

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU



FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue d'obtention du diplôme de **Master en Sciences Biologiques**

Option : **Biologie et Physiologie de la Reproduction**

Distribution et importance des dystrophines et leurs protéines associées dans le testicule et l'épididyme du lapin mâle au cours du développement postnatal

Étude histomorphométrique et immunohistochimique

Présenté par :

M^{lle} SAHLI Sarah

et

M^{lle} YAKOUBI Imene

Devant le jury d'examen composé de :

Mme Khammes-El Homsin

MCA / FSBSA-UMMTO

Mme Benabdesselam R

Pr / FSBSA-UMMTO

Mme Tounsi F

Doctorante / FSB-USTHB

Mme Guendouzi

MAA / FSBSA-UMMTO

Présidente

Promotrice

Co-promotrice

Examinatrice

Année Universitaire 2022/2023

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous tenons à adresser notre profonde gratitude et reconnaissance à notre promotrice, professeur Mme BENABDESSELAM R. Ce travail a pu être réalisé grâce à votre encadrement, vos discussions enrichissantes et vos observations. Vous étiez toujours disponible, à l'écoute de nos nombreuses questions et toujours intéressée par l'avancement de nos travaux, mille mercis à vous pour tout ce que vous nous avez appris et surtout votre patience.

Nous adressons nos remerciements à Mme TOUNSSI F, notre co-promotrice pour son accompagnement durant notre première partie de stage pratique.

Nos profonds remerciements à Mme GUENDOUI S. qui a mis à notre disposition le kit de révélation de l'immunomarquage ; et aussi pour son accompagnement et son aide durant la réalisation de la partie pratique du mémoire.

Nous tenons également à remercier les membres du jury, qui ont bien accepté de porter leur jugement sur ce modeste travail que nous souhaitons être à la mesure de leurs satisfactions :

- Mme KHAMMES N, pour avoir accepté de présider le jury et d'évaluer notre travail.**
- Mme GUENDOUI S, pour avoir accepté d'examiner ce travail, d'avoir bien voulu prendre le temps d'évaluer et de juger notre travail.**

DÉDICACE

*Je dédie cet humble et modeste travail avec grand amour, sincérité
et fierté :*

- *A ma chère maman ; ma raison de vivre, tous les mots ne pourraient témoigner de ma gratitude. Je te dédie ce mémoire de fin d'étude comme le fruit de tes efforts et de tes sacrifices.*
- *A mon cher papa ; l'amour de ma vie, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours pour toi.
Sans toi je ne serais jamais là où je suis.*
- *A mes sœurs « Sandra, Liza, Sissa », les prunelles de mes yeux, en témoignage de leur sororité, je vous souhaite tout le bonheur du monde, et une vie pleine de succès et de réussite.*
- *A celui que j'aime très fort, ma source de bonheur, qui m'a soutenue tout au long de ce projet « Aïssa », je te remercie infiniment.*
- *A ma binôme « Imene », pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension jusqu'à la fin de ce projet.*
- *A ma chère amie « Wassila » et mon cher ami « Odir », qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de la réalisation de ce travail. Que dieu vous protège.*
- *A ma belle-sœur « Sarah », la plus adorable fille au monde ; je te souhaite le meilleur, et une vie pleine du bonheur et de succès.*
- *A mes tantes « Sabrina » et « Zahina », et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.*

Merci.

SARAH

DÉDICACE

Mon travail est un hommage vibrant à celle qui est partie durant mon cursus, celle qui m'a appris à suivre ma voie pour réaliser mon rêve. A la mémoire de ma mère Zoulikha

A mon cher papa El-Hacene qui représente ma raison de vivre et qui est toujours à mes côtés

A ma merveilleuse petite sœur Ferroudja, à mon frère chéri Pédric, sa femme Sonia et mes petits neveux Ilyane, Anis, Djalis, Zemil

A mon oncle, mon deuxième père Tarek

Je remercie toute ma famille qui m'a encouragée, ma grande mère Laldja, mes tentes Fatima, Dalila, Cassadit, Nora, Wahiba et Atika et mes quatre autres oncles Ahmed, Menad, Boualem, Jalis

Je remercie mes cousins et cousines

Kamel, Pounes, Kahina, Hacene, Anais, Nelya, Humidia

A la personne que je trouve toujours à mes côtés et me soutienne, Arab

Je remercie ma chère amie et binôme Sarah

Je remercie mes ami(e)s Amina, Fasmine, Wassila, Taoues, Leticia, Ines, Djedjiga, Dilia, Ghiles

A tous mes collègues que j'aime de la promo BQR 2022/2023

A toutes les personnes qui m'aime, je vous souhaite le bonheur.

IMENE

Figure 1 : Représentation schématique du complexe de la dystrophine et ses protéines associées (DPC) au niveau du sarcolemme	02
Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation de la dystrophine et des interactions avec ses partenaires majeurs.	03
Figure 3 : Représentation Schématique de l'appareil génital du lapin mâle.....	10
Figure 4 : Le testicule et ses enveloppes.	12
Figure 5 : Représentation schématique d'une coupe du testicule montrant structures internes.....	13
Figure 6 : Détail d'une portion de tubules séminifère de lapin.	14
Figure 7 : Structure de la cellule de Sertoli.....	16
Figure 8 : Représentation schématqie d'un spermatozoïde de mammifère.	18
Figure 9 : Cycle spermato-génétique du lapin.	20
Figure 10 : Anatomie et régionalisation de l'épididyme.....	21
Figure 11 : Représentation schématique de l'épithélium épидидymaire.....	22
Figure 12 : Schéma représentatif de l'épididyme, illustrant les différents segments et les différents types de cellules épithéliales et dendritiques.	22
Figure 13 : Photographie d'un lapin âgé de 3 mois	27
Figure 14 : Photographie montrant l'étape de dissection et de prélèvement. Lapin disséqué (A) ; Testicules, épидидymes prélevés (B).....	28
Figure 15 : Photographie montrant l'étape de la fixation. Testicule et épидидyme dans le formol 10% (A) ; Coupes de testicule dans une cassette (B).....	28
Figure 16 : Photographie montrant l'étape d'inclusion. Appareil d'inclusion (A) ; Solidification des échantillons sur une plaque refroidissante (B).....	29
Figure 17 : Photographie de l'étape de confection des coupes et étalement. Microtome(A) ; Bain marie(B) ; Plaque chauffante pour le séchage des lames(C).....	30
Figure 18 : Plaque chauffante.	31
Figure 19 : Batterie de la réhydratation.	31
Figure 20 : La délimitation des tissus sur les lames en verre.	32
Figure 21 : Montage des coupes entre lame et lamelle à l'aide de l'Eukitt	33
Figure 22 : Microscope photonique équipé d'un appareil photo connecté à un ordinateur. ...	34
Figure 23 Structure histologique du testicule du lapin en fonction de l'âge.....	37
Figure 24 : Structure histologique de l'épididyme du lapin en fonction de l'âge.....	40
Figure 25 : Evolution du diamètre des tubes séminifères en fonction de l'âge (n=11).	42
Figure 26 : Evolution Surface des tubes séminifères, Surface de la lumière, surface de l'épithélium, surface des tissus interstitiels, surface des noyaux de cellules de sertoli.....	43
Figure 27 : Evolution des surfaces des noyaux de cellules de spermatogonies en fonction de l'âge (n=8).....	44
Figure 28 : Evolution du diamètre de l'épididyme en fonction de l'âge	44
Figure 29 : Evolution de la surface de la lumière de l'épididyme, de l'épididyme de l'épithélium épидидymaire des noyaux des cellules principales.....	46
Figure 30 : Evolution de la Hauteur des cellules principales de l'épididyme en fonction de l'âge.....	46
Figure 31 : Immunomarquage au niveau du tissu testiculaire en fonction d'âge.....	48
Figure 32 : Révélation de l'immunomarquage au niveau du tissu épидидymaire en fonction d'âge.....	50

Tableau 1 : Répartition des protéines associées à la dystrophine.	06
Tableau 2 : Localisation et distribution des dystrophines au niveau des composants structuraux du testicule	49
Tableau 3 : Distribution Localisation et distribution des dystrophines au niveau des composants structuraux du l'épididyme	51

ABD : Domaine de liaison à l'actine
ABP : Androgen Binding Protein
AEC : Aminoethyl carbazole
AP : Posphate Alcalin
BCIP : Bromo-Chloro-Inodyl-Phosphate
CH : Calponine Homology
CRR : Cysteine Rich Repeats
DAB : Diaminobenzidine
DAPs : Dystrophin-Associated-Proteins
DB : Dystrobrevines
DGC : Dystroglycan complex
DMD : Duchenne Muscular Dystrophy
Dp : Dystrophine
DPC : Complexe des dystrophines et leurs protéines associées
EGF : Epidermal Growth Factor
ESM : l'Erreur Standard à la moyenne
FSH : Hormone de Stimulation Folliculaire
H (A, B, C) : Hélices A, B, C
HRP : Horse Radish Peroxidase
H1-4 : Hinges (Charnières)
H₂O₂ : Peroxyde Hydrogène
IGF1-BP3 : Insulin-like Growth Factor1- Binding Protein
IHC : Immunohistochimie
IL : Interleukine
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
KD : Kilos Daltons
LBD : Lipid Binding Domain (domaine de liaison aux lipides).
Leu : Leucine
LH : Hormone lutéinisante
MB : Membrane plasmique
Mo : Monocyte
N : Noyau
NBT : Nitro Bleu Tetrazolium chloride
NO : l'oxyde nitrique
nNOS : Oxyde nitrique synthétase neuronale
PAR-1b : Partitioning Defective 1b (kinase 2)
PDZ=PSD : Protéine de Densité Post-Synaptique
PH : (Pleckstrin Homology)
PM : Poids Moléculaire
POMC : Pro-Opiomélanocortine
R1-R24 : Répétitions
SG : Sarcoglycanes
SPN : Sarcopane
SS : Souche Synthétique
Syn : Syntrophines
TGFβ : Transforming Growth Factor β
Val : Valine
WW : Modular Protein Domain
ZZ : Domaine de fixation du zinc

Remerciements	
Dédicaces	
Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

Chapitre I : Rappels bibliographiques

1. Dystrophine et protéines associées.....	02
1.1. Dystrophine	02
1.1.1. Définition	02
1.1.2. Organisation et structure	03
1.2. Protéines associées à la dystrophine.....	05
1.2.1. Le complexe des dystroglycanes (DG)	05
1.2.2. Le complexe des sarcoglycanes (SG)	05
1.2.3. Le complexe des syntrophines (Syn).....	07
1.2.4. Autres composants du complexe des dystrophines	07
1.2.4.1. Les dystrobrevines (DB)	07
1.2.4.2. Sarcospane (SPN).....	08
1.2.4.3. L'oxyde nitrique synthase neuronale (NOSn)	08
1.3. Interaction de la dystrophine avec les lipides membranaires	08
1.4. Importance des dystrophines et leurs protéines associées.....	08
2. Aspects anatomo-structuro-fonctionnels du testicule et de l'épididyme...09	
2.1. Testicule.....	11
2.1.1. Son anatomie	11
2.1.2. Enveloppes testiculaires	11
2.1.3. Histologie du testicule	12
2.1.3.1 Les tubes séminifères	13
2.1.3.2. Les cellules de Sertoli	15
2.1.3.3. Les cellules de la ligné germinale	16
2.1.3.4. Le tissu interstitiel et cellules de Leydig.....	17
2.1.4. Fonction de testicule.....	19
2.1.4.1. Fonction exocrine du testicule : Spermatogenèse	19
2.1.4.2. Fonction endocrine du testicule : Stéroïdogénèse	19
2.2. Epididyme	20
2.2.1. Son anatomie	20
2.2.2. Histologie de l'épididyme	21
2.2.2.1. Les cellules principales	23
2.2.2.2. Les cellules Basales	23
2.2.2.3. Les cellules Halo	23
2.2.2.4. Les cellules claires	24
2.2.2.5. Les cellules apicales	24
2.2.2.6. Les cellules étroites	24
2.2.2.7. La lumière du canal épидидymaire	24
2.2.3. Sa fonction	25

Chapitre II : Partie expérimentale

1. Matériels et méthodes	26
1.1. Matériel biologique	26
1.2. Sacrifices et prélèvement des organes.....	27

1.3. Traitement des échantillons et confection des coupes histologiques	28
1.3.1. Fixation	28
1.3.2. Déshydratation et clarification	29
1.3.3. Imprégnation	29
1.3.4. Inclusion ou enrobage	29
1.3.5. Confection des coupes	30
1.4. Examen immunohistochimie (IHC)	31
1.4.1. Déparaffinage des lames et hydratation des coupes	31
1.4.2. Perméabilisation	32
1.4.3. Blocage par la peroxydase et la protéine Block	32
1.4.4. Incubation avec l'anticorps primaire	33
1.4.5. Incubation avec l'anticorps secondaire	33
1.4.6. Amplification et révélation du signal	33
1.4.7. Contre coloration	33
1.4.8. Déshydratation et montage des lames	33
1.5. Observation des lames	34
1.6. Etude histomorphométrique	34
1.7. Etude statistique	35
2. Résultats	36
2.1. Résultats histologiques	36
2.1.1. Histologie du testicule	36
2.1.2. Histologie de l'épididyme	39
2.2. Aspects histo-morphométriques	42
2.2.1. Morphométrie du testicule.....	42
2.2.1.1. Diamètre des tubes séminifères.....	42
2.2.1.2. Surface des tubes séminifères, Surface de la lumière, surface de l'épithélium, surface des tissus interstitiels, surface des noyaux des cellules de sertoli	42
2.2.1.3 Taille des noyaux de spermatogonies.....	44
2.2.2. Morphométrie épидидymaire.....	44
2.2.2.1. Diamètre de l'épididyme	44
2.2.2.2. Surface de la lumière de l'épididyme, Surface de l'épididyme, surface de l'épithélium épididymaire et la surface des noyaux des cellules principales de l'épididyme.....	45
2.2.2.3. Hauteur des cellules principales de l'épididyme	45
2.3. Mise en évidence des dystrophines dans le testicule et de l'épididyme de lapins au cours de développement	48
2.3.1. Localisation des dystrophines au niveau du testicule à différents âges.....	47
2.3.2. Localisation des dystrophines au niveau du l'épididyme à différents âges	49
3. Discussion	51
3.1. Evolution histomorphométrique.....	51
3.1.1. Evolution histomorphométrique des testicules	51
3.1.2. Evolution histomorphométrique de l'épididyme.....	53
3.2. Examen immunohistochimie.....	53
3.2.1. Distribution des dystrophines dans le testicule	53
3.2.2. Examen immunohistochimique de l'épididyme.....	54
Conclusion et perspectives	56
Références bibliographiques	

Introduction

Les dystrophines sont les plus grandes protéines du cytosquelette sub-membranaire. Elles jouent un rôle crucial dans la structure et la fonction des muscles squelettiques, cardiaque et lisses. Elles sont localisées à la face interne de ces derniers, où elles assurent un lien structurel entre le cytosquelette et le sarcolemme. Au niveau cellulaire, cette protéine assure la transmission latérale des forces générées par les sarcomères tout en maintenant l'intégrité du sarcolemme via l'assemblage d'un complexe multiprotéique appelée complexe dystrophines-glycoprotéines (DGC) et également via l'interaction avec les lipides membranaires. La dystrophine joue également un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation dans les tissus non musculaires. Elle est aussi impliquée dans des cascades de signalisation cellulaire, soit directement en régulant des protéines membranaires tels que les canaux calciques, soit indirectement par l'intermédiaire des voies de signalisation calciques ou de l'oxyde nitrique (NO) (Péréon *et al.*, 2015).

Chez le lapin *Oryctolagus cuniculus* de la souche synthétique, la fertilité masculine est assurée essentiellement d'une part par les testicules, organes complexes qui assurent deux rôles majeurs : la spermatogénèse et la stéroïdogenèse. La spermatogénèse consiste à produire des spermatozoïdes fonctionnels à partir de spermatogonies souches, alors que la stéroïdogenèse correspond à la production des hormones stéroïdiennes, notamment la testostérone. D'autre part l'épididyme, long tubule pelotonné reliant le testicule au canal déférent, il représente un endroit sécuritaire pour la maturation et l'entreposage des spermatozoïdes qui transitent dans son tubule.

Cette étude est consacrée à la connaissance anatomo-histo-fonctionnelle de l'appareil reproducteur mâle du lapin de la souche SS, ainsi que de viser la localisation des dystrophines et de déterminer leurs importances au niveau du testicule et de l'épididyme, au cours de développement postnatal.

Ce document sera présenté en deux volets, le premier est constitué de la partie bibliographique qui comprend deux parties développant en l'occurrence : en premier, les dystrophines et leurs protéines associées ; en seconde partie, les rappels anatomo-histo-fonctionnels du testicule et de l'épididyme. Le deuxième volet est dédié à une étude expérimentale où nous avons réalisé une approche immunohistochimique dans le but de révéler la localisation des dystrophines au niveau des organes essentiels à la reproduction (testicule et épididyme), et une étude histomorphométrique dans le but d'examiner l'évolution de ces derniers.

Chapitre I :
Rappels bibliographiques

1. Dystrophine et protéines associées

La dystrophine (Dp) est une grande protéine filamenteuse. Elle est identifiée pour la première fois au niveau de la cellule musculaire, notamment squelettique, où elle permet la protection du sarcolemme des contraintes mécaniques de la contraction musculaire. Cette protéine appartenant au cytosquelette a été retrouvée en isoformes de même taille et de taille plus petite dans de nombreux tissus. La Dp est capable de constituer une structure macromoléculaire en s'associant avec des partenaires protéiques et glycoprotéiques, membranaires et cytoplasmiques, nommés protéines associées (Le Rumeur et *al.*, 2010).

1.1. Dystrophines

1.1.1. Définition

Les dystrophines sont des protéines sub-membranaire, présentent en dessous des membranes cellulaires. Avec les protéines associées à la dystrophine, les DAPs (Dystrophin-Associated-Proteins), elles forment une structure macromoléculaire, constituant un pont entre les microfilaments d'actine et les composants de la matrice extracellulaire (Figure 1). La Dp est exprimée constitutivement dans les cellules musculaires lisses, striées et cardiaques (Byers et *al.*, 1991) Ainsi, au niveau du sarcolemme par exemple, avec les DAPs, la Dp permet la protection de la membrane sarcolemmale contre les forces de concentration et relâchement musculaires (Culligan et *al.*, 1998).

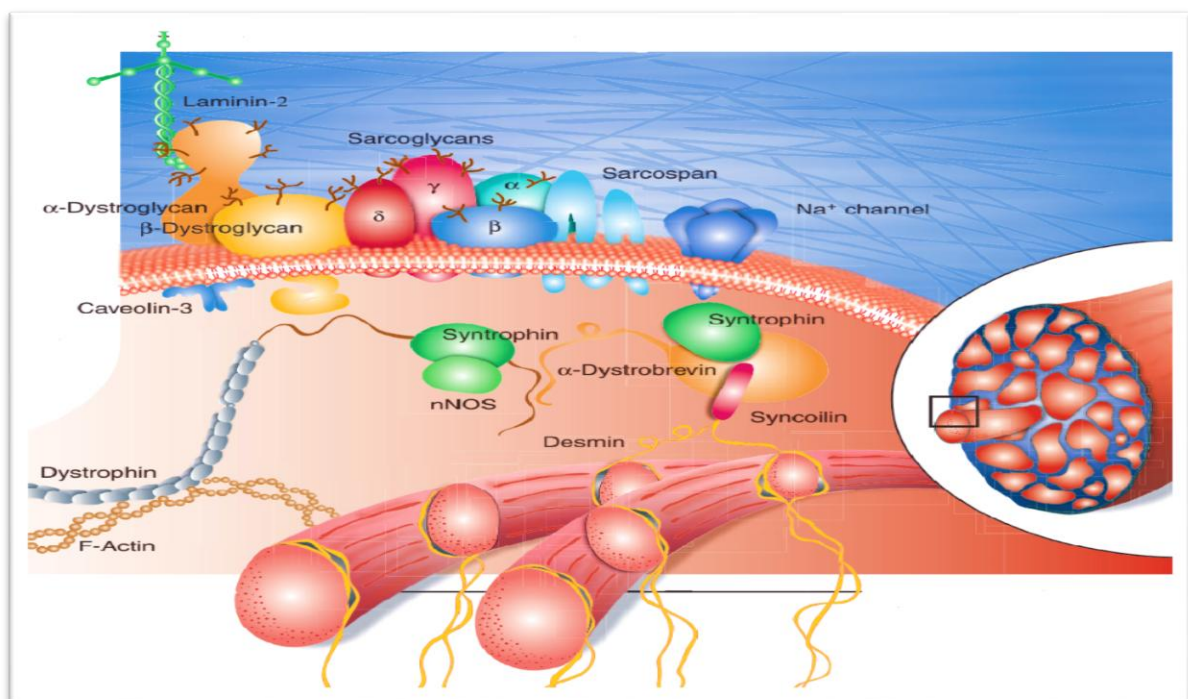


Figure 1 : Représentation schématique du complexe de la dystrophine et ses protéines associées (DPC) au niveau du sarcolemme (Ehmsen et *al.*, 2002)

La dystrophine est une protéine de 427 kDas (Dp427), codée par le plus grand gène de l'homme, le gène DMD (Duchenne Muscular Dystrophy), nommé ainsi du fait que la Dp427 fasse défaut chez les patients souffrant de cette forme de myopathie (DMD). Le gène DMD code pour 4 isoformes de Dp427, s'exprimant spécifiquement en fonction du tissu et de son développement, la Dp427M, Dp427B, Dp427P et Dp427L qui s'expriment, respectivement, dans le muscle, le cerveau, les cellules de Purkinje et les lymphocytes, mais aussi des isoformes de plus petites tailles, la Dp240, Dp160, Dp116 et Dp71, qui s'expriment dans d'autres tissus de l'organisme (Blake et *al.*, 1995 ; Norwood et *al.*, 2000).

1.1.2. Organisation et structure

La forme de Dp (Dp427) dont le haut poids moléculaire est composé de quatre domaines (Figure 2 ; Le Rumeur et *al.*, 2010), structurées en sous-domaines fonctionnels. Une extrémité N-terminale, un domaine central constitué de 24 segments répétés, proche de la spectrine, enfin une extrémité C-terminale en forme d'hélice (Koenig et Kunkel., 1990).

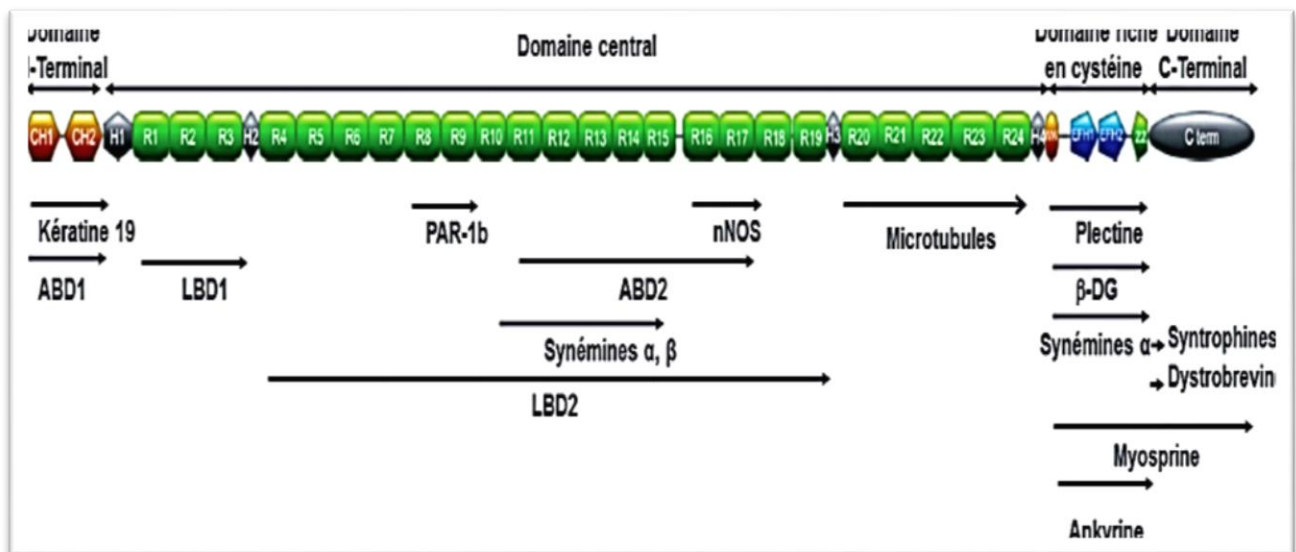


Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation de la dystrophine et des interactions avec ses partenaires majeurs (Nicolas, 2012).

H1-4 : charnières « hinges ». **ABD :** domaine de liaison à l'actine. **LBD :** domaine de liaison aux lipides. **nNOS :** domaine de liaison à la synthase neuronale de l'oxide nitrique. **DGC :** domaine de liaison au complexe dystrophine et glycoprotéines associées.

Le domaine N-terminal ou domaine de liaison à l'actine ABD1 (Actin Binding Domain 1), comprenant les premiers 240 acides aminés. Ce domaine lui-même est constitué de deux sous-domaines CH1 et CH2 (Calponin Homology) réunis par un fragment en hélice α . Il est capable de se lier à l'actine filamenteuse et également aux kératines 8 et 19.

Le domaine central va de l'acide aminé 240 au 3045 (environ 2800 acides aminés) ; il représente 76% de la protéine. Il est constitué de 24 répétitions homologues à la spectrine (ou spectrine like, R1 à R24). Ces répétitions sont organisées en triple faisceaux d'hélices α (HA, HB et HC) (figure 3) ; et il contient aussi 4 charnières riches en proline (ou hinges, H1 à H4) divisant le domaine central en 3 sous domaines.

Ce domaine possède diverses interactions avec :

- Les lipides membranaires via 2 domaines de liaison aux lipides LBD (Lipid Binding Domain), au niveau des répétitions R1-R3 (LBD1) et R4-R19 (LBD2) qui maintiennent la dystrophine en contact avec le sarcolemme (Legardinier *et al.*, 2008 ; Legardinier *et al.*, 2009).
- L'actine via le domaine ABD2 (Actin Binding Domain2), au niveau des répétitions R11-R17 (Amann *et al.*, 1998).
- La sérine/thréonine kinase via le domaine PAR-1b, au niveau des répétitions R8-R9 (Yamashita *et al.*, 2010).
- La synémine α et β qui sont des protéines de la famille des filaments intermédiaires, au niveau des répétitions R11-R14 (Bhosle *et al.*, 2006).
- L'oxyde nitrique synthétase neuronale (ou nNOS), au niveau des répétitions R16-R17 (Lai *et al.*, 2013 ; Molza *et al.*, 2015).
- Les microtubules au niveau des répétitions R20-R24 (Prins, 2009).

Le domaine riche en cystéines ou CRR (cysteine rich repeats), va de l'acide aminé 3080 à 3360. Il est composé de quatre sous-domaines : un domaine appelé WW (2 tryptophanes séparées par 21 acides aminés), deux domaines en main EF (ou EF hand), le EFH1 et EFH2, et enfin un domaine ZZ, capable de fixer le zinc. Le domaine CRR lie le β -DG (β -dystroglycane), qui en interagissant avec l' α -dystroglycane et les sarcoglycanes, forment le complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) (Campbell et Kahl, 1989 ; Ervasti et Campbell, 1991). Il se lie aussi à la synémine α (Bhosle *et al.*, 2006), la plectine (Rezniczek *et al.*, 2007), la myosprine « protéine kinase de type1 » (Prins *et al.*, 2009) et l'ankyrine (Ayalon *et al.*, 2008).

Le domaine C-terminal compte les 325 derniers résidus. Il est composé de faisceaux d'hélices similaires à ceux du domaine central. Il interagit avec la dystrobrevine, les syntrophines et la myosprine. Ce domaine interagit avec la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une des glycoprotéines associées à la dystrophine : la β dystroglycane (Sadoulet-Puccio *et al.*, 1996 ; Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997 ; Newey *et al.*, 2000 ; Reynolds *et al.*, 2008).

1.2. Protéines associées à la dystrophine

Les protéines associées à la dystrophine (DAPs : Dystrophin associated proteins) peuvent être divisées en trois groupes en fonction de leur localisation cellulaire : extracellulaire (α -dystroglycane), transmembranaire : (β -dystroglycane, sarcoglycane, sarcospane) et cytoplasmique (dystrobrevines, syntrophines, monoxyde d'azote synthase neuronal : NOSn). Une autre classification divise les DAPs en plusieurs complexes, celui des dystroglycane (DG), des sarcoglycane (SG), des syntrophines (Syn) et d'autres protéines, comme les dystrobrevines et la NOSn qui ne sont pas toujours classées parmi les DAPs (Tableau 1).

1.2.1. Le complexe des dystroglycane (DG)

Les DG sont des glycoprotéines ubiquitaires associées à la dystrophine. Elles sont au nombre de deux, l'Alpha-dystroglycane extracellulaire et le Beta-dystroglycane transmembranaire (Jean-Claude *et al.*, 1996). L' α -DG et la β -DG sont codés par un seul gène le DAG1 situé sur le chromosome 3p21, traduit à partir d'un seul transcrit dont le peptide résultant subit une protéolyse formant les deux protéines distinctes.

L' α -dystroglycane (α -DG) réside sur la surface extracellulaire du sarcolemme en raison de sa forte glycosylation et de son association membranaire périphérique. L' α -DG fonctionne comme un récepteur pour les ligands extracellulaires tels que la laminine (Ibraghimova-Beskrovnyaya *et al.*, 1992).

Le β -dystroglycane (β -DG) est une protéine transmembranaire, elle est constituée d'un court domaine intracellulaire dit « dystroglycan binding domain » qui lie le domaine riche en cystéine et la première moitié du domaine C-terminal de la dystrophine, et d'un domaine extracellulaire qui interagit étroitement avec l' α -dystroglycane.

1.2.2. Le complexe des sarcoglycane (SG)

Le complexe des sarcoglycane a été défini comme une sous-unité transmembranaire (Yoshida *et al.*, 1994) spécifiques du muscle squelettique et cardiaque. Chez les mammifères, six sarcoglycane ont été identifiés : α (50kDa), β (43kDa), γ (35kDa), δ (35kDa), ε (50kDa), ζ (40kDa). Tous sont des protéines transmembranaires à passage unique avec au moins un résidu glycosylé lié à l'asparagine.

- **L' α -sarcoglycane (α -SG)** est issu d'un gène situé sur le bras long du chromosome 17 en position 17q21. Il comporte dix exons s'étendant sur plus de 12kb (Brice et Schorderet, 1999).

- Le **β -sarcoglycane** (β -SG) présente un domaine amino-terminal intracellulaire et un domaine carboxy-terminal extracellulaire Il est constitué de 318 acides aminés. Son gène est localisé sur le bras long du chromosome 4 en 4q12, il se compose de six exons dispersés sur une région génomique d'environ 13 kb (Brice et Schorderet, 1999).

Tableau 1 : Répartition des protéines associées à la dystrophine.

Nom du complexe	Nom de la protéine	Poids moléculaire	Gène responsable	Localisation
Complexe dystroglycane	α - dystroglycane	156 kDa	3q21	Extracellulaire
	β - dystroglycane	43 kDa	3q21	Transmembranaire
Complexe sarcoglycane	α - sarcoglycane	50 kDa	17q21	Transmembranaire
	β - sarcoglycane	43 kDa	4q12	Transmembranaire
	γ - sarcoglycane	35 kDa	13q12	Transmembranaire
	δ - sarcoglycane	35 kDa	5q33-34	Transmembranaire
	ϵ - sarcoglycane	47 kDa	7q21.22	Transmembranaire
	ζ -sarcoglycane	40 kDa	8p22	Transmembranaire
Groupe des syntrophines	α - syntrophine	59 kDa	20q12	Intracellulaire
	β 1- syntrophine	59 kDa	8q23-24	Intracellulaire
	β 2- syntrophine	59 kDa	16q23	Intracellulaire
	γ 1-syntrophine	-	8q11	
	γ 2-syntrophine	-	2p25	
Autres	sarcospane	25 kDa	12p11.2	Transmembranaire
	α -dystrobrevine	87 et plus	18q12.1-q12.2	Intracellulaire
	β - dystrobrevine	87 et plus	2p22-23	Intracellulaire

- Le **γ - sarcoglycane** (γ -SG) est une protéine composée de 291 acides aminés, possédant un segment transmembranaire (leu-36 à val-60), un domaine C-terminal extracellulaire et un petit domaine intracellulaire. Son gène est localisé sur le bras long du chromosome 13 en 13q12.

- Le **δ -sarcoglycane** (δ -SG) est une glycoprotéine composée de 290 acides aminés. Elle est constituée d'un court domaine transmembranaire (leu35-val59) et une large partie extracellulaire de 231 acides aminés où se trouvent cinq cystéines, dont quatre à l'extrémité C-

terminale. Son gène est localisé sur le bras long du chromosome 5 en 5q33-q34 (Jean de Recondo, 2001).

- **Le ϵ -sarcoglycane (ϵ -SG)** est une protéine transmembranaire, composé de 413 acides aminés, et possédant un domaine extracellulaire, un site de glycosylation, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Son gène est situé sur le chromosome 7 en 7q21.22

- **Le ζ -sarcoglycane (ζ -SG)** est le dernier élément de la famille des sarcoglycanes, il présente 57% d'acides aminés similaires avec la δ -sarcoglycane et 55.7% avec la γ -sarcoglycane. Son gène est localisé sur le chromosome 8 en position 8p22 (Michela et Kate, 2011).

1.2.3. Le complexe des syntrophines (Syn)

Les syntrophines constituent une famille de protéines adaptatrices (Stone et *al.*, 2005 ; Rezniczek et *al.*, 2007 ; Adams et *al.*, 1993), composée de cinq membres : α -Syn, β_1 - and β_2 -Syn, and γ_1 - and γ_2 -Syn (Ahn et *al.*, 1996 ; Piluso et *al.*, 2000 ; Adams et *al.*, 1993 ; Ahn et *al.*, 1996), toutes les Syn ont une structure de quatre domaines similaires ; un domaine PH (pleckstrin homology) fractionné et un domaine PH intact, un domaine PDZ, et l'extrémité COOH terminale (Ahn et *al.*, 1994 ; Piluso et *al.*, 2000). Les trois isoformes : α Syn, β Syn, γ Syn ont un PM de 58 kDas (Rando, 2001). Les isoformes α_1 , β_1 , β_2 et γ_2 se retrouvent dans la jonction neuromusculaire du muscle squelettique, mais seul les isoformes α_1 et β_1 et β_2 sont présents à proximité du sarcolemme (Piluso et *al.*, 2000), γ_2 est localisée sur le réticulum sarcoplasmique/endoplasmique (Kameya et *al.*, 1999). Les domaines PH et PDZ sont impliqués dans la signalisation, notamment dans l'homo- et l'hétéro-dimérisation avec d'autres protéines et donc dans la fonction de recrutement de protéines de signalisation (Rando, 2001). Le domaine C-terminale contiendrait les sites de liaison à la dystrophine (Ahn et *al.*, 1995 ; Kameya et *al.*, 1999 ; Adams et *al.*, 2000 ; Alessi et *al.*, 2006). Ainsi, les syntrophines peuvent entraîner l'assemblage de différentes protéines de signalisation fonctionnellement interdépendantes, comme la NOS neuronale, les canaux ioniques et aqueux, les kinases, les transporteurs, les récepteurs des protéines G, et autres (Newey et *al.*, 2000). Les syntrophines ont des sites d'interaction avec les dystrobrevines (Suzuki et *al.*, 1995).

1.2.4. Autres composants du complexe des dystrophines

1.2.4.1. Les dystrobrevines (DB)

Cinq isoformes primaires de dystrobrevines ont été identifiées (Blake et *al.*, 1996). Elles se lient directement aux composants de la famille des dystrophines dans les muscles, le cerveau et

d'autres tissus (Sadoulet et *al.*, 1996). Cependant, α_1 -DB et α_2 -DB sont les principales isoformes du muscle squelettique. Les formes α - et β -DB, sont exprimés par le même gène. La longue queue de α_1 -dystrobrevine contient de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine, sites de phosphorylation, suggérant que les kinases peuvent réguler les interactions des DB avec les protéines de signalisation, notamment des DAPs, comme les syntrophines (Balasubramanian et *al.*, 1998 ; Grady et *al.*, 2003 ; Wagner et *al.*, 1994). De plus, chacune des isoformes est localisée différemment dans le muscle squelettique et interagit préférentiellement avec différents membres du DAPs (Peters et *al.*, 1998).

1.2.4.2. Sarcospane (SPN)

Le sarcospane est une protéine membranaire de 25 kDas avec quatre domaines transmembranaires et deux domaines intracellulaires (N-terminal et C-terminal ; Crosbie et *al.*, 1997). Il est exprimé principalement dans le muscle squelettique et cardiaque, mais des isoformes plus courtes existent dans d'autres tissus (Lebakken et *al.*, 2000). Le sarcospane est étroitement associé au complexe des sarcoglycanes (Crosbie et *al.*, 1999) et peut servir de chaperon dans l'assemblage du complexe des DAPs (Marshall et *al.*, 2012).

1.2.4.3. L'oxyde nitrique synthase neuronale (NOSn)

Les NOS sont des enzymes impliquées dans différentes voies de signalisation cellulaire (Campbell et *al.*, 2014). L'isoforme neuronale (NOSn), sans toutefois interagir avec la dystrophine, est associée au complexe des DAPS dans la fibre musculaire (Lai et *al.* ; 2009 ; Harper et *al.*, 2013). Le système d'oxygénation normale des muscles se produit grâce à l'activation de la NOSn et donc la production de l'oxyde nitrique (NO) nécessaire à une vasodilatation locale (Stamler et *al.*, 2001).

1.3. Interaction de la dystrophine avec les lipides membranaires

En plus de ses nombreux partenaires protéiques et glycoprotéiniques, la dystrophine est également capable d'interagir avec les lipides membranaires. Des séquences identifiées du domaine central possèdent une forte affinité pour des phospholipides anioniques (Wolf et *al.*, 1997). Ces liaisons sont dues à la fois à des forces électrostatiques et hydrophobes (Le Rumeur et *al.*, 2007). Ainsi, deux domaines de liaisons aux phospholipides ont été définis, ils sont nommés Lipid Binding Domains, LBD1 et LBD2 (Le gardinier et *al.*, 2009).

1.4. Importance des dystrophines et leurs protéines associées

La Dp 427 et ses protéines associées contribuent au maintien de l'intégrité structurale de la fibre musculaire. La principale fonction de la dystrophine est d'assurer une cohésion

mécanique entre le cytosquelette des cellules et la matrice et que son absence expliquerait la dégénérescence des muscles induites par les contractions. En fait, la Dp affronte le stress mécanique que subissent les myofibrilles et les tissus environnants via la matrice extracellulaire. Elle joue un rôle important en tant que ressort tendu entre la matrice extracellulaire et les microfilaments d'actine et ce, via des protéines et glycoprotéines cytoplasmiques et membranaires. (Ervasti, Campbell., 1993). En plus de la protection du sarcolemme, la Dp assure la régulation de diverses fonctions métaboliques au niveau du muscle squelettique, comme l'homéostasie calcique, des fonctions mitochondriales, des interactions avec les protéines motrices et l'expression de certains gènes (Gao et McNally., 2015).

La Dp est aussi impliquée dans des cascades de signalisation cellulaire, soit directement en régulant des protéines membranaires telles que les canaux calciques, soit indirectement par l'intermédiaire des voies de signalisation calciques ou du NO (Péron et al., 2015).

Les autres dystrophines de plus petites tailles sont identifiées dans d'autres tissus où elles joueraient des rôles dans la signalisation, notamment dans la maturation et la plasticité des synapses des neurones en particulier par leur fonction au niveau de l'agrégation et de la stabilisation de différents récepteurs de la membrane post synaptique (Lederfein et al., 1992 ; Lidov et al., 1993 ; Waite et al., 2012 ; Ricotti et al. 2016).

2. Aspects anatomo-structuro-fonctionnels du testicule et de l'épididyme du lapin.

L'appareil génital mâle des mammifères est composé d'organes et structurent qui assurent la formation, la maturation et l'émission des différents constituants du sperme, en l'occurrence : le testicule, l'épididyme, le canal déférent, les vésicules séminales, les canaux éjaculateurs, la prostate et le pénis (Figure 3 ; Jardin et De Fourmestaux, 1984). Le lapin possède une exception anatomique qui confère à l'appareil une capacité supplémentaire qui est le pouvoir de rétracter le testicule dans l'abdomen (Sabbagh, 1983).

Les testicules, ou gonades mâles au nombre de deux, sont contenues dans le scrotum et sont le siège de la production des gamètes mâles, les spermatozoïdes, et de la sécrétion des hormones sexuelles mâle, principalement la testostérone. La réception, le stock et le véhicule des spermatozoïdes sont assurés par un système canalaire comprenant les canaux efférents, l'épididyme, le canal déférent et les canaux éjaculateurs qui rejoignent l'urètre par lequel les spermatozoïdes sont expulsés et déposés par l'intermédiaire de l'organe de copulation, le pénis, dans l'appareil génital féminin grâce au liquide séminal, fluide nutritif et lubrifiant, produit

par deux types de glandes exocrines : les vésicules séminales et la prostate et une paire de glandes accessoires, les glandes bulbo-urétrales de Cowper (Stevens et *al.*, 2008).

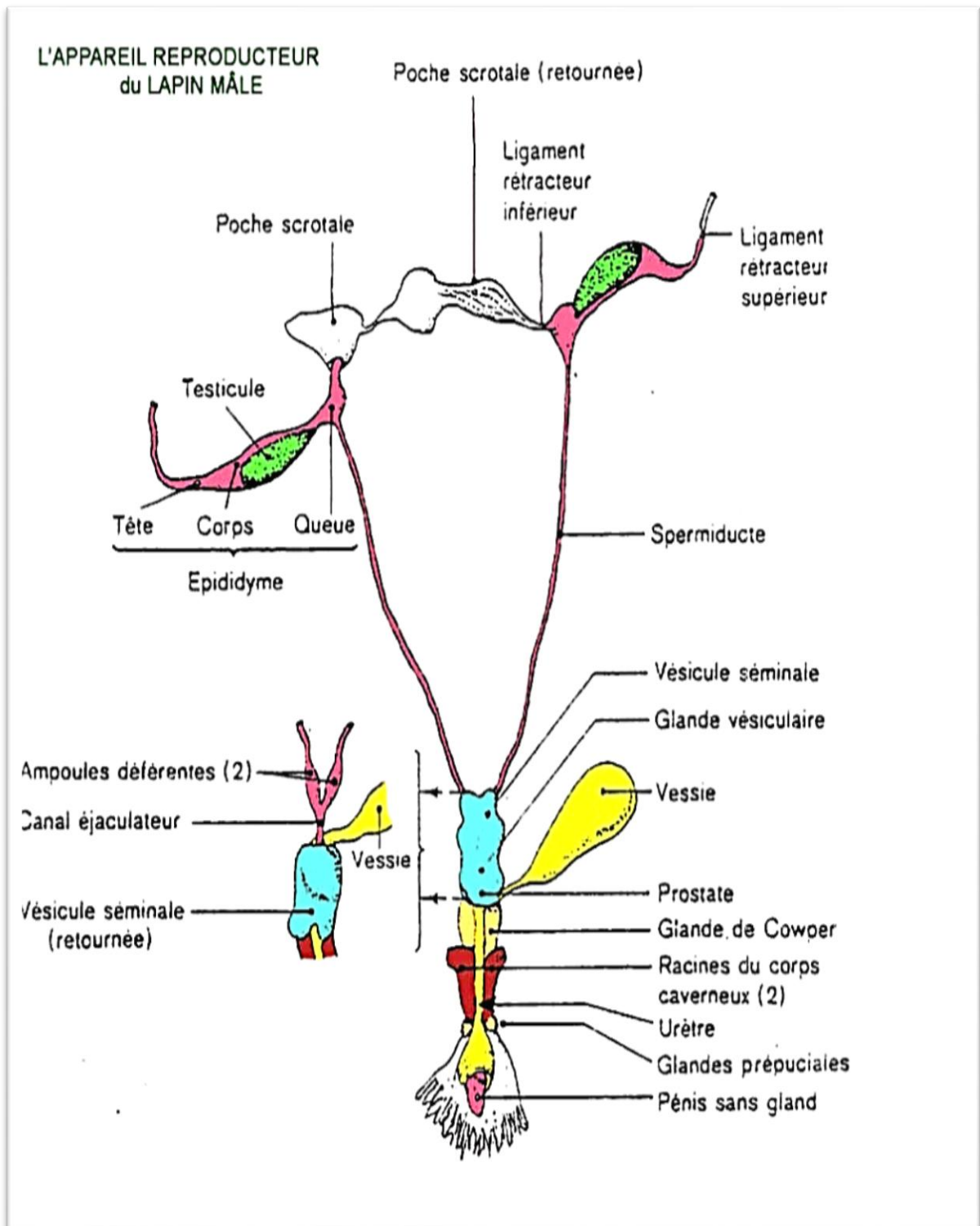


Figure 3 : Représentation Schématique de l'appareil génitale du lapin mâle (Lebas et *al.*, 1996)

2.1. Testicule

2.1.1. Son anatomie

Comme chez la plupart des mammifères, le lapin possède une paire de testicules, situés de part et d'autre de la ligne médiane inguinale, de forme oblongue, de couleur rosée, de consistance ferme et élastique. Ils sont logés dans les enveloppes testiculaires. Le testicule d'un lapin de 4 à 4.5 kg est de 3 à 3,5cm de longueur et 1.5 cm de largeur et pèse 1,5 à 2 g (Barone, 1984).

A la naissance des lapereaux, les testicules sont situés dans la cavité abdominale et leur croissance est lente par rapport à celle du corps. Au début de la spermatogénèse, vers le 45^{ème} jour, une accélération est observée. A l'âge de 2 à 3 mois, la migration du testicule dans la poche du scrotum aura lieu, puis cette communication entre les sacs scrotaux et l'abdomen reste durant toute la vie du mâle. En effet, le lapin garde la capacité de remonter ses testicules dans l'abdomen via le canal inguinal même en dehors de la reproduction ; le lapin est une espèce à la fois exorchide lorsque les testicules montent dans la cavité abdominale, et énorchide lorsqu'ils redescendent grâce à un tissu musculaire appelé crémaster, logé dans les bourses (Barone, 1976 ; 2001).

2.1.2. Enveloppes testiculaires

Les testicules sont logés dans des enveloppes testiculaires, la principale fonction de ces dernières est de protéger et de soutenir les gonades avec ses premières voies d'excrétion (épididyme et début du canal déférent) ainsi que les vaisseaux du cordon spermatique. Les enveloppes du testicule comprennent, en allant de l'extérieure vers l'intérieur, six tuniques régulièrement superposées ; dont deux plans superficiels, le scrotum et le dartos ou tunique musculuse, un plan intermédiaire représenté par fascia spermatique externe ou tunique celluleuse et trois plans profonds à savoir le crémaster, le fascia spermatique interne ou tunique fibreuse et la tunique séreuse vaginale (Figure 4 ; Vaissaire, 1977).

Le scrotum est double et forme de chaque côté un sac volumineux très allongé (deux poches scrotales), il est localisé dans la région inguinale, ventralement à l'anus (Figure4). Il n'est bien visible que dans les périodes d'activités sexuelles (Barone, 2001).

Le dartos est représenté par des sacs formés de peau très fine, de tissu fibro-musculaire lisse et de tissu conjonctif. Sa principale fonction thermorégulation essentielle à la spermatogénèse, Le dardos garde les testicules à une température légèrement inférieure à celle du corps (Alvarino, 1993 ; Barone, 2001).

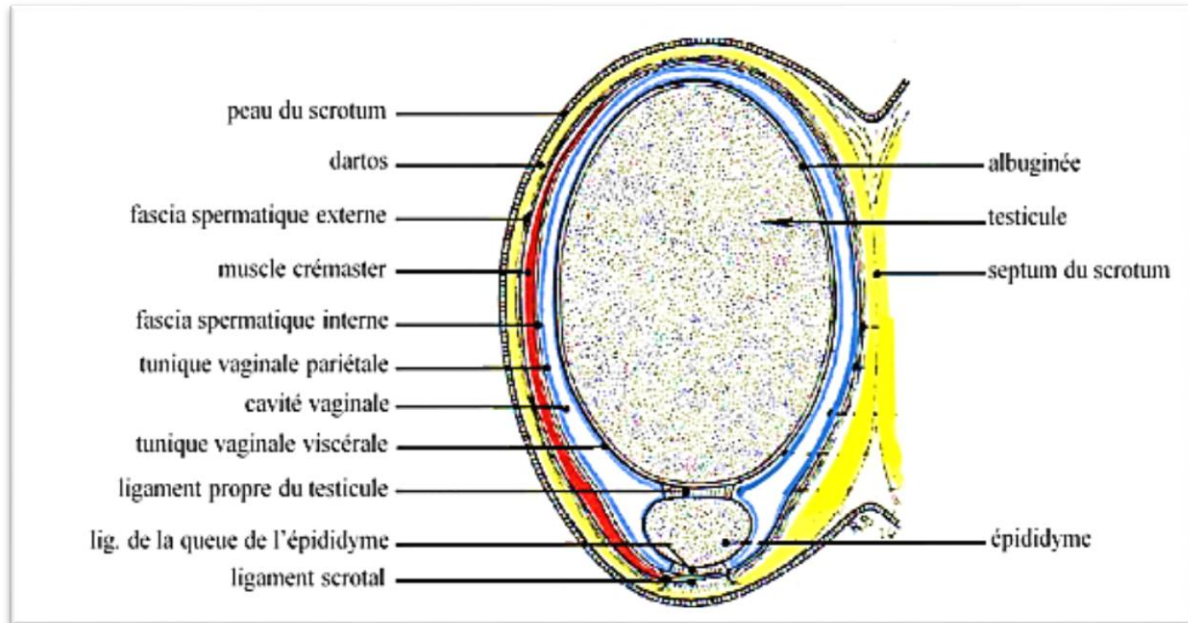


Figure 4 : Le testicule et ses enveloppes (Barone, 1978)

Le fascia spermatique externe (celluleuse) se trouve entre le scrotum et les couches profondes. Il double la face interne du dartos et il est constitué d'une superposition de couches de tissu conjonctif. La celluleuse permet une mobilité au testicule tout en le protégeant contre les chocs et les aplatissement (Vaissaire, 1977 ; Drion *et al.*, 1993).

Le crémaster est situé du côté externe de l'enveloppe fibro-séreuse et il est à l'origine de l'ascension du testicule (Vaissaire, 1977). Chez le lapin, c'est un sac musculaire complet de couleur rouge vif, directement continu avec le muscle oblique interne de l'abdomen, autour de l'anneau inguinal profond. Il est large d'un diamètre suffisant pour livrer le passage au testicule et à l'épididyme. Ce muscle joue un rôle important par ses contractions dans la thermorégulation testiculaire et lors d'un stress par la rétraction du testicule dans l'abdomen (Barone, 2001 ; Bonnes *et al.*, 2005).

Le fascia spermatique interne forme un sac piriforme débutant à l'anneau inguinal profond. Il est constitué d'une partie externe fibreuse et d'une autre interne séreuse. La fibreuse est fortement solidarisé à la lame pariétale de la cavité vaginale (Barone, 2001 ; Roger, 2009).

La tunique séreuse vaginale est très ample, piriforme, et le canal vaginal est long et vaste (Barone, 2001).

2.1.3. Histologie du testicule

Le testicule est entouré d'une enveloppe résistante, épaisse, constituée de tissu conjonctif de coloration blanche, appelée albuginée (Dadoune *et al.*, 2000). Au niveau de la coiffe

épididymaire, cette capsule s'épaissit et s'enfonce à l'intérieure du testicule pour former le corps d'Highmore, parcouru par un réseau de canalicules, le rete testis, à partir de ce dernier 15 à 20 petits canaux efférents conduisent les spermatozoïdes jusqu'à la partie initiale extrêmement sinueuse du canal déférent.

Du corps d'Highmore partent des cloisons conjonctives radiaires, les septa testis, délimitant 200 à 300 lobules testiculaires, chaque lobule testiculaire contient 2 à 4 tubes séminifères très longs, flexueux et contournés ; ces derniers débouchent par de courts segments rectilignes, les tubes droits, dans le rete testis (Figure 5; Vacheret,1999 ; Siffroi,2001).

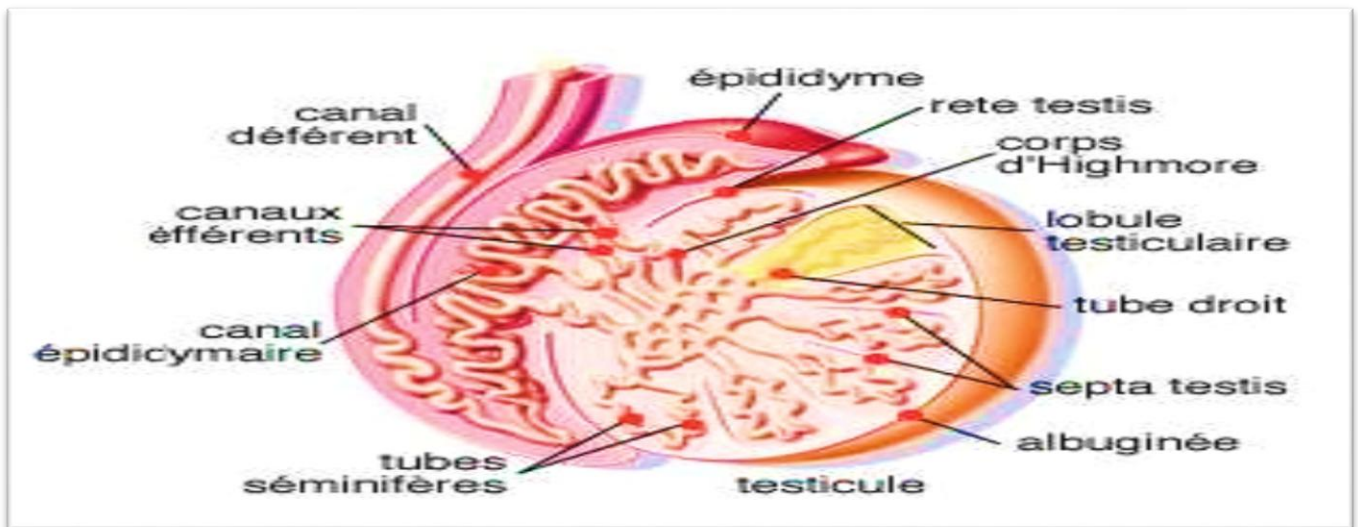


Figure 5 : Représentation schématique d'une coupe du testicule montrant structures interne (Muller et clos, 1997).

2.1.3.1 Les tubes séminifères

Les tubes séminifères, 2 à 3 tubes par lobule, sont pelotonnés et peuvent atteindre 70 m chez le lapin (Alvarino, 1993). Le tube séminifère est limité par une gaine tubulaire mince, appelée membrane propre du tube séminifère ou membrana propria, formée de la lame basale et de fibroblastes. Entre les tubes, un tissu conjonctif lâche contient des cellules endocrines isolées ou en petits îlots situés à proximité des capillaires : ces cellules endocrines ou cellules de Leydig sécrètent essentiellement de la testostérone (et de la dihydrotestostérone); elles constituent la glande interstitielle du testicule (Figure 6). La paroi du tube séminifère est formée d'un épithélium stratifié comprenant deux types de cellules : les cellules de la lignée germinale

disposées sur 4 à 8 couches et les cellules de Sertoli, cellules hautes s'appuyant sur la membrane basale et atteignant la lumière du tube par leur pôle apical (Goemaere, *et al.*, 1984)

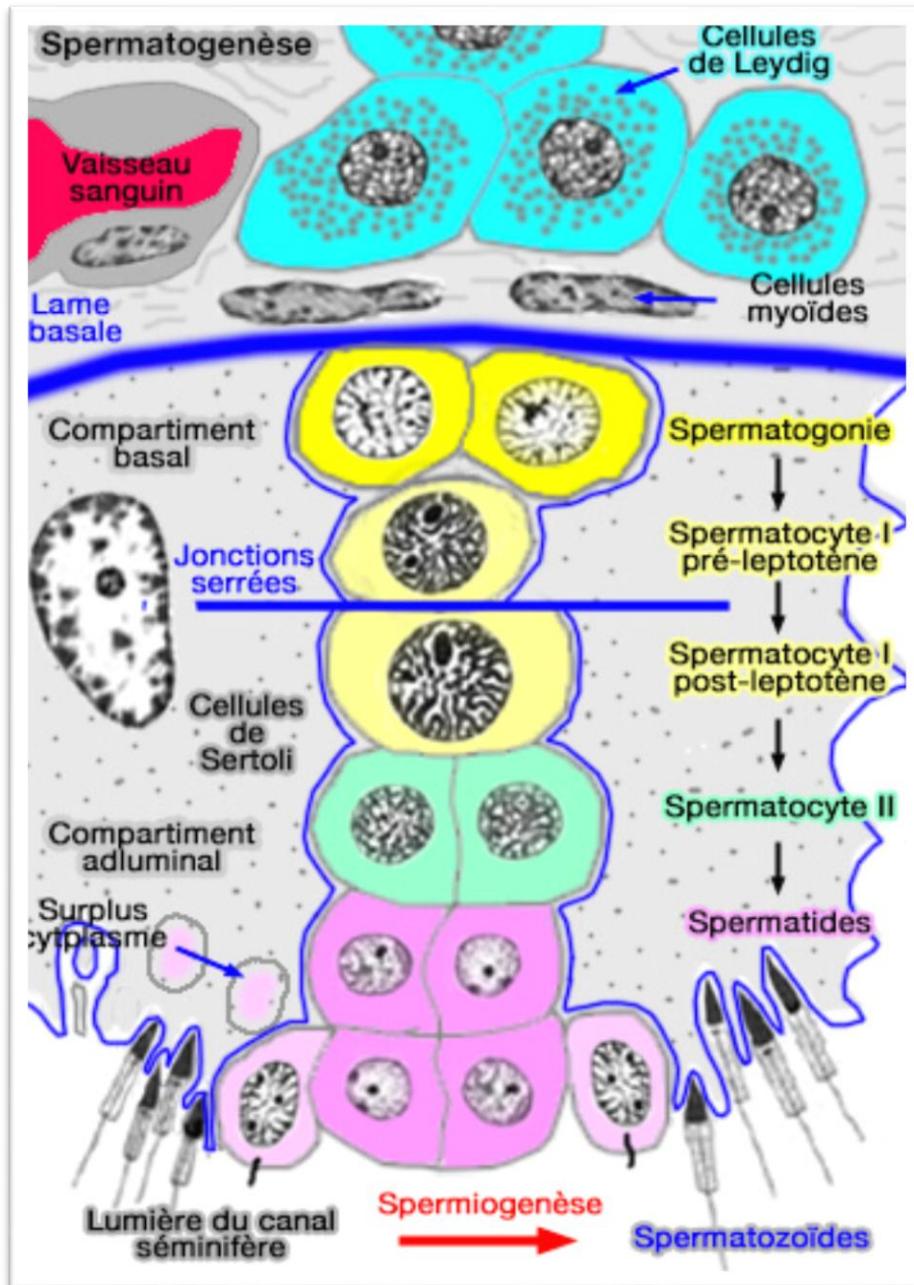


Figure 6 : Détail d'une portion de tubules séminifère de lapin (Junqueira et Carneiro, 2007).

2.1.3.2. Les cellules de Sertoli

Il s'agit d'une cellule grossièrement pyramidale dont la hauteur détermine celle de l'épithélium séminifère. Le corps cellulaire repose sur la membrane basale de la gaine périvitubulaire. Les faces latérales fixent les cellules germinales tout au long de leur maturation. La particularité de l'épithélium séminifère est la présence de jonctions serrées au pôle basal des cellules de Sertoli et non pas au pôle apical comme pour tout autre épithélium. Il est possible ainsi de distinguer deux compartiments ; le compartiment basal contient les spermatogonies et les spermatocytes pré-leptotène et le compartiment adluminal contient les spermatocytes et les spermatozoïdes (Figure 7).

La forme particulière est liée à la présence d'un abondant cytosquelette constitué d'un réseau de microtubules, de filaments d'actine et de filaments intermédiaires, comme la vimentine. La synthèse protéique et stéroïdogène de la cellule implique la présence d'un appareil de Golgi et surtout d'un réticulum endoplasmique lisse bien développé. La cellule adulte normale mature présente un noyau indenté, grossièrement triangulaire avec un nucléole tripartite proéminent. La compartimentation adluminale se met en place suite à la formation de jonctions serrées intercellulaires ; et la cellule dysgénésique montre un noyau immature et un cytoplasme presque mature avec des organites cytoplasmiques peu développés, ce type de cellules est retrouvé, souvent en association avec des cellules normales, en cas de testicules cryptorchides (Dadoue et Demoulin, 2001).

Le nombre de cellules de Sertoli détermine le nombre de cellules germinales pouvant se différencier en spermatozoïdes. Il y a une corrélation directe avec la numération spermatique, une trentaine de cellules germinales par cellule de Sertoli (Orth *et al.*, 1988).

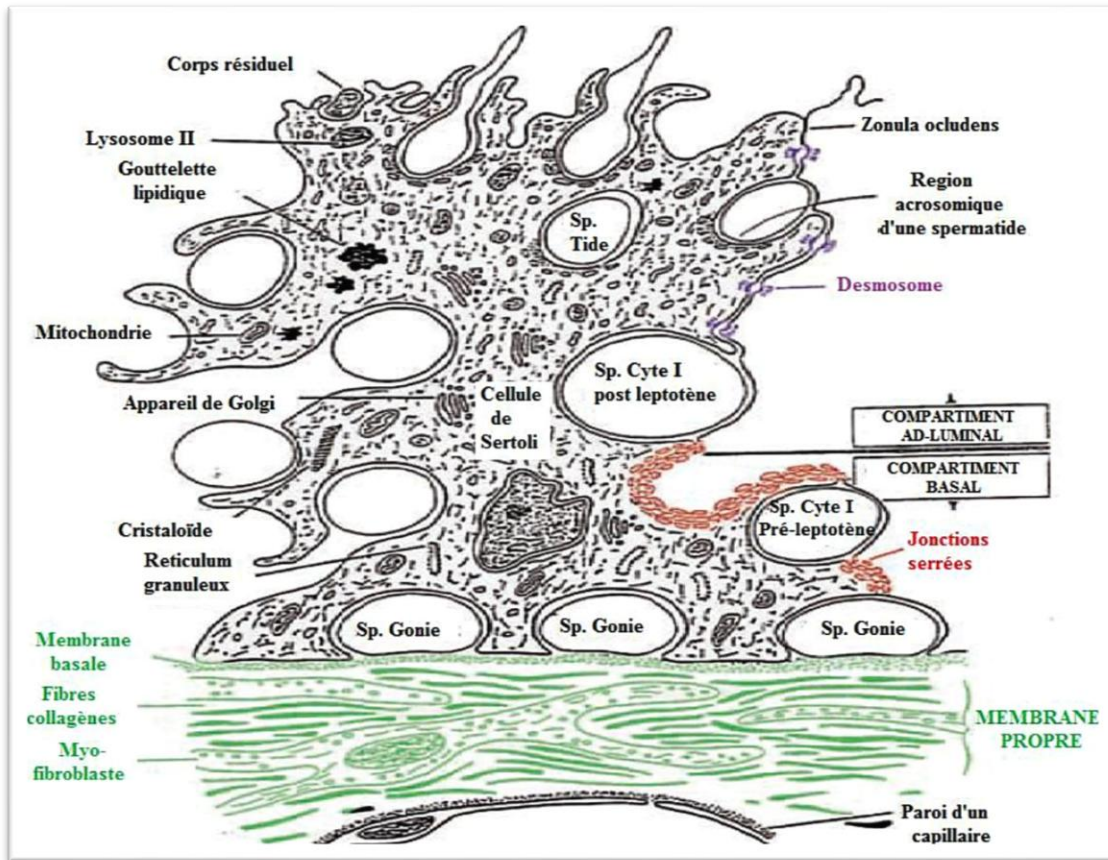
Rôles des cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli possèdent de multiples fonctions incluant :

- Le soutien physique et métabolique des cellules de Sertoli pour la différenciation des cellules germinales, leur entrée en méiose et leur transformation en spermatozoïdes (Dadoue et Demoulin, 2001).
- Rôle dans l'architecture des cystes, elles s'accrochent entre elles autour des premiers cystes par un engrenage des parois cellulaires, pour une fonction de soutien (Nicander, 1967).
- La sécrétion de facteurs régulant la fonction des cellules de Leydig et des cellules périvitubulaires.
- La sécrétion d'inhibine qui module la production hormonale, et des protéines de transport comme l'Androgen Binding Protein (ABP).

- La sécrétion d'un fluide tubulaire.
- La phagocytose des résidus de cytoplasme des spermatides.

Figure 7 : Structure de la cellule de Sertoli (Russell et Griswold, 1993).



2.1.3.3. Les cellules de la ligné germinale

Les cellules de la ligné germinale sont situées dans le compartiment basal du tube séminifère, vers la lumière centrale du tube. Les Différents types cellulaires se forment dans l'ordre qui suit : spermatogonie, spermatocyte I, spermatocyte II, spermatide, et spermatozoïde (Figure 6 ; Posière, 2002).

Les cellules germinales indifférenciées, subissent plusieurs mitoses aboutissant à la formation de spermatogonies de type A, assurant le maintien d'un pool de cellules germinales et de spermatogonies de type B (Fawcett et Burgos, 1956).

- Les spermatogonies de type A se caractérisent par un volumineux noyau arrondi ou ovalaire à chromatine condensée et des nucléoles périphériques.
- Les spermatogonies de type B ont une chromatine dispersée, des nucléoles centraux, et un cytoplasme peu abondant et peu coloré. Elles subissent des divisions mitotiques aboutissant à la formation de spermatocytes I.

- Les spermatocytes I sont reconnaissables par leur cytoplasme abondant, leur noyau volumineux contenant une chromatine disposée en amas grossiers ou en fins filaments. Elles subissent la première division méiotique et aboutissent à la formation de spermatocytes II.
- Les spermatocytes II sont plus petits, rarement visibles car elles rentrent rapidement dans la deuxième division méiotique et la production des spermatides.
- Les spermatides ou spermatozoïdes immatures, subissent un long processus de maturation appelé spermiogenèse qui les transforme en spermatozoïdes. Le noyau des spermatides au cours de cette phase prend progressivement la forme condensée et pointue du noyau de spermatozoïde.
- Les spermatozoïdes sont des cellules très allongées, environ 57 μm chez le lapin, comportant trois parties essentielles : la tête, le col et la queue. La tête a une forme ovoïde, piriforme et rétrécie caudalement, elle possède un noyau qui occupe la plus grande partie, il est constitué de chromatine très condensée. En arrière, on observe une région post-acrosomiale. Le col est un segment court reliant la tête à la queue, il contient des centrioles dont l'un donne naissance à l'axonème du flagelle. La queue est subdivisée en trois segments : La pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (Le Roux, 2002 ; Figure 8).

2.1.3.4. Le tissu interstitiel et cellules de Leydig

Le tissu interstitiel est un tissu conjonctif lâche, riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques et en terminaisons nerveuses, dans lequel les cellules de Leydig sont réparties en amas (Wrobel, 1990). La quantité du tissu interstitiel varie selon l'espèce, elle représente environ 10% du tissu testiculaire chez le cobaye, de 25 à 30% chez l'homme et environ 40% chez le ver rat (Dadoune et Demoulin, 2001).

Les cellules de Leydig, également connues sous le nom de cellules interstitielles du testicule, sont des cellules polygonales soit isolées, soit regroupées en amas dans l'espace interstitiel, qui renferme de nombreuses fibres de collagène, séparant les tubes séminifères. Elles ont un noyau rond avec une chromatine dispersée, et un cytoplasme riche en citernes de reticulum endoplasmique lisse et des mitochondries peu nombreuses. Au niveau de la membrane plasmique, de nombreuses jonctions de type Gap et desmosomes ont été mis en évidence (Dadoune et Demoulin, 2001)

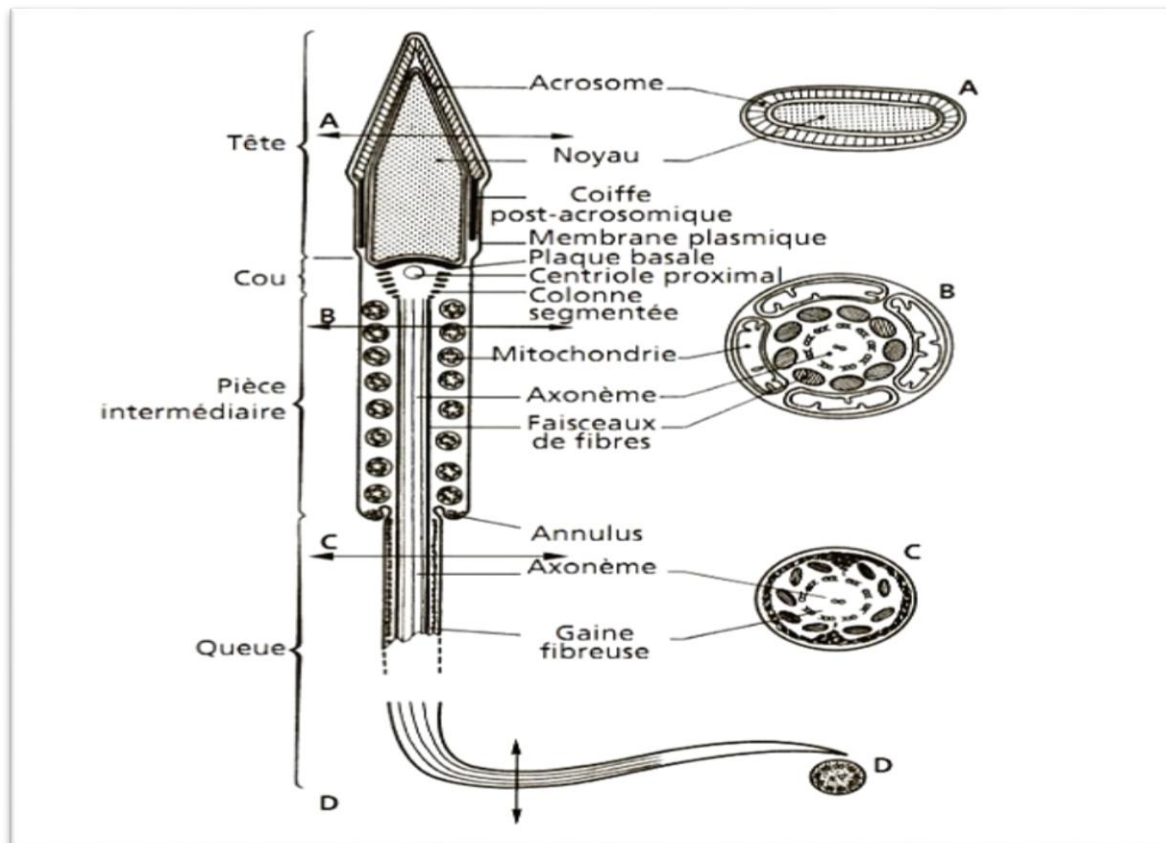


Figure 8 : Représentation schématique d'un spermatozoïde de mammifère (Le Moigne et Foucrier, 2009).

Le rôle principal des cellules de Leydig est de produire et sécréter de la testostérone qui va favoriser le développement des canaux de Wolf durant le stade fœtal et différencier l'appareil génital du fœtus. La testostérone joue aussi un rôle très important dans la maturation des spermatozoïdes durant la puberté. Ainsi les cellules de Leydig synthétisent et libèrent :

- L'ocytocine, qui stimule la contraction des tubes séminifères au niveau des cellules myoïdes périvitubulaires (Johnson et Everitt, 2002).
- L'IGF-1 et sa protéine porteuse (IGF1-BP3).
- L'inhibine qui potentialise les effets de la LH sur la stéroïdogenèse, contrairement à l'activine qui exerce un effet opposé de cette dernière (De Kretser et Hedger, 1996).
- Les facteurs de croissance et les cytokines comme l'EGF, le TGF β et IL-1 (Dadoune et Demoulin, 2001).
- Des peptides dérivés de la pro-opiomélanocortine (POMC) dont la β -endorphine qui est en association avec LH, ils stimulent la synthèse des androgènes lydigiens (Dadoune et Demoulin, 2001).

2.1.4. Fonction de testicule

2.1.4.1. Fonction exocrine du testicule : Spermatogenèse

Le rôle exocrine des testicules consiste en la production des spermatozoïdes au niveau des tubes séminifères qui s'amorce pendant la puberté et se poursuit tout au long de la vie. Au cours de la spermatogenèse, les cellules germinales (spermatogonies) passent par cinq stades différents pour se différencier en spermatozoïdes (Lebas, 2000 et Legrand *et al.*, 1993). Elle débute au niveau de la membrane basale des tubes séminifères où se trouvent les spermatogonies souches qui se multiplient activement par mitose pour donner les spermatocytes I. A la puberté, ces derniers subissent un important croisement et chaque spermatocyte I donne par méiose deux spermatocytes II qui vont subir à leur tour la méiose II pour donner quatre spermatides (Figure 9 ; Tortora et Derrickson, 2009).

La spermiogénèse est la transformation des spermatides en spermatozoïdes. Cette dernière étape se déroule dans les replis cytoplasmiques des cellules de Sertoli, à proximité de la lumière du tube séminifère. A partir de ce stade, il n'y a plus de divisions cellulaires, mais surtout des métamorphoses extrêmement complexes à l'échelle moléculaire et cellulaire pour aboutir à la formation des spermatozoïdes (Schulz *et al.*, 2005).

La durée de la spermatogenèse est constante pour chaque espèce. Elle est de l'ordre de 51,8 jours chez le lapin (Dadoune et Demoulin, 2001), et selon Boussit (1989), cette durée varie de 38 à 45 jours.

Les spermatozoïdes produits sont immatures et ne sont pas encore féconds. Ils acquerront leur pouvoir fécondant au cours de la phase de maturation, au niveau d'épithélium épидидymaire, en subissant plusieurs modifications qui les rendront aptes à reconnaître et à féconder un ovocyte d'une même espèce (Thibault et Levasseur, 2001).

2.1.4.2. Fonction endocrine du testicule : Stéroïdogénèse

La fonction endocrine du testicule est assurée par les cellules de Leydig qui sécrètent les hormones androgènes, notamment la testostérone nécessaire à la spermatogenèse, au développement et au maintien morphologique et fonctionnel des glandes accessoires de l'appareil génitale mâle (Barone, 2001).

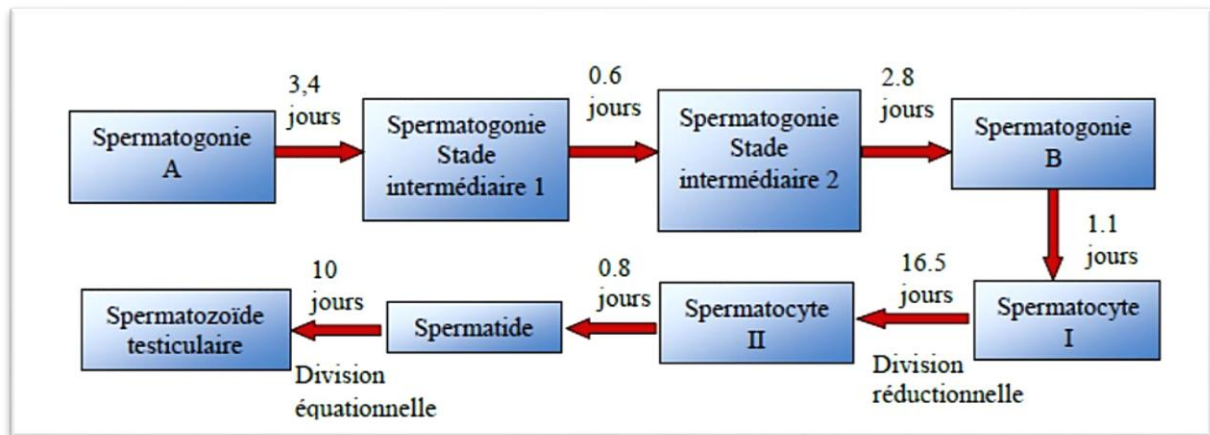


Figure 9 : Cycle spermatogénétique du lapin (Boussit, 1989).

En effet, la testostérone agit directement sur la différenciation des canaux de Wolf, le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires, après son métabolisme en dihydrotestostérone par l'enzyme 5- α réductase dans les tissus périphériques (prostate, épiddyme, vésicule séminale). En association avec la FSH, la testostérone est essentielle pour l'initiation et le maintien de la spermatogénèse. Elle agit sur les cellules de Sertoli et sur les cellules péritubulaires, via des récepteurs spécifiques stimulant indirectement la spermiogénèse par une voie paracrine (Wosnitzer et Paduch, 2013).

2.2. Epididyme

2.2.1. Son anatomie

L'épididyme est un long canal en circonvolution. Il s'étend postérieurement à partir du testicule par un réseau de canaux efférents jusqu'à son pôle inférieur où il devient le canal déférent (Orgebin-Crist et *al.*, 1975 ; Turner, 1995 ; Jones, 1999). L'épididyme comprend trois régions distinctes : une tête au pôle supérieur du testicule ; un corps, le long de sa face postérieure et une queue en forme de U à son pôle inférieur (Figure 10 ; Holtz et Foote., 1978 ; Stevens et *al.*, 2008).

Les spermatozoïdes suivent leurs acheminements en débutant des tubes séminifères, transitant par les tubes droits, le *rete testis* et enfin par les canaux ou cônes efférents qui se jettent dans la tête de l'épididyme (Bongki et *al.*, 2015 ; Reid et Cleland., 1957 ; Hamilton, 1972, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988 ; Hermo, 1995). L'épididyme mesure 5 m chez l'homme, 60 m chez le bélier et 80 m chez l'étalon. Sa paroi comporte un épithélium pseudostratifié reposant sur une lame basale, elle-même entourée de cellules musculaires lisses dont les contractions permettent le transit des spermatozoïdes à ce niveau. (Michel et Jean-François, 2013).

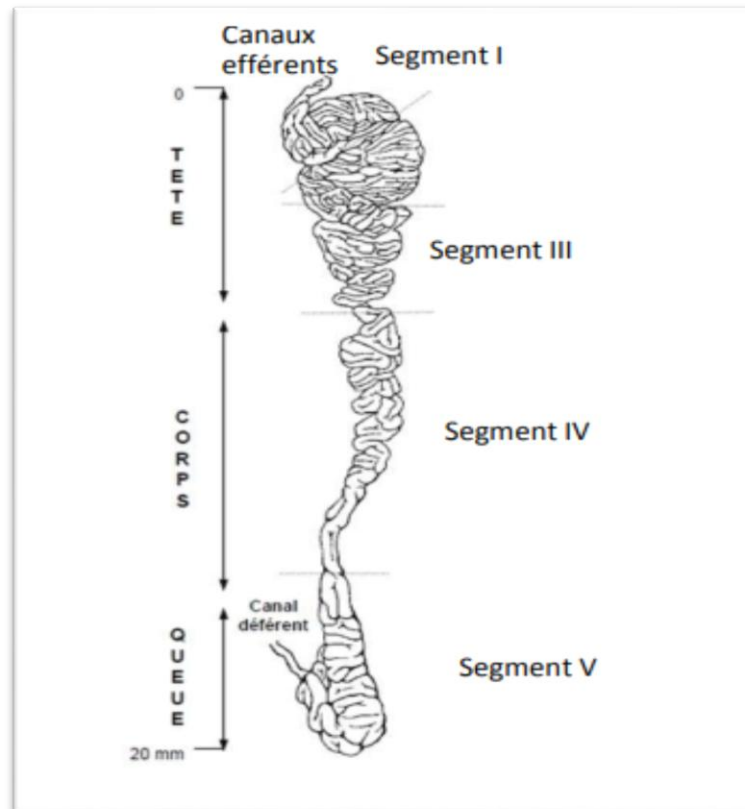


Figure 10 : Anatomie et régionalisation de l'épididyme (Hermo et Robaire, 2002)

2.2.2. Histologie de l'épididyme

L'épididyme est doté d'une paroi cylindrique musculaire lisse bordée par un épithélium pseudostratifié, qui augmente en épaisseur, passant d'une simple couche à trois couches disposées de façon longitudinale, une couche interne, circulaire intermédiaire épaisse et externe (Stevens et *al.*, 2008). A l'extrémité proximale, le muscle se contracte de façon rythmique lente pour participer à la progression des spermatozoïdes vers le canal déférent. Au niveau de l'extrémité distale, ce muscle est riche en innervation permettant une forte contraction de la partie inférieure de l'épididyme afin d'évacuer le sperme (Robaire et Hermo, 1988). L'épithélium épididymaire est composé de six types cellulaires : les cellules basales, étroites, apicales, claires, en halos et principales (Figure 11). Selon la région tubulaire, elles présentent

une variation des caractéristiques structurales et fonctionnelles (Figure 12 ; Robaire et *al.*, 2006; Cornwall, 2009 ; Shum et *al.*, 2011).

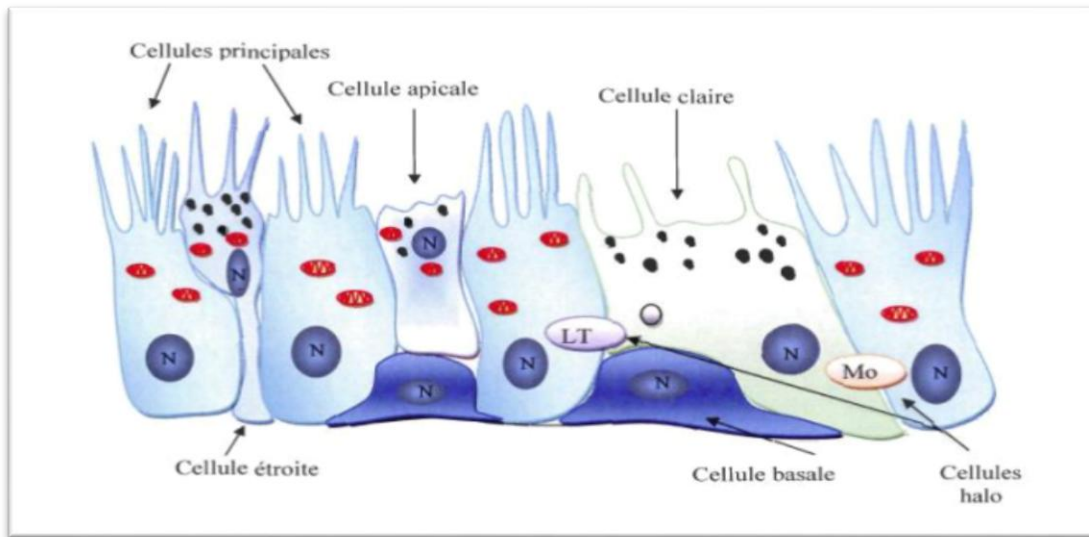


Figure 11 : Représentation schématique de l'épithélium epididymaire (Girouard, 2009). N : noyau ; LT : lymphocyte T ; Mo : monocyte.

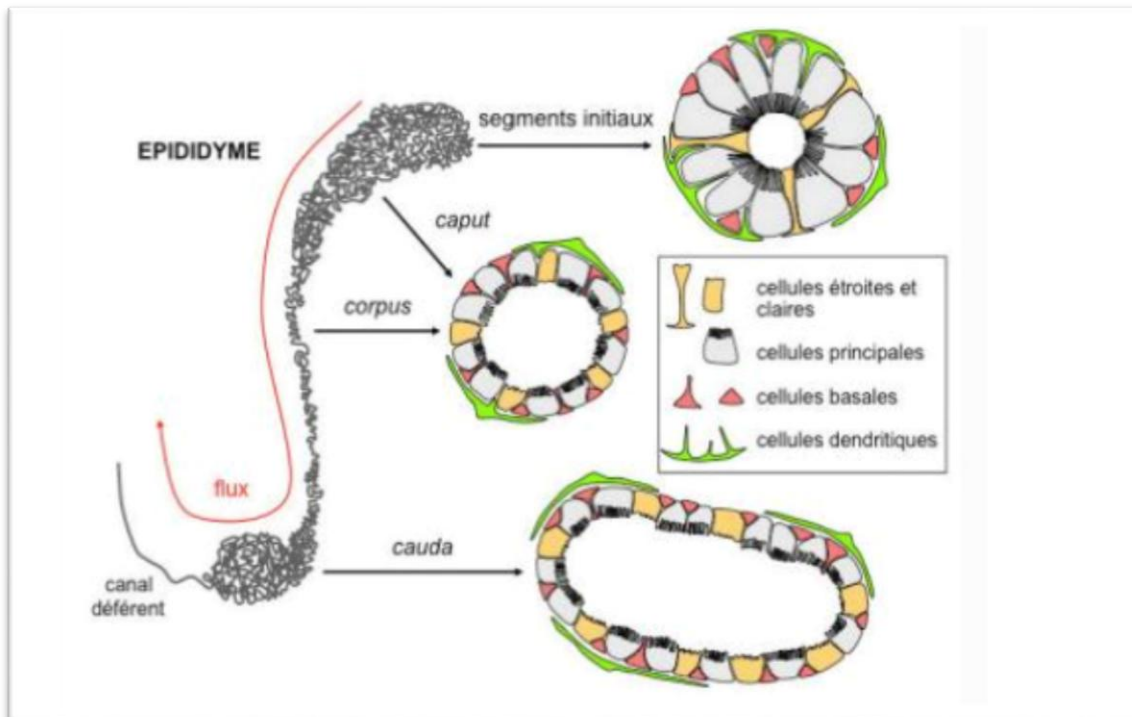


Figure 12 : Schéma représentatif de l'épididyme, illustrant les différents segments et les différents types de cellules épithéliales et dendritiques (Winnie et *al.*, 2011).

2.2.2.1. Les cellules principales

Les cellules principales, nommées aussi les cellules stéréociliées, sont de larges cellules prismatiques, représentant 65-80 % de la population totale des cellules épithéliales au niveau de tout le conduit épидидymaire de tous les mammifères (Trasler *et al.*, 1988). Ces cellules sont caractérisées par des invaginations profondes du cytoplasme apical qui contient des vacuoles membranaires, ornées de stéréocils étroitement alignés (Ramos et Dym, 1977). La hauteur des stéréocils est différente d'un segment à un autre, elles sont plus longues du côté de la lumière du segment initiale, plus basses et régulières au niveau de la tête et du corps, et enfin au niveau caudal, elles sont très minces et très irrégulières, ressemblant à une vraie bordure de broussailles (Flickinger *et al.*, 1978).

A l'exception des mitochondries qui sont présentes tout au long de l'épididyme, les cellules principales présentent des différences structurales d'une région épидидymaire à l'autre (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988). Ces différences concernent l'apparence et l'organisation de l'appareil sécrétoire (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et les granules sécrétoires) et l'appareil endocytaire, tels que les endosomes et lysosomes (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988 ; Hermo *et al.*, 1994a).

Selon Cooper 1998, les cellules principales sont reliées entre elles par des jonctions serrées et des desmosomes, elles sont très actives en ce qui concerne le transport, la sécrétion de petites molécules organiques, la synthèse de protéines et la résorption du fluide épидидymaire.

2.2.2.2. Les cellules Basales

Les cellules basales représentent 12 à 20 % de la population des cellules épидидymaires (Veri *et al.*, 1993). Elles sont distribuées tout au long de l'épididyme (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988) et sont plus nombreuses dans la tête et le corps que dans le segment initial mais rares dans la queue (Ramos et Dym, 1977). Ces petites cellules, reposant sur la lame basale, forment une couche sur toute la longueur du conduit épидидymaire (Figure 11) et leur membrane présente des interdigitations complexe avec celle des cellules principales via des desmosomes (Jones *et al.*, 1979). Des substances sécrétées par la cellule basale régulent la fonction des cellules principales. Les cellules basales sont un moyen de protection immunitaire des spermatozoïdes et fait partie des composants de la barrière hémato-épидидymaire (Robaire *et al.*, 2006).

2.2.2.3. Les cellules Halo

Les cellules halo sont présentes au niveau de tout le tubule (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo, 1988). Elles contiennent de nombreux organes et sont caractérisées par des

pseudopodes cytoplasmiques qui leurs permettent de dépasser et de s'étendre entre les cellules principales (Figure 11 ; Ramos et Dym, 1977). La présence de jonctions spécialisées et complexes avec la membrane plasmique des cellules principales, permet de les considérer comme des monocytes ou lymphocyte intraépithéliaux (Robaire et Hermo, 1988 ; Robaire et Viger, 1995 ; Cooper, 1998). Ce sont des cellules qui migrent durant le développement post-natale (Hoffer et *al.*, 1973).

2.2.2.4. Les cellules claires

Les cellules claires, nommées aussi les cellules mousseuses ou holocrines, se trouvent uniquement dans le corps, et la queue de l'épididyme (Sun et Flickinger, 1979 ; 1980 ; Moore et Bedford, 1979 ; Abou-Haila et Fain-Maurel, 1984 ; Robaire et Hermo, 1988 ; Adamali et Hermo, 1996). Ces grosses cellules prismatiques permettent l'absorption des substances de la lumière épидидymaire par pinocytose et la sécrétion des glycoprotéines (Moore et *al.*, 1979 ; Martinez-Garcia et *al.*, 1995).

2.2.2.5. Les cellules apicales

Les cellules apicales sont appelées ainsi car leur noyau sphérique est situé au niveau apical. Elles ne sont pas en contact avec la membrane basale et sont présentes au niveau du segment initiale, et en quantité moins dans la tête et le corps (Adamali et Hermo, 1996). Ces cellules possèdent un cytoplasme qui s'étend de la base de l'épithélium à la lumière tubulaire, riche en mitochondries (Robaire et Hermo, 1988 ; Robaire et Viger, 1995 ; Cooper, 1998). Elles collaborent avec les cellules principales par la sécrétion holocrine qui permet la résorption du liquide testiculaire et l'acidification du fluide épидидymaire (Martinez-Garcia et *al.*, 1995).

2.2.2.6. Les cellules étroites

Les cellules étroites sont localisées seulement dans le segment initial et la zone intermédiaire du canal. Elles sont plus étroites que les cellules principales adjacentes, dont elles se distinguent par l'expression de différentes protéines (Adamali et Hermo, 1996). Elles envoient de minces processus cytoplasmiques du côté apical et atteignent la membrane basale du côté opposé (Sun et Flickinger, 1979, 1980 ; Moore et Bedford, 1979 ; Abou-Haila et Fain-Maurel, 1984 ; Robaire et Hermo, 1988 ; Adamali et Hermo, 1996). Ces cellules jouent un rôle important dans la sécrétion d'ions H^+ dans la lumière épидидymaire (Herme et *ai.*, 2000a).

2.2.2.7. La lumière du canal épидидymaire

Elle contient le fluide épидидymaire et les spermatozoïdes, qui en transitant à travers ce conduit, acquièrent la capacité de réguler leurs volumes cellulaires, éventuellement par

l'absorption des composants lumineux qui fonctionnent comme une réserve d'osmolytes (Cooper et Yeung, 2003 ; Cooper, 2007). La composition du fluide de la lumière diffère d'une région à une autre de l'épididyme, on y trouve des ions, des petites molécules organiques, des protéines et des macromolécules, comme les glycoprotéines (Cornwall, 2009). Selon Hermo et Robaire (2002), il existe des variations d'activité du fluide épидидymaire tout le long du tubule.

2.2.3. Sa fonction

La fonction principale de l'épididyme est l'accumulation, le stockage et la maturation des spermatozoïdes, dont la capacité de la mobilité s'effectue au niveau de l'épididyme (Stevens et *al.*, 2008).

L'épididyme assure la sécrétion de protéines et de glycoprotéines qui interviennent dans la fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide et leurs permet d'obtenir le pouvoir fécondant (Michel et Jean-François., 2013). Aussi, il joue un rôle important dans la mobilité des spermatozoïdes, et ce en participant à l'élaboration du liquide épидидymaire via l'ajout des ions, des molécules organiques sous forme d'inositol et d'acétylcanitine (Cornwall., 2009). De plus, l'épididyme est responsable des fonctions métaboliques, en stimulant la glycolyse au niveau des cellules épидидymaires par la résorption du liquide, il induit l'activation du métabolisme des acides gras, la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone, la biosynthèse des prostaglandines et le métabolisme de la vitamine D (Garrett et *al.*, 1990). En revanche, la maturation épидидymaire des spermatozoïdes entraîne des modifications structurales, biochimiques et métaboliques par l'augmentation de la condensation de la chromatine avec l'établissement de ponts disulfures entre les cystéines des protamines, la maturation des enzymes de l'acrosome, la disparition de la gouttelette cytoplasmique au sein de la pièce intermédiaire, l'augmentation de la fluidité membranaire due à des modifications de la composition du liquide membranaire, la modification de la composition en protéines et la diminution des phospholipides induisant une augmentation des stérols et de la sensibilité membranaire (Reyes-Moreno et *al.*, 2008).

Les spermatozoïdes sont immobiles dans leur milieu natif, ils acquièrent la mobilité au cours de leur passage par l'épididyme. Ainsi, au niveau de la tête apparaissent les mouvements vibratiles, au sein du corps, les mouvements deviennent circulaires et au niveau caudal il y a acquisition de mobilité linéaire et progressive. Après avoir subi toutes ces modifications, les spermatozoïdes contenus dans la région caudale de l'épididyme ont la capacité de se protéger de la glaire cervicale pour commencer la capacitation (Michel et Jean-François, 2013).

Chapitre II :
Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes

Pour répondre à l'objectif de notre travail de mémoire qui est de mettre en évidence et de déterminer l'importance des protéines du cytosquelette sous-membranaire, en l'occurrence les dystrophines et les protéines associées, dans les changements morphologiques qui se produisent au cours du développement des principaux organes de reproduction, nous avons abordé l'étude expérimentale par une analyse histo-morphométrique et un examen immunohistochimique des dystrophines au niveau des structures du testicule et de l'épididyme.

Les manipulations expérimentales ont été faites :

- au laboratoire des ressources naturelles (FSB-USTHB) où les animaux ont été sacrifiés et les organes prélevés et prétraités jusqu'à la confection des blocs en cassettes. Cette étape a été faite par les étudiantes de Master de Biologie et Physiologie de la Reproduction, année 2019.
- Le Laboratoire d'Anatomo-Pathologie (LAP) de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire (ENSV) d'Alger, où nous avons fait des coupes histologiques.
- Le Laboratoire de Physiologie Animale (LPA) de la Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques (FSBSA) de L'UMMTO où nous avons procédé au marquage des dystrophines par la méthode immuno-histochimique à la peroxydase.

Notre part d'intervention a démarré le 07 mars 2023 au LAP de l'ENSV d'Alger et s'est poursuivie sans interruption au LPA de la FSBSA de l'UMMTO jusqu'à la fin de la partie pratique.

1.1. Matériel biologique

Les lapins utilisés dans cette étude sont tous des males de la souche synthétique. Cette souche est initiée en 2003 à l'Institut Technique des Elevage Baba-Ali (ITELV) en collaboration avec l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Toulouse (INRA). Cette souche est obtenue par insémination artificielle entre des mâles de souche paternelles sélectionnée INRA2666 (France) et des femelles de population blanche locales. Elle est caractérisée par une prolificité importante, un poids adulte sensiblement plus élevé et une meilleure aptitude à la croissance que la population locale Algérienne (Lebas *et al.*, 2010).

Les sept lapins utilisés, sont livrés par le Centre d'Elevage Cunicole de Tizirt et sont répartis en 3 lots :

1^{er}lot : 3 lapins âgés de 1 mois (Petit)

2^{ème}lot : 3 lapins âgés de 3 mois (Jeunes)

3^{émé}lot : 1 lapin âgé de 6 mois (Adulte)

Le lapin (*Oryctolagus cuniculus* ; Figure 13) est une espèce considérée comme un animal domestique. Il est aussi l'un des modèles de recherche scientifique car il offre plusieurs avantages dans le domaine de la reproduction animale (JOLY *et al.*, 2000).

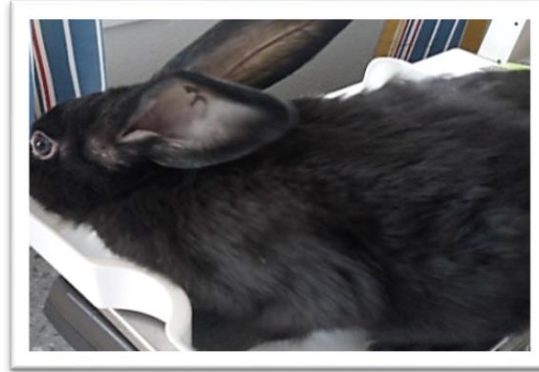


Figure13 : Photographie d'un lapin âgé de 3 mois (2019).

Selon Grasse, 1949 et Lebas *et al.*, 1984, la position taxonomique du lapin est la suivante :

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

1.2. Sacrifices et prélèvement des organes

Les lapins ont été pesés avant d'être sacrifiés par décapitation. Ensuite, les animaux ont été disséqués (Figure 14 A) et leurs organes reproducteurs (épididymes et testicules) ont été prélevés (Figure 14 B).

Les étapes de la dissection sont les suivantes :

- Retrait de la peau pour faciliter la dissection et pour repérer les organes reproducteurs superficiels.
- L'identification des organes reproducteurs après l'ouverture de la cavité abdominale.
- Isolement et prélèvement des testicules et des épididymes.

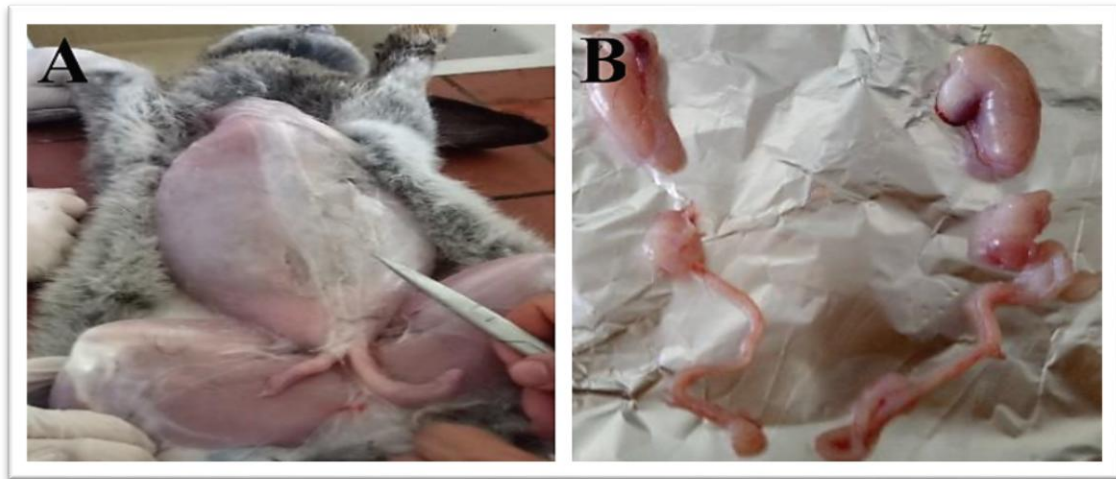


Figure 14 : Photographie montrant l'étape de dissection et de prélèvement (2019).
Lapin disséqué (A) ; Testicules, épидидymes prélevés (B).

1.3. Traitements des échantillons et confection des coupes histologiques

1.3.1. Fixation

Après le prélèvement, les organes (épididymes et testicules) ont été fixés immédiatement dans une solution de formol à 10% (Figure 15 A). Cette étape a pour but de conserver les tissus dans un état aussi proche que possible de leur état vivant. Elle permet le durcissement des échantillons et l'inhibition de l'action

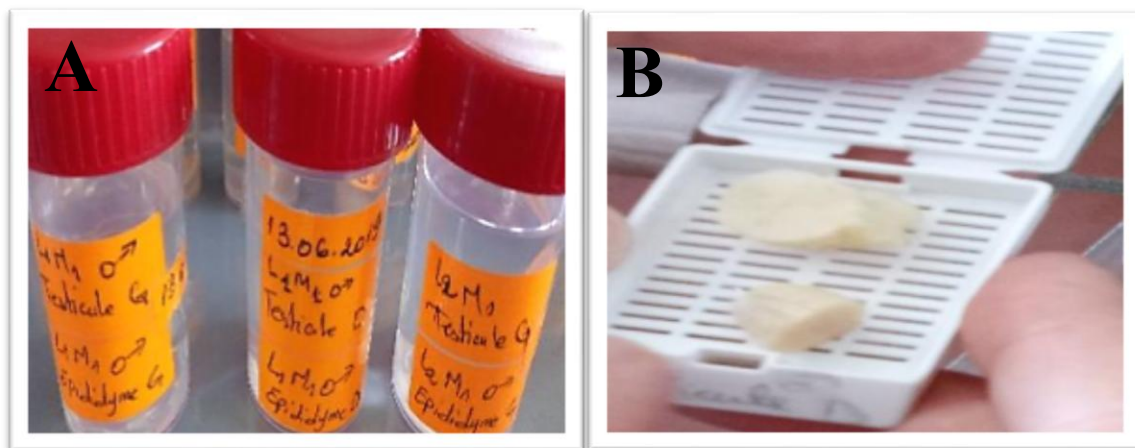


Figure 15 : Photographie montrant l'étape de la fixation (2019).
Testicule et épидидyme dans le formol 10% (A) ; Coupes de testicule dans une cassette (B).

1.3.2. Déshydratation et clarification

Les échantillons fixés dans la solution aqueuse ne peuvent pas être imprégnés de paraffine directement, d'où l'intérêt de la déshydratation dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (70°, 96°, 100°) pendant 2 heures pour chacun.

Comme la paraffine n'est pas miscible dans l'éthanol, les tissus sont placés dans 3 bains successifs de xylène. Chaque bain dure 2h également.

1.3.3. Imprégnation

Elle se fait par un passage des organes dans 3 bains successifs de paraffine à 60°C, de 2 heures chacun. Le premier bain est un mélange d'un volume de paraffine et le même de xylène. Les deux autres bains sont composés de paraffine pure.

1.3.4. Inclusion ou enrobage

Les échantillons sont placés dans des moules spécifiques dont les formes sont adaptées aux dimensions de l'organe, qui seront ensuite remplis par de la paraffine fondue à 60°C dans l'appareil d'enrobage (Figure 16 A). Les cassettes sont respectivement placées à la surface des moules selon la codification initiale, un coulage de paraffine est réalisé dans les moules jusqu'à immersion totale de l'échantillon. Les cassettes sont ensuite déposées sur une plaque refroidissante afin de permettre le durcissement ou la rigidification du bloc (Figure 16 B).



Figure 16 : Photographie montrant l'étape d'inclusion (2019).
Appareil d'inclusion (A) ; Solidification des échantillons sur une plaque refroidissante (B).

1.3.5. Confection des coupes

Nous avons réalisé cette étape au niveau de laboratoire d'Anatomie-Pathologie (ENSV). Le passage des blocs de paraffine contenant l'échantillon à travers le rasoir du microtome (Figure 17 A) permet de réaliser des coupes de 5µm d'épaisseur disposées en série sous formes de rubans. Ces derniers sont ensuite placés dans un bain-marie chauffé à 40°C (Figure 17 B) afin de permettre le dépliage du tissu. Les coupes sont retirées de l'eau, récupérées sur des lames gélatinées et mises à sécher sur une plaque chauffante pour 15 min (Figure 17 C).



Figure 17 : Photographie de l'étape de confection des coupes et étalement (Photos originales, 2023)

A. Microtome ; B. Bain marie ; C. Plaque chauffante pour le séchage des lames.

1.4. Examen immunohistochimie (IHC)

L'immunohistochimie est une technique d'histologie visant à localiser une protéine donnée dans un tissu ; dans notre expérimentation il s'agit de la dystrophine dans le testicule et l'épididyme.

Le principe de l'IHC repose sur la reconnaissance d'un antigène par un anticorps spécifique et la révélation de ce complexe antigène-anticorps par une réaction chimique grâce à une enzyme et son substrat. En général, l'enzyme est la HRP (Horse Radish Peroxidase) et son substrats l'AEC et le DAB pour la HRP

1.4.1. Déparaffinage des lames et hydratation des coupes

Sur une plaque chauffante (Figure 18), les lames sont posées afin de ramollir la paraffine du tissu.



Figure 18 : Plaque chauffante (Photo originale, 2023).

Les lames sont ensuite passées directement dans une série de bains, pour une durée de 5 minutes pour chacun (Figure 19) :

- Deux bains de xylène.
- Trois bains d'alcools successifs à des degrés décroissants (100°, 95°, 70°).
- Un rinçage à l'eau de robinet pour réhydrater les tissus.

Avant de continuer avec le reste des étapes du protocole, nous avons délimité les zones où les tissus étaient présents (Figure 20).



Figure 19 : Batterie de la réhydratation (photo originale, 2023)

1.4.2. Perméabilisation

Cette étape permet la perméabilisation du tissu afin de maintenir ce dernier aussi proche que celui d'un être vivant. Cette étape se fait par :

- Le détergent Tween 0,1% dans du tampon phosphate salin (PBS) pendant cinq minutes.
- Deux lavages avec du PBS, de 5 minutes chacun.

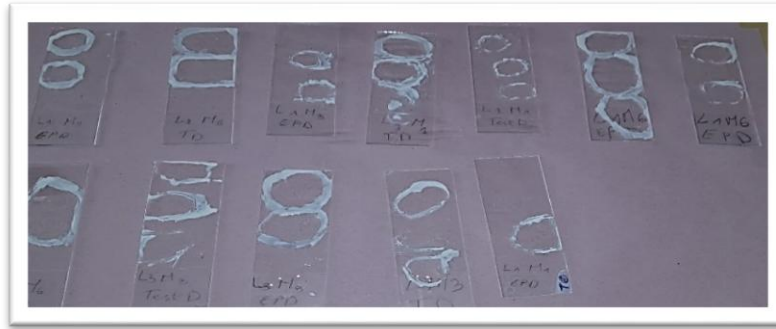


Figure 20 : La délimitation des tissus sur les lames en verre (photo originale, 2023).

1.4.3. Blocage par la peroxydase et la protéine Block

La solution bloquant l'activité de la peroxydase endogène est appliquée pendant une quinzaine de minutes (Figure 21). Après deux lavages au PBS, de 5 mn chacun, le blocage des protéines endogènes est fait en appliquant sur les lames quelques gouttes de la solution Protein Block pendant 15 mn (Figure 21).

1.4.4. Incubation avec l'anticorps primaire

Après deux lavages au PBS de 5 minutes chacun. L'incubation avec l'anticorps primaire (H4 : un polyclonal qui reconnaît toutes les dystrophines) est réalisée pour toutes les lames (A l'exception du témoin négatif) pendant toute la nuit à 4°C.

1.4.5. Incubation avec l'anticorps secondaire

Le lendemain, après deux rinçages au PBS de cinq minutes chacun, nous avons procédé à l'incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé pendant 30 mn pour toutes les lames même le témoin et à la fin de cette étape, les lames sont rincées de la même façon que les étapes précédentes.

1.4.6. Amplification et révélation du signal

Les lames sont incubées avec un complexe streptavidine-peroxydase (0,1% ; HRP Novo polymère) pendant 30 min, puis rincer avec du PBS deux fois 05 min chacun.

Après cette étape, la révélation est faite en utilisant le chromogène Diamino-benzidine-tetrahydrochloride (DAB) dans un tampon de substrat DAB (avec un rapport de 50/1) mélangé à H₂O₂ (0,1%), Le virement de couleur est surveillé à l'œil nu, dès que la couleur brune apparaît, les coupes sont rincées à l'eau.

1.4.7. Contre coloration

Les coupes sont mises en contact d'une solution de 0.1% d'hématoxyline pendant 5 mn. Cette étape est essentielle pour visualiser les noyaux et elle est suivie d'un rinçage à l'eau du robinet.

1.4.8. Déshydratation et montage des lames

Il s'agit d'effectuer trois bains d'éthanol successifs à des degrés croissantes (70°, 95°, 100°) ; puis deux bains de xylène, une minute pour chacun. Après la déshydratation, le montage des coupes entre lame et lamelle est fait avec le liquide de montage, l'Eukit (Figure 21),

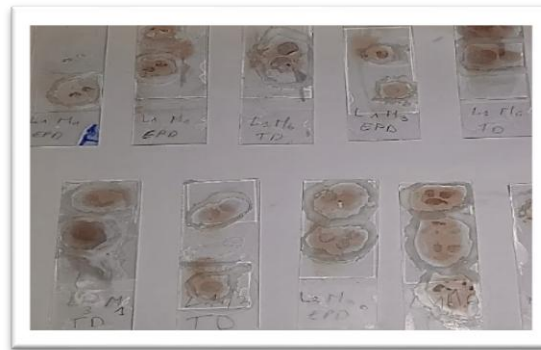


Figure 21 : Montage des coupes entre lame et lamelle à l'aide de l'Eukit (Photo originale, 2023).

1.5. Observation des lames

L'observation des coupes s'est faite à l'aide d'un microscope photonique équipé d'un appareil photo branché à un ordinateur (Figure 22). Des microphotographies ont été prises avec le grossissement 40x pour l'observation à grande échelle qui permet de cerner la morphologie générale des tissus et ensuite avec les grossissements 100x et 400x pour une observation plus fine qui permet l'examen structural, morphométrique mais aussi l'estimation de l'importance des dystrophines dans les tissus analysés.

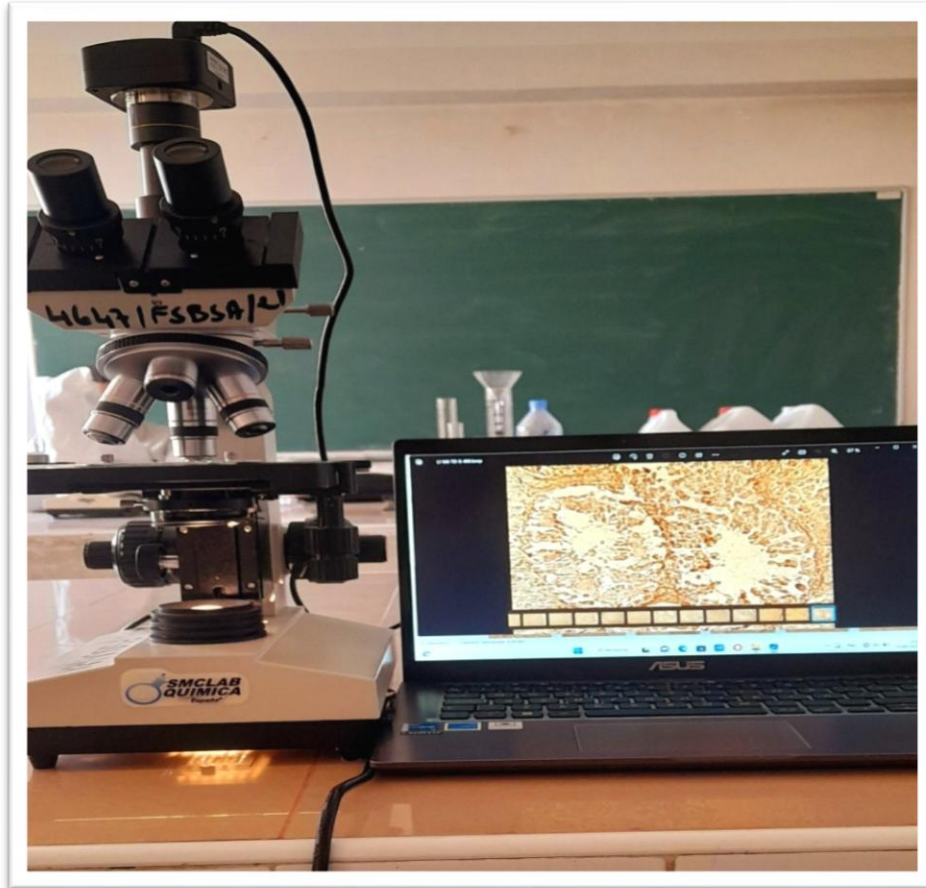


Figure 22 : Microscope photonique équipé d'un appareil photo connecté à un ordinateur.
(Photo originale, 2023)

1.6. Etude histomorphométrique

L'objectif de l'analyse histomorphométrique des images numériques des coupes histologiques des structures testiculaires et épидидymaires est l'extraction de l'information pour des mesures quantitatives et qualitatives. Nous avons réalisé cette étude à l'aide du logiciel « Axio Vision Rel.4.8 ». Les mesures concernent pour le testicule, la surface des tubes séminifères, leur diamètre, celui de leur lumière, la surface du tissu interstitiel, de l'épithélium séminifère, et enfin, la taille des noyaux des cellules de Sertoli et des spermatogonies pour le testicule. Pour l'épididyme, les mesures concernent sa surface, sa lumière, son diamètre, la hauteur des cellules principales et la surface des noyaux des cellules principales.

1.7. Etude statistique

Les résultats de l'étude morphométrique sont représentés par moyennes \pm l'erreur standard.

Les tests de normalité et d'homogénéité des variances ont été appliqués pour vérifier une série d'observation.

La comparaison de la moyenne pour les 3 groupes a été faite comme suit ; si la normalité et l'homogénéité sont vérifiées, on utilise un test paramétrique de l'ANOVA.

Le calcul du degré de significativité s'est fait entre les valeurs moyennes, la significativité est définie pour une probabilité p :

Si $p > 0.05$: La différence est non significative (NS)

Si $p < 0.05$: La différence est significative *

Si $p < 0.01$: La différence est très significative **

Si $p < 0.001$: La différence est hautement significative ***.

Résultats et discussion

2. Résultats

Dans cette partie, nous présentons d'une part les résultats relatifs aux variations histologiques et histomorphométriques et d'autre part, ceux de l'expression et la distribution des dystrophines au niveau du testicule et de l'épididyme en fonction de l'âge (1, 3 et 6 mois) chez le lapin mâle.

2.1. Aspects histologiques du testicule et de l'épididyme au cours du développement

2.1.1. Histologie du testicule

L'examen microscopique de l'aspect histologique des coupes de testicules de lapin a permis d'identifier des changements morphologiques en fonction de l'âge.

A l'âge d'un mois, au faible grossissement ($\times 100$), les tubes séminifères contournés sont bien visibles. Ils sont situés dans les lobules testiculaires qui sont séparés par des cloisons testiculaires, et entourés d'une gaine conjonctive composée d'une membrane basale, des fibrocytes et des fibres de collagène (**Figure 23A**).

Au fort grossissement ($\times 400$), les tubes séminifères apparaissent sous différents aspects, la majorité sont dépourvus de lumière (**Figure 23B**). Par ailleurs, la paroi des tubes séminifères est formée d'une lignée de cellules germinales ou spermatogonies. Nous avons aussi identifié les cellules de Sertoli, avec des noyaux de forme irrégulière ; ces cellules s'étendent jusqu'à la lumière des tubes séminifères. Enfin, autour des tubes séminifères, du tissu conjonctif interstitiel renfermant les cellules de Leydig (**Figure 23B**).

A l'âge de trois mois, au faible grossissement ($\times 100$), les tubes séminifères apparaissent en différentes sections, certaines transversales, d'autres longitudinales, leurs diamètres sont aussi variables (**Figure 23C**). La plupart des tubes séminifères présentent un début de formation de la lumière qui est très claire.

Au fort grossissement ($\times 400$), les spermatogonies paraissent en contact avec les cellules myoïdes bordant l'épithélium des tubes séminifères et les cellules de Sertoli ont des formes variables (**Figure 23D**). Dans la lumière des tubes séminifères qui donne l'impression d'être vide, nous avons pu identifier des spermatocytes I, des spermatides, caractérisés par leur forme ronde, mais pas de spermatozoïdes. De plus, nous avons reconnu les cellules de Leydig dans l'espace interstitiel qui s'est rétréci par rapport à celui des testicules d'un mois (**Figure 23D**).

A l'âge de six mois, au faible grossissement ($\times 100$), nous avons constaté que la plupart des tubes séminifères sont collés les uns aux autres et que leur épithélium s'est bien épaissi, délimitant une lumière rétrécie comparativement à son apparence au 3^{ème} mois (**Figure 23E**). La lumière de certains tubes séminifères contiendrait des spermatozoïdes (**Figure 23E**).

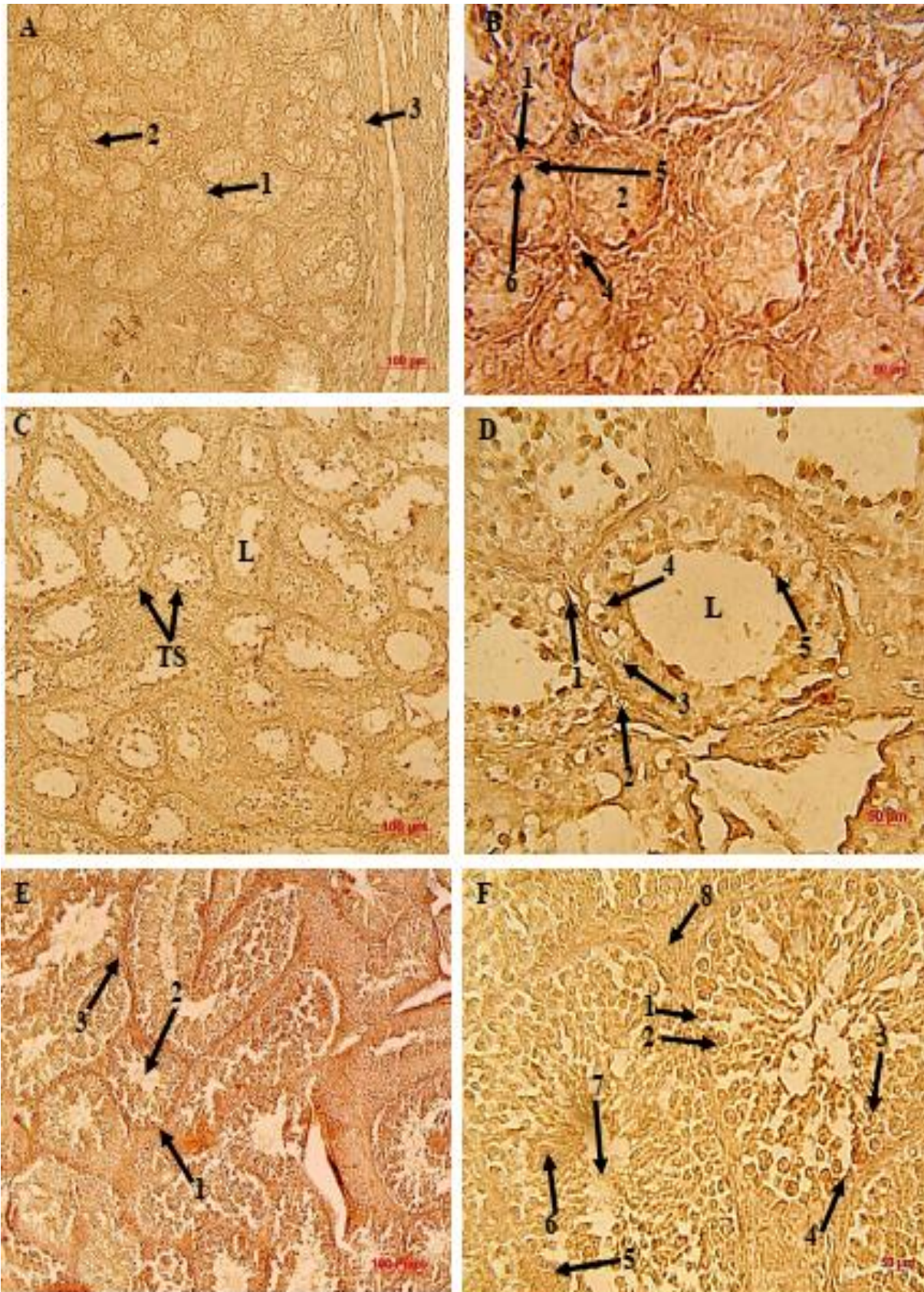


Figure 23 : Structure histologique du testicule du lapin à différents âges : 1 mois (A et B), 3 mois (C et D) et 6 mois (E et F).

Légende de la figure 23 :

A et B : Structure du testicule des lapins âgés de 1 mois au grossissement $\times 100$ et $\times 400$

Légende A :

- (1) : lobule testiculaire.
- (2) : cloison testiculaire.
- (3) : gaine limitante du tube séminifère.

Légende B :

- (1) : tube séminifère.
- (2) : lumière.
- (3) : tissu interstitiel.
- (4) : cellule de Leydig.
- (5) : spermatogonie.
- (6) : spermatocyte I.

C et D : Structure de testicule des lapins âgés de 3 mois au grossissement $\times 100$ et $\times 400$.

Légende C :

- (L) : lumière.
- (TB) : tube séminifère.

Légende D :

- (1) : cellule myoïde.
- (2) : cellule de Leydig.
- (3) : spermatogonie.
- (4) : spermatocyte.
- (5) : spermatide.
- (L) : lumière.

E et F : Structure de testicule de lapins âgés de 6 mois au grossissement $\times 100$ et $\times 400$.

Légende E :

- (1) : tube séminifère.
- (2) : lumière.
- (3) : tissu interstitiel rétréci

Légende F :

- (1) : spermatogonie.
- (2) : spermatocyte.
- (3) : spermatide rond.
- (4) : cellule myoïde.
- (5) : cellule de sertoli.
- (6) : spermatide allongée.
- (7) : spermatozoïde.
- (8) : tissu interstitiel.

Au fort grossissement ($\times 400$), nous avons reconnu au niveau du tissu inter-tubulaire des cellules de Leydig, éparses ou groupées en îlots (**Figure 23F**). En examinant les tubes séminifères de l'extérieur vers l'intérieur on distingue : les cellules de Sertoli dont les limites cellulaires ne sont pas visibles, les cellules de la lignée spermatogénétique, nous reconnaissons les spermatogonies de petites tailles à proximité de la membrane basale, les spermatocytes I de plus grandes tailles, les spermatides de forme ronde et enfin en contact avec la lumière des spermatides allongés et des spermatozoïdes dans la lumière (**Figure 23F**).

2.1.2. Histologie de l'épididyme

L'examen microscopique de l'aspect histologique des coupes de l'épididyme de lapin a permis d'identifier des changements morphologiques en fonction de l'âge.

A l'âge d'un mois, au faible grossissement ($\times 100$), l'observation des lumières des tubes épидидymaires de petite taille, dépourvue de sécrétion épидидymaire et de spermatozoïdes. Ces canaux sont entourés d'une capsule épaisse composée de tissu conjonctif (**Figure 24A**).

Au fort grossissement ($\times 400$), nous constatons que les tubes épидидymaires possèdent un épithélium pseudostratifié, doté de cellules cubique de taille régulière dont les cellules principales (**Figure 24B**).

A l'âge de trois mois, au faible grossissement ($\times 100$), le diamètre de la lumière des tubes épидидymaires est de taille moyenne (**Figure 24C**). L'apparition de stéréocils au niveau épithéliale, de plus la présence d'une faible sécrétion épидидymaire au niveau de certains tubes, alors que d'autres sont vides, mais pas de spermatozoïdes (**Figure 24C**).

Au fort grossissement ($\times 400$), l'apparition d'un épithélium pseudostratifié doté de différent type cellulaire : les cellules avec des stéréocils au niveau apicale, les cellules principales qui s'étendent jusqu'au centre des tubes épидидymaire et les cellules basales à la base des canaux épидидymaires (**Figure 24D**).

A l'âge adulte, 6 mois, au faible grossissement ($\times 100$), la lumière des tubes est irrégulière, la présence de sécrétions et de spermatozoïdes (**Figure 24E**).

Au fort grossissement ($\times 400$), une grande quantité de spermatozoïdes est relevée, un épithélium cylindrique pseudostratifié délimite la lumière des tubes épидидymaires, la part conjonctive se rétrécit et devient relativement à celle des autres âges moins importante (**Figure 24E**).

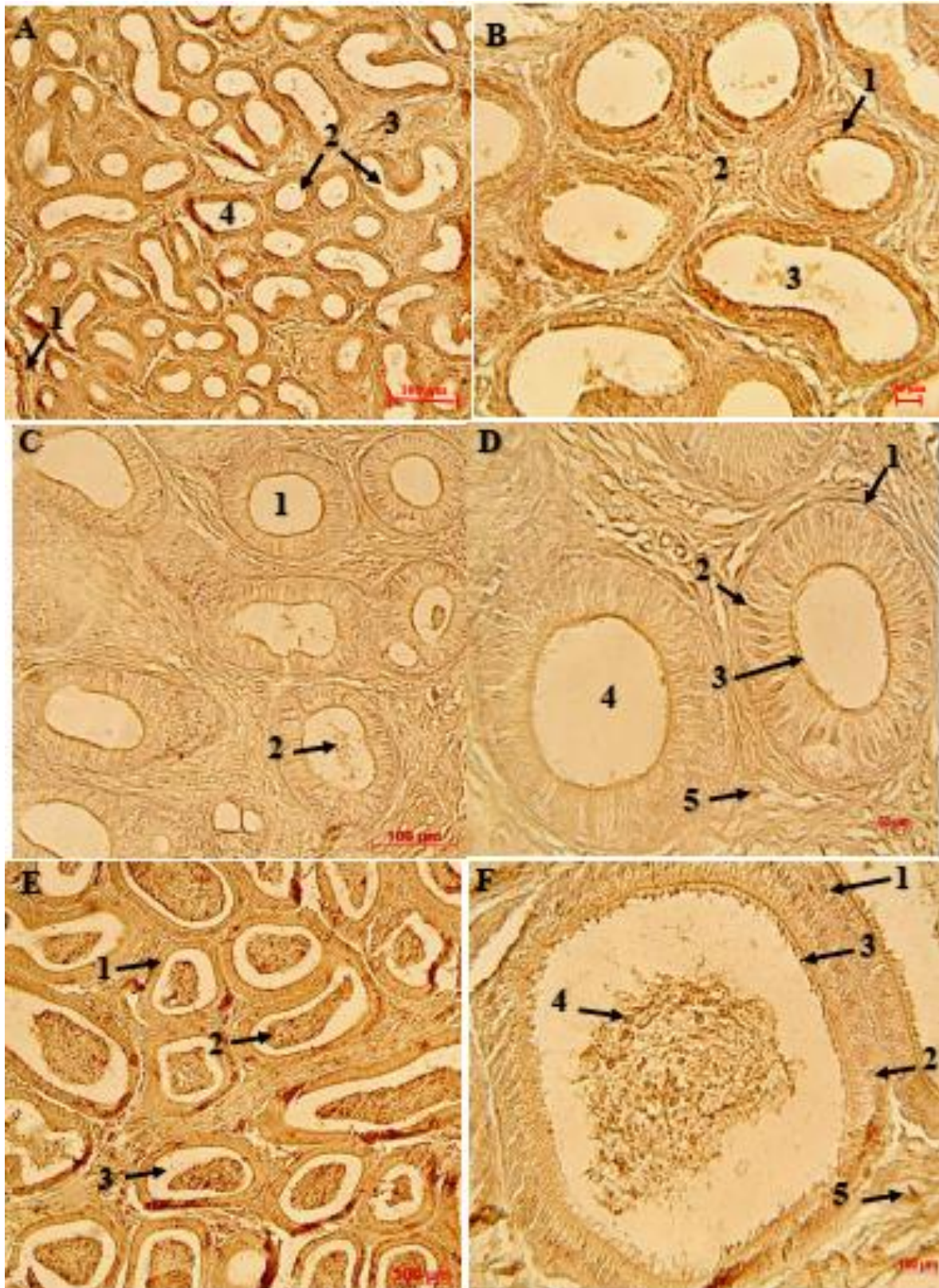


Figure 24 : Structure histologique d'épididyme du lapin en fonction d l'âge

Légende de la figure 24 :

A et B : Structure de l'épididyme des lapins âgés de 1 mois au grossissement $\times 100$ et $\times 400$

Légende A :

- (1): capsule conjonctive.
- (2): tubes de l'épididyme.
- (3): musculuse.
- (4): lumière.

Légende B :

- (1): épithélium.
- (2): musculuse.
- (3): lumière.

C et D : Structure de l'épididyme des lapins âgés de 3 mois au grossissement $\times 100$ et $\times 400$

Légende C :

- (1): lumière vide.
- (2) : une sécrétion épидидymaire.
- (3) : stéréocils.
- (4) : lumière.
- (5) : fibres musculaires lisses.

Légende D :

- (1): cellule basale.
- (2) : cellule principale.

E et F : Structure de l'épididyme de lapins âgés de 6 mois au grossissement $\times 100$ et $\times 400$

Légende E :

- (1): épithélium.
- (2): spermatozoïdes.
- (3) : lumière. (3): stéréocils.
- (4) : spermatozoïdes.
- (5) : fibres musculaires lisses.

Légende F :

- (1): cellule basale.
- (2): cellule principale.

2.2. Aspects histo-morphométriques du testicule et de l'épididyme au cours du développement

2.2.1. Histomorphométrie du testicule

2.2.1.1. Diamètre des tubes séminifères

La mesure du diamètre des tubes séminifères (TS) a révélé une augmentation progressive et hautement significative ($p < 0.001$) de ce paramètre au cours de développement. En effet, le diamètre des TS est de $43,17 \pm 1,75 \mu\text{m}$ à 1 mois d'âge, puis il passe à $108,5 \pm 3,31 \mu\text{m}$ à l'âge de 3 mois, pour atteindre la valeur de $205,8 \pm 24,58 \mu\text{m}$ au 6^{ème} mois (Figure 25).

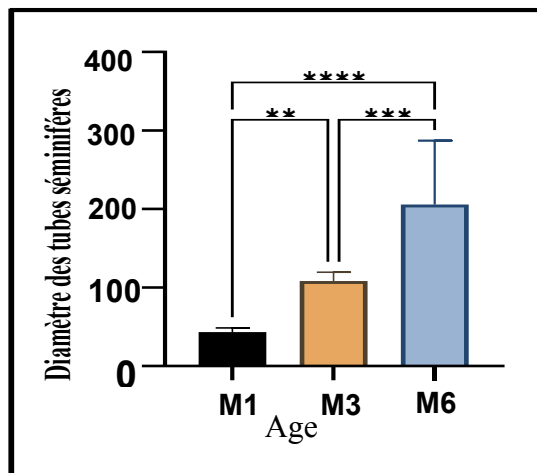


Figure 25 : Evolution du diamètre des tubes séminifères au cours du développement (n=11)

2.2.1.1. Surface des tubes séminifères, de la lumière, de l'épithélium, des tissus interstitiels, des noyaux de cellules de sertoli

L'évolution de la surface des tubes séminifères (TS) montre une augmentation significative ($p < 0.001$) de 1 à 6 mois, passant de la valeur de $2829 \pm 353,84 \mu\text{m}^2$ pour les rats d'1 mois à la valeur de $32613,13 \pm 3226 \mu\text{m}^2$ pour ceux de 6 mois, avec un écart de $29784 \mu\text{m}^2$ (Figure 26A).

L'étude histologique des TS a révélé l'absence de la lumière dans la majorité des TS à l'âge d'un mois, cependant pour certains TS, la surface de la lumière (SL) moyenne est faible, elle est de $176,6 \pm 9,37 \mu\text{m}^2$. La SL augmente ($p < 0.001$) pour passer à $2888 \pm 321,3 \mu\text{m}^2$ à 3 mois et diminue d'une façon non significative ($p > 0.05$) à l'âge de six mois (Figure 26B).

La surface de l'épithélium montre une augmentation progressive ($p < 0.001$ à $p < 0.01$), passant d'une moyenne de $2584 \pm 156 \mu\text{m}^2$ à 1 mois à une valeur de $37441 \pm 9149 \mu\text{m}^2$ à 6 mois avec un écart de $34857 \mu\text{m}^2$ (Figure 26C).

L'examen morphométrique de la surface du tissu interstitiel a révélé une diminution progressive de ce paramètre ; la valeur de $2612 \pm 297,94 \mu\text{m}^2$, enregistrée à l'âge de 1 mois, passe à $843,5 \pm 69,64 \mu\text{m}^2$ à l'âge de 6 mois, laissant apparaître un écart de $2542,36 \mu\text{m}^2$ entre les deux

ages ($p < 0.01$ à $p < 0.001$) ; néanmoins cette diminution est non significative ($p > 0.05$) entre les lapins de 3 mois et ceux de 6 mois (Figure 26D).

La mesure de la surface des noyaux des cellules de Sertoli indique une hausse significative entre 1 et 3 mois, avec des moyennes de $5,56 \pm 0,59 \mu\text{m}^2$ et $11,91 \pm 1,13 \mu\text{m}^2$. En revanche, entre de 3 et 6 mois, aucune différence ($p > 0.05$) n'a été enregistré (Figure 26E).

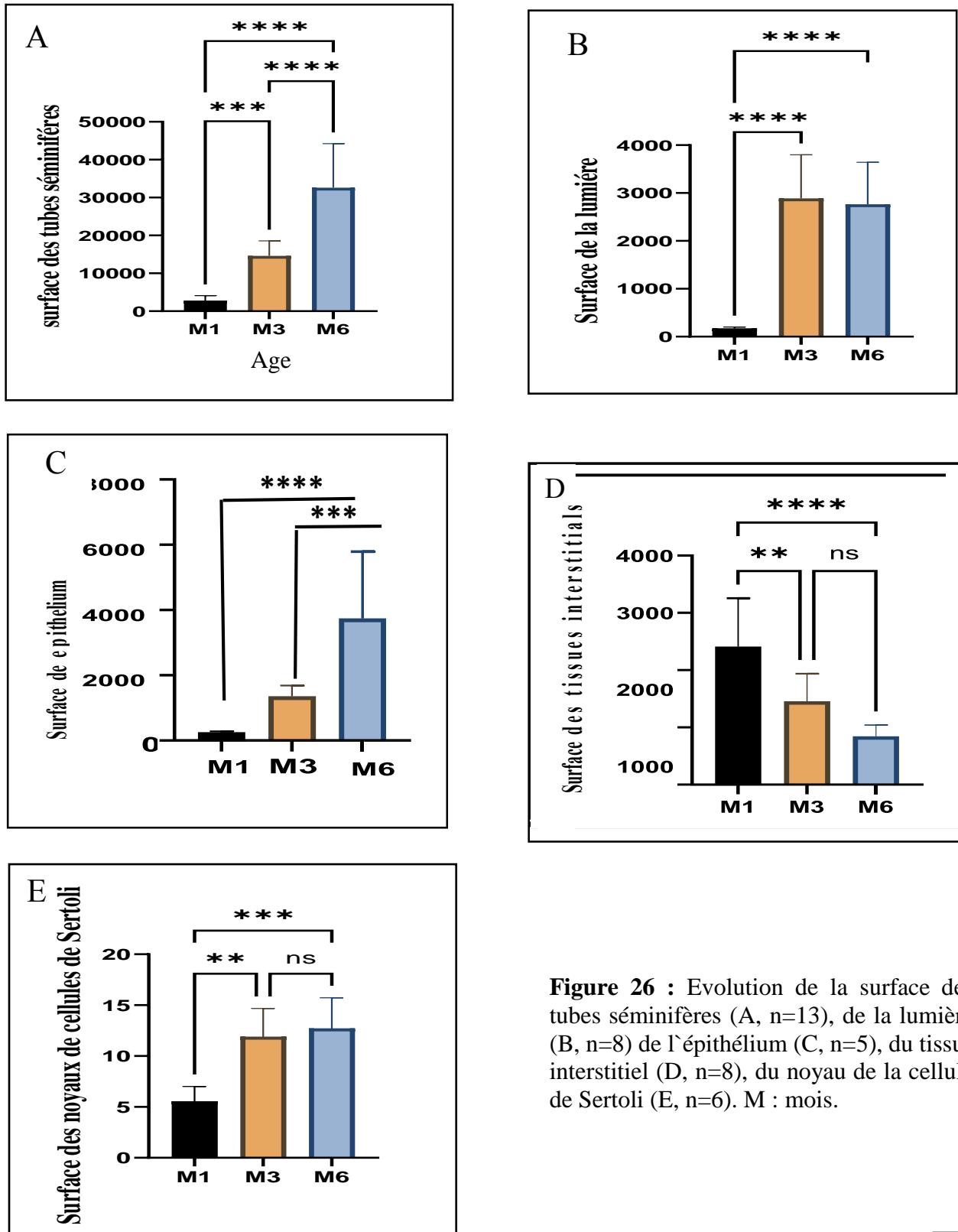


Figure 26 : Evolution de la surface des tubes séminifères (A, n=13), de la lumière (B, n=8) de l'épithélium (C, n=5), du tissu interstitiel (D, n=8), du noyau de la cellule de Sertoli (E, n=6). M : mois.

2.2.1.1. Noyaux de spermatogonies

2.2.1.2. Taille des noyaux de spermatogonies

Pour la taille des spermatogonies, Les moyennes enregistrées sont de $3,76 \pm 0,42 \mu\text{m}^2$ à l'âge d'1 mois, $4,93 \pm 0,43 \mu\text{m}^2$ à 3 mois et $6,19 \pm 0,4 \mu\text{m}^2$ à 6 mois. La comparaison de ces valeurs ne montre aucune différence significative (Figure 27).

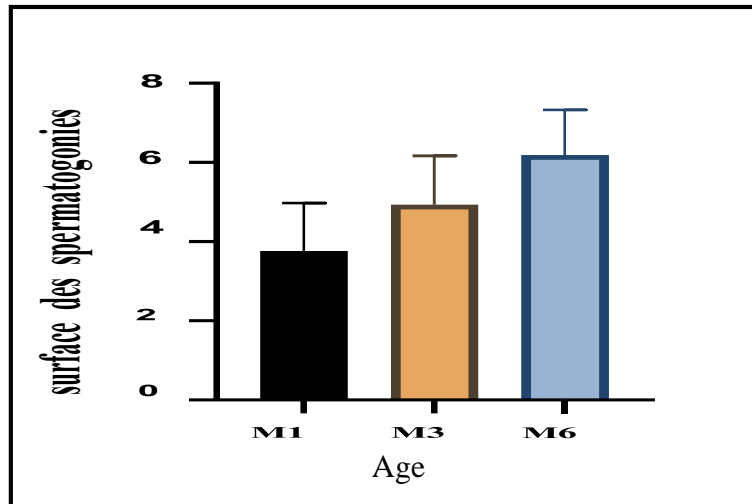


Figure 27 : Evolution des surfaces des noyaux de cellules de spermatogonies en fonction de l'âge (n=8). M : mois.

2.2.2. Histomorphométrie de l'épididyme

2.2.2.1. Diamètre de l'épididyme

Entre 1 et 3 mois, le diamètre de l'épididyme augmenté ($p < 0,01$), avec les valeurs de $22,58 \pm 1,181 \mu\text{m}^2$ vs $108,6 \pm 19,61 \mu\text{m}^2$, marquant un écart de $86,02 \mu\text{m}^2$. Cependant, aucune différence significative de ce paramètre n'a été enregistrée entre 3 et 6 mois (Figure 28).

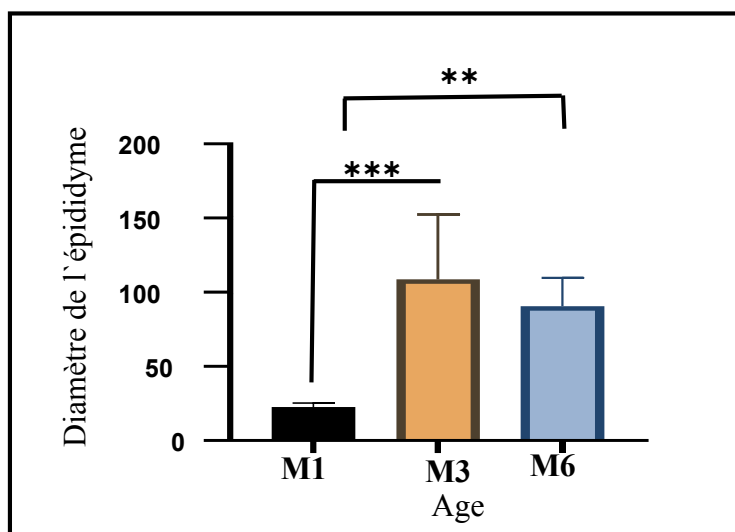


Figure 28 : Evolution du diamètre de l'épididyme en fonction de l'âge (n=12), M : mois.

2.2.2.2. Surface de la lumière de l'épididyme, de l'épididyme, de l'épithélium épididymaire et des noyaux des cellules principales de l'épididyme

Concernant la surface de la lumière de l'épididyme, une augmentation très significative ($p < 0.01$) a été également relevée entre l'âge d'un et 3 mois, avec une moyenne de $399,9 \pm 128,3 \mu\text{m}^2$ pour le premier mois, $5781 \pm 6537 \mu\text{m}^2$ à 3 mois et avec un écart de $5381,1 \mu\text{m}^2$. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux derniers mois, 3 et 6 mois (Figure 29A).

L'examen de la surface de l'épididyme (SE) montre une augmentation très significative entre 1 et 3 mois, avec les valeurs respectives de $1835 \pm 461,9 \mu\text{m}^2$ vs $11927 \pm 3135 \mu\text{m}^2$ et un écart conséquent de $10092 \mu\text{m}^2$. En revanche, aucune différence significative de la SE entre les lapins de 3 et 6 mois n'a été enregistrée (Figure 29B).

La surface de l'épithélium épididymaire (SEE) augmente fortement entre 1 mois ($933,7 \pm 241,7 \mu\text{m}^2$) et 3 mois ($6648 \pm 4406 \mu\text{m}^2$) laissant un écart de $5714,3 \mu\text{m}^2$. Cependant, aucune différence significative de la SEE n'a été relevée entre 3 et 6 mois (Figure 29C).

Concernant la surface des noyaux des cellules principales, aucune différence significative n'a été obtenue entre les trois âges dont les valeurs moyennes sont $6,035 \pm 0,4110 \mu\text{m}^2$ pour 1 mois, $7,215 \pm 0,4377 \mu\text{m}^2$ à 3 mois et $6,738 \pm 0,3257 \mu\text{m}^2$ à 6 mois (Figure 29D).

2.2.2.3. Hauteur des cellules principales de l'épididyme

La hauteur des cellules principales de l'épididyme subit une importante augmentation ($p < 0.0001$) au cours de la première étape de développement avec une moyenne de $5,872 \pm 0,3768 \mu\text{m}^2$ à 1 mois et $17,15 \pm 0,7112 \mu\text{m}^2$ à 3 mois avec un écart de $11,278 \mu\text{m}$. Cependant, aucun changement significatif n'a été enregistré à 6 mois comparativement à 3 mois (Figure 30).

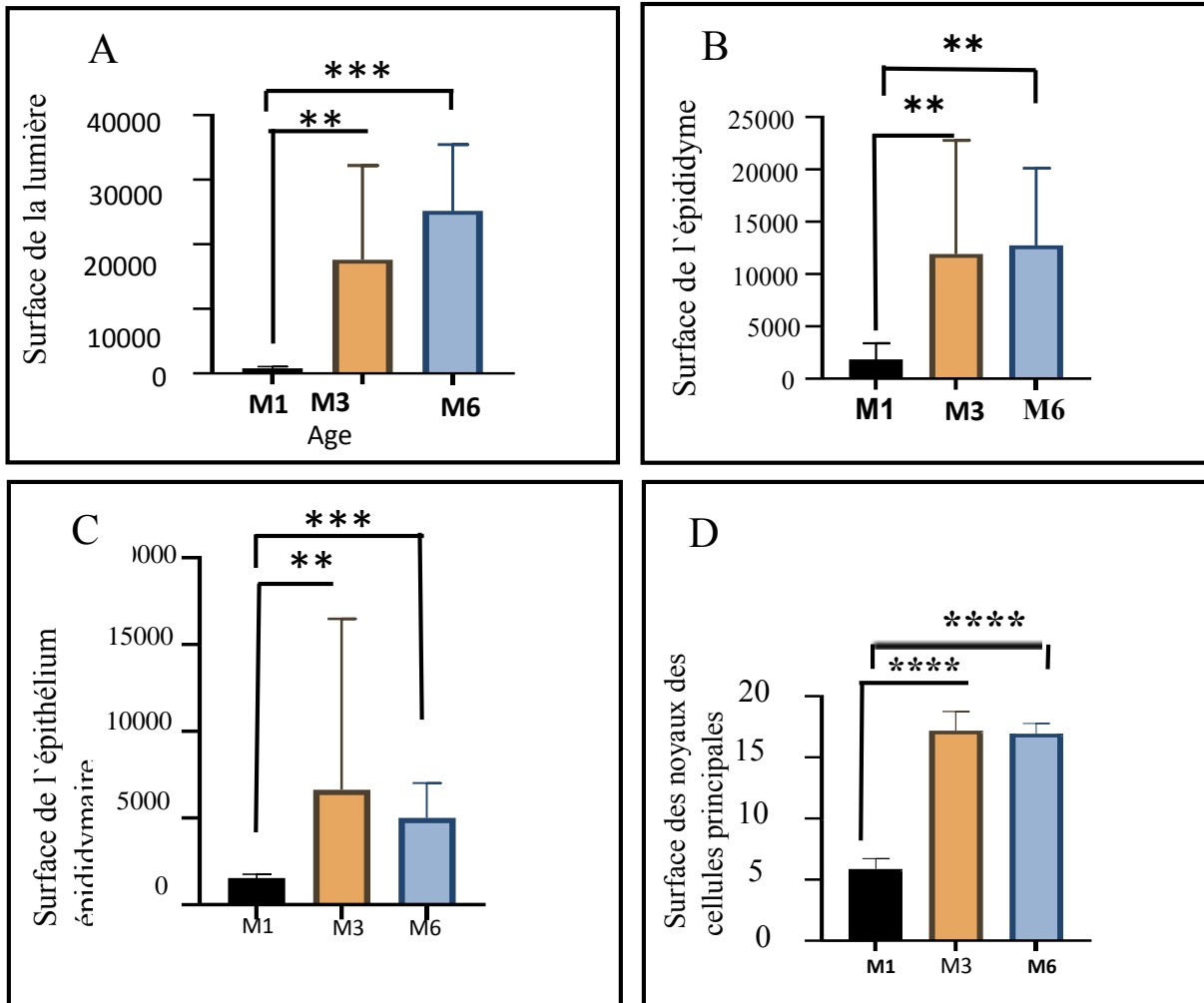


Figure 29 : Evolution de la Surface de la lumière de l'épididyme (A), de l'épididyme (B), de l'épithélium épididymaire (C) et des noyaux des cellules principales (D). M = mois.

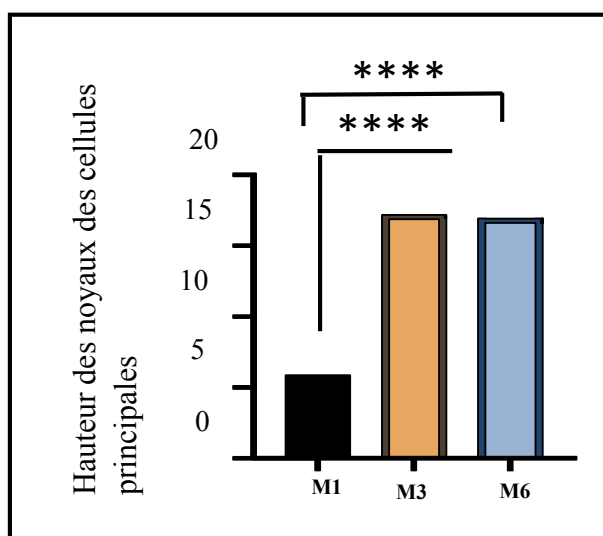


Figure 30 : L'évolution de la Hauteur des cellules principales de l'épididyme en fonction d'âge (n=5). M : mois.

2.3. Mise en évidence des dystrophines dans le testicule et de l'épididyme de lapins au cours du développement

La technique immunohistochimique à la peroxydase, utilisant l'anticorps H4, un polyclonal reconnaissant toutes les isoformes des dystrophines, nous a permis de localiser les dystrophines dans le testicule et l'épididyme de lapins de l'âge d'un mois, trois mois et six mois.

2.3.1. Localisation des dystrophines au niveau du testicule de lapins à différents âges

La distribution du marquage relatif aux dystrophines (Dp) au niveau des coupes testiculaires des lapins de 1 mois, montre un aspect discontinu du marquage au niveau de la membrane des lobules testiculaires, ainsi que celle des tubes séminifères et d'une façon relativement plus marquée du côté basal (**Figure 31A**). De la même manière, nous avons distingué une immunoréaction positive dans certains noyaux des spermatogonies (**Figure 31A**).

Sur des coupes de testicule de lapins de 3 mois, le marquage aux dystrophines paraît plus intense comparativement à son aspect à un mois. Le marquage est contenu tout au long de la membrane basale des tubes séminifères (**Figure 31B**). Par ailleurs, nous avons pu repérer un marquage discontinu analogue à celui relevé à 1 mois d'âge, au sein des membranes des cellules de Sertoli, celles des spermatogonies, des spermatocytes, des spermatides et celles des cellules myoïdes et des cellules de Leydig (**Figure 31B**). De plus, un marquage aux Dp diffus et continu est relevé au niveau des noyaux des cellules de Sertoli, des spermatogonies, spermatocytes I et ceux des spermatides (**Figure 31B**).

Au niveau des coupes de tissus des lapins de 6 mois, les dystrophines ont une localisation similaire à celle des lapins de 3 mois, mais avec une intensité plus intense. En effet, nous constatons clairement la discontinuité du marquage aux Dp des membranes basales des tubes séminifères, en plus d'une distribution avec un aspect granuleux au niveau du tissu interstitiel (**Figure 31C**). Par ailleurs, l'immunomarquage aux Dps est positif dans toutes les cellules des tubes séminifères. Il est moins discontinu autour des noyaux de toutes les cellules de la lignée germinales (spermatogonies, spermatocytes, spermatides ronds et allongés), aussi de même aspect au niveau des noyaux des cellules de Sertoli et celles de Leydig (**Figure 31C**). En plus, pour chacun de ces cellules un marquage est exprimé d'une façon discontinue au niveau de leurs membranes. En outre, les dystrophines sont bien localisées au niveau des structures des spermatozoïdes, notamment au niveau de la tête et du flagelle (**Figure 31C**).

En tenant compte de la localisation et l'intensité de l'immunomarquage lié aux Dp au niveau du testicule, nous avons réalisé un récapitulatif (**Tableau 2**).

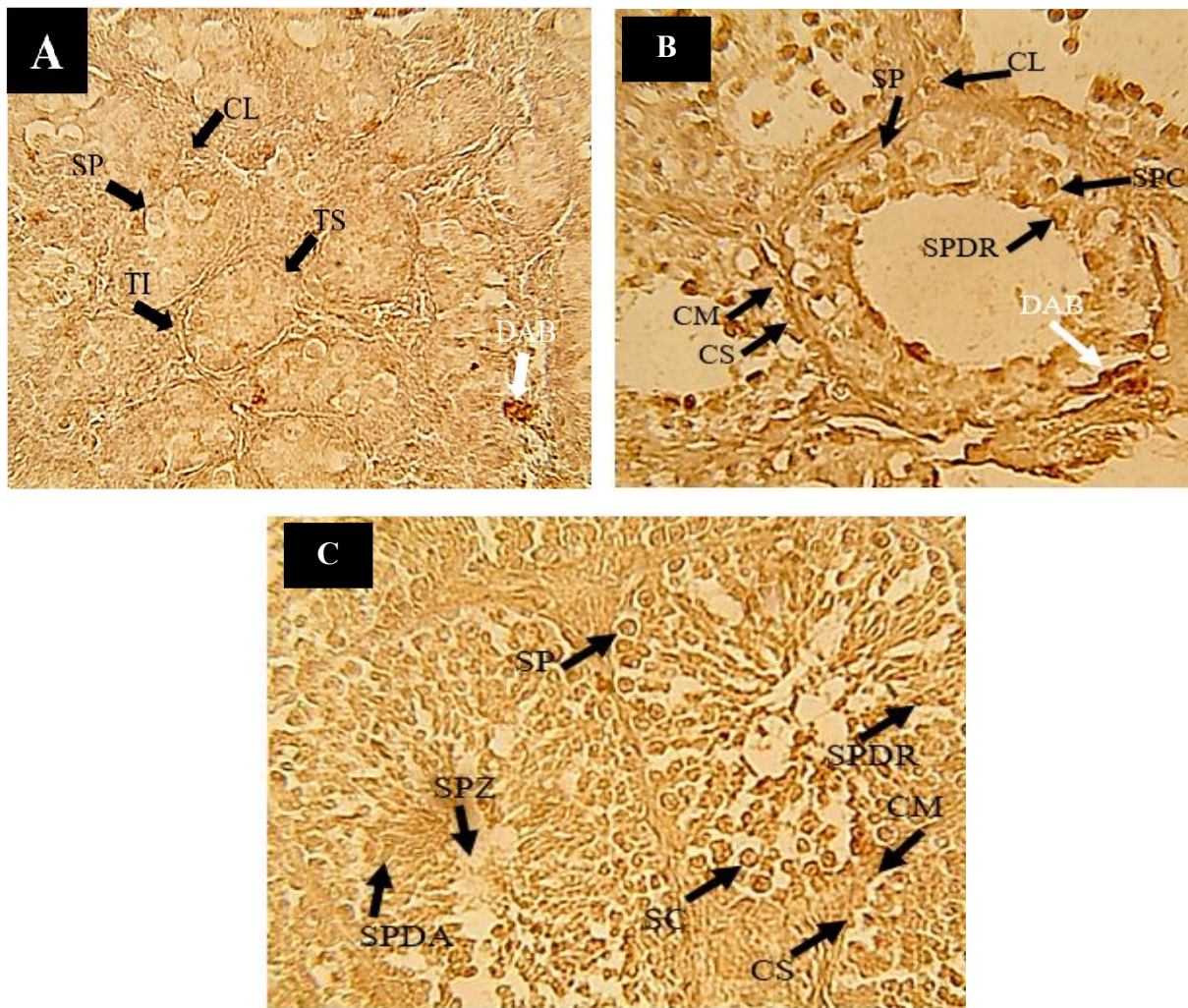


Figure 31 : Expression et distribution des dystrophines au niveau du tissu testiculaire de lapins âgés de 1 mois (A), 3 mois (B) et 6 mois (C).

LT : lobule testiculaire. TI : tissu interstitiel, TS : tube séminifère, SP : spermatogonie, CL : cellule de Leydig, SPC : spermatocyte, CM : cellule myoïde, SPDR : spermatide ronde, SPDL : spermatide allongée, CS : cellule de Sertoli, SPZ : spermatozoïdes,

↗ Flèche noire : dystrophines. ↖ Flèche blanche : dépôt de l'DAB.

Tableau 2 : Localisation et distribution des dystrophines au niveau des composants structuraux du testicule.

(+, ++, +++, +++++, --- : Intensité du marquage)

		1 mois	3 mois	6 mois
Membrane des lobulesterculaires		+++	---	---
Membrane des tubesSéminifères		++	+++	++++
Tissu interstitiel		+	+++	++++
Cellules deSertoli	NY	+	+++	++++
	Mb	++	+++	++++
Cellules deLeydig	NY	+	+++	++++
	Mb	++	+++	++++
CellulesMyoïde	NY	---	+++	++++
	Mb		+++	++++
Spermatogonies	NY	+	+++	++++
	Mb	+	+++	++++
Spermatocytes	NY	---	+++	++++
	Mb		++	++++
Spermatides	NY	---	+	++++
	Mb		+	++++
Spermatozoïdes	Tête	---	---	++++
	Flagelle			++++

2.3.2. Localisation des dystrophines au niveau de l'épididyme de lapins à différents âges

Les résultats de l'immunolocalisation des dystrophines au niveau de l'épididyme de lapins a révélé la présence de ces protéines du cytosquelette sub-corticale dès le premier mois. En effet, un marquage continu aux Dp, d'une importante intensité, est observé au niveau de la capsule conjonctive surrénalienne (**Figure 32A**). En revanche, un marquage discontinu (en forme de points dispersés) est visible au niveau de la musculuse. Il en est de même au sein de l'épithélium épididymaire, où un marquage discontinu plus intense du côté apical que du côté basal est observé (**Figure 32A**). Concernant les cellules principales et basales, un marquage intense au niveau des noyaux et discontinu au niveau des membranes cellulaires est remarqué (**Figure 32A**).

A l'âge de 3 mois, l'immunomarquage lié aux dystrophines est repéré au sein des tubes épididymaires, avec un marquage discontinu du côté de la musculuse et continu du côté de la lumière (**Figure 32B**) ; en effet, le marquage aux Dp apparait en points discontinus au sein des fibres musculaires et de l'épithélium pseudostratifié. Au sein des cellules principales et des cellules basales, les noyaux sont hautement marqués, contrairement aux membranes cellulaires qui sont marqués de façon discontinue, avec une intensité plus importante du côté de la lumière pour les cellules principales (**Figure 32B**).

A l'âge adulte de six mois, les dystrophines persistent au sein des fibres de la musculature et l'aspect du marquage est discontinu aussi bien au niveau des noyaux que des membranes des cellules principales, contrairement aux cellules basales où une forte intensité du marquage au niveau du noyau et de la membrane cellulaire (**Figure 32C**). Il en est de même au sein de la lumière où les spermatozoïdes sont fortement marqués (**Figure 32C**).

A partir de ces résultats nous avons tracé le tableau suivant qui résume la distribution du marquage H4 au niveau du tissu épидидymaire (**Tableau 3**).

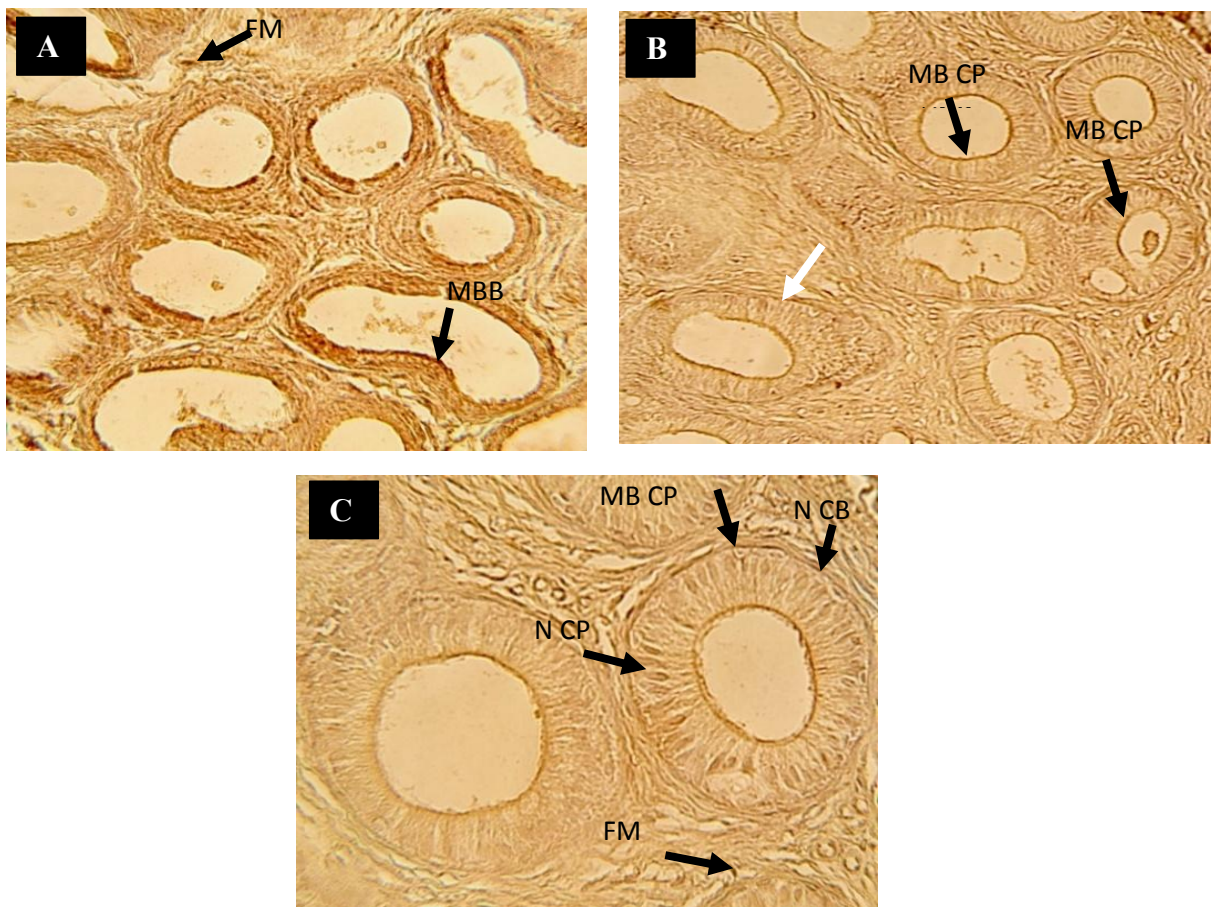


Figure 32 : Expression et distribution des dystrophines au niveau de l'épididymaire des lapins âgés de 1 mois (A), 3 mois (B) et 6 mois (C).

MBCP : membrane plasmique des cellules principales MB : membrane plasmique. FM : fibres musculaires. NCP : noyau de cellules principales. NCB : noyau des cellules basales SPZ : spermatozoïdes.

↗ Flèche noire : dystrophines. ↖ Flèche blanche : dépôt de l'DAB.

Tableau 3 : Localisation et distribution des dystrophines au niveau des composants structuraux de l'épididyme
(+, ++, +++, +++++, --- : Intensité du marquage)

		1 mois	3 mois	6 mois
Capsule conjonctive de l'épididyme		+++	+++	+++
Membrane des tubesépididymaire		++	+++	++++
Epithélium épидидymaire		+	++	+++
Muscleuse (Fibres musculaires)		+	+++	++++
Cellules principales	NY	++	+++	++++
	Mb	++	+++	++++
Cellules basales	NY	++	+++	++++
	Mb	++	+++	++++
Spermatozoïdes	Tête	++	+++	++++
	Flagelle	+	++	+++

3. Discussion

3.1. Histologie du testicule et de l'épididyme au cours du développement

3.1.1. Evolution histologiques du testicule au cours du développement

Les changements histologiques et histomorphométriques du testicule que nous avons obtenu entre les trois âges ; 1, 3 et 6 mois, nous ont permis de reconnaître certaines particularités développementales de cet organe. Ces dernières concernent les structures composant le testicule, notamment les tubes séminifères, et le tissu interstitiel.

Des résultats de l'examen histologique du testicule de lapins à différents âges, nous avons retenu que l'épithélium évolue vers l'état pluristratifié. En effet, les cellules germinales évoluent de l'âge jeune à l'âge de jeune adulte. L'âge d'1 mois est caractérisé par la présence uniquement d'une lignée de cellules germinales de type spermatogonies, avec des cellules de Sertoli qui les bordent des deux côtés, alors qu'à un âge plus avancé (3 mois), il y'a apparition de cellules germinales en stades avancés, où se distinguent les spermatogonies type A et type B, les spermatocytes et quelques spermatides rondes. A l'âge de jeune adulte, 6 mois, où les lapins sont complètement matures, nous avons reconnus toutes les cellules germinales à partir des spermatogonies jusqu'aux spermatozoïdes qui occupent la lumière des tubes séminifères. Par ailleurs, dans l'espace interstitiel, les cellules de Leydig sont apparentes à tous les âges même si leur apparence et importance diffèrent d'un stade de développement à un autre. Ces changements morphologiques accompagnant le développement au sein du testicule sont semblables à ceux décrits dans des études antérieures (Beaumont et Cassier, 1998 ; Welsch, 2002). Ces auteurs ont identifié les différents types cellulaires de la lignée germinale et ont décrit leur évolution au cours de développement, révélant que les cellules basales avec un noyau

dense sont des spermatogonies de type A, celles à noyau pâle sont des spermatogonies de type B, les cellules à noyau dense plus proche de la lumière sont des spermatides, qui se transformeront en spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Concernant les cellules de Leydig, nos observations rejoignent également celles de Welsch (2002), d'après lui les cellules à noyau ovale, situées dans l'espace interstitiel, sont les cellules de Leydig. Par ailleurs, Iczkowski *et al.* (1991) ont montré une augmentation remarquable du pourcentage de cellules germinales en mitose à 7 semaines et une forte activité méiotique à partir de 9 semaines. Concernant l'apparition des spermatozoïdes que nous n'avions pas observé à l'âge de 3 mois, elle contredit ce que rapportent plusieurs études de la littérature qui ont montré que les premiers spermatozoïdes apparaissent entre la 13^{ème} à 14^{ème} semaines environ au 3^{ème} mois du développement (Gondos *et al.*, 1973 ; Iczkowski *et al.*, 1991 et Ricken et Viebahn, 2002). Cependant, selon Alvarino (2000), les premiers spermatozoïdes sont déjà visibles chez le lapin de 60 jours. Nous suggérons que l'espèce et même la qualité et la quantité de la nourriture peuvent avoir un impact sur l'âge de la formation et maturité des spermatozoïdes.

Concernant les cellules myoïdes périvitubulaires, nous les avons identifiées dès l'âge de 1 mois et leur morphologie change au cours du développement. Ces cellules jouent un rôle important dans la spermatogenèse. En effet, elles sécrètent des facteurs prolifératifs qui favorise la progression des spermatozoïdes (Welsh *et al.*, 2009). Selon Leeson et Forman (1981), les cellules myoïdes deviennent plus condensées entre 14 et 28 jours post natal. Aux 30^{èmes} jours post natal, ces cellules deviendront morphologiquement des cellules périvitubulaires adultes.

L'analyse des résultats histomorphométriques du testicule nous a permis de retenir l'augmentation progressive du diamètre des tubes séminifères, similaires à ce qui a été décrit en 2007 par Garcia-Tomas et ses collaborateurs. En effet, ces auteurs ont rapporté que le diamètre tubulaire augmente avec une multiplication par 3 à 4 entre 8 et 14 semaines. Plusieurs autres études ont rapporté la hausse du diamètre des TS au début de la spermatogenèse et ce chez le lapin, le verrot, et les primates (Schinckel *et al.*, 1983 ; Chemes, 2001 et Iczkowski *et al.*, 1991).

Par ailleurs, nous avons constaté qu'à partir de l'âge de 3 mois, l'augmentation du diamètre des TS est inversement proportionnelle avec l'évolution de la surface du tissu interstitiel, qui se rétrécit avec l'âge. Cette relation a été déjà décrite par Watson et al (1956).

A propos des résultats histomorphométriques des surfaces des composants de testicule, nous avons déterminé une augmentation d'une manière progressive avec l'âge de la surface des tubes séminifères et celle de l'épithélium, tandis que la surface de la lumière augmente au cours 2 premiers âges puis elle rétrécit au cours de 6^{ème} mois. Ces résultats sont attribués à la prolifération des cellules de la lignée germinale et à l'établissement d'une spermatogenèse

avancé. Ces résultats sont cohérents avec les conclusions tirées par plusieurs chercheurs, notamment (França *et al.*, 2000), (Assis Neto *et al.*, 2003) et (Lakabi *et al.*, 2015).

3.1.2. Evolution histologiques de l'épididyme au cours du développement

Les résultats histologique et morphométrique de l'épididyme ont dévoiler une augmentation significative pour la plupart des critères mesurés (le diamètre, la surface de l'épididyme, la surface de la lumière, la surface de l'épithélium épididymaire, la hauteur des cellules principales) en fonction de l'âge (1, 3, 6 mois), en particulier entre les deux premiers âges. Ces résultats sont similaires avec ceux de (Hamidouche *et al.*, 2018), qui mettent également en évidence les caractéristiques physiologiques de la reproduction chez le lapin.

A un mois, l'épithélium est cubique, composée de cellules principales et basales, qui se transforme en un épithélium prismatique et pseudostratifié à 3 mois. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par (Lakabi *et al.*, 2018).

A l'âge de 3 mois, l'épithélium épididymaire se développe avec l'apparition de stéréocils (microvillosités) au niveau des cellules principales. A cet âge, la lumière épididymaire est dépourvue de spermatozoïdes. Cependant ces résultats contredisent la description d'Alvariño (2000), qui indique que les spermatozoïdes sont présente dans les tubes épididymaires à l'âge de 2 mois.

A l'âge de 6 mois, on observe une grande quantité de spermatozoïdes dans le tube, ce qui correspond aux résultats de (Cooper *et Yeung*, 2003). Donc, l'augmentation de la surface de l'épithélium épididymaire, la présence d'une activité importante de spermatogenèse, l'augmentation de la surface de la lumière tubulaire et le développement des tubeépididymaires sont similaires à ceux rapportés par (França *et al.*, 2000) et (Assis Neto *et al.*, 2003).

3.2. Expression et distribution des dystrophines au cours du développement dans le testicule et l'épididyme

3.2.1. Dystrophines au cours du développement dans le testicule

L'immuno-réaction des dystrophines par le H4, nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

Une localisation généralisée des dystrophines a été observé sur toutes les structures du testicule, néanmoins, avec toutefois des variations dans les caractéristiques et l'intensité de cette localisation. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Tejvir *et al.* (1991), qui ont également montré que les dystrophines se trouvaient en tuiles au niveau de tous les organes qui contient un tissu musculaire. Etant donné que le testicule est entouré par le Crémaster qui est un sac musculaire, nos résultats sont en accord avec ceux-ci.

Les dystrophines sont des protéines qui lient à l'actine F, leurs présences est fortement

remarquable à tous les niveaux membranaires avec une intensité croissante avec l'âge. Cela est observé aussi bien au niveau des membranes des lobules testiculaires, des tubes séminifères et aussi sur toutes les membranes cellulaires, y compris cellules de Leydig, cellules de Sertoli, cellules myoïdes et toutes les cellules de la lignée germinales

Cette répartition des dystrophines sous-membranaire a été soulignée par plusieurs auteurs.

Nos résultats mettent en évidence une distribution discontinue et ponctuelle du marquage au niveau des membranes dans toutes les structures à différents stades de développement. Ces observations sont en accord avec les conclusions de Lidov *et al.* (1993), qui ont mis en évidence un marquage au niveau de la membrane plasmique de Péricaryon et des dendritiques proximales sous forme de taches ou de segments très courts. Ces auteurs ont également rapporté une légère fluorescence, suggérant la présence des dystrophines à faible niveau dans le cytoplasme, et exclusion des noyaux. Cependant, nos résultats différents de ceux qui sont rapportés par ces auteurs, car nous avons observé une immunoraction positive autour des noyaux des cellules mentionnées précédemment, tandis que nous n'avons observé aucune réaction au niveau de cytoplasmique.

En ce qui concerne les résultats que nous avons obtenu concernant la présence de marquage au niveau de toutes les cellules des tubes séminifères et l'augmentation de l'intensité de marquage avec l'âge, nous avons suggéré une hypothèse en rapportant le rôle et l'importance dystrophines à leur distribution. Comme précédemment mentionné, les dystrophines jouent un rôle clé dans la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation des tissus non musculaires, ce qui indique leur présence dans toutes les structures. De plus, l'augmentation de l'intensité du marquage est due à l'accroissement des surfaces des structures et à l'augmentation de la taille des membranes sarcolemmiques, ce qui entraîne une hausse de l'expression de ces protéines. Cela peut expliquer l'augmentation de l'intensité de marquage avec l'âge. Cependant, nous ne disposons pas de données confirmant cette hypothèse.

3.2.2. Dystrophines au cours du développement dans l'épididyme

Dans tous les groupes d'animaux étudiés (1, 3, 6 mois), on a remarqué la présence d'une immunoréaction positive des dystrophines dans les structures du tissu épидидymaire.

Le marquage été présent dans différentes parties de l'organe, ce qui est similaires avec ceux de (Gérard.,1988).

Les dystrophines sont des protéines transmembranaires, qui se retrouvent dans la capsule conjonctive de l'épididyme ainsi que dans l'épithélium épидидymaire précisément au sein des membranes des cellules principales, basales et des spermatozoïdes. On as observé que le marquage des membranes de ces derniers est discontinu dans les 3 lots, mais il augmente en

intensité avec la croissance des animaux. Cela est mise en relation avec l'augmentation de la hauteur des cellules principales, ce qui entraîne l'agrandissement de leurs membranes, en accord avec les résultats de (Djazoli-Alim et Dorbani., 2015) qui ont démontrés que les noyaux supraoptiques dans les neurones magnocellulaires présentaient un marquage immuno-positif. Ce marquage est situé de manière discontinue dans les régions périmembranaires sous-jacente à la membrane plasmique. De plus, nous avons observé un marquage ponctuel dans la musculature dans tous les groupes. Ce marquage n'est pas aléatoire mais indique la présence des dystrophines et leurs protéines associées du côté extracellulaire, comme décrit par (Ehmsen et al., 2002).

L'épithélium épидидymaire est marquée de façon différente selon la région. A un mois le marquage est discontinué et faible dans les régions basale et apicale, cela signifie que les dystrophines et leurs protéines associées sont dispersées dans l'épithélium. A à l'âge de 3 et 6 mois le marquage de l'épithélium est intense sauf qu'il est continué du côté apicale et discontinué dans la région basale, cela explique pourquoi les stéréocils apparaissent au niveau des cellules principales de l'épithélium à un âge avancé. Ces stéréocils permettent la sécrétion du fluide épидидymaire à la puberté du lapin à partir de 45 jours. De plus, l'intensité du marquage augmente en même temps que le volume du tissu épithélial.

Conclusion et perspectives

La réalisation de l'évolution histomorphométrique et immunohistochimique, nous a permis d'analyser les modifications histologiques des différentes structures des tissus testiculaires et épидидymaires, ainsi que la révélation de la localisation des dystrophines et leurs protéines associées. Ces résultats sont essentiels pour comprendre l'importance de ces protéines dans les organes mentionnés fonction de l'âge (1, 3, 6 mois). A partir de ces études, nous pouvons conclure ce qui suit :

L'analyse histologique des testicules et de l'épididyme révèle un développement des structures des tubes séminifères et une augmentation de la taille de l'épididyme en fonction de l'âge. A partir du 3^{ème} mois, les sécrétions épидидymaires commencent, la lumière des tubes séminifères et les spermatocytes I apparaissent, indiquant ainsi l'installation de la spermatogenèse. Ce processus s'accélère à l'âge de 6 mois avec l'apparition des spermatides allongés, de plus les lumières séminifères et épидидymaires sont remplies de spermatozoïdes, confirmant ainsi que le lapin a atteint la puberté.

L'étude morphométrique des structures testiculaires montre une progression graduelle du diamètre, de la surface des tubes séminifères et la surface de leurs lumières, la surface de l'épithélium entre les 3 groupes d'âges. En revanche, la surface de tissu interstitiel diminue d'une manière progressive. Par ailleurs, une augmentation progressive de la taille des cellules de sertoli est observée entre les 2 premiers âges de développement, tandis que la taille des spermatogonies augmente entre les 3 groupes d'âges mais de manière non significative. En ce qui concerne les structures épидидymaires, on constate une augmentation importante du diamètre, la surface de l'épididyme et celle de sa lumière et son épithélium.

L'étude immunohistochimique des structures testiculaire, révèle l'apparition du marquage au niveau de tous les composants des tubes séminifères à tous les stades de développement, y compris les membranes des lobules testiculaires et celles des tubes séminifères ; les membranes cellulaires des cellules de la lignée germinale, les membranes des cellules de Sertoli, Leydig et myoïde, ainsi que la présence du marquage au niveau des noyaux de toutes ces cellules. Nous avons observé une différence d'intensité de marquage, avec un aspect discontinu au niveau des membranes, et un aspect continu au niveau des noyaux. Enfin, nous avons noté une augmentation de l'intensité du marquage avec l'âge.

L'étude immunohistochimique des structures épидидymaire révèle généralement une variation du marquage entre les différentes régions. En particulier, on observe un marquage continu au niveau de la capsule conjonctive à tous les âges, tandis que le marquage de

l'épithélium est discontinue et dispersée aux deux premiers âges, en revanche à l'âge de 6 mois le marquage de la musculature est ponctuel.

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de réaliser les études suivantes :

- Reprendre l'étude avec des tranches d'âge plus rapprochées et un effectif plus important.
- Reprendre la technique immunohistochimie en ciblant spécifiquement certaines familles de dystrophine notamment la dystroglycane qui relie les Dp à la membrane et la matrice extracellulaire.

Références bibliographiques

A

ABOU-HAILA, A., and FAIN-MAUREL, M.A., 1984, Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. *Anat. Rec.* 209 :197 -208.

A. BRICE D.-F SCHORDERET., 1999. *Traité de Neurologie, Neurogénétique Affections héréditaires Dégénératives*. Doin.

ADMALI, H.I., and HERMO, L., 1996, Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J Androl.* 17: 208-222.

ADAMS ME, BULTER MH, Dwyer TM, Peters MF, MURNANE AA, FROEHNER SC., 1993. Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron* 11 : 531–540.

ADAMS, M. E., KRAMARCY, N., KRALL, S. P., ROSSI, S. G., ROTUNDO, R. L., SEALOCK, R. and FROEHNER, S. C., 2000. Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J. Cell Biol.* 150, 1385-1398.

AHN AH, YOSHIDA M, ANDERSON MS, FEENER CA, SELIG S, HAGIWARA Y, OZAWA E, AND KUNKEL LM., 1994. Cloning of human basic A1, a distinct 59-kD dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23–24. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4446–4450.

AHN AH, KUNKEL LM, 1995. Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol* 128 : 363–371.

AHN AH, FREENER CA, GUSSONI E, YOSHIDA M, OZAWA E, AND KUNKEL LM., 1996. The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* 271 : 2724–2730.

ALESSI A, Bragg AD, PERCIVAL JM, Yoo J, ALBRECHT DE, FROEHNER SC, Adams ME., 2006. Syntrophin scaffolding is spatially and functionally distinct from that of the alpha/beta syntrophins. *Exp Cell Res* 312 : 3084 –3095.

ALVARINO J.M.R., 1993. Control de la reproducción en el conejo. *Mundi-Prensa* (1) :137p.

ALVARIÑO., 2000. Reproductive performance of male rabbits. In : *Proc. 7th World Rabbit Congr.*, Valencia Jul., 2000, vol. A : 13-35.

AMANN KJ, RENLEY BA, ERVASTI JM., 1998. A Cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. *J Biol Chem*; 273 : 28419–28423.

ASSIS NETO AC CARVALHO MAM., MELO MIV., MIGLINO MA., OLIVEIRA M., ALMEIDA MM., PAPA PC., KFOURY JÚNIOR JR., 2003. Aspectos biométricos do desenvolvimento testicular e corporal em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 40:154-160.

AYALON G, DAVIS JQ, SCOTLAND PB, et al., 2008. An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell* ; 135 : 1189–1200.

B

BALASUBRAMANIAN S, FUNG ET, HUGANIR RL., 1998. Characterization of the tyrosine phosphorylation and distribution of dystrobrevin isoforms. *FEBS Lett* 432 : 133–140.

BARONE R.,1976. *Anatomie comparée des mammifères domestiques* : Tome 4 :

Splanchnologie : Laboratoire d'anatomie. -Lyon, ENV.-879p.

RONE R., 1978. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3, splanchnologie, Fascicule 2, appareil urogénital, 951p.p89-447.

BARONE R., 1984. Anatomie comparée des Mammifères domestiques : Tome 3 : Splanchnologie 1 : Appareils digestif et respiratoire. - Paris : Vigot. - 896p.

BARONE R., 2001. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4 : splanchnologie II. Edition Vigot Frères : 241-516.

BEAUMONTA., CASSIERP., 1998. Travaux pratiques de biologie animale (Zoologie Embryologie-Histologie). - 3ème éd. - Paris : éd.Pierre et Marie Curie.-502p

BHOSLE RC, MICHELE DE, CAMPBELL KP, et al., 2006. Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochem Biophys Res Commun* ; 346 : 768–777

BLAKE D.J., TINSLEY J.M., DAVIES K.E., KNIGHT A.E., WINDER S.J. and KENDRICK-JONES J., COILED-COIL., 1995. Regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends. Biochem. Sci.*, 20 : 133-135.

BLAKE DJ, NAWROTZKI R, PETERS MF, FROEHNER SC, DAVIES KE., 1996. Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein. *J Biol Chem* 271: 7802–7810.

BONGKI Kim, JEREMY Roy, Winnie W.C. SHUM, NICOLAS Da Silva, Sylvie Breton., 2015, *Biologie de la reproduction* 92(1),1-11.

BONNES G., DESCLAUDE J., DROGOU C., GADOUD R., JUSSIAU R., MONTMEAS L., ET AL., 2005. Reproduction des animaux d'élevage. Educagri édition, deuxième édition, 407 P.

BOUSSIT D., 1989. Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association française de cuniculture ; Diffusion Lavoisier TEC & DOC : 240p

BYERS, T. J.; KUNKEL, L. M.; WATKINS, S. C., 1991. The Subcellular Distribution of Dystrophin in Mouse Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle. *J. Cell Biol*, 115 (2), 411–421.

C

CAMPBELL K, KAHL S., 1989. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*; 338: 259–262

CAMPBELL, M. G.; SMITH, B. C.; POTTER, C. S.; CARRAGHER, B. ; MARTELLA, M. A. 2014. Molecular Architecture of Mammalian Nitric Oxide Synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111 (35), E3614-3623.

CHEMS HE., 2001. Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int. J. Andrology*; 24: 2-7.

COOPER T.G., 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 53 : 119-136.

COOPER TG, YEUNG CH., 2003. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech* ;61:28 – 38.

CORNWALL G.A., 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Upd.* 15: 213-227.

CROSBIE, R. H., HEIGHWAY, J., VENZKE, D. P., Lee, J. C. and CAMPBELL, K. P., 1997. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* 272, 31221-31224.

CROSBIE RH, LEBEKKEN CS, HOLT KH, VENZKE DP, STRAUB V, LEE JC, GRADY RM, CHAMBERLAIN JS, SANES JR, CAMPBELL KP., 1999 ; Membrane

targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol* 145 : 153–165.

CULLIGAN K.G., MACKEY A.J., FINN D.M., 1998. Maguire P.B. and Ohlendieck K., Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy. *Int. J. Mol. Med.*, 2 : 639-648.

D

DADOUNE JP, DEMOULIN A., 2001. Structure et fonctions du testicule. La reproduction chez les mammifères et l'homme. In: Thibault C, Levasseur M-C (Eds.), Paris: INRA éditions; 221.250

De KRESTER D.M et HEDGER M.P., 1996. Inhibines et activines in Drosowsky M.A., Belaisch J. et Vermeulen A. (1996). *Endocrinologie masculine*. Edition Doin, Paris : 103-113.

DEWOLF, C.; MCCAULEY, P.; SIKORSKI, A. F.; WINLOVE, C. P.; BAILEY, A. I.; KAHANA, E.; PINDER, J. C.; GRATZER, W. B., 1997. Interaction of Dystrophin Fragments with Model Membranes. *Biophys. J.*, 72 (6), 2599–2604

DJAZOULI-ALIM FATMA ZOHRA et DORBANI-MAMINE., 2015. co-distribution des dystrophines et de la cavéoline-1 au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire du rat. *Agrobiologia*, volume 5(2) ;20-32.

DRION PV., BECKERS JF., ECTORS F., 1993. Physiologie de la reproduction. Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire

E

EHMSEN, ELLEN POON and KAY DAVIES., 2002. The dystrophin associated protein complex Jeffrey Functional Genetics Unit, Department of Human Anatomy and Genetics, University of Oxford, *Journal of Cell Science* 115, 2801-2803

ERVASTI J, CAMPBELL K. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991 ; 66 : 1121–113.

F

FAWCETTE D D.W. et BURGOS M.H., 1956. Observation on the cutomophosis of the germinal and interstitial cells of the human testes.in : Ciba fondation colloquium on Agein, vol.2, p86

FRANÇA LR., SILVA JR VA., GARCIA HC., GARCIA SK., DEBELJUK L. 2000. Cell Proliferation and Hormonal Changes During Postnatal Development of the Testis in the Pig. *Biology of Reproduction*, 63:1629–1636.

Flickinger C.J., Howards S.S. et English H.F., 1978. Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *Am. J. Anat.* 152 : 557-585.

G

Gao QQ, McNally EM., 2015. The Dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy. *Compr Physiol* ;1 ;5 :1223- 39.

GARCIA-TOMAS M., SANCHEZ J., RAFEL O., RAMON J. et PILES M., 2007. Développement sexuel post-natal chez le lapin : profils de croissance et de développement du testicule et l'épididyme dans deux lignées. 12èmes Journées de la Recherche Cunicule, Le Mans, France : 49-52.

GARRETT JE, GARRETT SH, DOUGLASS J. A., 1990. Spermatozoa-associated factor regulates proenkephalin gene expression in the rat epididymis. *Mol Endocrinol* ;4 :108 – 118.

GÉRARD et al., 1988. L'endocytose de « androgen-binding protein » (ABP) par les cellules principales de l'épididyme chez le rat. *Reprod. Nutr. Dévelop*, 28 (5), 1257-1266.

GIROUARD J., 2009. Rôle des domaines membranaires rafts dans le transfert et la compartimentation des protéines impliquées dans la maturation épидидymaire des

spermatozoïdes 160 bovins. Thèse de Doctorat en physiologie-endocrinologie. Département d'obstétrique et gynécologie faculté de médecine université laval QUÉBEC.

GOEMARERE, V. J., SANTA, M., GONZALEZ, A., 1984. Atlas d'histologie. CIACO, P: 53-63.

GONDOS B., RENSTON R.H et CONNER L.A., 1973. Ultrastructure of germ cells and sertoli cells in the postnatal Dom. Anim. 37: 92-95.

Grady RM, AKAABO M., Cohen AL, Maimone MM, Lichtman JW, Sanes JR., 2003. Tyrosinephosphorylated and nonphosphorylated isoforms of alpha-dystrobrevin: roles in skeletal muscle and its neuromuscular and myotendinous junctions. J Cell Biol 160 : 741– 752.

H

HAMIDOUCHE et al., 2018. Etude comparative des structures histologiques et du profil électrophorétique des protéines épидидymaires de lapins de deux types génétiques. 35ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie. Annales d'Endocrinologie. Volume 79, Issue 4, Page 254.

HAMILTON, D.W., 1972, The mammalian epididymis. In : Reproductive Biology. Balin H, Glassner S (eds). Excerpta Medica; Amsterdam, pp.268-337.

HAMILTON, D.W., 1975, Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens in the rat. In : Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5, edited by R.O. Greep and E.B. Astwood, pp.259-301. American Physiological Society, Washington.

HARPER, S. Q., 2013. Molecular Dissection of Dystrophin Identifies the Docking Site for NNOS. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 110 (2), 387–388.

HOFFER A.P., HAMILTON D.W. et FAWCETT D.W., 1973. The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. Anat. Rec. 175: 169-201.

Holtz W. et Foote R.H., 1978. The Anatomy of the reproductive system in male Dutch Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with special emphasis on the accessory sex glands. J. Morph. 58: 1-20.

I

ICZKOWSKI KA., SUN EL., GONDOS B. 1991. Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. Am. J. Anat. 190 : 266–72.

J

JARDIN A. et De FOURMESTRAUX N., 1984. In Mauvais-Jarvis P. médecine de la reproduction masculine. Ed. Flammarion Med. Sci. : 15-23.

JEAN-CLAUDE KAPLAN, MARC JEANOIERRE, JON-ANDONI URTIZBREA, JACQUES BECKMANN., 1996. Bases Moléculaires des Dystrophies Musculaires Progressives Transmission Autosomique Récessive annales institut pasteur actualités 7, 3, 157-171

JEFFERY EHMSSEN, ELLEN POON and KAY DAVIES., 2002. The dystrophin-associated protein complex Functional Genetics Unit, Department of Human Anatomy and Genetics, University of Oxford, South Parks Road, Oxford, UK *Author for correspondence Journal of Cell Science 115, 2801-2803. © The Company of Biologists Ltd.

JMERVASTI KP CAMPBELL., 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin.

JONES R., HAMILTON D.W. et 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.

JOHNSON M.H et EVERITT B.J., 2002. Reproduction. Edition De Boeck: 56-150.

Junqueira L.C. et Carneiro J., 2007. Basic histology. 11th ed. Copyright The Mc Grow hill companies.

K

KAMEYA S, MIYAGOE Y, NONAKA I, IKEMOTO T, ENDO M, HANAOKA K, NABESHIMA Y, AND TAKEDA S., 1999. Alpha1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J Biol Chem* 274: 2193–2200.

KOEING M, KUNKEL LM., 1990. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem*; 265:45 60-66

L

LAI, Y.; THOMAS, G. D.; YUE, Y. ; YANG, H. T.; LI, D.; LONG C.; JUDGE, L.; BOSTICK, B.; CHAMBRILAIN, J. S.; TERJUNG, R. L.; 2009. Dystrophins Carrying Spectrin-like Repeats 16 and 17 Anchor NNOS to the Sarcolemma and Enhance Exercise Performance in a Mouse Model of Muscular Dystrophy. *J. Clin. Invest.*, 119 (3), 624–635.

LAI Y, ZHAO J, YUE Y, et al., 2013. Alpha2 and alpha3 helices of dystrophin R16 and R17 frame a microdomain in the alpha1 helix of dystrophin R17 for neuronal NOS binding. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 110 : 525–530.

LAKABI L., MENAD R., HAMIDOUCHE Z., ZERROUKI N., 2015. Etude histomorphométrique du développement postnatal du testicule chez le lapin de la population blanche en Algérie. 32ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie. *Annales d'Endocrinologie*. Volume 79, Issue 4, 499p.

LAKABI L., HAMIDOUCHE Z., MENAD R., 2018. Caractérisation histomorphométrique de l'épithélium épидидymaire aux niveaux proximal et distal au cours du développement postnatal chez le lapin blanc élevé en Algérie. 35ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie. *Annales d'Endocrinologie*. Volume 79, Issue 4, Page 438.

LEBAKKEN, C. S., VENZKE, D. P., HRSTKA, R. F., CONSOLINO, C. M., FAULKER, J. A., WILLIAMSON, R. A. and CAMPBELL, K. P., 2000. Sarcospan deficient mice maintain normal muscle function. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1669-1677.

LEBAS F., COUDERT P., De ROCHAMBEAU H. et THEBAULT R.G., 1996. Le lapin, élevage et pathologie (nouvelle édition révisée). FAO éditeur, Rome : 227p

LEBAS F., 2000. Physiologie générale du lapin J.M. Rsale. Ebs., Mundi. prensa1 : 45-46.

LEESSON C.R. et FORMAN D.E., 1981. Postnatal development and differentiation of contractile cells within the rabbit testis. *J. Anat.* 132: 491–511.

LEGARDINIER S, HUBERT JF, Le BIHAN O., 2008. Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties. *Biochim Biophys Acta*; 1784 : 672–682

LEGRDINIER S, RAGUENES-NICOL C, TASCAN C., 2009. Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin. *J Mol Biol* ; 389 : 546–558

LE ROUX AN., 2002. La réforme des verrats de C.I.A pour baisse de qualité de semence: Approche anatomopathologique et histologique, Thèse : 2002, Ecole National Vétérinaire de Toulouse.

Le RUMEUR, E.; POTTIER, S.; Da COSTA, G.; METZINGER, L.; MOURET, L.; ROCHER, C.; FOURAGE, M.; RONDEAU-MOURO, C.; BONDON, A., 2007. Binding of the Dystrophin Second Repeat to Membrane Di-Oleoyl Phospholipids Is Dependent upon Lipid Packing. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768 (3), 648–654

LIDVO, H. G. W., BYERS, T. J., and KUNKEL, L. M. 1993. The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 54,167–187.

Le RUMEUR, E.; WINDER, S. J.; HUBERT, J.-F., 2010. Dystrophin: More than Just the Sum of Its Parts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1804 (9), 1713–1722.

M

MOLZA AE, MANGAT K, Le RUMEUR E, et al., 2015. Structural basis of neuronal nitric-oxide synthase interaction with dystrophin repeats 16 and 17. *J Biol Chem* ; 290 : 29531–29541.

MARSHALL JL, HOLMBERG J, CHOU E, OCAMPO AC, Oh J, LEE J, PETER AK, MARTIN PT, CROSBIE-WATON RH., 2012. Sarcospan-dependent Akt activation is required for utrophin expression and muscle regeneration. *J Cell Biol* 197 : 1009 –1027.

MARTINEZ-GARCIA F., REGADERA J., COBO P., PALACIOS J., PANIGUA R. et NISTAL M. 1995. The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andr.* 27 : 195-206

MICHEL P., JEAN-FRANCOIS G.,2013. Biologie de la reproduction etdu développement. (2nd ed). Paris cedex 15. Ellipses Edition Marketing S.A.,2014 : p 36-38.

MOORE, H.D., and BEDFORD, J.M., 1979, Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat. Rec.* 193 :293-311.

MULLER Y. et CLOS J., 1997. La reproduction (Gonades, gamètes et fécondation). Edition Nathan, Paris: 9-31.

N

NEWY SE, BENSON MA, PONTING CP, DAVIES KE, BALKE DJ., 2000. Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol* 10 : 1295–1298.

NORWOOD, F. L. ; SUTHERLAND-SMITH, A. J. ; KEEP, N. H. ; KENDRICK-JONES, J., 1993. The Structure of the N-Terminal Actin-Binding Domain of Human Dystrophin and How Mutations in This Domain May Cause Duchenne or Becker Muscular Dystrophy. *Struct. Lond. Engl.*, 8 (5), 481–491.

O

ORGBIN-CRIST, M.-C., DANZO, B.J., and DAVIES, J. 1975. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In : *Handbook of Physiology, Section 7, Volume 5*, edited by R.O. Greep and E.B. Astwood, pp.319-338. American Physiological Society, Washington.

ORTH JM., GUNSALUS GL., LAMPERTI AA., 1988. Evidence from Sertoli celldepleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122, 787–794

P

PILUSO G, MIRABELLA M, RICCI E, BELSITO A, ABBONDANZA C, SERVIDEVI S, PUCA AA, TONALI P, PUCA GA, NIGRO V., 2000. Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *J Biol Chem* 275 : 15851–15860.

POSIERE S.C.G.J., 2002. Récolte de la semence de chat (Felis catus) par électro-éjaculation et par dissection de l'épididyme (comparaison des méthodes, essai de cryoconservation avec undilueur canin. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort : 95p.

PRINS KW, HUMSTON JL, MEHTA A, VICTORIA T, EVELYN R, JAMES ME., 2009. Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol*; 186 : 363–369

R

RAMOS A.S., JR., et DYM, M.,1977. Fine structure of the monkey epididymis. *Am. J. Anat.* 149 :501-531.

RANDO, T., 2001. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signalling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24, 1575-1594.

REID, B.L., and CLELAND, K W., 1957, The structure and function of the epididymis. 1. The histology of the rat epididymis. *Aust J Zool.* 5 :223-246.

REYES-MORENO C, LAFLAMME J, FRENETTE G, SIRARD MA, SULLIVAN R., 2008. Spermatozoa modulate epididymal cell proliferation and protein secretion in vitro. *Mol Reprod Dev* ;75 :512 –520.

REYNOLDS JG, MCCALMON SA, DONGHEY JA .,2008. Deregulated protein kinase A signaling and myosin expression in muscular dystrophy. *J Biol Chem* ; 283 :8070–8074

REZNICZEK GA, KONIECZNY P, NIKOLIC B, et al.,2007. Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with beta-dystroglycan. *J Cell Biol* ; 176 : 965–977.

RICKEN A.M et VIEBAHN C., 2002. Stage-specific expression of the mitochondrial germ cell epitope PG2 during postnatal differentiation of rabbit germ cell. *Biol. Reprod.* 67:196-203.

ROBAIRE B. et HERMO L. (1988). Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In *The Physiology of Reproduction* : 999-1080 Eds Knobil E. et Neill J. Rav. Pres. New-York.

ROBAIRE B., HINTON B.T. et ORGEBIN-CRIST M.C. (2006). The epididymis. In : Neill J.D. (ed.) *Physiol. of Reprod.* Third. Edition. New York : Elsevier : 1071-1148.

S

SABBAGH M.,1983. Etude de la sexualité et de la reproduction du lapin domestique *Oryctolagus cuniculus* à des températures élevées en corrélation avec la régulation thermique, le comportement alimentaire et le fonctionnement thyroïdien et surrénalien en période d'adaptation au stress thermique. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université de DAKAR, Ecole inter-états des Sciences et Vétérinaires : 113p.

SADOLET-PUCCIO H, RAJALA M, KIUNKEL L.,1997. Dystrobrevin and dystrophin : an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94 : 12413–12418

SADOLET-PUCCIO HM, KHURANA TS, COHEN JB, AND KUNKEL LM., 1996. Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum Mol Genet* 5 : 489–496.

SCHINCKEL A, JOHNSON RK, PUMFREY RA, et al., 1983. Testicular growth in boars of different genetic lines and its relationship to reproductive-performance. *J. Anim. Sci.*; 56 (5):1065-1076

SHUM W.W., RUAN Y.C., DA SILVA N. et al. (2011). Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *J. Androl.* 32: 576-586.

STAMLER, J. S.; MEISSNER, G., 2001. Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. *Physiol. Rev.* 81 (1), 209–237.

STEVENS A., LOWE J. et YOUNG B., 2008. Atlas d'histologie fonctionnelle de wheater. (5nd ed). Paris., Edition De Boeck Université.

Stone MR, O'NEILL A, CATINO D, BLOCH RJ., 2005. Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19. *Mol Biol Cell* 16 : 4280 – 4293.

SUN, E.L., and FLICKINGER, C.J., 1979, Development of cell types and regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am. J. Anat.* 154 :27-56.

SUN, E.L, and FLICKINGER, C.J., 1980, Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. *Anat. Rec.* 196 :285-293.

SUZUKI A, YOSHIDA M, OZAWA E., 1995. Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *J Cell Biol* 128 :373-381.

T

TRASLER, J.M., HERMO, L., and ROBAIRE, B., 1988, Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. *Bioi. Reprod.* 38 :463-479.

TEJVIR.S. KHURANA, SIMONC. WATKINS, PHILIPPE CHAFEY, JAMEL CHELLY , FERANDO M.S. TOME, MICHEL FARDEAU, JEAN-CLAUDE KAPLAN, LOUIS M. KUNKEL., 1991. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders* 1, 185-194.

TORTORAG J., DERRICKSON., 2009. Manuel d'anatomie et de physiologie humaine. Hoboken, N.J. Wiley : 1174p.

TURNER, TT et REICH, GW., 1995. Motilité des spermatozoïdes épидидymaires Cauda : une comparaison entre cinq espèces, *Biology of Reproduction*, 32(1), 120-128

V

VAISSAIRE J-P., 1977. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoires. MALOINE S.A. EDITEUR. 457p, p81-276.

VERI J. P., HERMO L. et 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.

W

WATSONR H., SAPSFORD CS., Mc CANCE I., 1956. The development of the testis, epididymis and penis in the young merino ram. *Ausir.J.Agric.Res.*,7 ,574-590

WELSCH U.,2002. Précis D' ; histologie. Cytologie, Histologie, Anatomie Microscopique. -Tournai (Belgique) : éd Médicales internationales. - 260 p.

WINNIE W. C. SHUM, YE CHUN RUAN, NICOLAS DA SILVA ET SYLVIE BRETON., 2011. Establishment of cell-cell Cross Talk in the Epididymis: Control of Luminal Acidification. 32 : 576-586.

WROBREL K.H., 1990. Male reproduction system. In: *Textbook of Veterinary Histology*, 2ème Ed:226-243.

Y

Y. PEREON, S. MERCIER, A. MAGOT., 2015. Physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne. Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires Nantes-Angers ; 22 :12s18-12s23.

Résumée

L'objectif de cette étude vise la révélation de la localisation des dystrophines et leurs protéines associées pendant le développement post-natal gonadique (testicule et épидидyme) des lapins de la souche synthétique. Les animaux utilisés provenant du centre d'élevage cunicole de Tizirt (Tizi-Ouzou) sont répartis en 3 lots de : un mois, trois mois et six mois. Après la réalisation des coupes, nous avons effectuées une étude immunohistochimique et histomorphométrique. Les paramètres immunohistochimiques des tubes séminifères et anneaux épидидymaires ont été évaluées par une observation au microscope à appareil photo. Les paramètres histomorphométriques ont été évaluées à l'aide du logiciel Axio-Vision-4.8. Les résultats préliminaires obtenue montrent une augmentation progressive pour la plupart des paramètres histologiques : (surface de la lumière du tube séminifère, surface des cellules de Sertoli, diamètre de l'épididyme, surface de l'épididyme, surface de la lumière épидидymaire, surface de l'épithélium épидидymaire) quant à d'autres subissent des élévations importante pour les paramètres : (Surface des tubes séminifères, surface de l'épithélium des tubes séminifères, diamètre des tubes séminifères, la hauteur des cellules principales). Certains, paramètres microscopiques des tubes séminifères tel que le diamètre et la surface des tubes séminifères, la surface de l'épithélium et celle de la lumière augmentent significativement, tandis que la surface du tissu interstitiel diminue avec l'âge. A propos des résultats de l'immunohstochimie, la révélation d'un marquage discontinu au niveau membranaire et continue au niveau des noyaux. De plus, l'intensité du marquage augmente en fonction de l'âge ce qui signifie la réplication des dystrophines et leurs protéines associées au sein du testicule et de l'épididyme.

Mots-clés : Testicule, épидидyme, dystrophines, immunohistochimie, histomorphométrie, développement post-natal.

Abstract

The aim of this study was to determine the localization of dystrophins and their associated proteins during post-natal gonadal development (testis and epididymis) in rabbits of the syngenetic strain. The animals used came from the Tizirt rabbit breeding center (Tizi-Ouzou) aware divided into 3 batches of: one month, three months and six months. After sectioning, we performed an immunohistochemical and histomorphometric study. Immunohistochemical parameters of seminiferous tubules and epididymal rings were assessed by camera microscope observation. Histomorphometry parameters were assessed using Axio-Vision-4.8 software. The preliminary results obtained show a progressive increase for most histological parameters: (seminiferous tubule lumen area, sertoli cell area, epididymal diameter, epididymal area, epididymal lumen area, epididymal epithelium area) while others undergo significant elevations for the parameters: (seminiferous tubule area, seminiferous tubule epithelium area, seminiferous tubule diameter, principal cell height). Some microscopic parameters of the seminiferous tubules, such as seminiferous tubule diameter, seminiferous tubule surface area, epithelium surface area and lumen surface area, increase significantly, while interstitial tissue surface area decreases with age. The immunohistochemistry results revealed discontinuous labelling at the membrane level and continuous labelling at the nucleus level. Moreover, the intensity of labelling increases with age, indicating replication of dystrophins and their associated proteins within the testis and epididymis.

Key words: Testis, epididymis, dystrophins, immunohistochemistry, histomorphometry, post-partum development.