



Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques
Département de Biologie Animale et végétale

Mémoire de fin d'études

*En vue d'obtention du diplôme de Master (LMD) en Biologie
Option : Biologie et Physiologie de la reproduction (BPR)*

Thème

Etude préliminaire de profile électrophorétique et densitométrique des protéines épидидymaire durant le développement postnatal chez deux populations de lapins : population blanche et souche synthétique

Présenté par

M^{elle} : Malek Lynda

M^{elle} : Mehala Nacera

Soutenu devant le jury :

Président: Mr. Debiane H.	Maitre de conférences B	UMMTO
Promotrice: Mme. Ahmanache L.	Maitre de conférences B	UMMTO
Copromotrice : Mme. Hamidouche Z.	Maitre de conférences A	UMMTO
Examineur : Mr. Sebane H.	Maitre assistante A	UMMTO
Examineur : Mr. Kheddache A.	Maitre assistante A	UMMTO

2016-2017

Remerciements

Avant tout nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à **Mme le Dr. LAKABI-AHMANACHE L.** Maitre de conférence B qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être notre promotrice, de nous diriger tout au long de notre travail et pour toute l'aide et le temps qu'elle nous a consacrés. Nous vous remercions très sincèrement pour votre patience.

Nous remercions **Mme le Dr.HAMIDOUCHE Z.** maitre conférences, notre copromotrice de nous diriger tout au long de notre travail et assister durant toute la mise en place et la réalisation de notre expérimentation dans le laboratoire, pour toute l'aide et le temps qu'elle nous a consacré. Nous vous remercions très sincèrement pour votre patience

A Mr **Debiane H.** Maitre de conférences B qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury, sincères remerciements et notre immense gratitude.

Notre grande reconnaissance et la marque de notre profond respect à Mr **Sebane .H** Maitre assistante A et Mr **Kheddache A.** Maitre assistante A pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions le professeur **Mr HOUALLI** ainsi que toute l'équipe du laboratoire commun de biochimie et toutes personnes qui ont contribué à l'accomplissement de ce modeste travail, un grand merci.

Dédicaces

Je tien tous d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce mémoire.

Je dédie ce modeste travail.

- ✓ *A ma mère et mon père que le bon dieu leur accorde une longue vie.*
- ✓ *A mes très chers frères Said, Khalef et Yazid, qui ont toujours cru en moi merci de m'avoir toujours soutenue dans ce que je voulais faire. Avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite*
- ✓ *A mes très chères sœurs Farida, Thassadithe, Cylia et Lidia, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans les moments les plus durs, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*
- ✓ *A nos petits anges Yahia, Massila, Islam, Missipssa.*
- ✓ *A tous mes amis et amies et surtout à Zboudji Rabah .*

Ainsi celle avec qui j'ai l'immense plaisir de partager ce travail, ma camarade Nacera.

Lynda

Dédicaces

Je tien tous d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser ce mémoire.

Je dédie ce modeste travail.

- ✓ *A ma chère maman qui n'a pas retenu les précieux conciles*
- ✓ *mon chère papa qui a consacré sa vie pour notre avenir*
<< Que le Bon Dieu leur accorde une longue vie >>
- ✓ *A mes très chers frères Sofiane, Mouhand et Faouz, qui ont toujours cru en moi merci de m'avoir toujours soutenue dans ce que je voulais faire. Avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite*
- ✓ *A mes très chères sœurs, Karima, Nassima et Tinhinan, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans les moments les plus durs, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*
- ✓ *A nos petits anges Syphax et Wissam*
- ✓ *A tous mes amis et amies.*

Ainsi celle avec qui j'ai l'immense plaisir de partager ce travail, ma camarade et mon amie Lynda.

Nacera

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 01 :

A : Photos de l'appareil reproducteur de la souris mâle ; B : schéma de l'appareil reproducteur de lapins mâle 2

Figure 02 : Anatomie et régionalisation de l'épididyme 4

Figure 03 : Représentation schématique de l'épithélium épидидymaire 6

Figure 04 : Schéma représentatif de l'épididyme de la souris et du rat, montrant les différentssegments et illustrant les différents types de cellules épithéliales et les cellules dendritiques 6

Figure 05 : Représentation schématique de la sécrétion apocrine dans les cellules principales de l'épididyme. 13

Figure 06: A : Les gonades dissèquent du lapin ; B : l'épididyme prélève et le canal déférent 27

Figure 07: A : broyage de l'épididyme ; B : photographié d'unité de centrifugation 28

Figure 08: Courbe d'étalonnage du dosage des protéines réalisée par la BSA..... 28

Figure 09: Représentation de la formation de réseau Acylamide-Bisacrylamide 29

Figure 10: Courbe étalonnage de marqueur de poids moléculaire réalisé par la BSA 32

Figure 11: Etapes de l'électrophorèse ; A-Préparation de gel et formation des puis, B- Dépôt des échantillons, CD- La mise de gel dans la cuve et lancement de l'électrophorèse, EF-Fin de migration et récupération de gel, G- Coloration de gel, H-Décoration de gel. 34

Figure12 : Evolution de la concentration protéique de l'homogénat épидидymaire durant le développement postnatal des lapins de la population Blanche et de la souche Synthétique. . 38

Figure 13 :A- Profile électrophorétique de Sérum Albumine Bovin (BSA), B- Profile électrophorétique des protéines épидидymaires des lapins de la population blanche à différentes âges. 40

Liste des figures et tableaux

Figure 14 : Analyse électrophorétique monodimensionnelle (SDS-PAGE) des protéines épидидymaire des lapins de la Souche Synthétique différents âges.	41
Figure 15 : Analyse comparative électrophorétique monodimensionnelle (SDS-PAGE) des protéines épидидymaire des lapins de la population Blanche et de la souche synthétique à différents âges.	42
Figure 16 : localisation des bandes de migrations des protéines épидидymaire des lapins de la population blanche analysée par le logiciel Bio-Red	44
Figure 17 : localisation des bandes de migrations des protéines épидидymaire des lapins de la souche synthétique analysée par le logiciel Bio-Red	44
Figure 18 : A- Analyse électrophorétique monodimensionnelle (SDS-PAGE) des protéines épидидymaire des lapins de la population blanche à différentes âges. B- Analyse densitométrique des profils électrophorétique de l'épididyme des lapins à différentes âges .	45
Figure 19 : Evolution de la densité des bandes de migrations des lapins de la population blanche âgés de 4 à 24 semaines mesurées par le logiciel Bio-Rad.....	46
Figure 20 : A- Analyse électrophorétique monodimensionnelle (SDS-PAGE) des protéines épидидymaire des lapins de la souche synthétique à différentes âges. B- Analyse densitométrique des profils électrophorétique de l'épididyme des lapins à différentes âges.	47
Figure 21 : Evolution de la densité des bandes de migrations des lapins de la Souche synthétique âgés de 4 à 16 semaines mesurées par le logiciel Bio-Rad.....	48
Figure 22 : comparaison de la densité des bandes de migration des protéines épидидymaire chez les deux populations.....	49

Liste des tableaux

Tableau I : Durée du transit (en jour) des spermatozoïdes dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme chez différentes espèces (Robaire et Hermo, 1988)	8
Tableau II : Les verreries et les appareillages utilise dans notre expérimentation	26
Tableau III : Poids moyen vif et épидидymaire des lapins de la population blanche aux différents âges	36
Tableau IV : Poids moyen vif et épидидymaire des lapins de la souche synthétique aux différents âges	37

Signification des abréviations

AB	Aposomes
ABP	Androgen Binding Protein
ADAMs	A Disintegrin And Mettalloprotease
ADN	Acide désoxyribonucléique
APS	Proxydisulfate d'ammonium ou persulfate d'ammonium
ARE	Elément de Réponse aux Androgènes
BSA	Sérum Albumine Bovine
Cldn-1	Claudine-1
CRES	Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic
C DW532	Antigène lymphocytaire
DHT	5 α -dihydrotestostérone
EP	Epididymosomes
ESM	Erreur Standard à la Moyenne
FA-1	Fertilization Antigen 1
FSH	Folliculo - Stimuline Hormone
GPC	Glycérile Phosphoryl Choline
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GPXs	Glutathion Peroxydase 1, 3, 4 et 5
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HE	Protéines épидидymaire humaines
Hcp	Hauteur cellulaire
IDO	Indolamine Dioxygénase
ILC	Compartiment Intra-Liminalv
ISCH	Interstitial Cell Stimulating Hormone
LH	Luteinizing Hormone
LT	Lymphocyte T
Mo	Monocyte
N	Noyau
NPC2	Niemann-Pick disease type C2
NADPH	Nicotinamide Déphosphate
P34H	Protéine sperm surface protéin

PEA3	Polyoma Enhancer Activator Protein 3
PDGS	Prostaglandin D2 Synthase
PAGE	Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide
PMSF	Phényle Méthyle Sulfonyl Fluoride
PSA	Antigène Prostatique Spécifique
RCPG	Récepteur Couplé à une Protéine G
SBP	Sex Steroid-Binding Protein
SDS	Dodécylsulfate de Sodium
SGP2	Glycoprotéines Sulfatée de type 2 ou Clustérine
SOD:	Superoxyde Dismutase
SPAM	Sperm Adhesion Molecule
TEMED	Tétraméthyléthylènediaméne
ZP3	Protéine du la Zone Pellucide
ZSN	Zone Supranucléaire

Liste des figures et tableaux
Signification des abréviations
Sommaire

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Rappel bibliographique

1. Anatomie de l'appareil reproducteur du lapin mâle..... 2

2. Epididyme 3

2.1. Anatomie de l'épididyme 3

2.2. Histologie et fonction de l'épididyme du lapin 4

2.2.1. Histologie de l'épididyme 4

2.2.2. Composition de fluide épидидymaire 7

2.2.3. Transit épидидymaire 8

2.2.4. Fonctions de l'épididyme 8

2.2.4.1. Fonction de l'épithélium épидидymaire 9

2.2.4.1.1. Absorption et réabsorption 9

2.2.4.1.2. Sécrétion 9

2.2.4.1.3. Métabolisme 9

2.2.4.1.4. Spermiphagie..... 9

2.2.4.2. Fonctions au niveau du la lumière..... 10

2.2.4.2.1. Transport 10

2.2.4.2.2. Maturation 10

2.2.4.2.3. Stockage 10

2.3. Régulation des fonctions de l'épididyme 10

2.4. Mode de sécrétion de l'épididyme 12

2.4.1. Sécrétion mérocrine..... 12

2.4.2. Sécrétion apocrine 12

2.5. Sécrétion protéique épидидymaire..... 14

2.6. Quelques protéines épидидymaire 15

2.6.1. Clustérine (SPG-2) 15

2.6.2 Protéines épидидymaire humaines (HE)..... 16

2.6.3 Lactoferrine. 16

2.6.4. Protéine P34H/P26h 17

Sommaire

2.6.5. Polyoma enhancer activator protein 3 (PEA3).....	17
2.6.6. Claudines.....	18
2.7.7. Caténines.....	18
2.6.8. Cystatines (Cres).....	19
2.6.9. Cadhérines.....	19
2.6.10. Défensine.....	20
2.6.11. A Disintegrin And Mettalloprotease (ADAMs).....	20
2.6.12. Sperm adhesion molecule (SPAM).....	21
2.6.13. Fertilization antigen 1 (FA-1).....	21
2.6.14. Superoxyde dismutase (SOD).....	22
2.6.15. ATP-binding cassette transporter (ABCG2).....	22
2.6.16. Glutathion peroxydase (GPXs).....	23
2.7.17. Indolamine dioxygénase (IDO).....	24

Chapitre II: Matériels et Méthodes

1. Matériels.....	25
1.1. Matériel biologique.....	25
1.2. Verrerie et Appareillage.....	26
1.3. Autre matériels.....	26
2. Méthodes.....	26
2.1. Sacrifices et prélèvements.....	26
2.2. Extraction des protéines.....	27
2.3. Dosage des protéines.....	28
2.4. Etude électrophorétique.....	29
2.4.1. Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide (PAGE).....	29
2.4.2. Méthode d'électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS.....	30
2.4.2.1. Dénaturation des protéines.....	30
2.4.2.1.1. Dodécylsulfate de sodium 2 % (SDS) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S).....	30
2.4.2.1.2. β-mercaptoethanol 5%.....	31
2.4.2.2. Préparation des gels.....	31
2.4.2.2. Préparation des tampons des gels.....	31
2.4.2.3. Mise en place des gels.....	32
2.4.3. Révélation des bondes de migration électrophorétique.....	33

Sommaire

2.4.3.1. Coloration et fixation	33
2.4.3.2. Décoloration	33
3. Etude statistique	35
4. Analyse des gels électrophorétique	35

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Résultats	36
1.1. Poids vif des lapins et de l'épididyme.....	36
1.1.1. Lapins de la population blanche.....	36
1.1.2. Lapins de la souche synthétique.....	36
1.2. Dosage des protéines.....	37
1.3. Séparation des protéines épидидymaires par électrophorese.....	38
1.3.1. Indication sur le marqueur de poids moléculaire	38
1.3.2. Lapins de la population blanche.....	39
1.3.3. Lapins de la souche synthétique.....	40
1.3.4. Comparaison entre les deux populations.....	40
1.4. Poids moléculaire des bandes de migration des protéines épидидymaire	42
1.4.1. Population blanche	42
1.4.2. Souche synthétique.....	43
1.4.3. Comparaison entre les deux populations.....	43
1.5. Analyse semi-quantitative des protéines épидидymaires	43
1.5.1. Population blanche	45
1.5.2. Souche synthétique.....	46
1.5.3. Comparaison entre les deux populations.....	48
2. Discussion	50
2.1. Poids corporels et poids d'épididymes.....	50
2.2. Dosage des protéines et profils électrophorétique.....	51
Conclusion	55
Références.....	57
Annexes	

Introduction
Générale

L'épididyme est un long canal contourné accolé à la face postérieure du testicule, reliant les canaux efférents au canal déférent. Il est divisé en trois régions anatomiquement et fonctionnellement distincts : la tête, le corps, et la queue. Il joue plusieurs rôles essentiels pour la fertilité mâle, de ce fait, il est impliqué dans le transport, la concentration, la maturation et le stockage des spermatozoïdes (Hinton et Turner, 1988).

Actuellement, les recherches ont permis la compréhension des rôles de l'épididyme dans la maturation des spermatozoïdes. En effet les spermatozoïdes formés et libérés par le testicule ne possèdent pas encore le pouvoir fécondant ni la capacité de se mouvoir. Leurs différenciations et maturations se poursuivent dans le tube épидидymaire en mettant en place un environnement propice aux modifications biochimiques et structurales des spermatozoïdes (Seiler *et al.*, 2000).

La fluide épидидymaire contient des composés tels que les ions, macromolécules, et protéines à des concentrations inhabituelles, dont certains ne sont pas retrouvés dans d'autres fluides corporels.

La synthèse et la sécrétion protéique épидидymaire sont caractérisées par une forte spécificité tissulaire, segmentaire et cellulaire qui sont régulées par les androgènes et des facteurs testiculaires, ainsi que d'autres facteurs d'origine sanguine (Riar *et al.*, 1973).

Les protéines du fluide épидидymaire sont sécrétées principalement par les cellules principales telles que la clustérine, la lactoferrine, la défensine... et joue des rôles essentielle dans la maturation des spermatozoïdes ainsi que leur protection (Dacheux et Dacheux, 2002).

Néanmoins peu d'études ont été réalisées sur la détermination du profil électrophorétique et la concentration de ces protéines épидидymaires aux différents stades de développement postnatal, infantile, prépuberté et puberté.

De ce fait, l'objectif de notre travail est de mettre en évidence le profile électrophorétique et densitométrique des protéines épидидymaires ainsi que leur concentration tissulaire durant le développement postnatal de lapins appartenant à deux lignées, la population blanche qui est une population locale Algérienne et la souche synthétique qui est une souche améliorée génétiquement.

Dans ce cadre, nous avons divisé notre travail en trois chapitres, le premier chapitre portera sur des rappels bibliographiques de l'épididyme, tandis que dans le deuxième chapitre, nous aborderons les matériel et méthodes utilisés durant notre expérimentation. Dans le troisième chapitre nous exposerons les résultats obtenus et leur discussion et enfin nous terminerons par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I :
Rappels
Bibliographiques

L'appareil génital du lapin mâle, situé postérieurement, s'extériorise par des bourses peu marquées par rapport aux autres mammifères (Boussit, 1989). Il comporte 3 grandes portions qui sont: la portion glandulaire constituée par les testicules, la portion tubulaire constituée par l'épididyme, le canal déférent, l'urètre et la portion copulatrice constituée par le pénis (Barone, 1976). Il a d'une manière générale deux fonctions primordiales, la production des spermatozoïdes et leur dépôt dans les voies génitales femelles d'une part, et la sécrétion des hormones sexuelles d'autre part (Alvarino, 1993).

1. Anatomie de l'appareil reproducteur du lapin mâle

Le système reproducteur mâle du lapin est composé de deux testicules dont le rôle est la formation des spermatozoïdes et l'élaboration des hormones mâles, des canicules efférentes, deux épидидymes avec leurs canal défèrent qui forme les voies spermatiques qui acheminent les spermatozoïdes à l'intérieur des testicules puis à l'extérieur par l'épididyme et le conduit déférent jusqu'à l'urètre. Ainsi que des glandes accessoires qui jouent un rôle dans la maturation des spermatozoïdes, la présence ou l'absence de ces dernières varient selon les espèces (Figure 01) (Setchell *et al.*, 1988).

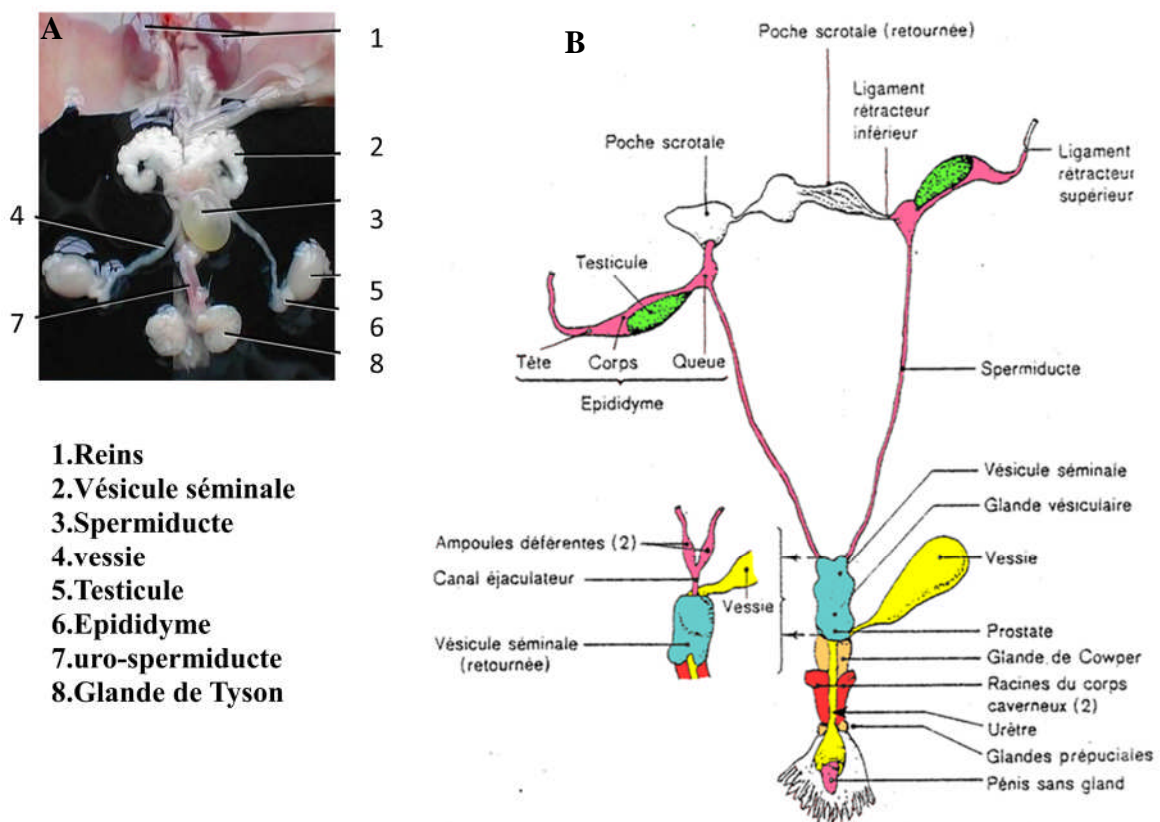


Figure 01 : A- Photos de l'appareil reproducteur du mâle de la souris (Cameron *et al.*, 1982),
 B- Schéma de l'appareil reproducteur de lapins mâle (Lebas *et al.*, 1996).

L'anatomie de l'appareil reproducteur mâle est similaire chez la majorité des mammifères en particulier chez les ovins, caprins, porcins et lapins avec néanmoins des différences concernant la taille, le poids et la forme des organes (Hamon *et al.*, 1999).

2. Epididyme

2.1. Anatomie de l'épididyme

L'épididyme est un organe accolé au testicule, formé d'un long tube épithélial extrêmement replié sur lui-même à l'intérieur d'une tunique conjonctive et met en communication le testicule en amont et le canal déférent en aval. C'est un dérivé du mésonephros embryonnaire apparu chez les amniotes (reptiles, oiseaux, mammifères) qui atteint son plein développement chez les mammifères avec une longueur variable selon les espèces, il mesure 1,5 à 3cm chez le lapin.

Ce tube contourné forme des lobules séparés par des travées conjonctives ou septa et présente trois segments anatomique et fonctionnel, une tête qui représente la région proximale reliée au hile du testicule par les canaux efférents, un corps qui constitue la partie médiane et la queue qui forme la région distale en continuité avec le canal déférent. L'épididyme peut être divisé en cinq segments, I, II, III, IV-VI, en fonction de leurs sécrétions et leurs activités enzymatiques (Figure 02) (Hinton et Turner, 1988).

L'épididyme joue plusieurs rôles essentiels pour la fertilité mâle, la tête et le corps épидидymaire sont responsables de la maturation spermatique, la queue est plus impliquée dans le stockage assurant qu'un nombre suffisant de gamètes soit présent à chaque éjaculation. Chez l'homme, les spermatozoïdes éjaculés peuvent survivre 12 à 24h, alors qu'ils sont viables pendant 10 jours dans la queue épидидymaire (Johnston *et al.*, 2005).

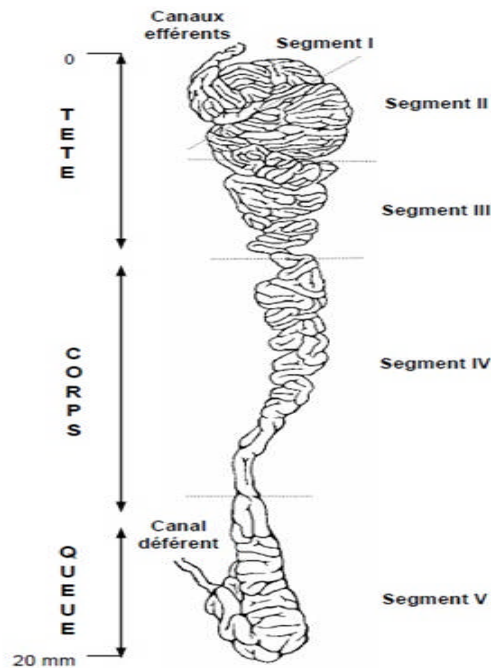


Figure 02 : Anatomie et régionalisation de l'épididyme (Hermo et Robaire, 2002).

2.2. Histologie et fonction de l'épididyme du lapin

2.2.1. Histologie de l'épididyme

Le canal épидидymaire comprend deux compartiments, un épithélium pseudostratifié, constitué de six types cellulaires, les cellules principales, basales, en halos, claire, apicale et étroites (Figure 03), entourées de 2 à 6 couches de fibres musculaires lisses et d'un tissu conjonctif contenant des terminaisons nerveuses et des capillaires sanguins d'une part; et d'une lumière bordée par cet épithélium d'autre part (Robaire et Hermo, 1988).

En effet, l'épithélium épидидymaire comprend principalement des cellules principales, représentant 65 à 80% des cellules épидидymaire (Trasler *et al.*, 1988) ; reconnaissables par leurs hauteurs semblables à de longues colonnes (Robaire et Viger, 1995) et la localisation de leurs noyaux (Faure *et al.*, 1991). Elles possèdent un réticulum endoplasmique et un système de Golgi très bien développés, indicateurs d'une très forte activité sécrétoires (Faure *et al.*, 1991).

Les cellules basales qui représentent 10 à 20% des cellules épидидymaire, sont caractérisées par un noyau oblong et un cytoplasme pauvre en organites (Soranzo *et al.*, 1982) et jouent un rôle dans l'élimination des radicaux libres ainsi que dans la protection immunitaire des spermatozoïdes en participant à ce qu'on appelle la barrière hémato-épидидymaire (Veri *et al.*, 1993 ; Cooper, 1998 et Seiler *et al.*, 2000).

Tandis que les cellules en halos disséminées tout le long du canal épидидymaire se caractérisent par un noyau très dense et contribuent à former une barrière immunologique au niveau de l'épididyme (Hoffer *et al.*, 1973 ; Serre et Robaire, 1999).

Les cellules claires prismatiques, présentes essentiellement dans le corps et la queue de l'épididyme (Soranzo *et al.*, 1982) sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules claires en région apicale, des lysosomes en région médiane et de nombreuses inclusions lipidiques dans leur région basale (Robaire et Hermo, 1988), qui joueraient un rôle dans l'absorption de certains composants du fluide épидидymaire (Olson et Hinton, 1985).

Les cellules apicales sont caractérisées par un noyau au niveau de tiers apical des cellules, un cytoplasme dense, des mitochondries abondante, des lysosomes et de l'anhydrase carbonique impliquée dans la sécrétion des ions (H) et la réabsorption des bicarbonates (HCO₃⁻) responsables de l'acidification du fluide épидидymaire (Martinez-Garcia *et al.*, 1995). Elles sont capables d'endocyter des substances contenues dans la lumière (Adamali *et al.*, 1999; Hermo et Robaire, 2002).

Les cellules étroites qui sont localisées dans des segments spécifiques, elles sont peu nombreuses et se caractérisent par un renflement cytoplasmique, un noyau allongé situé dans la portion supérieure, un grand nombre de petites vésicules dispersées dans la région apical de la cellule et par une base très étroite les reliant à la membrane basale. Ces cellules seraient impliquées dans l'acidification de la lumière de l'épididyme (Hermo et Adamali, 2000).

Des cellules dendritique ont été découvertes récemment au sain de l'épididyme murin (en 2011), elles forme un réseau dense situe à la base de l'épithélium avec des projections dendritique qui passent entre les cellules épithéliales et sont orientés en direction de la lumière du tubule (Da Selva *et al.*, 2011). Ces cellules possèdent des marqueurs de cellules immunitaire, dont le rôle serait de maintenir l'homéostasie immunitaire afin de protéger les spermatozoïdes (Wang *et al.*, 2016).

Ces différents types cellulaires présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles très variées de la région proximale à la région distale du tubule (Figure 04) (Shum *et al.*, 2011).

La lumière de l'épithélium épидидymaire renferme le fluide épидидymaire, qui assure le transport des spermatozoïdes depuis les gonades jusqu'au système éjaculateur traversant l'épididyme (Riar *et al.*, 1973 ; Adamali *et al.*, 1999 ; Hemo et Robaire, 2002).

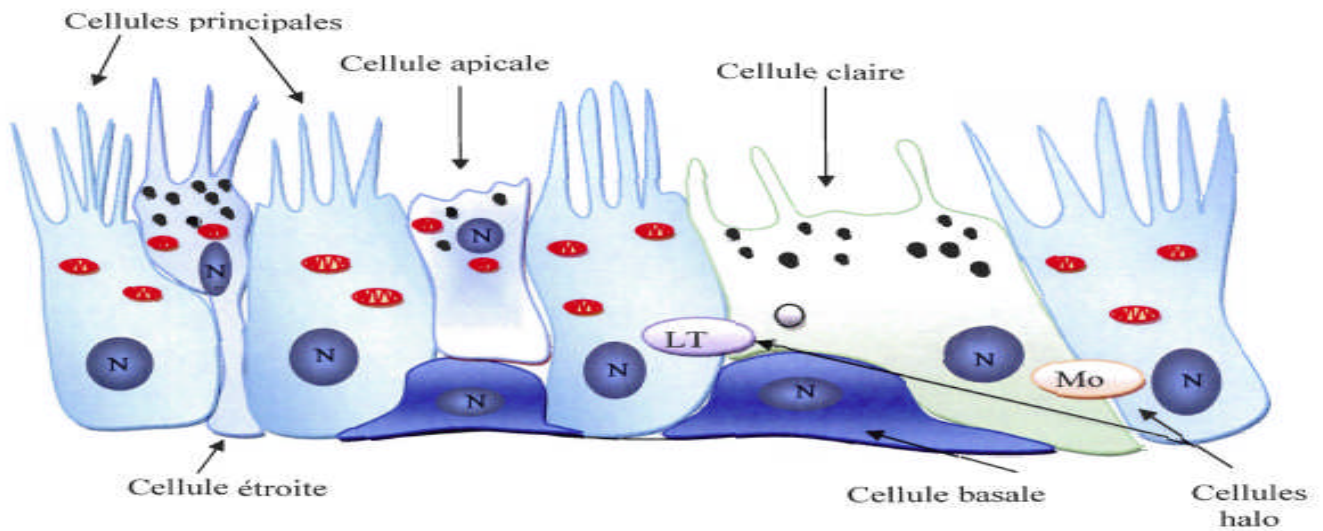


Figure 03 : Représentation schématique de l'épithélium épидидymaire (Girouard, 2009).

N : noyau ; LT : lymphocyte T ; Mo : monocyte

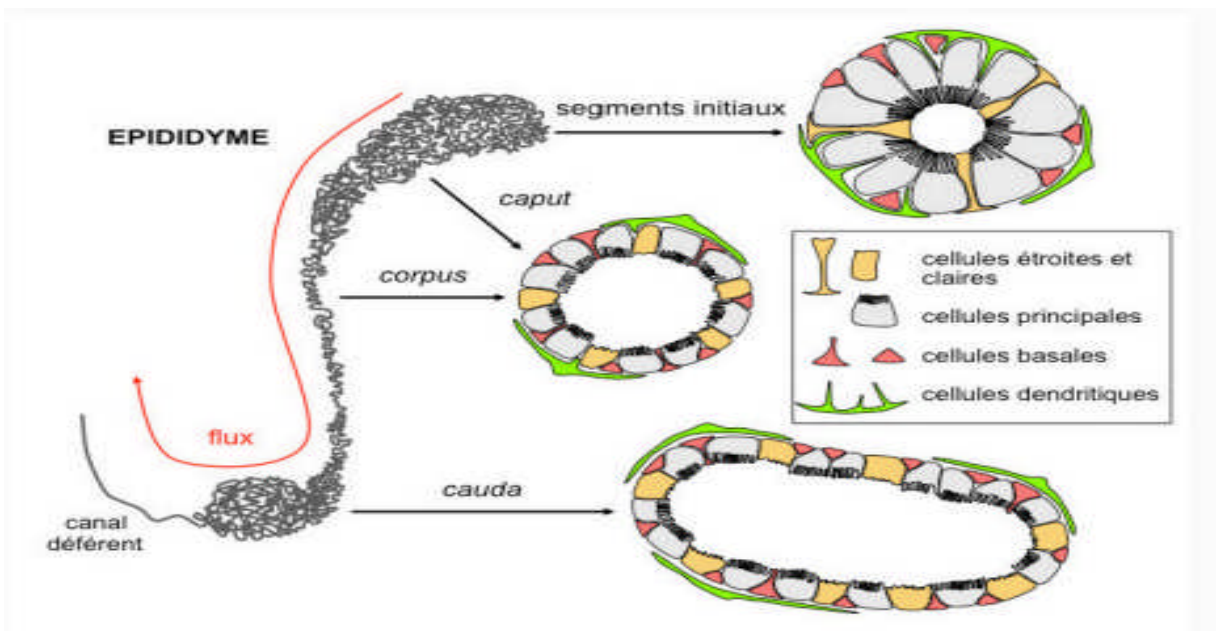


Figure 04 : Schéma représentatif de l'épидидyme de la souris et du rat, montrant les différents segments et illustrant les différents types de cellules épithéliales et les cellules dendritiques (Breton et Da Silva, 2012).

2.2.2. Composition de fluide épидидymaire

D'après Riar *et al.* (1973), Adamali *et al.* (1999) et Hemo et Robaire (2002), le fluide épидидymaire se compose principalement d'ions, de petites molécules organiques, des protéines, macromolécules et d'autres substances d'origine sanguine ou sécrétées par l'épithélium. La particularité du fluide épидидymaire vient de la présence de composés à des concentrations inhabituelles, dont certains ne sont pas retrouvés dans d'autres fluides corporels.

La composition du fluide épидидymaire dépend des phénomènes de sécrétions et de réabsorptions régionalisés tout au long de l'organe. L'établissement de ces sécrétions se fait progressivement durant le développement post-natal, avec la différenciation de l'organe et qui maintiennent les spermatozoïdes dans un environnement particulier quant au pH, la tension en oxygène, et les substrats énergétiques tels que la carnitine.

La plus grande partie du fluide testiculaire (99% chez le verat, 95% chez le taureau, 50 % chez le rat) est réabsorbée dans les premières régions épидидymaire. Principalement la réabsorption de l'eau associée au mouvement des ions (Dacheux et Dacheux, 2001).

Le fluide épидидymaire est riche en protéines sécrétés principalement par les cellules principales : L'albumine, la carnitine, la clusterine, la lactoferrine, la calmoduline, la NPC2 (Niemann-Pick disease type C2), l' α -antitrypsine, et la prostaglandine D2 synthétase (Dacheux *et al.*, 2006; 2012).

L'albumine contribue à la survie et la mobilité des spermatozoïdes (Elzanaty *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012) en modifiant la perméabilité membranaire du spermatozoïde par son action sur le cholestérol dont le transport est ensuite modulé par la NPC2 (Legare *et al.*, 2006).

La carnitine captée par les spermatozoïdes et transformée en acétylcarnitine (par la carnitine acétyltransférase) s'accumulera au cours de la maturation et sera utilisée comme substrat énergétique pour la motilité (Dacheux et Dacheux, 2001).

Dans le sperme, la clusterine et la lactoferrine possèdent une action antimicrobienne en formant un complexe associé aux semenogelins séminales qui module l'activité de la PSA (Antigène Prostatique Spécifique) (O'Rand *et al.*, 2011).

Tandis que la calmoduline intervient dans l'homéostasie calcique (Khattri *et al.*, 2012), L' α -anti-trypsine joue un rôle dans la médiation des processus inflammatoires (Lesig *et al.*, 2009), et enfin, la prostaglandine D2 synthétase intervient dans la modulation de l'apoptose via la Cyclooxygenase-2 (Cheuk *et al.*, 2002).

2.2.3. Transit épидидymaire

La durée du transit est assez peu variable en fonction de l'espèce, même si les longueurs du tube épидидymaire diffèrent dans de grandes proportions (Tableau 01). Chez l'homme, la durée totale est d'environ 1 semaine, le temps le plus long étant passé dans la queue de l'épididyme, chez le lapin la durée du transit des spermatozoïdes dans l'épididyme est de 10 jours, 3 jours dans la tête, 1 jour dans le corps et 6 jours dans la queue. C'est durant ce passage que les spermatozoïdes acquièrent leur maturation et leurs pouvoirs fécondant (Robaire et Hermo, 1988).

Tableau I : Durée du transit (en jour) des spermatozoïdes dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme chez différentes espèces (Robaire et Hermo, 1988).

Espèces	Tête	Corps	Queue	Durée totale
Homme	1 à 2,5	0,5	5	1 à 12
Etalon	1	1,5	6	7,5 à 10
Bélier	1	3	8	13
Taureau	2	2	10	14
Verrat	3	2	4 à 9	9 à 14
Lapin	3	1	5 à 6	9 à 10
Rat	3	3	5	11

2.2.4. Fonctions de l'épididyme

L'épididyme est un organe complexe qui remplit divers fonctions au sein du système reproducteur mâle, certaines fonctions sont attribuées à son épithélium alors que d'autres sont assurées à l'intérieur de la lumière du tubule.

2.2.4.1. Fonctions de l'épithélium épидидymaire

2.2.4.1.1. Absorption et réabsorption

L'épithélium de l'épididyme joue un rôle primordiale dans la composition du fluide séminal en absorbant un large volume de liquide et de molécules provenant de testicule de en réabsorbant des ions, des protéines et de l'eau.

La majorité des protéines présentes dans le fluide testiculaire sont réabsorbées par endocytose fluide ou spécifique, ou par transcytose, et sont remplacées par de nouveaux composés sécrétés par les cellules épithéliales (Thibault et Levasseur, 2001), ce qui permet de multiplier la concentration des spermatozoïdes à leurs entrées dans l'épididyme (Hamilton, 1975).

2.2.4.1.2. Sécrétion

L'épithélium sécrète dans le lumen une variété d'ions et de protéines telle que la Glycérile Phosphoryl Choline (GPC) et des protéines spécifique majoritairement des enzymes tel que phosphatase acides et alcalines, les glucosidases et les protéases procathepsine L modifient la membrane des spermatozoïdes, les glycosyltransférases qui peuvent modifier le fluide épидидymaire, la lactoferrine et la clustérine permettent la survie et la protection des spermatozoïdes au cours de transit épидидymaire (Thibault et Levasseur, 2001).

2.2.4.1.3. Métabolisme

La structure de l'épithélium de l'épididyme possède aussi une activité métabolique, en plus d'assurer le métabolisme intermédiaire du glucose (Bernadiis *et al.*, 1995), elle permet le métabolisme de la testostérone en 5 α -dihydrotestostérone (DHT) (Cooke et Robaire, 1987).

L'épididyme est aussi impliqué dans la biosynthèse, le métabolisme et la conjugaison du glutathion, la biosynthèse des prostaglandine (Blodorn *et al.*, 1996, Leung *et al.*, 1998) de même que le métabolisme de la vitamine D (Kidroni *et al.*, 1983).

2.2.4.1.4. Spermiphagie

La majorité des spermatozoïdes sont absorbés, puis détruite par les cellules apicales de l'épididyme et le canal déférent par spermiphagie qui est une phagocytose des spermatozoïdes non éjaculés. Tandis que une portion de spermatozoïdes est évacuée dans l'urine (Glover, 1974 ; Bedford, 1975).

2.2.4.2. Fonctions au niveau du la lumière

2.2.4.2.1. Transport

Le transport des spermatozoïdes le long de la lumière épидидymaire est possible grâce à la pression hydrostatique qui varie le long du tubule, des contractions musculaires et l'activité ciliaire des parois du tubule. Ces contractions sont largement responsable de transport des gamètes (Beford, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988).

De plus, le passage des spermatozoïdes à travers la lumière du tubule épидидymaire semble être un processus bien régulé et le temps requis pour le trajet est relativement constant et oscille entre 10 et 14 jours, sauf chez l'homme ou celui-ci est plutôt variable (Orgibincrist, 1998).

2.2.4.2.2. Maturation

La maturation des spermatozoïdes est un processus complexe, dépend d'un certain nombre de modification morphologique et physiologique, ce processus commence véritablement dans les testicules et se poursuit une fois le spermatozoïde libéré de cellule de Sertoli et après son passage dans les cônes efférent et l'épididyme. C'est dans ce processus que les spermatozoïdes acquièrent leur motilité et leur pouvoir de fécondé un ovule (Yeung *et al.*, 1998).

2.2.4.2.3. Stockage

Les spermatozoïdes matures atteignent la queue de l'épididyme et baignent dans un liquide qui permet de les conserver qui servira de réservoir durant l'attente de prochaine éjaculation, les spermatozoïdes baignent dans un liquide qui permet de les conserver dans un stade quiescent pour une période pouvant aller de quelque jours à plus d'un mois (Hinton et Palladino, 1995).

2.3. Régulation des fonctions de l'épididyme

La fonction sexuelle de lapin mâle fait l'objet d'une régulation de type neuroendocrine, les hormone intervenant dans cette régulation ont deux origine, d'une part le complexe hypothalamo-hypophysaire via une gonadolibérine la GnRH (gonadotropin releasing hormone) qui se fixe sur des récepteurs localisées sur les cellules gonadotrope de l'anthéhypophyse et stimule ainsi la synthèse et la sécrétion de deux gonadotrophines: FSH et ISCH (interstitial cell stimulating hormone) équivalent de LH (Thibault et Levasseur, 2001 ; Bonne *et al.*, 2005) et d'autre part, les testicules ou ce trouve les récepteurs spécifiques de chacune des deux gonadotrophines (Bonnes *et al.*, 2005).

La moitié des protéines épидидymaire sont sous contrôle androgénique (positif ou négatif), pour les autres, 43% sont modulés par des facteurs locaux, et 6% ne sont pas influencés quelles que soient les conditions physiologiques (Dacheux *et al.*, 2005).

Les fonctions luminale et épithéliale de l'épididyme, sont sous un contrôle d'un réseau complexe de molécules biochimiquement très variées et d'origines diverses, qui vont agir spécifiquement au niveau des cellules de l'épithélium épидидymaire pour réguler l'expression des gènes-cibles, et par conséquent, agir sur les fonctions physiologiques de cet organe (Holland et Orgebin-Crist, 1988).

Parmi les androgènes essentiels dans la régulation des fonctions de l'épididyme on trouve la testostérone et son métabolite la dihydrotestostérone (DHT) qui proviennent des testicules et des glandes surrénales et qui jouent un rôle très important dans la régulation de l'activité épидидymaire (Adamali *et al.*, 2000).

Leur action notamment la testostérone surrénalienne arrivent par la voies sanguines « contrôle endocrine » liées à la SBP (sex steroid-binding protein) (Mercier- Bodard *et al.*, 1970) et par le fluide testiculaire « contrôle lumicrine » liée à l'ABP (androgen binding protein) (Brooks, 1981 ; Holland et Orgebin-Crist, 1988) au niveau épидидymaire, par la 5 α -dihydrotestostérone (DHT) est le médiateur de l'action de la testostérone, obtenue après la conversion de ce dernier par la 5 α -réductase de type I et II, principalement au niveau du segment initial (Robaire et Hermo, 1988 ; Robaire *et al.*, 2000; Ezer et Robaire, 2003).

La DHT agit via un récepteur nucléaire spécifique AR, le complexe ainsi formé se fixe sur un élément de réponse aux androgènes (ARE), qui est une séquence nucléique située au niveau de promoteur des gènes cible pour réguler positivement leur expression ou les réprimées. Les récepteurs des androgènes sont présents au niveau des cellules principales de toutes les régions de l'épididyme chez les différentes espèces (Robaire *et al.*, 2000).

Néanmoins, selon Eddy *et al.* (1996) ; Hess *et al.*, (1997), d'autres hormones tel que : l'ocytocine, l'activine et l'inhibine, l'angiotensine II, la mélatonine, et de nombreux facteurs de croissance ..., peuvent intervenir dans :

- Le développement et le maintien de la structure de l'épithélium épидидymaire ;
- La régulation de ces fonctions;
- La protection des cellules épithéliales des dommages oxydatifs ;
- La stimulation des cellules principales et leur fonction sécrétrice ;
- Le maintien d'un pH favorable à l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes et leurs états de quiescence lors de leur stockage au niveau de la queue de l'épididyme ;

- La maturation des spermatozoïdes lors de leur transit épидидymaire.

2.4. Mode de sécrétion de l'épididyme

La sécrétion des protéines au niveau de la lumière de l'épididyme est réalisée essentiellement par les cellules principales et est accomplie selon deux modes de sécrétions différents, le mode mérocrine et le mode apocrine.

2.4.1. Sécrétion mérocrine

La sécrétion mérocrine est un mode de sécrétion protéique classique (Thibault et Levasseur, 2001) qui se produit dans la plupart des différents types cellulaires y compris les cellules principales de l'épithélium épидидymaire (Sherwood et Lockhart, 2006).

Selon ce mode la séquence primaire en acide aminé des protéines sécrétées de cette façon sont caractérisées par la présence d'un peptide signal à l'extrémité N-terminale ce qui permet à la protéine de s'associer au réticulum endoplasmique. Ainsi, l'ARNm est traduit en protéine par les ribosomes associés au réticulum endoplasmique rugueux de la cellule (Girouard, 2009).

Les protéines sont ensuite transportées jusqu'à l'appareil de Golgi afin d'y subir différentes modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation et l'acylation, sont ensuite transférées et emmagasinées dans des granules de sécrétion. Ces granules migrent jusqu'à la membrane plasmique de la cellule et libèrent leur contenu à l'extérieur lors de la fusion avec la membrane plasmique (Thibault et Levasseur, 2001).

Les protéines ne présentant pas d'ancrage membranaire sont libérées dans la lumière de l'épididyme (Girouard, 2009).

2.4.2. Sécrétion apocrine

La sécrétion apocrine a été mise en évidence par microscopie électronique dans les cellules principales de l'épididyme. Outre les cellules principales de l'épididyme, la sécrétion apocrine a aussi été observée dans le canal déférent et dans différentes glandes telles que la glande mammaire et les glandes accessoires (Figure 05) (Girouard, 2009)

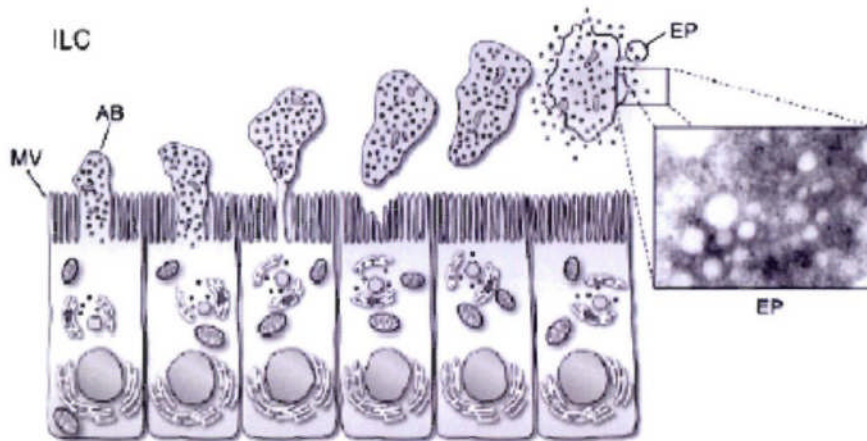


Figure 05 : Représentation schématique de la sécrétion apocrine dans les cellules principales de l'épididyme (Girouard, 2009).

AB : Aposomes; EP : Epididymosomes; ILC : compartiment intra-Liminal ; MV : microvillosité

Contrairement au mode mérocrine, la synthèse de même que les modifications post traductionnelles des protéines sécrétées selon le mode apocrine s'accomplissent dans le cytoplasme des cellules (Sullivan, 2005).

Effectivement, puisque la séquence primaire de ces protéines est dépourvue de peptide signal, les protéines ne peuvent s'associer au réticulum endoplasmique, la synthèse a donc lieu exclusivement sur des ribosomes libres (Girouard, 2009), c'est une particularité de la sécrétion protéique épидидymaire vient de la sécrétion des protéines ne possédant pas de signal peptidique, localisées dans des vésicules appelées épидидymosomes, protégeant ainsi les protéines d'une dégradation enzymatique (Rejraji *et al.*, 2002) ce sont des vésicules multi lamellaires libérées dans la lumière par un processus de sécrétion apocrine des cellules épithéliale épидидymaire (Hermo et Jacks, 2002 ; Rejraji *et al.*, 2002 ; Saez *et al.*, 2003), elles peuvent interagir avec la surface spermatique durant le transit épидидymaire pour permettre le transfert de protéines vers le spermatozoïde (Frenette *et al.*, 2002).

Les mécanismes de modifications post-traductionnelles de ces protéines restent, cependant, encore méconnus. Ces protéines seraient, toutefois, glycosylées de façon inhabituelle car les glucides ne s'associent pas à la protéine selon la glycosylation. En outre, l'extrémité N-terminale de ces protéines est bloquée par une acylation ce qui n'est pas commun pour les protéines mérocrines (Frenette, 2003).

Des protéines portant un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont aussi sécrétées de cette façon. De plus, le transport intracellulaire de ces protéines vers la membrane plasmique se fait indépendamment de l'appareil de Golgi et des granules de

sécrétion, les protéines sont plutôt emmagasinées dans une excroissance du cytoplasme apicale, nommée aposome (Bounor-Legare, 2001).

A ce propos, des études réalisées dans les cellules de la glande coagulante chez le rat ont permis d'établir que de l'albumine sérique pouvait entrer dans les cellules par transsudation au niveau de la membrane basale de ces cellules. Selon d'autres études, l'albumine pourrait jouer un rôle potentiel dans le transport des protéines apoclines vers la membrane apicale des cellules. Graduellement, la jonction entre la membrane plasmique et l'aposome se rétrécit ce qui mène au détachement de l'aposome (Bounor-Legare, 2001).

De fait, plusieurs de ces aposomes ont été observés dans la lumière de l'épididyme par microscopie électronique (Bounor-Legare, 2001). Ces aposomes contiennent entre autres des ribosomes libres, des vésicules de différentes grosseurs de même que quelques citernes du réticulum endoplasmique. Par la suite, les aposomes se fragmentent et libèrent leur contenu dans la lumière de l'épididyme (Girouad, 2009).

2.5. Sécrétion protéique épидидymaire

La quasi-totalité des protéines d'origine testiculaire pénétrant dans l'épididyme sont réabsorbées dans les premières régions de l'organe, et la plupart des protéines épидидymaire sont sécrétées dans la partie antérieure de l'épididyme (Syntin *et al.*, 1996).

Chez le verrat, l'activité sécrétrice de la région antérieure est six à huit fois plus importante que celle de la région caudale. La sécrétion protéique dans la tête, le corps et la queue représente 83%, 16% et 1% respectivement de la totalité des sécrétions épидидymaire (Dacheux *et al.*, 2003).

Selon les espèces, l'épithélium épидидymaire sécrète globalement les mêmes protéines dont les proportions qui varie de la tête au corps avec quelque protéines seulement qui représentent la majorité des protéines épидидymaire, par exemple, sur les 250 protéines du fluide épидидymaire équin, 18 d'entre elles représentent plus de 92% de l'activité sécrétrice épидидymaire (dont lactoferrine 41%, clusterine 25%) (Fouchecourt *et al.*, 2000). Chez le bélier et le verrat, 70% de l'activité de sécrétion de l'épididyme est liée à quatre protéines : la clusterine, la lactoferrine, la GPX (glutathion peroxydase), et la PDGS (prostaglandin D2 synthase) (Dacheux *et al.*, 2003).

Les changements de composition du fluide épидидymaire sont dus à la sécrétion séquentielle des différentes protéines tout au long de l'épididyme d'une part et d'autre part la réabsorption spécifique de certaines protéines dans l'organe.

Certaines de ces protéines sont réabsorbées aussitôt qu'elles sont sécrétées, comme la protéine Train A chez le verrat, et certaines isoformes de la clusterine chez le cheval. Par

contre, d'autres protéines restent présentes tout le long de l'organe, comme la PDGS (prostaglandin D2 synthase) chez plusieurs espèces (Dacheux *et al.*, 2003).

Les protéines synthétisées dans l'épididyme sont rarement spécifiques de cet organe, la spécificité épидидymaire est liée à un épissage particulier, ou à une sécrétion de protéines habituellement cellulaires (comme les enzymes lysosomales) (Dacheux et Dacheux, 2002).

La principale caractéristique des protéines épидидymaire sécrétées est leur polymorphisme très important, à la fois pour leur poids moléculaire et leur point isoélectrique, cette hétérogénéité moléculaire est liée à des modifications post-traductionnelles (principalement différentes degrés de glycosylation) qui ont lieu dans les cellules sécrétrices et induisent la production d'isoformes d'une même protéine, ces modifications post-traductionnelles sont aussi dépendantes de la région épидидymaire. De plus, des modifications post sécrétions peuvent avoir lieu comme des protéolyses et déglycosylations partielles (Dacheux *et al.*, 2003).

2.6. Quelques protéines épидидymaire

2.6.1. Clustérine (SPG-2)

La clustérine ou glycoprotéine sulfatée 2 (SGP-2) est une protéine de 394-416 acide aminé et de 35-45 kDa, abondamment, produite par l'épididyme, la vésicule séminale et les testicules (O'Bryan *et al.*, 1994b), c'est la protéine la plus sécrétée au niveau de toutes les régions de l'épididyme, elle représente 25% à 35% des sécrétions totales, avec des niveaux similaires chez plusieurs espèces. Elle est caractérisée par son affinité pour les phospholipides et son rôle protecteur en se liant à la membrane (Mattmueller et Hinton, 1991 ; Fouchécourt *et al.*, 2000 ; Dacheux et Dacheux, 2002 ; Dcheux *et al.*, 2003 ; Dacheux *et al.*, 2005).

Chez le rat, la régulation de cette protéine par les androgènes et son association avec les spermatozoïdes dans l'épididyme laisse supposer un rôle spécifique mal connu.

Sylvester *et al.* (1991) ; Hermo *et al.* (1991) ont supposé que cette protéine est libérée par les spermatozoïdes pour être réabsorbée au niveau des canaux efférent ; elle est remplacée par une autre SPG-2 épидидymaire.

Les études immunohistochimique révèlent l'existence d'hétérodimère conventionnel, tandis que la capsule acrosomial montre l'existence de plusieurs formes de cette protéine réagissant avec une chaîne d'anticorps anticlustérine (O'Bryan *et al.*, 1994).

2.6.2. Protéines épидидymaire humaines (HE)

Six protéines majeures sécrétées par les cellules épithéliales de l'épididyme humain, nommés de HE1 à HE6 ont été identifiées par Kirchhoff *et al.* (1990). La HE1 connue comme une glycoprotéine de transfère du cholestérol est de 19 à 20KDa, présente au niveau de l'épithélium et de la lumière de l'épididyme moyen et qui s'accumule au niveau de la queue de l'épididyme distal et des canaux déférents (Okamura *et al.*, 1999).

La HE2 est une petite protéine spécifiquement produite par l'épididyme proximal, et des anticorps spécifique anti-HE2 sont localisés au niveau des spermatozoïdes éjaculés (Osterhoff *et al.*, 1994).

La HE3 est une glycoprotéine fortement exprimée au niveau de l'épididyme avec une régionalisation très marquée, elle est abondante au niveau de l'épididyme proximal, l'analyse génomique montre qu'il existe trois gènes indépendants α , β et γ . Cependant la forme α et β sont exprimées tandis que la forme γ constitue un gène non fonctionnel (Kirchhoff *et al.*, 1994).

La HE4 est une protéine acide de 10 kDa, elle est localisée au niveau de l'épithélium et la lumière épидидymaire et aussi à la surface des spermatozoïdes éjaculés, la dissolution de cette protéine au cours de la capacitation laisse suggérer un rôle dans la décapacitation (Kirchhoff, 1998).

Les transcrits du gène HE5 sont abondants dans l'épithélium de l'épididyme distal, les spermatozoïdes et les lymphocytes (Pera *et al.*, 1996) ;Yeung *et al.*, 1997). Elle joue un rôle dans la protection des spermatozoïdes contre les attaques auto-immunes durant la maturation, le stockage et la fécondation à été attribué à cette protéine (Kirchhoff et Hale, 1996).

La HE6 est un récepteur couplé à une protéine G (RCPG), avec sept domaines transmembranaire et une longue séquence N terminale. Chez la souris, cette protéine est restreinte à l'épididyme, en particulière la partie proximal qui est le site majeur de son expression et la mutation de cette protéine provoque une infertilité associée à une anomalie d'absorptions du fluide testiculaire au niveau des canaux efférents (Obermann *et al.*, 2003 ; Gottwald *et al.*, 2006 ;Kirchhoff *et al.*, 2006).

2.6.3. Lactoferrine

C'est une glycoprotéine majeure est de 75 kDa, sécrété par les cellules principale de l'épithélium épидидymaire, elle se fixe sur les spermatozoïdes après sa sécrétion dans la lumière épидидymaire (Jin *et al.*, 1997), Cette protéine est absente au niveau de l'épididyme proximal, tandis qu'elle est présente dans le cytoplasme des cellules principales de

l'épididyme moyen et distal chez le verrat (Pearl et Roser, 2007). La lactoferrine joue un rôle anti-inflammatoire par la séquestration des ions du Fer (Weinberg, 1984).

2.6.4. Protéine sperm surface protéin (P34H/P26h)

La protéine sperm surface protéin P34H ou P26h font partie d'une famille de protéine située sur l'acrosome des spermatozoïdes et seraient sécrétés par les cellules principales de l'épithélium au niveau de la tête épидидymaire, et impliquée dans la liaison spermatozoïde – zone pellucide. Elle est absente des tubes séminifères et des canaux efférent, apparait faiblement dans la tête de l'épididyme et plus intensément dans le corps ; sa présence sur les spermatozoïdes augmente au cours de transite épидидymaire (Boue *et al.*, 1996).

Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus, cependant certaines organes comme le rein et le foie l'expriment a un haut niveau suivie du poumons et de l'épididyme (Nakagawa *et al.*, 2002). Selon la séquence d'acide aminé de cette protéine, sa taille est de 26 kDa, telle que dans le foie, cependant elle peut atteindre une tailles de 34 kDa (Boue *et al.*, 1994 ; Cho-Vega *et al.*, 2007a) sur les spermatozoïdes et la prostate (Liu *et al.*, 2006).

Un faible niveau de P34H est aussi associé à l'infertilité masculine. Cette protéine peut donc être considérée comme un marqueur de la maturation des spermatozoïdes et de la fertilité (Boue et Sullivan, 1996).

2.6.5. Polyoma enhancer activator protein 3 (PEA3)

La protéine PEA3 un membre de la famille des Ets dont on sait qu'il est majoritairement exprimé dans l'épididyme. La famille des Ets est une famille de facteurs de transcription qui contiennent tous un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé appelle ETS qui est capable de reconnaître une séquence cible de l'ADN (5' GGAA/T 3') (Defossez *et al.*, 1997). Cette famille est responsable de la transcription d'une grande quantité de protéases, d'oncogènes et d'autres gènes impliqués dans le système immunitaire, l'expression de PEA3 serait fortement régulée par les androgènes, mais aussi par l'action de certains facteurs testiculaires qui ne sont pas connus jusqu'à maintenant (Hinton *et al.*, 1998).

Enfin ce facteur de transcription pourrait être responsable de la régionalisation de l'expression de GPX5 (Faure *et al.*, 1991).

2.6.6. Claudines

Les claudines, quant à elles, forment une famille multi-génique composée d'au moins 24 membres et sont les principaux constituants impliqués dans la formation des jonctions serrées (Morita *et al.*, 1999). Les claudines sont capables de se polymériser et de former des pores permettant la diffusion sélective des ions et des molécules à travers l'espace paracellulaire. Aussi, la nature physiologique des jonctions semblerait dépendre de la combinaison des claudines associées (Tsukita et Furuse, 2000).

En effet, la concentration et le type de claudine impliquée dans la formation d'une jonction serrée contrôleraient la perméabilité sélective de ces canaux (Zahraoui, 2004). L'expression de claudine-1 (Cldn-1) au niveau de l'épithélium épидидymaire s'étend à tous les segments (Gregory *et al.*, 2001). Elle concerne plus particulièrement la région apicale, lieu de localisation des jonctions serrées ; le long de la membrane plasmique latérale des cellules principales ; l'interface entre les cellules principales et basales ainsi que la membrane basale de l'épithélium. Ces résultats laissent suggérer que claudine-1 pourrait agir en tant que molécule d'adhérence entre les cellules épithéliales adjacentes et ces cellules avec la lame basale (Gregory *et al.*, 2001).

Une étude réalisée sur des rats âgés de 7 jours et 10 semaines, a mis en évidence la localisation au niveau épидидymaire de deux claudines (2 et 10). Claudine-2 est exprimée principalement au niveau apical des cellules épithéliales adjacentes du segment initial et ne présente pas d'expression dans les autres régions épидидymaire. Claudine-10 est quant à elle, détectée au niveau apical des cellules épithéliales de tout l'épididyme chez un rat de 7 jours (Guan *et al.*, 2005).

La spécificité d'expression de ces claudines concourt à générer un environnement luminal spécifique en chaque point du canal épидидymaire, nécessaire au transport, à la maturation et au stockage des Spermatozoïdes (Guan *et al.*, 2005).

2.6.7. Caténines

Les caténines font partie d'une petite famille multigénique à deux isoformes α et β de protéines cytoplasmiques qui agissent en tant que protéines de liaison pour les cadhérines au niveau des jonctions d'adhérence (Kintner, 1992 ; Gumbiner, 2000). Elles sont exprimées le long de la membrane plasmique latérale entre les cellules principales adjacentes et les cellules claires dans tout l'épididyme de rat, excepté au niveau du segment initial où leur localisation cellulaire diffère (De Bellefeuille *et al.*, 2003). En effet, au niveau de la tête

proximale, on les retrouve entre les cellules principales voisines, les cellules étroites et les cellules apicales.

On observe donc, au sein de l'épididyme une spécificité territoriale d'expression pour ces protéines de liaison. Le ciblage des caténines α et β au niveau de la membrane plasmique latérale des cellules épithéliales semble être contrôlé par les androgènes. De plus, des études montre qu'elles établissent toutes une liaison avec la E-cadhérine, confirmant ainsi leur rôle dans la formation des jonctions d'adhérence au niveau de l'épithélium épididymaire (De Bellefeuille *et al.*, 2003).

2.6.8. Cystatines (Cres)

Sont des inhibiteurs protéases à cystéine, ces protéines contiennent deux ponts disulfures du côté C-terminal et leurs poids moléculaire varient entre 10 à 14 kDa (Hensken *et al.*, 1996). La protéine cystatin-related epididymal and spermatogenic (Cres) fortement restreinte à l'épididyme proximal, est faiblement présente dans les testicules (Cornwall *et al.*, 1992).

L'expression de gène Cres est sous le contrôle des androgènes et d'autres facteurs testiculaires non identifié dans l'épididyme, permettant la sécrétion de la protéine Cres dans le fluide où baignent les spermatozoïdes (Kirchhoff, 1999). Cres agirait comme inhibiteur de protéase et protégerait donc les spermatozoïdes et l'épithélium épididymaire contre un relargage prématuré des enzymes protéolytiques de l'acrosome (Hinton et Palladino, 1995 ; Gatti *et al.*, 2004).

2.6.9. Cadhérines

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires, dépendante du calcium, impliquées dans l'adhésion cellulaire, elles appartiennent à une famille multigénique qui compte plus de 50 membres. Ces glycoprotéines, de par leur rôle dans l'adhésion intercellulaire, tiennent une place extrêmement importante dans la différenciation épithéliale. Certaines d'entre elles sont exprimées au niveau de l'épididyme, telles que les cadhérines épithéliales (E-cadhérine), présentes entre les cellules principales épididymaire adjacentes, assurant ainsi l'intégrité de cet épithélium (Berx et Van Roy, 2001).

L'E-cadhérine apparaît au niveau de l'épididyme à partir du 7ème jour de développement postnatal chez le rat. Par ailleurs, le niveau d'expression de son ARNm, androgéno-dépendant sur l'ensemble de l'épididyme, est multiplié par trois, parallèlement à la formation de la barrière hémato-épididymaire (Cyr *et al.*, 1992, 1995).

2.6.10. Défensine

La défensine exprimée largement dans les cellules épithéliales de l'épididyme (Schutte *et al.*, 2002). La β - défensine exprimé uniquement dans la partie médiane de la tête épидидymaire, ces peptides sont libérés dans la lumière épидидymaire sous forme soluble et se lie au spermatozoïde de l'ensemble de l'épididyme par des interactions hydrophobes (Zhou *et al.*, 2004). Chez le rat, les ARNm de β defensine sont sous le contrôle des androgènes dans le segment initial de l'épididyme (Palladino *et al.*, 2003). La β -défensine assurent la protection des spermatozoïdes et de l'épididyme des infections microbiennes (Zanich *et al.*, 2003).

2.6.11. A Disintegrin And Metallprotease (ADAMs)

Ces protéines Constituent une famille de protéines transmembranaire avec un domaine désintégrine et métalloprotéase, qui regroupent un multidomaine conservé avec une structure prométalloprotéase, désintégrine, cystéine riche, EGF-like, un domaine transmembranaire et un autre cytoplasmique. Les ADAMs les plus étudiées en reproduction sont ADAM1a (fertiline α isoforme a), ADAM2 (fertiline β) d'origine testiculaire et ADAM3(Cyritestine) d'origine épидидymaire (Oh *et al.*, 2005).

L'hétérodimère ADAM1a /ADAM2 dans les cellules germinales au niveau testiculaire intervient dans la régulation ou la localisation spécifique des ADAM3, implique dans la progression des spermatozoïdes dans le tractus génitale femelle, la pénétration des cellules du cumulus oophorus et la fixation sur la zone pellucide (Cho *et al.*, 1998 ; Nishimura *et al.*, 2004).

L'épididyme de souris exprime plusieurs ADAMs ; parmi elles, certaines sont fortement exprimées (ADAM7 et ADAM28) et d'autre sont peu exprimées (ADAM8, ADAM15, ADAM23, ADAM32) (Oh *et al.*, 2005). Les transcrits de l'ADAM7 chez la souris et le rat sont très élevés au niveau de l'épididyme proximal puis diminuent progressivement vers l'épididyme distal (Oh *et al.*, 2005). L'étude immunohistochimique des ADAM7 et 28 montre une localisation luminale de l'ADAM7 au niveau de tous les segments de l'épididyme tandis que ADAM28 est restreinte à l'épididyme proximal (Oh *et al.*, 2005).

D'après Primakoff et Myles (2000) ; Evans (2001) le clivage protéolytique des ADAMs supprime le domaine pro et métalloprotéase, la séquence N-terminale et le domaine désintégrine persistent au niveau des spermatozoïdes matures ; ceux-ci sont impliqués dans l'interaction des spermatozoïdes avec l'ovocyte.

2.6.12. Sperm adhesion molecule (SPAM)

La protéine SPAM est une endo- β -galactosidase et glycosidase synthétisée par les cellules principales au niveau de l'épithélium épидидymaire (Chapman et Killian, 1984) et font partie des protéines qui subissent un traitement au cours de transit épидидymaire, pour devenir des hyaluronidases liées au GPI, nommées PH20 chez le Cobaye (Phelps *et al.*, 1990), SPAM1 chez l'homme (Jones *et al.*, 1995), 2B1 chez le rat (Jones *et al.*, 1996) et SPAM1 chez la souris (Deng *et al.*, 1999) sont bien connues.

Chez le rat la protéine 2B1, connue au niveau de la queue du spermatozoïde, est clivée en deux sous-unités liées par un pont disulfure dans la tête de l'épididyme ; au cours de la capacitation elle migre de la queue à la zone acrosomiale (Jones *et al.*, 1990 ; 1996). Chez la souris, le poids moléculaire de cette protéine diminue durant la maturation épидидymaire en raison des processus de déglycosylation des oligosaccharides N-liés (Deng *et al.*, 1999).

Les protéines SPAM1/2B1/PH20 sont multifonctionnelles ; elles jouent un rôle dans la dissolution de la matrice du cumulus oophorus, la liaison à la zone pellucide et probablement dans la signalisation intracellulaire (Cherr *et al.*, 2001). Chez la souris, le gène *Spam1* est exprimé au niveau de l'épithélium épидидymaire (Deng *et al.*, 2000). La protéine SPAM1 sécrétée dans le fluide luminal sous la forme soluble ou liée aux épидидymosomes est impliquée dans la maturation et le stockage des spermatozoïdes (Zhang et Martin-DeLeon, 2001 ; Zhang et Martin-DeLeon, 2003).

La concentration au niveau de la queue du spermatozoïde est 4 fois supérieure par rapport à celle de la tête ; elle est associée à l'augmentation de l'activité hyaluronidase (Deng *et al.*, 1999). L'activité de cette protéine est inversement liée à sa présence chez les rats ayant subi la ligature des canaux efférents confirmant son origine post-testiculaire (Zhang *et al.*, 2004).

2.6.13. Fertilization antigen 1 (FA-1)

La protéine fertilization antigen 1 (FA-1) est une glycoprotéine qui existe sous forme de dimère (51 ± 2 kDa) ou de monomère (23 kDa), localisée sur la membrane plasmique des cellules germinales mâles. Elle se développe dans les derniers stades de la spermatogenèse, et est donc cachée du système immunitaire par la barrière hémato-testiculaire (Kadam *et al.*, 1995).

Elle est impliquée dans la capacitation, et la réaction acrosomique, de plus elle possède des résidus phosphotyrosine capables d'auto-phosphorylation (Kadam *et al.*, 1995), et se lie à la protéine ZP3 de la zone pellucide (Zhu et Naz, 1997). Injectée à des souris (mâles

et femelles), elle réduit leur fertilité de 70%, de même que chez la lapine, sans perturber la motilité spermatique (Naz, 1999 ; Naz et Zhu, 1998).

2.6.14. Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est un enzyme exprimé dans toutes les régions de l'épididyme, assurent l'élimination de l'anion super-oxyde O_2^- par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène, afin de rendre la membrane plasmique imperméable, inerte et éphémère pour les radicaux dans le cas de stress (Eliasson *et al.*, 1997 ; Chesler *et al.*, 2004).

La SOD existe sous trois formes chez les mammifères, selon sa localisation ; la CuZnSOD localisée principalement dans le cytosol(32kDa) et porte un atome de zinc et de cuivre au niveau de son site actif, la MnSOD exclusivement retrouvée dans les mitochondries est de 23 kDa, et la EC-SOD retrouvée à l'extérieur des cellules a un poids moléculaire de 135 kDa et elle est composée de quatre sous-unités identiques et elle lie les mêmes métaux que la Cu,ZnSOD (Mates *et al.*, 1999 ; Fatman *et al.*, 2003 ; Culotta *et al.*, 2006).

Les atomes liés aux sites actifs de chacun des SOD sont des métaux de transition nécessaire pour effectuer leur action (Mates *et al.*, 1999 ; Zelko *et al.*, 2002).

L'association de cet enzyme avec la membrane plasmique pourrait être liée au besoin des spermatozoïdes d'être protégés du stress oxydant au cours de stockage ou pour promouvoir la production de H_2O_2 afin de changer le potentiel redox ; la phosphorylation des tyrosines associé à l'induction de la motilité et l'initialisation de la capacitation (Lewis et Aitken, 2001).

2.6.15. ATP-binding cassette transporter (ABCG2)

La protéine ABCG2 est un membre de la famille des transporteurs membranaires *ATP-binding cassette* d'un poids moléculaire d'environ 70 kDa impliqué dans l'efflux de conjugués sulfatés et du cholestérol, elle est présente sur les spermatozoïdes dans l'épididyme de bovin et jouerait un rôle dans le transport du sulfate et du cholestérol, localisée sur la coiffe acrosomique. Les expressions protéiques et ARNm montrent une expression croissante, depuis la tête jusqu'à la partie proximale de la queue, puis une expression décroissante au niveau de la partie distale de la queue d'épididyme, ainsi dans la région acrosomique des spermatozoïdes de bovin depuis leur production testiculaire (Sullivan *et al.*, 2011).

2.6.16. Glutathion peroxydase (GPXs)

Les glutathion peroxydases (GPX) forment une famille de cinq enzymes chez les mammifères, nommées GPX1 à GPX5. Ces enzymes métabolisent le peroxyde d'hydrogène, peroxydes hydrophiles de petite taille et des hydroperoxydes plus complexes en utilisant le glutathion réduit comme donneur d'électrons. Le peroxyde d'hydrogène est métabolisé par la GPX à de faible concentration et par la catalase à de forte concentration, cependant à une concentration proche de 10^{-6} M les GPX sont saturées (Tulsiani, 2003; Yamamoto, 1993).

Quatre membres de la famille des GPX sont localisés sur le spermatozoïde, dans les cellules épithéliales, ou dans le fluide épидидymaire (GPX1, GPX3, GPX4, GPX5). GPX1 représente la majeure forme de GPX cellulaire, est exprimée au niveau des testicules, la prostate, les vésicules séminales, le canal déférent, et l'épididyme (Dufaure *et al.*, 1996). GPX3 connue comme GPX plasmatique, est retrouvée dans l'épididyme où elle présente un comportement particulier. En effet, chez la souris, la protéine GPX3 est sécrétée dans la tête épидидymaire, alors qu'elle reste cytoplasmique dans la queue, avec un taux d'ARNm plus élevé dans la région caudale (Schwaab *et al.*, 1998).

GPX4 est trouvée dans le testicule, mais aussi sur la tête et la pièce intermédiaire du spermatozoïde épидидymaire, ainsi que dans le noyau spermatique, où elle pourrait contribuer à la condensation de la chromatine durant le trajet épидидymaire (Pfeifer *et al.*, 2001), elle interviendrait aussi dans l'architecture correcte de la pièce intermédiaire. L'expression de GPX4 varie peu dans les régions proximales de l'épididyme, mais augmente dans la queue (Ursini *et al.*, 1999).

Chez la souris, l'expression de l'ARNm de GPX5 (24kDa) est limitée aux cellules principales de la tête épидидymaire et est sous contrôle androgénique (Ghyselinck, 1993). Chez le rat elle est exprimée fortement dans le segment initial, puis décroît tout au long de l'épididyme (Jervis et Robaire, 2001).

La protéine GPX5 est sécrétée dans la lumière épидидymaire, et s'associe à la membrane plasmique des spermatozoïdes de souris et de rats (Perry *et al.*, 1992 ; Vernet *et al.*, 1997 ; Rejraji *et al.*, 2002). La GPX5 sécrétée au niveau de la lumière présente la particularité de ne pas posséder un atome de sélénium ou de sélénocystéine dans son site actif (par opposition aux autres GPX de mammifères) et elle se trouve liée aux spermatozoïdes. Par ailleurs, contrairement aux autres membres de la famille des GPX, la distribution de GPX5 est restreinte à l'épididyme et à la membrane plasmique des spermatozoïdes (Jimenez *et al.*, 1992 ; Vernet *et al.*, 1997).

Les GPXs pourraient jouer un rôle important dans la protection de la membrane du spermatozoïde, car elle représente la seule enzyme qui peut recycler le peroxyde d'hydrogène et réparer les dommages causés par un excès de radicaux libres (Grignard *et al.*, 2005).

2.7.17. Indolamine dioxygénase (IDO)

L'indolamine dioxygénase catalyse l'oxygénation du L-tryptophane par l'anion superoxyde pour produire un produit moins dangereux pour la cellule, les cynurénines qui peuvent être rapidement et facilement éliminées de la cellule (Hirata et Hayaishi, 1975 ; Ozaki *et al.*, 1987).

Pour être active, cette enzyme doit se trouver dans un environnement riche en tryptophane dont les concentrations sont beaucoup plus importantes dans la tête et la queue épидидymaire que dans le sérum. Cette enzyme semble donc être importante pour la protection des spermatozoïdes dans l'épididyme (Hinton, 1990).

Chapitre II :
Matériel et
Méthodes

Cette étude fait partie des activités de recherche de Dr. Lakabi Et Dr. Hamidouche, et s'inscrit dans le cadre de l'étude du développement gonadique et de la maturité sexuelle des lapins de la population Blanche et de la souche synthétique, par une étude préliminaire du profil protéines de l'épididyme durant le développement post-natal chez les deux populations, en effectuant le dosage et l'électrophorèse.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Au total 30 lapins mâles (*Oryctolagus cuniculus*) âges de 4 à 28 semaines et appartenant à deux populations différent ont été utilisé dans notre étude. En effet 18 lapins appartiennent à la population Blanche, âgés de 4, 8, 12, 16, 24 et 28 semaines (on n'a pas sacrifié des lapins à 20 semaines d'âge pour manque d'animaux à cet âge). Tandis que 12 lapins sont de la souche améliorée ou la souche synthétique, âge de 4, 8, 12 jusqu'à 16 semaines.

La position taxonomique du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est selon Lebas *et al.* (1984) comme suite :

- Règne : **Animal**
- Embranchement : **Vertébrés**
- Classe : **mammifères**
- Super Ordre : **Glires**
- Ordre : **Lagomorphes**
- Famille : **Léporides (lièvre et lapin)**
- Sous-famille : **Leporinae**
- Genre : ***Oryctolagus***
- Espèce : ***Oryctolagus cuniculus***

Les animaux de la population locale sont issus de l'unité d'élevage de lapins de la coopérative des petits élevages « COOPAPIST » située à de Djebba, dans la commune de Ouaguenoune, wilaya de Tizi-Ouzou. Ceux du type amélioré proviennent d'un élevage privé de la région de Tigzirth, wilaya de Tizi-Ouzou

Dans les deux cas, les animaux sont nourris et abreuvés, *ad libitum*. L'aliment est de type granulé, destiné à l'élevage cunicôle. L'abreuvement s'effectue par un système de tétines.

Selon Zerrouki (2006), la population locale de lapins présente une variabilité phénotypique résultant des croisements multiples et volontaires (amélioration des caractères

de production) avec des races étrangères introduites en Algérie au cours des années 70 (Néo-Zélandais, fauves de bourgogne, Géant des Flandres, californien). Ce processus s'est amplifié entre 1985 et 1989 par l'introduction de reproducteurs de souche « Hyplus ».

La souche Synthétique, a été initié à l'institut technique des élevage-Baba-Ali, Alger (ITELV) à partir de 2003 en collaboration avec l'INRA de Toulouse (Gacem et *al.*, 2009). Cette souche est caractérisée par une prolificité importante (9 lapereaux née vivant par mis-bas), un poids adulte sensiblement plus élevé et une meilleure aptitude à la croissance que la population locale algérienne (Lebas et Zerrouki, 2010).

1.2. Verrerie et Appareillage

Les verreries et les appareillages utiles dans notre expérimentation sont présents dans le tableau 02.

Tableau II : Verreries et les appareillages utilise dans notre expérimentation

Verrerie	Appareillage
-birchers (50, 100, 250, 500, et 1000ml)	-Unité d'électrophorèse sur mini cuve vertical comprend ; cuve d'électrophorèse
-tube à essai	-générateur de courant
-pipette graduées (1ml, 250ml)	-Unité de spectrophotomètre
-éprouvette	-plaque en verre et en hydroxyde d'alumine
-burette	- des espaceurs, peigne
-seringue d'hamilton	-agitateur a barreau magnétique
- mortiers, potter	-pH mètre
-eppendorfs	-Balance a précision
-cristallisoirs	-Unité de spectrophotométrie
	-Centrifugeuse

1.3. Autre matériels

Notre expérimentation à nécessité d'autres matériels tel que: des bavettes, des gants, spatules, pissettes, barreau magnétique, portoirs, micropipettes (10 μ l-100 μ l), (100-1000 μ l).

2. Méthodes

2.1. Sacrifices des animaux et prélèvements

Les lapins de la population blanche sont pesés puis sacrifiées par saignement et sont immédiatement disséqués, les épидидymes sont prélevés, plongés directement dans l'azote liquide (Figure 06).

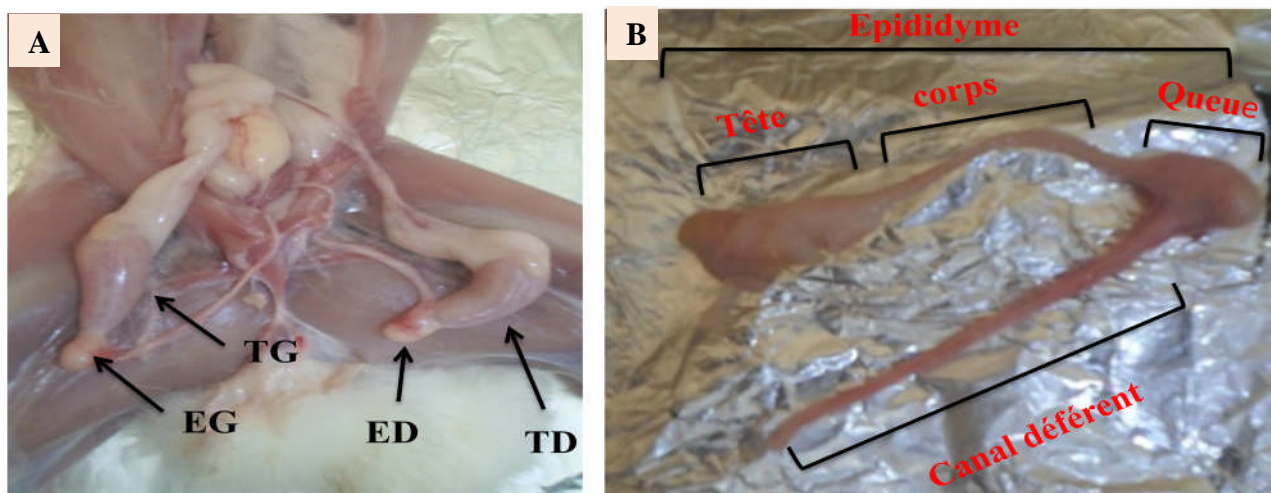


Figure 06: A : les gonades dissèquent du lapin ; B : l'épididyme prélevé et le canal déférent (Original. 2017).

TG : testicule gauche, EG : épididyme gauche, TD : testicule droit, ED : épididyme droit

Les échantillons épididymaire des lapins de la souche synthétique ont été récupérés, congelés à -80°C lors d'une étude antérieure, après passage dans l'azote liquide, en vue d'étude ultérieure. Leur récupération nous a permis de réaliser une étude comparative entre les deux populations de lapins disponibles souche synthétique et population locale.

2.2. Extraction des protéines

Les protéines ont été extraites à partir des épididymes par broyage mécanique. En effet les épididymes sont placés dans un Potter dans la glace et l'azote liquide afin de les durcir, puis broyées pendant quelques minutes. Pendant le broyage la solution Brooks qui est un tampon d'extraction et une anti-protéase le Phényle méthyle sulfonyl fluorure (PMSF) ont été ajoutés (Figure 07) (Annexe 01).

Le lysat a été récupéré dans des eppendorfs puis centrifugé pendant 10 min à une vitesse de 500 g. Après centrifugation le surnageant et le culot ont été déposés dans des nouveaux eppendorfs étiquetés, puis conservés à -20°C en attendant le dosage.

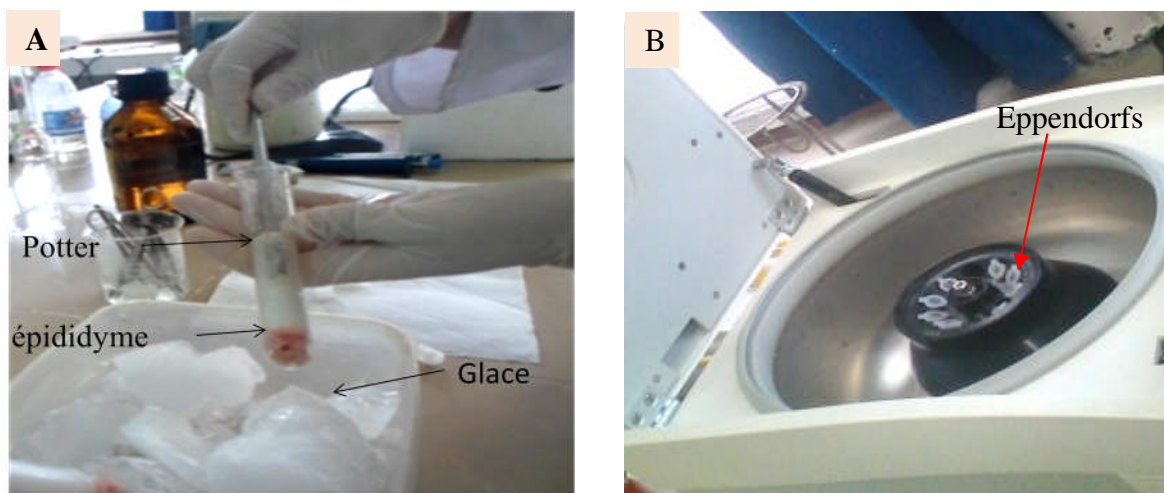


Figure 07: A : broyage de l'épididyme, B : photographié de l'unité de centrifugation (Original. 2017)

2.3. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées suivant la méthode de Bradford *et al.* (1976), qui est une méthode spectroscopique fondée sur des interactions entre les résidus acides aminés des protéines principalement (arginine, lysine et histidine) avec le colorant bleu brillant de comassie G-250. Cette méthode est basée sur une évaluation colorimétrique des échantillons.

Une solution standard de BSA (bovin albumine sérum) à 1 mg/ml a été utilisée pour la réalisation d'une courbe d'étalonnage associée au dosage (Annexe 02).

Cette courbe nous permet de déterminer la concentration en protéines des échantillons analysés selon l'équation obtenue, $Y=0,101x + 0,122$ avec un coefficient de détermination $R^2= 0,997$.

La densité optique (DO) des échantillons est mesurée par spectrophotométrie en lumière visible à $\lambda=595$ nm, puis 'que l'absorbance de bleu brillant de comassie est maximale à cette longueur d'onde.

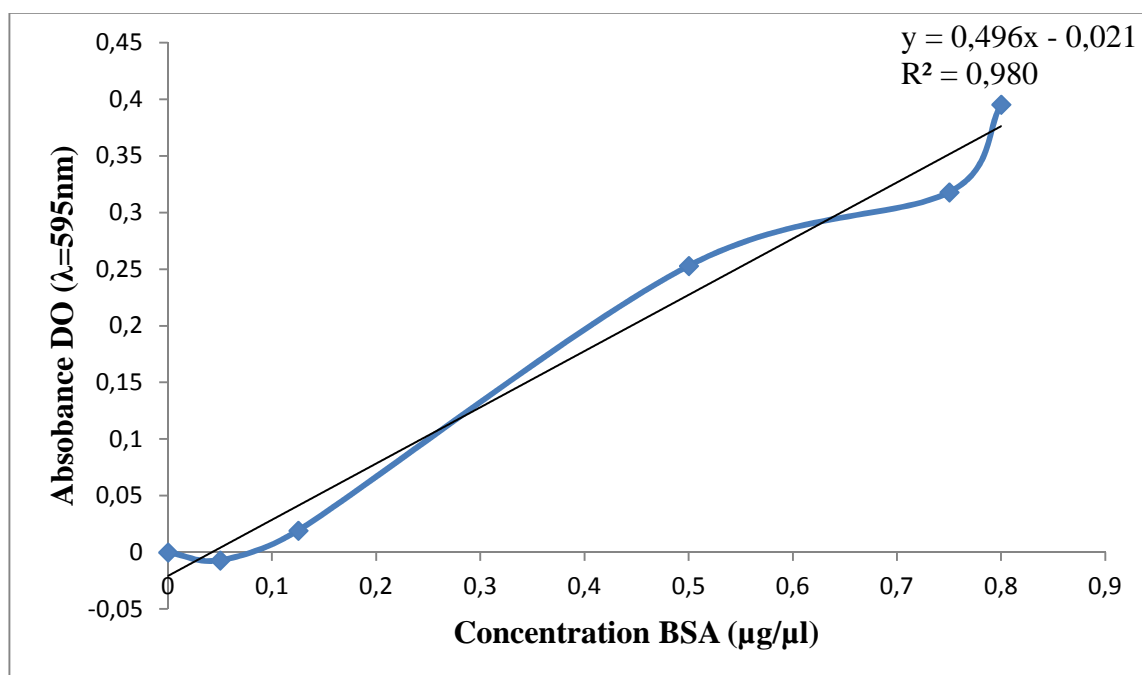


Figure 08: Courbe d'étalonnage du dosage des protéines réalisée par la BSA

2.4. Etude électrophorétique

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines, du fait de leurs caractéristiques amphotère, peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer de ce fait soit vers l'anode ou la cathode. Ainsi en fonction des conditions de l'électrophorèse elles auront des vitesses de migration différentes, vont donc se séparer les une des autres et selon leur caractéristiques physico-chimiques, elles se matérialiseront sur l'électrophorégramme par des bandes de migration plus au moins distinctes (Anonyme 1).

Pour séparer les protéines en fonction de leur taille, on les expose à un traitement par le SDS Dodécylsulfate de sodium qui les recouvre de charge négative (-) de sorte qu'elles migrent vers la cathode (+) et qu'elle ne les sépare que sous l'effet de leur poids moléculaire.

2.4.1. Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide (PAGE)

Un gel de polyacrylamide est une matrice de séparation utilisée en électrophorèse de biomolécule comme les protéines, est une méthode très utilisée en biochimie pour analyse des protéines, pour visualiser différentes protéines séparées en bandes distinctes en fonction de leur poids moléculaire.

Les gels de polyacrylamide peuvent variés en composition, ils sont constitués d'acrylamide qui est l'unité de base qui forme les chaines et de bisacrylamide (N, N méthéline

–bisacrylamide) qui est l'agent pontage qui accroche les chaînes d'acrylamide entre elle en fonction des différents taux de ces deux substances on obtient différents maillages et donc différentes densités du gel (Anonyme 2).

La propriété de tamis des gels de polyacrylamide est liée à leur structure particulière, qui est celle d'un réseau tridimensionnel de fibre et de pores résultant du greffage d'unités de N, N-méthylène-bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) bi fonctionnels sur des chaînes de polyacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) adjacentes (Figure 09).

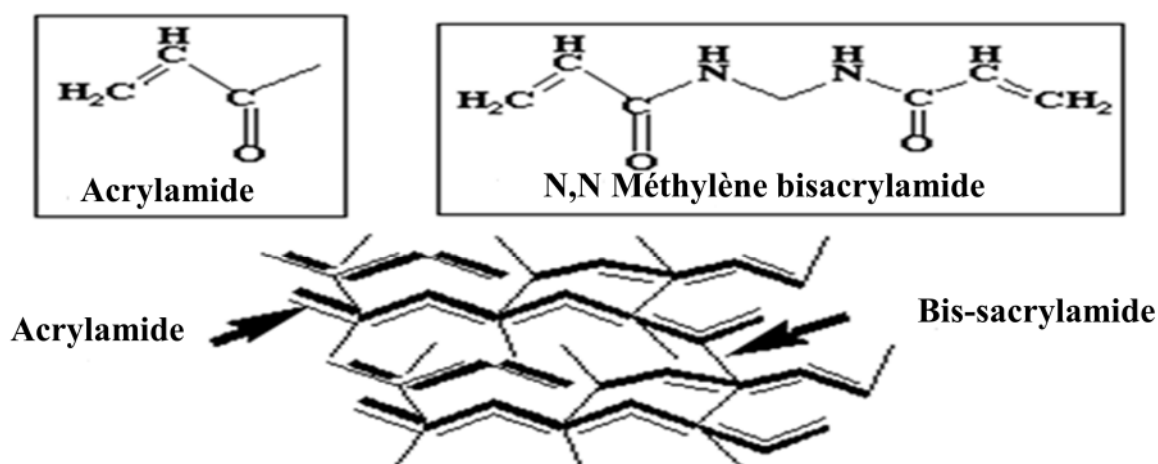


Figure 09: représentation schématique de la formation de réseau Acrylamide-Bisacrylamide (Jospord, 2006)

La réaction de polymérisation se fait grâce à l'ajoute de deux réactifs initiateurs, le Tétraméthyléthylènediaméne (TEMED) et le persulfate d'ammonium (peroxydisulfate d'ammonium ou encore APS). Ces deux réactifs en réagissant avec la lumière deviennent des anions hyper réactifs enclenchant la polymérisation.

Le TEMED est un composé chimique de la famille des diamines tertiaire, tandis que l'APS, dont la formule $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, est un oxydant fort et un amorceur radicalaire, qui produit des radicaux sous des conditions douces et entraîne ainsi des réactions de polymérisations radicalaires (Anonyme 3).

Cette méthode est la plus utilisée en raison des avantages offerts par les propriétés du gel qui sont la transparence, la reproductibilité élevée et une meilleure résolution liée à sa porosité, pour évaluer visuellement le poids moléculaire des protéines par rapport à celui des protéines connues.

2.4.2. Méthode d'électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS

2.4.2.1. Dénaturation des protéines

La dénaturation est un processus par lequel une macromolécule biologique, acide nucléique ou protéines, perd sa conformation tridimensionnelle normale : les protéines perdent leur repliement et se déplient (Pierre kamoun *et al.*, 1997).

Le pH isoélectrique des protéines épидидymaire

Les protéines épидидymaire sont soumises à un pré traitement dénaturant pendant 5 min à 95 C° après addition d'un tampon de dénaturation (annexe 03). L'agent dénaturant est un mélange de Dodécylsulfate de sodium (SDS) et de β -mercaptoethanol.

2.4.2.1.1. Dodécylsulfate de sodium 2 % (SDS) (C₁₂H₂₅NaO₄S)

C'est un détergent et tensioactif ionique fort qui forme des interactions hydrophobes avec la chaîne peptidique de la protéine et se fixe via sa longue chaîne hydrocarbonée, à raison d'environ une molécule de SDS pour deux acides aminés, les charges négatives des groupements sulfate du SDS masquent les quelques charges portées par la protéine, pour avoir un complexe dont la charge totale est approximativement proportionnelle à la longueur de la chaîne peptidique et donc la force électrostatique qui s'exerce lors de la migration en présence de SDS devient proportionnelle à la taille de la protéine (Pierre kamoun *et al.*, 1997).

Ainsi le SDS en s'associant à la chaîne protéique détruit le repliement tridimensionnel et rompt également toutes les interactions non-covalentes avec d'autres protéines.

2.4.2.1.2. β -mercaptoethanol 5%

C'est un composé chimique dont la formule est HOCH₂CH₂SH, la présence de la fonction thiol-SH fait du 2-mercaptoethanol un réducteur très utilisée en biochimie pour protéger les protéines contre l'oxydation, il est également employé pour réduire les ponts disulfures présents dans les protéines.

Le β -mercaptoethanol exerce une action dénaturante sur les protéines oligomérique en rompant les ponts disulfure ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle et les rendre monomérique (Pierre kamoun *et al.*, 1997).

2.4.2.2. Préparation des gels

Les gels utilisés pour séparer les protéines par électrophorèse sont en général discontinus, ils sont composés d'un gel de focalisation ou concentration et d'un gel de séparation. Cette méthode permet d'avoir des bandes de protéines bien focalisées et donc bien résolues.

Le gel de concentration permet au préalable de concentrer l'échantillon, avant qu'il ne s'introduise dans le gel de séparation. Ce dernier permet la résolution des échantillons tout au long de leur migration.

2.4.2.2. Préparation des tampons des gels

Les tampons utilisés pour les gels de concentration et de séparation, sont différents, avec des pH très spécifiques. Le PH dans le gel de concentration est légèrement acide (pH 6,8) (Annexe 05), tandis que celui du gel de séparation est basique (pH 8,8) (Annexe 04).

Dans le tampon de charge ou de migration (Annexe 06), la glycine qui joue le rôle d'anion est fortement chargée avec un pH 8,3, ce qui permet une migration rapide et la séparation ultérieure des protéines en fonction de la taille.

La matrice de chacune des deux parties du gel est créée par la copolymérisation d'acrylamide, de bis-acrylamide, le TEMED et le persulfate d'ammonium.

Le TEMED et le persulfate d'ammonium sont aussi des catalyseurs de réaction, en fournissant des radicaux libres qui vont déclencher la polymérisation radicalaire.

Tandis que la concentration d'acrylamide et de bis-acrylamide détermine la grosseur des pores formés. Le gel de séparation est assez concentré en acrylamide (12,5%), plus la concentration est élevée, plus les pores seront petits et les molécules les mieux séparées seront celles de faible poids moléculaire.

Le gel de focalisation est lui peu concentré en acrylamides (5%), son rôle étant seulement de permettre de concentrer l'échantillon en une bande focalisée avant la séparation.

Le SDS est incorporé à des concentrations différentes dans les tampons des gels et le tampon de migration, pour obtenir une concentration constante de SDS et donc maintenir les conditions de dénaturation et de charge des protéines analysées. Ceci permet la migration des protéines dans la matrice à l'aide d'un courant électrique de l'anode (-) vers la cathode (+) et la séparation des protéines s'effectue uniquement en fonction de leur poids moléculaire (Anonyme 4).

2.4.2.3. Mise en place des gels

Les deux gels, gel de séparation et de concentration, sont préparés en mélangeant les solutions d'acrylamide et de bisacrylamide avec une solution tampon, puis additionné des agents initiateurs (persulfate d'ammonium et le TEMED). Le gel de séparation est coulé en premier entre les deux plaques (en verre et alumine) séparées par des espaceurs, puis le gel de concentration pour concentrer les protéines et permettre une entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation et enfin des pistes individuelles sont réalisées par l'utilisation d'un

peigne qui sépare le gel en portion égales (puits) destinées à la migration de chaque échantillon (Figure 11).

Les échantillons ainsi préparé sont déposer a raison de 10 à 20 μ l dans chaque puits après avoir monté l'unité d'électrophorèse les 2 plaques renferment le gel et remplis la cuve de tampon d'électrode, l'unité est alors sous tension, courant et voltage constant (300mA/130V) (Figure 11).

Nous avons utilisés comme marqueurs de poids moléculaire la BSA ce qui nous à permis de faire une courbe étalon et de calculer de ce fait le poids moléculaire de nos échantillons, selon l'équation $Y = -1,599x + 1,845$ avec $R^2 = 0,949$

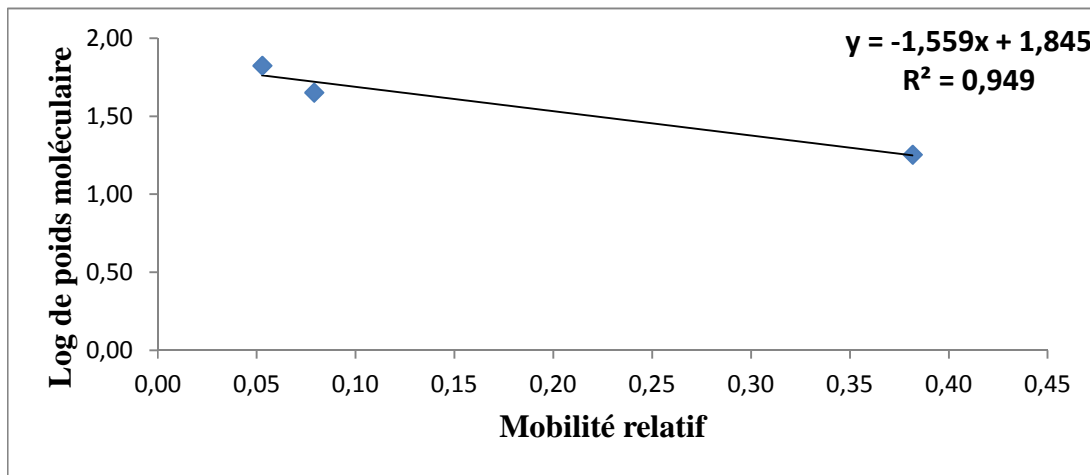


Figure 10 : Courbe étalonnage de marqueur de poids moléculaire réalisé par la BSA

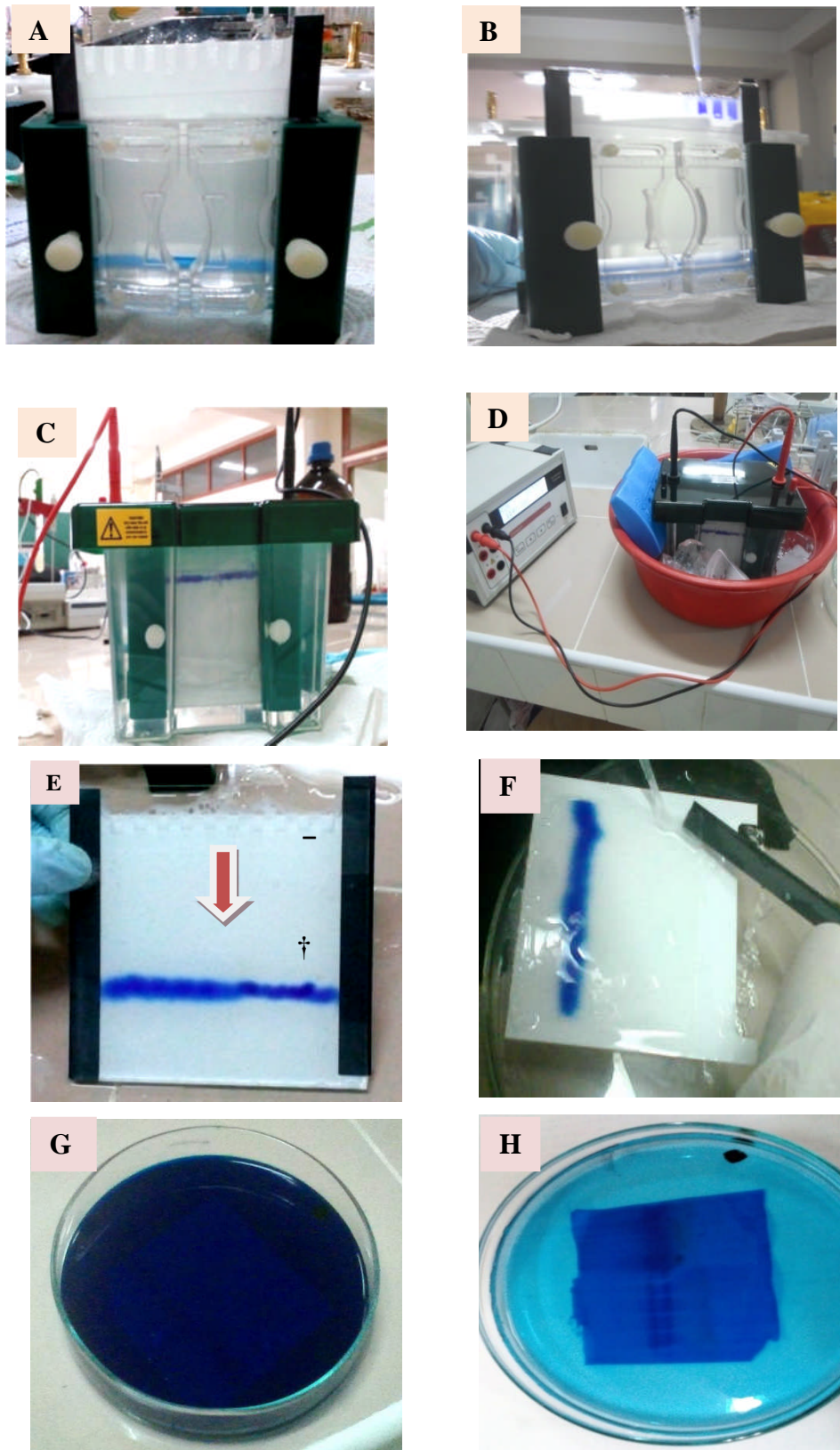


Figure 11: Etapes de l'électrophorèse ; A-Préparation de gel et formation des puis, B- Dépôt des échantillons, CD- La mise de gel dans la cuve et lancement de l'électrophorèse, EF-Fin de migration et récupération de gel, G- Coloration de gel, H-Décoloration de gel (original.2017).

2.4.3. Révélation des bandes de migration électrophorétique

A la fin de migration, le gel est démoulé pour subir les opérations successives qui sont la coloration et la décoloration.

2.4.3.1. Coloration et fixation

Le gel est immergé 10 à 30 min dans une solution de coloration contenant l'acide acétique glacial pour la fixation des protéines et de bleu de comassie 0.2 % (p/v) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée, méthanol, acide acétique glacial afin de colorer le front de migration (Figure 11) (Annexe 07).

2.4.3.2. Décoloration

La décoloration est réalisée par immersion du gel dans le mélange eau distillée /méthanol/acide acétique pendant 10 à 30 minutes, elle permet de visualiser les bandes de migration correspondant aux niveaux de migration des protéines (Figure 11) (annexe 08).

3. Etude statistique

Le traitement statistique des données et les présentations graphiques des résultats ont été réalisés sous Microsoft Office Excel 2007.

La moyenne arithmétique « X » des valeurs individuelles est calculée pour chaque série et pour la concentration en protéines ; elle est suivie par la valeur de l'erreur standard à la moyenne « ESM » qui constitue l'intervalle de confiance de celui-ci.

La validité statistique des différences entre les moyennes est évaluée d'après le test d'ANOVA réalisés à l'aide d'un logiciel informatique « OriginLab » et la valeur des probabilités « p » :

- ✓ Si $P < 0.001$: La différence est hautement significative=****
- ✓ Si $P < 0.01$: La différence est très significative=***
- ✓ Si $P < 0.02$: La différence est significative=**
- ✓ Si $P < 0.05$: La différence est peu significative=*
- ✓ Si $P > 0.05$: La différence est non significative

4. Analyse des gels électrophorétique

Pour déterminer le volume et la densité des protéines au niveau des bandes de migration, on utilise le logiciel Bio-Rad ou Quantity One 1-D analysis software.

Chapitre III :
Résultats et
Discussions

Les résultats rapportés dans ce chapitre concernent l'évaluation de la concentration protéique de l'homogénat épидидymaire et leur profile électrophorétique chez des lapins appartenant à deux populations, population Blanche et Souche Synthétique durant leur développement postnatal.

1. Résultats

1.1. Poids vif des lapins et de l'épididyme

1.1.1. Lapins de la population blanche

Le poids vif et épидидymaire de cette population montrent une évolution progressive en fonction de l'âge allant de 4 à 28 semaines d'âge, avec les valeurs respective de 671,67g et de 3453,33g de poids vif et de 0,13g à 1,67g pour l'épididyme (Tableau 03).

Tableau III : Poids moyen vif et épидидymaire des lapins de la population blanche aux différents âges.

	Infantile		Prépubère		Pubère	Adulte
	4 S	8 S	12 S	16 S	24 S	28 S
poids vif Moyenne (g)	671,67	1569,33 (****)	2118,33	2326,67	2581,33	3453,33 (**)
E.S.M	55,49	136,90	111,37	166,37	270,13	102,31
P	ns	P<0.001	ns	ns	ns	P<0.02
Poids épидидymaire Moyenne(g)	0,13	0,36	0,73	0,88	1,43	1,67
ESM	0,03	0,07	0,10	0,12	0,26	0,00

- S : semaine
- (*) : Comparaison des valeurs par rapport à la valeur précédente

1.1.2. Lapins de la souche synthétique

L'évolution pondérale corporel et épидидymaire de la souche synthétique montre une augmentation progressive, allant de la valeur 1316,67g à 4 semaines à la valeur 3050 g à 16 semaines et de la valeur 0,19g à 4 semaines à la valeur 0,94 g à 16 semaines d'âge (Tableau 04).

Tableau IV: Poids moyen vif et épидидymaire des lapins de la souche synthétique aux différents âges.

	Infantile		Prépubère	
	4 S	8 S	12 S	16 S
Poids vif Moyenne (g)	1316 ,67	2015 (****)	2140	3050 (*)
E.S.M	75,61	107,29	124	154,11
P	ns	P<0.001	ns	P<0.05
Poids épididymaire Moyenne(g)	0,16	0,54 (*)	0,75	0,89
ESM	0,005	0,13	0,06	0,5
P	ns	P<0.05	ns	ns

- S : semaine.
- (*) : Comparaison des valeurs par rapport à la valeur précédente.

1.2. Dosage des protéines

Les concentrations en protéines de l'homogénat épидидymaire des lapins de la population blanche âgés de 4, 8, 12, 16,24 et 28 semaines, et celle de la souche Synthétique âgé de 4, 8, 12 et 16 semaines sont représenté dans la figure 12.

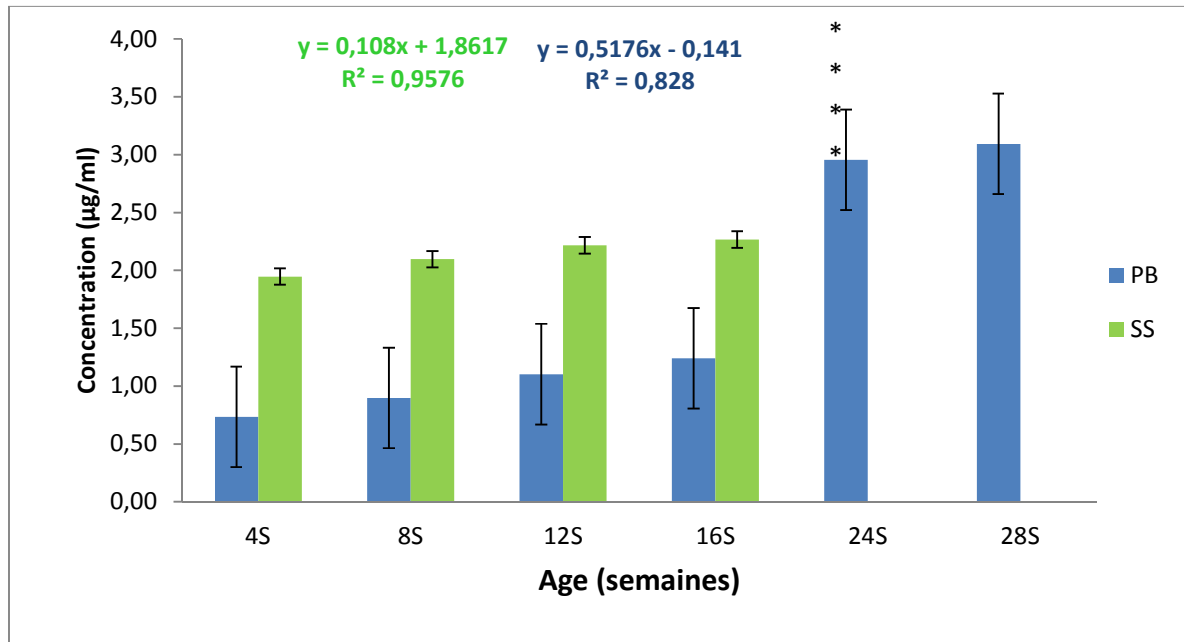


Figure12 : Evolution de la concentration protéique de l'homogénat épидидymaire durant le développement postnatal des lapins de la population Blanche et de la souche Synthétique.

PB : population blanche ; SS : souche synthétique ; (*) : Différence significative par rapport à la valeur précédente chez la PB

La concentration moyenne des protéines dans l'homogénat épидидymaire des lapins de la population blanche augmente progressivement selon l'âge passant de la valeur 0,73 µg/ml (à 4 semaines d'âge) à la valeur de 3,09 µg/ml (à 28 semaines d'âge), néanmoins cette augmentation est exponentielle entre 16 et 24 semaines d'âge avec un pourcentage d'augmentation de 138%.

Cette augmentation de la concentration en protéine épидидymaire est hautement significative ($p < 0,001$) entre 16 et 24 semaines d'âge. Cependant Chez les lapins de la souche synthétique la concentration en protéines épидидymaire moyenne augmente progressivement de 4 semaines à 16 semaines d'âges, passant de la valeur 1,95 µg/ml à la valeur 2,27 µg/ml.

La comparaison de l'évolution de la concentration en protéines de l'homogénat épидидymaire entre les deux populations, population blanche et souche synthétique, a montré des concentrations plus élevée chez la souche synthétique dès le début de l'expérimentation (4 semaines) jusqu'à 16 semaines d'âges (fin de l'expérimentation de la souche synthétique) avec un écart entre 1,03 µg/ml et 1,21 µg/ml.

1.3. Séparation des protéines épидидymaire par électrophorèse

L'électrophorèse des protéines épидидymaire des lapins de la population blanche et de la souche synthétique révèle l'apparition de plusieurs bandes de migration correspondant à des protéines de différents poids moléculaire.

1.3.1. Indication sur le marqueur de poids moléculaire utilisé

A défaut de disponibilité d'un marqueur standard de poids moléculaire des protéines au sein de notre faculté, nous avons utilisé un profil de protéines de poids moléculaire connus réalisé au laboratoire de biochimie de la faculté.

Ce marqueur nous permet de lire relativement les poids moléculaires des protéines obtenus sur notre gel.

Le profile électrophorétique de migration obtenu, pour ces protéines montre l'apparition de 4 bandes, chaque bande correspond à une protéine à poids moléculaire connus, la protéine de 67 kDa correspond à la protéine BSA, celle de 45 kDa à la protéine ovalbumine, celle de 23kDa à la chymotripcinogène, et celle de 18kDa à la protéine β -lactoglobuline. Ce qui nous permet d'identifié et déterminer le poids moléculaire des protéines constituant l'homogénat de l'épididyme des deux populations.

1.3.2. Lapins de la population blanche

Les profiles électrophorétique obtenus à partir de gel de polyacrylamide en SDS-PAGE, chez les lapins de la population blanche (âgée de 4 à 28 semaines) et celui de mélange de protéines à poids moléculaire connus qui jouent le rôle de marqueur de poids moléculaire, sont représentés dans la figure 13.

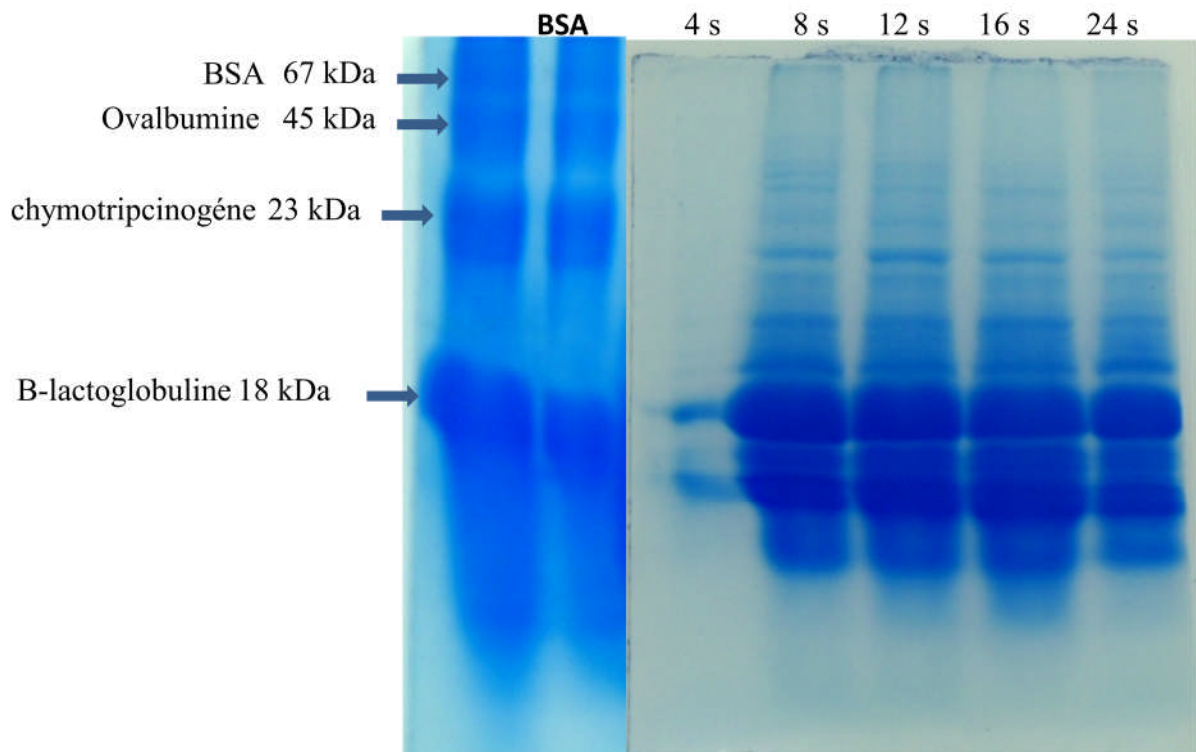


Figure 13 : Analyse électrophorétique monodimensionnelle (SDS-PAGE) des protéines épидидymaire des lapins de la population blanche à différents âges (original. 2017).

PB : population Blanche ;S : semaines.

A 4 semaines nous avons observé après la lecture du gel et à l'oeil nu l'apparition de 3 bandes de migrations bien visible et quelques bandes moins visible, alors que à partir de 8 semaines d'âge on remarque une forte augmentation de nombre des bandes de migration avec 11 bandes, ce même profil électrophorétique est aussi observé chez les lapins âgés de 12 semaines, à partir de 16 semaines le nombre de bandes augmente en fonction de l'âge allant de 12 bandes à 16 bandes à 24 semaines.

Nous avons constaté que non seulement le nombre des bandes de migration varie d'un âge à un autre mais aussi que certaines bandes de migration ne sont pas communes entre les âges.

1.3.3. Lapins de la souche synthétique

Les profils électrophorétique des protéines épидidymaire des lapins de la souche synthétique, âgés de 4 à 16 semaines, et celui de la BSA qui jouent le rôle de marqueur de poids moléculaire, sont représentés dans la figure 14.

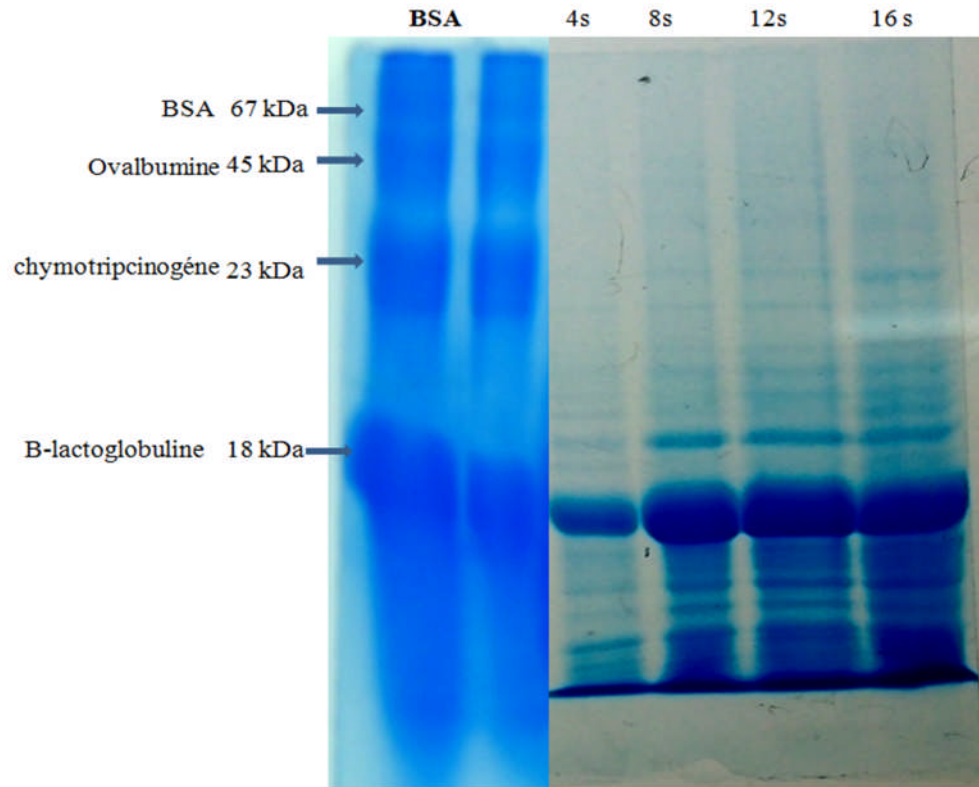


Figure 14 : Analyse électrophorétique monodimensionnelle (SDS-PAGE) des protéines épидidymaire des lapins de la Souche Synthétique à différents âges (original. 2017).

S : semaine

Nous avons remarquée l'augmentation de l'apparition des bandes de migration en fonction de l'âge. 13 bandes de migration sont bien visible à 16 semaines tandis que seule 9 bandes sont révélés à 4 semaines, cette augmentation est progressive durant tout le développement postnatal.

Ainsi nous avons constaté que non seulement le nombre des bandes de migration varie d'un âge à un autre, mais aussi que certaines bandes de migration ne sont pas communes entre les âges tel que à 4 semaines le nombre de bande de migration est faible tandis que à 16 semaines est supérieure.

L'ensemble des profils électrophorétique nous permettent de détecter un nombre plus important des bandes de migration, mais seulement sous la forme de traces, ceci peut être dû à la sensibilité de la technique, les conditions de migration et la concentration de ces protéines dans l'échantillon.

Ceci étant, les différences du nombre de bandes de migration entre les différents âges seraient due à l'expression des classes et /ou des types de protéines présentes, à cet instant, dans l'épididyme la longueur des bandes de migration observé n'est pas toujours la même pour les protéines de même poids moléculaire ce qui témoigne de la régulation de l'expression de spécieux protéique particulières au cours de l'âge (développement postnatal).

1.3.4. Comparaison entre les deux populations

La comparaison entre les profils électrophorétique des épididymes chez les lapins de la population blanche et la souche synthétique révèle une différence dans le nombre des bandes de migration ainsi leur emplacement durant toute l'expérimentation (Figure 15).

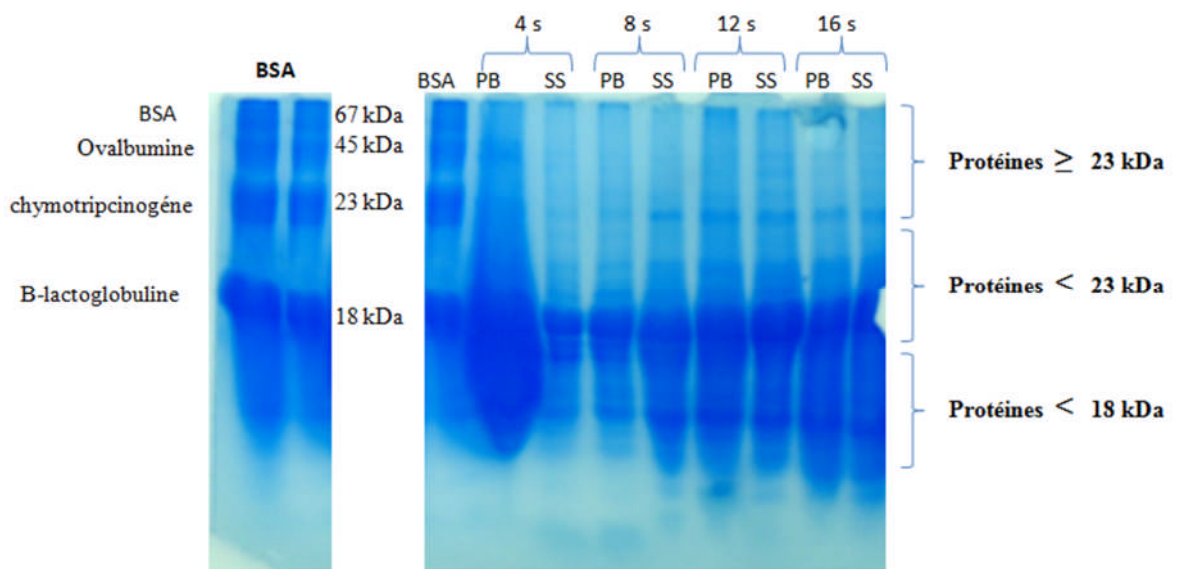


Figure 15: Analyse comparative électrophorétique monodimensionnelle (SDS-PAGE) des protéines épididymaire des lapins de la population Blanche et de la souche synthétique à différents âges. (Original. 2017).

PB ; population Blanche, SS : souche synthétique ; S : semaine ; BSA : sérum albumine bovin

1.4. Poids moléculaire des bandes de migration des protéines épидидymaire

L'électrophorèse des marqueurs de poids moléculaire, dont les poids moléculaire des 4 bandes obtenus lors de la migration sont connus, nous a permis de déterminer le poids moléculaire de bandes de migration de nos échantillons grâce à l'équation $Y = -1,599x + 1,845$ avec $R^2 = 0,949$.

1.4.1. Population blanche

Le profile électrophorétique de l'homogénat de l'épididymes de la population blanche agée de 4 semaines montre l'apparition de bandes de migrations dont le poids moléculaire varie entre 15 et 50 kDa tandis que à 8,12,et 24 semaines le poids moléculaire des bandes de migration des protéines varie entre 11 et 31 kDa, neanmoins à 24 semaines d'age une nouvelles bande de migration apparait avec un poids moléculaire de 66 kDa.

Certains bandes de migration des protéines sont présentes durant tous le developpement postnatal tel que la bande de migration au poids moléculaire de 31 k Da.

1.4.2. Souche synthétique

Le profile électrophorétique de l'homogénat des épидидymes des lapins de la souche synthétique montre l'apparition de plusieurs bandes de migratio dont le poids moléculaire varie entre 11 et 45 kDa à 4 semaines d'age, entre 10 et 31kDa à 8 semaines d'age, et entre 10 et 66 kDa à 12 et 16 semaines d'age.

1.4.3. Comparaison entre les deux populations

La comparaison des profiles électrophorétique de l'homogénat des épидидymes des lapins de la population blanche et la souches synthétique revele que des bandes de migration à un poids moléculaire donné comme la protéine de 31 kDa, sont présentent chez les deux populations aux différentes âge à l'exception de l'âge de 4 semaines ou elle sont absentes chez la population blanche, tandis que des protéines dont le poids moléculaire 66 kDa et 50 kDa qui apparaissent à 24 et 28 semaines d'age dans les epидидymes des lapins de la population blanches sont retrouvés précocement chez les lapin de la souches synthétique à 12 semaines d'age .

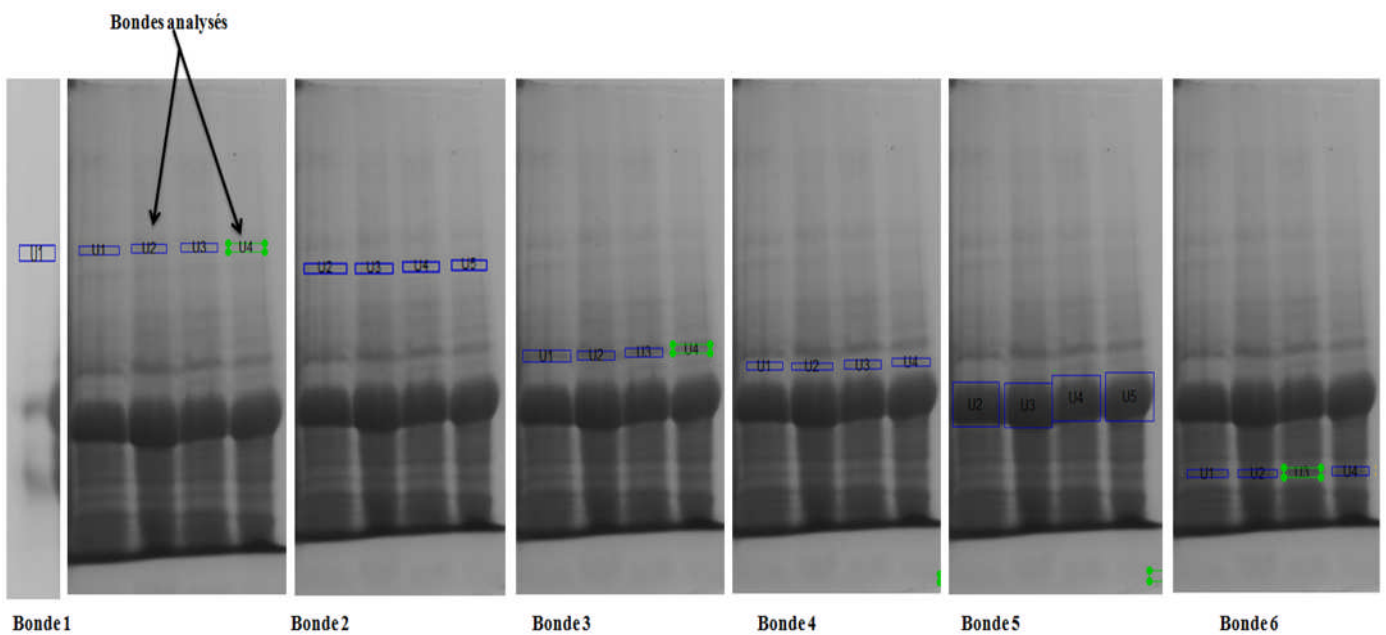
Ainsi d'autre protéines de poids moléculaire 11,19,et 31 kDa qui apparaissent à 8 semaines d'age chez la population blanche sont retrouvés précocement chez les lapins de la souche synthétique à 4 semaines d'age.

1.5. Analyse semi-quantitative des protéines epидидymaire

Afin de mesuré le volume et la densité des bandes de migration des protéines épидидymaire des lapins de la population blanches et la souche synthétique obtenus à partir des

profils électrophorétique lors de notre électrophorèse, nous avons sélectionné les bandes les plus visibles, 6 bandes de migration pour les lapins de la population blanche et 7 bandes de migration pour les lapins de la souche synthétique, et soumis ensuite à une analyse par le logiciel Bio-Rad (Figure 16 et 17). Ce dernier permet de faire une quantification des protéines (mésure semi-quantitatives) en mesurant la densité des bandes de migration de gel d'électrophorèse.

Les bandes de migration 3 et 3' des épидидymes des lapins de la population blanches et de la souches synthétique sont de poids moléculaire différent, déplacement électrophorétique différent, tandis que la bande de migration 7 existe chez les deux population, neanmoins elle n'est



pas reconnaissable (peu visible) par le logiciel chez les lapins de la population blanche, donc cette bande est présent mais de très faible quantité d'où la possibilité de faire la différences entre ces bandes.

Figure 16 : Localisation des bandes de migrations des protéines épидидymaire des lapins de la population blanche analysée par le logiciel Bio-Red (original. 2017).

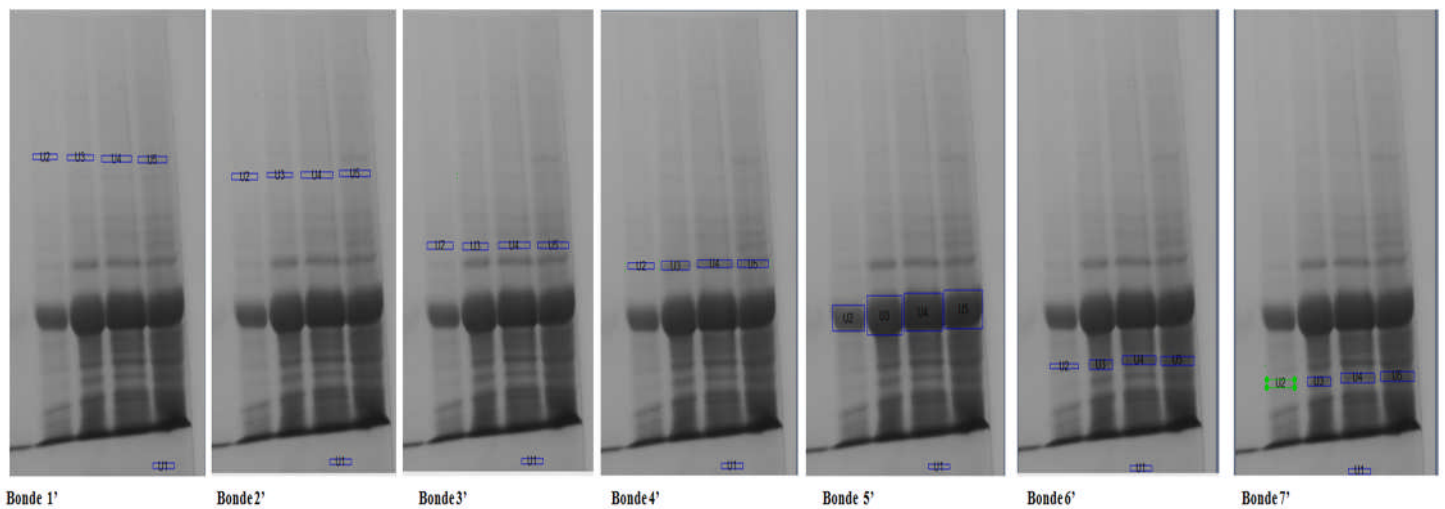


Figure 17 : Localisation des bandes de migrations des protéines épидидymaire des lapins de la souche synthétique analysée par le logiciel Bio-Red (original. 2017).

1.3.1. Population blanche

L'analyse densitométrique des profils électrophorétique des épидидymes des lapins de la population blanche est représenté dans la figure (18).

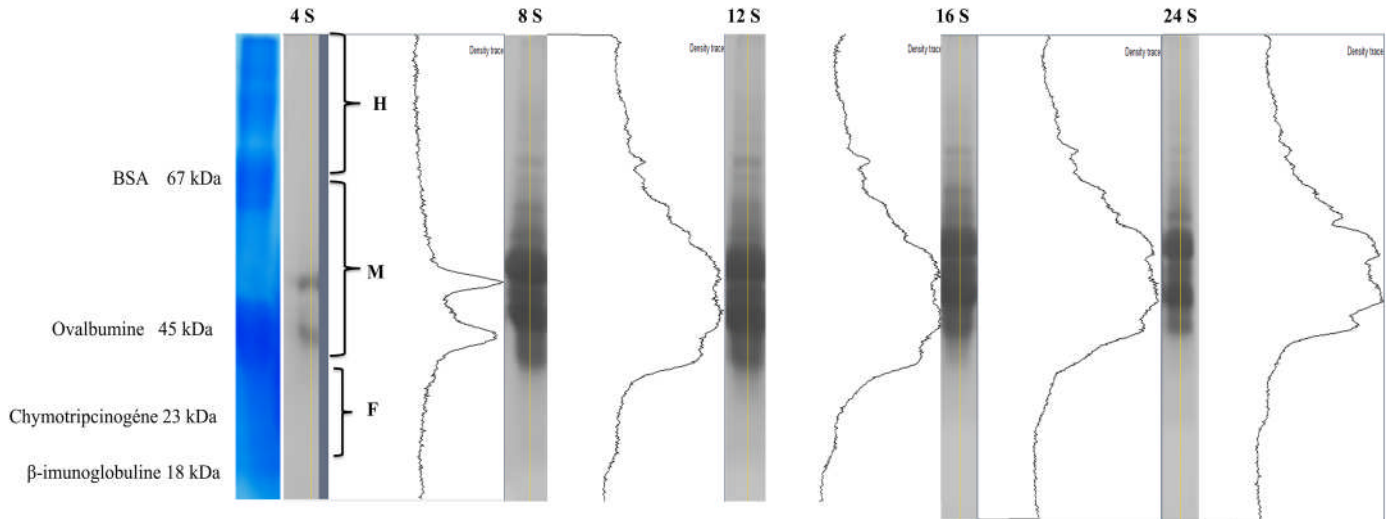


Figure 18: A- Analyse électrophorétique monodimensionnelle (SDS-PAGE) des protéines épидидymaire des lapins de la population blanche à différents âges. B- Analyse densitométrique des profils électrophorétique de l'épididyme des lapins à différents âges.

H : Haut poids moléculaire ; **M** : Moyen poids moléculaire ; **F** : Faible poids moléculaire ; **S** : semaine

D'après l'analyse semi-quantitative des protéines épидидymaire des lapins de la population blanche en mesurant la densité des bandes de migration, on a constaté l'augmentation de densité des protéines en fonction de l'âge avec l'apparition des zones de forte concentration des protéines de poids moléculaire moyenne comprise, entre 40 et 67 kDa, ainsi des protéines de faible poids moléculaire à < 40 kDa au début de développement, tandis que des concentrations faibles en protéines de haut poids moléculaire est observé durant tout le développement postnatal.

Les densités des bandes de migration des protéines épидидymaire des lapins de la population blanche marquent des variations dans l'apparition d'une bande à l'autre, en fonction de l'âge.

La figure 19 est une représentation graphique de la densité des protéines épидидymaires des lapins de la population blanche relevées sur les bandes les plus représentatives sur nos gels.

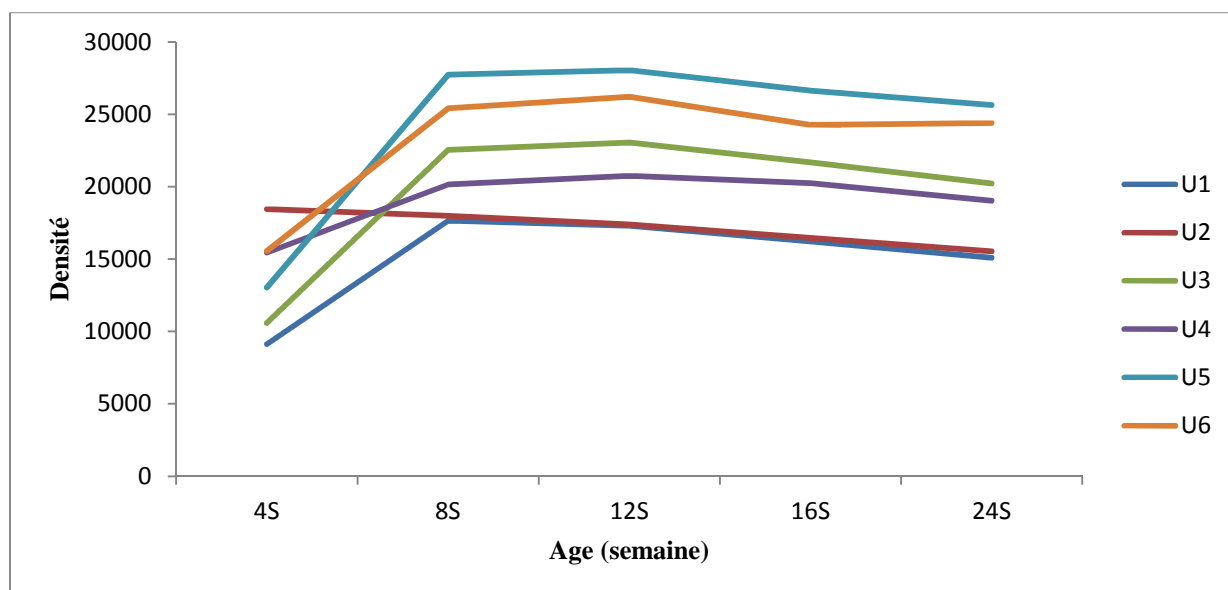


Figure 19 : Evolution de la densité des bandes de migrations des lapins de la population blanche âgés de 4 à 24 semaines mesurées par le logiciel Bio-Rad.

D'après les résultats nous avons remarqué que la densité de la bande U1 augmente de 4 à 8 semaines puis diminue progressivement de 8 à 24 semaines d'âge. Ainsi la densité de la bande U2 diminue progressivement de 4 à 24 semaines. Cependant, la densité de la bande U3 augmente de 4 à 12 semaines et diminue progressivement de 12 à 24 semaines.

La densité des bandes U4 et U6 augmente de 4 à 12 semaines puis diminue progressivement jusqu'aux 24 semaines. Alors que celle de U5 augmente de 4 à 12 semaines puis diminue de 12 à 16 semaines pour augmenter de 16 à 24 semaines d'âge.

1.5.2. Souche synthétique

Les résultats de l'analyse densitométrique des profils électrophorétiques des protéines épидидymaires des lapins de la souche synthétique sont représentés dans la figure (20).

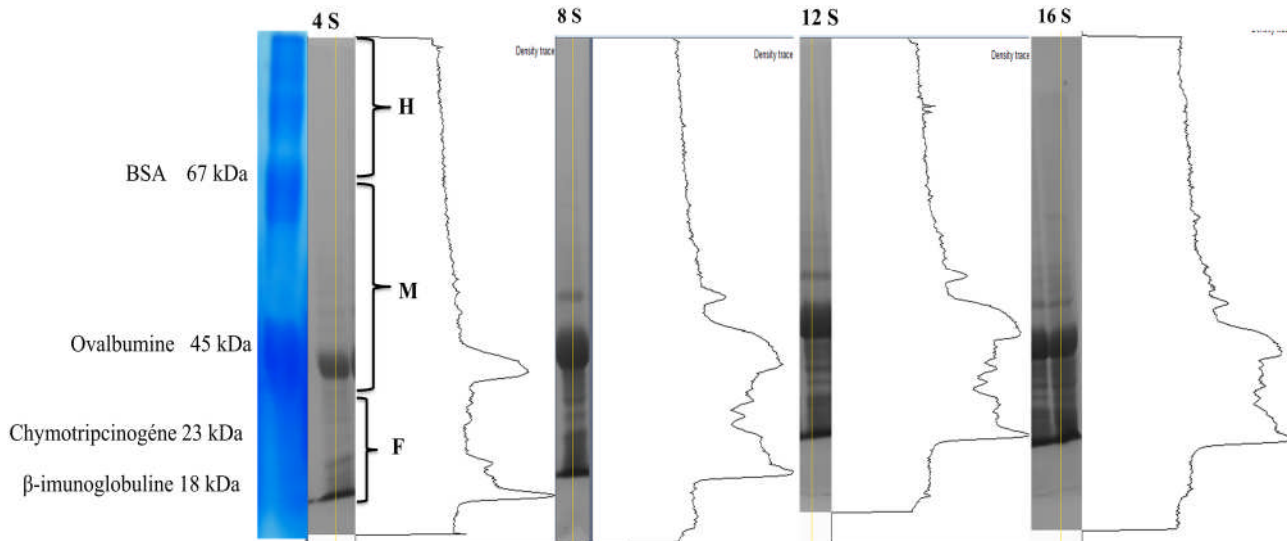


Figure 20: A- Analyse électrophorétique monodimensionnelle (SDS-PAGE) des protéines épидидymaire des lapins de la souche synthétique à différents âges. B- Analyse densitométrique des profils électrophorétique de l'épididyme des lapins à différents âges.

H : haut poids moléculaire ; **M :** moyenne poids moléculaire ; **F :** faible poids moléculaire **S :**

A partir de l'analyse semi-quantitative des protéines épидидymaires des lapins de la souche synthétique, nous avons constaté, en mesurant la densité des bandes de migration, l'augmentation de densité des protéines durant tout le développement postnatal, avec l'apparition des zones des protéines de faible concentration au niveau des hauts poids moléculaires qui augmente à 12 semaines.

On observe aussi des zones des protéines de forte concentration de poids moléculaire moyenne comprise entre 40 et 67 kDa et des protéines de faible poids moléculaire de < 40 kDa qui persiste de début jusqu'à la fin de développement postnatal

Les densités des bandes de migration des protéines épидидymaires des lapins de la souche synthétique montre des variations exprimées par l'apparition de bandes d'intensités différentes

en fonction de l'âge traduisant de faibles concentrations en protéine au début de développement et une forte concentration à la fin de développement.

La figure 21 est une représentation graphique de la densité des protéines épидидymaires des lapins de la souche synthétique relevées sur les bandes les plus représentatives sur nos gels.

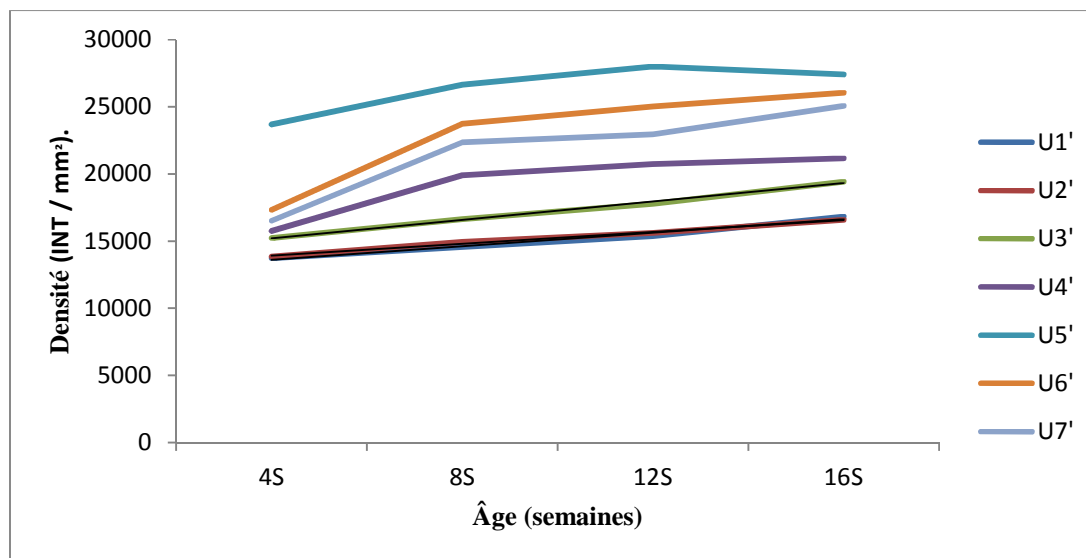


Figure 21 : Evolution de la densité des bandes de migrations des lapins de la Souche synthétique âgés de 4 à 16 semaines mesurées par le logiciel Bio-Rad

D'après ces résultats, nous avons constaté que la densité des bandes **U1'**, **U2'**, **U3'**, **U4'**, **U6'** et **U7'**, augmente progressivement durant tout le développement postnatal de 4 à 16 semaines d'âge. Tandis que la densité de la bande **U5'** augmente de 4 à 12 semaines puis diminue à 16 semaines.

1.5.3. Comparaison entre les deux populations

La figure 22 est une représentation graphique comparative de la densité des protéines épидидymaires des lapins des deux populations durant le développement postnatal relevées sur les bandes les plus représentatives sur nos gels.

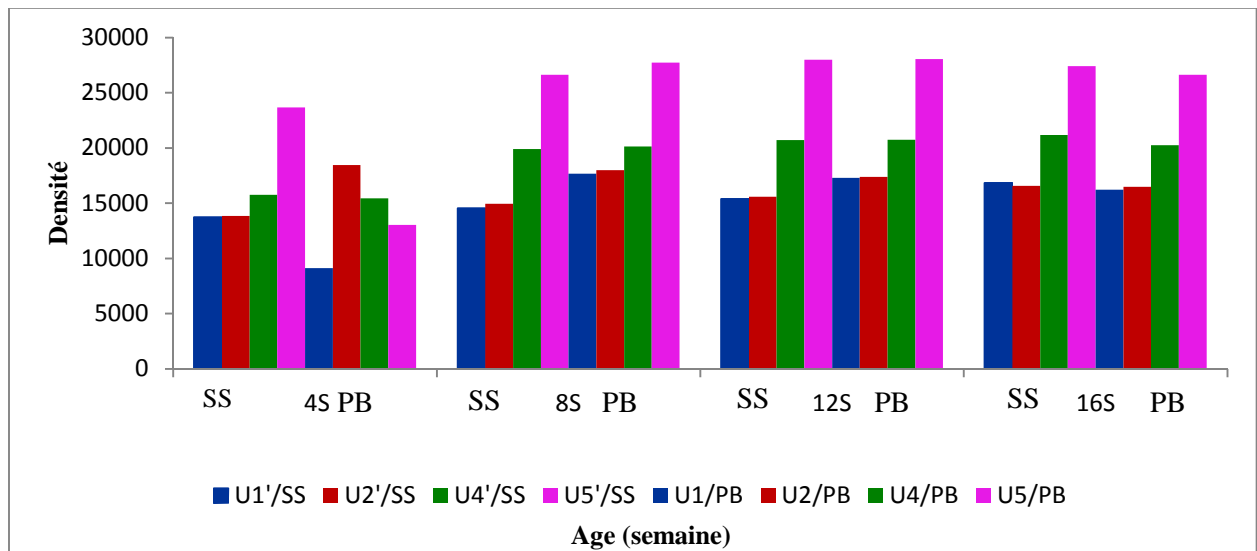


Figure 22 : comparaison de la densité des bandes de migration des protéines épididymaire chez les deux populations.

SS : souche synthétique ;PB :population blanche ; U :bande

La comparaison du profiles électrophorétiques et densimétriques des protéines épididymaires révèlent des variations qualitatives et quantitatives de l'accumulation des protéines chez les lapins des deux souches durant le développement postnatal.

La comparaison des densités des bandes de migrations des protéines épididymaires obtenues à partir des analyses densitométriques entre les lapins de la population blanche et la souche synthétique révèle que les bandes de migration 3et 3' observées dans les gels de la population blanche et de la souche synthétique sont respectivement spécifique à la population concernée, tandis que la bande 7 est peu visible dans le gel de la population blanche alors qu'elle est mesurable chez la souche synthétique .

Les valeurs des densités des bandes de migration des protéines épididymaires sont significativement plus élevées chez les lapins de la souche synthétique par rapport à la population blanche à tous les âges.

La différence des profiles densitométriques met en évidence l'existence d'une régulation de l'expression des protéines épididymaire en fonction de l'âge

2. Discussions

2.1. Poids corporels et poids d'épididymes

Dans nos résultats les moyennes des poids corporels et épидидymaire des lapins de la population blanche et la souche synthétique évolue de manière progressive durant tout le développement postnatal, cette croissance suit une courbe de type sigmoïdale, nos résultats corrobore avec ceux obtenus chez la même espèce par plusieurs auteurs (Garcia-Tomas *et al.*, 2007; Garcia-Tomas *et al.*, 2009 et Viguera-Villasenor *et al.*, 2013).

D'après nos observations, la vitesse de croissance de poids corporels des lapins et des épидидymes de la souche synthétique sont nettement supérieurs à ceux des lapins de la population blanche, cette différence peut être expliquée par le patrimoine génétique améliorée de la souche synthétique afin d'améliorer les performances de développement de testicule et de l'épididyme et qui sont plus intéressantes (Allab et Yamina, 2016).

Selon Iczkowski *et al.* (1991), l'augmentation du poids épидидymaire est probablement liée à la prolifération cellulaire due à une importante augmentation des niveaux de testostérone plasmatique entre 4 et 8 semaines d'âge qui a une action directe dans le maintien de la morphologie des cellules principales et dans l'inhibition de l'apoptose (Fan et Robaire, 1998).

Selon Piles *et al.* (2003), la croissance est un caractère extrêmement variable en fonction des facteurs génétiques, alimentaire et/ou environnementaux. Ce qui est en accord avec nos observations.

Abo-El-Ezz *et al.*, (1984) rapportent que plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de la vitesse de croissance des lapins, tels que la température, la diminution de la consommation alimentaire, la déshydratation des animaux et le catabolisme des tissus.

Ouhayoun (1976) et Blasco (1993) soulignent que la vitesse de croissance passe par un maximum à l'âge de 5-7 ou 8 semaines, puis elle ralentit progressivement, notamment après 11 semaines d'âge, en présentant une allure en dents de scie. La vitesse de croissance tend ensuite vers zéro à partir de l'âge de 6 mois.

La régulation du poids corporel et épидидymaire est aussi sous le contrôle hypothalamique en régulant la prise alimentaire, la satiété et la thermogénèse via des neuropeptides catabolique tels que le TRH et le CRH ou anabolique tel que le NPY, peptide orexigénique majeur, qui est inhibé par la leptine qui est une hormone tripeptidique dérivée des adipocytes (Karydis *et al.*, 1998 ; Richard *et al.*, 2004 in Djediat, 2005).

2.2. Dosage des protéines et profils électrophorétique

De plus, à partir des résultats obtenus par les dosages des protéines épидидymaire des deux populations de lapin, population blanche et souche synthétique, montre l'augmentation progressive de la concentration des protéines dans l'homogénat épидидymaire en fonction de l'âge, avec des valeurs de concentration faible au début de l'expérimentation et fort a la fin de développement.

Les profils électrophorétique et densimétrique des protéines, révèlent des variations qualitatives et quantitatives de l'accumulation des protéines chez lapins des deux souches durant toute le développement postnatal.

Tandis que les profils électrophorétique de nos échantillon des deux populations révèle l'apparition de plusieurs protéines, dont le poids moléculaire varie entre 10 et 66 kDa avec quelque protéines qui persiste durant tout le développement postnatal.

Selon Lakabi *et al.*, (2017), les cellules principales du l'épididyme des lapins de la population blanche âgées de 4 à 12 semaines sont caractérisées par de faibles caractères morphofonctionnels, c'est-à-dire : hauteur cellulaire (hcp), zone supranucléaire (zsn), et d'une proportion élevée du rapport (N/hcp). A partir de 14 semaines, ces cellules acquièrent des caractères morphométriques marqués par des valeurs élevées de hcp et zsn et de faibles valeurs du N/hcp. Ceci est évocateur d'une différenciation physiologique indiquant la mise en place de l'acquisition de la polarité cellulaire et du développement du caractère sécrétoire et/ou absorbif. Le rapport N/hcp élevé marquant les individus à bas âge, c'est-à-dire entre 4 et 12 semaines pourrait être un indicateur de l'existence des divisions cellulaires.

A la naissance, l'épididyme est un organe immature, constitué de cellules épithéliales indifférencies. C'est lors du développement post-natal que l'épididyme devient un organe mature, différencié et fonctionnel (Sun *et al.*, 1979).

La période de différenciation de l'épididyme est cruciale, ce n'est qu'après cette étape, que l'épididyme est un organe mature, fonctionnel et prêt à accueillir la première vague de spermatozoïdes arrivant du testicule au jour 44 chez le rat (Herms *et al.*, 1992).

Plusieurs protéines subissant des modulation ont été observées chez le rat Wistar au cours de développement (Umar *et al.*, 2003).

Selon Clulow *et al.*(1994), le fluide intraluminal est le résultat de l'absorption d'une grande partie du liquide testiculaire en provenance de *rete testis*, du transport sélectif des constituants sérique (Cyr *et al.*, 2002) et de la sécrétion de molécules par les cellules de l'épithélium épидидymaire essentiellement par les cellules principales (Dacheux *et al.*, 2002) de ce fait la composition de liquide épидидymaire varie tout le long de l'épididyme (Dacheux *et al.*,

1995) et est sous le contrôle des cellules épидидymaire et qui la modifient graduellement selon les régions (Dacheux et Dacheux , 2000).

Les protéines qui sont sécrétées par les cellules principales de l'épididyme varient tout au long de celui-ci et influencent ses fonctions (Dacheux *et al.*, 1998; Mboundou *et al.*, 1988; Syntin *et al.*, 1996). Chaque section de l'épididyme démontre un profil d'expression de protéines bien déterminées. Chaque protéine de l'épididyme varie donc en nombre et en concentration selon le segment concerné. Certaines protéines comme le GPX5, qui est exprimé principalement dans la tête (Kirchhoff, 1999), ne sont présentes que dans certain segment bien précis.

La sécrétion séquentielle de plusieurs protéines est l'une des originalités des changement continuel de la composition de fluide épидидymaire (Dacheux et Dacheux,2002 ; Dacheux *et al.*, 2003 ;2005). Cette régionalisation est connue chez toutes les espèces lorsqu'on compare les changements séquentiels postgonadique (Dacheux et Voglmayr , 1983 ; Dacheux *et al.*,1987,1989,1998,2005). Chez l'homme la tête parait le segment le plus actif en terme de sécrétion ; par contre la queue distal semble la moins active (Dacheux *et al.*,2006).

La constitution des protéines n'est pas toujours stable puisque, chez le rat Sprague-Dawly, deux protéines dont le poids moléculaire est de 35 et 33 kDa apparaissent puis disparaissent après un peu de temps de leur sécrétion (Vreeburg *et al.*, 1992). Cependant chez le lapin 5 protéines de 93,61,35,33 et 27 kDa qui étaient présentes au niveau du *rete testis* sont réabsorbée par les cellules épидидymaire de la partie proximal de la tête de l'épididyme tandis que des protéines de 94,88,63,52,38,36,22,20 et 13 kDa seront sécrétées dans la lumière épидидymaire (Nixon *et al.*, 2002).

Chez le vererrat, la puberté aura lieu au sixième mois, la sécrétion des protéines est la même pendant le premier mois au niveau de toutes les régions de l'épididyme (Syntin *et al.*, 1999), la protéine de 55 kDa présente uniquement chez les jeunes animaux pourrait être transitoire puisque le traitement par la testostérone provoque sa répression.

Deux protéines transitoires de 31 et 72 kDa ont été observées chez le vererrat (Syntin *et al.*,1999), chez cette espèce, le nombre des isoformes passe de 11 au cours du premier mois du développement à 187 à l'âge adulte et la spécialisation de régulation de régionalisation de l'expression des protéines commence à apparaître à partir du troisième mois.

Deux protéines ont été détectées avec un poids moléculaire de 17 et 23 kDa dans la queue de l'épididyme du bélier, la protéine de 17 kDa est immunolocalisée au niveau du flagelle des spermatozoïdes (Gatti *et al.*, 2000).

La spécificité de la sécrétion des protéines s'installe progressivement avec l'âge chez la souris (Bendahmane et Abou-Haila, 1994) et le rat (Ueda *et al.*, 1990).

La dynamique de changement de l'expression des gènes est à l'origine d'une régionalisation protéomique, la majorité des protéines (90%) présentent une sécrétion régionalisée (Dacheux et Dacheux, 2001).

La caractérisation de l'accumulation des protéines chez le verrat (Syntin *et al.*, 1999) montre que 48% des protéines dépendent des androgènes parmi elle 33,6% sont stimulées et 14,4% sont réprimées, 47% dépendent des autres facteurs et 5% ne sont pas régulées.

Les travaux de Macedo et Miguel, (1986) montrent que la maturité sexuelle est atteinte chez des males de race New Zelandaise au 129^{ème} jour d'âge. Tandis que Boiti (2005), montrent que la maturité sexuelle se produit approximativement à 5 mois selon la contrainte.

Les travaux de Leeson et Forman (1981), et d'El-Sherbiny (1994) montre un processus de différenciation à 4 semaines d'âge et qui augmente de la 8^{ème} à la 10^{ème} semaines. A 16 semaines d'âge (112 jours d'âge), ils observent des spermatozoïdes dans la tête et le corps de l'épididyme des lapins. Selon ces mêmes auteurs, l'entrée en puberté correspond à l'observation de l'apparition des premiers spermatozoïdes dans l'épididyme caudal des lapins mâles.

L'évolution de la concentration en protéines de l'homogénat épидидymaire entre les deux populations, population Blanche et souche Synthétique, à montré des concentrations plus élevée chez la souche synthétique dès le début de l'expérimentation (4 semaines) jusqu'à 16 semaines d'âges (fin de l'expérimentation de la souche synthétique) peut être due à un caractère extrêmement variable en fonction des facteurs génétiques, alimentaire et/ou environnementaux entre les deux populations.

D'après García-Thomas *et al.*, 2009, le développement gonadique varie en fonction des races, et devraient être pris en considération dans des études où les lapins sont utilisés comme modèle expérimental.

L'intensité de des différentes bandes protéiques obtenus à partir de ces deux profils électrophorétique reflète partiellement la variation dans l'abondance des protéines qui existe dans l'épididyme de deux populations de lapins, ainsi la migration de ces protéines reflète la masse moléculaire de chaque protéines qui varie en fonction de l'âge et de la population.

Il est important de signaler que l'électrophorèse ne révèle que les poids moléculaires apparents des protéines, il est possible que les protéines présentes chez les animaux prépubères ne sont pas les mêmes chez les pubères même si ces dernières possèdent le même poids moléculaire et par conséquent peuvent subir des régulations différentes.

Les facteurs lumicrine produits par les testicules jouent un rôle important pendant le développement postnatal épидидymaire (Hinton *et al.*, 2011). En effet, ces facteurs (tel que les androgènes, les facteurs de croissance et des enzymes) régulent l'activité sécrétoire des cellules

épithéliales de l'épididyme et des spermatozoïdes et participe directement au processus de maturation épидидymaire (Lan *et al.*, 1998; Robaire *et al.*, 2006).

Les mécanismes qui régulent la croissance et la différenciation de l'épididyme sont inconnus, bien qu'il soit clair que l'expression de beaucoup de gènes épидидymaires est liée au contrôle du développement (Robaire *et al.*, 2006).

Il est bien connu que les hormones sexuelles sont essentielles pour la production de plusieurs protéines exprimées dans l'épididyme (Ng *et al.*, 2006).

D'après Hamzeh *et al.* (2009) chez le rat les taux d'androgènes augmentent progressivement durant le développement postnatal jusqu'à un pic à l'âge pubère, suggérant un rôle des androgènes dans le développement de l'épididyme.

Enfin, durant cette période de différenciation, le niveau de testostérone augmente progressivement à partir de la phase prépubère, jusqu'à atteindre un plateau à l'âge adulte (Scheer *et al.*, 1980). Il est intéressant de noter que l'activité de l'enzyme responsable du métabolisme de la testostérone, la 5 α -réductase, est maximale à l'âge adulte dans l'épididyme (Scheer *et al.*, 1980). On remarque également que l'épididyme est sensible aux hormones glucocorticoïdes dans cette période de différenciation (Gladstones *et al.*, 2012). En effet, le récepteur aux glucocorticoïdes est exprimé à partir du jour 1 dans l'épididyme et son expression est particulièrement intense lors de cette période de différenciation, surtout dans les cellules basales (Gladstones *et al.*, 2012).

Cela suggère un rôle important des hormones dans les périodes de différenciation post-natale de l'épididyme. Après l'âge pubère, l'épididyme entre dans la phase d'expansion, la différenciation des cellules s'achève et l'épithélium atteint sa taille finale. L'entrée des spermatozoïdes dans l'épididyme a lieu à l'âge adulte ou on les retrouve dans tout l'épididyme (Robaire *et al.*, 2006).

*Conclusion et
Perspectives*

Conclusion et Perspectives

Notre étude biochimique, préliminaire, sur l'expression des protéines de l'épididyme durant le développement postnatal des lapins de la population blanche et de la souche synthétique, nous a permis de retenir différents résultats relatifs au développement pondéral des animaux et de leurs épididymes et du profil d'expression des protéines épididymaire.

Le poids vif et épididymaire des lapins des deux populations augmente progressivement durant le développement postnatal et suit une courbe sigmoïdale, avec des poids supérieur chez les lapins de la souche synthétique.

Le dosage de la concentration de l'homogénat épididymaire en protéines marque une augmentation progressive durant le développement postnatal, chez les deux populations, et plus importante chez les lapins de la souche synthétique.

Le profile électrophorétique des protéines épididymaire, a révélé l'apparition de plusieurs bandes de migration dont le nombre et l'épaisseur augment progressivement avec l'âge chez les lapins des deux populations, avec des variations dans le poids moléculaire en fonction de l'âge et de la population.

L'analyse densitométrique de nos bandes de migration des protéines épididymaire en mesurant leur densité, a révélé des variations qualitatives et quantitatives de l'accumulation des protéines durant tout le développement postnatal des lapins de chaque population avec des valeurs significativement plus élevées chez les lapins de la souche synthétique.

Nous avons constaté selon les observations et les résultats obtenus que les lapins de la souche synthétique diffèrent des lapins de la population blanche et subissent une maturation précoce non seulement sur le plan pondérale (le poids vif, le poids des épididymes) mais aussi sur le plan biochimique (la concentration moyennes des protéines, leur poids moléculaire). Ce qui corrobore avec les résultats des études histologique et morphométrique obtenues sur les mêmes animaux, dans des études antérieures.

Cette précocité sur le plan biochimique via la synthèse et la sécrétion de protéines impliquées dans la mise en place de la puberté, pourrait être expliquée par le fait que la souche synthétique est une souche améliorée génétiquement afin de modifier et perfectionner sa reproductivité et sa productivité (Lebas et Zerrouki, 2010, Lakabi *et al.*, 2017).

A l'issu de cette expérimentation, il serait donc nécessaire de compléter cette étude par :

Conclusion et Perspectives

- Réalisation d'une étude électrophorétique des protéines épидидymaire sur des effectifs plus élevés et sur des âges intermédiaire et adulte, en prenant soin d'utiliser un véritable marqueur standard des poids moléculaires de protéines.
- Refaire la même expérimentation en séparant les trois régions de l'épididyme (tête, corps et queue)
- Utiliser d'autre technique pour identifier les différentes protéines de l'homogénat épидидymaire, tel que Western Blot.

*Références
Bibliographiques*

Références Bibliographiques

- **Abo-el-ezz Z., Salem M.H., Abd El-Fattah G.A., Yassen A.M, 1984.** Effect of exposure to direct solar radiation on body weight, thermoregulation and reproductive efficiency in the male rabbit. In: Proceedings of 1st Egyptian–British Conference on Animal and Poultry Production, *Zagazig University, Egypt*, **1**: 119–135.
- **Abou-Haila A, Bendahmane M., 1994.** Synthesis, *characterization and hormonal regulation of epididymal proteins during development of the mouse. Differentiation*. **55**:119-125.
- **Adamali HI, Somani IH, Huang JQ, Gravel RA, Trasler JM, Hermo L. 1999.** II. Characterization and development of the regional- and cellular-specific abnormalities in the epididymis of mice with beta-hexosaminidase *A deficiency*. *J Androl* **20**(6):803-24.
- **Adamali, H. I., Somani, I. H., Huang, J. Q., Mahuran, D., Gravel, R. A., Trasler, J. M., and Hermo, L. 2000.** I. Abnormalities in cells of the testis, efferent ducts, and epididymis in juvenile and adult mice with beta-hexosaminidase A and B deficiency. *J Androl* **20**, 779-802.
- **Alvarino M. R., 1993.** *Control de la reproduction en el conejo. 1^{er} éd., IRYDA, mundi-prensa*, 137p.
- **Alvarino J. M.R. 2000.** Reproductive performance of male rabbits. In: *Proc. 7th world rabbit Conger; Valencia jul., 2000, vol. A, 13-35.*
- **Anonyme1:**<http://biochimej.univangers.fr/Page2/TexteTD/8TPmethodologie/5Electrophorese/1Electrophorese.htm>
- **Anonyme 2:** <http://biochimej.univangers.fr/TexteElectrophorese/electrophoresesSDS-PAGEmethodologieTP>.
- **Barone, 1976:** Anatomie comparée des mammifères domestique, tome 3. Splanchnologie 1, appareil digestif, appareil respiratoire, *Vigot Eds, Paris, France*.
- **Bedford, J.M. 1975.** Passage of spermatozoa through the epididymis. In: *Handbook of Physiology. Hamilton, D.W., Greep, R.O. Edit. Sect.7 Vol.5 pp.303-305 of Physiology. Hamilton, D.W., Greep, R.O. Edit. Sect.7 Vol.5 pp.303-305.*
- **Berx, G., and Van Roy, F. 2001.** The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* **3**, 289-293.
- **Blasco A., Bidanel J.P., Bolet G., Haley C.S., Santacreu M., 1993.** The genetics of prenatal survival of pigs and rabbits. *Livestock Production Science*. **37**: 1-21.

Références Bibliographiques

- **Boiti C., Castellini M., Theau-Clement M., Besenfelder U., Liguori L., Renieri T., and Boiti C., Castellini C., Theau-Clément M., Besenfelder U., Liguori L., Renieri T., Pizzi F. 2005.** Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Sci.* **13**: 71 – 91.
- **Blodorn B., Mader, Y. Urade., Hayaishi, K. Felgenhauer et W. Bruck. 1996.** “ Chroid plexus: the majore site of mRNA expression for the beta-trace protein (prostaglandin D synthase) in human brain “ *.Neurosciences Letters*, vol .209, p.117-120
- **Bonnes G., Desclaude J., Desclaude J., Drogoul C., Gadoud R., Jussiau R., Le Loc’h A., Montémas L. et Robin G. 2005.** *Reproduction des animux d’élevage. 2éme Ed. Educagri : 407p*
- **Boue, F., Biais, J., and Sullivan, R. 1996.** Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod* **54**, 1009-1017
- **Boue, F., and Sullivan, R. 1996.** Cases of human infertility are associated with the absencofP34Han, Kinetics and Mechanism of Coupling of Functionalized Chains at the pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma001672c HT Oyama - - Cité 50 fois - Autres articles 13 avr. 2001 - *Macromolecules* , **34** (10), pp 3331–3338. DOI: 10.1021/ A.V. Machado , J.A. Covas , V. , P. Cassagnau.,579-621
- **Boussit D. 1989.** Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l’association française de cuniculture ; Diffusion *Lavoisier* TEC & DOC : 240p.
- **Breton S. et Da Silva N. 2012.** Rôle de l’épididyme dans le contrôle de la fertilité mâle. *Med. Sci. Amer. I* : 1-20.
- **Brooks, D. E. 1979.** Influence of testicular secretions on tissue weight and on metabolic and enzyme activities in the epididymis of the rat. *J Endocrinol* **82**, 305-313.
- **Brooks, D. E. 1981.** Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. *Physiol Rev* **61**, 515-555.
- **Chapaman D.A.,Killian G.J.,1984.** Glycosidase activities in principal cells ,basal cells fibroblasts and spermatozoa isolated from the rat epididymis *.Boil .Reprod.*, **31**:627-636.

Références Bibliographiques

- **Chaudière, R Ferrari-Iliou:** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *FoodChem Toxicol* **1999**, 37:949-62.
- **Cheuk, B. L., Leung, P. S., Lo, A. C., and Wong, P. Y. 2002.** Androgen control of cyclooxygenase expression in the rat epididymis. *Biol Reprod* **63**, 775-780.
- **Chesler DA, McCutcheon JA, Reiss CS. 2004** .Posttranscriptional régulation of neuronal nitric oxide synthase expression by IFN- γ . *J Interferon Cytokine Res* **24**:141-149.
- **Cherr G.N.,Yudin A.I.,Overstreet J.W.,2001.**The dual functions of GPI anchored PH-20 hyaluronidase and intracellular signaling .*Matrix Biol.*,**20**:515-525.
- **Cho C., Bunch D.O., Faure J.E, Goulding E.H., Eddy E.M., Primakoff P., Myles D.G.,1998.**Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β .*Science* ,**281**:1857-1859
- **Clulow J., Jones, R.C. et Hansen L.A. 1994.** Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: comparisons with the homologous metanephric proximal tubule. *Exp. Physiol.* **79**: 915-928
- **Cooke G.M. et B.Robaire .1987.** The mechanism of rat epididymal 4-ene steroid -5 α -reductase “*Journal of Steroid Biochemistry*”, vol. **26,p** . 361-368.
- **Cooper, T. G. 1998.** Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* **53**, 119-136.
- **Cornwall, G. A., Orgebin-Crist, M. C., and Hann, S. R. 1992.** The CRES gene: a unique testis-regulated gene related to the cystatin family is highly restricted in its expression to the proximal region of the mouse epididymis. *Mol Endocrinol* **6**, 1653-1664.
- **Culotta, M Yang, TV O'Halloran:** Activation of superoxide dismutases: putting the métal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1763:747-58.
- **Cyr, D. G., Hermo, L., Blaschuk, O. W., and Robaire, B. 1992.** Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. *Endocrinology* **130**, 353-363.
- **Cyr, D. G., Robaire, B., and Hermo, L. 1995.** Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microsc Res Tech* **30**, 54-66.
- **Cyr, D. G., Finsson, K., Dufresne, J., and Gregory, M. 2002.**Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. *In The epididymis: from molecules to clinical*

Références Bibliographiques

practice, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 103-118.

- **Dacheux, J.L., Voglmayr, J.K., 1983.** Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. *Biol. Reprod.* **29**, 1033–1046
- **Dacheux J.L., Dacheux F., Paquignon M., 1989.** Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol. Reprod.*, **40**:635-651.
- **Dacheux, J. L., Druart, X., Fouchecourt, S., Syntin, P., Gatti, J. L., Okamura, N., and Dacheux, F. 1998.** Rôle of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular référence to the boar. *J Reprod Fertil Suppl* **53**, 99-107.
- **Dacheux, F., and Dacheux, J. L. 1999.** Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochim Biophys Acta* **1336**, 99-109.
- **Dacheux, F., and Dacheux, J.-L. 2000.** L'épididyme et les glandes annexes. In La reproduction chez les mammifères et l'homme, I. *Editions, ed. (Paris, Editions Ellipses)*, pp.290-315.
- **Dacheux, J. L., and Dacheux, F. 2002.** Protein sécrétion in the epididymis. In *The epididymis: from molécules to clinical practice (New-York, Kluwer Academic/Plenurn Publisher)*, pp. 151-168
- **Dacheux, J. L., Gatti, J. L., and Dacheux, F. 2003.** Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* **61**, 7-17.
- **Dacheux, J. L., Castella, S., Gatti, J. L., and Dacheux, F. 2005.** Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* **63**, 319-341.
- **Dacheux, J. L., Belghazi, M., Lanson, Y., and Dacheux, F. 2006.** Human epididymal secretome and proteome. *Mol Cell Endocrinol* **250**, 36-42.
- **Dacheux, J.L., Belleanne, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Ecroyd, H., Druart, X., Gatti, J.L., Dacheux, F., 2012.** The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **58**, 197–210.

Références Bibliographiques

- **Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirski FK, Pittet .MJ. and Breton .S. 2011** A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* **141**(5):653-663.
- **. DeBellefeuille, S., Hermo, L., Gregory, M., Dufresne, J., and Cyr, D. G. 2003.** Catenins in the rat epididymis: their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. *Endocrinology* **144**, 5040-5049
- **Defossez, P. A., Baert, J. L., Monnot, M., and de Launoit, Y. 1997.** The ETS family member ERM contains an alpha-helical acidic activation domain that contacts *TAFII60*. *Nucleic Acids Res* **25**, 4455-4463.
- **Deng X, Czymmek K, Martin-DeLeon PA.** Biochemical maturation of Spaml (PH-20) during epididymal transit of mouse sperm involves modifications of N-linked oligosaccharides. *Mol Reprod Dev* **1999**; 52: 196-206
- **Deng X., He Y., Martin-DeLeon P .A., 2000.** Mouse Spam 1(PH-20):evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes *.J.Androl.,21*:822-832.
- **Drevet, J. R.** Glutathione peroxidases expression in the mammalian epididymis and vas deferens. In *Andrology 2000*, F. Francavilla, Forti, ed. (Abruzzo, Collana di studiabruzzesi), pp. 427-462.
- **Dufaure, J. P., Lareyre, J. J., Schwaab, V., Mattei, M. G., and Drevet, J. R. 1996.** Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *C R Acad Sci III* **319**, 559-568.
- **Eddy E.M., Washburn T.F., Bunch D.O., Goulding E.H., Gladen B.C., Lubahn D.B. et Korach K.S. 1996.** Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinol.* **137**: 4796-805.
- **Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH 1997** Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional *localizations in the brain.* *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:3396-3401
- **El-Sherbiny A.M., 1994.** Some reproductive aspects of male rabbits. *Ph.D. Thesis*, Faculty of Agriculture, Ain-Shams *University, Cairo, Egypt*
- **Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, et al.** The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod* **2007**; 17: 2904-2911.

Références Bibliographiques

- **Evans, E. A., Zhang, H., and Martin-DeLeon, P. A. 2003.** SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 54
- **Ezer, N., and Robaire, B. 2003.** *Gene expression is differentially regulated in the epididymis after orchidectomy.*
- **Fan X. et Robaire B. 1998.** Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinol.* **139**: 2128-2136.
- **Faure, J., Ghyselinck, N. B., Jimenez, C, and Dufaure, J. P. 1991.** Spécifique distribution of messenger ribonucleic acids for 24-kilodalton proteins in the mouse epididymis as revealed by in situ hybridization: developmental expression and régulation in the adult. *Biol Reprod* **44**
- **Fatman, LM Schaefer., TD Oury:** Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine*, **2003**, 35:236-256. 13-22.
- **Flickinger, C. J., Howards, S. S., and English, H. F. 1978.** Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *Am J Anat* **152**, 557- 585
- **Fouchecourt, S., Metayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., and Dacheux, J. L. 2000.** Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* **62**, 1790-1803.
- **Frenette, G., Lessard, C., and Sullivan, R. 2002.** Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod* **67**, 308-313.
- **Frenette G, Lessard C, Madore E, Fortier MA, Sullivan R.** Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. *Biol Reprod* **2003**; 69: 1586-1592
- **Fujii, Y Iuchi, F Okada: Fundamental rôles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive System. Reprod Biol Endocrinol 2005,3:43.**
- **Gacem M. et Bolet G. 2009)** . Création d'une lignée issue du croisement entre une population locale et une souche européenne pour améliorer la production cunicole en Algérie. *11èmes Journées de la Recherche Cunicole, 29-30 novembre, Paris : 15-18*
- **García-Tomas M., Sanchez J., Rafel O., Ramon J., Piles M, 2007.** Développement sexuel post-natal chez le lapin : profils de croissance et de développement du testicule

Références Bibliographiques

et l'épididyme dans deux lignées. *12èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France : 49-52.*

- **Garcia-Tomas M., Sanchez J., Piles M. ,2009a.** Post-natal sexual development of testis and epididymis in the rabbit: Variability and relationships among macroscopic and microscopic markers. *Animal Reproduction Science. 110* : 347–355
- **Gatti J.L., Druart X., Syntin P., Guerin Y., Dacheux J.L., Dacheux F., 2000.** Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoproteins. *Biol. Reprod.*, **62**:950-958.
- **Gatti J.L.,Castella S.,Dacheux F.,Ecroyd H.,Métayer S.,Thimon V.,Dacheux J.L.,2004.**Post-testicular sperm environment and fertility *.Anim.Reprod.Sci.,82-83* :321-339.
- **Glover T.D. 1974.** “Recent progress in the study of male reproductive physiology : testis stimulation ;sperm formation, transport and maturation (epididymal physiology) ; semen analysis, storage and artificial insemination “ . *In AG Cuyton et D .Horrobin (éd.) .Reproductive physiology, vol. 8.MIR International Review of of Sciences . University Park Press. Baltimore, p. 221-270*
- **Ghyselinck, N. B., Dufaure, I., Lareyre, J. J., Rigaudiere, N., Mattei, M. G., and Dufaure, J. P. 1992.** Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol Endocrinol 7*, 258-272.
- **Ghyselinck, N. B., Dufaure, I., Lareyre, J.J., Rigaudiere, N., Mattei, M.G., Dufaure, J.P.1993.** Structural organization and regulation of the gene fot the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol Endocrinol 7*, 258-272.
- **Girouard J. 2009.** Rôle des domaines membranaires rafts dans le transfert et la compartimentation des protéines impliquées dans la maturation épидидymaire des spermatozoïdes bovins. *Thèse de Doctorat en physiologie-endocrinologie. Département d'obstétrique et gynécologie faculté de médecine université laval QUÉBEC*
- **Gladstones GH, Burton PJ, Mark PJ, Waddell BJ and Roberts P. 2012** immunolocalisation of 11beta-HSD-1 and -2, glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor and Na⁺ K⁺- ATPase during the postnatal development of the rat epididymis. *Journal of anatomy 220(4)*:350-362.

Références Bibliographiques

- **Gottwald U., Davies B., Fritsh M., Habenicht U.F., 2006.** New approaches for male fertility control : HEAs as an example of a putative target . *Mol .Cell.Endocrinol.*, **250**:49-57.
- **Gregory, M., Dufresne, J., Hermo, L., and Cyr, D. 2001.** Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology* **142**, 854-863.
- **Guan, X., Inai, T., and Shibata, Y. 2005.** Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Arch Histol Cytol* **68**, 213-225.
- **Gumbiner, B. M. 2000.** Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* **148**, 399-404.
- **Hamilton D.W. 1975 .** “Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymis, and ductus deferens in the rat” . *In R.O. Geep et E. B. Astwood (éd). Handbook of physiology, Section 7, Volume 5. Washington, DC: American Physiology Society, p. 259-301.*
- **Hamon R., Thepot N. et Salaun G. (1999).** Biologie de la reproduction des mammifères d'élevage. *Editions Educagri: 132p.*
- **Hamzeh M & Robaire B 2009;** Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *Journal of andrology* **30(2)**:200-212.
- **Henskens Y.M., Veerman E.C., Nieuw Amerongen A.V., 1996.** Cystatins in health and disease . *Biol.Chem .Hoppe .Seyler*, **377**:71-86.
- **Hermo L ., Wright J., Oko R., Morales C.R., 1991.** Role of epithelial cells of the male excurrent duct system of the rat in the endocytosis or secretion of sulfated glycoprotein -2 (clusterin). *Biol.Reprod .*, **44**:1113-1131.
- **Hermo L, Barin K and Robaire B 1992** Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. *The Anatomical record* **233(2)**:205-228.
- **Hermo L, Adamali HI, Andonian S. 2000.** Immunolocalization of CA II and H⁺ V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J Androl* **21(3)**:376-91.
- **Hermo, L., and Robaire, B. 2002.** Epididymal cell types and their functions. In the epididymis: from molecules to clinical practice, *RA Hinton, ed. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 81-102.* *ology* **144**, 975-988.
- **Hermo L, Jacks D 2002** Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev* **63**:394-410

Références Bibliographiques

- **Hess R.A., Bunick D., Lee K.H., Bahr J., Taylor J.A., Korach K.S. et Lubahn D.B.1997.** *A role for oestrogens in the male reproductive system. Nat. 39: 509-512.*
- **Hinton, B .T., Setchell, B.P. & White, R.W. 1976** The determination of myo-inositol in micropuncture samples from the testis and epididymis of the rat. *J. Physiol., Lond. 265, 14-15P.*
- **Hinton B. et Turner T., 1988.**Is the epididymis a kidney analogue ? *News Physiol. Sci ., 3:28-31*
- **Hinton, B. T. 1990.** The testicular and epididymal luminal amino acid microenvironment in the rat. *J Androl 11, 498-505.*
- **Hinton, B. T., Lan, Z. J., Rudolph, D. B., Labus, J. C., and Lye, R. J. 1998.** Testicular regulation of epididymal gene expression. *J Reprod Fertil Suppl 53, 47-57.*
- **Hirata F.,Hayaishi O.,1975.**Studies on indolamine 2,3-dioxygenase I.Superoxide anion as substrate *.J.Biol.Chem.,250:5960-5966.*
- **Hinton, B.T., Palladino, M.A., 1995.** Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech. 30, 67–81*
- **Hinton BT, Robaire B, Orgebin-Crist MC.** The epididymis. *In: Neill JD (ed.) Physiology of Reproduction, vol. Third Edition. New York: Elsevier; 2011 : 1071-1148*
- **Hoffer, A. P., Hamilton, D. W., and Fawcett, D. W. 1973.** The ultrastructure of he principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *AnatRec 175, 169-201.*
- **Holland, M. K., and Orgebin-Crist, M. C. 1988.** Characterization and hormonal regulation of protein synthesis by the murine epididymis. *Biol Reprod 38, 487-496.*
- **Iczkowski K.A., Sun E.L., Gondos B. ,1991.** Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. *Am. J. Anat. 190: 266*
- **Jervis, K. M., and Robaire, B. 2001.** Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod 65, 696-703.*
- **Jimenez, C., Ghyselinck, N. B., Depeiges, A., and Dufaure, J. P. 1992.** Immunochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated proteins of MR 24000 secreted by the mouse epididymis. *Biol Cell 68, 171-174*
- **Jin Y. ,Bannai S.,Dacheux F.,Dacheux J.L.,Okamura N.,1997.**Direct evidence for the secretion of lactoferrin and its binding to sperm in the porcine epididymis *.Mol.Reprod .Dev.,47:490-496.*

Références Bibliographiques

- **Johnston, D. S., Jelinsky, S. A., Bang, H. J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G. S., and Turner, T. T. 2005.** The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod* **73**, 404-413.
- **Jones, R., Hamilton, D. W., and Fawcett, D. W. 1979.** Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *Am J Anat* **156**, 373-400
- **Jones R.,Shalgi R.,Hoyland J .,Phillips D.M.,1990.**Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa *in vitro* .*Dev.Biol.*,**139**:349-362.
- **Jones M.H.,Davery P.M.,Aplin H.,Affara N.A.,1995.**Expression analysis ,genomic structure and mapping to 7q31 of the human sperm adhesion molecule gene SPAM1.*Genomics* ,**29**:796-800.
- **Jones R.,Ma A.,Hou S.T.,Shalgi R.,Hall L.,1996.**Testicular biosynthesis and epididymal endoproteolytic processing of rat sperm surface antigen 2B1.*J.Cell.Sci.*,**109**:2561-2570.
- **Jones, R. C. 1999.** To store or mature spermatozoa? The primary rôle of the epididymis. *Int J Androl* **22**, 57-67.
- **Johnston D.S., Jelinsky S.A., Bang H.J., Dicandeloro P., Wilson E., Kopf G.S. et Turner T.T. 2005.** *The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. Biol. Reprod.* **73**: 404-413.
- **Kadam, A. L., Fateh, M., and Naz, R. K. 1995.** Fertilization antigen (FA-1) completely blocks human sperm binding to human zona pellucida: FA-1 antigen may be a sperm receptor for zona pellucida in humans. *J Reprod Immunol* **29**, 19-30.
- **Karydis I. T. Tolis. , 1998.** Orexis, anorexia, and thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid*.**8**.
- **Kintner, C. 1992.** Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell* **69**, 225-236.
- **Kirchhoff C., Osterhoff C.,Habben I.,Ivell R.,1990.**Cloning and analysis of mRNAs expressed specifically in the human epididymis .*Int .J.Androl.*,**13**:155-167.
- **Kirchhoff, C., Habben, I., Ivell, R., and Krull, N. 1991.** A major human epididymis-specific DNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod* **45**, 350-357.

Références Bibliographiques

- **Kirchhoff, C., Krull, N., Pera, I., and Ivell, R. 1994.** A major mRNA of the human epididymal principal cells, HE5, encodes the leucocyte differentiation CDw52 antigen peptide backbone. *Mol Reprod Dev* **34**, 8-15.
- **Kirchhoff C.,Pera I.,Rust W ., Ivell R.,1994.**Major human epididymis –specific gene product ,HE3,is the first representative of a novel gene family .*Mol.Rep.Dev.*,**37**:130-137.
- **Kirchhoff C., Hale ., 1996.** Cell-to-cell transfer of glycosyl phosphatidyl inositol-anchored membrane proteins during sperm maturation .*Mol . Hum. Reprod.*, **2**:177-184.
- **Kirchhoff C., Osterhoff C., Pera I.,Schroter S.,1998.**Function of human epididymal proteins in sperm maturation .*Andrologia* ,**30**:225-232.
- **Kirchhoff, C. 1999.** Gene expression in the epididymis. *Int Rev Cytol* **188**, 133-202.
- **Kirchhoff C.,Obermann H .,Behnen M.,Davies B., 2006.** Role of epididymal receptorHE6intheregulationofsperm microenvironment.*Mol.Cell.Endocrinol.*,**250**:43-48.
- **Kumar, P. N., Arulhas, M. M., and Juneja, S. C. 1996.** Influence of hyperthyroidism induced at prepuberty on the epididymal lipids, number and motility of spermatozoa in rats .*Reprod Fertil Dev* **8**, 373-378.
- **Kumar M, Syed SM, Taketo MM & Tanwar PS 2012** Epithelial Wnt/ β catenin signalling isessential for epididymal coiling. *Developmental biology* %@ 0012-1606.
- **Lakabi et 2017 : 34** éme congrée de la société française d'endocrinologie *Poitiers (France) de 11 au 14 Octobre Paris*
- **Lan, Z. J., Palladino, M. A., Rudolph, D. B., Labus, J. C., and Hinton, B. T. 1997** Identification, expression, and regulation of the transcriptional factor polyomavirus enhancer activator 3, and its putative role in regulating the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNA-IV in the rat epididymis. *Biol Reprod* **57**, 186-193.
- **Lan, Z. J., Labus, J. C., and Hinton, B. T. 1998.** Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase catalytic activity and protein level in the initial segment of the rat epididymis by testicular factors: role of basic fibroblast growth factor. *Biol Reprod* **58**, 197-206.
- **Lebas F., Coudert P., Rouvier R. et De Rochambeau H. 1984.** *Le lapin : élevage et pathologie. F.A.O. éd. Rome : 298 p.*

Références Bibliographiques

- **Lebas F. ,1996** Interet d'une alimentation équilibrée pour l'élevage cunicole en Algérie. *6th Conference on Rabbit Production in Hot Climates, Assiut (Egypt) : 1*
- **Leeson C.R. et Forman D.E. 1981.** Postnatal development and differentiation of contractile cells within the rabbit testis. *J. Anat .132: 491–511*
- **Legare, C., Gaudreault, C., St-Jacques, S., and Sullivan, R. 2006.** P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. *Endocrinology 140, 3318-3327*
- **Leung, P. S., Chan, H. C., Chung, Y. W., Wong, T. P., and Wong, P. Y. 1998.** The role of local angiotensins and prostaglandins in the control of anion secretion by the rat epididymis.; *J Reprod Fertil Suppl 53, 15-22*
- **Lewis B.,Aitken R.J.,2001.**A redox –regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa *.J.Androl .,22:611-622*
- **Macedo A.P., Miguel O. 1986.** Puberty in New Zealand White rabbits. *Rev de Fac de Medicini Vet e Zootecnia; University of Sao Paulo. 23(1):55–67.*
- **Marklund:** Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J 1984, 222:649-55.*
- **Martinez-Garcia, F., Regadera, J., Cobo, P., Palacios, J., Paniagua, R., and Nistal, M.1995.** *The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. Andrologia 27,195-206*
- **Mates, F Sanchez-Jimenez:1999.** Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci 1999, 4:D339-45.*
- **Mattmueller D.R.,Hinton B.T.,1991 .***In vivo* secretion and association of clusterin (SGP-2) in luminal fluid with spermatozoa in the rat testis and epididymis *.Mol .Reprod.Dev.,30:62-69.*
- **Mbougou, J. R., Junera, H. R., Dadoune, J. P., and Fain-Maurel, M. A. 1988.** Characterization and hormonal regulation of tissue and fluid proteins in the mouse epididymis. *Reprod Nutr Dev 28, 1275-1282.*
- **Mercier-Bodard C., Alfsen A. et Baulieu E.E. 1970.** Sex steroid binding plasma protein (SBP). *Act. Endocrinol. Suppl. (Copenh) 147: 204-224.*
- **Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. 1999.** Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A 96, 511-516.*

Références Bibliographiques

- **Naz, R. K., and Zhu, X. 1998.** Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. *Biol Reprod* **59**, 1095-1100.
- **Naz, R. K. 1999.** Vaccine for contraception targeting sperm. *Immunol Rev* **171**, 193-202
- **Nishimura M, Saito T, Yamasaki H & Kudo R. 2004** Suppression of gap junctional intercellular communication via 5' CpG island methylation in promoter region of E-cadherin gene in endometrial cancer cells. *Carcinogenesis* **24**(10):1615-1623
- **Ng, K. M., Catalano, M. G., Pinos, T., Selva, D. M., Avvakumov, G. V., Munell, F., and Hammond, G. L. 2006** Evidence that fibulin family members contribute to the steroid-dependent extravascular sequestration of sex hormone-binding globulin. *J Biol Chem* **281**, 15853-15861
- **Nixon B., Jones R.C., Hansen L.A. and Holland M.K., 2002.** Rabbit epididymal secretory proteins. I. characterization and hormonal regulation. *Biol.*, **67**:133-139.
- **Obermann H., Samalecos A., Osterhoff C., Schroider B., Heller R., Kirchoff C., 2003.** HE6, a two subunit heptahelical receptor associated with apical membranes of efferent and epididymal duct epithelia. *Mol. Reprod. Dev.*, **64**:13-26.
- **O'Bryan M.K., Mallidis C., Murphy B.F., Baker H.W.G., 1994.** Immunohistological localization of clusterin in the male genital tract in humans and marmosets. *Biol. Reprod.*, **50**:502-509.
- **Ouhayoun J, 1976.** Etude comparative de races différentes par le poids adulte. *These de 38 cycle. Montpellier.*
- **Oh J., Woo J.M., Choi E., Kim T., Cho B.N., Park Z.Y., Kim Y.C., Kim D.H., Cho C., 2005.** Molecular, biochemical, and cellular characterization of epididymal ADAMs, ADAM7 and ADAM28. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**:1374-1383.
- **Okamura N., Kiuchi S., Tamba M., Kashima T., Hiramoto S., Baba T., Dacheux F., Dacheux J.L., Sugita Y., Jin Y.K., 1999.** A porcine homolog of the major protein of human epididymis, HE1, specially binds cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, **1438**:377-387.
- **Olson, G. E., and Hinton, B. T. 1985.** Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Androl* **6**, 20-34

Références Bibliographiques

- **O'Rand, M. G., Beavers, J., Widgren, E. E., and Tung, K. S. 2011.** Inhibition of fertility in female mice by immunization with a *B-cell epitope*, the synthetic sperm peptide, P10G. *J Reprod Immunol* **25**, 89-102
- **Orgebin-Crist, M.C. & Fournier-Delpech, S. 1982:** Evidence for maturational changes during epididymal transit. *J. Androl.* **3**, 429-433.
- **Orgebin-Crist, M.-C. 1998.** The epididymis across 24 centuries. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **53**, 285–292
- **Osterhoff C., Kichhoff C., Krull N., Ivell R., 1994.** Molecular cloning and characterization of a novel human sperm antigen (HE2) specifically in the proximal epididymis. *Biol.Reprod.*,**50**:516-525.
- **Ozaki Y., Nichol C.A., Duch D.S., 1987.** Utilization of dihydrofolin mononucleotide and superoxide anion for the decyclization of l-tryptophan by murine epididymal indolamine 2,3 dioxygenase. *Arch. Biophys.*, **257**:207-216.
- **Palladino, M. A., Powell, J. D., Korah, N., and Hermo, L. 2003 :** Expression and localization of hypoxia-inducible factor-1 subunits in the adult rat epididymis. *Biol Reprod* **70**, 1121-1130.
- **Pearl C.A. and Roser J.F.,** Expression of lactoferrin in the boar epididymis :Effects of reduced estrogen. *Domest Anim Endocrinol* ,doi:**10.1016/j.domaniend.2007.01.001**.
- **Pera, I., Ivell, R., and Kirchoff, C. 1996.** Body temperature (37 C) specifically downregulates the messenger ribonucleic acid for the major sperm surface antigen CD52 in epididymal cell culture. *Endocrinology* **137**, 4451-4459..
- **Perry, A. C., Jones, R., Niang, L. S., Jackson, R. M., and Hall, L. 1992.** Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochem J* **285** (Pt 3), 863-870.
- **Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W.,and Beh ne, D. 2001.** Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol *cross-linking during sperm maturation.* *Faseb J* **15**, 1236-1238.
- **Phelps B.M.,Koppel D.E.,Primakoff P., Myles D.G.,1990** .Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell surface domains. *J. Cell Biol.* ,**111**:1839-1847.

Références Bibliographiques

- **Pierre Kamonun 1997.** Appareil et méthodes en biochimie et biologie moléculaire , *Flammarion Medicine-sciences* p 213 - 223
- **Piles M., Gianola D., Varona L., Blasco A, 2003.** Bayesian inference about parameters of a longitudinal trajectory when selection operates on a correlated trait. *J. Anim. Sci.* **81**:2714–24.
- **Primakoff P., Myles D.G., 2000.** The ADAM gene family. *Trends Genet.*, 16:83-87.
- **Ramos, A. S., Jr., and Dym, M. 1977.** Fine structure of the monkey epididymis. *Am J Anat* **149**, 501-531
- **Rejraji, H., Vernet, P., and Drevet, J. R. 2002.** GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* **63**, 96-103.
- **Riar, S. S., Setty, B. S., and Kar, A. B. 1973.** Studies on the physiology and biochemistry of mammalian epididymis: biochemical composition of epididymis. *A comparative study. Fertil Steril* **24**, 355-363.
- **Richard TS., Dunn C.A., Carter WG, Usui ML, Olerud .JE. and Lampe .PD. 2004** Protein kinase Cs partially and temporally regulates gap junctional communication during human wound repair via phosphorylation of connexin43 on serine368. *The Journal of cell biology* **167**(3):555-562.
- **Robaire, B., Hermo, L. 1988.** Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In *The Physiology of Reproduction* pp 999-1080 Eds E Knobil and J Neill. Raven Press, New-York.
- **Robaire, B., and Viger, R. S. 1995.** Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* **52**, 226-236
- **Robaire, B., Syntin, P., and Jervis, K. 2000.** The coming of age of the epididymis. In *Testis, Epididymis and Technologies in the year 2000* pp 229-262 Eds B Jegou, C Pineau and J Saez. Springer-Verlag, New-York
- **Robaire B, Hinton B et Orgebin-Crist .MC .2006** The Epididymis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction 3rd ed.*, Knobil E & Neill J (Edit.) Elsevier, New York. p 1071-1148.
- **Saez, F., Frenette, G., and Sullivan, R. 2003.** Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *J Androl* **24**, 149-154.

Références Bibliographiques

- **Seiler, P., Cooper, T. G., and Nieschlag, E. 2000.** Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int J Androl* **23**, 65-76.
- **Serre, V., and Robaire, B. 1999.** Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod* **61**.
- **Setchell, B.P. & Waites, G.M.H. 1975** The blood-testis barrier. In Handbook of Physiology, Section 7: Endocrinology, Vol. 5: Male Reproductive System, pp.143-172. Eds D. W. Hamilton & R. O. Greep. Am. Physiol. Soc, Washington D.C
- **Setchell, B. P., Scott, T. W., Voglmayr, J. K., and Waites, G. M. 1988.** Characteristics of testicular spermatozoa and the fluid which transports them into the epididymis. *Biol Reprod* **1**, Suppl 1:40-66.705-714.
- **Schutte B.C.,Mitros J.P.,Bartlett J.A.,Walters J.D.,Jia H.P.,Welsh M.J.,Casavant T.L.,McCray P.B Jr.,2002.**Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy .,*Proc .Natl .Acad .,Sci.USA.*,99:2129-2133.
- **Scheer H, Robaire B.** Steroid A4-5c-reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis during postnatal development. *Endocrinology* **1980**;107:948-953.
- **Sherwood L. 2006.** Physiologie Humaine. 2 \acute{e} meEdition ; de Boeck Universit \acute{e} (Bruxelles) : 529-595.
- **Schwaab, V., Baud, E., Ghyselinck, N., Mattei, M. G., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R.1995.** Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, *sequence and chromosomal localization.* *Gene* **167**, 25-31.
- **Schwaab, V., Lareyre, J. J., Vernet, P., Pons, E., Faure, J., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. 1998.** Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* **53**, 157-162.
- **Shum W.W., Ruan Y.C., Da Silva N. 2011.** Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *J. Androl.* **32**: 576-586.
- **Soranzo, L., Dadoune, J. P., and Fain-Maurel, M. A. 1982.** Segmentation of the epididymal duct in mouse: an ultrastructural study. *Reprod Nutr Dev* **22**, 999-1012

Références Bibliographiques

- **Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., and Frenette, G. 2005.** Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis.*
- **Sullivan R, Legare C, Thabet M, et al.** Gene expression in the epididymis of normal and vasectomized men: what can we learn about human sperm maturation? *J Androl* 2011;32: 686-697.
- **Sun EL & Flickinger CJ .1979.** Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *The American journal of anatomy* 154(1):27-55.
- **Sylvester S.R., Morales C., Oko R., Griswold M.D., 1991.** Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biol.Reprod.*,45:195-207.
- **Syntin, P., Dacheux, F., Druart, X., Gatti, J. L., Okamura, N., and Dacheux, J. L. 1996.** Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod* 55, 956-974.
- **Syntin P. and Cornwall G.A., 1999.** Immunolocalization of CRES (*Cystatin-Related Epididymal Spermatogenic*) protein in the acrosome of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 60:1542-1552.
- **Thibault C. et Levasseur M.C. 2001** La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Nouvelle édition, éd. Ellipses (Paris): 928p.*
- **Trasler, J. M., and Hermo, L. (1988).** I. Abnormalities in cells of the testis, efferent ducts, and epididymis in juvenile and adult mice with beta-hexosaminidase A and B deficiency. *J Androl* 20, 779-802.
- **Tsukita, S., and Furuse, M. 2001.** Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149, 13-16
- **Tulsiani, D. R. 2003.** *Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation? Microsc Res Tech* 61,18-27.
- **Ueda H., Hirano T. and Fajimoto S., 1990.** Changes in protein secretory patterns during the development of the rat epididymis. *Zool. Sci.*,7:681-690.
- **Umar A., Ooms M.P., Luider T.M., Grootegoed J.A. and Brinkmann A.O., 2003.** Proteomic profiling of epididymis and vas deferens: identification of proteins regulated during rat genital tract development. *Endocrinology.* 144:4637-4647.

Références Bibliographiques

- **Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohe, L. 1999.** Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285, 1393-1396.
- **Veri, J. P., Hermo, L., and Robaire, B. 1993.** Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. *J Androl* 14, 23-44
- **Vernet, P., Faure, J., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. 1997.** Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol Reprod Dev* 47, 87-98.
- **Vigueras-Villasenor R.M., Montelongo-Solís P., Chávez-Saldana M.D., Gutiérrez-Pérez O., Arteaga-Silva M., Rojas-Castaneda J.C, 2013.** Postnatal testicular development in the Chinchilla rabbit. *Acta Histochemica* : 9.
- **Wang P et Duan YG 2016** The role of dendritic cells in male reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 76(3):186-192.
- **Weinberg E.D.,1984.** Iron withholding : a defence against infection and neoplasia. *Physiol Rev.*, 64:65-102.
- **Yamamoto, Y., Nagat, Y., Niki, E., Watanabe, K., Yohimura, S., 1993.** Plasma glutathione peroxidase reduces phosphatidylcholine hydroperoxide. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 133-138.
- **Yeung C.H., Cooper T.G., Nieshlag E., 1997.** Human epididymal secreted protein CD25 on ejaculated spermatozoa : correlation with semen characterization and the effect of its antibody. *Mol.Hum.Reprod.*, 3:1045-1051.
- **Yeung CH, Sonnenberg-Riethmacher E & Cooper TG 1998.** Receptor tyrosine kinase c-ros knock out mice as a model for the study of epididymal regulation of sperm function. *JReprod Fertil Suppl* 53:137-147
- **Young, L. G., Gould, K. G., and Hinton, B. T. 1987.** Changes in binding of a 27-kilodalton chimpanzee cauda epididymal protein glycoprotein component to chimpanzee sperm. *Gamete Res* 18, 163-178.
- **Zahraoui, A. 2004.** Tight junctions, a platform regulating cell proliferation and polarity *Med Sci (Paris)* 20, 580-585.

Références Bibliographiques

- **Zanich A ., Pascall J .C and Jones R.,2003.**Secreted epididymal glycoprotein 2D6 That Binds to the Sperm's Plasma Membrane is a Member of the b-Defensin Superfamily of Pore-Forming Glycopeptides *.Biol.Reprod.*,69:1831-1842.
- **Zelko, TJ Mariani, RJ.2002** .Folz: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gène structures, évolution, and expression. *Free Radie Biol Med* 2002, 33:337-49.
- **Zerrouki N. 2006.** Caractérisation d'une population locale de lapin en Algérie : évaluation des performances de reproduction des lapines en élevage rationnel. *Thèse Doctorat, Université de Tizi Ouzou (Algeria): 131pp.*
- **Zerrouki N Lebas F,Gacem M, Meftah I,Bolet G, 2010 .** Comparison of reproduction performances of a rabbit syntheticline and of rabbits of local populations in Algeria, in 2 breedinglocations - First results. 6th Conference on Rabbit Production in Hot Climates, Assiut (*Egypt*) 1-4 February
- **Zhang, F. P., Poutanen, M., Wilbertz, J., and Huhtaniemi, I. 2001.** Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 15, 172-183.
- **Zhang YW, Nakayama K, Nakayama K & Morita I 2003** A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res* 63(7):1623-1630
- **Zhang, H., Jones, R., and Martin-DeLeon, P. A. 2004.** Expression and secretion of rat SPAM1(2B1 or PH-20) in the epididymis: *role of testicular lumicrine factors.* *Matrix Biol* 22,653-661.
- **Zhou, C. X., Zhang, Y. L., Xiao, L., Zheng, M., Leung, K. M., Chan, M. Y., Lo, P. S., Tsang,L. L., Wong, H. Y., Ho, L. S., et al. 2004.** An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol* 6, 458-464.
- **Zhu, X., and Naz, R. K. 1997.** Fertilization antigen-1: cDNA cloning, testis-specific expression, and immunocontraceptive effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4704-4709.

Annexes

Annexes

Annexe 01: tampon d'extraction (10ml de Brooks + 150µl de PMSF)

Solution de Brooks:

- Tris 758 mg
- ajuster le Ph a 7.5 par H2O D 250 ml
- Sucrose 21.4 g
- MgCl₂ 152.5 mg
- Vérifier le Ph= 7.5

Solution de PMSF :Phényl methyl sulfonyl fluoride :

- PMSF 87 mg
- Propanol ou Ethanol pur 2.5 ml

Annexe 02 : dosage des protéines par la méthode de Bradford

Solution de BSA

- BSA (bovin sérum albumine) 20mg
- H2O D (tiède) 20ml

Solution de Bradford :

- Bleu de coomassie G250 0.01% = 0.01g
- Ethanol 95° 4.7% = 4.7 ml
- Acide orthophosphorique 8.50% = 8.5ml
- H2O D 100ml

Annexe 03 : Tampon de dénaturation

- Tris Hcl ph=6, 8 12.5ml
- SDS 2.3g
- Glycerol 10ml
- Sucrose 10g

Bleu de bromophénol 0.05g

- B-Mercaptoethanol 2.5ml
- H2O D 50ml

Annexe 04 : Gel de séparation 12.5%

Solution Acrylamide-Bisacrylamide

(30g acrylamide + 0.8g bisacrylamide + 100ml H2O D)

Solution Tris Hcl 11.25ml à ph 8.8

(18.15g tris + (1N) Hcl + 100ml H2O D)

Préparation de gel

➤ H2O D	1,875 ml
➤ Acry-bisacrylamide	1,875 ml
➤ Tris Hcl ph=8,8	2,25 ml
➤ SDS 10%	60 µl
➤ Persulfate d'ammonium 10%	40 µl
➤ Temed	10 µl

Annexes 05: gel de Concentration 5%

Solution Acrylamide-Bisacrylamide

(30g acryl + 0.8g bisacryl + 100ml H2O D)

Solution Tris Hcl ph 6.8 2.5ml:

(6g tris + Hcl (1N) + 100ml H2O D) **ph= 6.8**

Préparation de gel

➤ H2O D	1,875 ml
➤ Acry-bisacrylamide	375 µl
➤ Tris Hcl Ph=6,8	750 µl
➤ SDS 10%	30 µl
➤ Persulfate d'ammonium 10%	10 µl
➤ Temed	10 µl

Annexe 06 : Tampon de migration ph 8.3

Tris 3g + glycine 14.4g + SDS 1g + H2O D 1000 ml

Solution Tampon de Migration pour 1L :

(Tris 3g + SDS 1g + H2O D 500ml)

Puis ajuster le ph a 8.3 par (glycine 14.4g + H2O D 500ml)

Annexe 07 : Solution de coloration

- Methanol 250ml
- Acide acétique glacial 50ml
- Bleu brillant R250 0.5g
- H₂O D 200ml

Annexe 08 : Solution de décoloration

- Acide acétique glacial 100ml
- H₂O D 1000ml

Annexes 09 : préparation de la protéine standard (BSA)

- 0,002 g de Sérum Albumine Bovin (BSA)
- 800µl de tampon de dénaturation (annexe 03)