

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DES MÉCANISMES CELLULAIRES ET HUMORAUX
IMPLIQUÉS DANS L'ORCHITE AUTO-IMMUNE (OAI) SPONTANÉE

Par

Emil SILVAS

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en pathologie et biologie cellulaire

Août, 2003

© EMIL SILVAS, 2003



W
4
U58
2004
v.126

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**ÉTUDE DES MÉCANISMES CELLULAIRES ET HUMORAUX
IMPLIQUÉS DANS L'ORCHITE AUTO-IMMUNE (OAI) SPONTANÉE**

présenté par:

Emil SILVAS

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Luchino Cohen	Président-rapporteur
Docteur Marc-R. Pelletier	Directeur de recherche
Docteur Maria-Leiza Vitale	Codirectrice de recherche
Docteur Moïse Bendayan	Membre du jury

Mémoire accepté le:

RÉSUMÉ

L'orchite granulomateuse, une séquelle des oreillons chez l'humain, conduit parfois à l'infertilité permanente. Le vison est le seul modèle animal actuellement disponible, qui présente une orchite auto-immune (OAI) spontanée dont les caractéristiques sont semblables à celles de l'orchite granulomateuse chez l'homme. Nous avons développé et utilisé ce modèle expérimental pour étudier les réponses cellulaires et humorales responsables de la pathologie de l'OAI. Pour étudier les réponses cellulaires, nous nous sommes proposés d'identifier les cellules CD4, CD8, CD163, NCL-Macro et HLA positives dans les infiltrats qui accompagnent l'OAI, par les techniques d'immunohistochimie et d'immunofluorescence. Nous voulions aussi déterminer si les cellules CD4+, CD8+, CD163+ et HLA+ étaient aussi FasL+. Pour caractériser les réponses humorales, nous avons utilisé les anticorps anti-IgG de vison et anti-IgM, IgD, IgA, IgE humains qui reconnaissent aussi les protéines de vison, en immunohistochimie et en Western blot.

Nos résultats montrent, dans le testicule de vison orchitique, une infiltration des macrophages dans les espaces interstitiels et à l'intérieur des tubules séminifères complètement détruits. Dans l'épididyme orchitique, nos résultats démontrent un grand nombre de macrophages dans le tissu interstitiel. Dans cette étude nous avons montré pour la première fois que les macrophages interstitiels du testicule et de l'épididyme de vison - normal et orchitique- expriment le marqueur CD163 qui pourrait être impliqué dans la modulation du processus inflammatoire de l'OAI.

Dans le testicule du vison orchitique, nous avons détecté une infiltration de lymphocytes CD4+ et CD8+ dans les espaces interstitiels et à l'intérieur des tubules séminifères. L'épididyme orchitique présentait une accumulation de cellules CD4+ et

CD8+ au niveau du tissu interstitiel. Nous n'avons pas observé, en double marquage, de cellules marquées au CD4 et FasL. Le double marquage aux CD8 et FasL était évident dans des cellules des espaces interstitiels et dans l'épithélium épидидymaire orchitique. Nous avons identifié des cellules HLA+/FasL+ dans les tubules séminifères orchitiques. Dans les testicules et les épидидymes orchitiques, le marquage FasL positif est augmenté, ce qui suggère l'implication de l'apoptose dans les altérations structurales observées dans l'OAI.

Par analyse de Western blot, nous avons identifié les mêmes profils pour les immunoglobulines dans les sérums normaux et orchitiques. Cependant dans les sérums orchitiques, les taux d'IgG, d'IgM, d'IgA et d'IgD apparaissaient significativement ($p < 0.01$) plus élevés, alors que le taux d'IgE ne présentait pas de variation détectable entre les sérums sains et orchitiques.

En immunoperoxydase et dans le testicule du vison orchitique, les dépôts d'IgG identifiés se trouvaient dans les membranes basales des tubules séminifères et dans le tissu interstitiel. Nous avons identifié de dépôts d'IgM dans les membranes basales des tubules séminifères et des capillaires sanguins. Dans l'épididyme orchitique, nous avons observé des dépôts d'IgM dans les membranes basales de l'épithélium épидидymaire et aussi dans les espaces intertubulaires. De rares dépôts intracellulaires d'IgD étaient présents dans les espaces interstitiels du testicule orchitique. Nous avons aussi détecté des cellules positivement marquées à l'IgA et à l'IgE dans le tissu interstitiel des testicules et les épидидymes orchitiques. Ces résultats indiquent la présence d'auto-anticorps dans le sérum de visons ayant l'OAI.

Nos résultats montrent chez les visons orchitiques la présence : 1) d'un infiltrat de macrophages inter-, et intra-tubulaires dans le testicule et dans l'épididyme; 2) d'un

infiltrat de lymphocytes CD4+ et CD8+ dans le testicule et dans l'épididyme; 3) de cellules CD4+ qui n'étaient pas FasL+ et de cellules CD8+/FasL+ dans l'épithélium et l'espace interstitiel de l'épididyme; 4) de cellules FasL+ dans ces tissus, ce qui suggère l'implication de l'apoptose dans l'OAI. 5) Les taux sériques d'IgG, d'IgM, d'IgA et d'IgD avaient des valeurs significativement plus élevées dans les sérums des visons orchitiques; 6) la présence de dépôts immuns d'IgG et d'IgM dans les limitantes (vasculaires et tubulaires) et des dépôts intracellulaires d'IgA (dans le tissu interstitiel du testicule et de l'épididyme orchitiques), d'IgD (dans le tissu interstitiel du testicule orchitique) et d'IgE (dans les tubules et le tissu interstitiel du testicule et de l'épididyme orchitiques).

La présence d'une réponse cellulaire (des macrophages, des cellules CD4+ et CD8+) dans les tissus orchitiques examinés indique la participation dans la pathologie de l'OAI d'un mécanisme d'immunité cellulaire et l'identification d'une réponse humorale (des titres plus élevés d'immunoglobulines dans les sérums d'animaux orchitiques et des dépôts immuns), suggère l'implication de l'immunité humorale dans la pathologie de l'OAI.

Nos études nous ont permis de mettre en exergue un ensemble de réponses immunes cellulaires et humorales qui accompagnent les changements pathologiques au cours de l'OAI chez le vison. Le vison infertile représente un modèle idéal pour étudier l'infertilité masculine humaine et, l'identification des réponses cellulaires et humorales impliquées dans l'OAI du vison offre la possibilité de poser un diagnostic précoce et de préconiser un traitement approprié pour prévenir l'installation d'une infertilité irréversible chez l'homme.

MOTS CLÉS : auto-immune, CD4, CD8, orchite, vison, infertilité, auto-anticorps, FasL, immunohistochimie, immunofluorescence

SUMMARY

Granulomatous orchitis is a complication of mumps infection and represents an important cause of infertility in men. At present, mink is the sole animal model that develops a spontaneous autoimmune orchitis similar to human granulomatous orchitis. We have developed and used this animal model to study the cellular and humoral factors involved in the pathogenesis of autoimmune orchitis. In order to identify the cell types of the testicular infiltrate characteristic in orchitis, we used two different experimental approaches, immunohistochemistry and immunofluorescence, with different antibodies: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD163, anti-NCL-Macro, anti-HLA, and anti-FasL. We also determined whether the CD4, CD8, CD163, and HLA-positives cells were also FasL+. To characterize the humoral responses, we used immunohistochemistry and immunoblotting with mink anti-IgG and human anti-IgM, anti-IgA, anti-IgE, and anti-IgD antibodies, which recognize mink proteins too.

In the testis of infertile mink, our results showed a macrophage infiltration in the interstitium and in the seminiferous tubules, which presented extensive damage. A large number of macrophages was also present in the epididymis of infertile mink. In the present study, we show for the first time that the interstitial macrophages of the normal and infertile mink testis and epididymis express the CD163 marker, which might be involved in the modulation of inflammation in autoimmune orchitis.

In the infertile testis, we observed a CD4+ and CD8+ lymphocyte infiltration in the interstitial tissue and the seminiferous tubules. In the interstitium of infertile epididymis, we identified an accumulation of CD4+ and CD8+ lymphocytes. Using immunofluorescent double labeling, we could not detect any CD4+/FasL+ cells. Double-

labeled CD8+/FasL+ cells were observed in the interstitial tissue and epithelium of infertile epididymis. We identified HLA+/FasL+ cells in the infertile seminiferous tubules. In the infertile testis and epididymis, the FasL+ labeling was enhanced, suggesting the possible involvement of apoptosis in the structural damage observed in autoimmune orchitis.

Immunoblotting analysis revealed the same pattern of Ig bands in the sera of both normal and infertile mink. However, the levels of IgG, IgM, IgA and IgD were significantly increased ($p < 0.01$) in the serum of infertile animals, whereas IgE showed no detectable variation between the serum of normal and infertile minks.

By immunohistochemistry, we identified IgG deposits in the basement membranes of seminiferous tubules and the interstitial tissue of infertile testis. IgM deposits were observed in the basement membranes of the seminiferous tubules and of the capillaries. In the infertile epididymis, IgM deposits were localized in the basement membranes of the epithelium and in the intertubular spaces. We observed sparse IgD deposits in the interstitial tissue of infertile mink testis. In the testis and epididymis of infertile mink, we detected cellular IgA and IgE immunostaining in the interstitial tissue. These results suggest the presence of autoantibodies in the serum of mink with autoimmune orchitis.

In conclusion, our results in mink with autoimmune orchitis show: 1) a macrophage infiltration in the testicular and epididymal interstitium and tubules; 2) a CD4+ and CD8+ lymphocyte infiltration in the testis and epididymis; 3) CD4+/FasL- and CD8+/FasL+ cells in the epididymal epithelium and interstitium; 4) the presence of FasL-positive cells in these tissues, suggesting the involvement of apoptosis in autoimmune orchitis; 5) the levels of IgG, IgM, IgA, and IgD are significantly higher in the sera of infertile minks; 6) IgG and IgM deposits in the basement membranes of seminiferous

tubules and in the basal lamina of blood vessels; intracellular IgA deposits (in the interstitial tissue of infertile testis and epididymis), intracellular IgD deposits (in the testicular interstitium of infertile minks), and intracellular IgE deposits (in the tubules and interstitial tissue of infertile testis and epididymis).

In the examined tissues of infertile minks, we identified the presence of a cellular (macrophage and T lymphocyte infiltration) and humoral response (higher levels of circulating immunoglobulins and immune deposits), suggesting the involvement of both cellular and humoral immune mechanisms in the pathogenesis of autoimmune orchitis.

The infertile mink represents an ideal experimental model to study male immunologic infertility. The identification of the cellular and humoral immune responses involved in the spontaneous autoimmune orchitis of the mink offers the possibility for an early detection and an appropriate treatment to prevent irreversible infertility in men.

KEY WORDS: autoimmune, CD4, CD8, orchitis, mink, infertility, autoantibodies, FasL, immunohistochemistry, immunofluorescence.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
Page titre	i
Identification du jury	ii
Résumé	iii
Summary	vi
Table des matières	ix
Liste des schémas	xiv
Liste des figures	xv
Liste des abréviations	xviii
Remerciements	xxii
Avant-propos	xxiii
1. INTRODUCTION	1
1.1. Les maladies auto-immunes.....	1
1.1.1 Description	1
1.1.2 Classification des maladies auto-immunes.....	2
1.2 Immuno-tolérance	4
1.2.1 Les mécanismes cellulaires de la tolérance de soi	4
1.2.2 Des facteurs locaux impliqués dans l'immunorégulation du testicule.....	6
1.3 Modèles d'auto-immunité.....	9
1.3.1 Modèles expérimentaux	9
1.3.1.1 Maladies provoquées par injection d'extraits d'organes.....	9
1.3.1.2 Maladies auto-immunes provoquées par des virus.....	12
1.3.2 Les maladies auto-immunes spontanées	13
1.3.3 L'orchite dans les testicules ectopiques.....	15
1.3.4 Le modèle choisi	16
1.4 Les mécanismes de déclenchement des MAI.....	17
1.4.1 Généralités sur les auto-anticorps	17
1.4.2 Les sous-classes des anticorps de type IgG.....	19

1.4.3	Classes des anticorps de type IgA.....	19
1.4.4	Classe des anticorps de type IgD.....	20
1.4.5	Classe des anticorps de type IgE.....	21
1.4.6	Auto-anticorps anti-sperme (AAS).....	22
1.4.7	Anticorps anti-sperme (AAS) chez les femelles.....	24
1.5	Les lymphocytes B	28
1.6	Les complexes immuns.....	30
1.6.1	Les complexes immuns au niveau testiculaire.....	31
1.7	Les lymphocytes T	33
1.7.1	Les Lymphocytes T CD4+.....	34
1.7.2	Les Lymphocytes T CD8+.....	38
1.8	Macrophages	44
1.8.1	Macrophages testiculaires	44
1.8.2	Les fonctions immunes des macrophages testiculaires.....	48
1.9	HLA.....	50
1.9.1	Généralité	50
1.9.2	Associations du HLA et les maladies auto-immunes.....	53
1.10	Facteurs génétiques responsables du déclenchement des MAI.....	54
1.11	L'objectif de l'étude	57
2.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	58
2.1	Matériels.....	58
2.1.1	Animaux utilisés	58
2.1.1.1	Prélèvement des testicules.....	59
2.1.1.2	Prélèvement d'autres tissus.....	60
2.1.2	Produits chimiques et enzymes	61
2.1.3	Source des anticorps et des produits chimiques.....	61
2.1.3.1	Anticorps primaires	61
2.1.3.2	Anticorps secondaires conjugués à la biotine.....	62
2.1.3.3	Anticorps secondaires conjugués à la peroxydase.....	62
2.1.3.4	Anticorps secondaires conjugués au substances fluorescentes....	62
2.1.4	Autres	62

2.2	Méthodes.....	63
2.2.1	Western blot	63
2.2.1.1	Dosage des protéines des échantillons.....	63
2.2.1.2	Électrophorèse sur gels dénaturants SDS-PAGE.....	63
2.2.2	Immunohistochimie	65
2.2.3	Immunofluorescence	67
3.	RÉSULTATS.....	69
3.1.	Étude de l'immunité cellulaire chez le vison adulte normal et orchitique	69
3.1.1	Localisation par immunoperoxydase des macrophages dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques... ..	69
3.1.2	Localisation par immunoperoxydase des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques.....	70
3.1.3	Localisation par double marquage en immunofluorescence des molécules du CMH et FasL dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques.....	70
3.1.4	Localisation par double marquage en immunofluorescence des macrophages et de cellules FasL+ dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques.....	71
3.1.5	Localisation par immunoperoxydase des cellules CD4 positives dans le testicules et les épидидymes de visons normaux et orchitiques.....	72
3.1.6	Localisation par double marquage en immunofluorescence de cellules CD4 et FasL dans les testicules et les épидидymes de visons normaux et orchitiques.....	73
3.1.7	Localisation par immunoperoxydase des cellules CD8 positives dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques.....	74

3.1.8	Localisation, par double marquage, en immunofluorescence des CD8 et du FasL dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques.....	74
3.2	Étude du status de l'immunité humorale chez le vison adulte orchitique.....	75
3.2.1	Caractérisation du sérum de visons adultes sains et orchitiques par immunoperoxydase.....	75
3.2.2	Caractérisation de la présence d'IgG dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot.....	76
3.2.3	Localisation par immunoperoxydase de dépôts d'IgG dans le testicule et l'épididyme de visons sains et orchitiques.....	77
3.2.4.	Caractérisation de la présence d'IgM dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot	77
3.2.5	Localisation par immunoperoxydase de dépôts d'IgM dans le testicule et l'épididyme de visons sains et orchitiques	78
3.2.6	Caractérisation de la présence d'IgD dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot	78
3.2.7	Localisation par immunoperoxydase de dépôts d'IgD dans le testicule et l'épididyme de visons sains et orchitiques.....	79
3.2.8	Caractérisation de la présence d'IgE dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot	79
3.2.9	Localisation, par immunoperoxydase, des dépôts d'IgE dans les testicules et les épидидymes de visons sains et orchitiques.....	80
3.2.10	Caractérisation de la présence d'IgA dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot	80

3.2.11	Localisation par immunoperoxydase de dépôts d'IgA dans le testicule et l'épididyme de visons sains et orchitiques.....	81
4.	DISCUSSION	128
4.1.	Caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire chez le vison adulte orchitique.....	128
4.1.1	Les macrophages	128
4.1.2	Le complexe majeur d'histo-compatibilité (CMH)	131
4.1.3	Le système Fas-FasL	133
4.1.4	Les lymphocytes T CD4+ et CD8+	134
4.2.	Caractérisation de la réponse immunitaire humorale chez le vison adulte orchitique.....	137
4.3.	Conclusion	143
5.	BIBLIOGRAPHIE	146

LISTE DES SCHÉMAS

		PAGE
Schéma 1.	Facteurs impliqués dans le développement d'une maladie auto-immune.....	2
Schéma 2.	Représentation schématique d'une portion de tubule séminifère et des relations entre le compartiment interstitiel et les vaisseaux sanguins et lymphatiques.....	7
Schéma 3.	Mécanismes effecteurs des réactions auto-immunes.....	17
Schéma 4.	La structure des molécules CD4 et CD8.....	34
Schéma 5.	Activation des lymphocytes T par les APC matures stimulées....	36
Schéma 6.	Différenciation des cellules T CD8+ cytotoxiques.....	39
Schéma 7.	L'implication du Fas dans l'apoptose.....	42
Schéma 8.	Représentation schématique des composants intracellulaires de la voie de Fas/FasL.....	43
Schéma 9.	Les interactions macrophage–cellule de Leydig.....	47
Schéma 10.	Représentation du développement de la population de macrophages testiculaires chez le rat.....	49
Schéma 11.	Trois représentations de la molécule CMPH2.....	52

LISTE DES FIGURES

		PAGE
Figure 1	Localisation par immunoperoxydase des macrophages dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques	83
Figure 2	Localisation par immunoperoxydase des cellules HLA de classe II dans les testicules et les épидидymes de visons normaux et orchitiques.....	85
Figure 3	Localisation par double marquage, en immunofluorescence des cellules HLA de classe II et FasL dans les testicules de vison normaux et orchitiques.....	87
Figure 4	Localisation par double marquage, en immunofluorescence, des cellules qui expriment le HLA de classe II et le FasL dans les épидидymes de visons normaux et orchitiques.....	89
Figure 5	Localisation par double marquage, en immunofluorescence, des macrophages et de cellules qui expriment le FasL dans le testicule et l'épididyme de visons normal et orchitique.....	91
Figure 6	Localisation par immunoperoxydase de cellules CD4 positives, dans les testicules et les épидидymes de visons normaux et orchitiques.....	93
Figure 7	Localisation par double marquage, en immunofluorescence, des cellules qui expriment le CD4 et/ou le FasL dans les testicules des visons normaux et orchitiques.....	95
Figure 8	Localisation par double marquage, en immunofluorescence,	

	des cellules CD4+ et FasL dans l'épididyme de visons normaux et orchitiques.....	97
Figure 9	Localisation par immunoperoxydase des cellules CD8 + dans le testicule de vison normal et orchitique.....	99
Figure 10	Localisation par immunoperoxydase des cellules CD8+ dans l'épididyme de visons normaux et orchitiques	101
Figure 11	Localisation par double marquage, en immunofluorescence, de cellules CD8+ et FasL dans les testicules de visons normaux et orchitiques.....	103
Figure 12	Localisation par double marquage, en immunofluorescence, des CD8+ et FasL dans les épидидymes de visons normaux et orchitiques.....	105
Figure 13	Caractérisation du sérum d'animaux sains et orchitiques, par immunoperoxydase.....	107
Figure 14	Caractérisation de la présence d'IgG dans les sérums normaux et orchitiques par Western blot	109
Figure 14'	Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgG dans les testicules et des épидидymes de visons normaux et orchitiques.....	111
Figure15	Caractérisation de la présence d'IgM dans les sérums normaux et orchitiques par Western blot.....	113
Figure 15'	Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgM dans des testicules et d'épididymes de visons normaux	

	et orchitiques.....	115
Figure 16	Caractérisation de la présence d'IgD dans les sérums normaux et orchitiques par Western blot	117
Figure16'	Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgD dans des testicules et d'épididymes de visons normaux et orchitiques.....	119
Figure 17	Caractérisation de la présence d'IgE dans les sérums normaux et orchitiques par Western blot	121
Figure17'	Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgE dans des testicules et d'épididymes de visons normaux et orchitiques.....	123
Figure 18	Caractérisation de la présence d'IgA dans les sérums normaux et orchitiques par Western blot	125
Figure18'	Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgA, dans des testicules et d'épididymes de visons normaux et orchitiques.....	127

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	pourcent
aa	acide aminé
AAS	anticorps antisperme
AICD	activation induced cell death
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ABP	androgen binding protein
Amp	ampères
APS	ammonium persulfate
ATP	Adénosine Triphosphate
ATP	Adénosine Triphosphatase
BBP	bleu de bromophénol
BHT	barrière hémato-testiculaire
BSA	albumine sérique de bovin (bovine serum albumin)
C-terminale	Carboxy-terminale
Ca²⁺	Cation calcium
CAD	caspase-activated deoxyribonuclease
CD	Cluster of differentiation
CI	complexes immuns
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
DAB:	diaminobenzidine
DMSO	diméthyl sulfonyl oxide
EDS	éthane diméthane sulphonate
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique (ethylenediaminetetraactic acid)
EE	épithélium épидидymaire
EGF	facteur de croissance épithéliale (epidermal growth factor)
EGFR	récepteur du facteur de croissance épithéliale (epidermal growth factor receptor)

FasL	Fas ligand
FCF	facteur de croissance des fibroblastes
Fig	figure
FITC	fluorescein isothiocyanate
GALT	gut-associated lymphoid tissue
HRP	peroxidase de raifort (horseradish peroxidase)
IHC	immunohistochimie
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
kDa	kilodalton
kb	kilobase
LCM	chorioménigite lymphocytaire
LH	luteinizing hormone
LPS	lipopolysaccharide
lu	lumière du tubule séminifère
MAI	maladies auto-immunes
MB	membrane basale
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MEM	minimum essentiel medium
mM	millimolaire
mL	millilitre
µg	microgramme
µL	microlitre
NK	natural killer
OAE	orchite allergique expérimentale
OAI	orchite auto-immune
PA	phosphatase alcaline
PBS	phosphate buffered saline
PLC-γ	phospholipase C gamma
PMN	polymorpho-nuclear
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
ROS	reactive oxygen species

rpm	révolutions par minute
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard Error of the Mean
SRCR	scavenger receptor cystein-rich
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
TBS	tris buffered saline
TCA	acide trichloroacétique
TCR	T-cell receptor
TGF α	facteur de transformation alpha (transforming growth factor alpha)
TNF α:	Tumor Necrosis Factor Alpha
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TI	tissu interstitiel
TRITC	tetramethyl rhodamine isothiocyanate
TS	tubule séminifère
TR	tubuli recti
U	unité
V	volts

À mes parents Lucia et Emil

À mon épouse Alina

REMERCIEMENTS

Remerciements au **Dr. Réal-Marc Pelletier**, mon directeur de recherche.

Je remercie sincèrement **Dr. María Leiza Vitale**, mon codirecteur de recherche, pour le soutien tout au long de ma maîtrise.

Je tiens à remercier mon comité de parrainage, **Dr. Moïse Bendayan** et **Dr. Luchino Cohen** pour leurs précieux conseils scientifiques.

J'exprime ma gratitude au **Dr. Luc Oligny** et **Dr. Victor Kokta** du Département de Pathologie de l'Hôpital St-Justine qui m'ont permis avec générosité de réaliser toutes les images de microscopie.

Je suis très reconnaissant envers **Eloisa Carbajal** pour ses conseils, son aide et la patience qu'elle a gentiment témoignée envers moi. J'associe à ces remerciements **Suk Ran Yoon** pour son aide, lors de mes débuts.

Je remercie également à mes collègues **Robin Young**, **Mirela Pascariu**, **Zheng Guifu**, **Marie-Eve Fortin** et spécialement **Casimir Akpovi** pour leur aide, leur amitié et leur soutien pendant ma maîtrise.

J'aimerais aussi remercier tous ceux que je n'ai pas nommés et qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet.

AVANT-PROPOS

Certain de résultats décrits dans ce mémoire ont été et seront présentés à différentes occasions :

- **Silvas, E., Vitale M.L., Pelletier, R-M.** Études des mécanismes humoraux et cellulaires impliqués dans l'orchite auto-immune spontanée (OAI). *Médecine-Science*, Suppl. 2 vol. 18, 2002.
- **Silvas, E., Vitale M.L., Pelletier, R-M.** Études des facteurs cellulaires et humoraux impliqués dans l'orchite auto-immune spontanée (OAI). Journée Scientifique du Département de pathologie et biologie cellulaire, Montréal, Mai 2002.
- **Silvas, E., Vitale M.L., Pelletier, R-M.** L'orchite auto-immune (OAI) spontanée chez le vison. 30e anniversaire du CRRA Journée de la recherche des biologistes en reproduction et développement du grand Montréal. Faculté de médecine vétérinaire, Novembre 2002.
- **Silvas, E., Vitale M.L., Pelletier, R-M.** Approche pour un diagnostic précoce de l'orchite auto-immune spontanée (OAI) chez le vison adulte. *Médecine-Science*, Suppl. 2 vol. 19, 2003.
- **Silvas, E., Pelletier, R-M., Vitale M.L.** Caractérisation de l'infiltrat leucocytaire et des dépôts immuns apparaissant au cours de l'orchite auto-immune (OAI) spontanée chez le vison (*Mustela vison*) adulte. 71^e Congrès de l'ACFAS, Université du Québec à Rimouski, Mai 2003.

- **Silvas, E., Vitale M.L., Pelletier, R-M.** Étude de la réponse cellulaire et humorale au cours de l'orchite auto-immune spontanée chez le vison (*Mustela vison*). La 45^{ième} réunion annuelle du CRCQ. Manoir des Sables (Québec), Septembre 2003.

1. INTRODUCTION

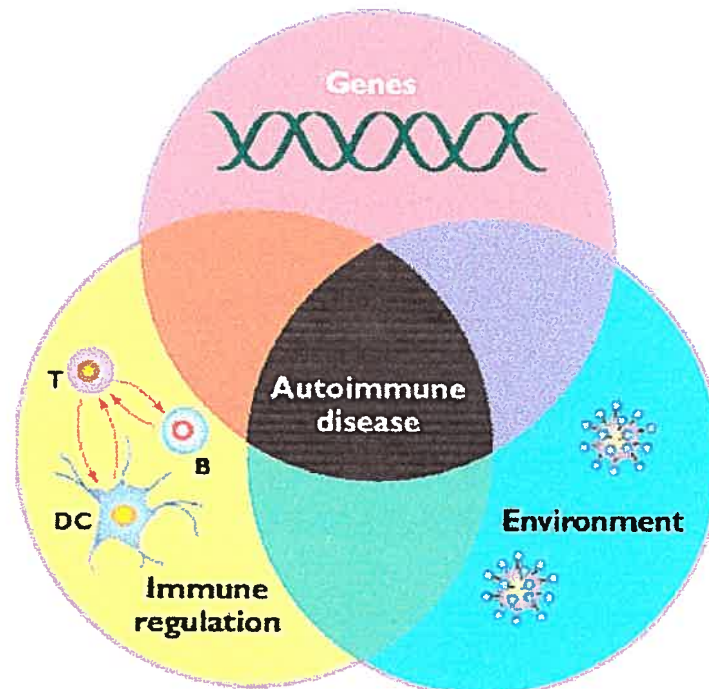
1.1 LES MALADIES AUTOIMMUNES (MAI)

1.1.1 Description

Les maladies auto-immunes (MAI) sont des maladies causées par la rupture de la tolérance de l'organisme pour ses propres constituants et sont caractérisées par une réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire dirigée contre certains auto-antigènes. La prévalence des MAI dans la population générale est de l'ordre 6 à 8 % (Mozes et coll. 1990; Ermann et Fathman, 2001).

Une telle définition, quoique vague, indique la présence d'un phénomène auto-immun, comme les auto-anticorps ou/et des lymphocytes autoréactifs (Ermann et Fathman, 2001). Le processus auto-immun peut résulter d'une réaction normale ou aberrante contre un antigène exogène ou endogène et ce processus est le résultat de plusieurs facteurs.

La réponse immune d'un individu, ayant une prédisposition génétique à un agent pathogène de l'environnement et une anomalie dans les mécanismes immunorégulateurs, peut déclencher une MAI. L'importance des composants, représentés dans le schéma suivant (Schéma 1), peut varier entre les individus et les maladies, mais l'apparition d'une MAI nécessiterait la convergence des facteurs génétiques, environnementaux et immunologiques (Ermann et Fathman, 2001).



Ermann et Fathman, 2001

Schéma 1. Facteurs impliqués dans le développement d'une maladie auto-immune. T, cellule T; B, cellule B; DC, cellule dendritique.

1.1.2 Classification des maladies auto-immunes

Deux critères de classification des MAI (Lahita et coll., 2000) :

- L'origine du processus auto-immun
- La nature des mécanismes pathogénétiques et des auto-antigènes impliqués

a) L'origine du processus auto-immun

Les MAI primitives, maladies sans une origine précise, mais avec des auto-anticorps et/ou des lymphocytes auto-réactifs qui sont les responsables des manifestations de la maladie.

Les MAI secondaires dans lesquelles le processus auto-immun résulte d'une affection qui provoque une rupture de la tolérance pour les auto-antigènes.

b) La nature des mécanismes pathogénétiques et des antigènes impliqués

Les MAI organo-spécifiques, résultent d'une réponse immunitaire dirigée contre un antigène précis d'un organe ou d'un tissu, et les lésions inflammatoires sont subaiguës ou chroniques et localisées dans des organes déterminés (Ponvert et coll., 1991).

Les MAI diffuses sont caractérisées par une réponse immunitaire dirigée contre des antigènes communs de divers tissus et des lésions disséminées qui résultent de la formation de complexes immuns circulants et leur dépôts au niveau des tissus (Ponvert et coll., 1991).

Il y a une limite à cette classification, à cause des associations entre les MAI diffuses et organo-spécifiques (Ponvert et coll., 1991).

Maladies auto-immunes spécifiques d'organes

glandes endocrines	thyroïdites, maladies de Basedow maladie d'Addison diabète juvénile, insulino-dépendant
tractus gastro-intestinal	anémie de Biermer
rein	syndrome de Goodpasteur
oeil	ophtalmie sympathique, uvéites
système nerveux	syndrome de Guillain-Barré
foie	hépatite aiguë
<i>Testicule</i>	<i>Orchite auto-immune spontanée</i>

Maladies auto-immunes non-spécifiques d'organe

lupus érythémateux disséminé
polyarthrite rhumatoïde
syndrome de Sjögren
anémies hémolytiques, leucopénie et thrombocytopénie auto-immunes

1.2 Immuno-tolérance

1.2.1 Les mécanismes cellulaires de la tolérance de soi

La tolérance immunologique est acquise par deux mécanismes au cours de la différenciation lymphocytaire (Goodnow, 1996), la “tolérance centrale”, impliquée dans la sélection du répertoire des lymphocytes B et T au niveau de la moelle osseuse et du thymus (Bonomo et Matzinger, 1993) et la “tolérance périphérique” (Hammerling et coll., 1993) dans laquelle existent des mécanismes pour l’inactivation fonctionnelle des cellules réactives (Alferink et coll., 1998).

Dans le thymus, pendant l’étape de sélection des cellules T, les molécules du CMH (complexe majeur d’histocompatibilité) présentent les auto-antigènes aux cellules T (Ridgway et Fathman, 1999). La sélection positive se déroule dans la région du cortex thymique, entre les thymocytes et les cellules épithéliales qui expriment les molécules de classes I et de classe II du CMH (Marrack et Kappler, 1997). Le thymocyte qui s’engage dans la sélection positive est un lymphocyte $CD4^+ CD8^+$ et il devient à la fin de sa différenciation, un lymphocyte soit $CD4^+$, soit $CD8^+$ (Liu et coll., 1997). Un facteur qui influence cette sélection semble être l’avidité avec laquelle un thymocyte et le complexe peptide-CMH réalisent une liaison. Une faible concentration du peptide conduit à la survie du thymocyte alors qu’une forte concentration du peptide conduit à son élimination (Sebzda et coll., 1994). La sélection négative est responsable de la tolérance du soi. Les thymocytes immatures qui reconnaissent les peptides autologues avec une forte avidité sont éliminés par apoptose (Swain, 1999). Ce phénomène se déroule dans la région de la jonction cortico-médullaire, endroit connu pour être le site de prédilection pour la sélection négative (Le et coll., 1995).

Pour les lymphocytes B, la délétion clonale des cellules immatures se passe comme pour les précurseurs thymiques, par apoptose (Goodnow et coll., 1990; Weintraub et coll., 2000). Les phénomènes de la tolérance périphérique sont responsables de l'élimination des lymphocytes matures déjà exportés à la périphérie. Ces phénomènes s'appliquent aussi bien aux lymphocytes T (Webb et coll., 1990) qu'aux lymphocytes B (Akkaraju et coll., 1997).

Les phénomènes d'apoptose sont très importants pour les maladies auto-immunes. Chez les souris déficientes en facteurs du complément (C1q, C4) ou chez les patients qui ont une prédisposition à un syndrome lupique, des études ont mis en évidence une diminution de l'élimination des cellules T apoptotiques (Taylor et coll., 2000). Les souris ayant une déficience en protéine amyloïde sérique (PAS) développent un syndrome lupique et l'apparition de ce syndrome s'explique par un défaut d'élimination de la chromatine en absence de PAS (Bickerstaff et coll., 1999). Les auto-anticorps qui caractérisent cette maladie sont présents en grande densité à la surface des cellules apoptotiques. Quand les cellules apoptotiques s'accumulent, les auto-antigènes qui seraient éliminés en conditions normales, maintenant persistent et peuvent être présentés par les cellules dendritiques (Albert et coll., 1998). Les cellules apoptotiques ont été décrites comme des cellules anti-inflammatoires qui inhibent la libération des molécules pro-inflammatoires par les macrophages (Voll et coll., 1997), mais récemment des formes de cellules apoptotiques qui déclenchent la maturation des cellules dendritiques ont été identifiées (Restifo, 2000). Il semblerait que si l'apoptose se déroule normalement, la présentation des auto-peptides ne modifie pas le statut immunologique, et que par contre, quand l'apoptose s'accompagne de phénomènes

d'inflammation en présence d'auto-anticorps, la présentation d'auto-antigènes conduit à un état d'auto-immunité (Verhasselt et Goldman, 2001).

1.2.2 Des facteurs locaux impliqués dans l'immuno-régulation du testicule

Les mécanismes qui, dans le testicule, conduisent à un état de tolérance immunologique ne sont pas encore complètement élucidés, mais le résultat est une infertilité spontanée très semblable à celle provoquée par l'orchite granulomateuse consécutive aux oreillons chez l'humain. (Tung et coll., 1984; Kalaydjiev et coll., 2002). La spermatogenèse se complète durant la puberté avec l'apparition des spermatozoïdes qui eux possèdent des antigènes tissulaires spécifiques qui ne sont pas présentés durant la vie fœtale, quand se déroule le processus de la tolérance (Haas, 1987). Les barrières tissulaires et la séquestration d'antigènes sont très importantes, mais ne suffisent pas à elles seules, à protéger l'organisme contre une orchite auto-immune (OAI) spontanée (Pelletier, 1986 ; Pelletier, 1988).

Les plus importants éléments de la barrière hémato-testiculaire (BHT) sont les complexes de jonctions occlusives situés entre cellules de Sertoli adjacentes (Pelletier et Byers, 1992 Pelletier, 1995b ; Pelletier, 2001), qui séparent l'épithélium séminifère en compartiments basal et luminal. Le compartiment basal contient les cellules germinales jeunes jusqu'au spermatocyte du stade zygotène et le compartiment luminal contient les autres cellules germinales.

Toutes les cellules germinales possèdent des antigènes intra-cytoplasmiques. Les cellules du compartiment luminal présentent aussi des structures antigéniques à la surface cellulaire. Les antigènes somatiques exprimés au niveau des cellules germinales n'ont pas la capacité d'interagir avec les lymphocytes très tôt dans la vie et il semblerait

que la tolérance aux antigènes des cellules germinales mâles n'existerait pas (Tung, 1998).

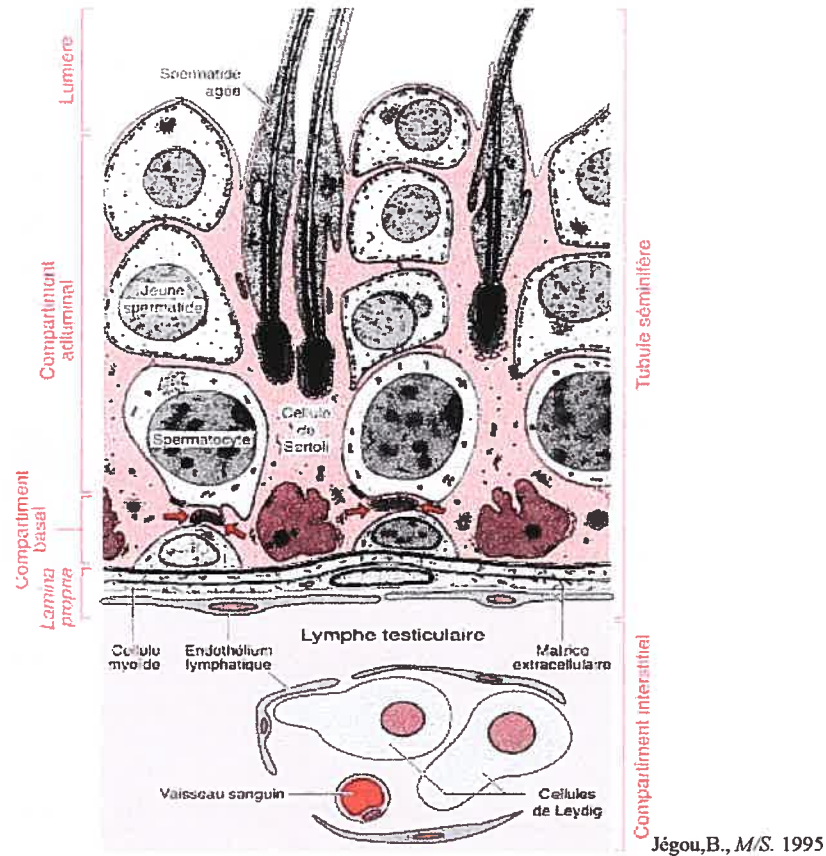


Schéma 2. Représentation schématique d'une portion de tubule séminifère et des relations entre le compartiment interstitiel et les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Toutefois, les cellules germinales ne sont pas complètement isolées par la BHT. Des auto-antigènes présents sur les spermatozoïdes en phase de préleptotène ont été démontrés à l'extérieur de la BHT (Yule et coll., 1988). Chez les animaux à reproduction saisonnière et chez les animaux à reproduction continue durant la puberté, la présence d'une BHT fonctionnelle coïncide avec l'apparition d'une lumière dans le

tubule séminifère et non pas avec l'apparition d'une classe particulière des cellules germinales dans l'épithélium (Pelletier, 1986). Des peptides caractéristiques du testicule sont reconnus par les cellules CD4⁺ au niveau des tubes droits qui font la liaison entre les tubules séminifères et le rete testis (Tung et coll., 1987, Yule et Tung, 1993).

Les greffes de tissus, comme les îlots du pancréas ou la glande parathyroïde, dans d'autres organes sont rapidement rejetées (les transplants sous-capsulaires au niveau du rein) (Head et Billingham, 1985), mais par contre, ils résistent plus longtemps quand ils sont greffés dans le testicule (Selawry et coll., 1987). La réponse des cellules T activées par des mitogènes ou par des anticorps est supprimée par les protéines qui se trouvent dans les fluides drainés dans l'espace testiculaire interstitiel (Pöllänen et coll., 1988) ou dans les surnageants de cultures de cellules de Sertoli (De Cesaris et coll., 1992).

Les cellules de Leydig forment des rosettes avec des thymocytes ou des lymphocytes et, la présence des cellules de Leydig réduit la réponse proliférative contre les alloantigènes (Born et Wekerle, 1982).

Des facteurs comme l'interleukine (IL)1 α , le TGF- β , la prostaglandine E2, les transglutaminases, le facteur de croissance des fibroblastes (FCF) ont été identifiés dans le testicule (Hedger et coll., 1990). L'activine et l'inhibine produites par le testicule ont la propriété soit, d'activer soit d'inhiber la prolifération des thymocytes après stimulation (Lee et coll., 1989; Hedger et coll., 1989). L'inhibine B est une hormone testiculaire qui est détectable durant toute la vie avec un changement important dans la première année après la naissance et pendant la puberté (Andersson, 2000). Chez les patients ayant une infertilité associée à une délétion du facteur d'azoospermie du

chromosome Y, la concentration de l'inhibine B dans le sérum est réduite (Frydelund-Larsen et coll., 2002). D'autres protéines qui inhibent l'activité cytolytique du complément dans le testicule ont été mises en évidence (Tarter et Alexander, 1984). Le facteur de croissance des plaquettes sanguines a été mis en évidence au niveau du testicule très récemment (Mariani et coll., 2002).

La cellule de Sertoli a le pouvoir de synthétiser des produits biologiquement actifs : la glycoprotéine 2-sulphaté a la capacité d'inhiber la lyse cellulaire provoquée par le complexe d'attaque C56789 (Jenne et Tschopp, 1989), et aussi la transférine qui a le pouvoir d'inhiber la blastogenèse lymphocytaire (Skinner et coll., 1984).

1.3 Modèles d'auto-immunité

1.3.1 Modèles expérimentaux

Il est relativement facile de provoquer une MAI chez différentes espèces de vertébré en injectant des extraits d'organes en présence d'adjuvant ou de virus.

1.3.1.1. Maladies provoquées par l'injection d'extraits d'organes

La thyroïdite allergique expérimentale

L'injection d'extraits de thyroïde homologues, émulsifiés dans de l'adjuvant de Freund chez les cobayes ou des souris, provoque l'apparition d'une thyroïdite auto-immune. Cette maladie ressemble à la maladie de Hashimoto chez l'humain et présente des lésions qui conduisent à la perte de l'architecture folliculaire normale et à la présence d'un infiltrat de cellules mononuclées (Collins et Gough, 2002).

L'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE)

L'EAE, une MAI démyélinisante du système nerveux central est provoquée par l'injection d'un homogénat de système nerveux central en présence d'adjuvant de

Freund. Les manifestations de la maladie sont très proches de la sclérose en plaques, une maladie qui se développe contre la protéine basique encéphalitogène de la myéline (Kappel et coll., 1991; Sumelathi et coll., 2001).

Glomérulonéphrites (GN) auto-immunes

En injectant des extraits de rein ou des préparations purifiées de membrane basale glomérulaire, allogéniques ou xénogéniques chez les moutons ou chez les rats en présence de l'adjuvant de Freund, on provoque l'apparition de la glomérulonéphrite auto-immune. Cette MAI est caractérisée par une prolifération mésangiale accompagnée de dépôts immuns sub-endothéliaux (Peutz-Kootstra et coll., 2001).

L'anémie hémolytique auto-immune expérimentale peut être induite chez la souris par injection d'hématies xénogéniques de rat. (Gehrs et Friedberg, 2002).

Orchite allergique expérimentale (OAE)

L'histopathologie de l'orchite se caractérise par l'apparition d'une inflammation du testicule –orchite- et de l'épididyme –épididymite- suivie d'une aspermatogénèse.

Orchite allergique expérimentale (OAE) qui survient après une immunisation à l'antigène tissulaire.

En utilisant un antisérum "spermatotoxique" Metchnikoff a démontré sa capacité d'immobiliser *in vitro*, les spermatozoïdes normaux (Metchnikoff, 1900). L'administration d'une seule dose d'homogénat testiculaire syngénique ou allogénique avec de l'adjuvant de Freund à des cobayes induit une OAE 2 à 8 semaines après l'immunisation (Voisin et coll., 1951; Tyler et coll., 1968; Pelletier et coll., 1981; Kohno et coll., 1983a). L'OAE se caractérise par : une congestion de l'espace interstitiel, une infiltration des leucocytes (Metchnikoff, 1900), une vacuolisation des cellules de Sertoli

(Voisin et coll., 1951). Les cellules de Leydig présentent peu de modification (Freund et coll., 1953). Par contre, les recherches ont montré la présence des anticorps anti-testiculaires dans le sérum des animaux malades (Tyler et coll., 1968) et une stérilité due à l'azoospermie avec retour de la fertilité 6 mois après sensibilisation (Laurence et coll., 1965). Pelletier et coll. (1981) ont montré chez les cobayes une destruction massive des cellules germinales testiculaires et une distension des jonctions des cellules de Sertoli, après immunisation avec des spermatozoïdes isologues en combinaison avec du l'adjuvant de Freund.

Les mêmes lésions ont été rapportées après l'injection d'antigènes testiculaires et de l'adjuvant de Freund, chez la souris (Pokorna et coll., 1963), et le rat (Freund et coll., 1954).

Andrada et coll. (1969) ont induit en 6 à 8 semaines l'OAE chez les singes, par injection d'homogénats testiculaires avec de l'adjuvant Freund. La présence d'adjuvant pour le déclenchement de l'OAE était essentielle (Boughton et Spector, 1963 ; Pelletier et coll., 1981), mais il est possible de provoquer une OAE sans adjuvant après une lésion thermique. Chez les cobayes (Fernandez-Collazo et coll., 1972) et les singes (Andrada et coll., 1970), des températures baises extrêmes induisent une OAE. Chez les souris, une OAE a été induite sans l'utilisation d'adjuvant (Sakamoto et coll., 1985; Itoh et coll., 1991).

Chez l'humain, l'OAE a été aussi provoquée chez des patients malades d'un carcinome de la prostate. Les patients ont reçu des homogénats testiculaires en même temps que de l'adjuvant Freund (Mancini et coll., 1965). Les résultats ont montré une congestion des tubules et une diminution du nombre de cellules germinales. En immunofluorescence, après l'incubation des coupes de testicule avec du sérum de

patients, une réaction positive a été observée au niveau des spermatozoïdes, des spermatides et de la membrane limitante de quelques tubules (Mancini et coll., 1965).

Plus récemment, une OAE qui conduit à une infertilité réversible a été induite chez le cobaye par administration d'une isoforme de la hyaluronidase testiculaire (Primakoff et coll., 1997; Tung et coll., 1997).

Orchite allergique expérimentale (OAE) qui résulte d'une manipulation du système immunitaire normal

Les manipulations du système immunitaire qui provoquent une orchite allergique expérimentale sont les suivantes :

- La thymectomie des souris – D3TX – âgées de 1 et 4 jours (Tung et coll., 1987) .
- Le transfert de cellules T CD5^{low} ou CD25^{low} à des souris athymiques ou à des souris sans cellules T (Sakaguchi et coll., 1995).
- Le traitement de souris néonatales avec de la cyclosporine A (Sakaguchi et Sakaguchi, 1990).
- Injection de cellules T sans RT-6 de rat à des rats athymiques (Mckeever et coll., 1990).
- L'injection de cellules T CD45RC^{high} de la rate à des rats athymiques (Fowell et coll., 1991).

1.3.1.2 Maladies auto-immunes provoquées par des virus

La chorioméningite lymphocytaire chez la souris

Le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) induit chez la souris une maladie aiguë avec un œdème facial et des convulsions. L'autopsie révèle des lésions de

nécrose diffuse avec des infiltrats cellulaires en special dans le système nerveux central (Laufer et coll., 1993).

D'autres maladies à virus persistants

Des phénomènes similaires au virus LCMV ont été observés chez d'autres espèces comme le cheval, les souris et les visons aléoutiens (Porter et coll., 1980).

1.3.2 Les maladies auto-immunes spontanées

Thyroïdite du poulet obèse

Les poulets présentent une thyroïdite très semblable aux thyroïdites auto-immunes retrouvées chez l'humain, caractérisées par une hypothyroïdie (Dietrich, 1989).

Le diabète spontané du rat

Certains rats (BB/W) souffrent d'un diabète spontané très semblable au diabète insulino-dépendant de l'humain (Ramanathan et Poussier, 2001).

Le lupus érythémateux murin

Les lignées pures de souris comme, NZB (néo-zélandaises-black) ou les lignées BW (croisement entre NZB et NZW/ néo-zélandaises-white) présentent une maladie très semblable au LED (lupus érythémateux disséminé) humain acquis de manière spontanée (Birmingham et coll., 2001).

Des modèles d'auto-immunité testiculaires

- *Les souris sans queue*

Un modèle d'auto-immunité a été réalisé en laboratoire chez les souris (Doohar et coll., 1981). Presque toutes les souris sans queue (T/tw 18) mâles et la plupart des femelles sont stériles. Environ 40% des souris mâles présentent une orchite dans un

testicule ou parfois les deux. Le reste (60%) semble avoir des testicules normaux. Les testicules des animaux orchitiques montrent des infiltrations avec des cellules mononuclées dans le tissu interstitiel, accompagnées d'une aspermatogenèse. L'aspermatogenèse observée est due à l'absence ou à un nombre réduit des cellules germinales (Dooher et coll., 1981).

- *Une lignée de chiens*

Une population de chiens qui appartenait à une unité de recherche de reproduction a généré 2 lignées partiellement pures dont l'une présentait deux MAI, la thyroïdite et l'orchite (Fritz et coll., 1976). L'analyse du sperme de ces chiens révélait une aspermie, ou un nombre réduit de spermatozoïdes. Les testicules de ces chiens présentaient des infiltrations lymphocytaires accompagnées ou non d'une aspermatogenèse. L'infiltration lymphocytaire était nodulaire ou diffuse dans le tissu interstitiel et autour ou dans les tubules séminifères. Dans les infiltrations nodulaires il y avait des centres germinatifs accompagnés d'une atrophie de l'épithélium séminifère. Ces modifications tubulaires étaient focales. Dans le cas d'une infiltration diffuse du testicule, les tubules séminifères ne renfermaient que des cellules de Sertoli (Fritz et coll., 1976).

- *Le modèle du singe*

Chez le singe rhesus macaques (*Macaca mulatta*), des études ont montré la présence d'une orchite dans 15% des cas étudiés et un même pourcentage d'aspermatogenèse. Au niveau de l'épididyme, il n'y avait pas de modification à signaler, en revanche des dépôts d'IgG et du complément étaient présents dans 45% des

testicules autour des membranes limitantes du capillaire et de l'épithélium épидидymaire (Tung et Alexander, 1980).

1.3.3. L'orchite dans les testicules ectopiques

Les testicules cryptorchidiques sont des testicules qui ne sont pas descendus dans le scrotum pendant le développement embryonnaire normal du système reproductif masculin. Les lésions trouvées dans ces testicules touchent toutes les structures testiculaires, et des auteurs affirment l'origine primaire (dysgénésie) de ces modifications alors que d'autres considèrent que ces modifications sont le résultat de la température plus élevée au niveau abdominal que dans le scrotum. (Nistal et coll., 1980; Nistal et coll., 1992). Chez l'humain, des études ont démontré la présence d'infiltrats lymphocytaires dans les tubules séminifères et dans le tissu interstitiel des testicules cryptorchidiques adultes (Nistal et coll., 2002). Ces infiltrats modifient la structure normale du testicule. L'orchite focale est le nom attribué à cette histopathologie (Honore, 1978). Dans l'orchite des testicules cryptorchidiques chez l'humain âgé, des cellules inflammatoires ont été trouvées en association avec la dégénérescence des tubules séminifères (Johnson et coll., 1984). L'incidence de l'orchite focale dans les testicules cryptorchidiques humains n'est pas connue et son rôle dans l'atrophie des tubules reste à établir. (Nistal et coll., 2002).

L'orchite des testicules ectopiques a été décrite aussi chez des modèles animaux expérimentaux. Cette orchite consiste en une accumulation des leucocytes, dont quelques éosinophiles, autour des tubules séminifères (Scott et coll., 1979). Les lésions, très similaires à celles retrouvées dans l'OAE, conduisaient à une hyalinisation plus ou moins complète des tubules séminifères (Padmanabhan et Singh, 1981).

1.3.4 Le modèle choisi

Malgré la présence et la production de facteurs immunosuppresseurs, le "privilège" immunitaire du testicule est parfois rompu.

Chez le vison (*Mustela vison*), l'infertilité peut être divisée en: infertilité *primaire* qui se traduit par une absence de puberté et en infertilité *secondaire*, qui se manifeste après une période variable de fertilité (Tung et coll., 1981; Pelletier, 1986; Pelletier, 1988). L'infertilité secondaire relève parfois d'une maladie auto-immune du testicule (Tung et coll., 1981).

Le modèle que nous avons choisi, le vison (*Mustela vison*), est un animal à activité reproductive saisonnière avec des variations importantes dans l'activité spermatogénétique chez l'adulte en fonction des saisons. Ces variations sont sous l'influence des cycles jour/nuit qui provoquent des modifications hormonales (Sundqvist et coll., 1988). Certains visons développent spontanément une orchite auto-immune.

L'activité spermatogénétique du vison est réduite durant les mois de mai à octobre (dans l'hémisphère Nord) et augmente vers le mois de novembre pour atteindre un maximum durant les mois de février et mars, en concomitance avec la période d'accouplement. Le vison constitue un modèle animal qui permet de comparer les aspects de la réinitiation de la spermatogenèse avec ceux de la régression testiculaire. L'infertilité qui se produit au cours de la régression testiculaire est accompagnée d'une baisse sensible des hormones (Kabbaj et coll., 2003). Tung et coll. (1984a) ont montré que, chez les visons à fourrure noire, 47% d'animaux de mois d'avril présentaient une orchite diffuse sévère et 25% présentaient une orchite focale. Les testicules des animaux ayant l'orchite diffuse indiquaient une infiltration massive des lymphocytes et des macrophages mais aussi la présence de dépôts IgG et C3 dans la membrane limitante des

tubules séminifères aspermatogénétiques. Ces réactions auto-immunes contre le testicule ont été observées après la saison d'accouplement en fin mars (Tung et coll., 1981; Sundqvist et coll., 1989) et coïncident avec le démantèlement de la BHT (Pelletier, 1986; Pelletier, 1988). Chez tous les phénotypes des visons, cette modification de la BHT est accompagnée de l'augmentation des titres d'auto-anticorps contre les cellules germinales (Tung et coll., 1984). Toutefois, ce sont surtout les visons à fourrure noire qui développent une OAI spontanée (20-30%) (Tung et coll., 1981; Tung et coll., 1984), et ceci démontre l'existence de mécanismes responsables pour la suppression du déclenchement d'OAI chez certains phénotypes.

1.4 Les mécanismes de déclenchement des MAI

1.4.1 Généralités sur les auto-anticorps

Les mécanismes directement responsables de lésions tissulaires au cours d'une MAI sont semblables à ceux impliqués dans le système de défense immunitaire. Des mécanismes lésionnels plus particuliers à l'auto-immunité peuvent être mis en jeu, médiés notamment par les auto-anticorps.

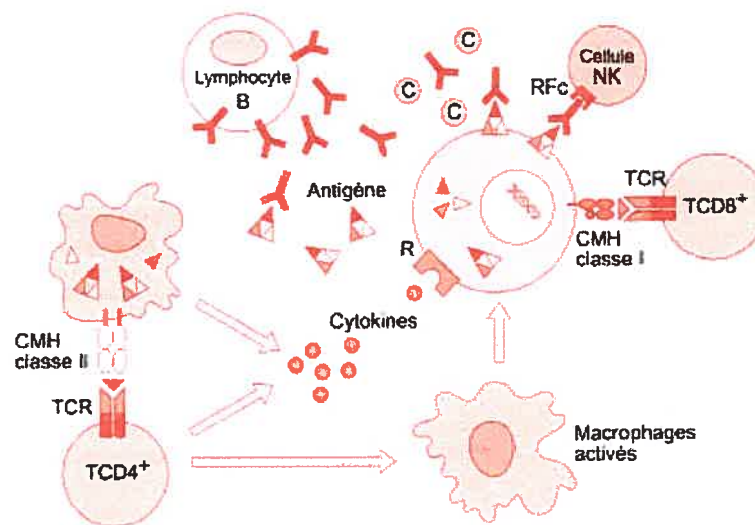


Schéma 3. Mécanismes effecteurs des réactions auto-immunes.

C, complément ; APC, cellule présentant l'antigène ; TCR, récepteur antigénique du lymphocyte ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; R, récepteur de cytokines ; R_{Fc}, récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines.

Les auto-anticorps sont des immunoglobulines qui interagissent avec des auto-antigènes d'un individu. Brickman et Shoenfeld (2001) ont présenté quelques aspects importants concernant l'interaction antigène - auto-anticorps :

- la molécule qui se lie à un anticorps n'est pas toujours celle qui induit la production de l'auto-anticorps
- la liaison antigène - auto-anticorps peut ou non conduire à une maladie
- des auto-anticorps peuvent être produits après des traumatismes, des infections, etc. mais la durée de vie de ces anticorps est réduite.

Les auto-anticorps sont classés en fonction de leur origine (George et coll., 1996):

- La plupart des auto-anticorps sont des IgM et une petite partie est constituée d'IgG, et d'IgA.
- Les auto-anticorps présentent une réactivité contre les antigènes du soi (auto) et contre les antigènes étrangers.
- Les auto-anticorps sont produits par les lymphocytes B CD5⁺ qui représentent entre 10-25 % des lymphocytes B circulants et spléniques.

Les immunoglobulines de type M représentent des anticorps de faible affinité pour les auto-antigènes et leur production constitue la première étape dans la réponse immunitaire (Casali et Notkins, 1989). Dans la deuxième étape, les cellules B produisent

l'IgG. La production des IgG commence très tôt et leur augmentation se fait une fois que la production des IgM a cessé (Hodgkin et Basten, 1995).

1.4.2 Les sous-classes des anticorps de type IgG

Les manifestations des maladies auto-immunes dépendent de la classe d'IgG impliquée. Ces classes d'IgG ont des actions différentes. Les IgG1 et IgG3 peuvent activer le complément d'une manière plus efficace que l'IgG2 alors que l'IgG4 n'a pas d'effet sur le complément (Michaelson, et coll., 1991). Une classification des MAI a permis d'établir les associations entre le type d'IgG produit et la réponse immunitaire qu'il induit. Les IgG1 et IgG3 sont impliquées dans la réponse contre les antigènes protéiques, l'IgG2 est trouvée après une immunisation par des polysaccharides, et l'IgG4 apparaît après une infection parasitaire (Jefferis et Kumararatne, 1990).

Maladies	Cibles d'auto-anticorps	Classe d'IgG	Références
Myasthénie grave	Récepteur d'acétylcholine	IgG1 +IgG3	Nielsen et coll., 1985
Myxedema	Thyroglobuline	IgG1+IgG4	Barra et coll.,1986
Infertilité	Spermatozoïdes	IgG1+IgG3	Haas et D'Cruz, 1991

1.4.3 Classes des anticorps de type IgA

Les IgA représentent 60% des immunoglobulines synthétisées, mais leur rôle est essentiellement au niveau des sécrétions des muqueuses et des glandes exocrines (Hexham et coll., 1999). Il existe deux classes d'IgA, l'IgA1 et l'IgA2. Des expériences

pour établir l'origine des IgA ont démontré sa synthèse au niveau local, et d'une petite partie provenant de la grande circulation (Mestecky et coll., 1991). Le plasma séminal contient des IgA, des IgG et des IgM qui sont produits dans le tractus génital masculin (Fowler et Mariano, 1983; Friberg, 1980). Certaines études ont rapporté qu'il y a 25 fois plus d'IgA que d'IgG dans le fluide séminal, la même valeur que dans d'autres sécrétions externes (Tjokronegoro et Sirisinha 1974), alors qu'une autre équipe de chercheurs a rapporté plus d'IgG que d'IgA (Mestecky et Fultz, 1999). Au niveau de l'épididyme normal, de la vésicule séminale, ou de la prostate, aucune étude n'a démontré la présence d'IgA (P. Brandtzaeg et coll., 1993).

Certains modèles animaux ont permis d'établir qu'il existe une liaison entre le système génital masculin et le système lymphatique associé à la muqueuse intestinale (gut-associated lymphoid tissue- GALT) (Clifton et coll., 1992). Des rats immunisés par diverses voies- intratesticulaire, intrapéritonéale- ont donné diverses réponses immunitaires locales intestinales et/ou génitales (testiculaires). Ces expériences suggèrent que GALT contribue à la réponse immunitaire IgA spécifique dans le tractus génital masculin.

1.4.4 Classe des anticorps de type IgD

L'IgD se trouve dans le sérum dans une concentration moins élevée que celle des IgG, IgA, l'IgM mais plus élevée que celle de l'IgE. Le rôle de l'IgD sérique n'est pas encore bien précisé, alors que plusieurs rôles ont été proposés pour l'IgD localisée sur les membranes des lymphocytes B (Blattner et Tucker, 1984).

L'IgD représente 0.25% de toutes les Ig sériques et possède une durée de vie de 2,8 jours (Rogentine et coll., 1966), comme l'IgE (Waldmann et coll., 1976). L'IgD

membranaire est le principal récepteur antigénique de surface des lymphocytes B périphériques, où elle est co-exprimée avec l'IgM. L'IgD semble être impliquée dans la génération et le maintien de la population de lymphocytes B avec mémoire et aussi dans l'induction de la tolérance des lymphocytes B (Cambier et coll., 1987).

Les signaux envoyés par l'IgD et les IgM à l'intérieur des lymphocytes B sont les mêmes, la différence réside dans la cinétique de la transmission des signaux (Tisch et coll., 1988). Après le contact des lymphocytes T avec des antigènes liés à l'IgD monomérique, 10 à 15 % de lymphocytes T périphériques (CD4+ et CD8+), peuvent présenter des récepteurs aux IgD (Coico et coll., 1988), et ces lymphocytes T, peuvent se lier à des lymphocytes B pendant l'étape de la présentation d'antigènes aux lymphocytes B (Wu et coll., 1999).

Il n'y a pas de corrélation entre le niveau d'IgD sérique et la quantité d'IgD exprimée par les lymphocytes (Josephs et Buckley, 1980). Par contre, une corrélation existerait entre les hormones sexuelles féminines et la production d'IgD. Les femelles présentent plus d'IgD que les mâles (Dunnette et coll., 1977). D'autres études montrent moins d'IgD sériques chez les femelles que chez les mâles (Stoica et coll., 1980) ou bien que le sexe n'a aucun impact (Zegers et coll., 1975).

1.4.5 Classe des anticorps de type IgE

Les IgE constituent une fraction très réduite des immunoglobulines sériques. Ces immunoglobulines exercent leurs fonctions biologiques par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Il existe deux types de récepteurs pour les IgE : FcεRI et FcεRII (Sutton et coll., 2000). Le mieux caractérisé, le FcεRI, se trouve localisé sur les mastocytes et les basophiles et il fixe exclusivement l'IgE monomériques. Le FcεRII (CD23) se trouve sur

les cellules présentatrices d'antigènes (Mudde et coll., 1995) et les lymphocytes B, et il possède une faible affinité pour l'IgE. Cette immunoglobuline joue un rôle central dans les maladies allergiques dans lesquelles existe une production anormale d'anticorps de classe IgE (Vercelli, 2001).

Dans le système génital masculin, des niveaux élevés d'IgE ont été associés à l'infertilité (Mathur et coll., 1981), mais jusqu'à présent il n'y a aucune évidence que l'infertilité d'origine immunologique serait le résultat de la production d'anticorps anti-sperme spécifiques IgE.

Chez les femmes, une réponse allergique contre les protéines du plasma séminal peut apparaître au niveau du vagin avec une évolution vers une vulvo-vaginite chronique (Chang, 1976). Les tests dermatologiques contre les antigènes ont démontré que ces réactions se font contre les protéines séminales et non contre les spermatozoïdes (Halpren et coll., 1967).

1.4.6 Auto-anticorps anti-sperme (AAS)

La formation d'auto-anticorps contre les spermatozoïdes chez les mâles d'après la théorie de Witkin (Witkin, 1988) (la plus complexe) a trois mécanismes :

- une diminution de la quantité ou de l'activité des cellules immuno-suppressives qui se retrouvent dans le tractus génital masculin
- une diminution ou une absence des facteurs stimulants pour les cellules immuno-suppressives
- Un changement dans l'antigénicité du sperme ce qui aurait comme conséquence une suppression inadéquate de la réponse immune contre le sperme (Witkin, 1988).

En plus de ces mécanismes, n'importe quelle agression qui a pour résultat une inoculation avec des antigènes spermatiques, peut annuler les mécanismes d'immunosuppression.

On retrouve le plus souvent une augmentation des anticorps anti-sperme après la vasectomie, la torsion testiculaire, le cancer du testicule, l'infection (D'Cruz et coll., 1991), le varicocèle, et la biopsie testiculaire (Haas, 1987a). La vasectomie peut être considérée comme un modèle expérimental pour l'auto-immunisation antispermatique (Samuel et Rose, 1980 ; Flickinger et coll., 1990).

Parce que la plupart des malades ne présentent pas ces événements, on a présumé que la présence d'auto-anticorps anti-sperme, serait une réponse d'une réaction croisée contre des antigènes de micro-organismes ou une réaction contre les antigènes spermatiques, qui inhiberaient les mécanismes immunosuppresseurs (Haas, 1996).

Les anticorps anti-sperme sont considérés comme des "anticorps naturels" dont le rôle biologique reste inconnu. Des travaux suggèrent qu'ils agissent comme "anticorps primitifs" dans la première ligne de la défense immunologique (Haas, 1996).

En plus des mécanismes de barrière qui limitent les contacts des antigènes spermatiques avec le système immunitaire masculin, le fluide séminal contient lui-même des facteurs immunosuppresseurs. Le plasma séminal inhibe la capacité des lymphocytes T et B à proliférer après le contact avec des facteurs mitogènes (James et Szymaniec, 1985), et inhibe la phagocytose des macrophages, et des polymorphonucléaires (PMN) (Witkin, 1986). De plus, des inhibiteurs (CD46 et CD59) qui interfèrent avec la voie d'activation du complément ont été mis en évidence dans le plasma séminal (Seya et coll., 1993).

Des récepteurs pour l'IgG (FcγRIII) ont été détectés dans le plasma sérial humain ce qui suggère que ces récepteurs soient impliqués dans le blocage des auto-anticorps contre les spermatozoïdes et préviennent la destruction des spermatozoïdes et une réponse immunitaire (Thaler et coll., 1989). Les antigènes du spermatozoïde semblent être eux-mêmes immunosuppresseurs parce que chez les animaux pré-exposés au sperme, sans adjuvant, l'apparition d'une OEA est inhibée (Hurtenbach et Shearer, 1982).

Les cellules T immuno-suppressives ont été décrites dans le tissu interstitiel du testicule et de l'épididyme normal (El-Demiry et coll., 1987; El-Demiry et James, 1988). Un rapport T-suppresseur/T-auxiliaire élevé dans le sperme démontre une prévalence de l'activité immuno-suppressive (Witkin, 1988). Quoique les lymphocytes T prédominent dans le tissu interstitiel du système génital masculin, les lymphocytes qui adhèrent à l'épithélium dans le système génital sont les lymphocytes T immuno-suppresseurs (El-Demiry et coll., 1985). Un changement du rapport T-suppresseur/T-cytotoxique suggère que, quand les lymphocytes T cytotoxique augmentent dans le système génital masculin, une réponse immunitaire contre le sperme peut apparaître (Witkin et Goldstein, 1988), mais il y a des exceptions à cette théorie (Barratt et coll., 1990).

1.4.7 Anticorps anti-sperme (AAS) chez les femelles

Il ne semble pas que le tractus génital féminin manquerait d'effecteurs et d'affecteurs immuns après inoculation locale de sperme. Des études ont montré que les antigènes placés dans le vagin, le cervix ou l'utérus, peuvent induire une réponse immune locale ou systémique (Bulmer et Johnson, 1985; Khong, 1987). La caractéristique de la réponse immune dépend plus de la nature de l'antigène utilisé que

du site d'inoculation. En général, les antigènes spermatiques appliqués dans le tractus génital femelle vont induire une réponse locale, médiée par l'IgA alors que l'inoculation systémique induira la stimulation d'IgG circulante ou d'IgM. (Szekeres-Bartho et coll., 1989).

Chez la plupart des femmes, la formation d'anticorps anti-sperme ne peut pas être expliquée par un manque d'immunogénicité du sperme, ni par une déficience du tractus génital féminin à développer une réponse immune aux antigènes locaux. Une incidence augmentée des anticorps anti-sperme a été observée chez les « prostituées », mais cette présence a été corrélée avec la quantité et la variété des antigènes spermatiques (Tabibzadeh et Satyaswaroop, 1989). Il reste à établir si cette augmentation est consécutive à une inoculation massive des antigènes spermatiques et du plasma séminal ou à des infections vénériennes.

Mais chez la plupart des femmes, l'absence ou la minimisation d'une réponse immunitaire contre les antigènes des spermatozoïdes -les anticorps antisperme- après l'accouplement a permis de décrire l'existence de plusieurs mécanismes (Witkin, 1988):

- une absorption réduite des antigènes du spermatozoïde dans le vagin à cause de la présence d'un épithélium pavimenteux squameux
- une réduction rapide de la charge antigénique après le coït
- une suppression active de la réponse immune par les spermatozoïdes eux-mêmes via l'activation des lymphocytes T CD8+
- l'adsorption des AAS par les leucocytes due à une réactivité croisée entre les spermatozoïdes et les lymphocytes
- la présence de facteurs immunosuppresseurs dans le plasma séminal

Les facteurs qui peuvent prédisposer à une réponse aux AAS semblent être liés à :

- l'incapacité du sperme à activer chez la femme les lymphocytes T suppresseurs.
- Une réduction idiopathique du nombre de lymphocytes suppresseurs dans le cervix.
- Un potentiel accru pour une réponse immune chez les femmes qui ont des partenaires positifs aux AAS.

En condition normale, le dépôt du sperme dans le tractus génital femelle est suivi d'une infiltration de leucocytes attirés par des facteurs chémotactiques contenus dans le plasma séminal (Anderson et Hill, 1989).

Une augmentation de certaines populations de leucocytes a été observée chez les femmes infertiles ou chez les femmes présentant une endométriose (Stewart et coll., 1992). Les leucocytes séquestrés dans le tractus génital pourraient sécréter une grande variété de substances (lymphokines, monokines) qui peuvent réduire la fertilité et la mobilité du sperme. De plus, il est possible que la libération de prostaglandine par les macrophages joue un rôle dans la modulation négative de la réponse immune contre les antigènes spermatiques (Stewart et coll., 1992).

Les effets des anticorps anti-sperme chez les femmes se résument à (Dondero et coll., 1993):

- une diminution de la mobilité du sperme jusqu'au phénomène d'agglutination des spermatozoïdes
- une réduction de la capacité des spermatozoïdes à traverser les sécrétions génitales féminines

- un effet négatif des anticorps anti-sperme au moment de la fusion des gamètes

La pathophysiologie de l'infertilité chez les femmes médiée par les anticorps anti-sperme

La présence des auto-anticorps anti-sperme (AAS) chez la femme peut être le résultat d'une anomalie dans le réseau immunitaire idiotype/anti-idiotype (Carron et coll., 1989). Ce réseau représente la base du contrôle du système immunitaire dans l'organisme. En l'absence de ce réseau, il y aurait une croissance incontrôlée d'anticorps après chaque exposition à un antigène étranger. Une fois que l'antigène produit une réponse humorale, le nouvel anticorps devient pour l'hôte un antigène étranger qui pourrait induire une réponse humorale secondaire (anti-idiotype). Cette deuxième réponse réduira et va contrôler la réponse primaire (idiotype). Cette formation séquentielle, d'anticorps idiotype/anti-idiotype, prévient la production excessive d'anticorps et de cellules productrices d'anticorps (Carron et coll., 1989). Si la production d'AAS est normalement réduite à cause d'une très forte réponse anti-idiotype, la régulation négative du réseau immunitaire pourrait avoir pour conséquence la formation d'anticorps anti-sperme en quantité suffisante pour réduire l'efficacité de la fécondation.

Le sérum des femmes fertiles exposées au sperme possède suffisamment d'anticorps anti-idiotypes capables de neutraliser l'activité des AAS (Naz et coll., 1993). Les anticorps anti-idiotypes manquent dans le sérum des femmes vierges qui n'ont pas été exposées au sperme (Naz et coll., 1993). Une variation entre le sperme viable et non viable a été rapportée (Vogelpoel et coll., 1987). Le sperme non-viable est capable de se lier aux IgG et au complément (C), alors que le sperme viable n'en est pas capable.

Les immunoglobulines associées aux spermatozoïdes pourraient influencer la réponse du tractus génital féminin contre les antigènes spermatiques potentiellement étrangers. Il serait difficile de démontrer qu'une femme possède des AAS contre le sperme de son partenaire, qui lui même est aussi AAS positif, parce que les immunoglobulines qui se trouvent sur le sperme sont difficilement différenciables des autres anticorps appartenant à la femme et qui apparaissent sur le sperme (Mathur et coll., 1987).

1.5 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B assurent l'immunité humorale, responsable des réactions d'hypersensibilité immédiate (anaphylaxie), de la cytolyse en présence du complément et du phénomène d'Arthus. Dans l'auto-immunité, ils jouent un rôle crucial et pas seulement à cause de la sécrétion d'auto-anticorps (Zouali, 2002). Ces cellules expriment la molécule CD5, mais aussi des IgM de surface, et en plus certaines cellules B matures présentent de faibles quantités d'IgD.

Les cellules B immatures qui reconnaissent des antigènes alors qu'elles sont encore dans la moelle osseuse sont empêchées de se développer et de produire des anticorps qui se lieraient aux cellules ou aux tissus hôtes. Des expériences (Nemazee et Burki, 1989) avec des souris transgéniques ont identifié deux mécanismes différents qui assurent la tolérance des cellules B immatures aux auto-antigènes. Un mécanisme actif dans le cas des antigènes multivalents (les cellules qui présentent plusieurs copies des molécules du CMH à leur surface), et un deuxième mécanisme qui agit dans le cas des antigènes de faible valence (des protéines solubles) (Nemazee et Burki, 1989).

Les cellules B matures qui peuvent reconnaître des antigènes vont être inactivées par une autre série de mécanismes (Russell et coll., 1991). Les cellules B auto-réactives peuvent se différencier même si les auto-antigènes ne sont pas présents dans la moelle osseuse. Ces cellules seront éliminées à cause de l'absence de signaux additionnels délivrés par les cellules T auxiliaires. Aussi la présence de protéines solubles en abondance peut induire un effet d'anergie dans les cellules B matures (Russell et coll., 1991). C'est seulement lorsqu'une cellule B reconnaît un antigène et reçoit des signaux additionnels qu'elle commence à synthétiser des anticorps (Cooke et coll., 1994).

La population des cellules B peut être divisée en deux groupes, en fonction de la présence ou de l'absence du CD5 (Lydyard et coll., 1999) : les cellules B CD5+, et les cellules CD5-. Des études utilisant le modèle de souris transgéniques HEL-Ig (hen egg lysozyme/immunoglobuline) ont permis d'établir que les lymphocytes B CD5+ sont responsables du maintien de la tolérance pour les auto-antigènes (Cooke et coll., 1994; Hippen et coll., 2000).

La lignée des souris MRL/lpr présente des manifestations de maladies très semblables au lupus érythémateux disséminé chez l'humain accompagnée d'une néphrite, d'une vasculite, et d'une sialadénite (Theofilopoulos et Dixon, 1985). Chez les mêmes souris, dépourvues des cellules B, il n'y a pas de dépôts immuns au niveau rénal ni d'infiltrats cellulaires (Shlomchik et coll., 1994). Les souris MRL/lpr possèdent des lymphocytes B qui expriment des Ig de surface mais ne présentent pas d'anticorps circulants développent une néphrite accompagnée d'un infiltrat cellulaire (Chan et coll., 1999). L'apparition d'une néphrite chez les souris MRL/lpr nécessite la présence des lymphocytes B mais non d'anticorps.

D'autres molécules de surface sont impliquées et jouent un rôle dans le maintien de la tolérance: le CD19 (Pesando et coll., 1989), le CD22 (Duodi et coll., 1995) et le CD72 (Adachi et coll., 2000).

Le nombre et la production des cellules B sont en relation avec les niveaux d'hormones androgènes et oestrogènes (Viselli et coll., 1997; Ellis, et coll., 2001). Les résultats démontrent qu'après castration, le nombre de cellules B à la périphérie augmente, alors que celui des cellules T, NK (natural killer), et des granulocytes reste inchangé chez les souris mâles (Ellis, et coll., 2001).

Au niveau testiculaire comme dans d'autres tissus, les lymphocytes B sont normalement en nombre réduit (Pöllänen et Niemi, 1987; Wang et coll., 1994). Au niveau épидидymaire, les résultats démontrent des variations. Une équipe a mis en évidence un nombre réduit de cellules B – moins 1% des cellules immunes-(Serre et Robaire, 1999) dans l'épithélium épидидymaire chez les rats jeunes et environ 5% chez les rats plus âgés. Une autre équipe (Flickinger et coll., 1997) n'a pas pu mettre en évidence les cellules B au niveau de l'épididyme.

1.6 Les complexes immuns

Les complexes immuns (CI) résultent de l'interaction d'un auto-antigène avec un auto-anticorps et ces CI peuvent être formés à distance d'un site où ils vont se déposer, ou au site même. Les CI sont formés par une combinaison d'antigènes, d'anticorps et de complément. Ce dernier joue un rôle important dans le métabolisme de CI (Schifferli et coll., 1986). Les CI formés modifient la perméabilité locale des membranes biologiques et activent les protéines du système du complément qui ensuite vont éliminer ces CI d'une manière efficace sans provoquer de lésions tissulaires. Ce phénomène est

accompagné aussi d'un recrutement local des cellules qui participent à une réaction inflammatoire. Cette réaction inflammatoire est responsable secondairement des lésions locales (Boitard, 1990)

Un des facteurs qui influencent la pathogénicité des CI réside dans la taille de ces CI. (Johnson et coll., 1987) Les CI de grande taille qui comprennent des antigènes multivalents sont moins pathogènes, étant plus facilement détruits par les cellules phagocytaires. Les CI de taille moyenne, ou de petite taille sont plus pathogènes (circulent plus facilement, traversent les membranes basales, forment des dépôts extravasculaires au niveau des tissus). Un autre facteur est la nature de l'auto-anticorps, par exemple les IgG et/ou les IgM sont susceptibles d'inhiber la précipitation des complexes alors que les IgA n'ont pas cet effet (Johnson et coll., 1987).

1.6.1 Les complexes immuns au niveau testiculaire

Au niveau testiculaire, la mise en évidence des CI comporte des problèmes techniques. Les cryoséctions augmentent les artéfacts qui vont interférer avec l'interprétation des résultats. Mais la difficulté majeure est l'auto-fluorescence du collagène, une coloration positive des cellules myoïdes et des cellules germinales, spécialement des spermatogonies, qui sont difficiles à séparer des CI qui se trouvent dans la membrane limitante (MB) (Salomon et Hedinger, 1982).

Chez les lapins vasectomisés (Bigazzi, et coll., 1976), une réponse humorale contre les antigènes spermatiques apparaît un an après la vasectomie et l'orchite est accompagnée d'une atrophie qui varie d'un tubule séminifère à l'autre. La réponse cellulaire se caractérise par un nombre réduit de cellules leucocytaires infiltrantes. En utilisant l'immunofluorescence, des antigènes spermatiques, des IgG et la fraction C3 du

complément ont été localisés dans la tunica propria des tubules séminifères, et ces complexes semblent avoir été formés in situ (Bigazzi, et coll., 1976). Chez l'humain infertile, les résultats obtenus sur les dépôts de complexes immuns au niveau des MB testiculaires, démontrent une similitude avec les résultats de lapins orchitiques (Tung et Woodroffe, 1978; Lehmann et coll., 1987).

Chez les singes – *Rhesus macaques* - des dépôts immuns ont été signalés dans les tubes efférents 1 à 12 ans après la vasectomie (Marsh et Alexander, 1982). Dans ces tubes, un marquage positif pour IgG et C3 a été mis en évidence dans la MB.

Les dépôts dans le rete testis et le ductus efferens n'ont pas la même signification pathologique que dans le testicule et la présence des dépôts immuns semble être un processus physiologique (Salomon et Hedinger, 1982). Dans le rete testis, la BHT est moins imperméable que dans les tubules séminifères (Suzuki et Nagano, 1978) et elle présente une perméabilité aux anticorps (Tung et coll., 1971). Chez les souris, 7 jours après l'immunisation avec des antigènes testiculaires, les dépôts des IgG ont été observés à l'extérieur de la BHT. Ces dépôts sont apparus avant le déclenchement de l'orchite (Yule et coll., 1988). L'apparition de dépôts immuns a été transférée chez les souris normales par inoculation de sérum de souris orchitiques. Les mêmes dépôts d'IgG ont été signalés après une immunisation incomplète (homogénat testiculaire seulement), sans OAE (Kohno et coll., 1983b). Ceci montre que les dépôts immuns ne sont pas suffisants pour déclencher à eux seuls une OAE (Tung et coll., 1970).

Dans les souris Brown-Norway (BN), des complexes immuns se développent d'une manière spontanée entre la lame basale des tubules séminifères et les cellules myoïdes testiculaires (Furbeth et coll., 1989). Ces complexes immuns apparaissent entre les 8èmes et 12èmes semaines de la vie, augmentent en quantité jusqu'à la 30ème

semaine et diminuent ensuite. Après la 20ème semaine, 15% des animaux montrent une destruction de l'épithélium germinale accompagnée d'une infiltration des lymphocytes. L'étape finale, qui ne montre au début aucun signe d'inflammation, est caractérisée par une atrophie tubulaire diffuse. Cependant, jusqu'à la soixante-dixième semaine de la vie, 85% des animaux avec les complexes immuns ne montrent aucun changement pathologique (Furbeth et coll., 1989).

La présence d'IgG et de C3 dans le cytoplasme des cellules myoïdes a été observée au cours de l'OAE, mais la fonction phagocytaire de ces cellules n'a pu être démontrée (Salomon et Hedinger, 1982).

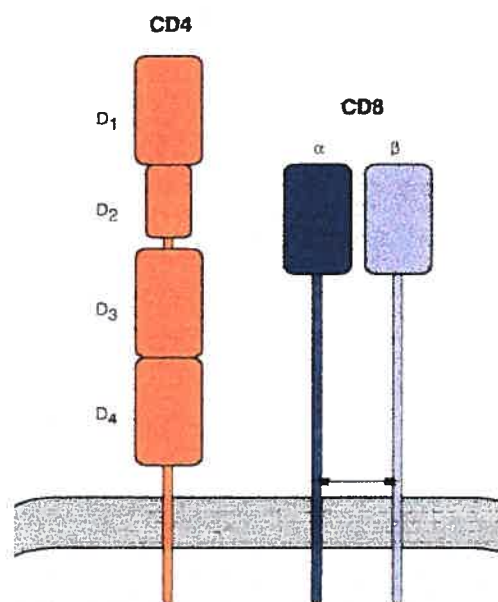
1.7 Les lymphocytes T

Le système immunitaire a développé une stratégie complexe pour maintenir la tolérance et pour prévenir une maladie auto-immune. Une réponse immunitaire implique une réaction de la part des cellules lymphocytaires T. Les lymphocytes T peuvent être subdivisés en deux grandes sous-populations selon qu'ils expriment la molécule CD4 ou CD8 (Rock, 1996; Gueze, 1998). À l'état normal, celles-ci ne sont jamais co-exprimées à la surface des lymphocytes T matures, sauf pendant leur différenciation. Les molécules CD4 et CD8 représentent des co-activateurs importants des lymphocytes T. Ce sont des molécules qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines.

En conditions normales, on trouve un nombre réduit de cellules lymphocytaires T dans le testicule et dans le tractus reproductif masculin chez l'humain (Yeung, et coll., 1994), le rat (Dym et Romrell, 1975; Flickinger, 1997; Serre et Robaire, 1997) et la souris (Nashan et coll., 1995). Sur ces cellules T testiculaires, peu de choses sont connues (Itoh et coll., 1995a; Hedger, 1997; Tompinks et coll., 1998; Hedger, 2002).

1.7.1 Les lymphocytes T CD4+

La molécule CD4 présente une seule chaîne glycoprotéique de 55 kDa. (Rudd et coll. 1988); elle est impliquée dans la reconnaissance de l'antigène avec l'aide des molécules de classe II du CMH (Littman, 1987). Cette molécule agit comme récepteur de surface pour toutes les cellules T auxiliaires (Th) (Parnes, 1989; Serre et Robaire, 1997).



Janeway et Travers, Imm., 1992

Schéma 4. La structure des molécules CD4 et CD8.

D1, D2, D3, D4, les domaines du CD4; α et β , les chaînes du CD8.

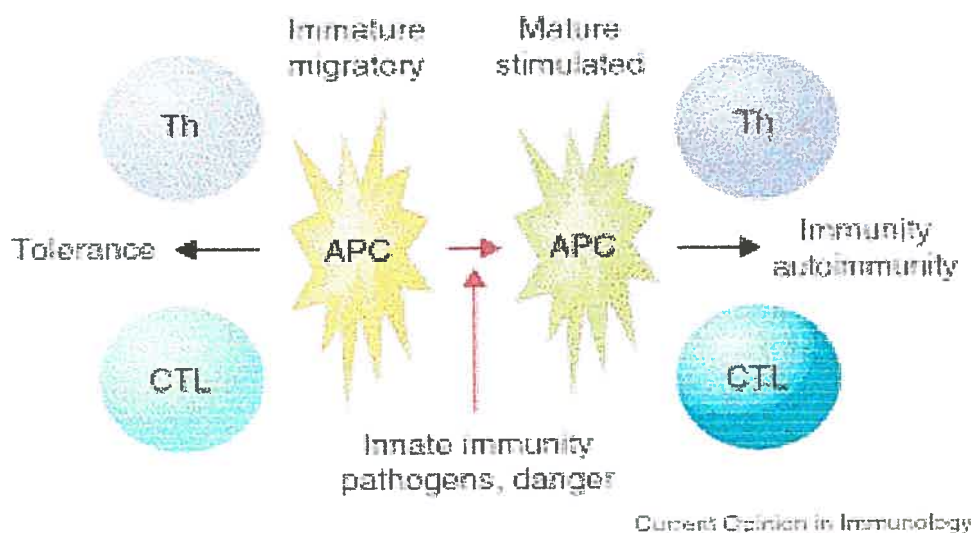
Chez les humains, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les éosinophiles et les cellules réticulo-endothéliales expriment le CD4, mais en faible densité en comparaison avec les cellules T (Scoazec et Feldmann, 1990). La molécule CD4 possède quatre domaines Ig-like extracellulaires tandis que le CD8 n'en possède qu'un seul à l'extrémité d'une longue tige protéique, fortement glycosylée et ayant la

rigidité de la mucine (Littman, 1996) (Schéma 4). La molécule de CD4 présente 4 domaines extracellulaires, une partie transmembranaire, et une queue cytoplasmique qui est très conservée chez les différentes espèces. La structure en 3-D des 2 premiers domaines extracellulaires de la molécule a été caractérisée par cristallographie en rayon X. Alors que le domaine extracellulaire amino-terminal est similaire à la structure d'une immunoglobuline, le deuxième domaine est semblable à l'immunoglobuline avec quelques différences dans les deux domaines C et V (Moldovan et coll., 2002).

Les deux premiers domaines du CD4 réalisent une tige rigide qui est liée au domaine carboxi-terminal de la molécule, par une liaison flexible (Doyle and Strominger, 1987). Le ligand physiologique du CD4 est représenté par les molécules du CMH de classe II qui se trouvent sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (Doyle and Strominger, 1987). Dans les cellules T, le CD4 présente un site d'ancrage entre la cellule présentatrice d'antigène et la cellule T et pendant l'étape de présentation d'antigène, il stabilise l'interaction entre le CMH de classe II et le récepteur de la cellule T (TCR). En plus, la partie intracellulaire de la molécule du CD4 est associée à une protéine tyrosine kinase $p56^{lck}$ (Veillette et coll., 1988). Pendant l'étape de reconnaissance de l'antigène, le CD4 et le complexe CD3 / TCR, qui est associé à la protéine kinase $p59^{fym}$, agissent d'une manière synergique en générant des signaux d'activation.

Les deux enzymes $p56^{lck}$ et $p59^{fym}$ phosphorylent les résidus tyrosines des chaînes epsilon et gamma du CD3 qui à leur tour activent la tyrosine kinase ZAP-70 le médiateur-clé de l'activation des cellules T (Sakihama et coll., 1995). Une étape importante est la présentation de l'(auto)antigène à la cellule T réactive par les cellules présentatrices d'antigènes. Cette présentation peut induire la tolérance des cellules T par

délétion ou par anergie (Heath et Carbone, 2001). L'hypothèse actuelle est que les CPA restent immatures et qu'elles préfèrent tolérer plutôt que d'activer les cellules auto-réactives (Steinman et coll., 2000). Donc, une manière de briser la tolérance et d'amorcer une réponse auto-immune serait de causer une interaction entre les cellules T périphériques et les signaux des CPA matures.



Ohashi et DeFranco, 2002

Schéma 5. Activation des lymphocytes T par les APC matures stimulées.

APC, cellule présentant l'antigène; CTL, cellules T cytotoxiques; Th, cellule T auxiliaire.

Plusieurs études ont démontré l'implication des cellules T dans les maladies auto-immunes. Dans ces expériences des lymphocytes T sont transférés chez les animaux. Les cellules T activées *in vitro* induisent une orchite sévère et une vaséite chez les souris (Mahi-Brown et coll., 1987; Itoh et coll., 1992; Musaka et coll., 1992). D'une manière similaire, des cellules T provenant des souris immunisées avec le peptide ZP3, oophorotogénique transfèrent l'oophorite chez les nouveau-nés (Rhim et coll., 1992).

Dans les deux cas, les cellules CD4⁺ sont les responsables de la transmission de la maladie (Mahi-Brown et coll., 1987; Mahi-Brown et Tung, 1989; Itoh et coll., 1991; Rhim et coll., 1992). L'importance des cellules CD4⁺ dans ce transfert a été démontrée par les études qui utilisaient des lignées et des clones de CD4⁺ (Rhim et coll., 1992; Yule et coll., 1993). Les lymphocytes T CD4⁺ exercent leurs activités grâce à l'expression de cytokines ou de molécules apparentées.

Quand elles sont activées, les cellules Th1 CD4⁺ produisent l'IL-2, l'IL-12 et l'interféron γ (IFN- γ). L'IL-4 est caractéristique d'une sous-population des cellules T auxiliaires, les cellules Th2 CD4⁺. Les cellules Th1 activent les macrophages et sembleraient répondre particulièrement bien aux antigènes présentés par ces cellules (Romagnani, 1992). A l'opposé, les cellules Th2 stimulent la production des éosinophiles et des mastocytes, et augmentent la synthèse d'anticorps, en particulier de classe IgE, grâce à la production d'IL-4. Les cellules Th2 répondent bien aux antigènes présentés par les cellules B (Unanue, 1992; Rook et coll., 1994).

L'IFN- γ des cellules Th1 inhibe la prolifération des cellules Th2, tandis que l'IL-10 des cellules Th2 bloque la production de cytokines par les Th1 (Romagnani, 1992).

Parce que les cellules CD4⁺ jouent un rôle important dans la pathogenèse des maladies auto-immunes, des interventions thérapeutiques contre les cellules T ont été introduites (Schultze-Koops et Lipsky, 2000). Les clones CD4⁺ qui agissent contre le peptide ZP3 en produisant l'oophorite après le transfert ; ils sont responsables de la sécrétion d'IL-2, et d'IFN- γ , mais ils ne produisent pas d'IL-4 et le transfert de la maladie est bloquée par l'anticorps contre TNF α (Rhim et coll., 1992; Luo et coll., 1993). Dans le cas de l'orchite auto-immune, l'utilisation d'anticorps anti-TNF peut

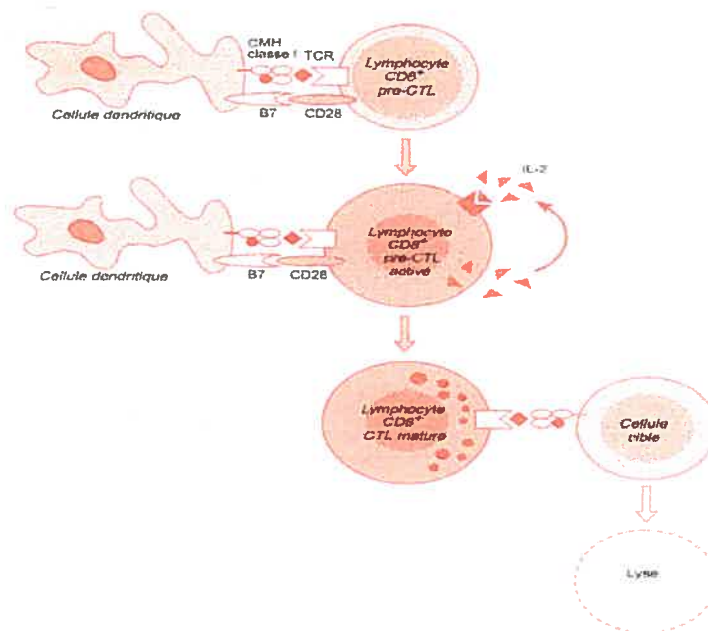
atténuer d'une manière significative la gravité de la maladie par la neutralisation de TNF (Yule et coll., 1993).

1.7.2 Les lymphocytes T CD8+

La molécule CD8 est un hétérodimère composé des chaînes α et β reliées par un pont disulfure, chacune contenant un seul domaine de type immunoglobuline fixé à la membrane par un segment de chaîne polypeptidique qui semble avoir une conformation étirée (Janeway, 1998 ; Medzhitov, 2002). La molécule CD8 est spécifique aux cellules lymphocytaires cytotoxiques (Serre et Robaire, 1997).

La molécule CD8+ entre en contact avec les protéines du CMH de classe I où elle se lie faiblement au domaine α_3 des molécules du CMH. La même molécule CD8 se lie au complexe *peptide* : CMH de classe I et entre en contact avec le TCR. À la queue cytoplasmique au CD8 se lie *Lck*, une enzyme qui déclenche l'activation de la cellule T CD8+ (Janeway et Travers, 1996).

La différenciation des lymphocytes T CD8+ nécessite la présence de certaines cytokines (en particulier de l'IL-2) dans le milieu, et après l'interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules T CD8+ augmentent le nombre de récepteurs à l'IL-2 et en même temps la production autocrine de cette IL.



Bach JF, Imm. 1999

Schéma 6. Différenciation des cellules T CD8+ cytotoxiques.
CTL, cellules T cytotoxiques; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR, récepteur antigénique du lymphocyte.

Au niveau cellulaire, l'activité cytotoxique des lymphocytes T peut se subdiviser en trois étapes :

- La reconnaissance de la cible par l'interaction du récepteur avec son antigène qui se trouve à la surface du lymphocyte T cytotoxique, et du peptide antigénique présenté par les molécules du CMH de classe I à la surface de la cellule cible.
- La cellule cytotoxique réalise une lésion irréversible de la cellule cible qui conduira à la dernière phase de la cytolyse.
- L'action cytotoxique se réalise par la libération du contenu enzymatique des granules lysosomiaux. Les deux principales enzymes sont les granzymes A et B (Atkinson et Bleackley, 1995).

Les cellules T, CD8⁺ jouent un rôle majeur dans les réponses immunes et leur fonction est liée à la protection contre les virus, les tumeurs et durant l'auto-immunité (Liblau, 2002).

En conditions normales, la plupart des cellules de l'organisme expriment des molécules du CMH de type I et donc ces cellules présentent un grand potentiel de destruction tissulaire (Liblau, 2002). L'importance des cellules T CD8 dans les maladies auto-immunes comme le diabète de type 1, l'arthrite rhumatoïde, la thyroïdite auto-immune et la sclérose multiple n'a pas été reconnue depuis longtemps, mais des destructions tissulaires ont été mises en évidence dans ces maladies auto-immunes chez l'humain (Wong et coll., 1999 ; Liblau, 2002).

Dans toutes les espèces étudiées, on n'a pas mis en évidence la présence du CMH au niveau de l'épithélium séminifères, mais les deux CMH, de classe I et de classe II sont exprimés dans le tissu interstitiel (Tung et coll., 1987 ; Pöllänen et Maddocks, 1988 ; Wang et coll., 1994 ; Hedger, 1997). Dans le testicule normal, les cellules CD8⁺ sont présentes dans le tissu interstitiel de rats et de souris, en nombre réduit, ainsi que des cellules CD4⁺, des cellules NK et des cellules dendritiques (Tompkins et coll., 1998 ; Hedger, 2002). En condition normale, des cellules lymphocytaires se retrouvent principalement au niveau du rete testis, de l'épididyme et du canal déférent (Ritchie et coll., 1984).

Une sous-population de cellules CD8⁺ présente des marqueurs spécifiques qui démontrent soit son activation – *granzyme B* (Griffiths et Mueller, 1991) – soit son potentiel cytotoxique – *TIA-1* (Anderson, 1995). L'expression de la granzyme B et de la TIA-1 a été démontrée dans les cellules lymphocytaires intra-épithéliales du tractus gastro-

intestinal (Muller et coll., 1998 ; Resnick, 1999), dans le tractus reproductif féminin (King et coll., 1993) et dans le tractus génital masculin (Yakirevich et coll., 2002).

Au niveau du testicule humain on trouve des similarités dans la présence des cellules inflammatoires (CD4+, CD8+, neutrophiles etc.), mais les données sont encore très limitées (Pöllänen et Niemi, 1987 ; Hedger, 1997 ; Hedger, 2002).

Les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire programmée

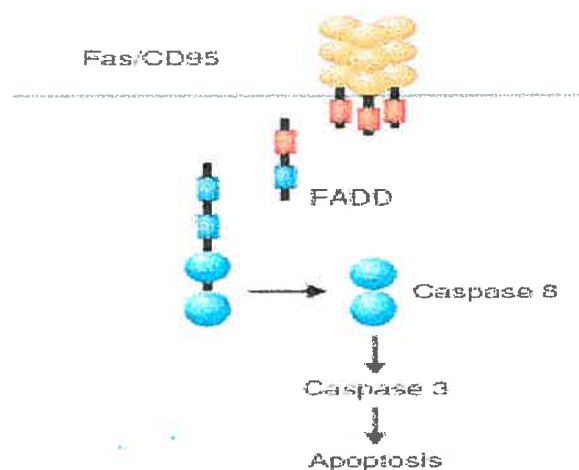
L'apoptose des cellules T matures assure l'homéostasie et la tolérance dans les tissus périphériques. Il y a au moins deux mécanismes d'apoptose, au niveau des lymphocytes T, l'un induit par l'antigène et l'autre par les lymphokines (Lenardo et coll., 1999).

L'apoptose accomplie par l'intermédiaire d'antigène est médiée par l'expression des cytokines comme FasL (Fas ligand) et TNF-alpha. La grande famille des récepteurs TNF comprend six membres – Fas, TNF-R1, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, et DR6 (Hengartner, 2000; Schulze-Osthoff, 1998).

Certaines cytokines agissent sur des récepteurs spécifiques qui à leur tour induisent l'activation de caspases (Ohashi et DeFranco 2002). Cependant, un autre mécanisme vient d'être décrit. Le FasL pourrait supprimer l'activation des cellules T par blocage de l'influx de Ca^{2+} dans la cellule (Lepple-Wienhues et coll., 1999). Dans ce processus, l'agent responsable serait une céramide produite après l'activation d'une sphingomyélinase comme réponse à la stimulation de Fas (O'Connell, 2002).

Dans les cellules T, le FasL induit la mort cellulaire de deux manières, par "suicide", ou par "fratricide" par une cellule voisine à la cellule T (Alderson et coll., 1995). Le récepteur Fas et son ligand, FasL, se présentent à la surface cellulaire sous

forme de trimère, chaque monomère de FasL a la capacité de se lier à 2 molécules de Fas distinctes et adjacentes. Cette liaison est suivie d'un rapprochement des cellules qui les expriment et ce rapprochement entraîne le rapprochement des régions intracytoplasmiques spécialisées, les domaines de mort – *death domains* – qui sont responsables du déclenchement du programme d'apoptose (Peitsch, et Tschopp, 1995). Ces domaines de mort sont nécessaires et suffisants pour initier le processus de l'apoptose et ces domaines vont continuer l'activation des autres facteurs protéiques (FADD/MORT 1) (Varfolomeev et coll., 1996).



Current Opinion in Immunology Ohashi et DeFranco, 2002

Schéma 7. L'implication du Fas dans l'apoptose.
FADD, Fas-associated death domain.

L'activation des caspases effectrices (caspase-3 ou caspase-7) entraîne le clivage d'une grande variété de protéines, incluant les enzymes de réparation de l'ADN, et les endonucléases, comme l'inhibiteur de l'activation de la caspase-déoxyribonucléase (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease- ICAD). Suite à cet événement, la

déoxyribonucléase activée par la caspase (caspase-activated deoxyribonuclease – CAD) est libérée du ICAD et entre dans le noyau pour couper d'une manière aléatoire l'ADN dans des fragments de 200 paires de bases. (Scaffidi et coll., 1999b).

Au niveau cellulaire, deux modes d'apoptose sont rapportés : le type I (la voie extrinsèque), sans l'aide des mitochondries et le type II (la voie intrinsèque), avec l'aide des mitochondries qui libère le cytochrome c (Scaffidi et coll., 1999). Les cellules de type I présentent une grande quantité de caspase 8 dans leur cytoplasme et sont associées au premier mode d'apoptose, alors que les cellules de type II sont dépendantes des voies extrinsèque et intrinsèque (Mor et coll., 2002).

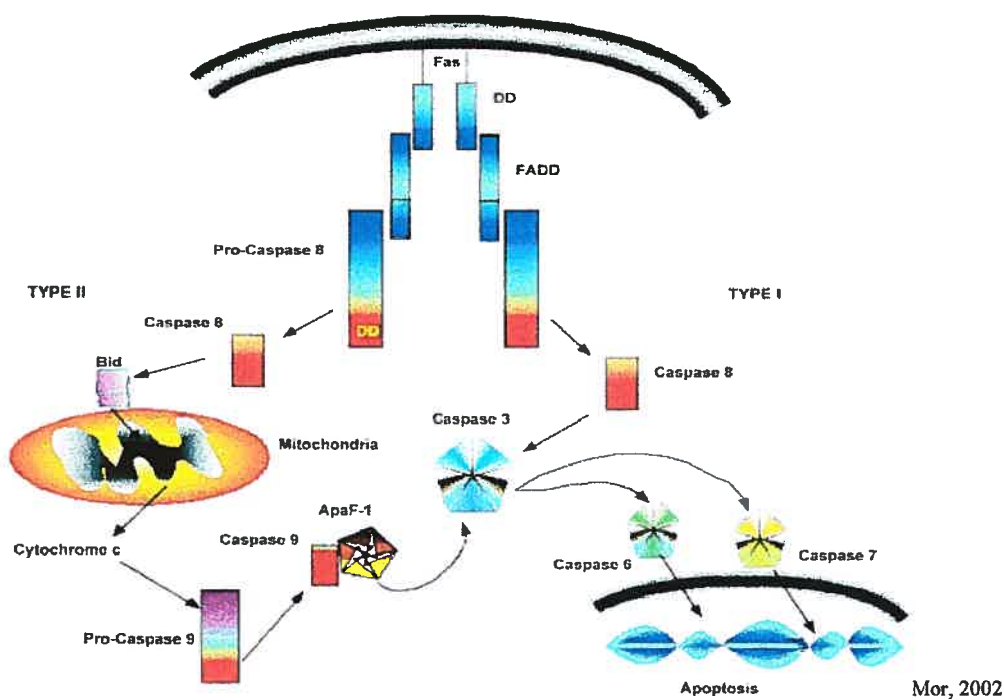


Schéma 8. Représentation schématique des composants intracellulaires de la voie Fas/FasL.

Des études *in vitro* suggèrent qu'il existe aussi des voies différentes d'apoptose pour les diverses classes des cellules T. L'apoptose des lymphocytes CD4⁺ se ferait par le système Fas/FasL, alors que celle des lymphocytes CD8⁺ se ferait préférentiellement par la voie du TNF-alpha (Zheng et coll., 1995 ; Sytwu et coll., 1996). L'apoptose induite par le système Fas/FasL se déclenche plus rapidement que celle induite par TNF (Clement et Stamenkovic, 1994 ; Varadhachary et coll., 1997).

Le système Fas/FasL semble être lié à la capacité de limiter l'invasion d'une inflammation dans un tissu et le fonctionnement de ce système a été mis en évidence au niveau du cerveau (Bechmann, 1999) et du trophoblaste (Mor, 1998). Des études récentes (Hikim et coll., 2003) ont montré que les souris *gld* (avec une mutation dans le gène du FasL) présentent la même sensibilité à l'apoptose, induite par la chaleur, des cellules germinales comme chez les souris normales. Ces résultats suggèrent que la voie Fas/FasL n'est pas nécessaire pour l'apoptose des cellules germinales induite par la chaleur dans le testicule.

1.8 Les macrophages

Les macrophages sont des cellules qui se trouvent dans tous les tissus et organes et ils représentent une population très hétérogène. Ces cellules ont des rôles dans le maintien de l'homéostasie et la défense de l'organisme; elles possèdent une grande variété de récepteurs de surface avec lesquels elles vont médier la reconnaissance des ligands endogènes ou exogènes (Gordon, 2003).

1.8.1 Les macrophages testiculaires

Du point de vue morphologique, les macrophages testiculaires sont semblables aux macrophages d'autres tissus. Ils expriment de nombreux marqueurs différents-

immunologiques, histochimiques, de fonction et des récepteurs Fc. (Hutson, 1994). Ces cellules présentent une activité phagocytaire, cytotoxique, et bactéricide. Une de leur caractéristiques est de présenter des antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Pöllänen et Niemi, 1987; Tung et coll., 1987; Wang et coll., 1994) et par conséquent, elles ont la capacité de présenter l'antigène aux cellules T auxiliaires (Head et Billingham 1985; Itoh et coll. 1995b).

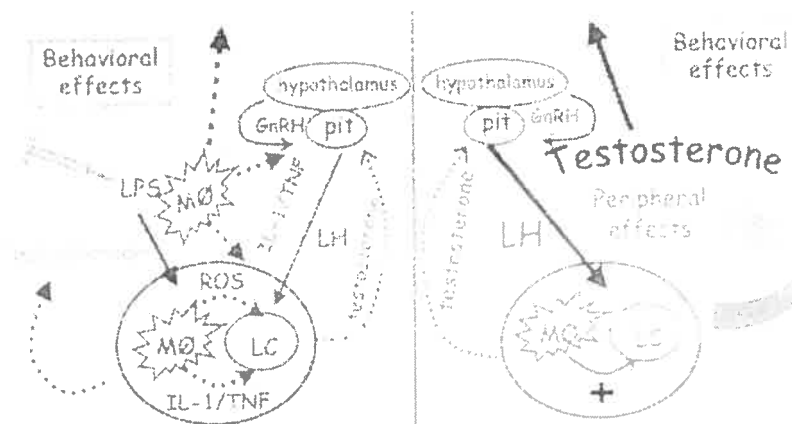
Chez les rats et les souris, les macrophages testiculaires sont peu nombreux avant la puberté, mais ils augmentent en nombre avec la spermatogenèse (Hardey et coll., 1989; Ariyaratne, 2000). L'élimination expérimentale des macrophages testiculaires par injection d'une cytokine encapsulée dans les liposomes chez les rats adultes, est suivie par une repopulation graduelle des macrophages dans le tissu interstitiel (Bergh et coll., 1993a). Quoique l'origine des macrophages testiculaires soit reliée aux cellules monocytaires circulantes, des expériences ont démontré la possibilité de ces macrophages résidants de se diviser (Schlatt et coll., 1999). Le recrutement et le maintien des macrophages sont sous l'influence et le contrôle des cellules de Leydig. La destruction des cellules de Leydig par des cytotoxines spécifiques, éthane diméthane sulphonate (EDS) par exemple, est suivie d'une diminution progressive du nombre de macrophages jusqu'à 50% (Wang et coll., 1994) dans les semaines qui suivent. Le nombre de macrophages revient à un niveau normal seulement après que des cellules de Leydig aient repopulé le testicule (Wang et coll., 1994). Dans le développement du testicule, la croissance du nombre de macrophages est suivie également par la croissance du nombre de cellules de Leydig (Raburn et coll., 1993; Ariyaratne et Mendis-Handagama, 2000). La destruction complète des cellules germinales ne provoque aucun changement quant au nombre de macrophages testiculaires (Meinhardt et coll., 1998).

Un rôle dans la régulation des fonctions et du nombre de macrophages testiculaires a été aussi attribué aux hormones hypophysaires, en particulier à l'hormone de croissance (GH) (Gaytan et coll.1994c) et à l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Yee et Hutson, 1983).

Le facteur « macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) » est impliqué dans le contrôle du nombre de macrophages dans le tractus genital masculin (Pollard, 1997). Des expériences ont démontré dans les souris knock-out $-csfm^{op} / csfm^{op}$ - pour M-CSF une réduction du nombre des macrophages testiculaires (Pollard, 1997). Le facteur qui inhibe la migration des macrophages (MIF) est exprimé sur les cellules de Leydig (Wennemuth et coll., 2000), mais son implication dans le recrutement des monocytes dans le testicule n'a pas été encore mise en évidence (Meinhardt et coll., 1998). Un autre facteur –la protéine qui attire les monocytes (MCP-1) est produite dans les mêmes quantités, par la cellule de Leydig et par les cellules péri-tubulaires (Aubry et coll., 2000; Gerdprasert et coll., 2002). L'IL-1 β est produite par les macrophages et par les cellules de Leydig est il semblerait que la sécrétion de MCP-1 est sous un control paracrine et autocrine (Aubry et coll., 2000).

Une association fonctionnelle entre cellules de Leydig et macrophages interstitiels a été mise en évidence par la présence d'inter-digitations spécialisées entre ces deux types de cellules qui probablement permettent un échange d'informations (Miller et coll., 1983). La destruction des macrophages avant la maturation testiculaire chez les rats immatures et chez les rats traités avec EDS conduit à une forte inhibition du développement des cellules de Leydig chez ces animaux (Gaytan et coll., 1994). La relation macrophages - cellules de Sertoli a été récemment précisée. Le diagramme suivant représente le modèle d'influence entre l'axe hypothalamique-pituitaire-

testiculaire et les macrophages testiculaires (Hales et coll., 2002). Une injection i.p. de lipopolysaccharide (LPS) cause une inhibition aiguë et immédiate de la production de testostérone, médiée par l'oxygène réactif (reactive oxygen species-ROS) élaboré par les macrophages testiculaires. Les cellules de Leydig adjacentes, à proximité des macrophages, sont soumises à un stress oxydant, ce qui a pour résultat la perturbation des mitochondries et l'inhibition de la protéine StAR (steroidogenic acute regulatory protein). L'activation des macrophages testiculaires et de monocytes/macrophages périphériques par le LPS induit la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF). Ces facteurs inflammatoires, à leur tour, diminuent le taux de la testostérone dans le sérum. En dépit de la baisse du taux de testostérone circulant, il n'y a aucune augmentation compensatoire de la sécrétion de LH. Dans des conditions physiologiques normales, la LH contrôle la production de la testostérone. Par un mécanisme de feedback, la testostérone contrôle à son tour la sécrétion de la LH (Hales, 2002).



Hales, 2002

Schéma 9. Les interactions macrophage–cellule de Leydig. MØ, macrophage testiculaire; ROS, reactive oxygen species; LC, cellule de Leydig; LPS, lipopolysaccharide; pit, glande pituitaire.

Ces résultats montrent que les deux types des cellules –macrophage et cellule de Leydig - interagissent et s'influencent d'une manière réciproque.

1.8.2 Les fonctions immunes des macrophages testiculaires

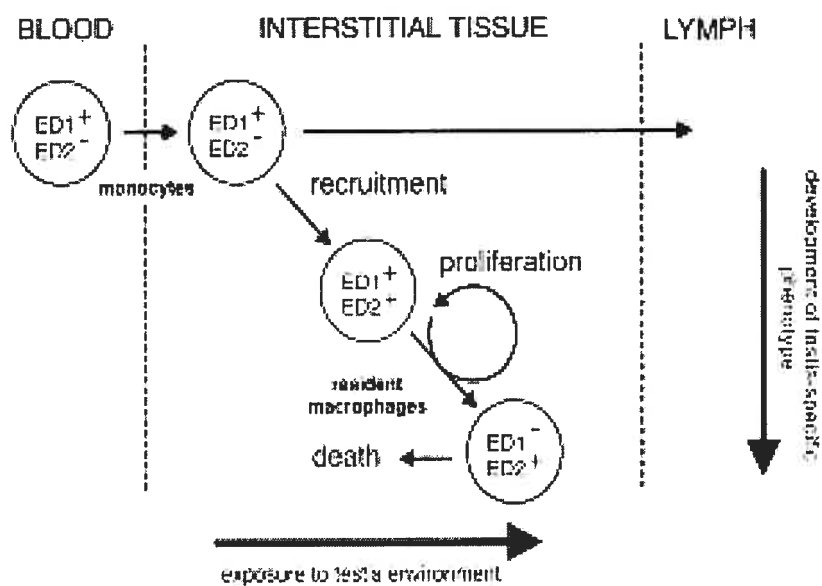
Les macrophages testiculaires ont la capacité de produire des cytokines qui ont un effet stimulant sur l'immunité cellulaire, comme l'interleukine12 (IL-12) ou qui sont capables d'une activité de suppression dans l'immunité cellulaire, comme l'IL-4, l'IL-10 et le TNF-beta (Paul et Seder, 1994 ; Cobbold et Waldmann, 1998). De plus, les macrophages peuvent contrôler les processus inflammatoires en synthétisant des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF-alpha ou des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TNF-beta (de Waal Malefyt et coll., 1992). La synthèse des cytokines pro-inflammatoires a été démontrée dans des macrophages testiculaires isolés. Les macrophages testiculaires isolés sécrètent aussi des prostaglandines et des facteurs stimulateurs des granulocytes/monocytes (CSF) (Moore et Hutson, 1994 ; Hayes et coll., 1996). Les cytokines anti-inflammatoires sécrétées par les macrophages représentent la source principale des peptides immunosuppresseurs de type beta-endorfine et de l'hormone alpha-mélanocyto-stimulatrice (He et coll., 1991).

Les études de Russell et Lindenbaum en 1979 et Miller en 1982 ont démontré qu'en conditions normales, les macrophages testiculaires ne quittent pas le testicule, mais ces études n'ont pas été continuées pour voir s'il existe un trafic durant les réponses immunes.

La population des macrophages dans un testicule normal n'est pas homogène et le marquage avec des anticorps monoclonaux a mis en évidence des sous-populations distinctes (Wang et coll., 1994 ; Meinhardt et coll., 1998). Chez le rat, l'anticorps ED1

reconnaît un antigène lysosomiale qui est exprimé dans tous les monocytes et dans la plupart des macrophages tissulaires (Damoiseaux et coll., 1994). L'anticorps ED2 reconnaît une intégrine spécifique aux macrophages, mais pas aux monocytes (Barbé et coll., 1990). La majorité (85%) des macrophages intratesticulaires présente le marqueur ED2 (Hedger, 1997). L'analyse quantitative des macrophages après marquage au ED1 ou au ED2, montre qu'il y a une population de macrophages qui n'est pas identifiée, elle n'est ni ED1⁺ED2⁻ ni ED1⁻ED2⁺ (Wang et coll., 1994).

On a proposé la voie suivante : les monocytes quitteraient le sang comme ED1⁺ED2⁻ et entreraient dans le testicule où ils séjournent quelques jours, après ils deviendraient ED2⁺ et perdraient complètement le ED1 (Hedger, 1997). Les arguments en faveur de cette progression restent seulement indirects et ils sont basés sur des observations effectuées sur des tissus autres que le testicule (Jäger et al., 1993 ; Sakanashi et al., 1994 ; McLennan, 1996).



Hedger, 2002

Schéma 10. Représentation du développement de la population de macrophages testiculaires chez le rat.

Les testicules des diverses espèces comme la brebis présentent un nombre réduit de macrophages (Pöllänen et Maddocks, 1988) et un rôle important doit être accordé à d'autres types de cellules immunes et testiculaires. Au niveau testiculaire, des cellules avec une morphologie et qui répondent aux marqueurs des cellules dendritiques ont été visualisées, mais elles représentent une très faible proportion des cellules d'origine myéloïde retrouvées dans le testicule (Itoh et coll., 1995a ; Hoek et coll., 1997). Ces cellules ont une structure stellaire et sont responsables de la présentation d'antigène (Steinman, 1991) et elles stimulent la différenciation et la prolifération de lymphocytes spécifiques (Hedger, 1997); les molécules accessoires qui reconnaissent les lymphocytes T spécifiques sont LFA-3/CD58, ICAM-1/CD54, B7-2/CD86 (Caux et coll., 1994 ; Inaba et coll., 1994). La fonction exacte des cellules dendritiques testiculaires n'est pas encore établie, mais il semblerait qu'elles interviennent dans le maintien de l'immuno-tolérance (Finkelman et coll., 1996 ; Hackstein et coll. 2001).

1.9 HLA (Human Leucocyte Antigen)

1.9.1. Généralité

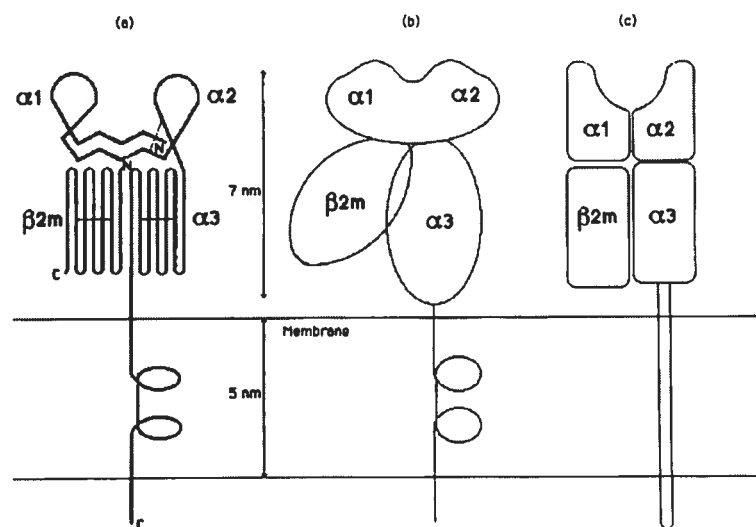
Les molécules du CMH de classe II se retrouvent à la surface des macrophages-monocytes, des lymphocytes B, des cellules endothéliales des capillaires et de certains épithéliums. On les retrouve aussi sur les lymphocytes T activés et leur expression peut être induite dans d'autres cellules par l'IFN- γ . Les cellules qui expriment les molécules du CMH de classe II présentent 3 ou 4 formes isotypiques de la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité.

- une molécule ou deux de DR.
- une molécule DQ.
- une molécule DP.

	<i>Cellules/tissus CMH II Positifs</i>	<i>Cellules/tissus CMH II négatifs</i>
cellules du système immunitaire	lymphocytes B matures, monocytes-macrophages, lymphocytes T activés, cellules dendritiques interstitielles	lymphocytes B immatures plasmocytes lymphocytes T au repos
cellules hématopoïétiques	précurseurs érythrocytaires granulocytaires et monocytaires	cellules matures de la série érythrocytaire et granulocytaire
cellules et tissus normaux-CMH classe II positifs	endothélium vasculaire, capillaires sanguins, vaisseaux lymphatiques, épithélium de l'urètre, épididyme, sein, dure-mère	--
cellules et tissus normaux-CMH classe II négatifs	--	glandes endocrines : thyroïde, hypophyse, surrénale, système nerveux central (neurones) et périphérique, épithélium de l'uretère, vessie, prostate, testicules, spermatozoïdes

La molécule DR, quantitativement la plus représentée a été la première à être identifiée. Elle est une glycoprotéine trans-membranaire de 55-60 kDa et présente deux chaînes associées de façon non-covalente : la chaîne lourde α (31-34 kDa) et la chaîne

légère β (26-29 kDa). Chaque chaîne comporte deux domaines extracellulaires N-terminaux, un domaine trans-membranaire hydrophobe et un domaine C-terminal intracytoplasmatique.



Colombani J., 1993

Schéma 11. Trois représentations de la molécule CMPH2. (a) La représentation « fil-de-fer » : domaine $\alpha 1$: 4 replis β et 1 hélice α ; domaine $\alpha 2$: 7 replis β . (b) et (c) : la symétrie de 4 domaines représentés par des ellipses ou des rectangles.

Les deux domaines extracellulaires de la chaîne α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et de la chaîne β ($\beta 1$ et $\beta 2$) comportent chacun environ 90 acides aminés. Cette molécule présente une symétrie au niveau des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ d'une part et $\alpha 2$ et $\beta 2$ d'autre part. Les domaines $\beta 1$ et $\beta 2$ de la molécule DR comportent chacun un pont disulfure (S-S). La chaîne DR α ne présente qu'un pont S-S dans le domaine $\alpha 2$ mais comporte deux chaînes oligosaccharidiques N-liées. La chaîne DR α n'est pas polymorphe alors que la chaîne β l'est très fortement au niveau des replis β et de l'hélice α du domaine $\beta 1$ (Colombani, 1993). Les autres molécules de classe II, DP et DQ, possèdent une structure similaire à

celle de la molécule DR, avec de petites modifications (Colombani, 1993). La chaîne DQ β possède une séquence intra-cytoplasmique plus courte que la chaîne DR β (Colombani, 1993). La chaîne DP β présente une délétion de deux acides aminés par rapport à la chaîne DR β . Les molécules et les gènes humains de classes II représentent une famille homogène et présentent des liens avec les molécules et les gènes murins.

1.9.2 Association du HLA et les maladies auto-immunes

La nature complexe des MAI et leur association avec les molécules du HLA de type II sont déterminées par plusieurs facteurs : les gènes HLA, les gènes non-HLA qui se retrouvent sur le bras court du chromosome 6 - la région 6p 21.3 - mais aussi des facteurs environnementaux qui contribuent au développement des MAI. Des associations entre certains allèles de HLA de classe II et des maladies auto-immunes ont été décrites longtemps avant la découverte d'un rôle majeur des molécules HLA dans la présentation antigénique des peptides aux lymphocytes T.

La fonction principale des molécules de HLA est de présenter des peptides au TCR (T-cell receptor – le récepteur de la cellule T). Les chaînes α et β des molécules du CMH de classe II s'orientent elles-mêmes pour former 9 plis dans la région de liaison avec les peptides. Les plis 1, 4, 9 sont considérés comme des plis majeures alors que les autres, moins profonds, sont considérés comme mineures. Les liaisons réalisées entre les peptides et les CMH sont importantes pour la structure et la stabilité du complexe CMH /peptide.

L'affinité entre les CMH et le peptide joue le rôle principal, en contrôlant la stabilité et la densité des complexes CMH/peptide à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. A leur tour, la densité et la stabilité du complexe déterminent la réponse des

cellules T. Les différents degrés de liaison entre TCR et le complexe CMH/peptide peuvent initier la différenciation des cellules T, vers les cellules Th1 ou Th2 et peuvent modifier le rôle d'un peptide agoniste en antagoniste sur une même cellule T.

1.10 Facteurs génétiques responsables du déclenchement des MAI

L'identification de lignées résistantes et moins résistantes de souris a permis d'évaluer la localisation et le nombre des gènes impliqués dans les MAI. Les études pour élucider s'il y a une prédisposition différentielle de la part du testicule, de l'épididyme ou du canal déférent pour l'OAE (orchite allergique expérimentale), ont montré que les souris de phénotype haploïde H-2^S développent l'orchite d'une manière prédominante, alors que les souris au phénotype haploïde H-2^K développent principalement une épидидymite et/ou une vasite. Cette différence a été démontrée aussi en utilisant la série BXH des lignées de souris transgéniques qui résultent de la lignée *C57BL/6J* prédisposant à une OAE et *C3H/HeJ* résistante à l'OAE (Wardlaw, 1970).

D'autres études ont démontré quatre gènes susceptibles pour l'orchite : *Orch-1* situé dans l'H-2, *Orch-2*, *Bphs* et *Orch-3* situés à l'extérieur de l'H-2. Des études basées sur des souris modifiées génétiquement montrent que le gène *Orch-1* se situe dans l'intervalle H-2S/H-2D entre les gènes IR qui contrôlent la réponse humorale pour le trinitrophenol-Ficoll (TNP-Ficoll) et le locus qui code pour le TNF α (Teuscher et coll., 1990). L'ordre des gènes dans cette région a été établi : *H-2S-TNP-Ficoll-Orch-1-TNF α -H-2D*. Une analyse moléculaire a localisé l'*Orch-1* dans une région de 50-60kb appartenant au Hsp 70.1 (Person et coll., 1992).

Les gènes situés à l'extérieur du CMH ont une forte influence sur la prédisposition à l'OAE. La lignée DBA/2J (H-2^D) de souris est résistante à l'OAE, alors

que la lignée BALB/cSyJ a une prédisposition à cette maladie. La lignée dérivée BALB/cSyJ x DBA/2J F1 donne des souris résistantes à l'orchite (Teuscher et coll., 1985). Dans la population (BALB/cSyJ x DBA/2J F1) x BALB/cSyJ, 54% des animaux étaient résistants, et seulement 46% démontraient une prédisposition à l'orchite. Ces résultats permettent de préciser que la résistance dominante à l'orchite semble être contrôlée par un seul gène *Orch-2* (Teuscher et coll., 1985). En utilisant de l'ADN isolé appartenant à cette population de cellules – BALB/cSyJ x DBA/2J F1) x BALB/cSyJ- et avec un marquage antérieur des autres populations de cellules –DBA/2J et BALB/cSyJ, le gène *Orch-2* a été trouvé sur le chromosome 11 dans une région qui code pour d'autres produits immunologiques importants (*nu*, *Idd-4*, *H-3*, *Tca-3*, *Mip1a*, *Mip1b*) (Buchberg et Camper, 1993).

L'induction de l'OAE nécessite un adjuvant comme la toxine du bacille *Bordetella pertussis* et l'adjuvant de Freund. Le *Bphs* représente un locus qui contrôle l'expression phénotypique de la prédisposition à l'histamine induite par la *Bordetella pertussis* (Wardlaw, 1970). Les souris qui ont un allèle influençable à cette position meurent à cause d'un choc hypo-volémique suite à l'administration de l'histamine (Teuscher, 1985 ; Teuscher et coll., 1987).

Des expériences sur l'EAE (encéphalomyélite allergique expérimentale) (Linthicum et Frelinger) et l'OAE (Teuscher, 1985) ont montré une association entre un allèle dans la même position et la prédisposition à ces MAI. En utilisant des microsatellites et des marqueurs spécifiques, le locus *Bphc* a été localisé au niveau du chromosome 6, télomérique de *Tcrb* et centromérique de *Prp* (Sudweeks et coll., 1993). Ces études ont placé le gène *Bphs* dans une région où on retrouve les gènes (*Igk*, *Ly-2*,

Ly-4 et *Tnfr-2*) qui codent pour des molécules immunologiques importantes (Moore et Elliott, 1993).

Le rôle des gènes dans la résistance contre les MAI a été étudié sur les populations de souris BALB/c. La résistance héritée d'une manière récessive chez les souris BALB/c est liée à une seule différence génotypique, le gène *Orch-3* (Person et coll., 1992). La position de ce gène n'est pas encore établie.

Le gène	La fonction	La localisation
Orch-1	EAO prédisposition	Chromosome 17
Orch-2	EAO résistance	Chromosome 11
Bphs	Dans l'EAO la toxine du <i>Bordetella pertussis</i>	Chromosome 6
Orch-3	EAO résistance	Pas encore localisé
AOD-1	D3TX- prédisposition à induire une oophorite auto-immune	Chromosome 16

La prédisposition à l'oophorite auto-immune chez les lignées de souris transgéniques D3TX a été étudiée avec une autre modification au niveau du récepteur T et la distribution de la pathologie chez ces souris était sous l'influence du bagage génétique de chaque souris qui porte la modification transgénique (Sakaguchi et coll., 1994).

Des croisements entre des lignées de souris (C57BL/6J X A/J)F1 x C57BL/6J et A/J (90%-incidence de l'oophorite) ou (C57BL/6J x A/J)F1 (100% - incidence de la maladie) ou C57BL/6J (8% - incidence de la maladie) ont montré que le rapport entre les animaux qui présentaient ou non l'oophorite est de 1,15 (Wardell et coll., 1995). Ce

rapport est caractéristique de la présence d'un seul locus, qui a été retrouvé sur le chromosome 16 où se retrouvent aussi d'autres gènes ayant une importance immunologique (*Ly-7, Ifgt, Ifrc, Iig1-1, Mls-3, VpreB*) (Reeves et coll., 1993).

1.11 L'objectif de l'étude

Le modèle animal que nous avons utilisé dans cette étude est le seul disponible au moins jusqu'à présent à développer une OAI d'une manière spontanée. Ce modèle nous a donné l'occasion d'étudier les modifications patho-physiologiques au cours de cette maladie. Cette affection est très semblable à l'orchite granulomateuse retrouvée chez l'humain, suite aux l'oreillons. L'OAI conduit à une infertilité à cause d'aspermato-génèse.

Étant donné que l'OAI représente une modification dans l'état immunologique normal, qu'elle est associée, comme d'autres MAI, à des changements dans l'immunité humorale et cellulaire, nos objectifs étaient d'identifier et caractériser la population des cellules infiltrantes au cours de l'orchite, de localiser des dépôts immuns au niveau du testicule et de l'épididyme et de caractériser le sérum des visons orchitiques.

Pour identifier et caractériser la présence des cellules infiltrantes qui accompagnent l'OAI spontanée, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre certains types cellulaires : anti NCL-Macro, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD163, anti-HLA, anti-FasL en immunohistochimie et immunofluorescence. Pour mettre en évidence et caractériser les dépôts immuns, nous avons utilisé le Western blot et l'immunohistochimie, en utilisant le sérum d'animaux orchitiques, des anticorps anti-IgG de vison et anti-IgM, -IgD, -IgA, -IgE humain sur des tissus d'animaux sains et orchitiques.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIELS

2.1.1 Animaux

2.1.2 Produits chimiques

2.1.3 Anticorps

2.1.1 Animaux utilisés

Pour cette étude, nous avons utilisé le vison (*Mustela vison*) un animal à activité reproductive saisonnière, c'est-à-dire il présente des variations dans son cycle reproductif en fonction des saisons. La phase d'activité spermatogénétique dont le maximum se situe entre février et mars, est suivie d'une période d'inactivité spermatogénétique durant laquelle se produit une régression testiculaire progressive qui commence à partir du mois d'avril et dont le maximum se situe en août.

Notre laboratoire utilise le vison comme modèle animal depuis plusieurs années et nous avons rapporté les variations d'activité spermatogénétique au cours du développement et du cycle annuel reproductif saisonnier (Pelletier R.-M. 1986; Pelletier R.-M. 1988).

Nous nous sommes procuré les visons à la visonnière St-Damase, Québec.

Groupes d'animaux:

A) normaux

Les animaux normaux sont des visons adultes, c'est-à-dire âgés de plus d'un an, au cours du mois de mars - durant la phase spermatogénétique active, donc, qui ont déjà passé par une période de fertilité.

B) infertiles

Il s'agit d'animaux infertiles souffrant d'une infertilité secondaire. Nous avons utilisé 5 animaux pour chaque groupe. L'infertilité a été établie par le fermier qui vérifie la présence ou non de spermatozoïdes. Tous les animaux sont anesthésiés par une injection de Somnotol (pentobarbital sodique - 0.2 mL/kg), intrapéritonéale.

2.1.1.1 Prélèvement des testicules

Les testicules ont été prélevés en prenant soin d'enlever les vaisseaux sanguins et la capsule entourant les testicules. Les testicules décapsulés sont soumis ensuite à une digestion enzymatique pour générer des fractions enrichies en tubules séminifères et d'autres en tissu interstitiel. La séparation des tubules séminifères et du tissu interstitiel est essentielle puisque ces deux compartiments ont des fonctions distinctes : les tubules séminifères contiennent les cellules germinales et les cellules de Sertoli et sont impliquées dans la spermatogenèse alors que le tissu interstitiel assure la production d'androgènes par le biais des cellules de Leydig.

Les testicules prélevés sont digérés dans du «minimum essentiel medium» (MEM) contenant 0.25 mg/mL de collagénase D et 0.1 mg/mL d'inhibiteur de la trypsine sous agitation douce (80-90 cycles/minute) dans un bain d'eau maintenu à 37°C (Pelletier et coll., 1999 ; Kabbaj et coll., 2001 ; Kabbaj et coll., 2003). Dans certains cas, les tubules séminifères ou tissu interstitiel ont été séparés à l'aide de fines pinces afin d'accélérer la digestion.

La digestion une fois complétée est arrêtée par ajout d'un volume égal de MEM sans enzymes. La solution de testicules digérés est ensuite transférée dans des tubes de 15 mL et laissée sédimenter pendant 30 minutes, à température ambiante. Par la suite, ces tubes sont centrifugés deux fois à 840 rpm (centrifuge Beckman GS-6R, rotors GH-3.8,

Beckman, Mississauga, Ont.) pendant 20 minutes, afin de séparer la fraction enrichie en tissu interstitiel (partie supérieure) de la fraction enrichie en tubules séminifères (partie inférieure). La séparation était identifiable grâce à la coloration différente des deux fractions : brun pour le tissu interstitiel et beige pâle pour les tubules séminifères. Les fractions enrichies ainsi séparées sont prélevées puis lavées deux fois avec du PBS 1X (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) et centrifugées à 2500 rpm pendant 10 minutes. Les fractions sont ensuite homogénéisées, en fonction de leur volume, à l'aide d'un homogénéisateur et d'un sonicateur (Fisher Sonic dismembrator modèle 300, Fisher Scientific, Pittsburgh, EU), dans du PBS 1X contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases (1mM EDTA, 2mM PMSF, 2 µg/mL de leupeptine et 2 µg/mL d'aprotinine). Ensuite elles furent congelées à -80°C. Nous avons aussi vérifié au microscope optique la pureté des fractions enrichies en tubules séminifères et en tissu interstitiel.

2.1.1.2 Prélèvement d'autres tissus

En plus des testicules, nous avons prélevé d'autres tissus de vison pour les utiliser comme contrôles positifs pour Western blots. Nous avons prélevé l'épididyme, la rate et le sang. Mis à part le sang, les tissus ont été homogénéisés dans du PBS 1X contenant le même cocktail d'inhibiteurs de protéases que nous avons utilisé pour l'homogénéisation des fractions testiculaires.

Le sang prélevé est laissé à la température ambiante pour 12 heures et ensuite pour les suivantes 12 heures à 4°C. Il est alors centrifugé à 2500 rpm deux fois pour obtenir le sérum. Le sérum recueilli est aliquoté et gardé à -80°C.

2.1.2 Produits chimiques et enzymes

- BSA, DAB, inhibiteur de la trypsine et 3-aminopropyléthoxysilane, de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, É-U)
- collagénase D et leuceptine de Roche Molecular Biochemicals (Laval, Québec, Canada)
- kit de chimiluminescence Lumi light plus Western blotting substrate et BM chemiluminescence blotting substrate (POD) de Boehringer Mannheim (Laval, Québec, Canada)
- MEM, Gibco BRL Products (Burlington, Ontario, Canada.)
- Permout, Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, É-U)
- réactif Bradford, Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada
- DABCO, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada.

2.1.3 Source des anticorps

2.1.3.1 -anticorps primaires

- anti-macrophage fait chez la souris, de Novo Castra, New Castle, R.U)
- anti-CD 4 et anti-CD 8 faits chez la souris, de Novo Castra, New Castle, R-U)
- anti CD163 fait chez la souris, de Novo Castra New Castle, R-U)
- anti-HLA DR, DP, DQ fait chez la souris de Cedarlane (Hornby, Ontario, Canada)

- anti IgG fait chez le vison, obtenu du Docteur Marshall E. Bloom (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana, É-U)
- anti-human IgM, IgD, IgE, IgA faits chez le lapin de Dako (Glostrup, Danemark).

2.1.3.2 anticorps secondaires conjugués à la biotine

- anti-lapin IgG (H+L) et anti-souris IgG (H+L), de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Bio/Can Scientific, Mississauga, Ontario, Canada)

2.1.3.3 anticorps secondaires conjugués à la peroxydase

- anti-souris IgG, de Santa Cruz Biotechnology Inc., California, É-U
- anti-lapin IgG (H+L), de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Mississauga, Ontario, Canada

2.1.3.4 anticorps secondaires conjugués aux substances fluorescentes

- anti-lapin FITC de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Mississauga, Ontario, Canada
- anti-souris TRITC de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Mississauga, Ontario, Canada

2.1.4 Autres

- streptavidine conjuguée à la peroxydase, de Amersham Pharmacia Biotech. (Baie d'Urfé, Québec, Canada)
- Somnotol, de MTC Pharmaceuticals (Cambridge Ontario, Canada)
- Kodak X-OMAT XAR-5 (Eastman Kodak, Rochester, NY, É-U).

2.2 MÉTHODES

2.2.1 Western-blot

2.2.1.1 Dosage des protéines des échantillons

Pour déterminer la concentration de protéines contenues dans les homogénats de tissu interstitiel et des fractions enrichies en tubules séminifères, nous avons utilisé la méthode de Bradford (1976). Nous avons ainsi établi la courbe standard à l'aide de concentrations connues de BSA et avons déterminé la concentration en protéines totales de chacun des échantillons à partir de cette courbe standard.

2.2.1.2 Électrophorèse sur gels dénaturants SDS-PAGE

Pour étudier les protéines contenues dans les échantillons, nous les avons séparées selon leur conformation et masse moléculaire par la technique SDS-PAGE. Une fois leur concentration en protéines déterminée, chaque échantillon est ramené à une concentration de 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ par l'addition de PBS 1X, puis les échantillons sont de nouveau dilués dans du tampon d'échantillon 2X (8M d'urée, 3% SDS, 5% β -mercaptoéthanol, 0.005% de BBP, 70 mM Tris-HCl pH 6.8) jusqu'à une concentration finale de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Les échantillons sont resuspendus dans ce tampon puis chauffés pendant 3 minutes dans un bain d'eau bouillante. Une quantité de protéines équivalente de chacun des échantillons (25 μg) est ensuite placée dans les puits de gel de polyacrylamide. La concentration en acrylamide des gels d'entassement et de séparation était de 4% et 10% respectivement. La migration est effectuée à un voltage de 70 à 90 V pendant 2 heures (tampon du gel séparateur: 1.0M Tris-0.5 M glycine; tampon du gel d'entassement: 0.5M Tris-HCl pH 6.7; tampon d'électrode: 0.1M tris, 0.15M glycine, 0.1% SDS) (Pelletier et coll., 1999).

Après la migration des échantillons, les protéines séparées contenues dans le gel furent transférées sur une membrane de nitrocellulose dotée de pores de 45µm. Ce transfert de protéines du gel à la membrane a été effectué à 4 °C sous un voltage de 27 V toute la nuit (Towbin et coll., 1979). Le tampon de transfert utilisé est composé de 25mM Tris-HCl pH 8.3, 150 mM glycine et 20% méthanol. Les membranes furent ensuite colorées au rouge de Ponceau (0.2% rouge de Ponceau dans une solution aqueuse de 3% TCA) afin d'évaluer la qualité du transfert, l'uniformité de la quantité protéinique de chacun des échantillons, la dégradation possible des échantillons et l'emplacement des étalons de poids moléculaire. Les membranes furent rincées avec du TBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 24.8 mM Tris-Base, pH 7.4) plusieurs fois, jusqu'à ce que le rouge eu disparu.

Les membranes décolorées furent saturées pendant une heure à 37°C dans une solution de lait écrémé (5% dans du TBS 1X). Les membranes furent ensuite incubées dans une solution contenant l'anticorps contre la protéine étudiée. La durée et la température de l'incubation varient de 2 heures à 37 °C à 24 heures à 4°C, selon l'anticorps utilisé. Après cette incubation, les membranes furent lavées plusieurs fois dans une solution de TBS-Tween-20 (0.05%) (TBST-0.05%). Les membranes étaient incubées avec une solution contenant le deuxième anticorps couplé à la peroxydase anti-lapin-HRP, ou anti-souris-HRP selon le premier anticorps utilisé (1:2000). Les membranes étaient lavées plusieurs fois avec du TBST-0.05% puis avec du TBS. L'emplacement du complexe anticorps-antigène sur la membrane fut révélé par l'utilisation de solutions de chimiluminescence de Roche Molecular Biochemicals. La lumière émise par l'action de la peroxydase était captée sur film Kodak X-OMAT XAR-

5. Tous les résultats sont exprimés comme moyenne \pm SEM (*standard error of the mean*), après la quantification de l'intensité des bandes utilisant le programme Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EU, gratuit sur l'internet). Pour déterminer si les différences observées entre le sérum normal et le sérum d'animaux orchitiques étaient significatives, nous avons calculé la probabilité p associée au test *t de Student*. Les valeurs de $p < 0.01$ étaient considérées significatives.

2.2.2 Immunohistochimie

Afin de déterminer la localisation des protéines étudiées dans le testicule, nous avons utilisé la technique d'immunohistochimie (IHC) sur coupe de paraffine.

Les testicules de visons prélevés sont fixés par perfusion de l'artère testiculaire en utilisant tout d'abord, une solution de PBS 1X pour laver l'artère du sang puis une solution de Bouin (75 % d'acide picrique supersaturé, 25% de formaline liquide) contenant 5% d'acide acétique (Pelletier, 1995; Pelletier et coll., 1997). Les testicules furent immergés dans le même fixateur pendant 48 heures (Pelletier, 1995). Les testicules fixés furent ensuite déshydratés dans des solutions graduées d'alcool (70, 90 et 100% éthanol) puis dans du xylène pour ensuite être enrobés dans la paraffine. Nous avons coupé ces blocs de paraffine afin d'obtenir des coupes de 5 microns. Ensuite nous avons monté ces coupes de tissu sur des lames enduites de 3-aminopropyltriéthoxysilane, ce qui permet à la coupe de tissu d'adhérer plus fermement à la lame. Une fois les coupes bien séchées sur les lames, nous les avons déparaffinées puis réhydratées dans des solutions de xylène et d'alcool (100, 90 70 et 50% éthanol) et nous les avons plongées dans des bains d'eau distillée et de TBS 1X. Pour perméabiliser les cellules, nous avons utilisé le citrate de sodium -pH 6.0- à la température de 90°C

pour 5 minutes (Sarsfield et coll., 1996, modifié), le méthanol à -20°C (Kabbaj et coll., 2001) et la digestion avec la trypsine (Huang et coll., 1976). Pour bloquer l'activité peroxydase endogène du tissu, nous avons placé les lames dans une solution de TBS 1X contenant 0.6% H_2O_2 pendant 10 minutes. Nous avons ensuite lavé ces lames dans des bains de TBS 1X et de TBST-0.1% (Kabbaj et coll., 2001; Kabbaj et coll., 2003). Nous avons saturé les coupes de tissu en les incubant pendant une heure à température ambiante avec une solution de lait (0.5%) contenant ou non du Triton X-100 (0.05%), selon l'anticorps et la coupe utilisés. Nous avons ensuite incubé les lames pendant 24 heures à température ambiante avec l'anticorps dirigé contre la protéine étudiée, dilué dans du lait écrémé à 1% (anti-macrophage fait chez la souris 1 :10, anti-CD4 fait chez la souris 1:10, anti-CD8 fait chez la souris 1:10, anti-IgG 1:3000, anti-IgM 1 :1500, anti-IgD 1 :100, anti-IgE 1 :100, anti-IgA1 :100 et le sérum, sain et orchitique 1 :3000). L'IgG utilisé est spécifique au vison et les autres immunoglobulines (IgM, IgA, IgD et IgE) humaines reconnaissent les protéines de vison à cause de leurs homologies structurelles (Coe et Hadlow, 1972 ; Haughton et coll., 1978; Bovkun et coll., 1993; Najakshin et coll., 1993 ; Najakshin et coll., 1996). Nous avons lavé les coupes en les agitant dans plusieurs bains de TBST-0.1% puis nous les avons incubées avec le deuxième anticorps conjugué à la biotine (anti-souris-biotine 1:2000, anti-lapin-biotine 1:1000) pendant une heure à température ambiante. Nous avons à nouveau lavé les coupes dans du TBST-0.1% puis nous avons incubé les lames pendant une heure à température ambiante avec la streptavidine conjuguée à la peroxydase diluée dans du lait à 0.5% (1:200). Nous avons fait un lavage final avec du TBST-0.1% puis avons plongé les coupes dans une solution de TBS 1X contenant 0.05% DAB et 0.03% H_2O_2 pendant 10-12 minutes (Pelletier et coll., 1999). Le produit de réaction obtenu fut visualisé

comme un précipité brun-rouge, nous avons lavé les lames dans l'eau, puis déshydraté les coupes dans des bains d'alcool gradué (70, 90 et 100% éthanol) et de xylène. Nous avons ensuite monté les coupes dans de la résine (Permount, Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA). Pour effectuer des contrôles négatifs, nous avons réalisé des coupes en incubant avec du lait à 0.5% sans le premier anticorps. Les résultats représentatifs d'au moins trois expériences ont ensuite été visualisés et photographiés à l'aide d'un microscope Zeiss et d'une caméra digitale Zeiss en utilisant un support informatique.

2.2.3 Immunofluorescence

Pour mettre en évidence un double marquage, nous avons utilisé une technique qui permet de visualiser en fluorescence la présence de deux protéines en utilisant deux haptènes différentes.

Une fois les coupes bien séchées sur les lames, nous les avons déparaffinées puis réhydratées dans des solutions de xylène et d'alcool (100, 90 70 et 50% éthanol) et nous les avons plongées dans des bains d'eau distillée et de TBS 1X. Pour perméabiliser les cellules nous les avons introduites dans le citrate de sodium à la température de 90⁰C pour 5 minutes (modifié après Sarsfield et coll., 1996). Nous avons ensuite bien lavé ces lames dans des bains de TBS 1X et de TBST-0.1%. Nous avons saturé les coupes de tissu en les incubant pendant une heure à température ambiante avec une solution de lait (3%) contenant du Triton X-100 (0.05%). Nous avons ensuite incubé les lames pendant 24 heures à température ambiante avec l'anticorps dirigé contre la protéine, diluée dans du lait à 1% (anti-macrophage fait chez la souris 1 :1, anti-CD4 fait chez la souris 1:1, anti-CD8 fait chez la souris 1:1 anti-Fas fait chez la souris 1 :1 et anti-FasL fait chez le lapin 1 :15). Nous avons lavé les coupes dans le TBST-0.1%, puis nous les avons

incubés avec le deuxième anticorps (fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-lapin 1:400, et tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) rhodamine anti-mouse 1:100) une heure à la température ambiante. Nous avons fait un lavage final avec du TBST-0.1%. Toutes ces étapes se sont déroulées à l'obscurité pour préserver l'intensité de la réaction. Pour effectuer des contrôles négatifs, nous avons incubé des coupes de tissus avec du lait sans le premier anticorps.

Les coupes ont été ensuite montées en utilisant une solution de 50% de glycérine et 5% de DABCO dans du TBS 1x et ensuite scellées en utilisant du vernis. La visualisation de la réaction est faite avec un microscope à fluorescence Zeiss Axioskop II équipé avec des filtres pour FITC et TRITC.

3. RÉSULTATS

3.1 Étude de l'immunité cellulaire chez le vison adulte normal et orchitique

3.1.1 Localisation par immunoperoxydase des macrophages dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques

Afin d'identifier spécifiquement la localisation des macrophages, nous avons incubé des coupes de testicule et d'épididyme de visons adultes, sains et infertiles, obtenus en février et en mars, avec l'anticorps monoclonal anti-macrophages (NCL-Macro).

Dans le testicule normal de vison du mois de mars, les macrophages résident dans les espaces interstitiels (Figure 1a) entre les tubules séminifères. Dans le même espace interstitiel on voit des cellules de Leydig et autres cellules qui ne sont pas marquées (Figure 1a). Les coupes de tissu incubées en absence de l'anticorps NCL-Macro (contrôle négatif) ne présentent pas de marquage (Figure 1a'). Dans le testicule de vison orchitique obtenu au mois de mars, on a identifié, dans les espaces interstitiels plus de marquage NCL-Macro (Figure 1b) en comparaison avec le testicule normal. Les macrophages entourent les tubules séminifères complètement détruits (Figure 1c) et sont aussi présents à l'intérieur des tubules séminifères (Figure 1c). Les flèches vides (Figures 1a, b, c) identifient des cellules qui ne sont pas marquées dans le tissu interstitiel. Dans des coupes d'épididyme de vison sain du mois de février et mars on remarque la présence de quelques macrophages dans le tissu interstitiel (Figure 1d). Dans les coupes d'épididyme de vison orchitique on a marqué des macrophages au

niveau du tissu interstitiel (Figure 1e). La flèche vide (Figure 1e) montre des cellules qui ne sont pas marquées dans le tissu interstitiel de vison orchitique.

3.1.2 Localisation par immunoperoxydase des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques

Pour déterminer la localisation des molécules du CMH de classe II dans le testicule et l'épididyme, nous avons incubé des coupes de tissus sain et orchitique avec l'anticorps monoclonal anti-HLA (DR, DP, DQ).

Dans le testicule du vison sain du mois de février et de mars on n'a pas mis en évidence la présence de molécules du CMH de classe II dans les tubules séminifères (Figure 2a). Par contre, dans le tissu interstitiel du même testicule on a marqué des cellules possédant des molécules du CMH de classe II dans le testicule sain (Figure 2a). Dans le testicule du vison orchitique du mois de mars, nous avons identifié des cellules HLA+ dans le tissu interstitiel sous-capsulaire (Figure 2b), dans le tissu interstitiel intertubulaire (Figure 2c), et dans les tubules séminifères complètement détruits (Figure 2a). Dans l'épididyme sain du vison adulte du mois de mars on n'a pas marqué des cellules possédant des molécules du CMH de classe II (Figure 2d). Dans l'épididyme du vison adulte orchitique du mois de mars nous avons marqué des cellules dans les espaces intertubulaires (Figures 2e, f), ainsi que dans l'épithélium épидидymaire (Figure 2f).

3.1.3 Localisation par double marquage en immunofluorescence des molécules du CMH et FasL dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques

Pour déterminer si les cellules HLA de classe II+ étaient ou non FasL+, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-HLA (DR, DP, DQ) et l'anticorps polyclonal anti-FasL sur des coupes de testicule et de l'épididyme du vison fertile et orchitique.

Dans un testicule sain, le double marquage démontrait la présence dans le tissu interstitiel des cellules marquées au HLA de classe II (Figure 3a) et FasL - (Figure 3a'). Dans les tubules séminifères normaux, nous n'avons pas observé un marquage HLA (Figure 3a), mais quelques cellules sont FasL+ (Figure 3a'). Dans le testicule de vison orchitique le double marquage a identifié, sous la capsule, des cellules HLA de classe II positives (Figure 3b) qui étaient FasL négatives (Figure 3b'). Dans les tubules séminifères nous avons observés des cellules HLA de classe II positives (Figure 3b) qui étaient FasL positives (Figure 3b'). Dans le tissu interstitiel on a identifié des cellules HLA de classe II positives (Figure 3c) qui étaient FasL négatives (Figure 3c'). Dans le tissu interstitiel, les cellules FasL positives (Figure 3c') étaient HLA de classe II négatives (Figure 3c). Dans l'épididyme normal nous avons identifié dans l'espace interstitiel des cellules positives pour HLA de classe II (Figure 4a) qui étaient négatives pour FasL (Figure 4a'). Dans l'épididyme de vison orchitique nous avons identifié dans les espaces interstitiels des cellules HLA positives (Figure 4b), mais FasL négatives (Figure 4b').

3.1.4 Localisation par double marquage en immunofluorescence des macrophages et de cellules FasL positives dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques

Pour déterminer si les macrophages étaient ou non FasL+, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal l'anti-CD163 et l'anticorps anti-FasL, sur des coupes de testicule et d'épididyme de visons adultes, sains et infertiles, obtenus en février et en mars.

Dans le testicule normal on a identifié des macrophages CD163 positifs dans l'espace interstitiel (Figure 5a) qui présentent un faible marquage FasL positif (Figure 5a'). Dans les espaces interstitiels du testicule de vison orchitique (Figure 5b) on a observé des macrophages marqués au CD163. Le marquage avec le NCL-Macro (Figure 1 b) est plus prononcé en comparaison avec le marquage CD 163 (Figure 5 b) ; ceci pourrait être expliqué par une différence de nature des antigènes reconnus par les deux anticorps. L'anticorps NCL-Macro (3A5) reconnaît un antigène de la famille de CD68, qui est probablement une molécule de différenciation (Jaspars et coll., 1994). L'antigène reconnu par CD163 est un récepteur scavenger probablement modifié dans le vison orchitique, ce qui pourrait masquer l'épitope reconnu par l'anticorps utilisé. Dans l'épididyme normal nous avons identifié des macrophages CD163 positifs dans le tissu interstitiel (Figure 5c). Ces cellules n'étaient pas marquées au FasL (Figure 5c'). Dans l'épididyme de vison orchitique les macrophages marqués au CD163 (Figure 5d) n'étaient pas marqués au FasL (Figure 5d').

3.1.5 Localisation par immunoperoxydase des cellules CD4 positives dans les testicules et les épидидymes de visons normaux et orchitiques

Dans le but de localiser les cellules CD4+, nous avons incubé des coupes de testicule et de l'épididyme de visons adultes sains et orchitiques avec l'anticorps anti-CD4.

Sur les coupes de testicule de vison sain on n'a pas marqué de cellules CD4+ (Figure 6). Par contre, le testicule de vison orchitique démontrait la présence des cellules CD4+ dans les espaces interstitiels (Figures 6b, c) et à l'intérieur des tubules séminifères complètement détruits (Figure 6c). Dans l'épididyme de vison fertile nous avons observé des cellules CD4+ dans le tissu interstitiel (Figure 6d), alors que dans un épididyme de vison orchitique on a mis en évidence une accumulation de cellules CD4+ dans le tissu interstitiel (Figure 6e).

3.1.6 Localisation par double marquage en immunofluorescence de cellules CD4 et FasL dans les testicules et les épididymes de visons normaux et orchitiques

Pour déterminer si les cellules CD4+ étaient ou non FasL positives, nous avons utilisé le double marquage en immunofluorescence. Nous avons incubé des coupes de testicule et d'épididyme de visons fertiles et orchitiques avec l'anticorps anti-CD4 et l'anticorps anti-FasL.

Dans le testicule normal on n'a pas identifié de cellules CD4 positives dans l'espace interstitiel (Figure 7a). Néanmoins, l'espace interstitiel présentait des cellules FasL positives (Figure 7a'). Des cellules CD4+ se trouvaient dans le tissu interstitiel du testicule de vison orchitique (Figures 7b, c), mais ces cellules étaient FasL négatives (Figure 7b'). À l'intérieur des tubules séminifères des visons orchitiques qui présentaient une dégénérescence plus avancée, on a marqué des cellules CD4+ (Figure 7c) qui n'étaient pas FasL + (Figure 7c'). Dans le tissu interstitiel de l'épididyme de vison normal, nous avons observé des cellules CD4+ (Figure 8a) qui étaient FasL- (Figure 8a') et des cellules FasL+ (Figure 8a') qui étaient CD4- (Figure 8a). Dans l'épithélium épididymaire normal, nous n'avons pas identifié de cellules CD4+ (Figure 8a). Par

contre, nous avons identifié des cellules FasL⁺ (Figure 8a'). Au contraire, dans l'épithélium (Figure 8b) et le tissu interstitiel (Figure 8c) de l'épididyme de vison orchitique nous avons identifié des cellules CD4⁺, qui étaient FasL⁻ (Figure 8b', 8c').

3.1.7 Localisation par immunoperoxydase des cellules CD8⁺ dans les testicules et les épididymes de visons normaux et orchitiques

Dans le but de localiser des cellules CD8⁺, nous avons incubé des coupes de testicule et de l'épididyme du vison adulte sain et orchitique avec l'anticorps anti-CD8.

Dans le testicule normal, nous n'avons pas identifié de cellules CD8⁺ ni dans l'espace interstitiel ni dans les tubules séminifères (Figure 9a). Au contraire, dans le testicule de vison orchitique nous avons marqué des cellules CD8⁺ dans les espaces interstitiels (Figure 9b, c, d,) et à l'intérieur des tubules séminifères détruits (Figure 9c). Dans l'épididyme de vison normal nous avons observé quelques cellules CD8⁺ dans le tissu interstitiel (Figure 10a), alors que dans un épididyme de vison orchitique on a observé une accumulation des cellules CD8⁺ dans le tissu interstitiel (Figure 10b, c, d) et aussi à la base de l'épithélium (Figure 10b, d).

3.1.8 Localisation, par double marquage, en immunofluorescence des CD8 et du FasL dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques

Afin de déterminer si les cellules CD8⁺ étaient aussi FasL⁺, nous avons utilisé le double marquage en immunofluorescence, en utilisant l'anticorps anti-CD8 et l'anticorps anti-FasL sur des coupes de testicule et de l'épididyme de visons fertiles et orchitiques.

Dans le testicule normal on a identifié de rares cellules CD8⁺ dans l'espace interstitiel (Figure 11a,) qui n'étaient pas FasL⁺ (Figure 11a'). À l'intérieur des tubules

séminifères de vison orchitique on a marqué des cellules CD8+ (Figure 11b) qui n'étaient pas FasL + (Figure 11b'). Les cellules FasL positives d'un tubule séminifère de vison orchitique (Figure 11b') étaient CD8 - (Figure 11b). Des cellules CD8+ présentes dans le tissu interstitiel du testicule de vison orchitique (Figure 11c) étaient FasL - (Figure 11c'). Dans le tissu interstitiel de l'épididyme normal nous avons observé des cellules CD8 + (Figure 12a) qui étaient FasL - (Figure 12a'). Dans l'épithélium épидидymaire de testicule normal, nous n'avons identifié ni des cellules CD8+ (Figure 12a), ni des cellules FasL positives (Figure 12a'). Par contre, dans l'épithélium épидидymaire de vison orchitique nous avons identifié des cellules CD8+ (Figure 12c), qui étaient FasL + (Figure 12c'). Dans le tissu interstitiel de l'épididyme de vison orchitique nous avons observé de nombreuses cellules CD8+ (Figure 12b, c) qui étaient FasL - (Figures 12b', c'). Nous avons marqué dans l'espace interstitiel quelques cellules qui étaient simultanément CD8+ et FasL+ (Figures 12c, c').

3.2 Étude du statut de l'immunité humorale chez le vison adulte orchitique

3.2.1 Caractérisation du sérum de visons adultes sains et orchitiques par immunoperoxydase.

Le marquage à la peroxydase était beaucoup plus important dans les membranes limitantes des tubules séminifères et des capillaires sanguins du testicule sain en présence du sérum de vison infertile (Figure 13b) qu'en présence du sérum normal (Figure 13a). Dans les tubules séminifères nous avons mis en évidence une réaction autour de spermatocytes (Figure 13 b). Sur des coupes d'épididyme normal incubées avec le sérum d'animal sain, nous avons observé un faible marquage dans le tissu

interstitiel (Figure 13c). Après incubation de l'épididyme sain avec un sérum de vison orchitique, le marquage dans le tissu interstitiel était plus important autour des membranes limitantes du tubule épидидymaire (Figure 13d) et dans le tissu conjonctif de l'espace interstitiel (Figure 13d). Les spermatozoïdes qui se trouvent dans la lumière de l'épididyme sont marqués (Figure 13d).

3.2.2 *Caractérisation de la présence d'IgG dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot*

Dans le sérum de vison fertile (Figure 14a, ligne A) et orchitique (Figure 14a, ligne B), en utilisant l'anti-IgG de vison, nous avons identifié 5 bandes distinctes qui correspondaient aux poids moléculaires de 25-, 36-, 61-, 103- et 145 kDa respectivement. Après la quantification de l'intensité de chacune de ces bandes (Figure 14 b), nous avons observé que les protéines de poids moléculaires de 25- et 36 kDa étaient présentes en plus grande quantité dans le sérum d'animaux orchitiques en comparaison avec le sérum normal. Ces différences étaient significatives ($P < 0.01$). Dans les fractions enrichies en tissu interstitiel et en tubules séminifères de vison sain, après incubation avec un sérum de vison orchitique nous avons mis en évidence les mêmes bandes immuno-réactives, des poids moléculaires autour de 150-, 130-, 100-, 80- et 50 kDa avec des intensités plus fortes, en comparaison avec le sérum normal (Figure 14c).

Dans l'épididyme du vison normal, après incubation avec du sérum de vison sain (Figure 14d A) ou orchitique (Figure 14d B), nous avons détecté la présence des mêmes bandes (avec des masses moléculaires autour de 150-, 80- et 63 kDa), mais l'intensité des bandes était plus forte après l'incubation avec le sérum de vison orchitique.

3.2.3 Localisation par immunoperoxydase de dépôts d'IgG dans le testicule et l'épididyme de visons sains et orchitiques

Afin d'identifier et de localiser les dépôts d'IgG dans les animaux sains et orchitiques, nous avons incubé des coupes de testicule et d'épididyme de visons sains et orchitiques avec l'anticorps anti-IgG de vison. Les résultats montrent une faible marquage autour des membranes limitantes des tubules séminifères (Figure 14'a) et de l'épididyme (Figure 14'd) d'animaux normaux. Sur des coupes de tissus de visons orchitiques on a mis en évidence des dépôts d'IgG dans les membranes limitantes des tubules séminifères (Figure 14'b, c), dans le tissu interstitiel du testicule (Figure 14'b) et de l'épididyme (Figures 14'e, f).

3.2.4 Caractérisation de la présence d'IgM dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot

Après l'incubation avec l'anticorps anti-IgM humain, nous avons identifié 4 bandes distinctes dans le sérum de vison sain (Figure 15a, ligne A) et orchitique (Figure 15a, ligne B), qui correspondent aux poids moléculaires de 21-, 47-, 61- et 103- kDa. Les bandes obtenues ont été quantifiées en utilisant le programme Scion Image (Figure 15 b). Nous avons observé que toutes les bandes identifiées sont présentes avec une intensité plus grande dans le sérum de vison orchitique que dans le sérum de vison sain. Cette différence entre les deux sérums était significative ($P < 0.01$).

Après l'incubation des fractions enrichies en tissu interstitiel et en tubules séminifères de vison fertile, avec un sérum de vison orchitique et l'anticorps anti-IgM, nous avons identifié des bandes immuno-réactives additionnelles autour de 200 kDa et autour de 120 kDa en comparaison avec l'incubation du sérum de vison fertile (Figure

15c). Après l'incubation de l'épididyme du vison fertile, avec un sérum de vison sain (Figure 15d, ligne A) ou orchitique (Figure 15d, ligne B) nous avons observé les mêmes bandes.

3.2.5 Localisation par immunoperoxydase de dépôts d'IgM dans le testicule et l'épididyme de visons sains et orchitiques

Pour identifier les dépôts de l'IgM, nous avons incubé des coupes de testicule et de l'épididyme de visons sains et orchitiques avec l'anticorps anti-IgM humain. Nous avons observé un marquage faible autour des membranes limitantes (interne et externe) vasculaires, dans le tissu interstitiel du testicule (Figure 15'a) et de l'épididyme (Figure 15'c) de visons fertiles. Au contraire, sur des coupes de testicule de vison orchitique, nous avons trouvé des dépôts d'IgM au niveau de toutes les membranes limitantes de tubules séminifères et des capillaires sanguins (Figure 15'b). Dans l'épididyme de vison orchitique, les dépôts se trouvaient dans la membrane limitante de l'épithélium épидидymaire (Figure 15'd). Dans l'épididyme de vison orchitique nous avons aussi identifié des dépôts d'IgM localisées dans les espaces intertubulaires (Figure 15'd).

3.2.6 Caractérisation de la présence d'IgD dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot

Nous avons identifié une seule bande de 145 kDa dans les sérums de visons sains et orchitiques. Après la quantification nous avons détecté une différence significative ($p < 0.01$) dans le taux d'IgD dans le sérum de vison orchitique par comparaison avec le sérum de vison sain (Figure 16b). Nous avons fait migrer 25 μ g de protéines de fractions enrichies en tubules séminifères, en tissu interstitiel (Figure 16c) et de l'épididyme (Figure 16 d) sur un gel 8% SDS-PAGE. Les membranes ont été incubées avec du sérum

de vison sain et orchitique et ensuite avec l'anticorps anti-IgD. Les sérums des animaux sains et infertiles reconnaissent les mêmes bandes avec la même intensité dans les échantillons des testicules examinés (Figure 16c). Dans l'épididyme, les bandes sont plus fortes après l'incubation avec le sérum de vison orchitique (Figure 16d).

3.2.7 Localisation par immunoperoxydase de dépôts d'IgD dans le testicule et l'épididyme de visons sains et orchitiques

Afin d'identifier les dépôts d'IgD dans les animaux sains et orchitiques nous avons incubé des coupes de testicules et d'épididymes de visons sains et orchitiques avec l'anticorps anti-IgD humain. Dans les testicules (Figure 16'a) et les épididymes normaux (Figure 16'c) il n'y avait pas de dépôts d'IgD. Dans les espaces interstitiels de testicule d'animaux orchitiques nous avons identifié de dépôts d'IgD (Figure 16'b). Dans l'épididyme de vison orchitique nous n'avons pas détecté un marquage pour de dépôts d'IgD (Figure 16'd).

3.2.8 Caractérisation de la présence d'IgE dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot

On a identifié 3 bandes distinctes dans les sérums d'animaux sains et orchitiques, à 25-, 61- et 79 kDa (Figure 17a). Après quantification, en utilisant le programme Scion Image (Figure 17b) nous n'avons pas observé des différences significatives entre les sérums de visons normaux et orchitiques. Nous avons fait migrer 25 µg de protéines de fractions enrichies en tubules séminifères, en tissu interstitiel (Figure 17c) et de l'épididyme (Figure 17d) sur un gel 8% SDS-PAGE. Les membranes ont été incubées avec du sérum de vison sain et orchitique et ensuite avec l'anticorps anti-IgE. Les

sérums des animaux sains et infertiles ont reconnu les mêmes bandes avec la même intensité dans les échantillons des tissus examinés (Figure 17c, d).

3.2.9 Localisation, par immunoperoxydase, des dépôts d'IgE dans les testicules et les épидидymes de visons sains et orchitiques

Afin d'identifier la présence de dépôts d'IgE dans les animaux sains et orchitiques, nous avons incubé des coupes de testicules et d'épididymes de visons avec l'anticorps anti-IgE humain. Dans le testicule (Figure 17'a) et l'épididyme normaux (Figure 17'c) il n'y avait pas de marquage pour l'IgE. Par contre, dans les testicules de visons orchitiques on a identifié un marquage aussi bien dans les tubules séminifères (Figure 17'b) que dans le tissu interstitiel (Figure 17'b). Dans l'épididyme de vison orchitique, nous avons détecté des dépôts d'IgE dans le tissu interstitiel épидидymaire (Figure 17'e), mais aussi dans l'épithélium épидидymaire (Figures 17'd, e).

3.2.10 Caractérisation de la présence d'IgA dans le sérum de visons sains et orchitiques par Western blot

Nous avons identifié 5 bandes de 25-, 61-, 72-, 82-, et 123 kDa dans le sérum de vison sain (Figure 18a, ligne A) et orchitique (Figure 18a, ligne B). Après la quantification, nous avons remarqué que seulement la bande de 82 kDa était significativement plus intense dans le sérum de vison infertile ($P < 0.01$) (Figure 18b). Des fractions enrichies en tubules séminifères, en tissu interstitiel (Figure 18c) et de l'épididyme (Figure 18d) ont été incubées avec du sérum de vison sain et orchitique et ensuite avec l'anticorps anti-IgA. Les bandes révélées dans les tissus examinés après l'incubation avec les deux sérums sont similaires (Figure 18c, d).

3.2.11 Localisation par immunoperoxydase de dépôts d'IgA dans le testicule et l'épididyme de visons sains et orchitiques

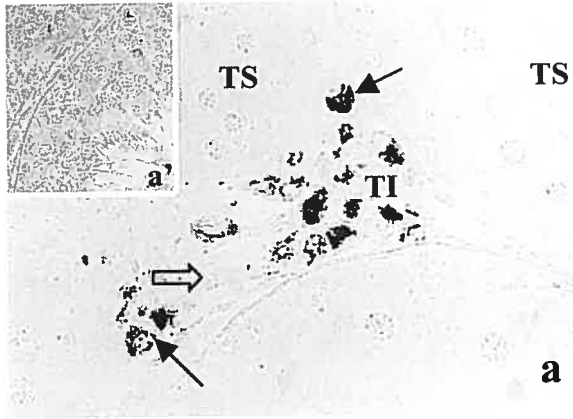
Afin de mettre en évidence la présence de dépôts d'IgA, nous avons incubé des coupes de testicule et de l'épididyme de visons sains et orchitiques avec l'anticorps anti-IgA humain. Dans le testicule (Figure 18'a) et l'épididyme normaux (Figure 18'c) on n'a pas observé un marquage pour l'IgA. Par contre, dans les testicules (Figure 18'b) et dans les épидидymes (Figure 18'd) de vison orchitique on a identifié un marquage dans des cellules localisées dans les espaces interstitiels.

Figure 1 Localisation par immunoperoxydase des macrophages dans le testicule et l'épididyme de visons normaux et orchitiques.

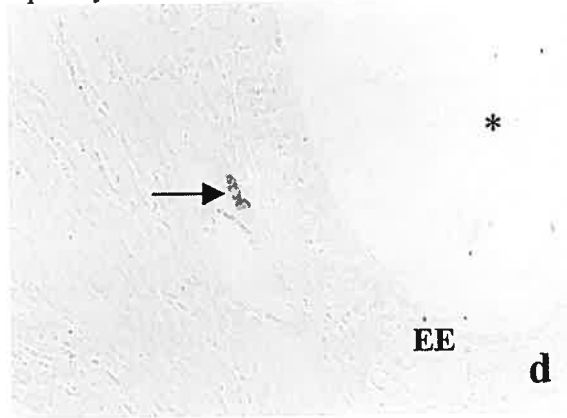
Afin de déterminer la présence et la localisation des macrophages, nous avons incubé des coupes de testicule (*a, b, c*) et d'épididyme (*d, e*) des visons normaux (*a, d*) et orchitiques (*b, c, e*) prélevées au cours des mois de février et de mars avec l'anticorps anti-macrophages (NCL-Macro). Le contrôle négatif, incubé en absence d'anticorps anti-macrophages apparaît en *a'*. Les flèches noires montrent des cellules marquées dans le tissu interstitiel du testicule et de l'épididyme. Par contre, les flèches vides montrent la présence de cellules qui ne sont pas marquées dans le tissu interstitiel du testicule (*b, c*) et de l'épididyme (*e*). Les têtes de flèches montrent la présence des macrophages à l'intérieur des tubules séminifères (*c*).

EE- épithélium épididymaire; TI- tissu interstitiel; TS –tubule séminifère; * - lumière épididymaire. Magnification : a, a', b, d, e – X 630, c - X 400.

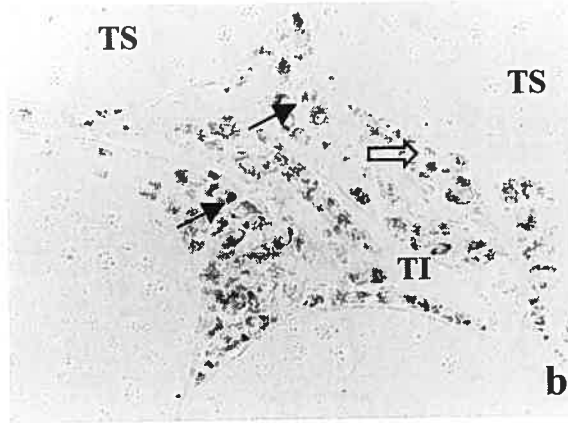
Figure 1
Testicule normal



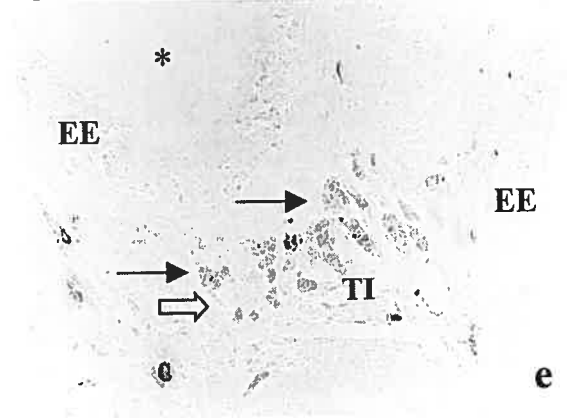
Épididyme normal



Testicule infertile



Épididyme infertile



Testicule infertile

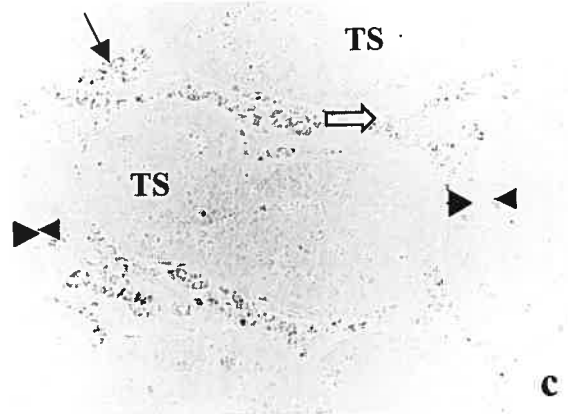


Figure 2 Localisation par immunoperoxydase des cellules HLA de classe II dans les testicules et les épидидymes de visons normaux et orchitiques.

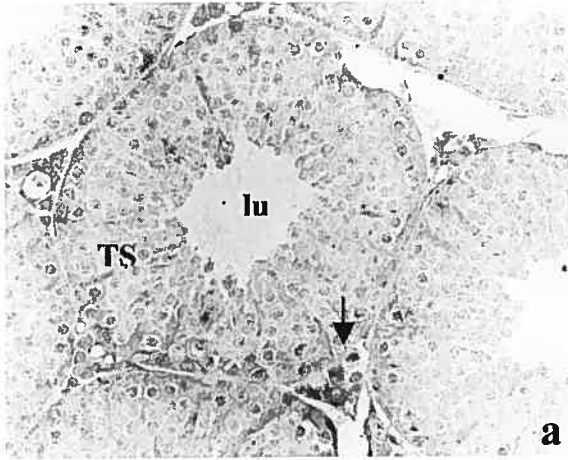
Afin de déterminer la présence et la localisation des cellules HLA de classe II, nous avons incubé des coupes de testicules et d'épididymes de vison du mois de février et de mars, fertiles (*a, d*) et orchitiques (*b, c, e, f*) avec l'anticorps anti-HLA (DR, DP, DQ). Les flèches noires montrent la présence des cellules marquées dans les espaces interstitiels du testicule de vison sain et orchitique (*a, b, c*) et dans un tubule séminifère d'un vison orchitique (*b* - tête de flèche). Dans la microphotographie *b*, les flèches vides montrent une infiltration massive de cellules HLA+ sous-capsulaire d'un testicule. Au niveau de l'épididyme (*e*) on a mis en évidence des cellules marquées dans l'espace interstitiel (flèches noires) mais aussi des cellules qui se trouvent dans l'épithélium épидидymaire (*f* - tête de flèche).

EE- épithélium épидидymaire; ET- épithélium tubulaire ; TI- tissu interstitiel; TR- tubuli recti; TS –tubule séminifère; lu- lumière du tubule séminifère; * - lumière

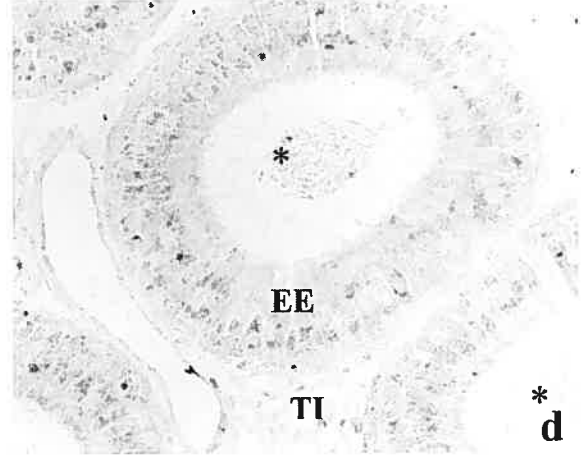
épидидymaire. Magnification : a, d - X 400 ; b, c, e, f – X 630.

Figure 2

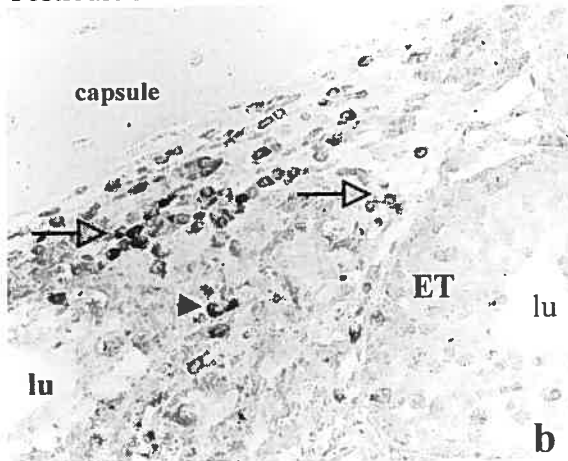
Testicule normal



Épididyme normal



Testicule infertile



Épididyme infertile

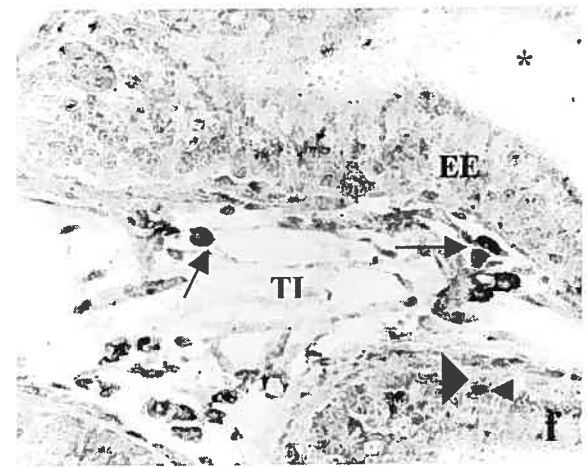
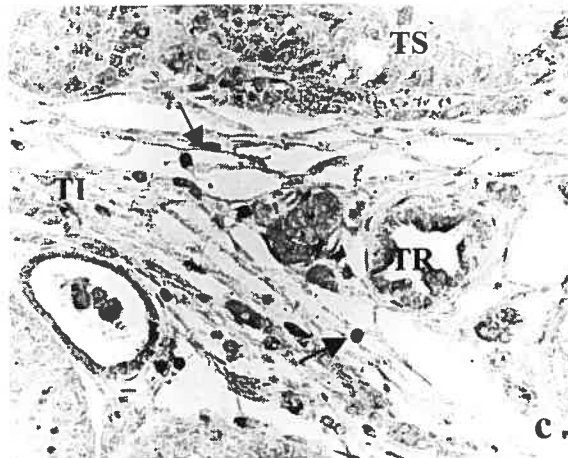
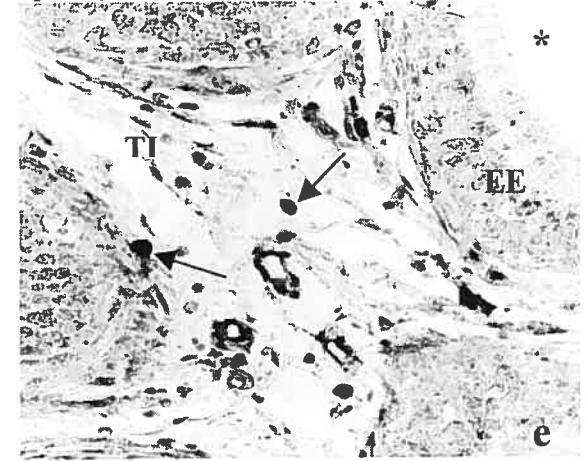


Figure 3 Localisation par double marquage, en immunofluorescence des cellules HLA de classe II et FasL dans les testicules de vison normaux et orchitiques.

Afin de mieux déterminer la présence et la localisation des cellules qui expriment HLA de classe II et du FasL, nous avons utilisé l'immunofluorescence. Les coupes de testicules de vison sain (*a*- HLA, *a'*- FasL) et orchitique (*b*, *b'*, *c*, *c'*) furent incubées avec l'anticorps anti-HLA (-DR, DP, DQ) et l'anticorps anti-FasL. Dans les microphotographies *a* et *a'* les flèches blanches montrent dans le tissu interstitiel des cellules positives pour l'HLA, mais négatives pour le FasL. Dans les images *b*, *b'* les flèches vides indiquent la présence dans le testicule de vison infertile, de cellules marquées au l'HLA et au FasL dans le tubule séminifère (*b'*). Dans la région sous-capsulaire, les flèches blanches indiquent des cellules HLA positives (*b*) et FasL négatives (*b'*.) Dans le tissu interstitiel (*c*, *c'*) on observe une augmentation du signal pour l'anticorps anti-HLA, alors que les têtes des flèches montrent le marquage au FasL.

TI- tissu interstitiel; TS –tubule séminifère; lu- lumière du tubule séminifère;
Magnification : X 630.

Figure 3

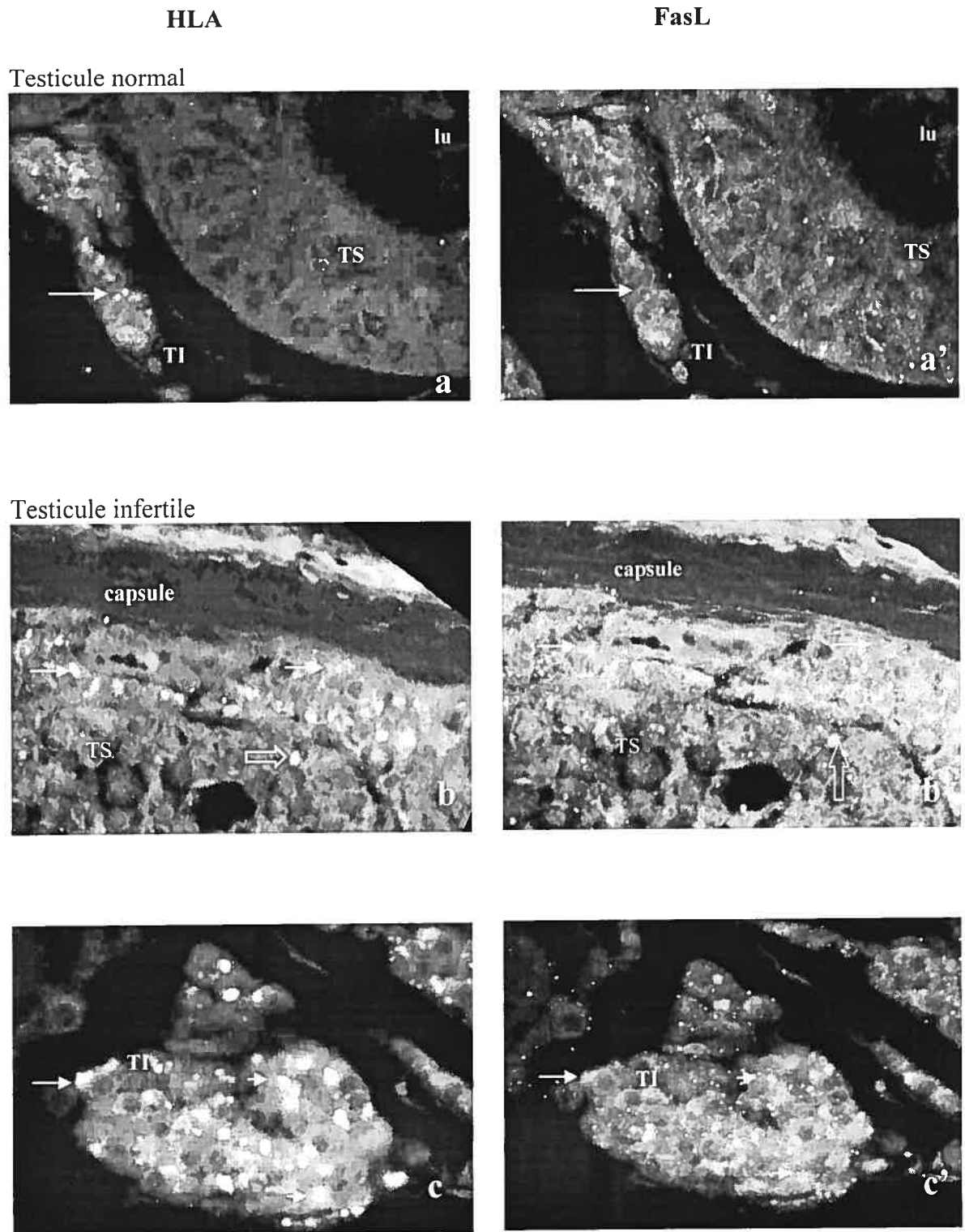


Figure 4 Localisation par double marquage, en immunofluorescence, des cellules qui expriment le HLA de classe II et le FasL dans les épидидymes de visons normaux et orchitiques.

Pour déterminer la localisation des cellules HLA de classe II positives et/ou FasL dans l'épididyme, nous avons incubé des coupes d'épididyme de vison fertile (*a, a'*) et de vison orchitique (*b, b', c, c'*) l'anticorps avec anti-HLA (DR, DP, DQ) et l'anticorps anti-FasL. Les flèches blanches montrent la présence des cellules marquées pour HLA (*a, b*) et qui ne sont pas marquées FasL (*a', b'*) dans l'espace interstitiel des épидидymes de visons normaux et orchitiques. Dans l'épithélium épидидymaire des visons orchitiques on retrouve de cellules positives pour HLA (*b* - flèche vide) et négatives pour FasL (*b'*- flèche vide).

EE- épithélium épидидymaire; TI- tissu interstitiel; * - lumière épидидymaire.

Magnification : X 630

Figure 4

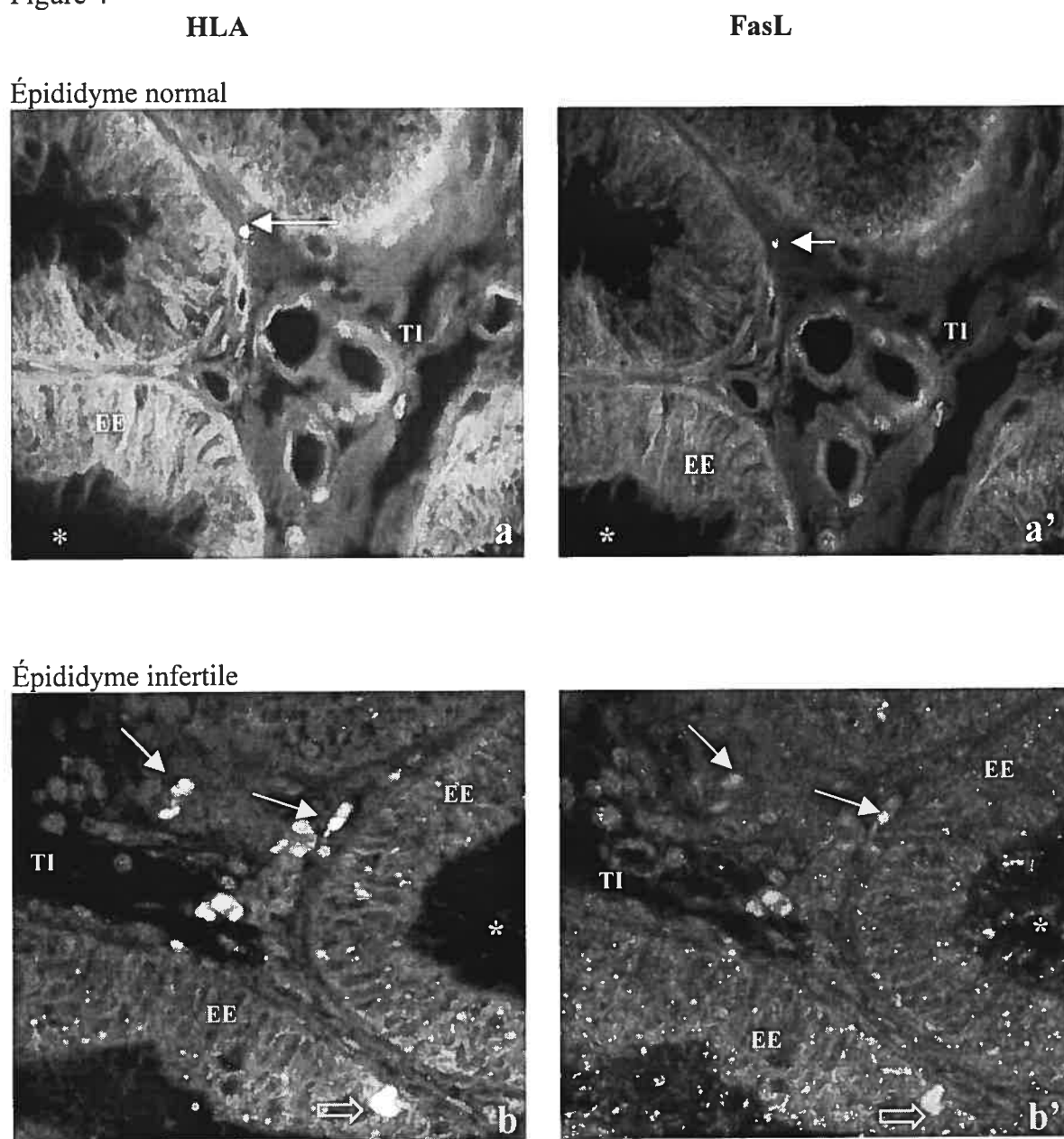


Figure 5 Localisation par double marquage, en immunofluorescence, des macrophages et de cellules qui expriment le FasL dans le testicule et l'épididyme de visons normal et orchitique.

Afin de déterminer si les macrophages testiculaires étaient Fas-L positifs, nous avons incubé des coupes de testicule et de l'épididyme, de visons sains (*a, a', c, c'*) et orchitiques (*b, b', d, d'*) avec l'anticorps monoclonal anti-CD163 et l'anticorps polyclonal anti-FasL. Les flèches blanches identifient la présence des cellules CD163 positives, donc des macrophages, dans l'espace interstitiel du testicule de vison fertile (*a*) et infertile (*b*). Ces cellules sont faiblement marquées au FasL (*a', b'*). Dans l'épididyme de vison sain et infertile, nous avons mis en évidence quelques macrophages CD163 positifs au niveau du tissu interstitiel (*c, d*), mais qui ne sont pas marqués au FasL (*c', d'*).

EE- épithélium épидидymaire; TI- tissu interstitiel; TS –tubule séminifère; lu- lumière du tubule séminifère. Magnification : X 630

Figure 5

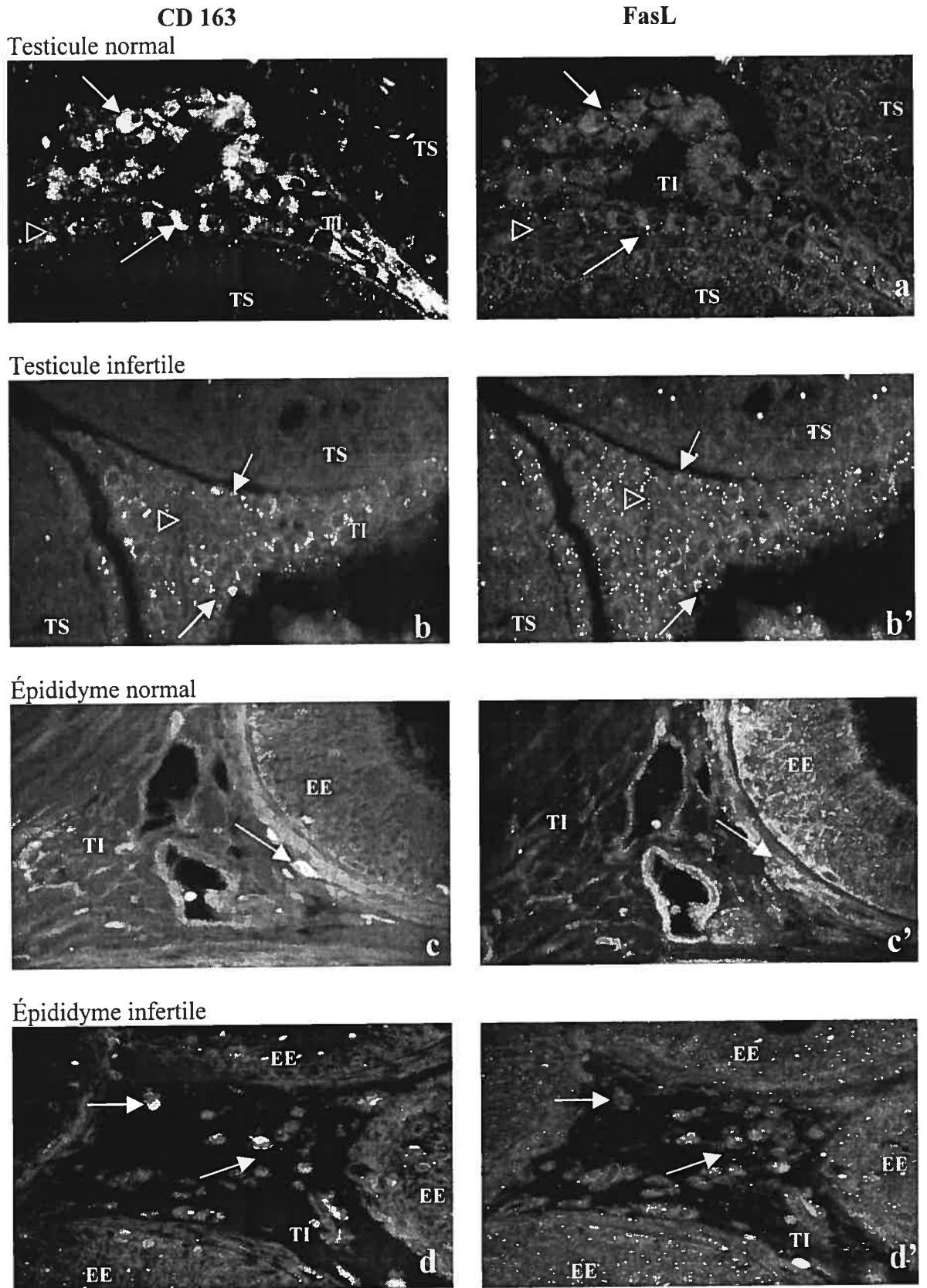


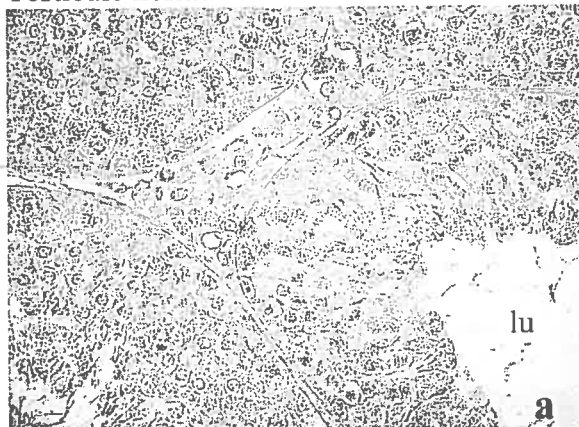
Figure 6 Localisation par immunoperoxydase de cellules CD4 positives dans les testicules et les épидидymes de visons normaux et orchitiques.

Afin de déterminer la présence et la localisation des cellules CD4⁺, nous avons incubé avec l'anticorps anti-CD4⁺ des coupes de testicules de vison sain (*a*) et orchitique du mois de mars (*b, c*) et des épидидymes de visons normaux (*d*) et orchitiques (*e*). Le testicule normal ne présente pas des cellules marquées avec l'anticorps anti-CD4 (*a*). Des cellules marquées se retrouvent dans l'espace interstitiel (*b, c* - flèches noires) et dans un tubule séminifère d'un testicule de vison orchitique (*b* - tête de flèche). Dans l'épididyme normal (*d*) on a mis en évidence des cellules marquées dans l'espace interstitiel (flèches noires). Dans l'épididyme de vison orchitique (*f*), nous avons mis en évidence une augmentation de cellules CD4⁺ dans l'espace interstitiel par rapport au tissu sain.

EE- épithélium épидидymaire; TI- tissu interstitiel; TS -tubule séminifère; lu- lumière du tubule séminifère; * - lumière épидидymaire. Magnification : a, d - X 400 ; b, c, e - X

Figure 6

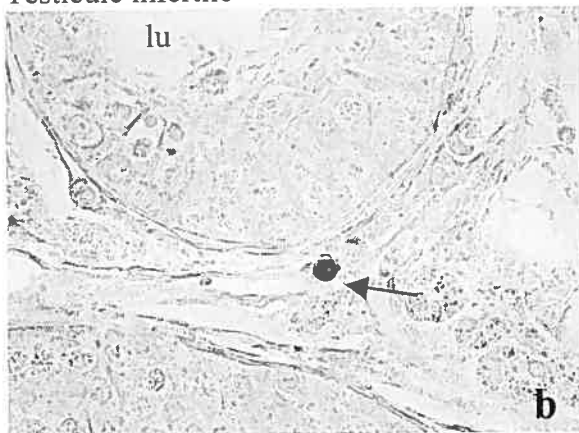
Testicule normal



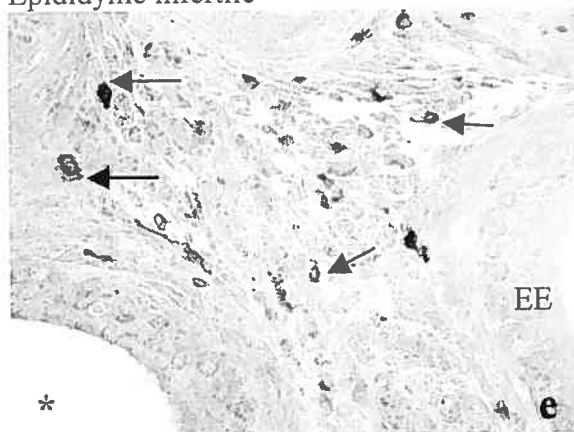
Épididyme normal



Testicule infertile



Épididyme infertile



Testicule infertile

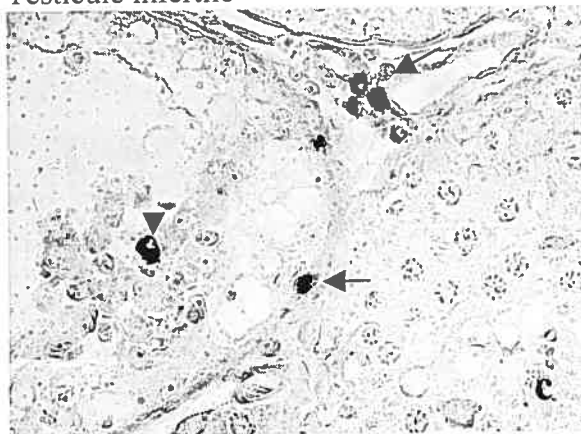


Figure 7 Localisation par double marquage, en immunofluorescence, des cellules qui expriment le CD4 et/ou le FasL dans les testicules des visons normaux et orchitiques.

Afin de déterminer si les cellules CD4+ étaient ou non FasL+, nous avons utilisé l'immunofluorescence, en utilisant l'anticorps anti-CD4+ et l'anticorps anti-FasL, sur des coupes de testicules de visons fertiles (*a, a'*) et orchitiques (*b, b', c, c'*). Dans les microphotographies *a* et *a'* les flèches vides montrent dans le tissu interstitiel des cellules négatives pour CD4 mais positives pour FasL. Dans les images *b, b'*, on montre l'existence dans le tissu interstitiel du testicule de vison infertile, des cellules CD4 marquées (flèches blanches), alors que les flèches vides indiquent la présence d'un marquage FasL positif sur d'autres cellules. Dans les tubules séminifères de vison orchitique présentant une dégénérescence plus avancée (*c, c'*) on a mis en évidence des cellules CD4+ qui sont Fas-L négatives à l'intérieur des tubules (flèches vides) et dans le tissu interstitiel (flèches blanches).

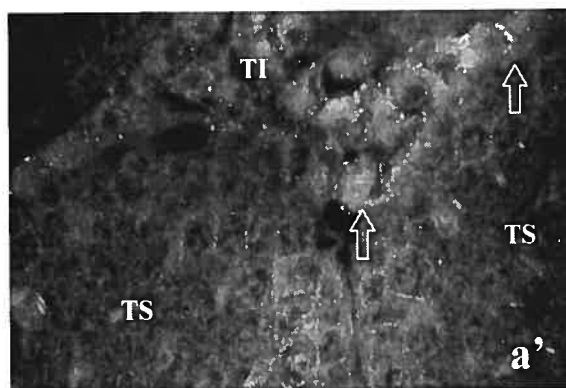
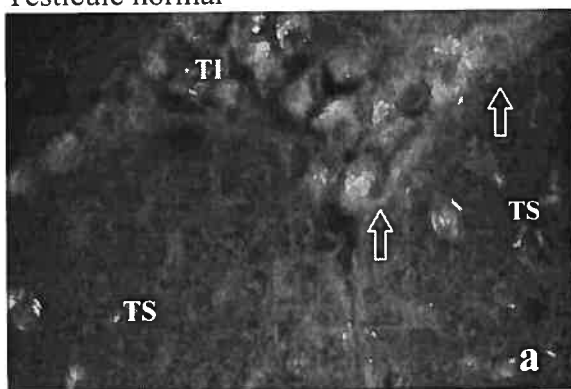
TI- tissu interstitiel; TS –tubule séminifère; Magnification : X 630.

Figure 7

CD4

FasL

Testicule normal



Testicule infertile

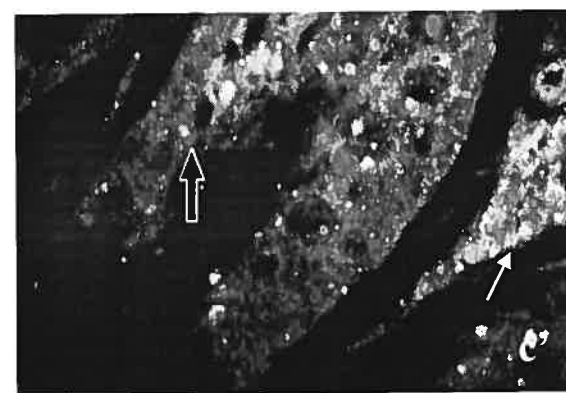
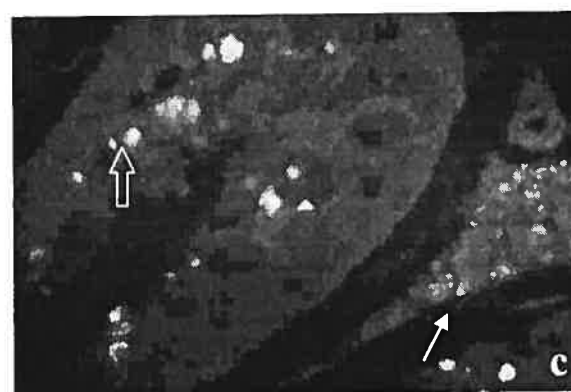
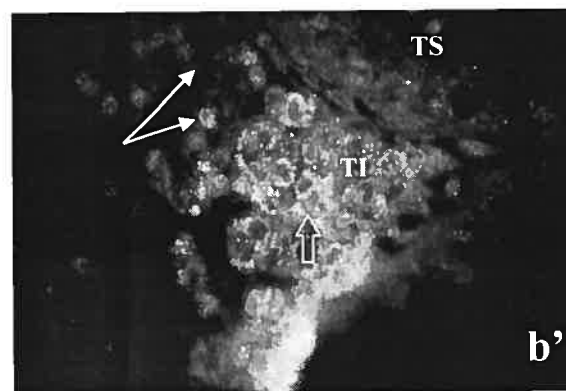
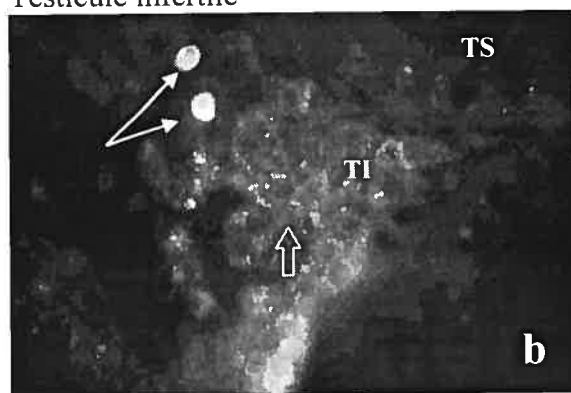


Figure 8 Localisation par double marquage, en immunofluorescence, des cellules CD4+ et FasL dans l'épididyme de visons normaux et orchitiques.

Pour déterminer si les cellules CD4+ étaient aussi FasL+, nous avons incubé des coupes de l'épididyme de visons fertiles (*a, a'*) et orchitiques (*b, b', c, c'*) avec l'anticorps anti-CD4+ et l'anticorps anti-FasL. Dans le tissu interstitiel normal (*a, a'*), nous avons observé des cellules CD4 positives (*a*, flèche blanche) qui étaient FasL négatives (*a'*- flèche blanche) et des cellules FasL positives (*a'*- flèche vide) qui étaient CD4 négatives (*a* - flèche vide). Les têtes des flèches (*a, a'*) indiquent dans l'épithélium épididymaire normal, de cellules CD4 négatives (*a*), mais FasL positives (*a'*). Dans l'épithélium épididymaire de vison orchitique nous avons identifié des cellules CD4 positives (*b* - têtes des flèches) qui étaient FasL négatives (*b'*- têtes de flèches). Dans le tissu interstitiel de l'épididyme de vison orchitique, nous avons aussi mis en évidence des cellules CD4+ (*c*- flèches blanches) qui étaient FasL négatives (*c'*- flèches blanches).

EE- épithélium épididymaire; TI- tissu interstitiel; lu- lumière du tubule séminifère; * - lumière épididymaire. Magnification : X 630

Figure 8

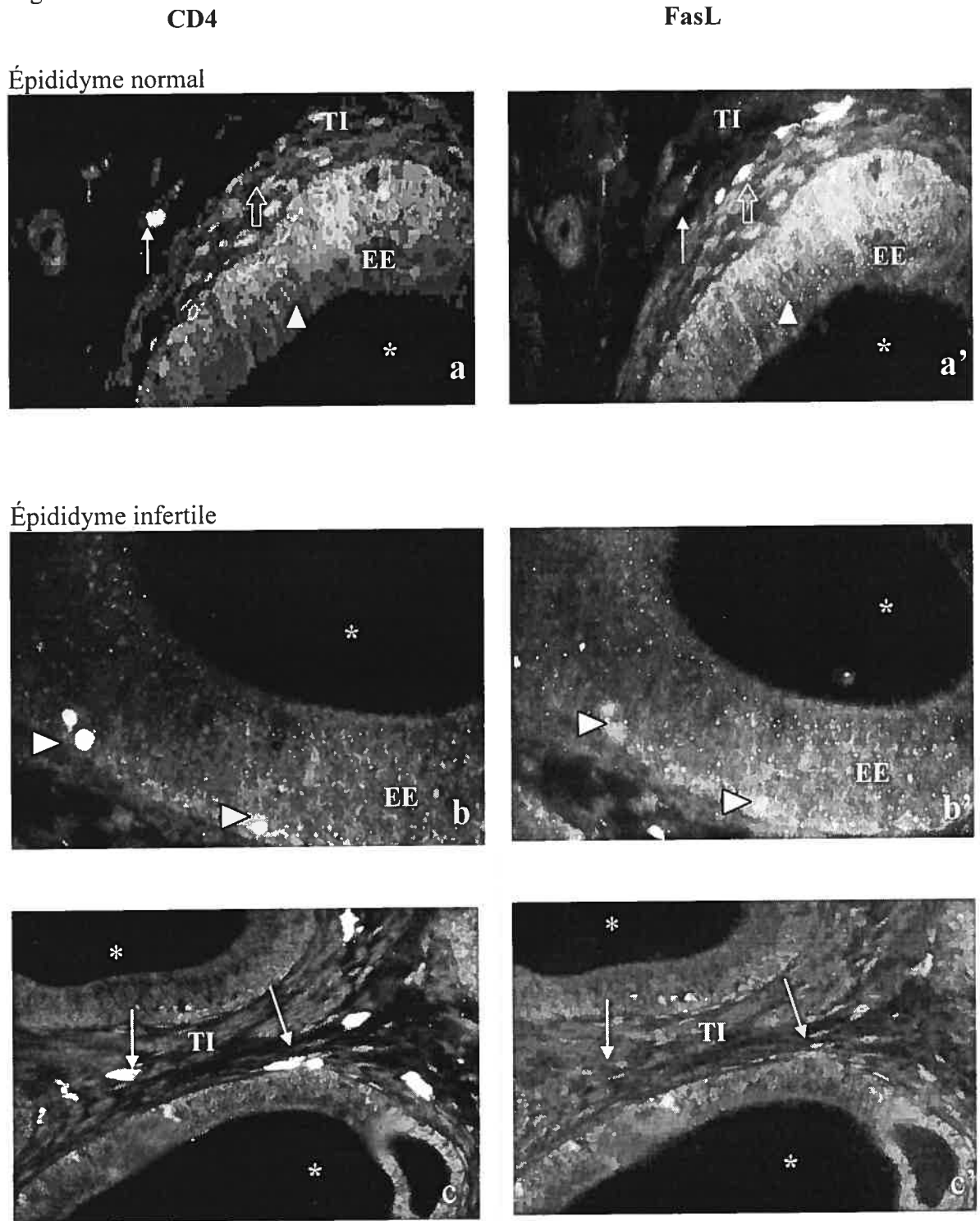


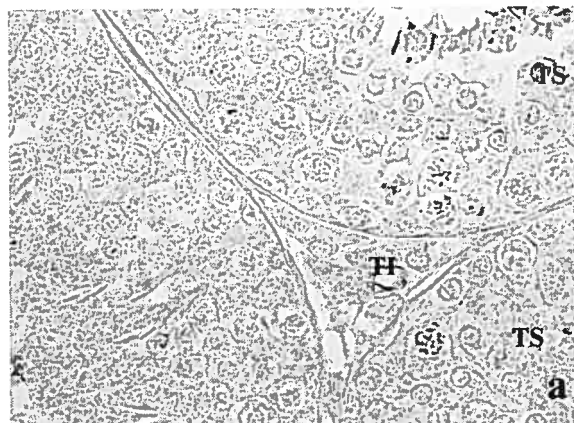
Figure 9 Localisation par immunoperoxydase des cellules CD8⁺, dans le testicule de vison normal et orchitique.

Dans le but d'identifier et de localiser les cellules CD8⁺ dans le testicule, nous avons incubé des coupes de testicule de visons fertiles (*a*) et orchitiques (*b*, *c*) avec l'anticorps anti-CD8⁺. Les flèches noires montrent la présence des cellules marquées dans l'espace interstitiel du testicule de vison orchitique (*b*, *c*, *d*). Dans les tubules séminifères de vison orchitique on retrouve aussi de cellules CD8⁺ (*c*- tête de flèche).

TI- tissu interstitiel; TS –tubule séminifère. Magnification : X 630

Figure 9

Testicule normal



Testicule infertile

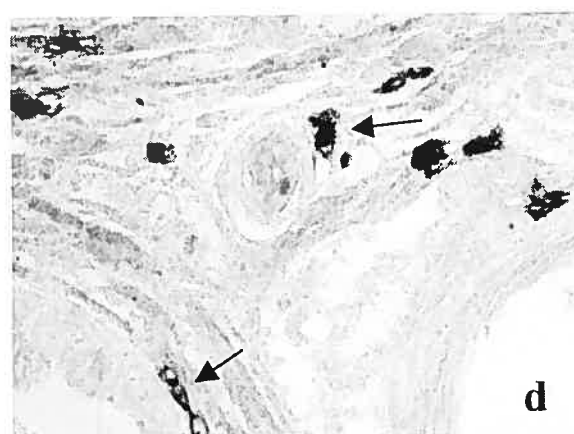
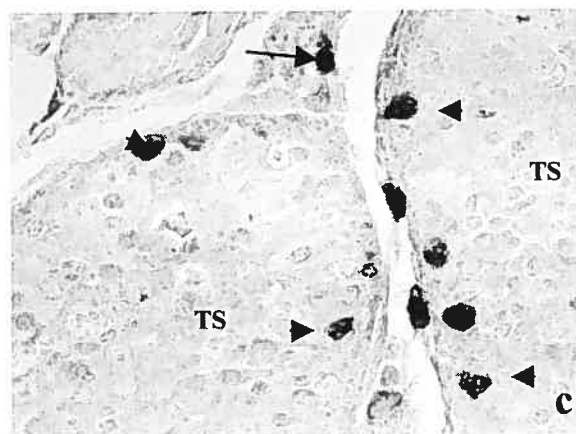


Figure 10 Localisation par immunoperoxydase des cellules CD8+ dans l'épididyme de visons normaux et orchitiques.

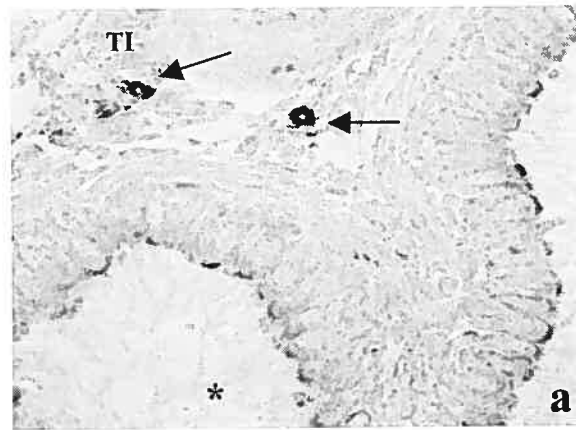
Pour identifier et localiser les cellules CD8+, nous avons incubé des coupes de l'épididymes de visons fertiles (*a*), et orchitiques (*b, c, d*) avec l'anticorps anti-CD8+. Les flèches noires montrent les cellules CD8+ dans le tissu interstitiel des épididymes de visons normaux (*a*) et orchitiques (*b, c, d*) alors que les flèches vides indiquent des cellules CD8+ localisées à la base de l'épithélium.

EE- épithélium épididymaire; TI- tissu interstitiel; * - lumière épididymaire.

Magnification : X 630

Figure 10

Épididyme normal



Épididyme infertile

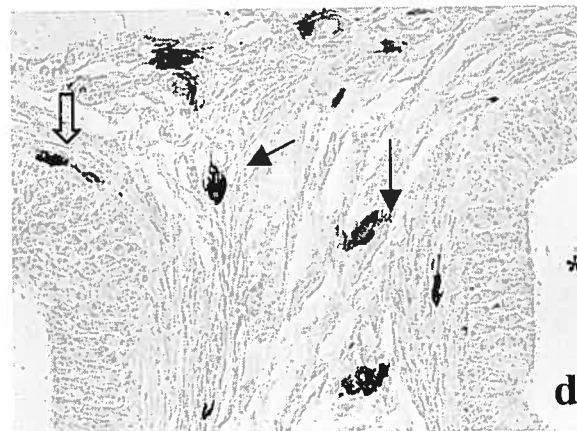
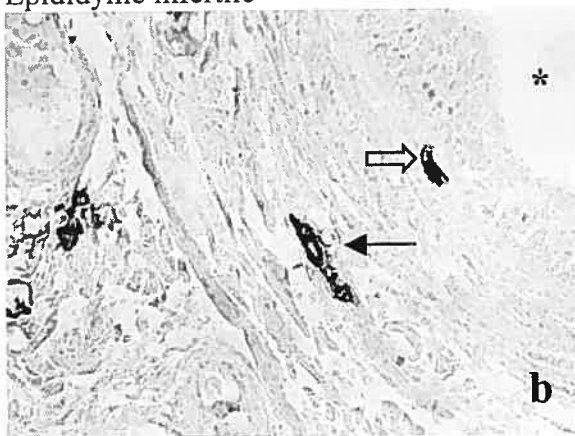


Figure 11 Localisation par double marquage, en immunofluorescence, de cellules CD8⁺ et FasL dans les testicules de visons normaux et orchitiques.

Afin de caractériser si les cellules CD8⁺ étaient aussi FasL positives, nous avons utilisé l'immunofluorescence. Nous avons incubé des coupes de testicules de visons fertiles (*a, a'*) et orchitiques (*b, b', c, c'*) avec l'anticorps anti-CD8⁺ et l'anticorps anti-FasL. Les flèches blanches montrent des cellules CD8⁺ dans le tissu interstitiel du testicule de vison sain (*a, a'*) et orchitique (*c, c'*), et les flèches vides identifient le marquage de FasL. Dans les illustrations *b, b'* on identifie la présence des cellules CD8⁺ à l'intérieur d'un tubule séminifère (flèche).

TI- tissu interstitiel; TS –tubule séminifère; Magnification : X 630

Figure 11

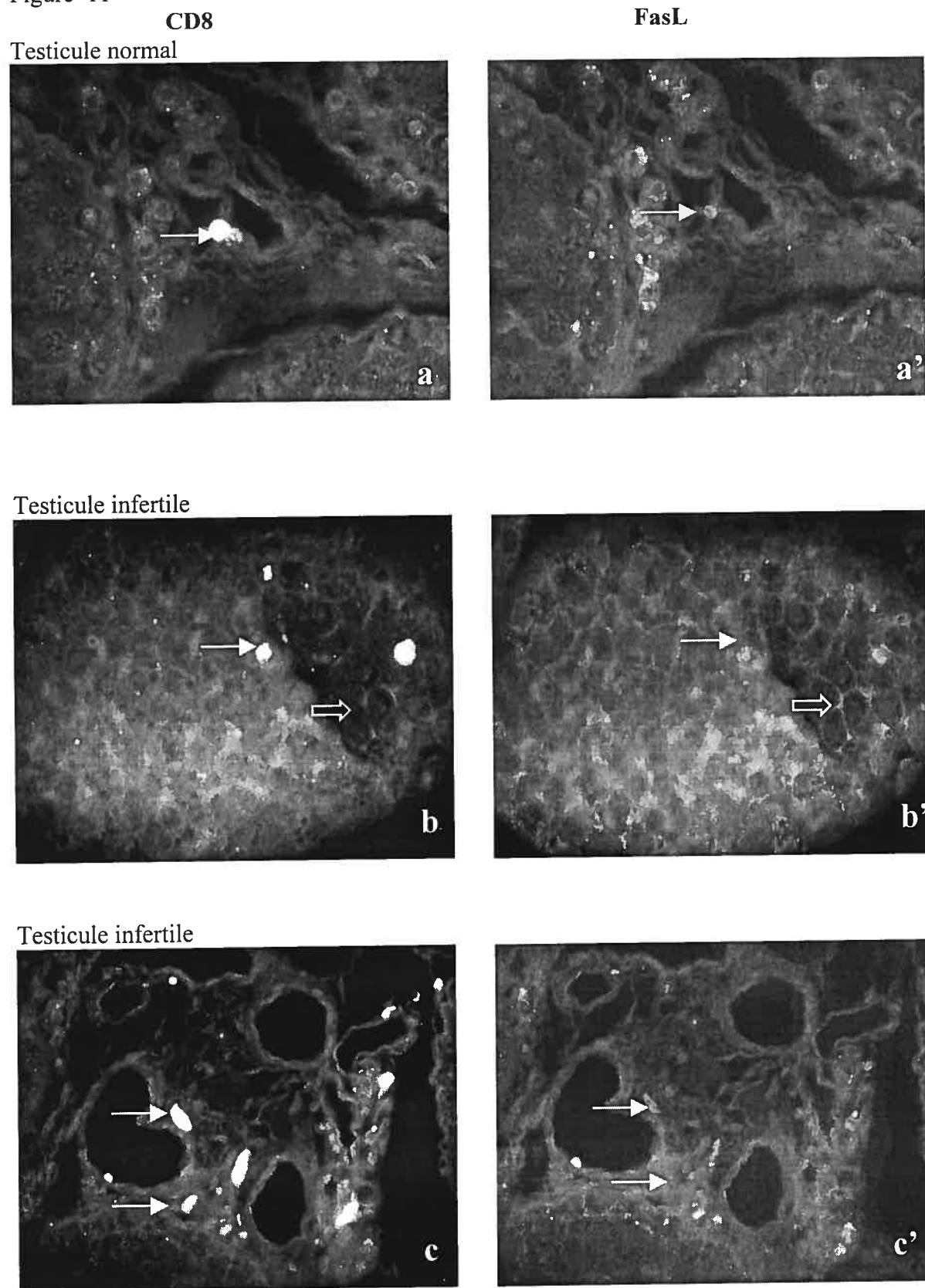


Figure 12 Localisation par double marquage, en immunofluorescence, des CD8+ et FasL dans les épидидymes de visons normaux et orchitiques.

Pour déterminer si les cellules CD8+ étaient aussi FasL+, nous avons incubé des coupes d'épididymes de visons fertiles (*a, a'*) et orchitiques (*b, b', c, c'*) avec l'anticorps anti-CD8+ et l'anticorps anti-FasL. Les flèches blanches montrent des cellules CD8+ dans le tissu interstitiel de l'épididyme (*a, a', c, c'*), et les flèches vides identifient le marquage de FasL. Les têtes de flèches montrent les cellules CD8+ qui se situent dans l'épithélium épидидymaire.

EE- épithélium épидидymaire; TI- tissu interstitiel; * - lumière épидидymaire.

Magnification : X 630

Figure 12

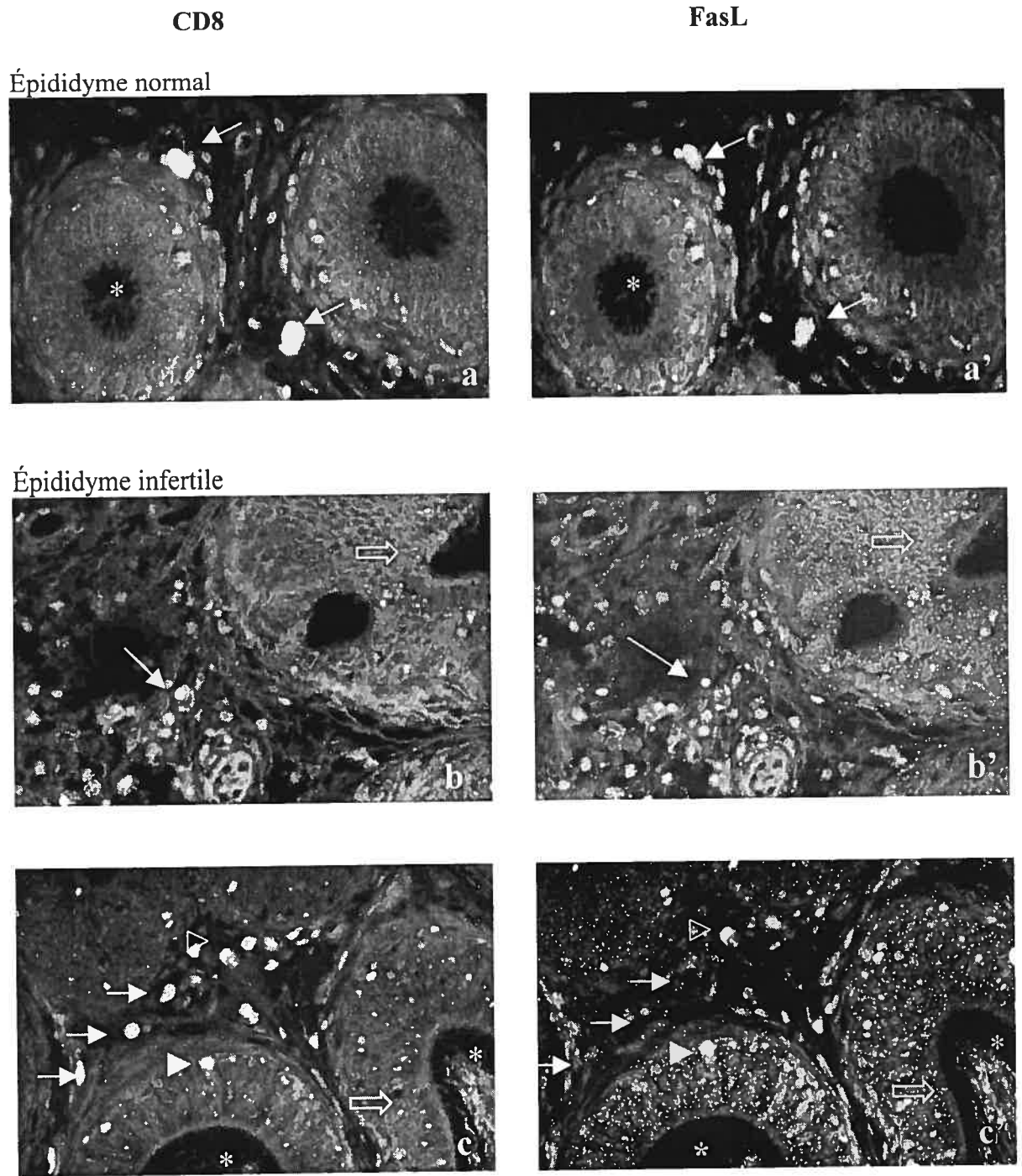


Figure 13 Caractérisation du sérum d'animaux sains et orchitiques par immunoperoxydase

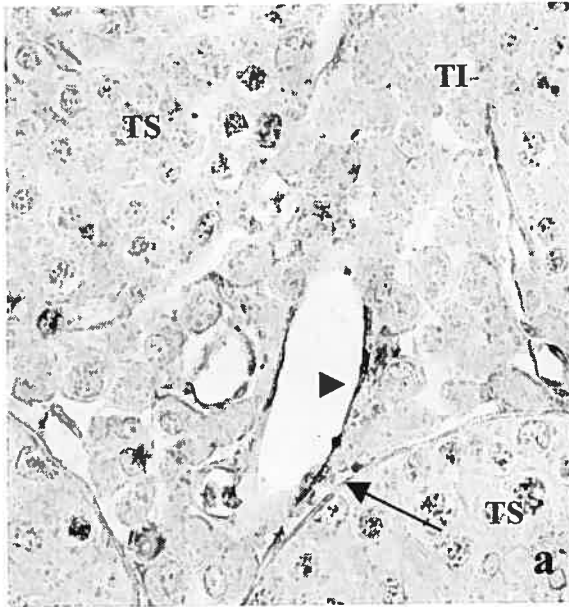
Nous avons incubé des coupes de testicules et des épидидymes sains avec le sérum d'animaux sains (*a, c*) et orchitiques (*b, d*). L'incubation des tissus normaux (*a, c*) avec le sérum normal a montré une faible immunoréaction autour des membranes basales des vaisseaux sanguins et lymphatiques (*a*, tête de flèche) et des tubules séminifères (*a*, flèche noire) et dans le tissu interstitiel de l'épididyme (*c*, flèche noire). Dans le testicule, une réaction plus forte est observée avec le sérum de vison orchitique, dans les vaisseaux sanguins (l'intima et l'adventices, *b*- tête de flèche), dans les membranes limitantes de tubules séminifères (*b*, flèches noires) et dans les tubules séminifères où la réaction est localisée en dépôt autour des cellules germinales (*b*, flèches vides). Dans l'épididyme, l'utilisation du sérum de vison orchitique (*d*) montre une forte réaction dans le tissu interstitiel, autour des membranes limitantes du tubule épидидymaire (*d*, flèches noires) et dans le tissu conjonctif de l'espace interstitiel (*d*, têtes des flèches). Les spermatozoïdes qui se trouvent dans la lumière de l'épididyme sont marqués.

EE- épithélium épидидymaire; TI- tissu interstitiel; TS –tubule séminifère; lu- lumière du tubule séminifère; * - lumière épидидymaire. Magnification : X 630

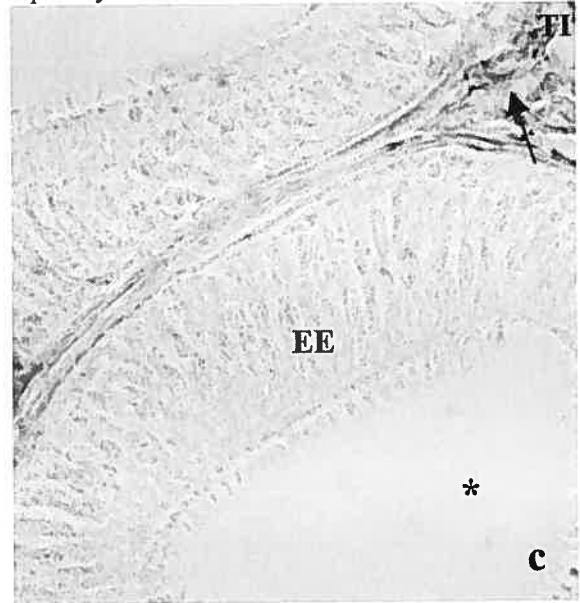
Figure 13

Sérum normal

Testicule normal

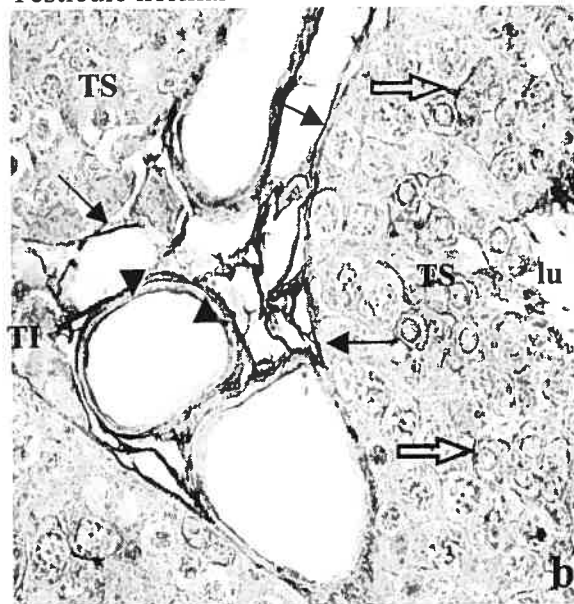


Épididyme normal



Sérum infertile

Testicule normal



Épididyme normal

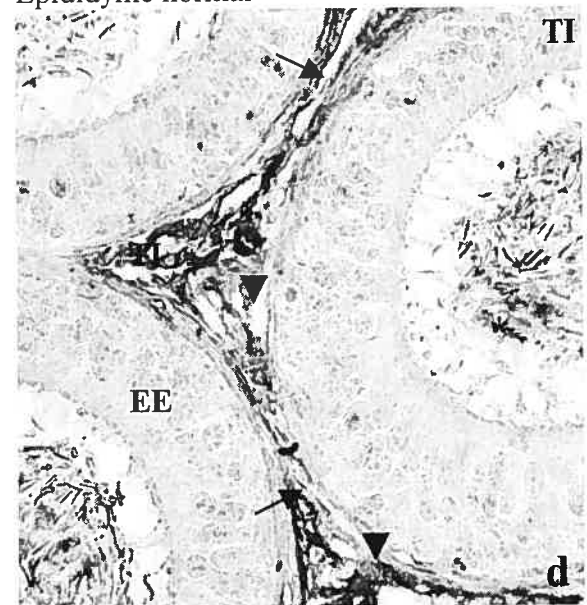


Figure 14 Caractérisation de la présence d'IgG dans les sérums des visons normaux et orchitiques par Western blot

a – Western blot obtenu après l'incubation du sérum de vison sain (ligne **A**) et orchitique (ligne **B**) avec l'anticorps anti-IgG. Nous avons identifié 5 bandes immuno-réactives dans les lignes **A** et **B**.

b – quantification avec le programme Scion Image des bandes obtenues en *a* ; les bandes de 25- et 36 kDa sont significativement plus accentuées ($P < 0.01$) dans le sérum de vison orchitique (la ligne **B**) ($n=3$).

c, d – Immunoblot représentatif des protéines de fractions enrichies de tubules séminifères (TS), en tissu interstitiel (TI), la rate (*c*) et l'épididyme (*d*) normaux. Les membranes ont été incubées avec du sérum de vison sain (**A**) et orchitique (**B**) et ensuite avec l'anticorps anti-IgG spécifique de vison. Le profil des bandes était similaire après l'incubation avec le sérum de vison sain et infertile, mais la réactivité semble plus forte dans tous les tissus examinés après l'incubation avec le sérum de vison orchitique (les lignes **B**).

Figure 14

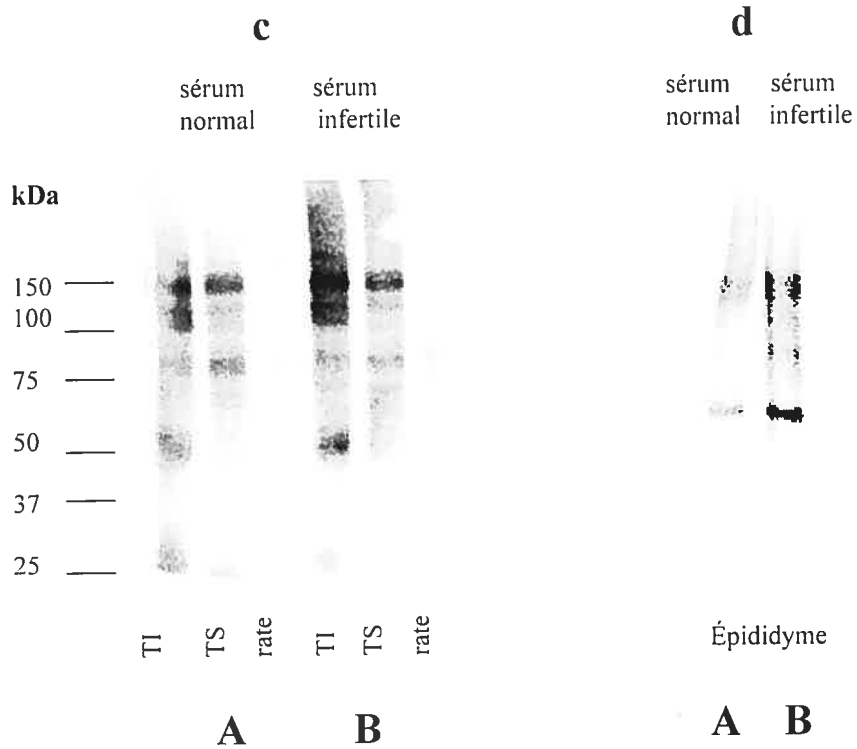
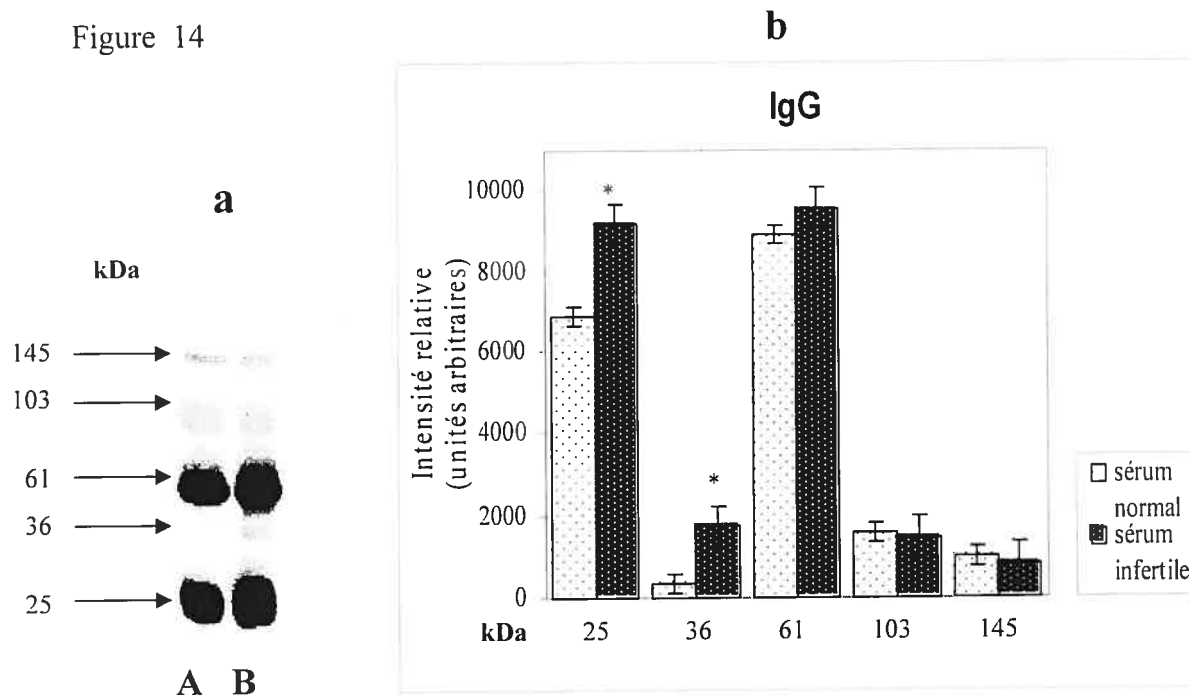


Figure 14' Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgG, dans les testicules et des épидидymes de visons normaux et orchitiques.

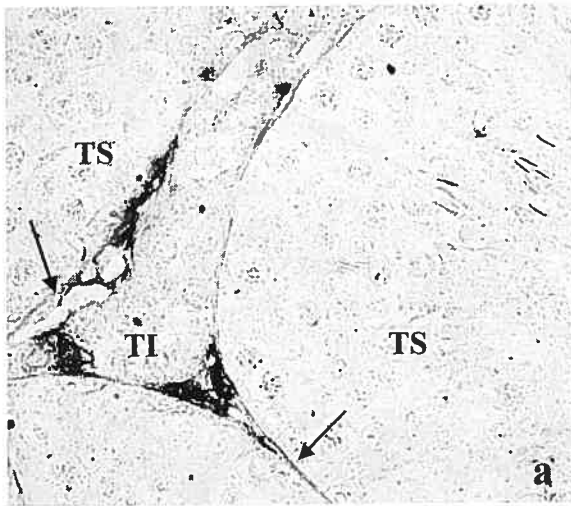
Afin de localiser les dépôts d'IgG dans les animaux sains et orchitiques nous avons incubé l'anticorps spécifique anti-IgG de vison sur des coupes de testicules et des épидидymes de visons sains (*a, d*) et orchitiques (*b, c, e, f*). Les résultats montrent sur les coupes de testicules et d'épididymes normaux, une réaction autour de membranes basales des tubules séminifères (flèche, *a*), et des tubules épидидymaires (flèche, *d*). Sur des coupes des tissus des visons orchitiques, on a mis en évidence des dépôts dans les membranes limitantes des tubules séminifères (flèche, photo *b*), dans le tissu interstitiel (tête de flèche, photo *b*), et des dépôts d'IgG (flèches vides, *c, e, f*).

Dans l'illustration *c*, on remarque une cellule qui contient des dépôts dans la lumière du "tubuli recti" (tête de flèche vide), et une autre cellule similaire dans un tubule séminifère (tête de flèche).

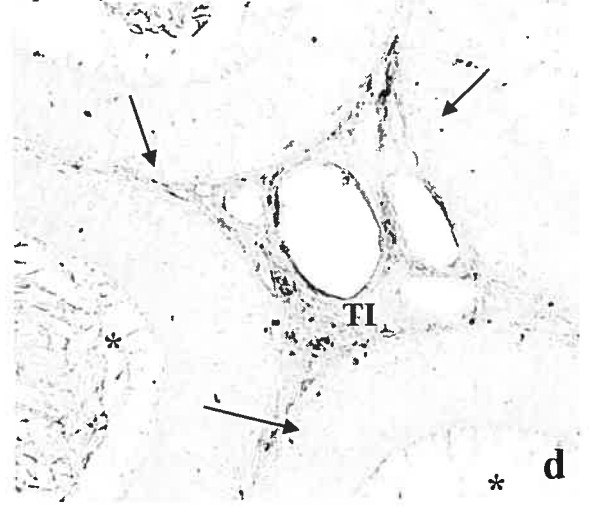
EE- épithélium épидидymaire; TI- tissu interstitiel; TR- tubuli recti; TS –tubule séminifère; lu- lumière du tubule séminifère; * - lumière épидидymaire. Magnification :

X 630

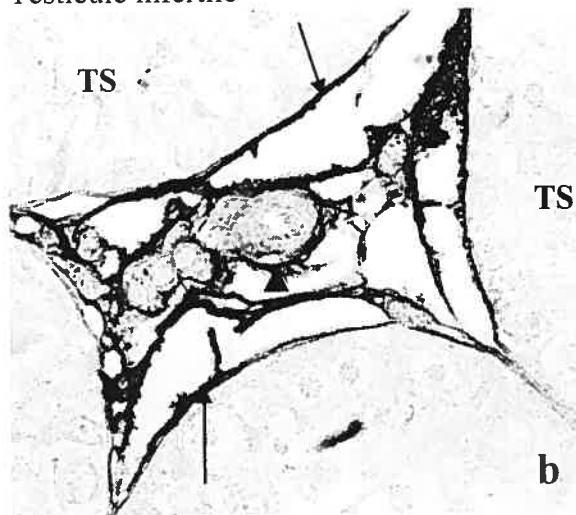
Figure 14'
Testicule normal



Épididyme normal



Testicule infertile



Épididyme infertile

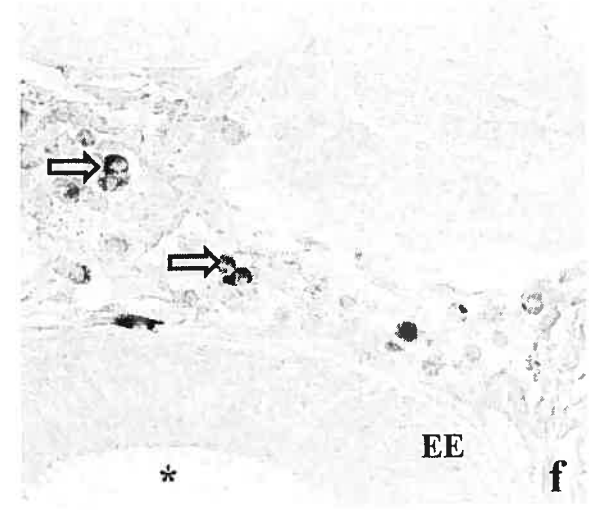
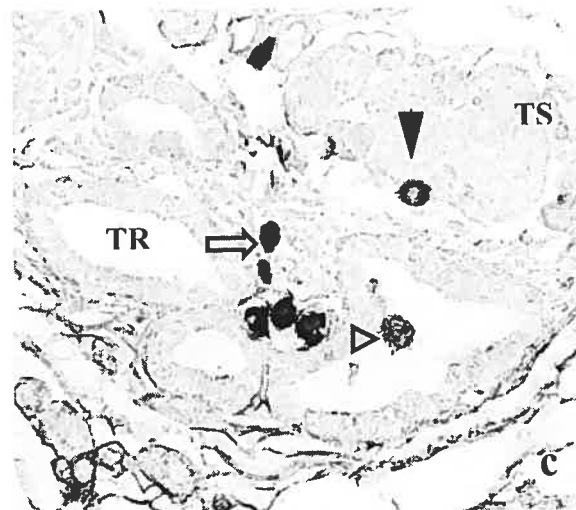
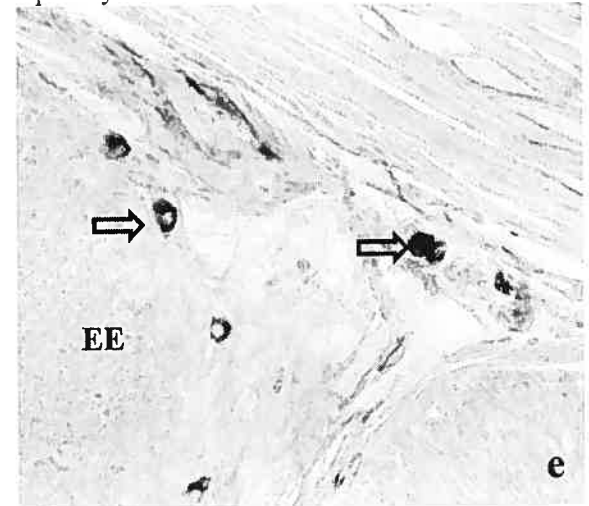


Figure 15 Caractérisation de la présence d'IgM dans les sérums de visons sains et orchitiques par Western blot

a – Western blot obtenu après l'incubation du sérum de vison sain (ligne **A**) et orchitique (ligne **B**) avec l'anticorps anti-IgM. Nous avons identifié 4 bandes immuno-réactives dans les lignes **A** et **B**.

b – quantification des bandes obtenues en *a* avec le programme Scion Image; toutes les bandes sont significativement plus intenses ($P < 0.01$) dans le sérum de vison orchitique (la ligne **B**) ($n=3$).

c, d – Western blot des protéines de fractions enrichies de tubules séminifères (TS), en tissu interstitiel (TI), la rate (*c*) et l'épididyme (*d*). Les membranes ont été incubées avec du sérum de vison sain (**A**) et orchitique (**B**) et ensuite avec l'anticorps anti-IgM. Les flèches noires indiquent les bandes qui apparaissent seulement dans les TS et TI incubés avec le sérum de vison orchitique. Dans l'épididyme (*d*), le profil des bandes est similaire avec le sérum sain (**A**) ou infertile (**B**).

Figure 15

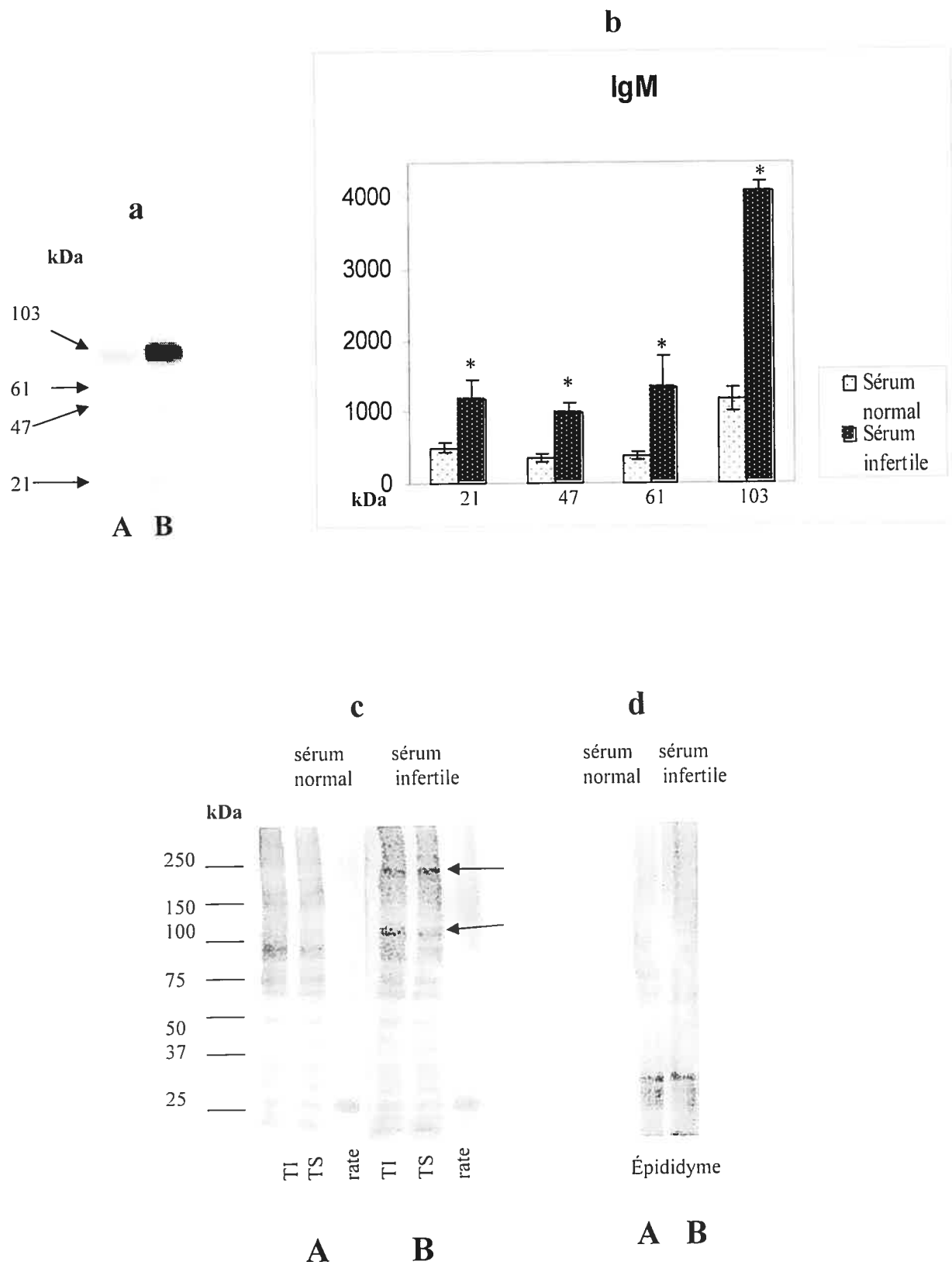


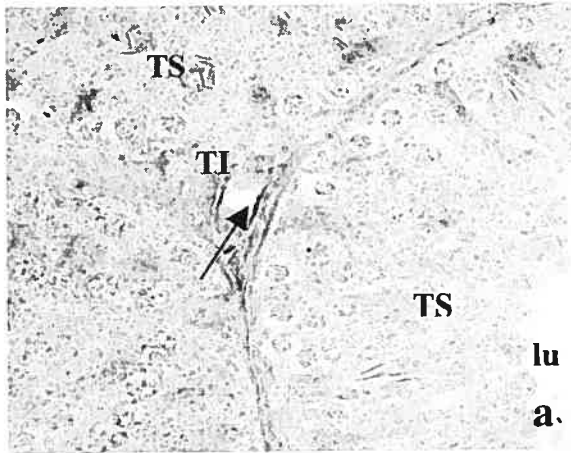
Figure 15' Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgM, dans des testicules et d'épididymes de visons normaux et orchitiques.

Pour identifier les dépôts d'IgM dans les animaux sains et orchitiques nous avons incubé des coupes de testicules et des épididymes de visons sains (*a, c*) et orchitiques (*b, d*) avec l'anticorps anti-IgM humain. Sur les coupes de tissu sain on a mis en évidence une réaction faible autour de l'intima et de l'adventice des vaisseaux sanguins, dans le tissu interstitiel du testicule et de l'épididyme (*a, c*, flèches noires). Par contre, dans les tissus des visons orchitiques il y avait une forte réaction dans toutes les membranes basales du tubule séminifères et des capillaires sanguins (*b*, tête de flèche) du testicule. Dans l'épididyme de vison orchitique on a identifié des dépôts d'IgM dans des cellules localisées dans les espaces intertubulaires (*d*, flèches vides).

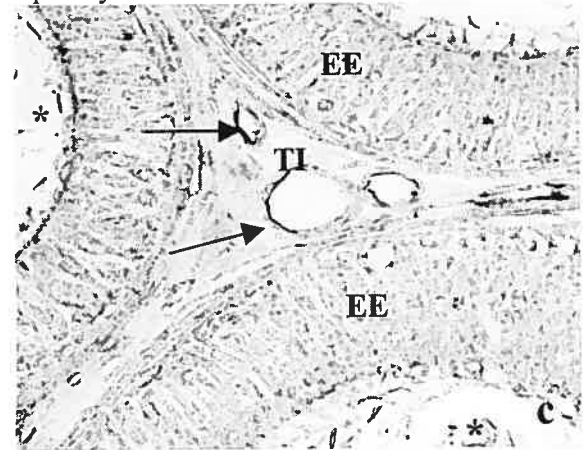
EE- épithélium épididymaire; TI- tissu interstitiel; TS -tubule séminifère; lu- lumière du tubule séminifère; * - lumière épididymaire. Magnification : X 630

Figure 15'

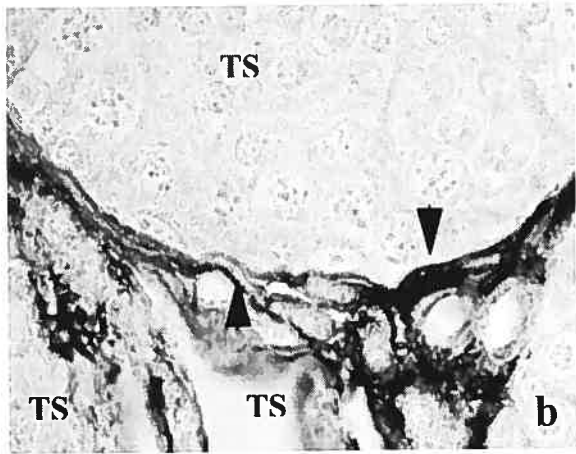
Testicule normal



Épididyme normal



Testicule infertile



Épididyme infertile

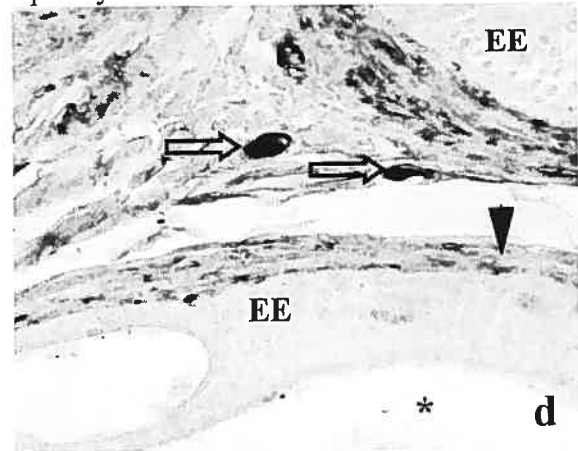


Figure 16 Caractérisation de la présence d'IgD dans les sérums normaux et orchitiques par Western blot

a – Western blot obtenu après l'incubation du sérum de vison sain (ligne **A**) et orchitique (ligne **B**) avec l'anticorps anti-IgD; nous avons identifié une seule bande immuno-réactive dans les lignes **A** et **B**.

b – quantification avec le programme Scion Image des bandes obtenues en *a* ; la bande était significativement plus intense ($P < 0.01$) dans le sérum de vison orchitique (la ligne **B**) ($n=3$).

c, d – Western blot de fractions enrichies de tubules séminifères, en tissu interstitiel, la rate (*c*) et l'épididyme (*d*). Les membranes ont été incubées avec du sérum de vison sain (**A**) et orchitique (**B**) et ensuite avec l'anticorps anti-IgD. Il n'y avait pas des différences évidentes entre les polypeptides visualisés après incubation avec le sérum de vison sain (**A**) ou infertile (**B**).

Figure 16

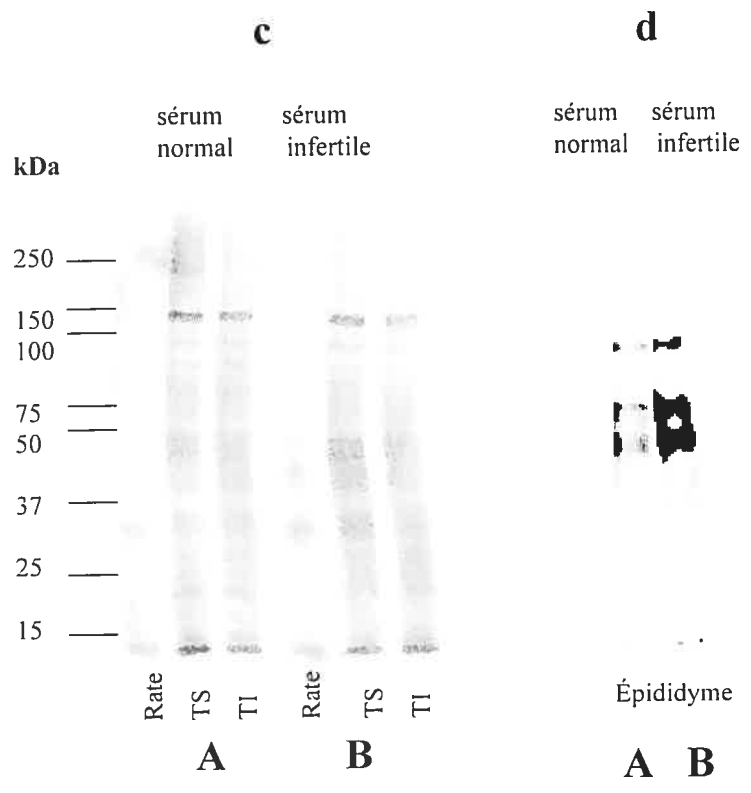
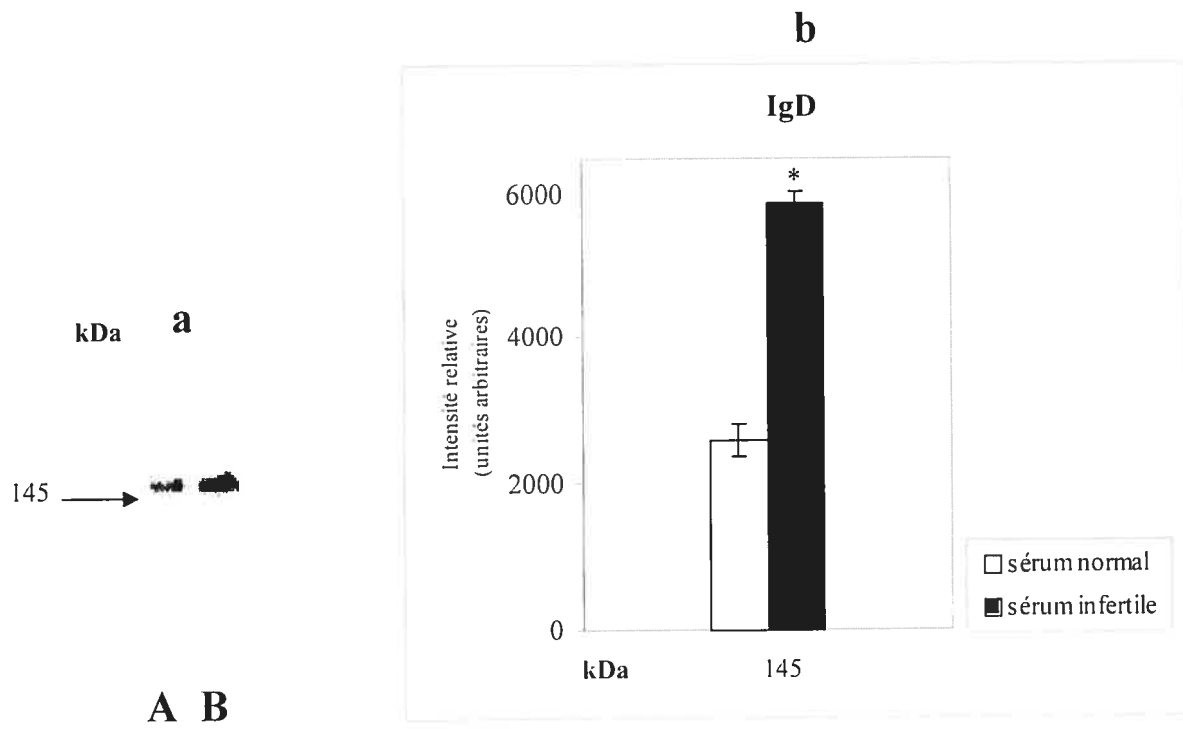


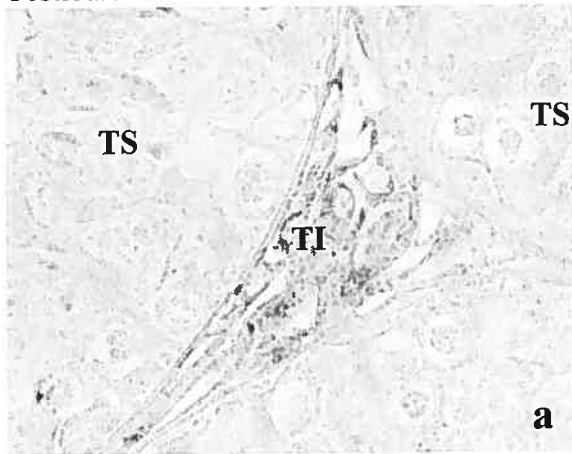
Figure 16' Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgD dans des testicules et d'épididymes de visons normaux et orchitiques.

Afin d'identifier les dépôts d'IgD dans les animaux sains et orchitiques nous avons incubé des coupes de testicules et d'épididymes d'animaux sains (*a, c*) et orchitiques (*b, d*) avec l'anticorps anti-IgD humain. Sur les coupes de tissus sains on n'a pas mis en évidence un marquage pour l'IgD. Dans le testicule de vison infertile, dans l'espace interstitiel on a identifié quelques cellules présentant des dépôts intracellulaires d'IgD (flèche, *b*).

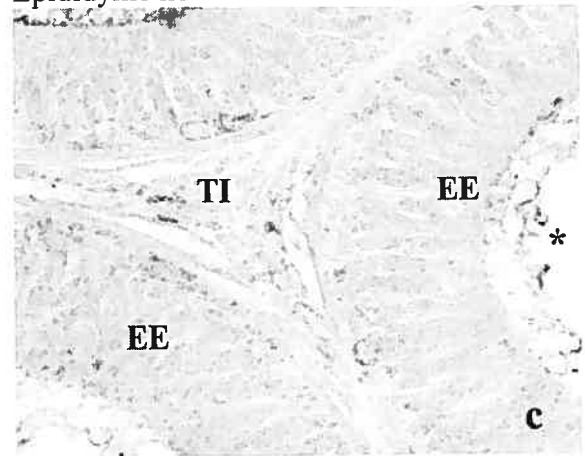
EE- épithélium épididymaire; TI- tissu interstitiel; TS –tubule séminifère; lu- lumière du tubule séminifère; * - lumière épididymaire. Magnification : X 630

Figure 16'

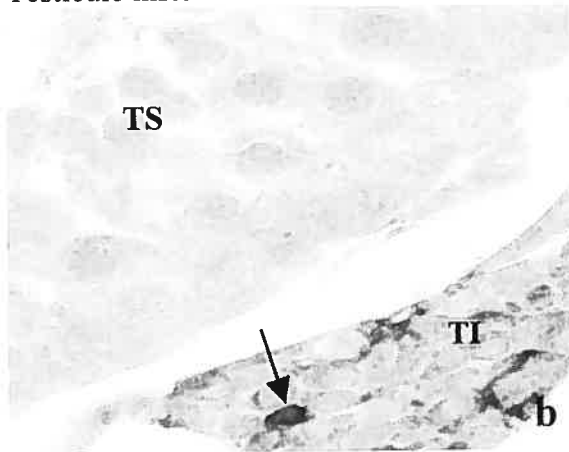
Testicule normal



Épididyme normal



Testicule infertile



Épididyme infertile

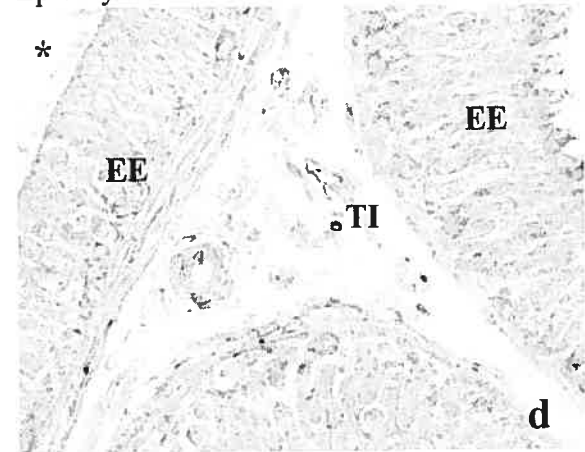


Figure 17 Caractérisation de la présence d'IgE dans les sérums des visons sains et orchitiques par Western blot

a – Western blot obtenu après l'incubation du sérum de vison sain (ligne **A**) et orchitique (ligne **B**) avec l'anticorps anti-IgE.

b – quantification des bandes obtenues en *a* avec le programme Scion Image; nous n'avons pas identifié des différences significatives entre les sérums de vison sain (ligne **A**) et orchitique (ligne **B**) ($P > 0.01$) ($n=3$).

c, d – Western blot des protéines de fractions enrichies de tubules séminifères (TS), en tissu interstitiel (TI), la rate (*c*) et l'épididyme (*d*). Les membranes ont été incubées avec du sérum de vison sain (**A**) et orchitique (**B**) et ensuite avec l'anticorps anti-IgE. Les bandes observées sont similaires après le traitement avec le sérum de vison sain (**A**) et infertile (**B**).

Figure 17

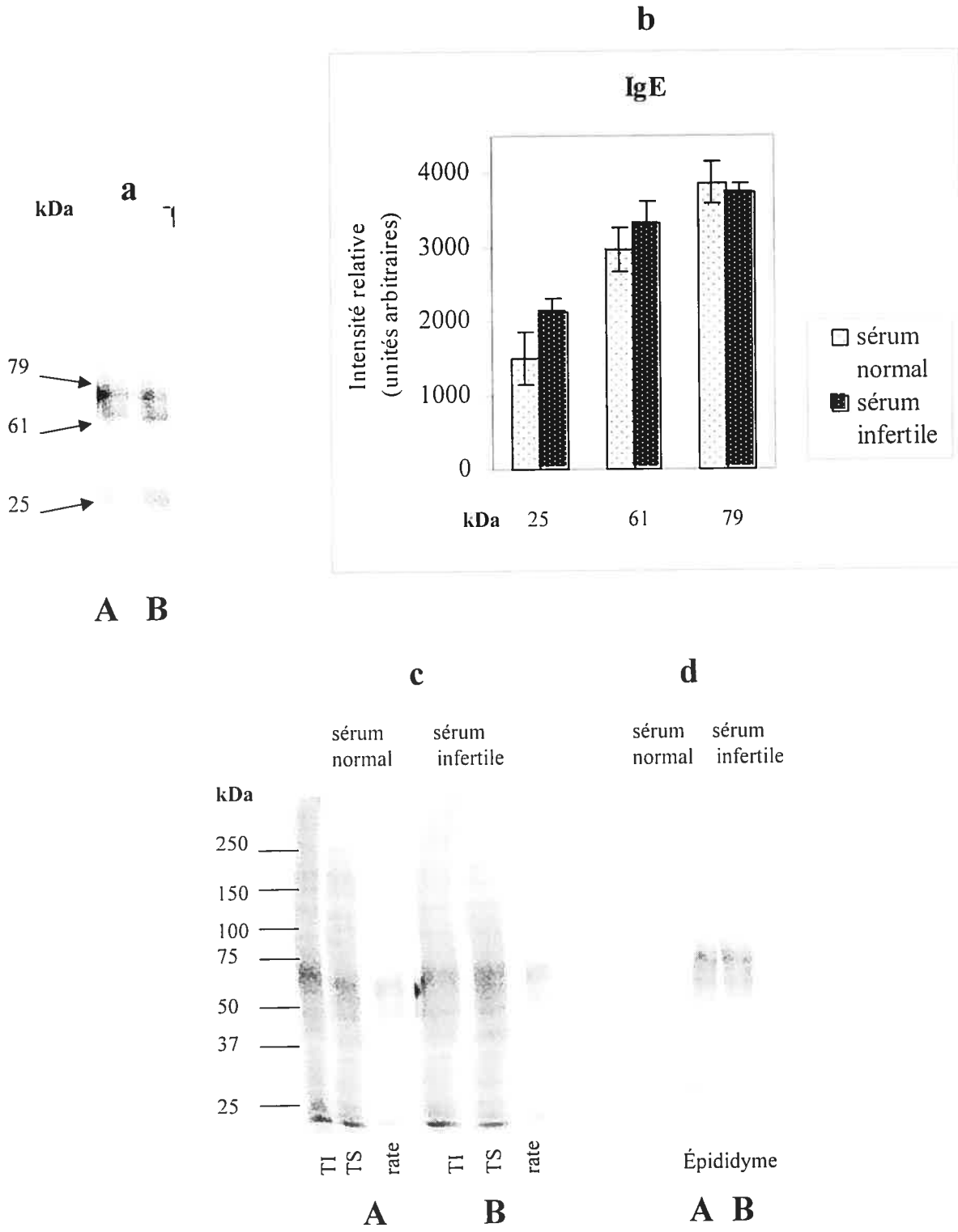


Figure 17' Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgE dans des testicules et d'épididymes de visons normaux et orchitiques.

Pour mettre en évidence les dépôts d'IgE dans les animaux sains et orchitiques nous avons incubé des coupes de testicules et des épидидymes de visons sains (*a, c*) et orchitiques (*b, d*) avec l'anticorps anti-IgE humain. Sur les coupes de tissus sains, il n'y avait pas de marquage pour l'IgE. Par contre, sur les coupes de tissu de vison orchitique on a identifié des cellules marquées aussi bien dans le tubule séminifère (flèche, *b*) que dans le tissu interstitiel (tête de flèche, *b*). Dans l'épididyme de vison orchitique il y avait des dépôts dans des cellules localisées dans le tissu interstitiel épидидymaire (tête de flèche vide, *e*), mais aussi dans des cellules qui envahissent l'épithélium épидидymaire (flèche vide, *d, e*).

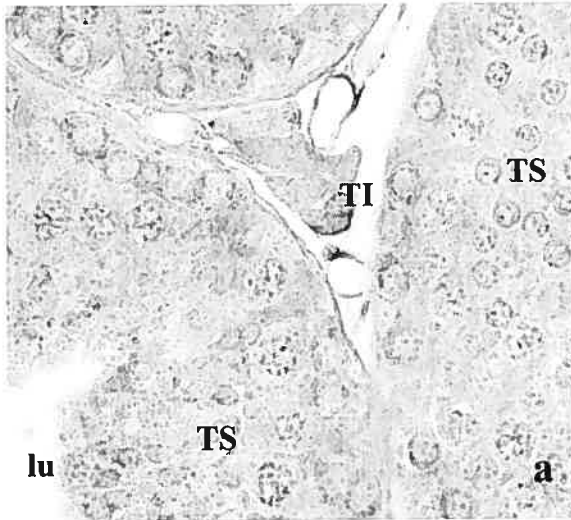
EE- épithélium épидидymaire; TI- tissu interstitiel; TR- tubuli recti; TS –tubule

séminifère; lu- lumière du tubule séminifère; * - lumière épидидymaire Magnification :

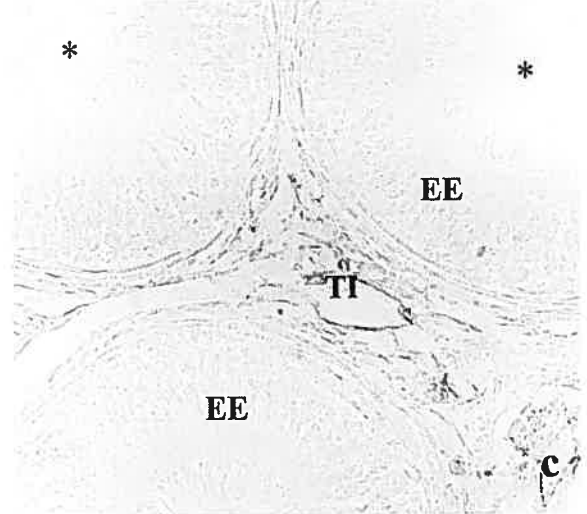
X 630

Figure 17'

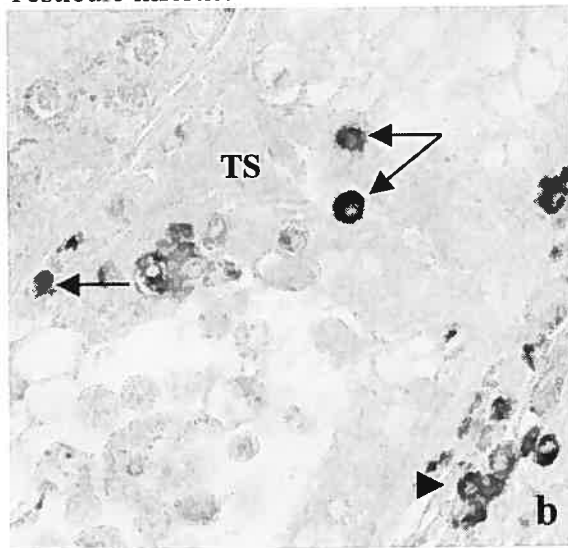
Testicule normal



Épididyme normal



Testicule infertile



Épididyme infertile

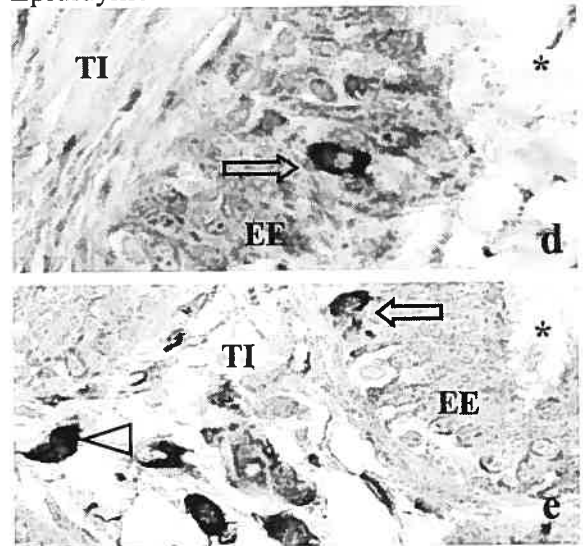


Figure 18 Caractérisation de la présence d'IgA dans les sérums des visons sains et orchitiques par Western blot

a – Western blot obtenu après l'incubation du sérum de vison sain (ligne **A**) et orchitique (ligne **B**) avec l'anticorps anti-IgA ; nous avons identifié 5 bandes immuno-réactives dans les lignes **A** et **B**.

b – quantification des bandes obtenues en *a* avec le programme Scion Image; la bande de 82 kDa est significativement plus intense ($P < 0.01$) dans le sérum de vison orchitique (la ligne **B**) ($n=3$).

c, d – Western blot des protéines de fractions enrichies de tubules séminifères (TS), en tissu interstitiel (TI), la rate (*c*) et l'épididyme (*d*). Les membranes ont été incubées avec du sérum de vison sain (**A**) et orchitique (**B**) et ensuite avec l'anticorps anti-IgA. Le profil des bandes dans tous les tissus étudiés est similaire après l'incubation avec le sérum sain (**A**) et infertile (**B**).

Figure 18

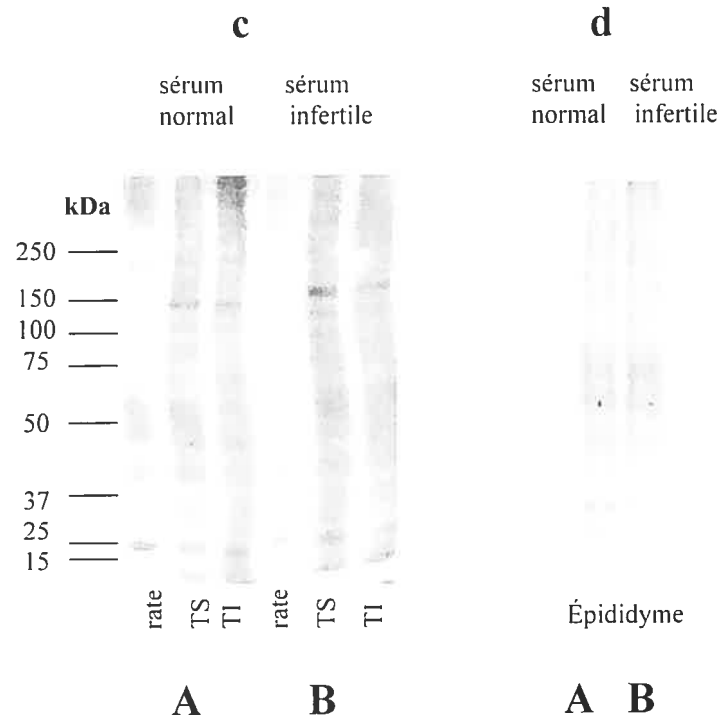
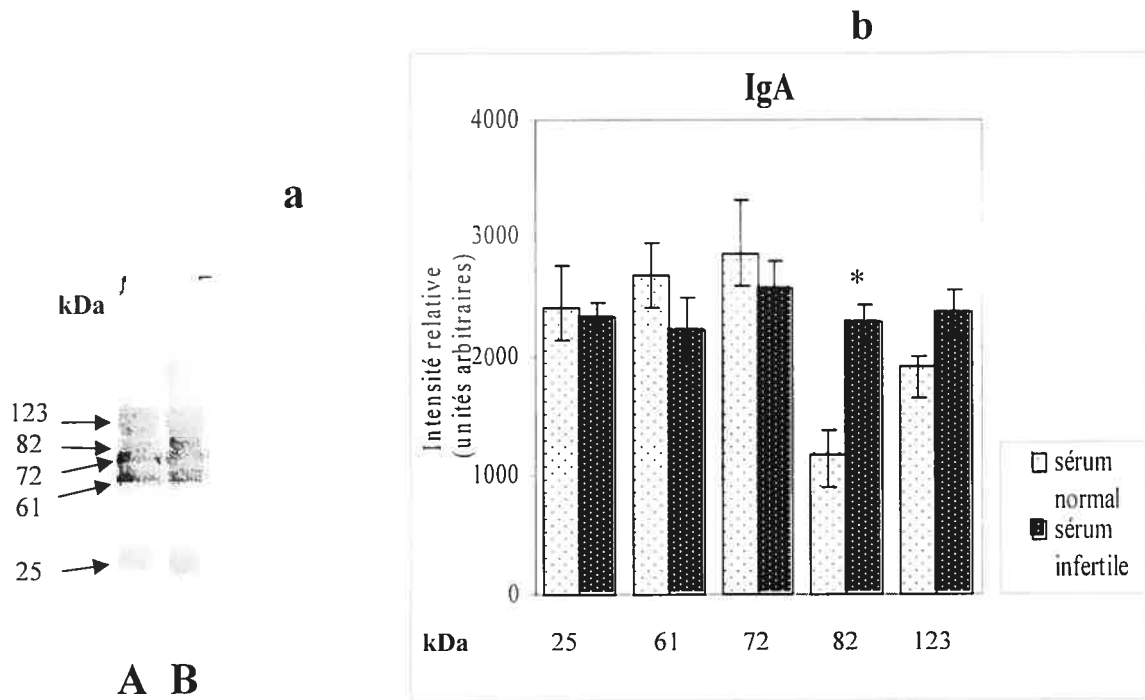


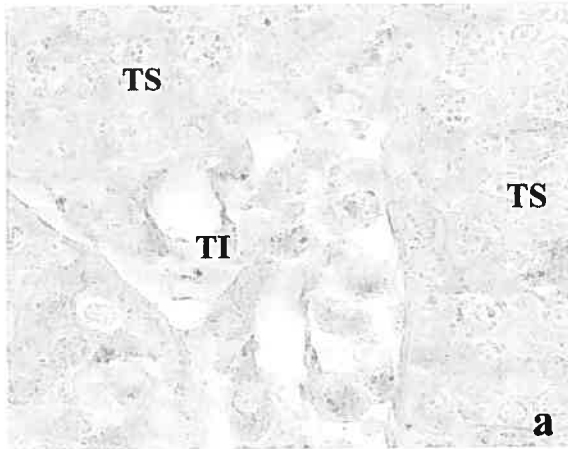
Figure 18' Localisation par immunoperoxydase des dépôts d'IgA dans des testicules et d'épididymes de visons normaux et orchitiques.

Afin de mettre en évidence les dépôts d'IgA dans les testicules et les épидидymes d'animaux sains et orchitiques nous avons incubé l'anticorps anti-IgA humain avec des coupes de tissu sains (*a, c*) et orchitiques (*b, d*). Sur les coupes de testicule et de l'épididyme sains il n'y avait pas de marquage pour l'IgA (*a, c*). Par contre, sur des coupes des tissus orchitiques (testicule et épидидyme) on a identifié un marquage dans des cellules qui se trouvent localisées dans l'espace interstitiel (flèche, *b, d*).

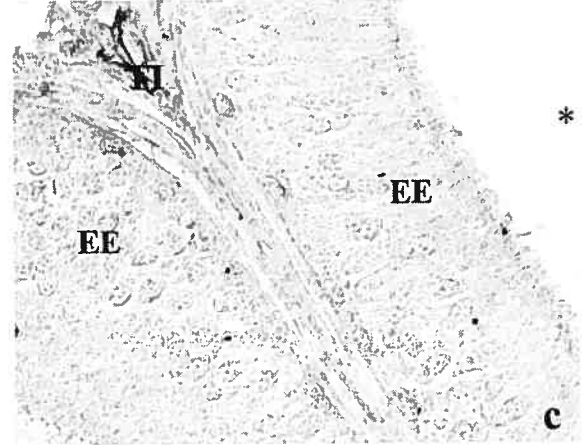
EE- épithélium épидидymaire; TI- tissu interstitiel; TS –tubule séminifère; lu- lumière du tubule séminifère; * - lumière épидидymaire. Magnification : X 630

Figure 18'

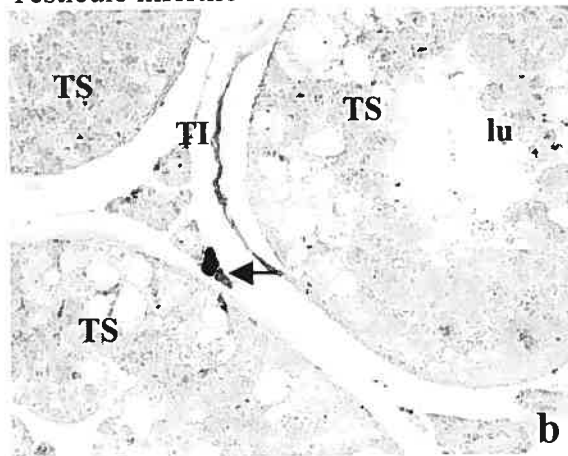
Testicule normal



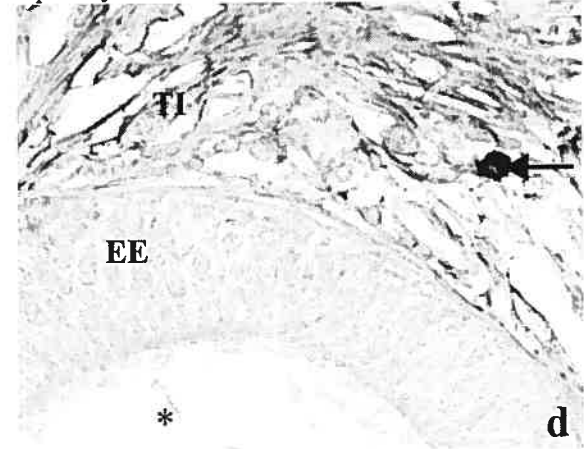
Épididyme normal



Testicule infertile



Épididyme infertile



4. DISCUSSION

4.1. Caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire chez le vison adulte orchitique

Un de nos objectifs était d'identifier les cellules leucocytaires du testicule de vison orchitique. Pour identifier et caractériser les cellules infiltrantes qui accompagnent l'OAI spontanée chez le vison adulte, nous avons utilisé des anticorps pour déterminer la présence de certaines cellules du système immunitaire : anti-NCL-Macro et anti-CD163 (pour les macrophages), anti-CD4, anti-CD8, anti-HLA, anti-FasL en immunohistochimie et en immunofluorescence.

4.1.1 *Les macrophages*

La population de cellules leucocytaires du tissu interstitiel testiculaire normal comprend en grande majorité des macrophages, mais aussi un nombre significatif de lymphocytes et quelques mastocytes (Hedger, 1997). Les macrophages ont un rôle central dans l'immunité naturelle via leur activité phagocytaire, cytotoxique et leur capacité de présenter l'antigène. Ils communiquent avec d'autres cellules et interviennent dans le remodelage tissulaire via la sécrétion de protéases et d'inhibiteurs de protéases (Hedger, 1997). Dans notre étude sur les testicules sains, nous avons identifié dans les espaces interstitiels des macrophages en utilisant l'anticorps anti-NCL-Macro, par la technique d'immunoperoxydase. De plus, en immunofluorescence et en utilisant l'anticorps anti-CD163 qui marque la protéine CD163 exprimée par les macrophages, nous avons montré pour la première fois que les macrophages interstitiels

du testicule et de l'épididyme de vison expriment aussi le marqueur CD163. L'antigène CD163 est un récepteur exprimé exclusivement sur les monocytes et les macrophages. Le CD163 est une glycoprotéine qui appartient à la superfamille des « scavenger récepteur cystéin-rich (SRCR) » (Hogger et coll., 1998). L'activation de cette protéine dans les macrophages systémiques, chez l'humain, est suivie d'abord par la stimulation d'une cascade de signalisation intracellulaire et ensuite par la sécrétion des cytokines (IL-1 β , GM-CSF et IL-6) (Van den Heuvel et coll., 1999). Les observations de Van den Heuvel identifient les macrophages matures comme une source potentielle de cytokines pro-inflammatoires suite à leur activation par un ligand endogène de CD163.

À l'intérieur des tubules séminifères de visons sains nos expériences n'ont pas mis en évidence la présence de macrophage, ce qui est en concordance avec d'autres études qui démontrent que les macrophages représentent une proportion importante des cellules interstitielles du testicule sain (20-25%) (Niemi et coll., 1986), mais ils n'ont pas été rapportés à l'intérieur des tubules séminifères chez le rat normal (Miller et coll., 1984; Niemi et coll., 1986; Hutson, 1990).

Dans les testicules de visons orchitiques étudiés, nous avons identifié des macrophages dans les espaces interstitiels et aussi des macrophages qui envahissent les tubules séminifères complètement détruits. Frungiri et coll. (2002) ont signalé la présence de macrophages dans la membrane limitante et dans la lumière des tubules séminifères chez l'humain infertile. Chez les rats soumis à une orchite auto-immune expérimentale, Suescun et coll. (2003) et Theas et coll. (2003), ont rapporté une augmentation des sous-classes de macrophages (ED1+/ED2-; ED1-/ED2+) dans le testicule. Ce phénomène était causé par une augmentation des macrophages de la

circulation arrivés récemment dans le testicule (ED1+/ED2-) et des macrophages résidents (ED2+/ED1-).

Dans l'épididyme des visons sains et fertiles, nous avons trouvé quelques macrophages dans le tissu interstitiel. Par contre, au niveau du tissu interstitiel épидидymaire de vison orchitique, nous avons identifié un marquage beaucoup plus important pour les macrophages. En utilisant un anticorps anti-macrophage OX-42, Flickinger et coll. (1997) ont détecté un nombre plus élevé de cellules OX42 positives dans les tissus interstitiels des épидидymes du rat sain que dans l'épithélium épидидymaire. Ce nombre très réduit de macrophages au niveau de l'épithélium épидидymaire d'un animal normal limiterait la possibilité de capter et de présenter les antigènes aux cellules effectrices du système immunitaire (Robinson et coll., 1986).

Une augmentation de macrophages dans les testicules et les épидидymes de visons orchitiques suggère une réaction inflammatoire. L'inflammation *in vivo* induit l'arrivée de nouveaux monocytes et de macrophages dans le testicule (O'Bryan et coll., 2000; Gerdprasert et coll., 2002) avec une très forte activité pro-inflammatoire. Entre les macrophages et les cellules de Leydig, il existe une très proche association. Dans les conditions normales, les macrophages sont responsables de la production de facteurs essentiels de croissance et de différenciation des cellules de Leydig (Hales, 1999). Suite à une stimulation immunitaire, les macrophages sont activés et produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , TNF- α) qui inhibent la stéroïdogenèse des cellules de Leydig (Hales, 2002) ce qui se traduit par une diminution de testostérone chez les animaux orchitiques (Pelletier et coll., 2000).

Les macrophages testiculaires expriment les molécules du CMH de classe II à leur surface (Pöllänen et Niemi, 1987; Tung et coll., 1987; Wang et coll., 1994). Chez

toutes les espèces étudiées jusqu'à présent, l'expression du CMH II n'est pas détectable dans les tubules séminifères normaux, alors qu'elle l'est dans le tissu interstitiel. Nous avons aussi observé la présence de cellules exprimant le HLA de classe II seulement dans le tissu interstitiel. L'expression des molécules du CMH de classe I (Fiszer et Kurpisz, 1998) et II (Pöllänen et Niemi, 1987; Tung et coll., 1987; Pöllänen et Maddocks, 1988; Wang et coll., 1994) a été rapportée dans le testicule normal.

4.1.2 Le complexe majeur d'histo-compatibilité (CMH)

Nos résultats montrent l'absence de l'expression du CMH de classe II dans des cellules des tubules séminifères des visons sains. Par contre, dans le tissu interstitiel de ces mêmes testicules, nous avons mis en évidence un marquage qui démontre la présence de molécules du CMH de classe II. Dans les testicules de visons orchitiques, nous avons identifié des molécules du CMH de classe II dans les tissus interstitiels sous-capsulaires et intertubulaires et dans les tubules séminifères complètement détruits. Dans le testicule de vison orchitique, en utilisant la technique de double marquage nous avons identifié sous la capsule, des cellules HLA II+ / FasL-. Nous avons observés dans les tubules séminifères des cellules HLA II+ / FasL+ et dans le tissu interstitiel des cellules HLA II+ / FasL- et aussi des cellules HLA II- / FasL+. Le système Fas-FasL est un mécanisme par lequel les cellules qui expriment le FasL induisent l'apoptose des cellules qui expriment le Fas. Des études sur le testicule adulte (Xu et coll., 1999; Woolveridge et coll., 1999; Francavilla et coll., 2000) ont démontré que les cellules germinales expriment le Fas. La présence d'un marquage HLA II+ dans les tubules séminifères de vison orchitique suggère une infiltration des cellules sanguines. La colocalisation de HLA et FasL dans ces cellules suggère une possible implication de la

voie Fas/FasL dans l'apoptose des cellules germinales, suivie de la destruction de l'épithélium séminifère. Cette hypothèse est soutenue par les résultats de Theas et coll. (2003) qui ont démontré, chez le rat ayant une OAI, une augmentation significative des cellules germinales Fas+. Cette augmentation était corrélée avec la croissance du nombre des cellules germinales apoptotiques. Pöllänen et Niemi (1987) ont signalé un nombre élevé de cellules T qui expriment des molécules du CMH de classe II dans la région sous-capsulaire du testicule humain sain. La prédisposition à produire une réponse auto-immune dans la région sous-capsulaire du testicule de la souris est en concordance avec cette observation (Tung et coll., 1987). Setchell et coll. (1990) ont suggéré que l'endothélium micro-vasculaire de la capsule testiculaire attirerait les lymphocytes plus efficacement que le feraient les vaisseaux sanguins du tissu interstitiel. Ceci semble être important parce que dans l'orchite auto-immune induite, les lésions tissulaires débuteraient dans la région sous-capsulaire (Tung et coll., 1987). Une possibilité pour l'apparition de l'orchite auto-immune serait l'expression anormale du HLA-DR. Cette molécule qui se trouve sur une panoplie de cellules immunes est impliquée dans la présentation de l'antigène. HLA-DR est exprimée à la surface des cellules épithéliales du tractus reproductif masculin (Pudney et Anderson, 1993) et son expression aberrante pourrait conduire à une activation des cellules T et ensuite à une orchite auto-immune.

Nous n'avons pas identifié de molécules du CMH de classe II dans l'épididyme du vison sain, mais elles sont présentes dans le tissu interstitiel et aussi dans l'épithélium épидидymaire de visons orchitiques. La présence de molécules du CMH de classe II dans l'épididyme de vison orchitique suggère leur implication possible dans l'activation de

lymphocytes T résidents, qui pourraient participer à la génération des lésions auto-immunes de l'orchite.

4.1.3 *Le système Fas-FasL*

Le système Fas-FasL est une importante voie d'apoptose dans une grande variété de tissus humains (Lee et coll., 1999). Dans les lymphocytes T CD4+, l'apoptose – AICD (activation induced cell death)- est préférentiellement induite par l'interaction du récepteur Fas avec son ligand (FasL) (Lenardo, 1996). Au contraire, dans les lymphocyte T CD8+ la voie dominante serait récepteur TNF α /TNF α (Lenardo, 1996). Suda et coll. (1995) suggèrent que le FasL serait exprimé par les cellules T CD4+ et CD8+, mais pas par les cellules B.

Dans le testicule adulte, la localisation précise du FasL est controversée. Des études ont rapportées l'expression du FasL sur des cellules de Sertoli (Xu et coll., 1999), ou sur des cellules germinales (D'Alessio et coll., 2001) ou encore sur les deux types cellulaires (Woolveridge et coll., 1999). Ainsi la localisation et le rôle du système Fas/FasL dans le testicule sont controversés.

Nos études d'immunofluorescence démontrent une augmentation du nombre de cellules qui expriment FasL dans les testicules et épидидymes de visons orchitiques. Ces résultats suggèrent que les altérations structurales dans l'orchite auto-immune au niveau du testicule et de l'épididyme seraient induites en partie par l'apoptose via le système Fas/FasL. Nos observations sont en accord avec les résultats rapportés par Theas et coll., (2003) qui montrent que la mort des cellules germinales chez les rats orchitiques se produit par un mécanisme apoptotique qui impliquerait le système Fas/FasL. D'Alessio et coll. (2001) ont montré que la transcription du FasL a lieu dans toutes les cellules germinales, mais la protéine se trouve seulement au stade des spermatozoïdes matures,

ce qui suggérerait que l'observation d'une expression du FasL par les cellules de Sertoli serait erroné. Riccioli et coll. (2003) proposent que pour les spermatozoïdes de souris, le FasL pourrait représenter un mécanisme d'autodéfense contre les lymphocytes présents dans le tractus génital féminin.

4.1.4 Les lymphocytes T CD4+ et CD8+

Dans la population des leucocytes étudiés chez le vison, nous avons immunolocalisé des cellules CD4+ et CD8+ dans le testicule et l'épididyme. Dans le testicule de vison sain, nous n'avons pas détecté la présence des cellules CD4+, et par l'immunofluorescence nous avons identifié de rares cellules CD8+ dans l'espace interstitiel testiculaire. Dans les testicules et les épидидymes de visons sains et orchitiques, en double marquage en immunofluorescence, nous n'avons pas identifié des cellules CD4+/FasL+. Dans l'épididyme de vison orchitique, nous avons observé de cellules CD8+/FasL+. Les cellules CD8+ qui expriment le FasL peuvent induire l'apoptose dans les cellules cibles qui expriment le Fas (Kagi et coll., 1994) La colocalisation CD8/FasL suggère l'implication des lymphocytes CD8+ dans les lésions observées dans l'épididyme de visons orchitiques. Le mécanisme Fas/FasL était décrit aussi dans d'autres maladies auto-immunes comme la thyroïdite auto-immune (Giordano et coll., 1997), l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Sabelko-Downes et coll., 1999), l'uvéite auto-immune expérimentale (Wahlsten et coll., 2000), le diabète (Su et coll., 2000) et l'arthrite (Zhang et coll., 1997).

Par contre, en utilisant les mêmes techniques nous avons visualisé, chez les visons orchitiques, des cellules CD4+ et CD8+ dans les espaces interstitiels et à l'intérieur des tubules séminifères détruits. L'augmentation du nombre de cellules CD4+

et CD8⁺ suggère que ces cellules seraient impliquées dans la pathogenèse des lésions testiculaires par intermédiaire de leur activité cytolytique. Ces résultats sont en concordance avec les données de l'équipe de Yakirevich et coll. (2002) qui montrent, par immunohistochimie, l'absence de lymphocytes CD3 et de marqueurs cytotoxiques dans l'épithélium séminifère humain normal.

Les cellules CD4⁺ sont les cellules immunes essentielles pour le transfert d'une orchite auto-immune chez la souris (Mahi-Brown et Tung, 1989). Quand les cellules CD4⁺ sont éliminées d'un transfert, l'apparition d'une orchite auto-immune expérimentale est inhibée.

Dans le testicule normal, il y a un nombre très réduit de lymphocytes. Chez les rats normaux, les cellules T testiculaires prédominantes sont de type CD8⁺ (Hedger, 1997). Pöllänen et Niemi (1987) ont trouvé les deux types lymphocytaires CD4⁺ et CD8⁺ dans le testicule normal humain (l'albuginée et le tissu interstitiel), mais El-Demiry et coll. (1987) n'ont pas mis en évidence des cellules T intra-testiculaires en conditions normales chez l'homme. Cette équipe a signalé une augmentation des cellules T, CD4⁺ et CD8⁺ dans les testicules des hommes infertiles. Suite à un processus inflammatoire on trouve une accumulation de lymphocytes, de neutrophiles et de monocytes systémiques dans les testicules de souris (Fujii et coll., 1991). Chez les souris ayant une orchite auto-immune induite et en phase initiale de la maladie, il y a une infiltration massive de neutrophiles dans les tubules séminifères et dans le tissu interstitiel du testicule accompagnée par une destruction de l'architecture des tubules séminifères et une hypo-spermatogenèse (Fujii et coll., 1991). Dans les phases tardives de la maladie, les neutrophiles infiltrants cèdent la place aux cellules mononucléaires (lymphocytes, macrophages) et la structure des tubules séminifères semble

complètement détruite (Hedger, 1997). Cette modification est suivie d'une fibrose du testicule et d'une aspermatogenèse (Fujii et coll., 1991). La production de cytokines inflammatoires par ces cellules (les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes circulants qui envahissent le testicule) stimule les lymphocytes résidents du testicule et cette activation serait responsable du déclenchement de l'orchite auto-immune ou d'une production d'anticorps (Hedger, 1997). Chez les rats avec une orchite auto-immune induit, Lustig et coll. (1993) ont signalé une augmentation du nombre des lymphocytes CD4+ et CD8+ dans les infiltrats testiculaires interstitiels et les tubules séminifères ont souffert une atrophie (Suescun et coll., 1994). Ces auteurs suggèrent aussi que les cellules CD8+ cytolytiques qui ont pour cible l'épithélium séminifère seraient impliquées dans la destruction des tubules séminifères observée dans l'orchite auto-immune. Les cellules CD8+ cytolytiques reconnaissent les auto-antigènes membranaires de classe I du CMH et Lustig et coll. (1993) suggèrent que les cellules CD8+ cytotoxiques seraient le principal sous-type présent chez les rats qui développent une orchite auto-immune. L'absence des antigènes du CMH de classe I à la surface des cellules des tubules séminifères a été rapportée par l'équipe d'Anderson (1984), mais Ben et coll. (1986), en utilisant un modèle murin d'orchite auto-immune, ont montré l'activation des cellules T cytotoxiques et l'expression des antigènes de CMH de classe I sur les cellules testiculaires de cette même espèce animale.

Dans les espaces interstitiels de l'épididyme de vison sain, nous avons mis en évidence quelques cellules CD4+ et CD8+. En revanche l'épididyme de vison orchitique présentait une accumulation de cellules CD4+ et CD8+. Nous avons remarqué aussi la présence de cellules CD8+ dans le tissu interstitiel et dans les tubules de l'épididyme. Dans l'épididyme de rats normaux, Flickinger et coll., (1997) ont rapporté une

concentration plus élevée de lymphocyte T dans le tissu interstitiel que dans l'épithélium épидидymaire. Cette distribution suggère que le tissu interstitiel pourrait servir de réservoir de cellules qui pourraient être utilisées par l'épithélium au besoin. L'équipe de Yakirevich (2002) a observé que dans les épидидymes humains normaux et cryptorchidiques, le nombre de lymphocytes CD8⁺ était plus élevé dans l'épithélium que dans le tissu interstitiel. Nos résultats sont similaires à ceux de Yakirevich (2002) qui ont montré que la plupart des lymphocytes de l'épithélium épидидymaire et du tissu interstitiel de l'épидидyme sont de type CD8⁺. Leur étude suggère que les lymphocytes T CD8⁺ (cytotoxiques) activés dans l'épидидyme normal pourraient contrôler l'apparition de lymphocytes et de macrophages réagissant contre le sperme et ainsi contribuer au maintien de la tolérance aux auto-antigènes.

4.2 Caractérisation de la réponse immunitaire humorale chez le vison adulte orchitique

Plusieurs études suggèrent l'implication de l'immunité humorale dans l'infertilité masculine. Dans des biopsies prélevées chez des patients infertiles, des dépôts immuns ont été localisés dans les tubules séminifères, des cellules germinales et dans les cellules de Leydig (Lehmann et Emmons, 1989; Salomon et coll., 1982). Dans le sérum des malades infertiles, des auto-anticorps circulants contre les spermatozoïdes, les cellules de Sertoli et la membrane basale des tubules séminifères ont été rapportés (Lehmann et coll., 1987; Lehmann et Emmons, 1989; Salomon et coll., 1982; Salomon et Hedinger, 1982)

Chez les souris ayant une orchite expérimentale auto-immune, Itoh et coll. (1994) ont observé que les auto-anticorps du sérum réagissaient exclusivement avec des

spermatides à divers stades de développement. Dans des conditions normales, les spermatides sont isolées du système circulatoire par la barrière hémato-testiculaire. Ainsi les auto-anticorps circulants pourraient réagir spécifiquement contre les spermatides si la fonction de la barrière hémato-testiculaire est altérée par une inflammation testiculaire (Itoh et coll., 1994). L'immunisation avec des cellules de Sertoli et adjuvant de Freund (Tung et Fritz, 1987) ou avec un extrait de membrane basale des tubules séminifères (Lustig et coll., 1982) chez les rats est capable d'induire une orchite auto-immune et aussi de produire des anticorps anti-cellules de Sertoli et anti-lame basale.

Pour l'étude de la présence d'anticorps dans le sérum des animaux orchitiques par immunopéroxydase, nous avons incubé des coupes de testicule et épидидyme sains avec le sérum d'animaux adultes sains et orchitiques, suivie d'une incubation avec l'anti-IgG de vison. Les testicules normaux incubés avec le sérum de visons sains montraient une réaction faible autour des membranes basales des tubules séminifères et des vaisseaux sanguins. Dans les testicules sains incubés avec des sérums d'animaux orchitiques, nous avons observé une réaction plus forte dans les membranes limitantes des tubules séminifères et des vaisseaux sanguins. Aussi dans les tubules séminifères, nous avons observé un dépôt autour des cellules germinales (spermatogonies et spermatocytes).

L'épididyme normal incubé avec le sérum d'animal sain et l'anticorps anti-IgG présente un faible marquage dans le tissu interstitiel. Après l'incubation de l'épididyme sain avec le sérum d'animaux orchitiques, des dépôts d'IgG sont très évidents dans le tissu interstitiel autour des membranes limitantes des tubules épидидymaires et dans le tissu conjonctif de l'espace interstitiel. Ces résultats suggèrent la présence d'auto-anticorps de type IgG dans le sérum des visons orchitiques.

Chez les visons orchitiques, nous avons observé par immunopéroxydase des dépôts d'IgG dans les membranes basales des tubules séminifères, dans les tissus interstitiels du testicule et aussi des accumulations des complexes immuns dans les épидидymes. Ces observations suggèrent la présence d'auto-antigènes dans ces régions.

Chez les visons orchitiques et en utilisant la même technique, nous avons identifié des dépôts d'IgM dans les membranes basales des tubules séminifères et des vaisseaux sanguins testiculaires. Dans l'épididyme de vison orchitique des dépôts d'IgM se trouvent dans les membranes basales de l'épithélium épидидymaire et aussi dans des cellules localisées dans les espaces intertubulaires. Dans les espaces interstitiels du testicule de vison orchitique nous avons identifié de rares dépôts intracellulaires d'IgD qui, dans l'épididyme de vison orchitique, étaient absents. Dans les testicules et les épидидymes normaux, nous n'avons pas trouvé de dépôts d'IgE. Par contre, dans les testicules de visons orchitiques nous avons identifié des cellules marquées, aussi bien dans les tubules séminifères que dans le tissu interstitiel. Dans l'épididyme de vison orchitique, nous avons détecté des dépôts d'IgE dans des cellules localisées dans le tissu interstitiel épидидymaire et aussi dans des cellules qui traversent l'épithélium épидидymaire. Dans les testicules et les épидидymes normaux, par la technique d'immunopéroxydase, nous n'avons pas localisé de dépôts d'IgA. Au contraire, dans les testicules et dans les épидидymes de visons orchitiques, nous en avons identifié dans des cellules des espaces interstitiels.

Chez les rats ayant une orchite auto-immune induite, Doncel et coll., (1989) n'ont pas mis en évidence des dépôts d'IgG à l'intérieur des tubules séminifères. Les mêmes résultats ont été signalés par Saari et coll. (1996). Furbeth et coll. (1989) ont rapporté que des dépôts d'IgG et de C3 apparaissaient d'une manière spontanée dans les testicules de

rats Brown-Norway entre la membrane basale des tubules séminifères et les cellules myoïdes. Ces dépôts étaient accompagnés, dans une proportion de 15% des animaux, d'une infiltration du testicule par des lymphocytes et d'une destruction de l'épithélium séminifère suivie d'une aspermatogénèse. Des dépôts d'IgG dans le compartiment basal des tubules séminifères ont été aussi détectés chez les rats après une immunisation active (Saari, et coll., 1996). Yule et Tung (1993) ont montré que des clones de cellules T spécifiques anti-sperme sont capables d'induire l'orchite auto-immune, preuve que le mécanisme cellulaire seul serait capable de produire l'orchite auto-immune sans l'implication des anticorps. Les dépôts immuns seuls ne seraient pas capables d'induire une orchite auto-immune (Yule et coll., 1988).

Chez les souris ayant une orchite expérimentale, Yule et coll. (1988) ont rapporté la présence de dépôts d'IgG à la périphérie des tubules séminifères. Quelques dépôts présentaient un aspect circulaire et semblaient être localisés autour des cellules germinales, tandis que des dépôts granulaires sous forme de complexes immuns étaient intracellulaires (cellules germinales). Dans cette étude, Yule et coll. avaient pour la première fois démontré l'existence d'auto-antigènes sur les cellules germinales (spermatocytes pre-leptotènes et spermatogonies) localisés à l'extérieur de la barrière hémato-testiculaire. Ces auto-antigènes sont ainsi accessibles aux anticorps circulants. La formation in situ de complexes immuns par les auto-anticorps circulants démontre que les auto-antigènes testiculaires ne sont pas complètement séquestrés et que la barrière hémato-testiculaire est une barrière immunologique incomplète. Pelletier (1986) a montré que chez les visons la barrière hémato-testiculaire présente une variation physiologique. Chez le vison adulte normal, pendant le cycle reproductif annuel saisonnier, la barrière hémato-testiculaire est incompétente d'une manière transitoire (Pelletier, 1986; 1988).

Pendant les phases d'incompétence de la barrière hémato-testiculaire, les auto-antigènes testiculaires des cellules germinales deviennent plus facilement la cible des cellules présentatrices d'antigènes ou des lymphocytes sanguins (Pelletier, 1986; Pelletier, 1988). Cette augmentation dans la perméabilité de la barrière hémato-testiculaire coïncide avec une augmentation de 85% des anticorps anti-spermatiques dans le sérum des visons normaux et dans le sérum des visons ayant une orchite auto-immune spontanée (Tung et coll., 1984). Des données récentes (Yoon et coll., cité par Pelletier et coll., 2000) placent en discussion les observations présentées par Tung selon lesquelles que le changement saisonnier de la compétence de la barrière hémato-testiculaire serait accompagné d'une élévation de 7 à 10 fois du taux des anticorps anti-spermatiques dans le sérum de visons orchitiques mais pas des visons normaux. Malgré le taux élevé des anticorps anti-spermatiques, la plupart des visons ne développent pas une orchite auto-immune spontanée. Ceci indique que le développement et le maintien d'un état d'immuno-tolérance dans le testicule nécessite des facteurs immunosuppresseurs autres que la barrière hémato-testiculaire qui vont inhiber l'apparition d'un infiltrat lymphocytaire et prévenir l'installation d'une maladie auto-immune. Il est possible que les visons infertiles manquent de facteurs immunosuppresseurs ou que ceux-ci soient inefficaces, ou encore incapables de prévenir l'installation d'une orchite auto-immune (Pelletier et coll., 2000).

Pour mieux caractériser les sérums des visons orchitiques, nous avons utilisé le Western blot pour comparer les profils d'immunoglobulines des sérums des animaux sains et orchitiques. Nos résultats montrent un taux significativement ($p < 0.01$) élevé d'IgG, d'IgM, d'IgA et d'IgD dans les sérums d'animaux orchitiques, alors que le taux d'IgE ne présente pas de variation significative entre les sérums. L'augmentation des IgM et IgD semble plus importante que celle d'IgA et d'IgG. Le rôle d'IgD sérique n'est pas

encore établi et la signification d'une concentration anormalement élevée ou basse diminue reste inconnue (Vladutiu, 2000). L'IgM est produite en faibles quantités par les cellules B-mémoires, et un titre élevé d'IgM dans le sérum démontre un contact récent avec les auto-antigènes testiculaires. Dans le sérum des patients ayant des maladies auto-immunes, des valeurs élevées d'IgG, IgA, IgM et IgD ont été rapportées (Lertora et coll., 1975 ; Leslie et coll., 1978; Onodera et coll., 1968; Rostenberg et coll., 1978; Schmidt, et coll., 1973).

Mathur et coll. (1981) ont rapporté que des taux élevés d'IgE seraient associés à l'infertilité chez les humains. Il n'y a pas d'évidence qui démontre que l'infertilité immunologique serait causée par les anticorps IgE anti-sperme. La contribution de l'isotype d'anticorps à la pathogenèse des maladies auto-immunes est très controversée. Les anticorps IgG anti-ADN injectés dans les souris induit le syndrome de «lupus-like », tandis que les anticorps IgM anti-ADN produisent rarement des lésions auto-immunes (Mason et coll., 2001). Le rôle d'IgM a été étudié chez les souris *lpr* (lupus pro). Après une mutation de l'IgM induite chez les souris *lpr*, les animaux ont présenté une glomérulonéphrite, une augmentation des anticorps IgG et une durée de vie réduite (Boes et coll., 2000).

Pour soutenir les résultats obtenus par la technique d'immunohistochimie, nous avons aussi utilisé le Western blot pour établir la présence possible d'auto-anticorps dans les sérums des visons orchitiques qui réagiraient avec les auto-antigènes testiculaires et épидидymaires. Nous avons incubé des fractions enrichies en tubules séminifères et en tissu interstitiel de testicules normaux, des épидидymes normaux et de rates normales avec du sérum de visons sains et orchitiques afin d'étudier la réactivité de ces tissus avec toutes les immunoglobulines. Les antigènes testiculaires et épидидymaires reconnus par le

sérum sont spécifiques à ces deux organes et ne sont pas reconnus dans la rate. En utilisant l'anticorps anti-IgG de vison et après incubation des tissus avec les sérums des visons orchitiques, nous avons identifié dans le tissu interstitiel de testicule et de l'épididyme et dans les tubules séminifères, les mêmes auto-antigènes qui sont présents dans ces tissus incubés avec du sérum normal mais la réactivité est plus forte dans le cas des sérums de visons orchitiques. Le sérum normal montrait une faible réaction avec les antigènes épидидymaires, mais la réactivité était plus forte après l'incubation avec le sérum de vison orchitique. Ces résultats suggèrent la présence des auto-anticorps de type IgG dans le sérum des visons orchitiques.

En utilisant l'anticorps anti-IgM et après incubation de tissu avec du sérum de vison orchitique, nous avons identifié dans les tissus interstitiels et les tubules séminifères des bandes immunoréactives de poids moléculaires voisins de 200 et 120 kDa qui sont moins évidentes après l'incubation avec le sérum normal. Nos résultats suggèrent la présence d'un niveau élevé d'auto-anticorps de type IgM dans le sérum des visons orchitiques. En utilisant les anticorps anti-IgD, anti-IgE et anti-IgA sur des coupes de testicules et d'épididymes, nous n'avons pas détecté de différences entre les tissus pré-incubés avec du sérum de vison sain ou orchitique.

4.3. Conclusion

L'objectif de cette étude était de caractériser des facteurs cellulaires et humoraux impliqués dans l'apparition de l'orchite auto-immune spontanée chez le vison (*Mustela vison*) adulte. Nos résultats montrent la présence d'un infiltrat de macrophages inter-tubulaires et intra-tubulaires dans le testicule et l'épididyme. Nous avons montré pour la première fois que les macrophages interstitiels du testicule et de l'épididyme de vison

expriment le marqueur CD163. Dans le testicule et dans l'épididyme de visons orchitiques, nous avons identifié un infiltrat de lymphocytes CD4+ et CD8+. La colocalisation de HLA II et FasL dans les tubules séminifères de visons orchitiques suggère une implication possible de la voie Fas/FasL dans l'apoptose des cellules germinales, suivie de la destruction de l'épithélium séminifère. La colocalisation CD8/FasL suggère l'implication des lymphocytes CD8+ dans les lésions observées dans l'épididyme de visons orchitiques. Les taux sériques d'IgG, d'IgM, d'IgA et d'IgD ont des valeurs significativement plus élevées dans les sérums des visons orchitiques. Nous avons mis en évidence de dépôts immuns d'IgG et d'IgM dans les membranes limitantes (vasculaires et tubulaires) et des dépôts intracellulaires d'IgA (dans le tissu interstitiel du testicule et de l'épididyme de vison orchitique), d'IgD (dans le tissu interstitiel du testicule de vison orchitique) et d'IgE (dans les tubules et le tissu interstitiel du testicule et de l'épididyme de vison orchitique). La présence dans les tissus des visons orchitiques examinés d'une réponse cellulaire (de macrophages, de cellules CD4+ et CD8+) indique la participation dans la pathologie de l'OAI d'un mécanisme d'immunité cellulaire et l'identification d'une réponse humorale (des titres plus élevés d'immunoglobulines dans les sérums d'animaux orchitiques et des dépôts immuns), suggère l'implication de l'immunité humorale dans la pathologie de l'OAI.

La compréhension des mécanismes qui réduisent la fertilité chez les visons mâles donnera la possibilité de développer de nouvelles stratégies pour un diagnostic précoce de l'OAI spontanée et aussi pour un meilleur traitement de cette maladie. Les implications économiques dans l'industrie de la fourrure comptent lourd dans l'approfondissement des recherches dans ce domaine.

L'orchite auto-immune spontanée chez le vison est très semblable à l'orchite granulomateuse qui apparaît après les oreillons chez l'homme. Le vison, comme modèle d'études expérimentales, pourrait permettre d'envisager des études visant le développement d'un traitement ciblé pour prévenir ou guérir une infertilité, jusque là caractérisée d'irréversible, chez l'homme.

5. BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, T., C. Wakabayashi, T. Nakayama, H. Yakura, and T. Tsubata. 2000. CD72 negatively regulates signaling through the antigen receptor of B cells. *J. Immunol.* 164 :1223-1229.
- Akkraraju, S., K. Canaan, and C.C. Goodnow. 1997. Self-reactive B cells are not eliminated or inactivated by autoantigen expressed on thyroid epithelial cells. *J. Exp. Med.* 186: 2005-2012.
- Albert, M., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-89.
- Alderson, M.R., T.W. Tough, T. Davis-Smith, S. Braddy, B. Falk, K.A. Schooley, R.G. Goodwin, C.A. Smith, F. Ramsdell, and D.H. Lynch. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181: 71-77.
- Alferink, J., A. Tafuri, D. Vestweber, R. Hallmann, G.J. Hammerling, and B. Arnold. 1998. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science.* 282: 1338-1341.
- Anderson, D.J., and J.A. Hill. 1989. Immunological aspects of the reproductive organs and implications of intercourse. *Curr. Opin. Immunol.* 1: 1119-1124.
- Anderson, P. 1995. TIA-1: structural and functional studies on a new class of cytolytic effector molecule. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 198:131-143.
- Anderson, D.J., P. Narayan, and W.C. DeWolf. 1984. Major histocompatibility antigens are not detectable on post-meiotic human testicular germ cells. *J. Immunol.* 133: 1962-1965.
- Andersson, A.M. 2000. Inhibin B in the assessment of seminiferous tubular function. *Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 14: 389-397.

- Andrada, J.A., E.C. Andrada, and E. Witebsky. 1969. Experimental autoallergic orchitis in rhesus monkeys. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130: 1106-1113.
- Ariyaratne, H.B., N .Mills, J.I. Mason, and S.M. Mendis-Handagama. 2000. Effects of thyroid hormone on Leydig cell regeneration in the adult rat following ethane dimethane sulphonate treatment. *Biol. Reprod.* 63: 1115-1123.
- Ariyaratne, H.B., and S. Chamindrani Mendis-Handagama. 2000. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol. Reprod.* 62: 680-690.
- Atkinson, E.A., and R.C. Bleackley. 1995. Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. *Crit. Rev. Immunol.* 15: 359-384.
- Aubry, F., C. Habasque, A.P. Satie, B. Jegou, and M. Samson. 2000. Expression and regulation of the CC-chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in rat testicular cells in primary culture. *Biol. Reprod.* 62: 1427-1435.
- Bach, J.F. 1999. *Immunologie*. Flammarion Médecine-Sciences. 231.
- Barbe, E., J.G. Damoiseaux, E.A. Dopp, and C.D. Dijkstra. 1990. Characterization and expression of the antigen present on resident rat macrophages recognized by monoclonal antibody ED2. *Immunobiology.* 182: 88-99.
- Barra, A., P. Aucouturier, J.L. Preud'homme, 1986. Isotypic distribution of human anti-thyroglobulin IgG antibodies: methodological difficulties. *Diagn. Immunol.* 4: 228-232.
- Barratt, C.L., P.E. Harrison, A. Robinson, and I.D. Cooke. 1990. Antisperm antibodies and lymphocyte subsets in semen- not a simple relationship. *Int. J. Androl.* 13: 50-58.

- Bechmann, G., J. Mor, M. Nilsen, S. Eliza, R. Nitsch, and F. Naftolin. 1999. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*. 27, 62–74.
- Ben, K., N.J. Alexander, and N. Huso. 1986. In vitro cell-mediated and complement-mediated cytotoxicity to murine testicular cells. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 12: 33-37.
- Bergh, A., J.E. Damber, and van N. Rooijen. 1993. Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. *J. Endocrinol.* 136: 407-413.
- Bickerstaff, M.C., M. Botto, W.L. Hutchinson, J. Herbert, G.A. Tennent, A. Bybee, D.A. Mitchell, H.T. Cook, P.J. Butler, M.J. Walport, and M.B. Pepys. 1999. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nat. Med.* 5: 694–697.
- Bigazzi, P.L., J.A. Andrada, E.C. Andrada, E.H. Beutner, and E. Witebsky. 1968. Immunofluorescence studies on Addison's disease. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 34: 455-469.
- Bigazzi, P.E., L.L. Kosuda, K.C. Hsu, and G.A. Andres. 1976. Immune complex orchitis in vasectomized rabbits. *J. Exp. Med.* 143: 382-404.
- Birmingham, D.J., B.H. Rovin, C.Y. Yu, and L.A. Hebert. 2001. Of mice and men: the relevance of the mouse to the study of human SLE. *Immunol. Res.* 24: 211-224.
- Blattner, F.R., and P.W. Tucker. 1984. The molecular biology of immunoglobulin D. *Nature.* 307: 417-422.
- Boes, M., A.P. Prodeus, T. Schmidt, M.C. Carroll, and J. Chen. 1998. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J. Exp. Med.* 188: 2381–2386.

- Boitard, C. 1990. Current concepts in autoimmunity. *Curr. Eye Res.* 9 Suppl: 69-73.
- Bonomo, A., and P. Matzinger. 1993. Thymus epithelium induces tissue-specific tolerance. *J. Exp. Med.* 177: 1153-1164.
- Born, W., and H. Wekerle. 1982. Leydig cells nonspecifically suppress lymphoproliferation in vitro: implications for the testis as an immunologically privileged site. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2: 291-295.
- Bovkun, L.A., Peremislov, V.V., Nayakshin, A.M., Belousov, E.S., Mechetina, L.V., Aasted, B., and A.V. Taranin. 1993. Expression of immunoglobulin kappa and lambda chains in mink. *Eur J Immunol.* 23:1929-1934.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brandtzaeg, P., E. Christiansen, F. Muller, and K. Purvis. 1993. Humoral immune response patterns of human mucosae including the reproductive tracts. In: Griffin P.D., Johnson P.M., Editors, *Local Immunity in Reproductive Tract Tissues*, Oxford University Press, New Delhi, 97-130.
- Breucker, H. 1978. Macrophages, a normal component in seasonally involuting testes of the swan, *Cygnus olor*. *Cell Tissue Res.* 193: 463-471.
- Brickman, C.M., and Y. Shoenfeld. 2001. The mosaic of autoimmunity. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl*; 235: 3-15.
- Buchberg, A.M., and S.A. Camper. 1993. Encyclopedia of the mouse genome III. Mouse chromosome 11. *Mamm. Genome.* 4 Spec No: S 164-175.
- Bulmer, J.N., and P.M. Johnson. 1985. Immunohistological characterization of the decidual leucocytic infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. *Immunology.* 55: 35-44.

- Cambier, J.C., L.B. Justement, M.K. Newell, Z.Z. Chen, V.M. Harris, V.M. Sandoval, M.J. Klemsz, and J.T. Ransom. 1987. Transmembrane signals and intracellular "second messengers" in the regulation of quiescent B-lymphocyte activation. *Immunol. Rev.* 95: 37-57.
- Caux C, B. Vanbervliet, C. Massacrier, M. Azuma, K. Okumura, L.L. Lanier, and J. Banchereau. 1994 B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells *J Exp Med.* 180:1841-1847
- Carron, C.P., A. Mathias, and P.M. Saling. 1989. Anti-idiotypic antibodies prevent antibody binding to mouse sperm and antibody-mediated inhibition of fertilization. *Biol. Reprod.* 41: 153-162.
- Casali, P., and A.L. Notkins. 1989. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol. Today.* 10: 364-368.
- De Casseye Jadot-Van, M., G. De Bled, W. Gepts, and R. Schoysman. 1980. An immunohistochemical study for testicular biopsies in cases of male infertility. *Andrologia.* 12: 122-129.
- De Cesaris, P., A. Filippini, C. Cervelli, A. Riccioli, S. Muci, G. Starace, M. Stefanini, and E. Ziparo. 1992. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: biological effects on lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 1639-1646.
- Chan, O.T., L.G. Hannum, A.M. Haberman, M.P. Madaio, and M.J. Shlomchik. 1999. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J. Exp. Med.* 189: 1639-1648.
- Chang, T.W. 1976. Familial allergic seminal vulvovaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 15; 126: 442-444.

- Clement, M.V., and I. Stamenkovic. 1994. Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: similarities and distinctions. *J. Exp. Med.* 180: 557-67.
- Clifton, V.L., A.J. Husband, and D.J. Kay. 1992. Local immunity in the male reproductive tract. *Immunol. Cell. Biol.* 70: 301-307.
- Cobbold, S., and H. Waldmann. 1998. Infectious tolerance, *Curr. Opin. Immunol.* 10: 518-524.
- Coe, J.E. and W.J., Hadlow. 1972. Studies on immunoglobulins of mink: definition of IgG, IgA and IgM. *J. Immunol.* 108: 530-537.
- Coico, R.F., G.W. Siskind, and G. J. Thorbecke. 1988. Role of IgD and T_H cells in the regulation of the humoral immune response. *Immunol. Rev.* 105: 45-67.
- Coico, R.F., S.L.Tamma, M. Bessler, C.F. Wei, and G.J. Thorbecke. 1990. IgD-receptor-positive human T lymphocytes. I. Modulation of receptor expression by oligomeric IgD and lymphokines. *J. Immunol.* 145: 3556-3561.
- Collins J., and S. Gough. 2002. Autoimmunity in thyroid disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 29 Suppl 2: S417-424.
- Colombani, J. 1993. HLA-Fonctions immunitaires et applications medicales. Ed. J. Libelet Eurotext. 63-77.
- O'Connell, J. 2002. Fas ligand and the fate of antitumour cytotoxic T lymphocytes. *Immunology.* 105: 263-266
- Cooke, M.P., A.W. Heath, K.M. Shokat, Y. Zeng, F.D. Finkelman, P.S. Linsley, M. Howard, and C.C. Goodnow. 1994. Immunoglobulin signal transduction guides the specificity of B cell-T cell interactions and is blocked in tolerant self-reactive B cells. *J. Exp. Med.* 179: 425-438.

- D'Alessio, A., Riccioli, A., Lauretti, P., Padula, F., Muciaccia, B., De Cesaris, P., Filippini, A., Nagata, S., and Ziparo. 2001. Testicular FasL is expressed by sperm cells. *E Proc Natl Acad Sci U S A*. 98 :3316-3321.
- D'Cruz, O.J., G.G. Jr. Haas, R. de La Rocha, and H. Lambert. 1991. Occurrence of serum antisperm antibodies in patients with cystic fibrosis. *Fertil. Steril.* 56: 519-527.
- Damoiseaux, J.G., E.A. Dopp, W. Calame, D. Chao, G.G. MacPherson, and C.D.Dijkstra. 1994. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology.* 83: 140-147.
- Dietrich, H.M. 1989. Housing, breeding and selecting chickens of the Obese strain (OS) with spontaneous autoimmune thyroiditis. *Lab. Anim.* 23: 345-52.
- El-Demiry, M.I., T.B. Hargreave, A. Busuttil, K. James, A.W. Ritchie, and G.D. Chisholm. 1985. Lymphocyte sub-populations in the male genital tract. *Br. J. Urol.* 57: 769-774.
- El-Demiry, M.I., T.B. Hargreave, A. Busuttil, R. Elton, K. James, and G.D. Chisholm. 1987. Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertil. Steril.* 48: 470-479.
- El-Demiry, M. and K. James. 1988. Lymphocyte subsets and macrophages in the male genital tract in health and disease. A monoclonal antibody-based study. *Eur. Urol.* 14: 226-235.
- Doncel, G.F., J.A. Di Paola, and L. Lustig. 1989. Sequential study of the histopathology and cellular and humoral immune response during the development of an autoimmune orchitis in Wistar rats. *Am. J. Reprod. Immunol.* 20: 44-51.
- Dondero, F., A. Lenzi, L. Gandini, and F. Lombardo. 1993. Immunological infertility in humans. *Exp. Clin. Immunogenet.* 10: 65-72.

- Doody, G.M., L.B. Justement, C.C. Delibrias, R.J. Matthews, J. Lin, M.L. Thomas, and D.T. Fearon. 1995. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science*. 269: 242-244.
- Doohar, G.B., K. Artzt, D. Bennett, and U. Hurtenbach. 1981. Observations on autoimmune orchitis in sterile mice carrying a recessive lethal mutation at the T/t complex exhibiting spontaneous allergic orchitis. *J. Reprod. Fertil.* 62 : 505-511.
- Doyle, C., J. L. Strominger. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*. 330: 256-258.
- Dunnette S.L., G. J. Gleich, R.D. Miller, and R.A. Kyle. 1977. Measurement of IgD by a double antibody radioimmunoassay: demonstration of an apparent trimodal distribution of IgD levels in normal human sera. *J. Immunol.* 119: 1727-1731.
- Dym, M., and L.J. Romrell. 1975. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *J. Reprod. Fertil.* 42: 1-7.
- Ellis, T.M., M.T. Moser, R.C. Flanigan, and E.D. Kwon. 2001. Alterations in peripheral B cells and B cell progenitors following androgen ablation in mice. *Int. Immunol.* 13: 553-558.
- Ermann, J., and C.G. Fathman. 2001. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat. Immunol.* 2: 759-761.
- Finkelman F.D., A. Lees, R. Birnbaum, W.C. Gause, and S.C. Morris. 1996. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J. Immunol.* 157: 1406-1414.
- Fiszer, D., and M. Kurpisz. 1998. Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40: 172-176.

- Flickinger, C.J., Herr J.C., Howards S.S., Sisak J.R., Gleavy J.M., Fusia T.J., Vailes L.D, and H.H. Handley 1990 Early testicular changes after vasectomy and vasovasostomy in Lewis rats. *Anat Rec.* 227: 37-46
- Flickinger C.J., L.A. Bush, S.S. Howards, and J.C. Herr. 1997. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat. Rec.* 248: 380-390.
- Fowell, D., A.J. McKnight, F. Powrie, R. Dyke, and D. Mason. 1991. Subsets of CD4+ T cells and their roles in the induction and prevention of autoimmunity. *Immunol. Rev.* 123: 37-64.
- Fowler, J.E. Jr., and M. Mariano. 1983. Immunoglobulin in seminal fluid of fertile, infertile, vasectomy and vasectomy reversal patients. *J. Urol.* 129: 869-872.
- Francavilla, S., P. D'Abrizio, N. Rucci, G. Silvano, G. Properzi, E. Straface, G. Cordeschi, S. Necozone, L. Gnessi, M. Arizzi, and S. Ulisse. 2000. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 2692-2700.
- Friberg, J. 1980. Immunoglobulin concentration in serum and seminal fluid from men with and without sperm-agglutinating antibodies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 136: 671-675.
- Fritz, T.E., S.A. Lombard, S.A. Tyler, and W.P.Norris. 1976. Pathology and familial incidence of orchitis and its relation to thyroiditis in a closed beagle colony. *Exp. Mol. Pathol.* 24: 142-158.
- Frungieri, M.B., R.S. Calandra, L. Lustig, V. Meineke, F.M. Kohn, H.J. Vogt, and A. Mayerhofer. 2002. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril.* 78: 298-306.
- Frydelund-Larsen, L., C. Krausz, H. Leffers, A.M. Andersson, E. Carlsen, S. Bangsboell, K. McElreavey, N.E. Skakkebaek, and E. Rajpert-De Meyts.

2002. Inhibin B: a marker for the functional state of the seminiferous epithelium in patients with azoospermia factor C microdeletions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 5618-5624.
- Fujii, Y., T. Yokochi, I. Nakashima, J. Asai, N. Kato. 1991. A new mouse model for autoimmune orchitis. *Med. Microbiol. Immunol.* 180: 1-14.
- Furbeth, C., G. Hubner, and G.H. Thoenes. 1989. Spontaneous immune complex orchitis in brown Norway rats. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 57:37-45.
- Gaytan, F., C. Bellido, C. Morales, C. Reymundo, E. Aguilar, and N. Van Rooijen. 1994. Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. *J. Androl.* 15: 558-564.
- Gaytan, F., J.L. Romero, C. Bellido, C. Morales, C. Reymundo, and E. Aguilar. 1994. Effects of growth hormone and prolactin on testicular macrophages in long-term hypophysectomized rats. *J. Reprod. Immunol.* 27: 73-84.
- Gehrs, B.C., and R.C. Friedberg. 2002. Autoimmune hemolytic anemia, *Am. J. Hematol.* 69: 258-271.
- George, J., Y. Levy, and Y. Shoenfeld. 1996. Immune network and autoimmunity. *Intern. Med.* 35: 3-9.
- Giordano, C., G. Stassi, R. De Maria, M. Todaro, P. Richiusa, G. Papoff, G. Ruberti, M. Bagnasco, R. Testi, and A. Galluzzo. 1997. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275:960-963.
- Griffiths, G.M. and C. Mueller. 1991. Expression of perforin and granzymes in vivo: potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. *Immunol. Today.* 12: 415-419.

- Gerdprasert, O., M.K. O'Bryan, D.J. Nikolic-Paterson, K. Sebire, D.M. de Kretser, and M.P. Hedger. 2002. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor in normal and inflamed rat testis. *Mol. Hum. Reprod.* 8: 518-524.
- Goodnow, C.C. 1996. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 2264-2271.
- Goodnow, C.C., S. Adelstein, and A. Basten. 1990. The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. *Science.* 248: 1373-1379.
- Gorak-Stolinska, P., J.P. Truman, D.M. Kemeny, and A. Noble. 2001. Activation-induced cell death of human T-cell subsets is mediated by Fas and granzyme B but is independent of TNF-alpha. *J. Leukoc. Biol.* 70: 756-766.
- Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3:23-35.
- Haas, G.G. Jr. 1987. How should sperm antibody tests be used clinically? *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 15: 106-111.
- Haas, G.G. Jr.. 1987a. Antibody-mediated causes of male infertility. *Urol. Clin. North. Am.* 14: 539-550.
- Haas, G.G. Jr. 1996. Antisperm antibodies in infertile men. *JAMA.* 275: 885-886.
- Haas, G.G. Jr. and O.J. D'Cruz. 1991. The predominance of IgG1 and IgG3 subclass antisperm antibodies in infertile patients with serum antisperm antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 26: 104-109.
- Hackstein, H., A.E. Morelli, and A.W. Thomson. 2001. Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol.* 22: 437-442.

- Hales, D.B. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 57: 3-18.
- Hales, K.H., T. Diemer, S. Ginde, B.K. Shankar, M. Roberts, H.B. Bosmann, and D.B. Hales. 2000. Diametric effects of bacterial endotoxin lipopolysaccharide on adrenal and Leydig cell steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology.* 141: 4000-4012.
- Halpren, B.N., T. Ky, and B. Robert. 1967. Clinical and immunological study of an exceptional case of reaginic type sensitization of human seminal fluid. *Immunol.* 12; 247-254.
- Hammerling G.J., G. Schonrich, I. Ferber, and B. Arnold. 1993. Peripheral tolerance as a multi-step mechanism. *Immunol. Rev.* 133: 93-104.
- Haughton, G, L.L., Lanier, and G.F. Babcock. 1978. The murine kappa light chain shift. *Nature.* 14: 154-157.
- Hayes, R., S.A. Chalmers, D.J. Nikolic-Paterson, R.C. Atkins, and M.P. Hedger. 1996. Secretion of bioactive interleukin-1 by rat testicular macrophages in vitro. *J. Androl.* 17: 41-49.
- He, L., M.P. Hedger J.A Clements, and G.P. Risbridger. 1991. Localization of immunoreactive beta-endorphin and adrenocorticotrophic hormone and pro-opiomelanocortin mRNA to rat testicular interstitial tissue macrophages. *Biol Reprod.* 45: 282-289.
- Head, J.R., and R.E. Billingham. 1985. Immunologically privileged sites in transplantation immunology and oncology, *Perspect. Biol. Med. Autumn.* 29: 115-131.
- Heath, W.R., and F.R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 47-64.

- Hedger, M.P. 1997. Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev. Reprod.* 2: 38-47
- Hedger, M.P., A.E. Drummond, D.M. Robertson, G.P. Risbridger, and D.M. de Kretser. 1989. Inhibin and activin regulate [3H]thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.* 61: 133-138.
- Hedger, M.P., J.X. Qin, D.M. Robertson, and D.M. de Kretser. 1990. Intra-gonadal regulation of immune system functions. *Reprod. Fertil. Dev.* 2: 263-280.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407: 770-776.
- Van den Heuvel, M.M., C.P. Tensen, J.H. van As, T.K. Van den Berg, D.M. Fluitsma, C.D. Dijkstra, E.A. Dopp, A. Droste, F.A. Van Gaalen, C. Sorg, P. Hogger, and R.H. Beelen. 1999. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J. Leukoc. Biol.* 66: 858-866.
- Hexham, J.M., K.D. White, L.N. Carayannopoulos, W. Mandecki, R. Brisette, Y.S. Yang, and J.D. Capra. 1999. A human immunoglobulin (Ig)A α 3 domain motif directs polymeric Ig receptor-mediated secretion. *J. Exp. Med.* 189: 747-752.
- Hikim, A.P., Y. Lue, C.M. Yamamoto, Y. Vera, S. Rodriguez, P.H. Yen, K. Soeng, C. Wang and R.S. Swerdloff. 2003. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology.* 144: 3167-3175
- Hippen, K.L., L.E. Tze, and T.W. Behrens. 2000. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J. Exp. Med.* 191: 883-890.
- Hodgkin, P.D., and A. Basten. 1995. B cell activation, tolerance and antigen-presenting function. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 121-129.
- Hoek, A., W. Allaerts, P.J. Leenen, J. Schoemaker, and H.A. Drexhage. 1997. Dendritic cells and macrophages in the pituitary and the gonads. Evidence for their role

in the fine regulation of the reproductive endocrine response. *Eur. J. Endocrinol.* 136: 8-24.

Hogger, P., J. Dreier, A. Droste, F. Buck, and C. Sorg. 1998. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *J. Immunol.* 161: 1883-1890.

Honore, L.H. 1978. Ageing changes in the human testis: a light-microscopic study. *Gerontology.* 24: 58-65.

Huang, S.N., Minassian, H., and J.D. More. 1976. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest.* 35: 383-390.

Hurtenbach, U., and G.M. Shearer. 1982. Germ cell-induced immune suppression in mice. Effect of inoculation of syngeneic spermatozoa on cell-mediated immune responses. *J. Exp. Med.* 155: 1719-1729.

Hutson, J.C. 1990. Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biol Reprod.* 43: 885-890.

Hutson, J.C. 1994 .Testicular macrophages. *Int. Rev. Cytol.* 149: 99-143.

Inaba K, M. Witmer-Pack, M. Inaba, K.S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P.S. Linsley and S. Ikehara 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med.* 180:1849-1860.

Itoh, M., C. Hiramane, and K. Hojo. 1991. A new murine model of autoimmune orchitis induced by immunization with viable syngeneic testicular germ cells alone. I. Immunological and histological studies. *Clin. Exp. Immunol.* 83: 137-142.

- Itoh, M., C. Hiramane, A. Mukasa, Y. Tokunaga, Y. Fukui, Y. Takeuchi, and K. Hojo. 1992. Establishment of an experimental model of autoimmune epididymo-orchitis induced by the transfer of a T-cell line in mice. *Int. J. Androl.* 15: 170-181.
- Itoh, M., D.G. De Rooij, A. Jansen, and H.A. Drexhage. 1995a. Phenotypical heterogeneity of testicular macrophages/dendritic cells in normal adult mice: an immunohistochemical study. *J. Reprod. Immunol.* 28: 217-232.
- Itoh, M., D. De-Rooij, and Y. Takeuchi. 1995b. Mode of inflammatory cell infiltration in testes of mice injected with syngeneic testicular germ cells without adjuvant. *J. Anat.* 187: 671-679.
- Itoh, M., A. Yano, Q. Xie, K. Iwahashi, Y. Takeuchi, P.L. Meroni, and F. Nicoletti, 1998. Essential pathogenic role for endogenous interferon-gamma (IFN-gamma) during disease onset phase of murine experimental autoimmune orchitis. I. In vivo studies. *Clin. Exp. Immunol.* 111: 513-520.
- Jäger A., R.J. Radlanski, and W.Götz. 1993. Demonstration of cells of the mononuclear phagocyte lineage in the periodontium following experimental tooth movement in the rat. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies ED1 and ED2 on paraffin-embedded tissues. *Histochemistry.* 100: 161-166.
- James, K., and S. Szymaniec. 1985. Human seminal plasma is a potent inhibitor of natural killer cell activity in vitro. *J. Reprod. Immunol.* 8: 61-70.
- Janeway, C.A. Jr. 1998. A tale of two T cells. *Immunity.* 8: 391-394.
- Jaspars E.H., E. Bloemena, P. Bonnet, R.J. Scheper, E. Kaiserling, and C.J. Meijer. 1994. A new monoclonal antibody (3A5) that recognises a fixative resistant epitope on tissue macrophages and monocytes. *J Clin Pathol.* 47: 248-252.

- Jefferis, R., and D.S. Kumararatne. 1990. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin. Exp. Immunol.* 81: 357-367.
- Jégou, B., C. Pineau, and A. Dupaix. 1995. La cellule de Sertoli : actualisation du concept de cellule nourricière. *M/S.* 4 : 519-527.
- Jenne, D.E., and J. Tschopp. 1989. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7123-7127.
- Johnson, A., S. Harkin, M.W. Steward, and K. Whaley. 1987. The effects of immunoglobulin isotype and antibody affinity on complement-mediated inhibition of immune precipitation and solubilization. *Mol. Immunol.* 24: 1211-1217.
- Johnson L., R.S. Zane, C.S. Petty, and W.B. Neaves. 1984. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol. Reprod.* 31: 785-795.
- Josephs, S.H., and R.H. Buckley. 1980. Serum IgD concentrations in normal infants, children, and adults and in patients with elevated IgE. *J. Pediatr.* 96: 417-420.
- Kabbaj, O., Holm, C., Vitale, M.L., and Pelletier R.-M. 2001. Expression, activity and subcellular localization of testicular hormone-sensitive lipase (HSL) during postnatal development in the guinea pig. *Biol. Reprod.* 65: 601-612.
- Kabbaj, O., Yoon, S.R., Holm, C., Rose, J., Vitale, M.L., and R.M. Pelletier, 2003. Relationship of the hormone-sensitive lipase-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormone and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*). *Biol Reprod.* 68: 722-734.

- Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, and P. Golstein. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 256:528.
- Kalaydjiev, S., D. Dimitrova, M. Nenova, S. Peneva, I. Dikov, and L. Nakov. 2002. Serum sperm antibodies are not elevated after mumps orchitis. *Fertil. Steril.* 77: 76-82.
- Kappel, C.A., M.C. Dal Canto, R.W. Melvold, and B.S. Kim. 1991. Hierarchy of effects of the MHC and T cell receptor beta-chain genes in susceptibility to Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J. Immunol.* 147: 4322-4326.
- Khong, T.Y. 1987. Immunohistologic study of the leukocytic infiltrate in maternal uterine tissues in normal and preeclamptic pregnancies at term. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 15: 1-8.
- King, A., P. Wooding, L. Gardner, Y.W. Loke. 1993. Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. *Hum Reprod.* 8: 2061-2067.
- Kohno, S., J.A. Munoz, T.M. Williams, C. Teuscher, C.C. Bernard, and K.S. Tung. 1983. Immunopathology of murine experimental allergic orchitis. *J. Immunol.* 30: 2675-2682.
- Kohno, S., E. Ziparo, L.F. Marek, and K.S. Tung. 1983. Murine Sertoli cells: major histocompatibility antigens and glycoconjugates. *J. Reprod. Immunol.* 5: 339-350.
- Lahita, R. G., Chiorazzi, N., and W. H. Reeves. 2000. Textbook of the autoimmune diseases. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.

- Laufer, T.M., M.G. von Herrath, M.J. Grusby, M.B. Oldstone, and L.H. Glimcher. 1993. Autoimmune diabetes can be induced in transgenic major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J. Exp. Med.* 178: 589-596.
- Laurence, K.A., O. Carpuq, A. Lefevre, and D. Mauldin. 1965. Allergic aspermatogenesis in the guinea pig. Induction and recovery studies. *Int. J. Fertil.* 10: 341-347.
- Le, P.T., H.T. Maecker, and J.E. Cook. 1995. In situ detection and characterization of apoptotic thymocytes in human thymus. Expression of bcl-2 in vivo does not prevent apoptosis. *J Immunol.* 154: 4371-4378.
- Lee, S.H., M.S. Shin, W.S. Park, S.Y. Kim, S.M. Dong, H.K. Lee, J.Y. Park, R.R. Oh, J.J. Jang, J.Y. Lee, and N.J. Yoo. 1999. Immunohistochemical analysis of Fas ligand expression in normal human tissues. *APMIS.* 107: 1013-1019.
- Lee, W, A.J. Mason, R. Schwall, E. Szonyi, and J.P. Mather. 1989. Secretion of activin by interstitial cells in the testis. *Science.* 243: 396-398.
- Lehmann, D., and L.R. Emmons. 1989. Immunological phenomena observed in the testis and their possible role in infertility. *Am. J. Reprod. Immunol.* 19: 43-52.
- Lehmann D, B. Temminck, D. Da Rugna, B. Leibundgut, A. Sulmoni, and H. Muller. 1987. Role of immunological factors in male infertility. Immunohistochemical and serological evidence. *Lab. Invest.* 57: 21-28.
- Lenardo, M.J. 1996. Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J. Exp. Med.* 183: 721-724.
- Lenardo M, K.M. Chan, F. Hornung, H. McFarland, R. Siegel, J. Wang, and L. Zheng. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol.* 17: 221-253.

- Lepple-Wienhues, A, C. Belka, T. Laun, A. Jekle, B. Walter, U. Wieland, M. Welz, L. Heil, J. Kun, G. Busch, M. Weller, M. Bamberg, E. Gulbins, and F. Lang. 1999. Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 13795-13800.
- Lertora, J. J. L., F. J. Gomez-Perez, and G. A. Leslie. 1975. Structure and biological functions of human IgD. V. Insulin antibodies of the IgD class in sera from some diabetic patients. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 49: 597-606.
- Leslie, G. A., and L. N. Martin. 1978. Structure and function of serum and membrane immunoglobulin D (IgD). *Contemp. Top. Mol. Immunol.* 7: 1-49.
- Levy, S., V. Serre, L. Hermo, and B. Robaire. 1999. The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the Brown Norway rat. *J. Androl.* 20: 356-365.
- Liblau, R.S., F.S. Wong, L.T. Mars, and P. Santamaria. 2002. Autoreactive CD8 T Cells in Organ-Specific Autoimmunity: Emerging Targets for Therapeutic Intervention. *Immunity.* 17: 1-6.
- Linthicum, D.S., and J.A. Frelinger. 1982. Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. II. Susceptibility is controlled by the combination of H-2 and histamine sensitization genes. *J. Exp. Med.* 156: 31-40.
- Littman, D.R. 1987. The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu. Rev. Immunol.* 5:561-584.
- Littman, D.R. 1996. The CD4 molecule. Roles in T lymphocytes and in HIV disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 205: v-x.
- Liu, Y.J., O. de Bouteiller, and I. Fugier-Vivier. 1997. Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr. Opin Immunol.* 9: 256-262.

- Luo, A.M., K.M. Garza, D. Hunt, and K.S. Tung. 1993. Antigen mimicry in autoimmune disease sharing of amino acid residues critical for pathogenic T cell activation. *J. Clin. Invest.* 92: 2117-2123.
- Lustig, L., M.L. Satz, M.B. Szein, and B. Denduchis. 1982. Antigens of the basement membranes of the seminiferous tubules induce autoimmunity in Wistar rats. *J. Reprod. Immunol.* 4: 79-90.
- Lustig, L., L. Lourtau, R. Perez, and G.F. Doncel. 1993. Phenotypic characterization of lymphocytic cell infiltrates into the testes of rats undergoing autoimmune orchitis. *Int. J. Androl.* 16: 279-284.
- Lustig, L., B. Denduchis, R. Ponzio, M. Lauzon, and R.M. Pelletier. 2000. Passive immunization with anti-laminin immunoglobulin G modifies the integrity of the seminiferous epithelium and induces arrest of spermatogenesis in the guinea pig. *Biol Reprod.* 62:1505-1514.
- Lydyard, P.M., A.P. Jewell, C. Jamin, and P.Y. Youinou. 1999. CD5 B cells and B-cell malignancies. *Curr Opin Hematol.* 6: 30-36.
- Mahi-Brown, C.A., T.D. Yule, and K.S. Tung. 1987. Adoptive transfer of murine autoimmune orchitis to naive recipients with immune lymphocytes. *Cell. Immunol.* 106: 408-419.
- Mahi-Brown, C.A., and K.S. Tung. 1989. Activation requirements of donor T cells and host T cell recruitment in adoptive transfer of murine experimental autoimmune orchitis (EAO). *Cell. Immunol.* 124: 368-379.
- Mancini, R., J.A. Andrada, D. Sacaceni, A.E. Bachmann, J.C. Lavieri, and M. Nemirovsky. 1965. Immunological studies in patients with prostatic carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 25: 859-866.
- Mariani, S., S. Basciani, M. Arizzi, G. Spera, and L. Gnessi. 2002. PDGF and the testis. *Trends Endocrinol Metab.* 13: 11-7.

- Marrack, P., J. Kappler, and B.L. Kotzin. 2001. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat. Med.* 7: 899-905.
- Marrack, P., and J. Kappler. 1997. Positive selection of thymocytes bearing alpha beta T cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 9:250-255.
- Marsh, L.D., and N.J. Alexander. 1982. Effects on the efferent ducts in *Macaca mulatta*. *Am. J. Pathol.* 107:310-315.
- Marshburn, P.B., and W.H. Kutteh. 1994. The role of antisperm antibodies in infertility. *Fertil. Steril.* 61: 799-811.
- Mason, L.J., C.T. Ravirajan, D.S. Latchman and D.A. Isenberg. 2001. A human anti-dsDNA monoclonal antibody caused hyaline thrombi formation in kidneys of leaky SCID mice. *Clin. Exp. Immunol.* 126: 137-142.
- Mathur, S., L. Chao, B.A. Schulte, C. Woodley-Miller, A. Abdel-Latif, C.M. Fredericks, P.F. Rust, and H.O. Williamson. 1987. Sperm and seminal plasma antigens from autoimmune men induce immunological infertility. *Arch Androl.* 19: 161-175.
- Mathur, S, H.O. Williamson, E.R. Baker, and H.H. Fudenberg. 1981. Immunoglobulin E levels and antisperm antibody titers in infertile couples. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 140: 923-930.
- McKeever U, J.P. Mordes, D.L. Greiner, M.C. Appel, J. Rozing, E.S. Handler, and A.A. Rossini. 1990. Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87:7618-22.
- McLennan, I.S. 1996. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *J. Anat.* 188: 17-28.

- Medzhitov, R, and C.A. Jr. Janeway. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 296: 298-300.
- Meinhardt, A., M. Bacher, C. Metz, R. Bucala, N. Wreford, H. Lan, R. Atkins, and M. Hedger. 1998. Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biol Reprod*. 59:371-378.
- Mestecky, J., and P.N. Fultz. 1999. Mucosal immune system of the human genital tract. *J. Infect. Dis*. 179 Suppl 3: S470-474.
- Mestecky, J., C. Lue, and M.W. Russell. 1991. Selective transport of IgA. Cellular and molecular aspects. *Gastroenterol. Clin. North. Am*. 20: 441-471.
- Metchnikoff, E. 1900. Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxine, sur le spermatoxine et l'antispermatoxine. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. 14 :1.
- Michaelsen, T.E., P. Garred, and A. Aase. 1991. Human IgG subclass pattern of inducing complement-mediated cytolysis depends on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration. *Eur. J. Immunol*. 21: 11-16.
- Miller, S.C. 1982. Localization of plutonium-241 in the testis. An interspecies comparison using light and electron microscope autoradiography. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med*. 41: 633-43.
- Miller, S.C., B.M. Bowman, and H.G. Rowland. 1983. Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *Am J Anat*. 168: 1-13.
- Miller, S.C., B.M. Bowman, and L.K. Roberts. 1984. Identification and characterization of mononuclear phagocytes isolated from rat testicular interstitial tissues. *J. Leukoc. Biol*. 36: 679-687.

- Moldovan, M.C., Yachou, A., Levesque, K., Wu, H., Hendrickson, W.A., Cohen, E.A., and R.P. Sekaly. 2002. CD4 dimers constitute the functional component required for T cell activation. *J Immunol.* 169 : 6261-6268.
- Moore, K.J., and R.W. Elliott. 1993. Encyclopedia of the mouse genome III. October. Mouse chromosome 6. *Mamm. Genome.* 4 Spec No: S88-109.
- Moore, C., and J.C. Hutson. 1994. Physiological relevance of tumor necrosis factor in mediating macrophage-Leydig cell interactions. *Endocrinology.* 134: 63-69.
- Mor, G., L.S. Gutierrez, M. Eliza, F. Kahyaoglu and A.Arici. 1998. Fas-Fas ligand system-induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40: 89-94.
- Mor, G., S. Straszewski, and M. Kamsteeg. 2002. Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: survival and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 64: 1305-1315.
- Mozes, E., S. Mendlovic, F. Kalush, A. Waisman, Y. Shoenfeld, and H. Fricke. 1990. Immunoregulation of autoimmune diseases. *Isr J Med Sci.* 26: 688-690.
- Mudde, G.C., R. Bheekha, and C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen. 1995. Consequences of IgE/CD23-mediated antigen presentation in allergy. *Immunol Today;* 16: 380-383.
- Muller, S., J. Lory, N. Corazza, G.M. Griffiths, K. Z'graggen, L. Mazzucchelli, A. Kappeler, and C. Mueller. 1998. Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am. J. Pathol.* 152: 261-268.
- Mukasa, A., M. Itoh, Y. Tokunaga, C. Hiramine, and K. Hojo. 1992. Inhibition of a novel model of murine experimental autoimmune orchitis by intravenous administration with a soluble testicular antigen: participation of CD8+ regulatory T cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62: 210-219.

- Najakshin, A.M., Belousov, J.S., Alabyev, B.Yu., Bogachev, S.S., and A.V. Taranin. 1993. cDNA clones encoding mink immunoglobulin lambda chains. *Mol Immunol.* 30:1205-1212.
- Najakshin, A.M., Belousov, E.S., Alabyev, B.Yu., Christensen, J., Storgaard, T., Aasted, B., and A.V. Taranin. 1996. Structure of mink immunoglobulin gamma chain cDNA. *Dev Comp Immunol.* 20:231-240.
- Naz, R.K., K. Ahmad, and A.C. Menge. 1993. Antiidiotypic antibodies to sperm in sera of fertile women that neutralize antisperm antibodies. *J. Clin. Invest.* 92:2331-2338.
- Nemazee, D.A., and K. Burki. 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature.* 337: 562-566.
- Nielsen, F.C., A. Rodgaard, R. Djurup, F. Somnier, and S. Gammeltoft. 1985. A triple antibody assay for the quantitation of plasma IgG subclass antibodies to acetylcholine receptors in patients with myasthenia gravis. *J. Immunol Methods.* 83: 249-258.
- Niemi, M., R.M. Sharpe, and W.R. Brown. 1986. Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res.* 243: 337-344.
- Nistal, M., R. Paniagua, and J.A. Diez-Pardo. 1980. Histologic classification of undescended testes. *Hum Pathol.* 11: 666-674.
- Nistal, M., F. Martinez-Garcia, J. Regadera, P. Cobo, and R. Paniagua. 1992. Macroorchidism: light and electron microscopic study of four cases. *Hum. Pathol.* 23: 1011-1018.
- Nistal, M., M.L. Riestra, and R. Paniagua. 2002. Focal orchitis in undescended testes: discussion of pathogenetic mechanisms of tubular atrophy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 126: 64-69.

- Ohashi, P.S., and A.L. DeFranco. 2002. Making and breaking tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 744-759.
- Onodera, S., A. Shibata, A. B. Miura, A. Suzuki, and S. Sakamoto. 1968. Quantitative determination of serum immunoglobulin D in gammopathy. *Tohoku J. Exp. Med.* 95: 145-151.
- Padmanabhan, R., and S. Singh. 1981. Effect of experimental cryptorchidism on the testis in the rat-a histological study. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 95: 1057-1064.
- Parnes, J.R. 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol.* 44: 265-311.
- Paul, W.E, and R.A. Seder.1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* 76: 241-251.
- Peitsch, M.C., and J. Tschopp. 1995. Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family. *Mol. Immunol.* 32:761-772.
- Pelletier, R.M., M.S. Nemirovsky, R. Calvert, and J.S. Hugon. 1981. Effects of immunization with Freund's complete adjuvant and isologous spermatozoa on the seminiferous epithelium and blood-testis barrier in guinea pigs. *Anat Rec.* 199: 197-211.
- Pelletier, R.M. 1986. Cyclic formation and decay of the blood-testis barrier in the mink (*Mustela vison*), a seasonal breeder. *Am. J. Anat.* 175: 91-117.
- Pelletier, R.M. 1988. Cyclic modulation of Sertoli cell junctional complexes in a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Am. J. Anat.* 183: 68-102.
- Pelletier, R.M., and S.W. Byers. 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc. Res. Tech.* 20:3-33.

- Pelletier, R.M. 1995. The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of Sertoli junctional barrier in continual (Guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *J. Androl.* 16: 400-409.
- Pelletier, R.M. 1995b. Le rôle des jonctions intercellulaires dans le fonctionnement de la barrière hémato-testiculaire. *M/S.* 11 : 605-609.
- Pelletier, R.M., J-M. E Trifaro, M. Carbajal, Y. Okawara, and M. L. Vitale. 1999. Calcium-dependent actin filament-serving protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis and spermatozoa. *Biol.Reprod.* 60: 1128-1136.
- Pelletier, R.M., S.R. Yoon, O. Kabbaj, and M.L. Vitale. 2000. Development and maintenance of fertility in the male mink. *Scientifur.* 24: 16-24.
- Person, P.L., M. Snoek, P. Demant, S.R. Woodward, and C. Teuscher. 1992. The immunogenetics of susceptibility and resistance to murine experimental allergic orchitis. *Reg. Immunol.* 4:284-297.
- Pesando, J.M., L.S. Bouchard, and B.E. McMaster. 1989. CD19 is functionally and physically associated with surface immunoglobulin. *J. Exp. Med.* 170: 2159-2164.
- Peutz-Kootstra, C.J., E. de Heer, P.J. Hoedemaeker, C.K. Abrass, and J.A. Bruijn. 2001. Lupus nephritis: lessons from experimental animal models. *J. Lab. Clin. Med.* 137: 244-260.
- Pöllänen , P., and S. Maddocks. 1988. Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. *J. Reprod. Fertil.* 82: 437-445.
- Pöllänen , P., and M. Niemi. 1987. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int J Androl.* 10: 37-42.

- Pöllänen P, O. Soder, and J. Uksila. 1988. Testicular immunosuppressive protein. *J. Reprod. Immunol.* 14:125-138.
- Pollard, J.W. 1997. Role of colony-stimulating factor-1 in reproduction and development. *Mol. Reprod Dev.* 46: 54-60.
- Ponvert, C., Paupe, J., and C. Griscelli. 1991. Immunologie fondamentale et immunopathologie. Ed. Marketing Paris. 279-305.
- Porter, D.D., A.E. Larsen, and H.G. Porter. 1980. Aleutian disease of mink. *Adv. Immunol.* 29: 261-286.
- Primakoff, P., L. Woolman-Gamer, K.S. Tung, and D.G. Myles. 1997. Reversible contraceptive effect of PH-20 immunization in male guinea pigs. *Biol Reprod.* 56: 1142-1146.
- Pudney, J.A., and D.J. Anderson. 1993. Organization of immunocompetent cells and their function in the male reproductive tract. In: Griffin PD, Johnson PM eds. *Local immunity in the reproductive tract tissues*. Oxford: Oxford University Press. 131-145.
- Raburn, D.J., A. Coquelin, A.J. Reinhart, and J.C. Hutson. 1993. Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis. *J. Reprod. Immunol.* 24: 139-151.
- Ramanathan, S, and P. Poussier. 2001. BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes. *Immunol Rev.* 184: 161-171.
- Reeves, R.H., N.G. Irving, and R.D. Miller. 1993. Encyclopedia of the mouse genome III. October. Mouse chromosome 16. *Mamm. Genome.* 4 Spec No: S223-229.
- Resnick, M.B., Y. Finkelstein, A. Weissler, J. Levy, and E. Yakirevich. 1999. Assessment and diagnostic utility of the cytotoxic T-lymphocyte phenotype

using the specific markers granzyme-B and TIA-1 in esophageal mucosal biopsies. *Hum Pathol.* 30: 397-402.

- Restifo, N.P. 2000. Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12; 597-603.
- Ridgway, W.M., and C.G. Fathman. 1999. MHC structure and autoimmune T cell repertoire development. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 638-642.
- Rhim, S.H., S.E. Millar, F. Robey, A.M. Luo, Y.H. Lou, T. Yule, P. Allen, J. Dean, and K.S. Tung. 1992. Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida. *J.Clin. Invest.* 89: 28-35.
- Riccioli, A., L. Salvati, A. D'Alessio, D. Starace, C. Giampietri, P. De Cesaris, A. Filippini, and E. Ziparo. 2003. The Fas system in the seminiferous epithelium and its possible extra-testicular role. *Andrologia.* 35: 64-70.
- Ritchie, A.W., T.B. Hargreave, K. James, and G.D. Chisholm. 1984. Intra-epithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens? *Br J Urol.* 56: 79-83.
- Robinson, A.P., T.M. White, and D.W. Mason. 1986. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology.* 57: 239-247.
- Rogentine, G. N., Jr., D. S. Rowe, J. Bradley, T. A. Waldmann, and J. J. Fahey. 1966. Metabolism of human immunoglobulin D (IgD). *J. Clin. Investig.* 45:1467-1478.
- Romagnani, S. 1992. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immuno.l Today.* 13: 379-381.

- Rook, G.A., R. Hernandez-Pando, and S.L. Lightman. 1994. Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunol Today*. 15: 301-303.
- Rostenberg, I., and R. Penaloza. 1978. Serum IgG and IgD levels in some infectious and noninfectious diseases. *Clin. Chim. Acta*. 85:319-321.
- Rudd, C.E., J.M. Trevillyan, J.D. Dasgupta, L.L. Wong, and S.F. Schlossman. 1988. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 85: 5190-5194.
- Russell, J.J., and A. Lindenbaum. 1979. One-year study of nonuniformly distributed plutonium in mouse testis as related to spermatogonial irradiation. *Health Phys*. 36: 153-157.
- Russell, D.M., Z. Dembic, G. Morahan, J.F. Miller, K. Burki, and D. Nemazee. 1991. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature*. 354: 308-311.
- Saari, T., K. Jahnukainen, and P. Pöllänen . 1996. Autoantigenicity of the basal compartment of seminiferous tubules in the rat. *J. Reprod. Immunol*. 31: 65-79.
- Sabelko-Downes, K. A., A. H. Cross, and J. H. Russell. 1999. Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med*. 189:1195-1205.
- Sakaguchi, S., T.H. Ermak, M. Toda, L.J. Berg, W. Ho, de St Groth B. Fazekas, P.A Peterson, N. Sakaguchi, and M.M. Davis. 1994. Induction of autoimmune disease in mice by germline alteration of the T cell receptor gene expression. *J. Immunol*. 152: 1471-1484.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi. 1990. Thymus and autoimmunity: capacity of the normal thymus to produce pathogenic self-reactive T cells and conditions required for their induction of autoimmune disease. *J Exp Med*. 172: 537-545.

- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155: 1151-1164.
- Sakanashi, Y., M. Takeya, T. Yoshimura, L. Feng, T. Morioka and K. Takahashi. 1994. Kinetics of macrophage subpopulations and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in bleomycin-induced lung injury of rats studied by a novel monoclonal antibody against rat MCP-1. *J. Leuk. Biol.* 56: 741-750.
- Sakamoto, Y., K. Himeno, H. Sanui, S. Yoshida, and K. Nomoto. 1985. Experimental allergic orchitis in mice. I. A new model induced by immunization without adjuvants. *Clin Immunol Immunopathol.* 37: 360-368.
- Sakihama, T., A. Smolyar, and E.L. Reinherz. 1995. Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4, MHC class II and TCR molecules. *Immunol Today.* 16: 581-587.
- Salomon, F., and C.E. Hedinger. 1982. Abnormal basement membrane structures of seminiferous tubules in infertile men. *Lab Invest.* 47: 543-554.
- Salomon, F., P. Saremaslani, M. Jakob, and C.E. Hedinger. 1982. Immune complex orchitis in infertile men. Immunoelectron microscopy of abnormal basement membrane structures. *Lab. Invest.* 47: 555-567.
- Samuel, T., and N.R. Rose. 1980. The lessons of vasectomy-a review. *J. Clin. Lab. Immunol.* 3: 77-83.
- Sarsfield, P., Rinne, A., Jones, D.B., Johnson, P., and D.H. Wright. 1996. Accessory cells in physiological lymphoid tissue from the intestine: an immunohistochemical study. *Histopathology.* 28 :205-211.

- Scaffidi, C., I. Schmitz, J. Zha, S.J. Korsmeyer, P.H. Krammer and M.E. Peter. 1999a. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.* 274: 22532–22538.
- Scaffidi, C., S. Kirchhoff, P.H. Krammer and M.E. Peter. 1999b. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 277–285.
- Schifferli, J.A., Y.C. Ng, and D.K. Peters. 1986. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N. Engl. J. Med.* 315:488-495.
- Schlatt, S., D.M. de Kretser, and M.P. Hedger. 1999. Mitosis of resident macrophages in the adult rat testis. *J. Reprod. Fertil.* 116: 223-228.
- Schmidt, K., and C. Mueller-Eckhard. 1973. Antinuclear autoantibodies of IgD class: an analysis of 82 patients. *Z. Immunitaetsforsch.* 145:385–391.
- Schulze-Koops, H., and P.E. Lipsky. 2000. Anti-CD4 monoclonal antibody therapy in human autoimmune diseases. *Curr. Dir. Autoimmun.* 2: 24-49.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M.E. Peter. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254: 439–459.
- Scoazec, J.Y., and G. Feldmann. 1990. Both macrophages and endothelial cells of the human hepatic sinusoid express the CD4 molecule, a receptor for the human immunodeficiency virus. *Hepatology.* 12: 505-510.
- Scott, J.N., H.I. Fritz, and F. Nagy. 1979. Response to cryptorchidism of the testis and epididymis of the opossum (*Didelphis virginiana*). *J. Reprod. Fertil.* 57: 175-178.
- Sebzda, E., V.A. Wallace, J. Mayer, R.S. Yeung, T.W. Mak, and P.S. Ohashi. 1994. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science.* 263: 1615-1618.

- Selawry, H., R. Fojaco, and K. Whittington. 1987. Extended survival of MHC-compatible islet grafts from diabetes-resistant donors in spontaneously diabetic BB/W rat. *Diabetes*. 36: 1061-1067.
- Serre, V., and B. Robaire. 1999. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod*. 61: 705-714.
- Setchell, B.P., J. Uksila, S. Maddocks, and P. Pöllänen . 1990. Testis physiology relevant to immunoregulation. *J. Reprod. Immunol*. 18: 19-32.
- Seya, T., T. Hara, M. Matsumoto, H. Kiyohara, I. Nakanishi, T. Kinouchi, M. Okabe, A. Shimizu, and H. Akedo. 1993. Membrane cofactor protein (MCP, CD46) in seminal plasma and on spermatozoa in normal and "sterile" subjects. *Eur J Immunol*. 23: 1322-1327.
- Shevach, E.M. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol*. 18: 423-449.
- Shlomchik, M.J., M.P. Madaio, D. Ni, M. Trounstein, and D. Huszar. 1994. The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. *J. Exp. Med*. 180: 1295-1306.
- Skinner, M.K., W.L. Cosand, and M.D. Griswold. 1984. Purification and characterization of testicular transferrin secreted by rat Sertoli cells. *Biochem J*. 218: 313-320.
- Steinman R. M. 1991 The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 271-296,.
- Steinman, R.M., S. Turley, I. Mellman and K. Inaba. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med*. 191: 411-416.

- Stewart, C.J., M.A. Farquharson., and A.K. Foulis. 1992. Characterization of the inflammatory infiltrate in ovarian dysgerminoma: an immunocytochemical study. *Histopathology*. 20: 491-497.
- Stoica, G., E. Macarie, V. Michiu, and R.C. Stoica. 1980. Biologic variation of human immunoglobulin concentration. I. Sex-age specific effects on serum levels of IgG, IgA, IgM and IgD. *Med. Interne*. 18: 323-332.
- Su, X., Q. Hu, J. M. Kristan, C. Costa, Y. Shen, D. Gero, L. A. Matis, and Y. Wang. 2000. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *J. Immunol*. 164: 2523-2532.
- Suda, T., T. Okazaki, Y. Naito, T. Yokota, N. Arai, S. Ozaki, K. Nakao, and S. Nagata. 1995. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J. Immunol*. 154: 3806-3813.
- Sudweeks, J.D., J.A. Todd, E.P. Blankenhorn, B.B. Wardell, S.R. Woodward, N.D. Meeker, S.S. Estes, and C. Teuscher. 1993. Locus controlling Bordetella pertussis-induced histamine sensitization (Bphs), an autoimmune disease-susceptibility gene, maps distal to T-cell receptor beta-chain gene on mouse chromosome 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 90: 3700-3704.
- Suescun, M.O., Calandra, R.S., and L. Lustig 1994 Alterations of testicular function after induced autoimmune orchitis in rats. *J Androl*. 15: 442-448.
- Suescun, M.O., R.S. Calandra, and L Lustig. 2000. Effect of testicular macrophage conditioned media from rats with autoimmune orchitis on Leydig cell function. *Am. J. Reprod. Immunol*. 43: 116-123.
- Suescun, M.O., L. Lustig, R.S. Calandra, N.P. Groome, and S. Campo. 2001. Correlation between inhibin secretion and damage of seminiferous tubules in a model of experimental autoimmune orchitis. *J. Endocrinol*. 170: 113-120.

- Suescun, M.O., Rival, C., Theas, M.S., Calandra, R.S., and L. Lustig. 2003. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol Reprod.* 68: 2114-2121.
- Sumelahti, M.L., P.J. Tienari, J. Wikstrom, J. Palo, and M. Hakama. 2001. Increasing prevalence of multiple sclerosis in Finland. *Acta Neurol Scand.* 103: 153-158.
- Sundqvist, C., L.C. Ellis, and A. Bartke. 1988. Reproductive endocrinology of the mink (*Mustela vison*). *Endocr. Rev.* 9: 247-266.
- Sundqvist, C., A.G. Amador, and A. Bartke. 1989. Reproduction and fertility in the mink (*Mustela vison*). *J. Reprod. Fertil.* 85: 413-441.
- Sutton, B.J., R.L. Beavil, and A.J. Beavil. 2000. Inhibition of IgE-receptor interactions. *Br. Med. Bull.* 56: 1004-1018.
- Suzuki, F., and T. Nagano. 1978. Regional differentiation of cell junctions in the excurrent duct epithelium of the rat testis as revealed by freeze-fracture. *Anat Rec.* 191: 503-519.
- Sytwu, H.K., R.S. Liblau, and H.O. McDevitt. 1996. The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity.* 5: 17-30.
- Swain, S.L. 1999. Helper T cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 11: 180-185.
- Szekeres-Bartho J., M.F. Reznikoff-Etievant, P. Varga, M.F. Pichon, Z. Varga, and G. Chaouat. 1989. Lymphocytic progesterone receptors in normal and pathological human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 16: 239-247.
- Tabibzadeh, S.S., and P.G. Satyaswaroop. 1989. Sex steroid receptors in lymphoid cells of human endometrium. *Am. J. Clin. Pathol.* 91: 656-663.

- Tarter, T.H., and N.J. Alexander. 1984. Complement-inhibiting activity of seminal plasma. *Am. J. Reprod. Immunol.* 6: 28-32.
- Taylor, P.R., A. Carugati, V.A. Fadok, H.T. Cook, M. Andrews, M.C. Carroll, J.S. Savill, P.M. Henson, M. Botto and M.J. Walport. 2000. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192: 359-366.
- Teuscher, C., D.L. Gasser, S.R. Woodward, and W.F. Hickey. 1990. Experimental allergic orchitis in mice. VI. Recombinations within the H-2S/H-2D interval define the map position of the H-2-associated locus controlling disease susceptibility. *Immunogenetics.* 32: 337-344.
- Teuscher, C. 1985. Experimental allergic orchitis in mice. II. Association of disease susceptibility with the locus controlling Bordetella pertussis-induced sensitivity to histamine. *Immunogenetics.* 22: 417-425.
- Teuscher, C., S.M. Smith, E.H. Goldberg, G.M. Shearer, and K.S. Tung. 1985. Experimental allergic orchitis in mice. I. Genetic control of susceptibility and resistance to induction of autoimmune orchitis. *Immunogenetics.* 22: 323-333.
- Teuscher, C., E.P. Blankenhorn, and W.F. Hickey. 1987 Differential susceptibility to actively induced experimental allergic encephalomyelitis and experimental allergic orchitis among BALB/c substrains. *Cell Immunol.* 110: 294-304
- Thaler, C.J., W.P. Faulk, and J.A. McIntyre. 1989. Soluble antigens of IgG receptor Fc gamma RIII in human seminal plasma. *J. Immunol.* 143: 1937-1942.
- Theas, S., Rival, C., and L. Lustig. 2003. Germ Cell Apoptosis in Autoimmune Orchitis: Involvement of the Fas-FasL System. *Am J Reprod Immunol.* 50: 166-176.
- Theofilopoulos, A.N., and F.J. Dixon. 1985. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol.* 37: 269-390.

- Tienari, P.J., J. Wikstrom, A. Sajantila, J. Palo, and L. Peltonen. 1992. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *Lancet*. 340: 987-991.
- Tisch, R., C. M. Roifman, and N. Hozumi. 1988. Functional differences between immunoglobulins M and D expressed on the surface of an immature B-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 6914-6918.
- Tjokronegoro, A., and S. Sirisinha. 1974. Degradation of immunoglobulins by secretions of human reproductive tracts. *J. Reprod. Fertil*. 38: 221-225.
- Tompkins, A.B., P. Hutchinson, D.M. de Kretser, and M.P. Hedger. 1998. Characterization of lymphocytes in the adult rat testis by flow cytometry: effects of activin and transforming growth factor beta on lymphocyte subsets in vitro. *Biol Reprod*. 58: 943-951.
- Towbin, H., Staechelin, T., and J. Dordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci. U S A*. 76: 4350-4354.
- Tung, K.S. 1978. Allergic orchitis lesions are adoptively transferred from vasoligated guinea pigs to synergicrecipients. *Science*. 201: 833-835.
- Tung, K.S., and N.J. Alexander. 1980. Monocytic orchitis and aspermatogenesis in normal and vasectomized rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am. J. Pathol*. 101: 17-30.
- Tung, K.S., L.E. Ellis, G.V. Childs, and M. Dufau. 1984. The dark mink: a model of male infertility. *Endocrinology*. 114: 922-929.
- Tung, K. S., C. Teuscher, S. Smith, L. Ellis, and M. L. Dufau. 1984a. Factors that regulate the development of testicular autoimmune diseases *Ann NY Acad Sci*. 438: 171-188.

- Tung, K.S., L. Ellis, C. Teuscher, A. Meng, J.C. Blaustein, S. Kohno, and R. Howell. 1981. The black mink (*Mustela vison*). A natural model of immunologic male infertility. *J. Exp. Med.* 154:1016-1032.
- Tung, K.S., S. Smith, C. Teuscher, C. Cook, and R.E. Anderson. 1987. Murine autoimmune oophoritis, epididymoorchitis, and gastritis induced by day 3 thymectomy. *Immunopathology. Am. J. Pathol.* 126: 293-302.
- Tung, K.S., T.D. Yule, C.A. Mahi-Brown, and M.B. Listrom. 1987. Distribution of histopathology and Ia positive cells in actively induced and passively transferred experimental autoimmune orchitis. *J Immunol.* 138:752-759.
- Tung, K.S., C. Teuscher, and A.L. Meng. 1981. Autoimmunity to spermatozoa and the testis. *Immunol Rev.* 55: 217-255.
- Tung, K.S., E.R. Unanue, and F.J. Dixon. 1970. The immunopathology of experimental allergic orchitis. *Am. J. Pathol.* 60: 313-328.
- Tung, K.S., E.R. Unanue, and F.J. Dixon. 1971. Pathogenesis of experimental allergic orchitis. II. The role of antibody. *J. Immunol.* 106: 1463-1472.
- Tung, K.S., and A.J. Woodroffe. 1978. Immunopathology of experimental allergic orchitis in the rabbit. *J Immunol.* 120: 320-328.
- Tung, P.S., and I.B. Fritz. 1984. Extracellular matrix promotes rat Sertoli cell histotypic expression in vitro. *Biol. Reprod.* 30: 213-229.
- Tyler, A, E.T. Tyler, and P.C. Denny. 1967. Concepts and experiments in immunoreproduction. *Fertil Steril.* 18: 153-166.
- Unanue, E.R. 1992. Cellular studies on antigen presentation by class II MHC molecules. *Curr Opin. Immunol.* 4: 63-69.

- Varfolomeev, E.E., M.P. Boldin, T.M. Goncharov, and D. Wallach. 1996. A potential mechanism of "cross-talk" between the p55 tumor necrosis factor receptor and Fas/APO1: proteins binding to the death domains of the two receptors also bind to each other. *J. Exp. Med.* 183: 1271-1275.
- Veillette, A., M.A. Bookman, E.M. Horak, and J.B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell.* 55: 301-308.
- Vercelli, D. 2001. Immunoglobulin E and its regulators. *Curr. Opin. Allergy Clin Immunol.* 1: 61-65.
- Verhasselt, V., and M. Goldman. 2001. From Autoimmune Responses to Autoimmune Disease: What is Needed? *J. Autoimm.* 16: 327-330.
- Viselli, S.M., K.R. Reese, J. Fan, W.J. Kovacs, and N.J. Olsen. 1997. Androgens alter B cell development in normal male mice. *Cell. Immunol.* 182: 99-104.
- Vladutiu AO. 2000. Immunoglobulin D: properties, measurement, and clinical relevance. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7: 131-140.
- Vogelpoel, F.R., E.R. te Velde, E. Scheenjes, R. Van Kooy, J. Kremer, and J. Verhoef. 1987. Antibody and complement-binding activity of viable and nonviable human spermatozoa. *Arch. Androl.* 18: 189-197.
- Voll, R.E., M. Herrmann, E.A. Roth, C. Stach, J.R. Kalden and I. Girkontaite 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 390 : 350-351.
- de Waal Malefyt, R., H. Yssel, M.G. Roncarolo, H. Spits, de J.E. Vries. 1992. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol.* 4: 314-320.
- Wahlsten, J. L., H. L. Gitchell, C. C. Chan, B. Wiggert, R. and R. Caspi. 2000. Fas and Fas ligand expressed on cells of the immune system, not on the target tissue,

control induction of experimental autoimmune uveitis. *J. Immunol.* 165:5480-5486.

Waldmann, T. A., A. Ito, M. Ogawa, O. R. McIntyre, and W. Strober. 1976. The metabolism of IgE. Studies in normal individuals and in a patient with IgE myeloma. *J. Immunol.* 117: 1139-1144.

Wang, J., N.G. Wreford, H.Y. Lan, R. Atkins, and M.P. Hedger. 1994. Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biol Reprod.* 51: 551-561.

Wardell, B.B., S.D. Michael, K.S. Tung, J.A. Todd, E.P. Blankenhorn, K. McEntee, J.D. Sudweeks, W.K. Hansen, N.D. Meeker, and J.S. Griffith. 1995. Aod1, the immunoregulatory locus controlling abrogation of tolerance in neonatal thymectomy-induced autoimmune ovarian dysgenesis, maps to mouse chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4758-4762.

Wardlaw, A.C. 1970. Inheritance of responsiveness to pertussis HSF in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 38: 573-589.

Webb, S., C. Morris, and J. Sprent. 1990. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell.* 63: 1249-1256.

Weintraub, B.C., J.E. Jun, A.C. Bishop, K.M. Shokat, M.L. Thomas, and C.C. Goodnow. 2000. Entry of B cell receptor into signaling domains is inhibited in tolerant B cells. *J Exp Med.* 191: 1443-1448.

Wennemuth G., G. Aumuller, M. Bacher, et A. Meinhardt. 2000. Macrophage migration inhibitory factor-induced Ca(2+) response in rat testicular peritubular cells. *Biol Reprod.* .62.:1632-1639.

Witkin, S.S. 1986. Selective activation of functional suppressor cells by human seminal fluid. *Clin. Exp Immunol.* 64: 364-369.

- Witkin, S.S. 1988. Mechanisms of active suppression of the immune response to spermatozoa. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 17: 61-64.
- Witkin, S.S., and M. Goldstein. 1988. Reduced levels of T suppressor/cytotoxic lymphocytes in semen from vasovasostomized men: relationship to sperm autoantibodies. *J. Reprod. Immunol.* 14: 283-290.
- Wong, F.S., J. Karttunen, C. Dumont, L. Wen, I. Visintin, I.M. Pilip, N. Shastri, E.G. Pamer, and C.A. Jr. Janeway. 1999. Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type I diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med.* 5: 1026-1031.
- Woolveridge, I., M. de Boer-Brouwer, M.F. Taylor, K.J. Teerds, F.C. Wu, and I.D. Morris. 1999. Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes. *Biol. Reprod.* 60: 461-470.
- Wu, Y., S. M. L. Tamma, V. Lima, and R. Coico. 1999. Facilitated antigen presentation by B cells expressing IgD when responding T cells express IgD-receptors. *Cell. Immunol.* 192:194-202.
- Xu, J.P., Li, X., Mori, E., Guo, M.W., Matsuda, I., Takaichi, H., Amano, T., and T. Mori. 1999. Expression of Fas-Fas ligand in murine testis. *Am J Reprod Immunol.* 42: 381-388.
- Yakirevich, E., O. Yanai, Y. Sova, E. Sabo, A. Stein, J. Hiss, and M.B. Resnick. 2002. Cytotoxic phenotype of intra-epithelial lymphocytes in normal and cryptorchid human testicular excurrent ducts. *Hum Reprod.* 17: 275-283.
- Yee, J.B., and J.C. Hutson. 1983. Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness. *Biol. Reprod.* 29: 1319-1326.

- Yeung, C.H., D. Nashan, C. Sorg, F. Oberpenning, H. Schulze, E. Nieschlag, and T.G. Cooper. 1994. Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol Reprod.* 50: 917-926.
- Yule, T.D., and K.S. Tung. 1993. Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor. *Endocrinology.* 133: 1098-1107.
- Yule, T.D., G.D. Montoya, L.D. Russell, T.M. Williams, and K.S. Tung. 1988. Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. *J Immunol.* 141: 1161-1167.
- Zegers, B.J., J.W. Stoop, E.E. Reerink-Brongers, P.C. Sander, R.C. Aalberse, and R.E. Ballieux. 1975. Serum immunoglobulins in healthy children and adults. Levels of the five classes, expressed in international units per millilitre. *Clin. Chim. Acta.* 65: 319-329.
- Zhang, H., Y. Yang, J. L. Horton, E. B. Samoilova, T. A. Judge, L. A. Turka, J. M. Wilson, Y. Chen. 1997. Amelioration of collagen-induced arthritis by CD95 (Apo-1/Fas)-ligand gene transfer. *J. Clin. Invest.* 100:1951-1957.
- Zheng, L., G. Fisher, R.E. Miller, J. Peschon, D.H. Lynch, and M.J. Lenardo. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature.* 377: 348-351.
- Zouali, M. 2002. B cell diversity and longevity in systemic autoimmunity. *Mol. Immunol.* 38: 895-901.