, 844-851.

Baur, A., Bauer, K., Jarry, H., and Kohrle, J. (1997). 3,5-diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5'deiodinase activity in rat anterior pituitaries in vivo and in reaggregate cultures and GH3 cells in vitro. Endocrinology *138*, 3242-3248.

Berges, R.R., Furuya, Y., Remington, L., English, H.F., Jacks, T., and Isaacs, J.T. (1993). Cell proliferation, DNA repair, and p53 function are not required for programmed death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 8910-8914.

Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., and Larsen, P.R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. Endocrine reviews *23*, 38-89.

Blaschuk, O.W., Munro, S.B., and Farookhi, R. (1995). Cadherins, steroids and cancer. Endocrine *3*, 83-89.

Bonkhoff, H., Fixemer, T., and Remberger, K. (1998). Relation between Bcl-2, cell proliferation, and the androgen receptor status in prostate tissue and precursors of prostate cancer. The Prostate *34*, 251-258.

Borck, G., Ur Rehman, A., Lee, K., Pogoda, H.M., Kakar, N., von Ameln, S., Grillet, N., Hildebrand, M.S., Ahmed, Z.M., Nurnberg, G., *et al.* (2011). Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. American journal of human genetics *88*, 127-137.

Braga, V.M. (2002). Cell-cell adhesion and signalling. Current opinion in cell biology *14*, 546-556.

Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C.A., Causton, H.C., *et al.* (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. Nature genetics *29*, 365-371.

Breeze, R.G., and Wheeldon, E.B. (1977). The cells of the pulmonary airways. The American review of respiratory disease *116*, 705-777.

Brennan, K.R., and Brown, A.M. (2004). Wnt proteins in mammary development and cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia *9*, 119-131.

Brissette, J.L., Kumar, N.M., Gilula, N.B., Hall, J.E., and Dotto, G.P. (1994). Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 6453-6457.

Brown, D., Smith, P.J., and Breton, S. (1997). Role of V-ATPase-rich cells in acidification of the male reproductive tract. The Journal of experimental biology *200*, 257-262.

Brown, M.D., Gilmore, P.E., Hart, C.A., Samuel, J.D., Ramani, V.A., George, N.J., and Clarke, N.W. (2007). Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations. The Prostate *67*, 1384-1396.

Buhler, T.A., Dale, T.C., Kieback, C., Humphreys, R.C., and Rosen, J.M. (1993). Localization and quantification of Wnt-2 gene expression in mouse mammary development. Developmental biology *155*, 87-96.

Burger, P.E., Gupta, R., Xiong, X., Ontiveros, C.S., Salm, S.N., Moscatelli, D., and Wilson, E.L. (2009). High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells. Stem cells *27*, 2220-2228.

Burger, P.E., Xiong, X., Coetzee, S., Salm, S.N., Moscatelli, D., Goto, K., and Wilson, E.L. (2005). Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 7180-7185.

Buzzard, J.J., Morrison, J.R., O'Bryan, M.K., Song, Q., and Wreford, N.G. (2000). Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. Biology of reproduction *62*, 664-669.

Carreau, S. (2003). Estrogens--male hormones? Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society *41*, 107-111.

Carroll, T.J., Park, J.S., Hayashi, S., Majumdar, A., and McMahon, A.P. (2005). Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. Developmental cell *9*, 283-292.

Chakrabarti, R., Wei, Y., Hwang, J., Hang, X., Andres Blanco, M., Choudhury, A., Tiede, B., Romano, R.A., DeCoste, C., Mercatali, L., *et al.* (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*, 1004-1015, 1001-1013.

Chan, H.C., Lai, K.B., Fu, W.O., Chung, Y.W., Chan, P.S., and Wong, P.Y. (1995). Regional differences in bioelectrical properties and anion secretion in cultured epithelia from rat and human male excurrent ducts. Biology of reproduction *52*, 192-198.

Chen, Y., Merzdorf, C., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. (1997). COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early Xenopus embryos. The Journal of cell biology *138*, 891-899.

Cheung, K.H., Leung, G.P., Leung, M.C., Shum, W.W., Zhou, W.L., and Wong, P.Y. (2005). Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. The Journal of general physiology *125*, 443-454.

Chimento, A., Sirianni, R., Zolea, F., Bois, C., Delalande, C., Ando, S., Maggiolini, M., Aquila, S., Carreau, S., and Pezzi, V. (2011). Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. International journal of andrology *34*, 420-429.

Clarke, H., Marano, C.W., Peralta Soler, A., and Mullin, J.M. (2000). Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms. Advanced drug delivery reviews *41*, 283-301.

Clermont, Y., and 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., and Nusse, R. (2012). Wnt/beta-catenin signaling and disease. Cell *149*, 1192-1205.

Clulow, J., Jones, R.C., and Hansen, L.A. (1994). Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: comparisons with the homologous metanephric proximal tubule. Experimental physiology *79*, 915-928.

Cole, B.B., Smith, R.W., Jenkins, K.M., Graham, B.B., Reynolds, P.R., and Reynolds, S.D. (2010). Tracheal Basal cells: a facultative progenitor cell pool. The American journal of pathology *177*, 362-376.

Colegio, O.R., Van Itallie, C., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2003). Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. American journal of physiology Cell physiology *284*, C1346-1354.

Coleman, S., Silberstein, G.B., and Daniel, C.W. (1988). Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland: evidence supporting a role for epidermal growth factor. Developmental biology *127*, 304-315.

Cooke, P.S., Holsberger, D.R., Witorsch, R.J., Sylvester, P.W., Meredith, J.M., Treinen, K.A., and Chapin, R.E. (2004). Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. Toxicology and applied pharmacology *194*, 309-335.

Cooper, T.G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. Journal of reproduction and fertility Supplement *53*, 119-136.

Cooper, T.G. (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? Human reproduction *20*, 9-11.

Cooper, T.G., Barfield, J.P., and Yeung, C.H. (2008). The tonicity of murine epididymal spermatozoa and their permeability towards common cryoprotectants and epididymal osmolytes. Reproduction *135*, 625-633.

Corvol, P., Michaud, A., Soubrier, F., and Williams, T.A. (1995). Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension *13*, S3-10.

Crespin, S., Bacchetta, M., Bou Saab, J., Tantilipikorn, P., Bellec, J., Dudez, T., Nguyen, T.H., Kwak, B.R., Lacroix, J.S., Huang, S., *et al.* (2014). Cx26 regulates proliferation of repairing basal airway epithelial cells. The international journal of biochemistry & cell biology *52*, 152-160.

Cyr, D.G. (2011). Connexins and pannexins: Coordinating cellular communication in the testis and epididymis. Spermatogenesis *1*, 325-338.

Cyr, D.G., Blaschuk, O.W., and Robaire, B. (1992a). Identification and developmental regulation of cadherin messenger ribonucleic acids in the rat testis. Endocrinology *131*, 139-145.

Cyr, D.G., Dufresne, J., Pillet, S., Alfieri, T.J., and Hermo, L. (2001). Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. Journal of andrology *22*, 124-135.

Cyr, D.G., Finnson, K., Dufresne, J., and Gregory, M. (2002). Cellular Interactions and the Blood-Epididymal Barrier. In The epididymis : From molecules to clinical practice, B. Robaire, and B. Hinton, eds. (New York: Plenum Press), pp. 103-118.

Cyr, D.G., Gregory, M., Dube, E., Dufresne, J., Chan, P.T., and Hermo, L. (2007). Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. Asian journal of andrology *9*, 463-475.

Cyr, D.G., Hermo, L., Blaschuk, O.W., and Robaire, B. (1992b). Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. Endocrinology *130*, 353-363.

Cyr, D.G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J.M., and Laird, D.W. (1999). Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. Endocrinology *140*, 3815-3825.

Cyr, D.G., Hermo, L., and Laird, D.W. (1996). Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. Endocrinology *137*, 1474-1484.

Cyr, D.G., Robaire, B., and Hermo, L. (1995). Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. Microscopy research and technique *30*, 54-66.

Da Silva, N., Cortez-Retamozo, V., Reinecker, H.C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., Swirski, F.K., Pittet, M.J., and Breton, S. (2011). A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. Reproduction *141*, 653-663.

Da Silva, N., Shum, W.W., and Breton, S. (2007). Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. Asian journal of andrology *9*, 476-482.

Da Silva, N., Silberstein, C., Beaulieu, V., Pietrement, C., Van Hoek, A.N., Brown, D., and Breton, S. (2006). Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis. Biology of reproduction *74*, 427-438.

Dacheux, J.L., and Dacheux, F. (2002). Protein secretion in the epididymis (New York: Plenum Press).

Dacheux, J.L., Gatti, J.L., and Dacheux, F. (2003). Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. Microscopy research and technique *61*, 7-17.

Dean, M.D., Good, J.M., and Nachman, M.W. (2008). Adaptive evolution of proteins secreted during sperm maturation: an analysis of the mouse epididymal transcriptome. Molecular biology and evolution *25*, 383-392.

DeBellefeuille, S., Hermo, L., Gregory, M., Dufresne, J., and Cyr, D.G. (2003). Catenins in the rat epididymis: their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. Endocrinology *144*, 5040-5049.

Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome biology *4*, P3.

Deshpande, S.N., Vijayakumar, G., and Rao, A.J. (2009). Oestrogenic regulation and differential expression of WNT4 in the bonnet monkey and rodent epididymis. Reproductive biomedicine online *18*, 555-561.

Deugnier, M.A., Faraldo, M.M., Janji, B., Rousselle, P., Thiery, J.P., and Glukhova, M.A. (2002). EGF controls the in vivo developmental potential of a mammary epithelial cell line possessing progenitor properties. The Journal of cell biology *159*, 453-463.

Deugnier, M.A., Moiseyeva, E.P., Thiery, J.P., and Glukhova, M. (1995). Myoepithelial cell differentiation in the developing mammary gland: progressive acquisition of smooth

muscle phenotype. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists *204*, 107-117.

Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., and Wicha, M.S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes & development *17*, 1253-1270.

Dontu, G., Jackson, K.W., McNicholas, E., Kawamura, M.J., Abdallah, W.M., and Wicha, M.S. (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. Breast cancer research : BCR *6*, R605-615.

Dorfel, M.J., and Huber, O. (2012). Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. Journal of biomedicine & biotechnology *2012*, 807356.

Dorfel, M.J., Westphal, J.K., Bellmann, C., Krug, S.M., Cording, J., Mittag, S., Tauber, R., Fromm, M., Blasig, I.E., and Huber, O. (2013). CK2-dependent phosphorylation of occludin regulates the interaction with ZO-proteins and tight junction integrity. Cell Commun Signal *11*, 40.

Dube, E., and Cyr, D.G. (2012). The blood-epididymis barrier and human male fertility. Advances in experimental medicine and biology *763*, 218-236.

Dube, E., Dufresne, J., Chan, P.T., and Cyr, D.G. (2012). Epidermal growth factor regulates connexin 43 in the human epididymis: role of gap junctions in azoospermia. Human reproduction *27*, 2285-2296.

Dube, E., Dufresne, J., Chan, P.T., Hermo, L., and Cyr, D.G. (2010). Assessing the role of claudins in maintaining the integrity of epididymal tight junctions using novel human epididymal cell lines. Biology of reproduction *82*, 1119-1128.

Dube, E., Hermo, L., Chan, P.T., and Cyr, D.G. (2008). Alterations in gene expression in the caput epididymides of nonobstructive azoospermic men. Biology of reproduction *78*, 342-351.

Dufresne, J., and Cyr, D.G. (2007). Activation of an SP binding site is crucial for the expression of claudin 1 in rat epididymal principal cells. Biology of reproduction *76*, 825-832.

Dufresne, J., Finnson, K.W., Gregory, M., and Cyr, D.G. (2003). Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. American journal of physiology Cell physiology *284*, C33-43.

Dufresne, J., St-Pierre, N., Viger, R.S., Hermo, L., and Cyr, D.G. (2005). Characterization of a novel rat epididymal cell line to study epididymal function. Endocrinology *146*, 4710-4720.

Ebnet, K., Schulz, C.U., Meyer Zu Brickwedde, M.K., Pendl, G.G., and Vestweber, D. (2000). Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. The Journal of biological chemistry *275*, 27979-27988.

Erjefalt, J.S., Sundler, F., and Persson, C.G. (1997). Epithelial barrier formation by airway basal cells. Thorax *52*, 213-217.

Fan, X., and Robaire, B. (1998). Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. Endocrinology *139*, 2128-2136.

Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., and Anderson, J.M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. The Journal of biological chemistry *273*, 29745-29753.

Finaz, C., Boue, F., Meduri, G., and Lefevre, A. (1991). Characterization of rat epithelial epididymal cells purified on a discontinuous Percoll gradient. Journal of reproduction and fertility *91*, 617-625.

Ford, J.R., and Terzaghi-Howe, M. (1992). Basal cells are the progenitors of primary tracheal epithelial cell cultures. Experimental cell research *198*, 69-77.

Fraser, L.R., Umar, G., and Sayed, S. (1993). Na(+)-requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. Journal of reproduction and fertility *97*, 539-549.

Freestone, S.H., Marker, P., Grace, O.C., Tomlinson, D.C., Cunha, G.R., Harnden, P., and Thomson, A.A. (2003). Sonic hedgehog regulates prostatic growth and epithelial differentiation. Developmental biology *264*, 352-362.

Frenette, G., Leclerc, P., D'Amours, O., and Sullivan, R. (2009). Estrogen sulfotransferase is highly expressed along the bovine epididymis and is secreted into the intraluminal environment. Journal of andrology *30*, 580-589.

Friend, D.S., and Gilula, N.B. (1972). Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. The Journal of cell biology *53*, 758-776.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. The Journal of cell biology *141*, 1539-1550.

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. The Journal of cell biology *156*, 1099-1111.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. The Journal of cell biology *123*, 1777-1788.

Galton, V.A., Martinez, E., Hernandez, A., St Germain, E.A., Bates, J.M., and St Germain, D.L. (1999). Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. The Journal of clinical investigation *103*, 979-987.

Ganem, J.P., Jhaveri, F.M., and Marroum, M.C. (1998). Primary adenocarcinoma of the epididymis: case report and review of the literature. Urology *52*, 904-908.

Garcia-Rodriguez, L., Perez-Torras, S., Carrio, M., Cascante, A., Garcia-Ribas, I., Mazo, A., and Fillat, C. (2011). Connexin-26 is a key factor mediating gemcitabine bystander effect. Molecular cancer therapeutics *10*, 505-517.

Garcia-Zaragoza, E., Perez-Tavarez, R., Ballester, A., Lafarga, V., Jimenez-Reinoso, A., Ramirez, A., Murillas, R., and Gallego, M.I. (2012). Intraepithelial paracrine Hedgehog signaling induces the expansion of ciliated cells that express diverse progenitor cell markers in the basal epithelium of the mouse mammary gland. Developmental biology *372*, 28-44.

Garraway, I.P., Sun, W., Tran, C.P., Perner, S., Zhang, B., Goldstein, A.S., Hahm, S.A., Haider, M., Head, C.S., Reiter, R.E., *et al.* (2010). Human prostate sphere-forming cells represent a subset of basal epithelial cells capable of glandular regeneration in vivo. The Prostate *70*, 491-501.

Gatti, J.L., Druart, X., Guerin, Y., Dacheux, F., and Dacheux, J.L. (1999). A 105- to 94kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. Biology of reproduction *60*, 937-945.

Ghebeh, H., Sleiman, G.M., Manogaran, P.S., Al-Mazrou, A., Barhoush, E., Al-Mohanna, F.H., Tulbah, A., Al-Faqeeh, K., and Adra, C.N. (2013). Profiling of normal and malignant breast tissue show CD44high/CD24low phenotype as a predominant stem/progenitor marker when used in combination with Ep-CAM/CD49f markers. BMC cancer *13*, 289.

Ghosh, M., Brechbuhl, H.M., Smith, R.W., Li, B., Hicks, D.A., Titchner, T., Runkle, C.M., and Reynolds, S.D. (2011a). Context-dependent differentiation of multipotential keratin 14-expressing tracheal basal cells. American journal of respiratory cell and molecular biology *45*, 403-410.

Ghosh, M., Helm, K.M., Smith, R.W., Giordanengo, M.S., Li, B., Shen, H., and Reynolds, S.D. (2011b). A single cell functions as a tissue-specific stem cell and the in vitro nicheforming cell. American journal of respiratory cell and molecular biology *45*, 459-469.

Giepmans, B.N. (2004). Gap junctions and connexin-interacting proteins. Cardiovascular research *62*, 233-245.

Goldstein, A.S., Lawson, D.A., Cheng, D., Sun, W., Garraway, I.P., and Witte, O.N. (2008). Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 20882-20887.

Gomm, J.J., Browne, P.J., Coope, R.C., Bansal, G.S., Yiangou, C., Johnston, C.L., Mason, R., and Coombes, R.C. (1997). A paracrine role for myoepithelial cell-derived FGF2 in the normal human breast. Experimental cell research *234*, 165-173.

Gomperts, B.N., Belperio, J.A., Fishbein, M.C., Keane, M.P., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (2007). Keratinocyte growth factor improves repair in the injured tracheal epithelium. American journal of respiratory cell and molecular biology *37*, 48-56.

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction proteins. Progress in biophysics and molecular biology *81*, 1-44.

Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R., and Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. Biochimica et biophysica acta *1778*, 729-756.

Goss, K.H., and Kahn, M. (2011). Targeting the Wnt pathway in Cancer (New York: Springer).

Gregory, M., and Cyr, D.G. (2006). Identification of multiple claudins in the rat epididymis. Molecular reproduction and development *73*, 580-588.

Gregory, M., and Cyr, D.G. (2014). Blood-epididymis barrier and inflammation. Spermatogenesis *4*.

Gregory, M., Dufresne, J., Hermo, L., and Cyr, D. (2001). Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. Endocrinology *142*, 854-863.

Grigoriadis, A., Mackay, A., Reis-Filho, J.S., Steele, D., Iseli, C., Stevenson, B.J., Jongeneel, C.V., Valgeirsson, H., Fenwick, K., Iravani, M., *et al.* (2006). Establishment of the epithelial-specific transcriptome of normal and malignant human breast cells based on MPSS and array expression data. Breast cancer research : BCR *8*, R56.

Guan, X., Inai, T., and 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*, 213-225.

Guazzone, V.A., Hollwegs, S., Mardirosian, M., Jacobo, P., Hackstein, H., Wygrecka, M., Schneider, E., Meinhardt, A., Lustig, L., and Fijak, M. (2011). Characterization of dendritic cells in testicular draining lymph nodes in a rat model of experimental autoimmune orchitis. International journal of andrology *34*, 276-289.

Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell *84*, 345-357.

Guo, C., Liu, H., Zhang, B.H., Cadaneanu, R.M., Mayle, A.M., and Garraway, I.P. (2012). Epcam, CD44, and CD49f distinguish sphere-forming human prostate basal cells from a subpopulation with predominant tubule initiation capability. PloS one *7*, e34219.

Guyonnet, B., Dacheux, F., Dacheux, J.L., and Gatti, J.L. (2011). The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. Journal of andrology *32*, 651-664.

Hackett, N.R., Shaykhiev, R., Walters, M.S., Wang, R., Zwick, R.K., Ferris, B., Witover, B., Salit, J., and Crystal, R.G. (2011). The human airway epithelial basal cell transcriptome. PloS one *6*, e18378.

Hamzeh, M., and Robaire, B. (2009). Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. Journal of andrology *30*, 200-212.

Hamzeh, M., and Robaire, B. (2011). Androgens activate mitogen-activated protein kinase via epidermal growth factor receptor/insulin-like growth factor 1 receptor in the mouse PC-1 cell line. The Journal of endocrinology *209*, 55-64.

Hannema, S.E., and Hughes, I.A. (2007). Regulation of Wolffian duct development. Horm Res 67, 142-151.

Hayashi, T., Yoshinaga, A., Ohno, R., Ishii, N., Kamata, S., and 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*, 692-698.

Hein, S.M., Haricharan, S., Johnston, A.N., Toneff, M.J., Reddy, J.P., Dong, J., Bu, W., and Li, Y. (2015). Luminal epithelial cells within the mammary gland can produce basal cells upon oncogenic stress. Oncogene.

Hejmej, A., Kotula-Balak, M., Sadowska, J., and Bilinska, B. (2007). Expression of connexin 43 protein in testes, epididymides and prostates of stallions. Equine veterinary journal *39*, 122-127.

Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M., and Merad, M. (2010). Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. Immunological reviews *234*, 55-75.

Henderson, N.A., Cooke, G.M., and 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*, 779-791.

Hermo, L., Barin, K., and Robaire, B. (1992). 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., and 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*, 494-505.

Hermo, L., Oko, R., and Morales, C.R. (1994a). Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. International review of cytology *154*, 106-189.

Hermo, L., and 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*, 59-69.

Hermo, L., Papp, S., and 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. The Anatomical record 239, 421-440.

Hermo, L., and Robaire, B. (2002). Epididymal cell types and their functions. In The epididymis : from molecular to clinical practice B. Robaire, and B. Hinton, eds. (New York: Plenum Press), pp. 81-102.

Hermo, L., Schellenberg, M., Liu, L.Y., Dayanandan, B., Zhang, T., Mandato, C.A., and Smith, C.E. (2008). Membrane domain specificity in the spatial distribution of aquaporins 5, 7, 9, and 11 in efferent ducts and epididymis of rats. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society *56*, 1121-1135.

Hernandez, S., Chavez Munguia, B., and Gonzalez-Mariscal, L. (2007). ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. Experimental cell research *313*, 1533-1547.

Hess, R.A. (2003). Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. Reproductive biology and endocrinology : RB&E *1*, 52.

Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.H., Bahr, J., Taylor, J.A., Korach, K.S., and Lubahn, D.B. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature *390*, 509-512.

Hess, R.A., Bunick, D., Lubahn, D.B., Zhou, Q., and Bouma, J. (2000). Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. Journal of andrology *21*, 107-121.

Hess, R.A., Fernandes, S.A., Gomes, G.R., Oliveira, C.A., Lazari, M.F., and Porto, C.S. (2011). Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. Journal of andrology *32*, 600-613.

Higashi, T., Katsuno, T., Kitajiri, S., and Furuse, M. (2015). Deficiency of angulin-2/ILDR1, a tricellular tight junction-associated membrane protein, causes deafness with cochlear hair cell degeneration in mice. PloS one *10*, e0120674.

Higashi, T., Lenz, D.R., Furuse, M., and Avraham, K.B. (2013a). A "Tric" to tighten cellcell junctions in the cochlea for hearing. The Journal of clinical investigation *123*, 3712-3715.

Higashi, T., Tokuda, S., Kitajiri, S., Masuda, S., Nakamura, H., Oda, Y., and Furuse, M. (2013b). Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. Journal of cell science *126*, 966-977.

Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., and Rubin, L.L. (1997). Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. Journal of cell science *110 (Pt 14)*, 1603-1613.

Holsberger, D.R., and Cooke, P.S. (2005). Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. Cell and tissue research *322*, 133-140.

Holschbach, C., and Cooper, T.G. (2002). A possible extratubular origin of epididymal basal cells in mice. Reproduction *123*, 517-525.

Honecker, F., Kersemaekers, A.M., Molier, M., Van Weeren, P.C., Stoop, H., De Krijger, R.R., Wolffenbuttel, K.P., Oosterhuis, W., Bokemeyer, C., and Looijenga, L.H. (2004). Involvement of E-cadherin and beta-catenin in germ cell tumours and in normal male fetal germ cell development. The Journal of pathology *204*, 167-174.

Hong, K.U., Reynolds, S.D., Watkins, S., Fuchs, E., and Stripp, B.R. (2004). Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. The American journal of pathology *164*, 577-588.

Hosack, D.A., Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2003). Identifying biological themes within lists of genes with EASE. Genome biology *4*, R70.

Howe, L.R., and Brown, A.M. (2004). Wnt signaling and breast cancer. Cancer biology & therapy *3*, 36-41.

Hudson, D.L., Guy, A.T., Fry, P., O'Hare, M.J., Watt, F.M., and Masters, J.R. (2001). Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: identification of intermediate phenotypes by keratin expression. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society *49*, 271-278.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. The Journal of cell biology *171*, 939-945.

Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2008). Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. Molecular biology of the cell *19*, 4687-4693.

Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S., and Nagafuchi, A. (1999). Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. The Journal of cell biology *144*, 1311-1322.

Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics *4*, 249-264.

Isaacs, J.T., and Kyprianou, N. (1987). Development of androgen-independent tumor cells and their implication for the treatment of prostatic cancer. Urological research *15*, 133-138.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999a). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. The Journal of cell biology *147*, 1351-1363.

Itoh, M., Morita, K., and Tsukita, S. (1999b). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. The Journal of biological chemistry *274*, 5981-5986.

Iwamoto, N., Higashi, T., and Furuse, M. (2014). Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. Cell structure and function *39*, 1-8.

Iwata, T., Schultz, D., Hicks, J., Hubbard, G.K., Mutton, L.N., Lotan, T.L., Bethel, C., Lotz, M.T., Yegnasubramanian, S., Nelson, W.G., *et al.* (2010). MYC overexpression induces prostatic intraepithelial neoplasia and loss of Nkx3.1 in mouse luminal epithelial cells. PloS one *5*, e9427.

Jelinsky, S.A., Turner, T.T., Bang, H.J., Finger, J.N., Solarz, M.K., Wilson, E., Brown, E.L., Kopf, G.S., and Johnston, D.S. (2007). The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. Biology of reproduction *76*, 561-570.

Jiang, F.X., Temple-Smith, P., and Wreford, N.G. (1994). Postnatal differentiation and development of the rat epididymis: a stereological study. The Anatomical record *238*, 191-198.

Johnston, D.S., Jelinsky, S.A., Bang, H.J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G.S., and Turner, T.T. (2005). The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. Biology of reproduction *73*, 404-413.

Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Cossu, A., Reis-Filho, J.S., Fulford, L., Dexter, T., Davies, S., Bulmer, K., Ford, E., *et al.* (2004). Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. Cancer research *64*, 3037-3045.

Jones, C., Nonni, A.V., Fulford, L., Merrett, S., Chaggar, R., Eusebi, V., and Lakhani, S.R. (2001). CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation. British journal of cancer *85*, 422-427.

Jones, M.A., Young, R.H., and Scully, R.E. (1997). Adenocarcinoma of the epididymis: a report of four cases and review of the literature. The American journal of surgical pathology *21*, 1474-1480.

Jongen, W.M., Fitzgerald, D.J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T.J., Gros, D., Takeichi, M., and Yamasaki, H. (1991). Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca2+ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. The Journal of cell biology *114*, 545-555.

Junghans, D., Haas, I.G., and Kemler, R. (2005). Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. Current opinion in cell biology *17*, 446-452.

Kaplan, M.M., McCann, U.D., Yaskoski, K.A., Larsen, P.R., and Leonard, J.L. (1981). Anatomical distribution of phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodinases in the nervous system of normal and hypothyroid rats. Endocrinology *109*, 397-402.

Kaplan, M.M., and Utiger, R.D. (1978). lodothyronine metabolism in rat liver homogenates. The Journal of clinical investigation *61*, 459-471.

Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., *et al.* (2008). Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. Molecular biology of the cell *19*, 2465-2475.

Kendrick, H., Regan, J.L., Magnay, F.A., Grigoriadis, A., Mitsopoulos, C., Zvelebil, M., and Smalley, M.J. (2008). Transcriptome analysis of mammary epithelial subpopulations identifies novel determinants of lineage commitment and cell fate. BMC genomics *9*, 591.

Kikuchi, S., Ninomiya, T., Tatsumi, H., Sawada, N., and Kojima, T. (2010). Tricellulin is expressed in autotypic tight junctions of peripheral myelinating Schwann cells. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society *58*, 1067-1073.

Killian, G.J., Amann, R.P., and Snyder, J. (1976). Isolation of principal and basal cells from the epithelium of the hamster caput epididymidis by unit gravity sedimentation. Biology of reproduction *15*, 266-279.

Kim, B., Roy, J., Shum, W.W., Da Silva, N., and Breton, S. (2015). Role of testicular luminal factors on Basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis. Biology of reproduction *92*, 9.

Kirichok, Y., Navarro, B., and Clapham, D.E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca2+ channel. Nature *439*, 737-740.

Klinefelter, G.R., and Amann, R.P. (1980). Metabolism of testosterone by principal cells and basal cells isolated from the rat epididymal epithelium. Biology of reproduction *22*, 1149-1154.

Koster, M.I., Kim, S., Mills, A.A., DeMayo, F.J., and Roop, D.R. (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. Genes & development *18*, 126-131.

Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., and Blasig, I.E. (2008). Structure and function of claudins. Biochimica et biophysica acta *1778*, 631-645.

Kristensen, D.M., Nielsen, J.E., Kalisz, M., Dalgaard, M.D., Audouze, K., Larsen, M.E., Jacobsen, G.K., Horn, T., Brunak, S., Skakkebaek, N.E., *et al.* (2010). OCT4 and

downstream factors are expressed in human somatic urogenital epithelia and in culture of epididymal spheres. Molecular human reproduction *16*, 835-845.

Krug, S.M., Amasheh, S., Richter, J.F., Milatz, S., Gunzel, D., Westphal, J.K., Huber, O., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2009). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. Molecular biology of the cell *20*, 3713-3724.

Kuefer, R., Hofer, M.D., Zorn, C.S., Engel, O., Volkmer, B.G., Juarez-Brito, M.A., Eggel, M., Gschwend, J.E., Rubin, M.A., and Day, M.L. (2005). Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value for prostate cancer. British journal of cancer *92*, 2018-2023.

Kuiper, G.G., Kester, M.H., Peeters, R.P., and Visser, T.J. (2005). Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association *15*, 787-798.

Kurita, T., Medina, R.T., Mills, A.A., and Cunha, G.R. (2004). Role of p63 and basal cells in the prostate. Development *131*, 4955-4964.

Kwak, B.R., Pepper, M.S., Gros, D.B., and Meda, P. (2001). Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. Molecular biology of the cell *12*, 831-845.

Kwon, O.J., Zhang, L., Ittmann, M.M., and Xin, L. (2014). Prostatic inflammation enhances basal-to-luminal differentiation and accelerates initiation of prostate cancer with a basal cell origin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, E592-600.

Lawson, D.A., and Witte, O.N. (2007). Stem cells in prostate cancer initiation and progression. The Journal of clinical investigation *117*, 2044-2050.

Lawson, D.A., Xin, L., Lukacs, R.U., Cheng, D., and Witte, O.N. (2007). Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 181-186.

Lawson, D.A., Zong, Y., Memarzadeh, S., Xin, L., Huang, J., and Witte, O.N. (2010). Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 2610-2615.

Lechner, J.F., Haugen, A., Autrup, H., McClendon, I.A., Trump, B.F., and Harris, C.C. (1981). Clonal growth of epithelial cells from normal adult human bronchus. Cancer research *41*, 2294-2304.

Lee, D.K., Liu, Y., Liao, L., Wang, F., and Xu, J. (2014). The prostate basal cell (BC) heterogeneity and the p63-positive BC differentiation spectrum in mice. International journal of biological sciences *10*, 1007-1017.

Leung, G.P., Cheung, K.H., Leung, C.T., Tsang, M.W., and Wong, P.Y. (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*, 5-13.

Levy, S., and Robaire, B. (1999). Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. Biology of reproduction *60*, 1392-1401.

Li, J.Y., Wang, H.Y., Liu, J., Liu, Q., Zhang, J.S., Wan, F.C., Liu, F.J., Jin, S.H., and Zhang, Y.L. (2008). Transcriptome analysis of a cDNA library from adult human epididymis. DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes *15*, 115-122.

Li, Z., Sun, Z.J., Liao, C.G., Ma, L., Ma, B.F., and Zhang, Y.Q. (2010). Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted originating from the epididymis differentially associates with viable and defective spermatozoa. Fertility and sterility *93*, 2661-2667.

Liefer, K.M., Koster, M.I., Wang, X.J., Yang, A., McKeon, F., and Roop, D.R. (2000). Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. Cancer research *60*, 4016-4020.

Litvinov, I.V., Vander Griend, D.J., Xu, Y., Antony, L., Dalrymple, S.L., and Isaacs, J.T. (2006). Low-calcium serum-free defined medium selects for growth of normal prostatic epithelial stem cells. Cancer research *66*, 8598-8607.

Liu, B.Y., McDermott, S.P., Khwaja, S.S., and Alexander, C.M. (2004). The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 4158-4163.

Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F.J., Reaves, T.A., Walsh, S., Pochet, M., and Parkos, C.A. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. Journal of cell science *113* (*Pt 13*), 2363-2374.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. Annual review of cell and developmental biology *20*, 781-810.

Lombardi, A.P., Royer, C., Pisolato, R., Cavalcanti, F.N., Lucas, T.F., Lazari, M.F., and Porto, C.S. (2013). Physiopathological aspects of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the male reproductive system. Spermatogenesis *3*, e23181.

Lopardo, T., Lo Iacono, N., Marinari, B., Giustizieri, M.L., Cyr, D.G., Merlo, G., Crosti, F., Costanzo, A., and Guerrini, L. (2008). Claudin-1 is a p63 target gene with a crucial role in epithelial development. PloS one *3*, e2715.

Lucas, T.F., Royer, C., Siu, E.R., Lazari, M.F., and Porto, C.S. (2010). Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells. Biology of reproduction *83*, 307-317.

Lydka, M., Kopera-Sobota, I., Kotula-Balak, M., Chojnacka, K., Zak, D., and Bilinska, B. (2011). Morphological and functional alterations in adult boar epididymis: Effects of prenatal and postnatal administration of flutamide. Acta Vet Scand *53*, 12.

Lynch, T.J., and Engelhardt, J.F. (2014). Progenitor cells in proximal airway epithelial development and regeneration. Journal of cellular biochemistry *115*, 1637-1645.

Ma, X., Ziel-van der Made, A.C., Autar, B., van der Korput, H.A., Vermeij, M., van Duijn, P., Cleutjens, K.B., de Krijger, R., Krimpenfort, P., Berns, A., *et al.* (2005). Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. Cancer research *65*, 5730-5739.

Mandell, K.J., and Parkos, C.A. (2005). The JAM family of proteins. Advanced drug delivery reviews *57*, 857-867.

Mandon, M., and Cyr, D.G. (2015). Tricellulin and its role in the epididymal epithelium of the rat. Biology of reproduction *92*, 66.

Many, A.M., and Brown, A.M. (2010). Mammary stem cells and cancer: roles of Wnt signaling in plain view. Breast cancer research : BCR *12*, 313.

Many, A.M., and Brown, A.M. (2014). Both canonical and non-canonical Wnt signaling independently promote stem cell growth in mammospheres. PloS one *9*, e101800.

Mariano, C., Silva, S.L., Pereira, P., Fernandes, A., Brites, D., and Brito, M.A. (2011). Evidence of tricellulin expression by immune cells, particularly microglia. Biochemical and biophysical research communications *409*, 799-802.

Martinez-Garcia, F., Regadera, J., Cobo, P., Palacios, J., Paniagua, R., and Nistal, M. (1995). The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. Andrologia *27*, 195-206.

Marty, M.S., Chapin, R.E., Parks, L.G., and Thorsrud, B.A. (2003). Development and maturation of the male reproductive system. Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology *68*, 125-136.

McCarthy, K.M., Skare, I.B., Stankewich, M.C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R.A., Lynch, R.D., and Schneeberger, E.E. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. Journal of cell science *109 (Pt 9)*, 2287-2298.

Medina, M.C., Molina, J., Gadea, Y., Fachado, A., Murillo, M., Simovic, G., Pileggi, A., Hernandez, A., Edlund, H., and Bianco, A.C. (2011). The thyroid hormone-inactivating type III deiodinase is expressed in mouse and human beta-cells and its targeted inactivation impairs insulin secretion. Endocrinology *152*, 3717-3727.

Mege, R.M., Gavard, J., and Lambert, M. (2006). Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. Current opinion in cell biology *18*, 541-548.

Memmi, E.M., Sanarico, A.G., Giacobbe, A., Peschiaroli, A., Frezza, V., Cicalese, A., Pisati, F., Tosoni, D., Zhou, H., Tonon, G., *et al.* (2015). p63 Sustains self-renewal of mammary cancer stem cells through regulation of Sonic Hedgehog signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *112*, 3499-3504.

Mese, G., Richard, G., and White, T.W. (2007). Gap junctions: basic structure and function. The Journal of investigative dermatology *127*, 2516-2524.

Meyer, R.A., Laird, D.W., Revel, J.P., and Johnson, R.G. (1992). Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. The Journal of cell biology *119*, 179-189.

Michelson, P.H., Tigue, M., Panos, R.J., and Sporn, P.H. (1999). Keratinocyte growth factor stimulates bronchial epithelial cell proliferation in vitro and in vivo. The American journal of physiology *277*, L737-742.

Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R., and Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature *398*, 708-713.

Mizuma, H., Murakami, M., and Mori, M. (2001). Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: expression of type II iodothyronine deiodinase. Circulation research *88*, 313-318.

Moller, P., Mechtersheimer, G., Kaufmann, M., Moldenhauer, G., Momburg, F., Mattfeldt, T., and Otto, H.F. (1989). Expression of epidermal growth factor receptor in benign and malignant primary tumours of the breast. Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology *414*, 157-164.

Moore, H.D., and Bedford, J.M. (1979). Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. The Anatomical record *193*, 293-311.

Mori, M., Mahoney, J.E., Stupnikov, M.R., Paez-Cortez, J.R., Szymaniak, A.D., Varelas, X., Herrick, D.B., Schwob, J., Zhang, H., and Cardoso, W.V. (2015). Notch3-Jagged signaling controls the pool of undifferentiated airway progenitors. Development *142*, 258-267.

Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 511-516.

Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell *132*, 598-611.

Murashima, A., Miyagawa, S., Ogino, Y., Nishida-Fukuda, H., Araki, K., Matsumoto, T., Kaneko, T., Yoshinaga, K., Yamamura, K., Kurita, T., *et al.* (2011). Essential roles of androgen signaling in Wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. Endocrinology *152*, 1640-1651.

Musah, S., Chen, J., and Hoyle, G.W. (2012). Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury. Respiratory research *13*, 107.

Nahmod, K.A., Vermeulen, M.E., Raiden, S., Salamone, G., Gamberale, R., Fernandez-Calotti, P., Alvarez, A., Nahmod, V., Giordano, M., and Geffner, J.R. (2003). Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *17*, 491-493.

Navarro, B., Kirichok, Y., and Clapham, D.E. (2007). KSper, a pH-sensitive K+ current that controls sperm membrane potential. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 7688-7692.

Nayak, G., Lee, S.I., Yousaf, R., Edelmann, S.E., Trincot, C., Van Itallie, C.M., Sinha, G.P., Rafeeq, M., Jones, S.M., Belyantseva, I.A., *et al.* (2013). Tricellulin deficiency affects tight junction architecture and cochlear hair cells. The Journal of clinical investigation *123*, 4036-4049.

Nguyen, B.C., Lefort, K., Mandinova, A., Antonini, D., Devgan, V., Della Gatta, G., Koster, M.I., Zhang, Z., Wang, J., Tommasi di Vignano, A., *et al.* (2006). Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. Genes & development *20*, 1028-1042.

Nie, W., Yan, H., Li, S., Zhang, Y., Yu, F., Zhu, W., Fan, F., and Zhu, J. (2009). Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells. Molecular immunology *46*, 355-361.

Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. Journal of molecular biology *299*, 551-572.

Nonogaki, T., Noda, Y., Narimoto, K., Shiotani, M., Mori, T., Matsuda, T., and Yoshida, O. (1992). Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. Human reproduction *7*, 81-85.

Nusse, R. (2005). Wnt signaling in disease and in development. Cell research 15, 28-32.

Nusse, R., Fuerer, C., Ching, W., Harnish, K., Logan, C., Zeng, A., ten Berge, D., and Kalani, Y. (2008). Wnt signaling and stem cell control. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology *73*, 59-66.

O'Driscoll, M.C., Daly, S.B., Urquhart, J.E., Black, G.C., Pilz, D.T., Brockmann, K., McEntagart, M., Abdel-Salam, G., Zaki, M., Wolf, N.I., *et al.* (2010). Recessive mutations in the gene encoding the tight junction protein occludin cause band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria. American journal of human genetics *87*, 354-364.

Okada, H., Tsubura, A., Okamura, A., Senzaki, H., Naka, Y., Komatz, Y., and Morii, S. (1992). Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma. Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology *421*, 157-161.

Oudes, A.J., Campbell, D.S., Sorensen, C.M., Walashek, L.S., True, L.D., and Liu, A.Y. (2006). Transcriptomes of human prostate cells. BMC genomics *7*, 92.

Packard, A., Schnittke, N., Romano, R.A., Sinha, S., and Schwob, J.E. (2011). DeltaNp63 regulates stem cell dynamics in the mammalian olfactory epithelium. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *31*, 8748-8759.

Papp, S., Robaire, B., and Hermo, L. (1995). Immunocytochemical localization of the Ya, Yc, Yb1, and Yb2 subunits of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of adult rats. Microscopy research and technique *30*, 1-23.

Pardo-Saganta, A., Law, B.M., Tata, P.R., Villoria, J., Saez, B., Mou, H., Zhao, R., and Rajagopal, J. (2015). Injury induces direct lineage segregation of functionally distinct airway basal stem/progenitor cell subpopulations. Cell stem cell *16*, 184-197.

Parsons, J.K., Gage, W.R., Nelson, W.G., and De Marzo, A.M. (2001). p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. Urology *58*, 619-624.

Pastor-Soler, N., Bagnis, C., Sabolic, I., Tyszkowski, R., McKee, M., Van Hoek, A., Breton, S., and Brown, D. (2001). Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. Biology of reproduction *65*, 384-393.

Pastor-Soler, N., Beaulieu, V., Litvin, T.N., Da Silva, N., Chen, Y., Brown, D., Buck, J., Levin, L.R., and Breton, S. (2003). Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. The Journal of biological chemistry *278*, 49523-49529.

Pastor-Soler, N., Isnard-Bagnis, C., Herak-Kramberger, C., Sabolic, I., Van Hoek, A., Brown, D., and Breton, S. (2002). Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. Biology of reproduction *66*, 1716-1722.

Pastor-Soler, N., Pietrement, C., and Breton, S. (2005). Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction. Physiology *20*, 417-428.

Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. Cell stem cell *8*, 486-498.

Paul, M.K., Bisht, B., Darmawan, D.O., Chiou, R., Ha, V.L., Wallace, W.D., Chon, A.T., Hegab, A.E., Grogan, T., Elashoff, D.A., *et al.* (2014). Dynamic changes in intracellular ROS levels regulate airway basal stem cell homeostasis through Nrf2-dependent Notch signaling. Cell stem cell *15*, 199-214.

Pelletier, R.M. (1994). Blood barriers of the epididymis and vas deferens act asynchronously with the blood barrier of the testis in the mink (Mustela vison). Microscopy research and technique *27*, 333-349.

Pelletier, R.M. (1995). Freeze-fracture study of cell junctions in the epididymis and vas deferens of a seasonal breeder: the mink (Mustela vison). Microscopy research and technique *30*, 37-53.

Pereira, M.F., Fernandes, S.A., Nascimento, A.R., Siu, E.R., Hess, R.A., Oliveira, C.A., Porto, C.S., and Lazari, M.F. (2014). Effects of the oestrogen receptor antagonist Fulvestrant on expression of genes that affect organization of the epididymal epithelium. Andrology *2*, 559-571.

Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature *406*, 747-752.

Petersen, O.W., Lind Nielsen, H., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Ronnov-Jessen, L., and Bissell, M.J. (2001). The plasticity of human breast carcinoma cells is more than epithelial to mesenchymal conversion. Breast cancer research : BCR *3*, 213-217.

Pietrement, C., Sun-Wada, G.H., Silva, N.D., McKee, M., Marshansky, V., Brown, D., Futai, M., and Breton, S. (2006). Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. Biology of reproduction *74*, 185-194.

Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. Current opinion in genetics & development *17*, 45-51.
Prater, M.D., Petit, V., Alasdair Russell, I., Giraddi, R.R., Shehata, M., Menon, S., Schulte, R., Kalajzic, I., Rath, N., Olson, M.F., *et al.* (2014). Mammary stem cells have myoepithelial cell properties. Nature cell biology *16*, 942-950.

Prossnitz, E.R., and Barton, M. (2009). Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. Prostaglandins & other lipid mediators *89*, 89-97.

Radice, G.L., Ferreira-Cornwell, M.C., Robinson, S.D., Rayburn, H., Chodosh, L.A., Takeichi, M., and Hynes, R.O. (1997). Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. The Journal of cell biology *139*, 1025-1032.

Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Fanning, A.S., Lagziel, A., Kitajiri, S., Ramzan, K., Khan, S.N., Chattaraj, P., Friedman, P.L., Anderson, J.M., *et al.* (2006). Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. American journal of human genetics *79*, 1040-1051.

Ribeiro-Silva, A., Ramalho, L.N., Garcia, S.B., Brandao, D.F., Chahud, F., and Zucoloto, S. (2005). p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. Histopathology *47*, 458-466.

Rios, A.C., Fu, N.Y., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2014). In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. Nature *506*, 322-327.

Rizzo, S., Attard, G., and Hudson, D.L. (2005). Prostate epithelial stem cells. Cell proliferation *38*, 363-374.

Robaire, B., and Hinton, B. (2002). The epididymis, from molecules to clinical practice (New York: Kluwer Academic/Plenum publishers).

Robaire, B., and Viger, R.S. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. Biology of reproduction *52*, 226-236.

Robb, G.W., Amann, R.P., and Killian, G.J. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. Journal of reproduction and fertility *54*, 103-107.

Robinson, E.J., Neal, D.E., and Collins, A.T. (1998). Basal cells are progenitors of luminal cells in primary cultures of differentiating human prostatic epithelium. The Prostate *37*, 149-160.

Rock, J.R., Gao, X., Xue, Y., Randell, S.H., Kong, Y.Y., and Hogan, B.L. (2011). Notchdependent differentiation of adult airway basal stem cells. Cell stem cell *8*, 639-648.

Rock, J.R., Onaitis, M.W., Rawlins, E.L., Lu, Y., Clark, C.P., Xue, Y., Randell, S.H., and Hogan, B.L. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 12771-12775.

Rock, J.R., Randell, S.H., and Hogan, B.L. (2010). Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. Disease models & mechanisms *3*, 545-556.

Rodriguez, C.M., Kirby, J.L., and Hinton, B.T. (2001). Regulation of gene transcription in the epididymis. Reproduction *122*, 41-48.

Ruan, Y.C., Wang, Y., Da Silva, N., Kim, B., Diao, R.Y., Hill, E., Brown, D., Chan, H.C., and Breton, S. (2014). CFTR interacts with ZO-1 to regulate tight junction assembly and epithelial differentiation through the ZONAB pathway. Journal of cell science *127*, 4396-4408.

Saito, K., Kawakami, S., Okada, Y., Takazawa, R., Koga, F., Kageyama, Y., and Kihara, K. (2006). Spatial and isoform specific p63 expression in the male human urogenital tract. The Journal of urology *176*, 2268-2273.

Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. The Journal of cell biology *141*, 397-408.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. Molecular biology of the cell *11*, 4131-4142.

Salvatore, D., Tu, H., Harney, J.W., and Larsen, P.R. (1996). Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. The Journal of clinical investigation *98*, 962-968.

Sarrio, D., Franklin, C.K., Mackay, A., Reis-Filho, J.S., and Isacke, C.M. (2012). Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. Stem cells *30*, 292-303.

Schleicher, G., Drews, U., and Stumpf, W.E. (1989). No evidence for aromatization of [3H]testosterone in oestrogen receptor containing cells of the epididymis. Journal of steroid biochemistry *32*, 299-302.

Schoch, K.G., Lori, A., Burns, K.A., Eldred, T., Olsen, J.C., and Randell, S.H. (2004). A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies in vitro. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology *286*, L631-642.

Schulzke, J.D., Gunzel, D., John, L.J., and Fromm, M. (2012). Perspectives on tight junction research. Annals of the New York Academy of Sciences *1257*, 1-19.

Seiler, P., Cooper, T.G., and Nieschlag, E. (2000). Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. International journal of andrology *23*, 65-76.

Seiler, P., Wenzel, I., Wagenfeld, A., Yeung, C.H., Nieschlag, E., and Cooper, T.G. (1998). The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. International journal of andrology *21*, 217-226.

Senoo, M. (2013). Epidermal Stem Cells in Homeostasis and Wound Repair of the Skin. Adv Wound Care (New Rochelle) *2*, 273-282.

Senoo, M., Pinto, F., Crum, C.P., and McKeon, F. (2007). p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. Cell *129*, 523-536.

Serre, V., and Robaire, B. (1999). Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. Biology of reproduction *61*, 705-714.

Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K.J., Stingl, J., Smyth, G.K., Asselin-Labat, M.L., Wu, L., Lindeman, G.J., and Visvader, J.E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. Nature *439*, 84-88.

Shahi, P., Seethammagari, M.R., Valdez, J.M., Xin, L., and Spencer, D.M. (2011). Wnt and Notch pathways have interrelated opposing roles on prostate progenitor cell proliferation and differentiation. Stem cells *29*, 678-688.

Shipitsin, M., Campbell, L.L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., *et al.* (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. Cancer cell *11*, 259-273.

Shou, J., Ross, S., Koeppen, H., de Sauvage, F.J., and Gao, W.Q. (2001). Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. Cancer research *61*, 7291-7297.

Shum, W.W., Da Silva, N., Brown, D., and Breton, S. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. The Journal of experimental biology *212*, 1753-1761.

Shum, W.W., Da Silva, N., McKee, M., Smith, P.J., Brown, D., and Breton, S. (2008). Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. Cell *135*, 1108-1117.

Shum, W.W., Hill, E., Brown, D., and Breton, S. (2013). Plasticity of basal cells during postnatal development in the rat epididymis. Reproduction *146*, 455-469.

Shum, W.W., Ruan, Y.C., Da Silva, N., and Breton, S. (2011). Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. Journal of andrology *32*, 576-586.

Shum, W.W., Smith, T.B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L.S., Roy, J.W., Hill, E., Pittet, M.J., Breton, S., and Da Silva, N. (2014). Epithelial Basal Cells Are Distinct from Dendritic Cells and Macrophages in the Mouse Epididymis. Biology of reproduction.

Sibony, M., Segretain, D., and Gasc, J.M. (1994). Angiotensin-converting enzyme in murine testis: step-specific expression of the germinal isoform during spermiogenesis. Biology of reproduction *50*, 1015-1026.

Signoretti, S., Pires, M.M., Lindauer, M., Horner, J.W., Grisanzio, C., Dhar, S., Majumder, P., McKeon, F., Kantoff, P.W., Sellers, W.R., *et al.* (2005). p63 regulates commitment to the prostate cell lineage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 11355-11360.

Signoretti, S., Waltregny, D., Dilks, J., Isaac, B., Lin, D., Garraway, L., Yang, A., Montironi, R., McKeon, F., and Loda, M. (2000). p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. The American journal of pathology *157*, 1769-1775.

Silva, J.E., and Larsen, P.R. (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. Nature *305*, 712-713.

Simper, N.B., Jones, C.L., MacLennan, G.T., Montironi, R., Williamson, S.R., Osunkoya, A.O., Wang, M., Zhang, S., Grignon, D.J., Eble, J.N., *et al.* (2015). Basal cell carcinoma of the prostate is an aggressive tumor with frequent loss of PTEN expression and overexpression of EGFR. Human pathology *46*, 805-812.

Sirianni, R., Chimento, A., Ruggiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Ando, S., Maggiolini, M., and Pezzi, V. (2008). The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. Endocrinology *149*, 5043-5051.

Sleeman, K.E., Kendrick, H., Ashworth, A., Isacke, C.M., and Smalley, M.J. (2006). CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. Breast cancer research : BCR *8*, R7.

Sleeman, K.E., Kendrick, H., Robertson, D., Isacke, C.M., Ashworth, A., and Smalley, M.J. (2007). Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. The Journal of cell biology *176*, 19-26.

Smith, G.H., and 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, T.B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L.S., Hill, E., Pittet, M.J., and Da Silva, N. (2014). Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. Andrology *2*, 755-762.

Song, M.G., Hwang, S.Y., Park, J.I., Yoon, S., Bae, H.R., and Kwak, J.Y. (2011). Role of aquaporin 3 in development, subtypes and activation of dendritic cells. Molecular immunology *49*, 28-37.

St-Pierre, N., Dufresne, J., Rooney, A.A., and Cyr, D.G. (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*, 1232-1240.

Staehelin, L.A. (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. Journal of cell science *13*, 763-786.

Staehelin, L.A., Mukherjee, T.M., and Williams, A.W. (1969). Fine structure of frozenetched tight junctions. Die Naturwissenschaften *56*, 142.

Steed, E., Balda, M.S., and Matter, K. (2010). Dynamics and functions of tight junctions. Trends in cell biology *20*, 142-149.

Steinman, R.M. (2007). Dendritic cells: understanding immunogenicity. European journal of immunology *37 Suppl 1*, S53-60.

Sternlicht, M.D., Kedeshian, P., Shao, Z.M., Safarians, S., and Barsky, S.H. (1997). The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *3*, 1949-1958.

Stevenson, B.R., Heintzelman, M.B., Anderson, J.M., Citi, S., and Mooseker, M.S. (1989). ZO-1 and cingulin: tight junction proteins with distinct identities and localizations. The American journal of physiology *257*, C621-628.

Stingl, J., Eaves, C.J., Zandieh, I., and Emerman, J.T. (2001). Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. Breast cancer research and treatment 67, 93-109.

Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H.I., and Eaves, C.J. (2006a). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. Nature *439*, 993-997.

Stingl, J., Raouf, A., Eirew, P., and Eaves, C.J. (2006b). Deciphering the mammary epithelial cell hierarchy. Cell cycle *5*, 1519-1522.

Stingl, J., Raouf, A., Emerman, J.T., and Eaves, C.J. (2005). Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. J Mammary Gland Biol Neoplasia *10*, 49-59.

Stout, C., Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2004). Connexins: functions without junctions. Current opinion in cell biology *16*, 507-512.

Su, P., Zhao, F., Cao, Z., Zhang, J., Aschner, M., and Luo, W. (2015). Mir-203-mediated tricellulin mediates lead-induced in vitro loss of blood-cerebrospinal fluid barrier (BCB) function. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA *29*, 1185-1194.

Sullivan, R., Legare, C., Thabet, M., and 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*, 686-697.

Sun, E.L., and Flickinger, C.J. (1979). Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. The American journal of anatomy *154*, 27-55.

Sun, E.L., and Flickinger, C.J. (1982). Proliferative activity in the rat epididymis during postnatal development. The Anatomical record *203*, 273-284.

Suzuki, F., and Nagano, T. (1978). Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. Developmental biology *63*, 321-334.

Suzuki, K., Yu, X., Chaurand, P., Araki, Y., Lareyre, J.J., Caprioli, R.M., Orgebin-Crist, M.C., and Matusik, R.J. (2007). Epididymis-specific lipocalin promoters. Asian journal of andrology *9*, 515-521.

Tadokoro, T., Wang, Y., Barak, L.S., Bai, Y., Randell, S.H., and Hogan, B.L. (2014). IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, E3641-3649.

Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development *102*, 639-655.

Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. Annual review of biochemistry *59*, 237-252.

Takeichi, M. (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. Nature reviews Neuroscience *8*, 11-20.

Tanaka, T., Yamasaki, H., and Mesnil, M. (2001). Induction of a bystander effect in HeLa cells by using a bigenic vector carrying viral thymidine kinase and connexin32 genes. Molecular carcinogenesis *30*, 176-180.

Terpe, H.J., Stark, H., Prehm, P., and Gunthert, U. (1994). CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. Histochemistry *101*, 79-89.

Thimon, V., Metayer, S., Belghazi, M., Dacheux, F., Dacheux, J.L., and Gatti, J.L. (2005). Shedding of the germinal angiotensin I-converting enzyme (gACE) involves a serine protease and is activated by epididymal fluid. Biology of reproduction *73*, 881-890.

Tsukita, S., and Furuse, M. (2000). The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. Annals of the New York Academy of Sciences *915*, 129-135.

Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. Nature reviews Molecular cell biology *2*, 285-293.

Turner, T.T. (1991). Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. Annals of the New York Academy of Sciences *637*, 364-383.

Turner, T.T., Giles, R.D., and Howards, S.S. (1981). Effect of oestradiol valerate on the rat blood--testis and blood--epididymal barriers to [3H]inulin. Journal of reproduction and fertility *63*, 355-358.

Turner, T.T., Johnston, D.S., Finger, J.N., and Jelinsky, S.A. (2007). Differential gene expression among the proximal segments of the rat epididymis is lost after efferent duct ligation. Biology of reproduction *77*, 165-171.

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. Cell *126*, 741-754.

van Amerongen, R., Bowman, A.N., and Nusse, R. (2012). Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/beta-catenin-responsive stem cells in the mammary gland. Cell stem cell *11*, 387-400.

Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2004). The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. Proceedings of the American Thoracic Society *1*, 38-41.

Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., and Blanpain, C. (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. Nature *479*, 189-193.

van Leenders, G.J., and Schalken, J.A. (2003). Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. Critical reviews in oncology/hematology *46 Suppl*, S3-10.

Vendrely, E., and Dadoune, J.P. (1988). Quantitative ultrastructural analysis of the principal cells in the human epididymis. Reproduction, nutrition, development *28*, 1225-1235.

Veri, J.P., Hermo, L., and Robaire, B. (1993). Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. Journal of andrology *14*, 23-44.

Wang, B.E., Wang, X.D., Ernst, J.A., Polakis, P., and Gao, W.Q. (2008). Regulation of epithelial branching morphogenesis and cancer cell growth of the prostate by Wnt signaling. PloS one *3*, e2186.

Wang, K., Li, N., Yeung, C.H., Li, J.Y., Wang, H.Y., and Cooper, T.G. (2013a). Oncogenic Wnt/beta-catenin signalling pathways in the cancer-resistant epididymis have implications for cancer research. Molecular human reproduction *19*, 57-71.

Wang, S., Garcia, A.J., Wu, M., Lawson, D.A., Witte, O.N., and Wu, H. (2006). Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 1480-1485.

Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K.D., Walker, D., Yu, H., Halili, M.V., Hu, Y.P., Price, S.M., Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. Nature *461*, 495-500.

Wang, Z.A., Mitrofanova, A., Bergren, S.K., Abate-Shen, C., Cardiff, R.D., Califano, A., and Shen, M.M. (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*, 274-283.

Westphal, J.K., Dorfel, M.J., Krug, S.M., Cording, J.D., Piontek, J., Blasig, I.E., Tauber, R., Fromm, M., and Huber, O. (2010). Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. Cellular and molecular life sciences : CMLS *67*, 2057-2068.

Wheelock, M.J., and Johnson, K.R. (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. Current opinion in cell biology *15*, 509-514.

White, S.R., Martin, L.D., Stern, R., Laxman, B., and Marroquin, B.A. (2010). Expression of IL-4/IL-13 receptors in differentiating human airway epithelial cells. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology *299*, L681-693.

Wittchen, E.S., Haskins, J., and Stevenson, B.R. (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. The Journal of biological chemistry *274*, 35179-35185.

Wittchen, E.S., Haskins, J., and Stevenson, B.R. (2000). Exogenous expression of the amino-terminal half of the tight junction protein ZO-3 perturbs junctional complex assembly. The Journal of cell biology *151*, 825-836.

Wojno, K.J., and Epstein, J.I. (1995). The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34 beta E12) in the diagnosis of prostate cancer. A review of 228 cases. The American journal of surgical pathology *19*, 251-260.

Wong, P.Y., Chan, H.C., Leung, P.S., Chung, Y.W., Wong, Y.L., Lee, W.M., Ng, V., and Dun, N.J. (1999). Regulation of anion secretion by cyclo-oxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from the rat. The Journal of physiology *514 (Pt 3)*, 809-820.

Wong, P.Y., Gong, X.D., Leung, G.P., and Cheuk, B.L. (2002). Formation of the epididymal fluid microenvironment (New York: Kluwer Academic / Plenum).

Wong, V. (1997). Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. The American journal of physiology *273*, C1859-1867.

Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F., and Rosen, J.M. (2005). On mammary stem cells. Journal of cell science *118*, 3585-3594.

Wu, J.C., Tsai, R.Y., and Chung, T.H. (2003). Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. Journal of cellular biochemistry *88*, 823-835.

Wu, R., Martin, W.R., Robinson, C.B., St George, J.A., Plopper, C.G., Kurland, G., Last, J.A., Cross, C.E., McDonald, R.J., and Boucher, R. (1990). Expression of mucin synthesis and secretion in human tracheobronchial epithelial cells grown in culture. American journal of respiratory cell and molecular biology *3*, 467-478.

Wu, R., Zhao, Y.H., and Chang, M.M. (1997). Growth and differentiation of conducting airway epithelial cells in culture. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology *10*, 2398-2403.

Wu, X., Zhao, B., Li, W., Chen, Y., Liang, R., Li, L., Jin, Y., and Ruan, K. (2012). MiR-200a is involved in rat epididymal development by targeting beta-catenin mRNA. Acta biochimica et biophysica Sinica *44*, 233-240.

Xu, B., Abdel-Fattah, R., Yang, L., Crenshaw, S.A., Black, M.B., and Hinton, B.T. (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*, 1282-1291.

Xu, B., Washington, A.M., and Hinton, B.T. (2014). PTEN signaling through RAF1 protooncogene serine/threonine kinase (RAF1)/ERK in the epididymis is essential for male fertility. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 18643-18648.

Xu, B., Yang, L., Lye, R.J., and Hinton, B.T. (2010). p-MAPK1/3 and DUSP6 regulate epididymal cell proliferation and survival in a region-specific manner in mice. Biology of reproduction *83*, 807-817.

Xu, X., Li, W.E., Huang, G.Y., Meyer, R., Chen, T., Luo, Y., Thomas, M.P., Radice, G.L., and Lo, C.W. (2001). N-cadherin and Cx43alpha1 gap junctions modulates mouse neural crest cell motility via distinct pathways. Cell communication & adhesion *8*, 321-324.

Xue, Y., Smedts, F., Debruyne, F.M., de la Rosette, J.J., and Schalken, J.A. (1998). Identification of intermediate cell types by keratin expression in the developing human prostate. The Prostate *34*, 292-301.

Yamashita, S. (2004). Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology 279, 768-778.

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., and McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. Molecular cell *2*, 305-316.

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., *et al.* (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature *398*, 714-718.

Yap, A.S., Brieher, W.M., and Gumbiner, B.M. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. Annual review of cell and developmental biology *13*, 119-146.

Yeung, C.H., and Cooper, T.G. (2003). Developmental changes in signalling transduction factors in maturing sperm during epididymal transit. Cellular and molecular biology *49*, 341-349.

Yeung, C.H., Cooper, T.G., Bergmann, M., and Schulze, H. (1991). Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. The American journal of anatomy *191*, 261-279.

Yeung, C.H., Nashan, D., Sorg, C., Oberpenning, F., Schulze, H., Nieschlag, E., and Cooper, T.G. (1994). Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. Biology of reproduction *50*, 917-926.

Yeung, C.H., Wang, K., and Cooper, T.G. (2012). Why are epididymal tumours so rare? Asian journal of andrology *14*, 465-475.

Zaya, R., Hennick, C., and Pearl, C.A. (2012). In vitro expression of androgen and estrogen receptors in prepubertal and adult rat epididymis. General and comparative endocrinology *178*, 573-586.

Zhang, L., Valdez, J.M., Zhang, B., Wei, L., Chang, J., and Xin, L. (2011). ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increases their cloning efficiency. PloS one *6*, e18271.

Zhang, Z., Kobayashi, S., Borczuk, A.C., Leidner, R.S., Laframboise, T., Levine, A.D., and Halmos, B. (2010). Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. Carcinogenesis *31*, 577-586.

Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T., Katzenellenbogen, B.S., and Hess, R.A. (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. Journal of andrology *23*, 870-881.

Zhu, L.J., Hardy, M.P., Inigo, I.V., Huhtaniemi, I., Bardin, C.W., and Moo-Young, A.J. (2000). Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. Biology of reproduction *63*, 368-376.

ANNEXE



Annexe 1. Comparaison des résultats de microréseaux et de PCR.

Figure 1. Comparaison des résultats de PCR et de microréseaux concernant les gènes CD11c, Cldn1, CX3CR1, Ednra, Krt14, Krt18, Ptgs1, Tp63 et MarvelD2.

L'utilisation de la PCR pour différencier les différentes populations de cellules épithéliales épididymaires a permis de montrer que les gènes enrichis dans la population de cellules basale étaient également enrichis en utilisant la méthode des microréseaux. Les résultats obtenus par PCR confirment les données obtenu par microréseaux.