

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



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

Mémoire de fin d'études

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

Thème

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

Présenté par : M^{elle} BENMESBAH Nadia

Soutenu devant le jury :

Président: M^{er} DEBIANE H.	Maître de conférences B	UMMTO
Promotrice: M^{me} LAKABI L.	Maitre de conférences B	UMMTO
Co-Promotrice: M^{me} HAMIDOUCHE Z.	Maitre de conférences A	UMMTO
Examinatrice : M^{me} CHOUGAR S.	Maître assistante A	UMMTO
Examinatrice : M^{me} GUENDOUZI S.	Maître assistante A	UMMTO

Remerciements

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à « ALLAH le Tout Puissant », pour nous avoir donné la volonté, la santé et la patience afin de réaliser et achever ce travail.

Mes vifs remerciements à M^{me}, LAKABI. L Maître assistante B, à l'université Mouloud MAAMERI de TO, qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être notre promotrice, de nous diriger tout au long de notre travail et pour toute l'aide et le temps qu'elle nous a consacré. Je vous remercie très sincèrement pour votre patience.

Nous tenant à remercier tout particulièrement notre co-promotrice, M^{me} HAMIDOUCHE. Z Maître assistante A, à l'université Mouloud MAAMERI de TO, d'avoir accepté de nous co-encadrer, et de nous avoir donné la liberté d'action à chaque étape de la réalisation de ce travail. Elle fut pour nous une co-promotrice attentive ; sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance nous ont beaucoup appris.

Que M^{er} DEBIANE H, Maître de conférences B, à l'université Mouloud MAAMERI de TO, soit vivement remercié pour l'intérêt qu'il a accordé au sujet et pour avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus chaleureux à M^{me} CHOUGAR S. et M^{me} GUENDOZI S, pour avoir acceptés d'examiner, d'évaluer et de juger notre travail.

C'est aussi pour nous un plaisir autant qu'un devoir, d'exprimer notre gratitude et reconnaissance à M^r HOUALI. K pour avoir mis à notre disposition son laboratoire de recherche doctorale et tout le matériel nécessaire, ainsi qu'à M^{me} YEFSAH. R et M^{me} TABET. N, et tout l'ensemble du personnel des différentes structures technico-administratives, pour leur aide, et pour tous ceux et celles qui, pendant cette période de préparation de mémoire, nous ont soutenus, aidés et encouragés.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma mère et mon père que le bon dieu leur accorde une longue vie.

- ✓ *A mes très chers frères, qui ont toujours cru en moi merci de m'avoir toujours soutenue dans ce que je voulais faire. Avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite*
- ✓ *A mes très chères sœurs qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans les moments les plus durs, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*
- ✓ *A la mémoire mes grands parents et de ma tante et mon oncle, que dieu ait paix de leurs âme.*
- ✓ *A mes oncles et tantes et tous mes proches. .*
- ✓ *A tous mes amis et amies.*

Nadia

La liste des figures

Figure 1 : Organisation interne du testicule.....	04
Figure 2: Ultrastructure d'une portion du tube seminifere.....	05
Figure 3 : Structure de la cellule de Sertoli.....	07
Figure 4 : Différentes étapes de la spermatogenèse.....	08
Figure 5 : Régulation de l'action endocrine de la testostérone.....	10
Figure 6 : Structure biochimique de la transferrine.....	13
Figure 07 : Appareil génitale mâle du lapin et mise en évidence des testicules et des épididymes.....	20
Figure 08 : lapins mâle ; A : lapin de la souche local, B : lapin de la souche synthétique.....	21
Figure 9 : Séparation des protéines des autre débris cellulaire A : Centrifugation, B : Mise en évidence du surnageant.....	23
Figure 10 : Structure de bleu de coomassie.....	24
Figure 11 : Homogénéisation à l'aide d'un vortex.....	25
Figure 12 : Dosage spectrophotométrique de la gamme étalon A : Dépôt de l'échantillon, B : Absorbance de l'échantillon.....	26
Figure 13 : Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de Bradford et <i>al</i> (1976).....	26
Figure 14 : Structure du détergent anionique Sodium dodecyl sulfate (SDS)	28
Figure 15 : Préparation de la cuve à électrophorèse.....	30
Figure 16 : Evolution du poids vif des lapins de la PB et la SS en fonction de l'âge.....	32

Figure 17 : Evolution du poids des testicules des lapins de la PB et de la SS en fonction de l'âge.....	33
Figure 18 : Evolution de la concentration protéique de l'homogénat testiculaire durant le développement postnatal des lapins de PB et de la SS.....	34
Figure 19 : Analyse électrophorétique monodimensionnel des protéines testiculaire des lapins de la population blanche.....	36
Figure 20 : Analyse électrophorétique monodimensionnelle des protéines testiculaire des lapins de la SS.....	37
Figure 21 : Linéaire de détermination de la masse moléculaire des protéines testiculaire...	38
Figure 22 : Profil électrophorétique monodimensionnel des protéines testiculaire des lapins de la PB.....	39
Figure 23 : Profil électrophorétique monodimensionnel des protéines testiculaire des lapins de la SS.....	40
Figure 24 : Localisation des bandes de migrations des protéines testiculaire des lapins de la PB et de la SS.....	41
Figure 25 : Evolution de la densité des bandes de migration des échantillons de la PB en fonction de l'âge.....	42
Figure 26 : Analyse densitométrique des profils électrophorétiques des protéines testiculaire des lapins de la PB.....	42
Figure 27 : Evolution de la densité des bandes de migration des échantillons de la SS en fonction de l'âge.....	43
Figure 28 : Analyse densitométrique des profils électrophorétiques des protéines testiculaire des lapins de la souche synthétique.....	43

Liste des figures

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Rappels bibliographique	
1. Anatomie et histologie du testicule	3
1.1. Anatomie.....	3
1.2. Histologie.....	3
1.2.1. Tissu interstitiel.....	4
1.2.2 Tube séminifère.....	4
1.2.2.1. Cellules de Leydig.....	6
1.2.2.2. Cellules de Sertoli.....	6
1.2.2.3. Cellules germinales	7
2. Fonctions et physiologie du testicule.....	8
2.1. Stéroïdogénèse.....	9
2.1.1. Rôle de la testostérone et de ses dérivés.....	9
2.1.2. Transport des estrogènes.....	9
2.1.3. Régulation de l'activité endocrine.....	10
2.2. Spermatogenèse.....	10
2.3. Cellules de Sertoli.....	11
2.3.1. Régulation de la cellule de Sertoli.....	11
2.3.2 Fonction de phagocytose.....	11

2.4.3 Sécrétrice.....	12
2.4.3.1 Sécrétion d’hormones et de facteurs de croissance.....	12
3. Sécrétion de protéines testiculaire.....	13
3.1. Protéines Sertolienne.....	13
3.1.1. Transferrine	14
3.1.2. Etrogen binding protein (ABP).....	15
3.1.3. Retinol binding protein (RBP).....	16
3.1.4. Clusterine ou glycoprotéine sulfatée-2 (SGP-2).....	17
3.1.5 Glycoprotéine sulfatée-1 (SGP-1).....	17
3.1.6. Alpha 2-macroglobuline.....	18
Chapitre II : Matériels et méthodes	
1. Matériel.....	19
1.1. Matériel biologique.....	19
1.3. Matériel de prélèvement des organes.....	21
1.4. Matériel de laboratoire.....	21
1.4.1. Appareillage.....	21
1.4.2 Verreries.....	22
1.4.3. Autres matériels.....	22
1.4.4. Produits chimiques et réactifs.....	22
2. Méthode.....	22
2.1. Extraction des protéines à partir des testicules.....	23
2.2. Dosage des protéines	23

2.2.1. Méthode Bradford (1976).....	24
2.2.1.1. Principe	24
2.2.1.2. Réalisation de la courbe étalon.....	24
2.2.1.3. Fonctionnement du spectrophotomètre.....	25
2.3. Analyse électrophorétique.....	27
2.3.1. Définition et principe général.....	27
2.3.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).....	27
2.3.2.1. Conditions générales.....	27
2.3.2.2. Préparation des gels.....	27
2.3.2.3. Préparation des échantillons.....	28
2.3.2.4. Electrophorèse.....	29
2.4. Révélation des bandes de migration électrophorétique.....	29
2.4.1. Fixation.....	29
2.4.2. Coloration	29
2.4.3. Décoloration.....	29
3. Analyse densitométrique qualitative des protéines sur gel.....	31
4. Programmation informatique	31
5. Analyse statistique.....	31
Chapitre III : Résultats et discussions	
1. Résultats.....	32
1.1. Poids des lapins.....	32
1.2. Poids des testicules.....	33
1.3. Dosage des protéines testiculaire.....	34
1.4. Electrophorèse et densitométrie des protéines testiculaire.....	35

1.4.1. Electrophorèse des protéines testiculaire.....	35
1.4.1.1. marqueur de poids moléculaire.....	35
1.4.1.2. Protéines de la population blanche	35
1.4.1.3. Protéines de la souche synthétique	36
1.4.1.4. Identification des poids moléculaires des protéines après séparation électrophorétique sur gel.....	37
1.4.1.4.1. Chez la population blanche.....	38
1.4.1.4.2. Chez la souche synthétique.....	39
1.4.1.4.3. Comparaison.....	40
1.4.2. Analyse semi-qualitative des protéines testiculaire.....	40
1.4.2.1. Chez la population blanche.....	41
1.4.2.2. Chez la souche synthétique.....	43
1.5. Analyse comparative des résultats électrophorétique et densitométrique.....	44
2. Discussion.....	44
2.1. Poids vif et poids testiculaire.....	44
2.2. Dosage et électrophorèse des protéines testiculaire.....	45
Conclusion et perspectives	48
Références bibliographiques.....	49
Annexe.....	58

Chez tous les mammifères et en particulier chez les ovins, caprins, porcins et lapins, l'organisation des appareils reproducteurs est la même, avec néanmoins des différences concernant la taille, le poids et la forme des organes (Hamon et *al.*, 1999). Les organes reproducteurs mâles possèdent trois principales fonctions dont la production des spermatozoïdes dans le testicule, la maturation, le stockage et le transport des spermatozoïdes dans le canal déférent et enfin le dépôt de la semence dans le tractus génital femelle via le pénis.

1. Anatomie et histologie du testicule

Le testicule est une glande amphicrine dont la fonction exocrine permet la production de gamètes mâles par le processus de spermatogénèse et dont la fonction endocrine concerne la production des hormones stéroïdes masculines (œstrogènes, essentiellement la testostérone). Chez les mammifères, le testicule est l'un des organes les plus complexes, tant d'un point de vue structural que fonctionnel (Sophie Chocu, 2014).

1.1. Anatomie

Les testicules sont des organes pairs dotés d'une double structure, compartiment tubulaire et compartiment interstitiel (Muller et Clos, 1997). Situés de part et d'autre de la ligne médiane inguinale, protégé et soutenu par une enveloppe appelée scrotum, constituée d'une fine couche de peau recouvrant divers couches fibro-élastiques et musculaires, dont la plus importante est le dartos (Barone, 2001).

Les testicules chez le lapin adulte sont de forme ovoïde, amincis aux extrémités avec un pôle caudal plus pointu, mesurant 3 à 3,5 cm de longueur, 1 à 1,5 cm de largeur, 1 à 1,3 cm d'épaisseur et pesant 1,5 à 2 g (Boussit, 1989 ; Barone, 2001).

1.2. Histologie

L'organisation interne du testicule est semblable chez les différents mammifères étudiés (Figure 1). Les testicules sont délimités par une enveloppe dense appelée albuginée (*tunica albuginea*) dont la surface interne est constituée d'un tissu conjonctif qui s'étend vers une région du testicule, appelée *mediastinum testis*, à l'intérieur de laquelle se situe un réseau de conduits anastomosés dénommé *rete testis*. Le tissu conjonctif qui constitue l'albuginée est

très vascularisé et contient des fibres musculaires lisses ce qui confère à cette structure enveloppant le parenchyme testiculaire, la capacité de se contracter (Jégou et *al.*, 2014).

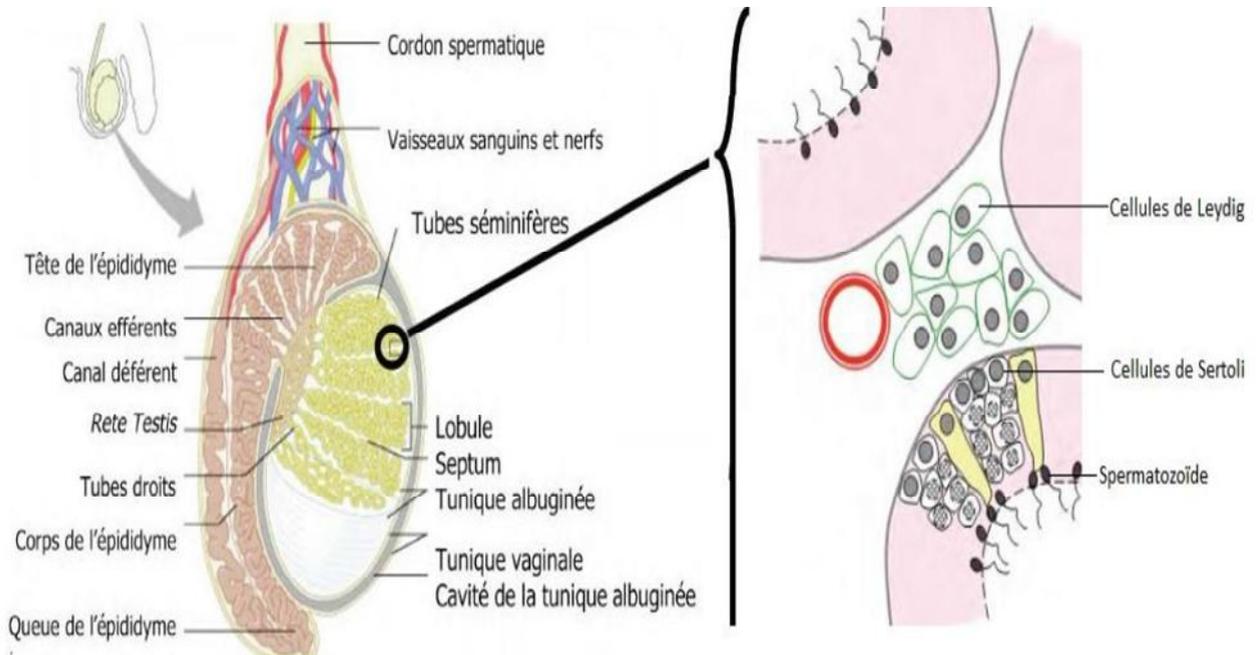


Figure 1 : Organisation interne du testicule (Senger, 2012)

Le parenchyme testiculaire est composé de nombreux lobules et chaque lobule comporte de très nombreux conduits, appelés les tubes séminifères, qui constituent le lieu d'élaboration des gamètes mâles. Chez le chat, ce tissu constitue 88 % du testicule, ce qui est élevé par rapport aux autres mammifères (environ 70-80 % en général) (Jégou et *al.*, 2014).

La structure du tube séminifère comprend un épithélium séminal composé des cellules de Sertoli et des cellules germinales ainsi qu'un tissu de soutien, la *lamina propria*, formée de fibres de collagène et de couches de cellules myoïdes (Barone, 2001).

1.2.1. Tissu interstitiel

Le tissu interstitiel testiculaire se compose de nombreux éléments : vaisseaux sanguins et canaux lymphatiques, fibrocytes, macrophages, parfois mastocytes et cellules endocrine appelées cellules de Leydig retenues par des fibres de collagène. Ces cellules sont groupées en amas autour de petits vaisseaux sanguins, sont intimement liées les unes aux autres (Figure 2) (Christensen, 1970).

1.2.2 Tube séminifère

Les spermatozoïdes sont élaborés dans de longs canalicules de petit diamètre appelé tubes séminifères. Ce sont des structures complexes formées d'une membrane limitante, de cellule de Sertoli constituant l'élément de soutien et de cellules germinales à des stades de développement variés (spermatogonies, spermatocytes et spermatides) (Figure 2) (Clermont, 1963).

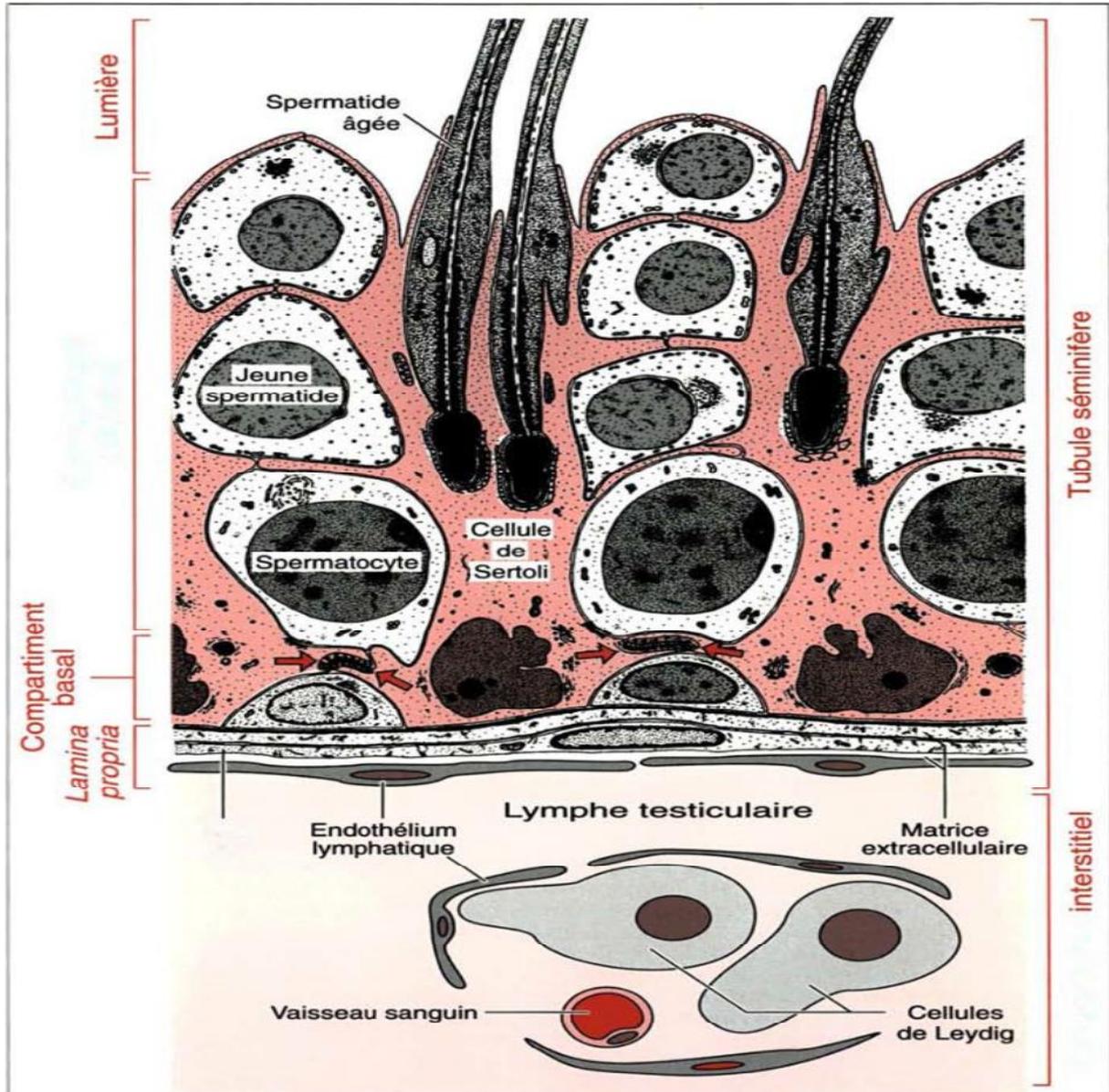


Figure 2: Ultrastructure d'une portion du tube séminifère (Russell et Griswold, 1993)

1.2.2.1. Cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont des cellules polygonales (10 μ m chez l'homme), qui sont soit dispersées, soit groupées en amas autour des capillaires sanguins et entourées par une lame basale discontinue.

Les cellules de Leydig présentent un noyau rond qui contient de volumineux nucléoles. Leur cytoplasme est riche en citernes de REL ; les mitochondries sont peu nombreuses, de taille variable et présentent des crêtes tubulaires. Les enclaves lipidiques sont abondantes dans le cytoplasme des cellules matures.

De nombreuses jonctions, de types Gap, desmosome et plus rarement des jonctions septées ont été mis en évidence au niveau de la membrane plasmique (Dadoune et Demoulin, 2001).

1.2.2.2. Cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont de grandes cellules non prolifératives dotées d'un grand noyau polymorphe et d'un cytoplasme abondant. Leur base repose sur la lame basale, tandis que leur cytoplasme apical en atteint la lumière (Clermont, 1963).

Des régions latérales et apicales partent de nombreuses projections cytoplasmiques finement réticulées qui s'infiltrant entre les cellules germinales qui sont en contact immédiat avec la surface des cellules de Sertoli. A proximité de la membrane limitante les projections cytoplasmiques latérales des cellules de Sertoli adjacentes sont reliées par des complexes de jonction caractéristiques (jonctions serrées) situés à la surface de la cellule (Clermont, 1963).

Des études ont montré que ces complexes de jonction des cellules de Sertoli divisent l'épithélium séminifère en deux compartiments distincts, un compartiment basal où sont situés les spermatogonies et les spermatocytes pré-leptotènes, et un compartiment bordant la lumière et contenant les spermatocytes et les spermatides.

Par suite les cellules de Sertoli sont considérées comme l'un des éléments de la barrière de perméabilité (barrière hémato-testiculaire), qui est capable d'éliminer de nombreuses substances du compartiment apical (Figure 3) (Dym, 1970).

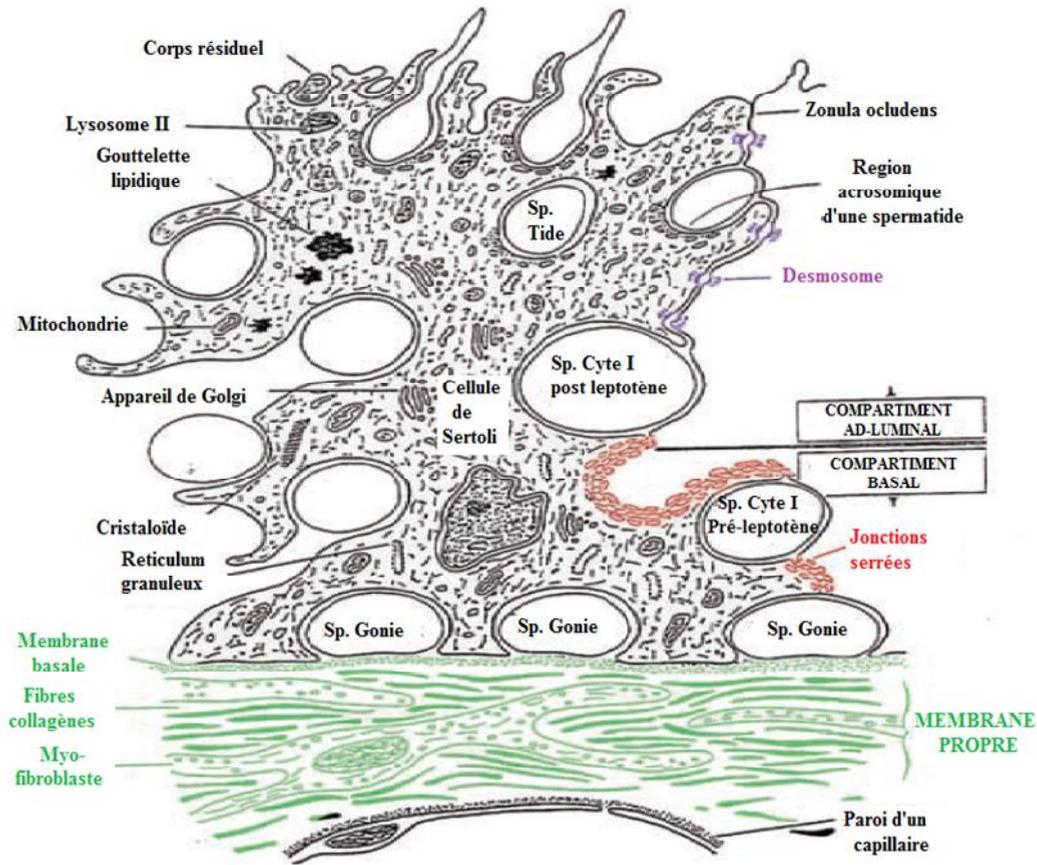


Figure 3 : Structure de la cellule de Sertoli (Russell et Griswold, 1993)

1.2.2.3. Cellules germinales

Les spermatogonies du lapin, comme celles de tous les mammifères, se divisent en deux catégories principales : spermatogonies du type A qui en se proliférant donnent naissance à des spermatogonies du type B. Chez l'homme, les spermatogonies de type A ont été en outre subdivisées en « type clair » et « type foncé » (Fawcett et Burgos, 1956).

Les spermatogonies (spermatogonies du type B) recrutées effectuent une réplication de l'ADN suivie de la première division de méiose qui les transforme en spermatozytes I tétraploïdes. L'achèvement de cette première division conduit à deux spermatozytes II diploïdes (Kretser, 1969). Chacun subit alors la deuxième division de méiose, sans synthèse d'ADN, ce qui conduit à la formation de deux spermatoïdes haploïdes. La dernière phase est la spermiogénèse, qui transforme les spermatoïdes en spermatozoïdes (Figure 4) (Clermont, 1972).

Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone) qui agissent sur le testicule pour réguler ses fonctions.

2.1. Stéroïdogénèse

Les cellules de Leydig sont le siège de la biosynthèse de la testostérone. Cette biosynthèse nécessite l'intervention d'un certain nombre d'enzymes agissant en cascade à partir d'un précurseur commun à tous les stéroïdes, le cholestérol (Saez, 1994). Dans l'organisme, il existe différentes sources de cholestérol. Celui-ci provient soit des lipoprotéines circulantes HDL et LDL (High et Low Density Lipoprotein) (Morris et Chaikoff, 1959; Benahmed *et al.*, 1981), soit des esters de cholestérol, soit via une synthèse endogène à partir d'acétate (Hou *et al.*, 1990).

Le transport du cholestérol du cytoplasme vers la membrane mitochondriale, est une étape clef. Plusieurs protéines interviennent dans le transport du cholestérol. La plus importante est la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) (Clark *et al.*, 1994).

2.1.1. Rôle de la testostérone et de ses dérivés

La testostérone agit en se fixant aux récepteurs aux estrogènes (AR) à différents niveaux des cellules de Sertoli où elle est essentielle au déclenchement et l'entretien de la spermatogénèse et aussi dans l'inhibition de l'apoptose des cellules germinales (Singh *et al.*, 1995).

Il a été démontré que des taux relativement modérés de testostérone dans le testicule sont suffisants pour maintenir une spermatogénèse (Zhang *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que leur récepteurs localisés sur les cellules de Sertoli, jouent un rôle clé pour la méiose des cellules germinale et sont indispensables à la stéroïdogénèse mâle (Chang *et al.*, 2004; De Gendt *et al.*, 2004).

2.1.2. Transport des estrogènes

Une fois synthétisées, les hormones stéroïdes sont transportées dans le sang jusqu'aux différents organes cibles. La majorité des hormones stéroïdes sont liées à des protéines plasmiques telles que la Sex Hormone Binding Globuline (SHBG), l'albumine et l'ABP (protéine sécrétée par la cellule de Sertoli) (Joseph *et al.*, 1987).

2.1.3. Régulation de l'activité endocrine

La LH est l'hormone qui contrôle la fonction endocrine du testicule en agissant sur les cellules de Leydig et stimule la production de la testostérone. Il existe une interaction très forte entre les tubes séminifères et le compartiment interstitiel, au travers d'un dialogue entre les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig (Figure 5) (Hayes *et al.* 2000).

Les macrophages jouent un rôle important dans la régulation de la fonction endocrine des cellules de Leydig (Hales, 1996). Ces cellules sont capables d'inhiber la synthèse des stéroïdes par le biais de cytokines (IL-1) et de TNF-alpha (Abney, 1999).

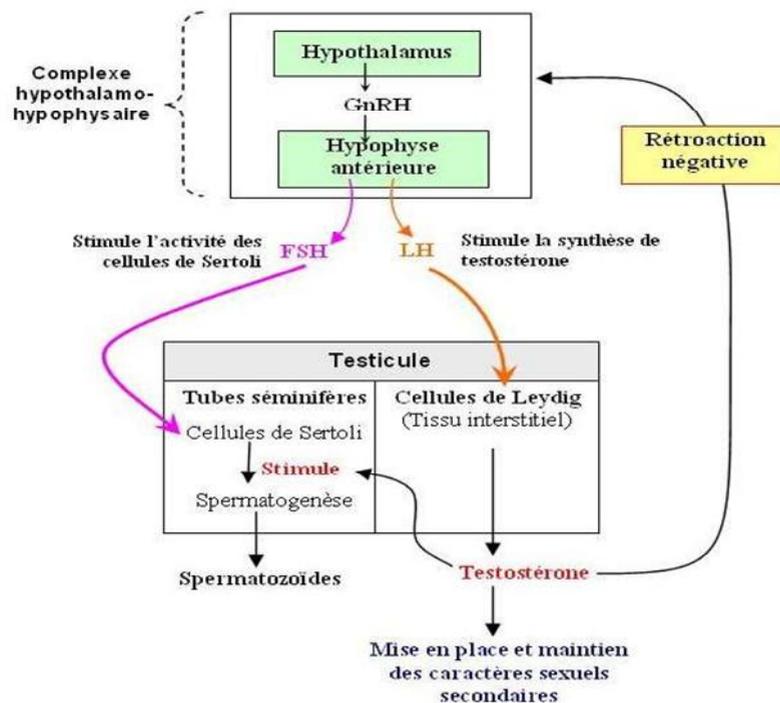


Figure 5 : Régulation de l'action endocrine de la testostérone (Abney, 1999)

2.2. Spermatogénèse

Lors de la phase proliférative de la spermatogénèse, les cellules germinales souches ou spermatogonies développent une forte activité mitotique pendant leur autorenouvellement.

L'Erm (Ets related molecule) est un facteur de transcription spécifiquement exprimé dans les testicules par les cellules de Sertoli vers 3 à 4 semaines après la naissance semble être indispensable à l'autorenouvellement des cellules germinales (Chen *et al.*, 2005; Hess *et al.*, 2006).

Le GDNF est sécrété par les cellules de Sertoli, il initie le développement des cellules souches spermatogoniales, il joue un rôle important dans la régulation de l'évolution des spermatogonies vers la mitose ou la méiose (Meng *et al.*, 2000) et induit leur prolifération (Viglietto *et al.*, 2000; Tadokoro *et al.*,2002).

2.3. Cellules de Sertoli

Tout au long de la spermatogenèse, les cellules germinales sont dépendantes d'une population de cellules somatiques : les cellules de Sertoli, qui en plus de ses fonctions de maintien de l'architecture de l'épithélium séminifère et de contrôle du bon déroulement de la spermatogenèse, elle assure de nombreuses autres fonctions tel la création de l'environnement optimal pour le développement des cellules germinales et l'autorenouveaulement des germinales souches (niche) (Russell, 1993).

2.3.1. Régulation de la cellule de Sertoli

Le facteur PModS est sécrété par les cellules myoïdes périvitubulaires. L'activité de ce facteur a été montrée comme influençant les fonctions des cellules de Sertoli, une fois qu'elles sont différenciées (Norton *et al.*, 1992 et 1994).

2.3.2 Fonction de phagocytose

La cellule de Sertoli assure une triple fonction de phagocytose. Son rôle premier est l'élimination des cellules germinales qui ont dégénéré au cours de la spermatogenèse. Elle a également pour rôle de phagocyter les corps résiduels, qui se détachent des spermatozoïdes lors de la spermiation. Enfin, elle élimine les complexes de jonctions qui sont sans cesse renouvelés (Russell *et al.*, 1990).

Concernant son rôle premier (Nakanishi et Shiratsuchi, 2003), il a été montré que la cellule de Sertoli phagocyte les cellules germinales apoptotiques qui expriment de manière spécifique le phosphatidylsérine phospholipide (PS).

Il a été montré que la transferrine dimérique est un modulateur de la phagocytose des corps résiduels, les dimères de transferrine inhibant *in vitro* l'ingestion des corps résiduels par les cellules de Sertoli (Yefimova *et al.*, 2008).

2.4.3 Sécétrice

L'activité sécrétoire de la cellule de Sertoli est essentielle au bon déroulement de la spermatogénèse (Russell et Griswold, 1993).

Le fluide testiculaire est tout d'abord nécessaire à la formation de la lumière des tubes séminifères. Il permet également le transport des spermatozoïdes dans la lumière du tube ainsi que leur transport vers le *rete testis*, les canaux efférents et l'épididyme. Il permet aussi le transport de différentes molécules (nutriment, protéines ou facteurs de croissance) produites par la cellule de Sertoli (Russell *et al.*, 1989).

Le fluide sécrété par les cellules de Sertoli joue un rôle important dans la distribution des nutriments aux cellules germinales et dans le transport de facteurs régulateurs impliqués dans la communication entre les deux parties du tube séminifère. La composition protéique du fluide testiculaire ne diffère pas de celle du plasma sanguin, de la lymphe et du liquide interstitiel (Johnson et Everitt, 2002).

2.4.3.1 Sécrétion d'hormones et de facteurs de croissance

La cellule de Sertoli est la cellule pivot autour de laquelle s'organise toute l'activité fonctionnelle du testicule et ce, dès la vie fœtale. Pour cela, elle sécrète des hormones et autres molécules. Ces molécules sont impliquées dans différentes fonctions.

Dès la vie fœtale, la cellule de Sertoli est responsable de la production d'une hormone primordiale pour le développement mâle : l'AMH (Anti-Müllerian Hormone ou MIS pour Müllerian Inhibiting Substance). Cette hormone de 140 kDa est impliquée dans le développement sexuel et dans la différenciation du testicule fœtal (Donahoe *et al.*, 1988).

La cellule de Sertoli sécrète également de nombreuses facteurs de croissance et cytokines tels que le TGF α (Transforming Growth Factor α), le FGF (Fibroblast Growth Factor), des IGFs (Insulin like Growth Factors), les interleukines Il-1 α et Il-6, le GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor) et le SCF (Stem Cell Factor) (Viglietto *et al.*, 2000; Tadokoro *et al.*, 2002).

3. Sécrétion de protéines testiculaire

3.1. Protéines Sertolienne

La cellule de Sertoli sécrète également des protéines de transport. Ces protéines sont responsables de l'acheminement de nutriments, vitamines et hormones vers les cellules germinales.

Parmi ces protéines de transport, la cellule de Sertoli sécrète des protéines liant les métaux notamment la transferrine qui lie le fer (Skinner *et al.*, 1980) et la ceruloplasmine qui transporte le cuivre (Skinner *et al.*, 1983), des protéines de transport des lipides comme la clusterine (impliquée dans le transport des lipides notamment) et la saposine (protéine activatrice des sphingolipides) (Kissinger *et al.*, 1982), des protéines pour le transport des hormones, tel que les protéines de liaison aux estrogènes, les (ABP) ou à l'acide rétinolique et des protéines de transport des vitamines (A et D principalement) (Sanborn *et al.*, 1975 ; Hagenas *et al.*, 1975).

3.1.1. Transferrine

La transferrine est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 79 kDa, composée d'une seule chaîne polypeptidique de 679 résidus d'acides aminés (Figure 6). Des études cristallographiques de la protéine ont permis de visualiser deux domaines fonctionnels homologues (Gorinski B, Horsburgh C, Lindsey PE, et al., 1979). Il existe environ 50 % d'homologie entre les résidus d'acides aminés qui composent ces deux domaines (Heaphy S, Williams J. 1982). Chacun des domaines peut fixer un ion Fe^{3+} avec une très forte affinité (Aisen P. 1978). Outre le fer, la transferrine peut fixer d'autres métaux comme le Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} avec une affinité plus faible.

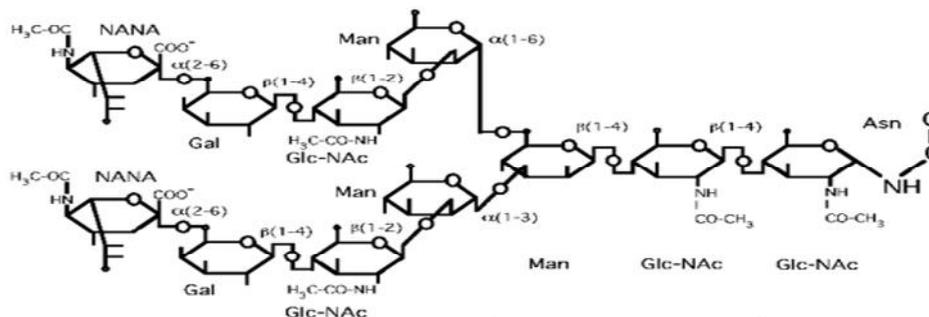


Figure 6 : Structure biochimique de la transferrine (Raisonnier, 2003)

Le foie est le principal site de synthèse de la transferrine. Dès sa synthèse par les hépatocytes, la transferrine est aussitôt sécrétée dans le sang (Morgan, 1969).

La synthèse de transferrine est aussi détectée dans d'autres organes qui présentent des barrières hématiques, comme le système nerveux central, les cellules de la rétine (Bloch, 1987, Cassia, 1997, Yefimova, 2000), ainsi que dans la glande mammaire (Lee, 1987) et le testicule (Huggenvik, 1987).

La transferrine sécrétée par les cellules de Sertoli du testicule présente une composition identique en acides aminés et le même poids apparent que la transferrine sérique. Cependant, elle a une composition en sucre quantitativement plus importante (Skinner, 1984).

La transferrine est détectée dès la vie fœtale dans le testicule. En effet, l'analyse de testicules fœtaux de rats a montré la présence des ARNm de la transferrine dès 14,5 jours post-coïtum (Migrenne, 2003). Elle est considérée comme un marqueur de différenciation des cellules de Sertoli, car son niveau d'expression augmente avec l'âge, parallèlement à la maturation des cellules de Sertoli (Anthony, 1991 ; Suire, 1997).

La transferrine produite par le testicule comme celle présente dans le sang est connue comme un proémine transporteur de fer du fait de la présence de la barrière hématotesticulaire. Le fer provenant de la circulation sanguine ne peut arriver directement aux cellules germinales méiotiques ou post méiotiques. De ce fait, la cellule de Sertoli a mis en place un système permettant de véhiculer le fer de la circulation sanguine vers les cellules germinales situées au-delà de cette barrière hématotesticulaire selon le mécanisme suivant :

- La transferrine sérique chargée de deux atomes de fer se fixe sur son récepteur situé du côté basal des cellules de Sertoli, le complexe est internalisé par la membrane baso-latérale puis l'amène jusqu'aux endosomes ;

- L'acidification à l'intérieur des endosomes (pH : 5,5), du fait de la présence de pompes à protons, entraîne une dissociation du fer du complexe transferrine-récepteur ;

- L'apotransferrine sérique, liée à son récepteur, est recyclée vers la surface ;

- La transferrine sertolienne, liée au fer, se fixe sur son récepteur situé au niveau des spermatozoïdes et des spermatides (Holmes, 1983 ; Sylvester, 1984) ;

- Le fer est alors pris en charge par la ferritine se trouvant dans la plupart des cellules germinales, en particulier les spermatozoïdes pachytènes, ou incorporé dans des protéines (Wauben-Penris, 1988 ; Petrie, 1992,).

3.1.2. Etrogen binding protein (ABP)

L'ABP (Etrogen Binding Protein) est une glycoprotéine de liaison des androgènes de 701 à 90 000 D composée de 2 sous unités qui ont été mise en évidence dans le cytosol testiculaire ou épидидymaire dans un certain nombre d'espèces par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Hansson et *al.*, 1974). Elle lie spécifiquement ces deux stéroïdes androgènes, principalement la 5 α -dihydrotestostérone (5 α DHT) et en moindre quantité la testostérone, mais très peu ou pas du tout les autres stéroïdes, qu'ils soient d'origine gonadique ou surrénalienne (Hansson et *al.*, 1975 ; Jégou et *al.*, 1978). C'est une protéine thermolabile, sensible à la trypsine (Musto et *al.*, 1978).

L'ABP est une protéine d'origine testiculaire : on l'observe en effet dans le cytosol du testicule (Hansson et *al.*, 1973), elle est excrétée dans le fluide testiculaire (Jégou et *al.*, 1978) et passe dans l'épididyme (French et Ritzen, 1977). Plus précisément, l'ABP est produite par les cellules de Sertoli (Hagenäs et *al.*, 1978 ; Steinberger et Steinberger, 1977 ; Rommerts et *al.*, 1977).

Sa concentration exprimée par sa capacité à lier la 5 α DHT à saturation diminue progressivement de la tête à la queue de l'épididyme chez le rat adulte (Hansson et *al.*, 1974). Ceci traduit une destruction de la capacité de liaison de la protéine dans l'épididyme. Cette observation est confirmée chez le lapin adulte par la comparaison des concentrations (molaires) d'ABP dans le fluide testiculaire et celui de la queue épидидymaire (Danzo, Cooper et Orgebin-Crist, 1977). La présence d'ABP dans le plasma séminal de l'éjaculat a été observée chez certaines espèces (taureau, bélier, bouc) alors qu'on ne peut pas la détecter chez d'autres (homme, ver rat, étalon) (Jégou et Le Gac-Jégou, 1978).

Dès les premiers travaux sur l'ABP, il est apparu que la protéine est sous le contrôle endocrinien puisqu'elle disparaît du testicule après hypophysectomie et qu'un traitement combiné de FSH et LH via la testostérone en restaure la production chez le rat. Cependant tous les auteurs ne s'accordent pas sur la dépendance hormonale de l'ABP ; certains donnent un rôle prioritaire à FSH alors que pour d'autres, la testostérone est essentielle (Hansson et *al.*, 1973 et 1974).

Selon des travaux réalisés sur des cellules de Sertoli de rat immature cultivées *in vitro*, ces deux hormones, FSH et testostérone, augmentent la sécrétion de l'ABP. Elles agissent indépendamment l'une de l'autre avec, toutefois, une interaction significative lorsqu'elles sont administrées simultanément (Louis et Fritz, 1979).

Par contre, le transport de l'ABP dans l'épididyme semble spécifiquement contrôlé par la FSH (Weddington et *al.*, 1975 ; Kotite, et *al.*, 1978 ; Tindall et *al.*, 1978).

L'ABP lie spécifiquement les androgènes, mais les stéroïdes liés se dissocient assez rapidement de la protéine porteuse. Ceci suggère que cette protéine doit jouer un certain rôle dans le stockage et le transport des androgènes vers les organes cibles de l'appareil génital mâle (Kotite, et *al.*, 1978).

3.1.3. Retinol binding protein (RBP)

La rétinol-binding protein (RBP), appelée aussi RBP4, est la protéine de transport du rétinol du milieu extracellulaire. La RBP a une demi-vie courte de 12 heures et une masse moléculaire de 21 kDa, elle est formée d'une seule chaîne polypeptidique de 182 acides aminés (Diconstanzo Dufetel, 1987 ; Aussel et Cynober, 1998 ; Graham et *al.*, 2006 ; Guder et Hofmann, 2008).

La cellule rétinol-binding protein (CRBP) et la cellule rétinol-acide-binding protein (CRABP) sont deux protéines intracellulaires de transport des rétinoïdes et des acides gras. Le métabolisme du rétinol dans le testicule débute par la captation du rétinol du complexe rétinol-RBP par les cellules périvitubulaires riches en CRBP qui vont fournir le rétinol à une molécule nouvellement synthétisée de RBP libérée pour atteindre le tube séminifère (Davis et Ong, 1995).

La cellule de Sertoli, elle aussi riche en CRBP, peut alors internaliser le rétinol du complexe rétinol-RBP. Cette cellule synthétise à son tour de nouvelles molécules de RBP-rétinol du côté apical pour fournir du rétinol aux cellules germinales du côté luminal de la barrière hémato-testiculaire (Schmitt et Ong, 1993).

L'une des destinées du rétinol est d'être internalisé dans les spermatozoïdes pour être converti en rétinylester et stocké. Ce stock de rétinoïdes pourrait avoir une fonction dans la maturation ultérieure des spermatozoïdes. Par ailleurs, la CRABP est localisée dans les spermatogonies et exclusivement localisée dans le cytoplasme, ce qui suggère un rôle pour

protéger certains stades de la spermatogénèse de l'effet de l'acide rétinolique (Davis et Ong, 1992).

3.1.4. Clusterine ou glycoprotéine sulfatée-2 (SGP-2)

En 1983, la clusterine a été purifiée pour la première fois à partir du fluide testiculaire de bélier (Blaschuk et Burdzy, 1983). Cette molécule représente la glycoprotéine majoritaire du fluide testiculaire. Elle a été caractérisée alors comme un inducteur d'agrégation *in vitro* de divers types cellulaires. SGP-2 ou *sulfated glycoprotein-2* est la molécule équivalente de la clusterine chez le rat. Elle est également le produit majoritaire de sécrétion des cellules de Sertoli de rat en culture (Collard et Griswold, 1987).

Cette glycoprotéine hétérodimérique de 80 kDa et de très large distribution chez les animaux supérieurs, a été associée à des phénomènes physiologiques tels que les interactions cellule-cellule, la sécrétion, la régulation du complément et le transport des lipides.

Sa propriété anti-lytique vis-à-vis du complément et sa capacité de se lier à des lipides ou à des molécules hydrophobes lui confèrent un rôle de protection de la membrane cellulaire.

En outre, elle pourrait préserver la cellule de la suractivation du complément et maintenir l'intégrité de la membrane cellulaire ou des peptides biologiques dans les vésicules de sécrétion dans des situations normales et pathologiques (Rabenetrasana et Ramschoye, 1994).

Le gène de la clusterine, d'une longueur de 20 kb, est présent en deux copie par génome (Purello et *al.*, 1991 ; Fink et *al.*, 1993).

La forme précurseur de la clusterine est composée de 427 à 449 résidus d'acides aminés. Son peptide signal comporte une vingtaine de résidus d'acides aminés. Les chaînes α et β non glycosylées ont une masse moléculaire moyenne de 50 kDa. La maturation de cette protéine comporte un clivage protéolytique et des glycosylations (Collard et Griswold, 1987 ; James et *al.*, 1991).

3.1.5 Glycoprotéine sulfatée-1 (SGP-1)

Glycoprotéine-1 sulfatée (SGP-1) est un polypeptide de 70 KDa majeur sécrétée par des cellules de Sertoli de rat. L'analyse séquentielle a révélé une similarité de séquence de

70% avec la prosaposine humaine et une similarité de 80% avec la prosaposine de souris. ces prosaposines qui sont des protéines de 65 à 70 kDa clivées dans les lysosomes en quatre protéines de 10-15 kDa appelées saposines A, B, C et D.

.Les études morphologiques et immunocytochimiques ont indiqué que la prosaposine et la saposine peuvent atteindre les phagosomes de cellules de Sertoli, par fusion lysosomale, qui contiennent des corps résiduels cytoplasmiques détachés des spermatides durant la spermiation. Ainsi, la prosaposine et leurs saposines dérivées doivent jouer un rôle dans l'hydrolyse des glycolipides membranaires présent dans les corps résiduels phagocytés.

D'autre part, la fonction de la forme sécrétée du SGP-1 n'est pas toujours pas claire. Cependant, Morales et *al.*, 1995 ont vu que le SGP-1 interagissait avec la membrane plasmique des spermatides en développement.

3.1.6. Alpha 2-macroglobuline

L'alpha macroglobuline (A2M) est une glycoprotéine de masse moléculaire 725kDa et de demi-vie de 5 jours, synthétisée par le foie, les macrophages et aussi par les cellules de Sertoli. Elle est constituée de glucides et de quatre sous-unités polypeptidique identiques reliées par des ponts disulfures (Annie et *al.*, 1994).

Nous avons réalisé une étude préliminaire qui vise à déterminer le profil électrophorétique des protéines testiculaires durant le développement postnatal chez deux populations de lapins, la population blanche et la souche synthétique.

Notre travail s'articule autour de l'étude du développement gonadique et de la maturité sexuelle des lapins de la population blanche et de la souche synthétique. Il s'inscrit dans le cadre des travaux post-doctoraux du Dr Lakabi L. Il a été réalisé dans les laboratoires communs de notre faculté principalement dans le laboratoire commun II et le laboratoire de biochimie dirigé par le Professeur Houali K.

1. Matériel

1.1 Matériel biologique

L'étude a été réalisée sur les testicules de 27 lapins mâles « *Oryctolagus cuniculus* » à différents âges et appartenant à deux populations de fonds génétiques différents : 12 lapins âgés de 4, 8, 12 et 16 semaines de la population blanche et 12 lapins âgés de 4, 8, 12 et 16 semaines de la souche synthétique.

Les animaux de la population blanche sont issus de l'unité d'élevage de lapins de la coopérative des petits élevages « COOPAPIST » située à Djebba, dans la commune de Ouaguenoune, wilaya de Tizi-Ouzou. Ceux de la souche synthétique proviennent d'un élevage privé à Tizirt, wilaya de Tizi-Ouzou.

Les lapins de la population blanche ont été sacrifiés par saignement puis disséqués (figure 07). Les testicules sont prélevés, dégraissés, pesés puis plongés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Tandis que ceux de la souche synthétique ont été sacrifiés et disséqués en 2016 pour une étude histologique sous la direction du Dr HAMIDOUCHE, leurs testicules (utilisés dans notre étude) ont été prélevés, pesés, congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C au niveau du laboratoire LABAB.

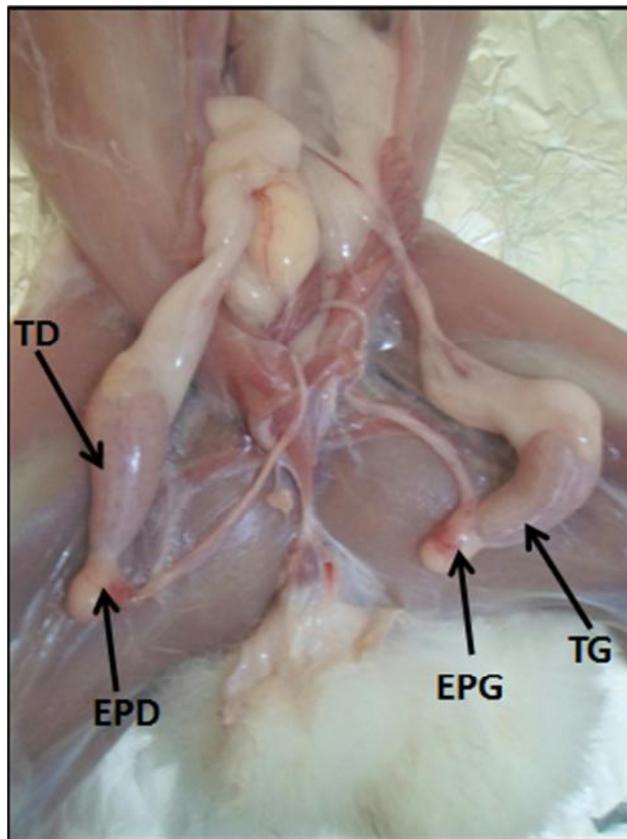


Figure 07 : Appareil génitale mâle du lapin et mise en évidence des testicules et des épидидymes (Originale, 2017)

TD : Testicule Droit, EPD : Epididyme Droit, TG : Testicule Gauche, EPG : Epididyme Gauche.

Selon Zerrouki (2006), la population locale de lapins présente une variabilité phénotypique résultant des croisements multiples et volontaires (amélioration des caractères de production) avec des races étrangères introduites en Algérie au cours des années 70 (Néo-Zélandais, fauves de bourgogne, Géant des Flandres, californien). Ce processus s'est amplifié entre 1985 et 1989 par l'introduction de reproducteurs de souche « Hyplus ».

Le type amélioré ou souche synthétique, a été initié à l'institut technique des élevage-Baba-Ali, Alger (ITELV) à partir de 2003 en collaboration avec l'INRA de Toulouse (Gacem et *al.*, 2009). Cette souche est caractérisée par une prolificité importante (9 lapereaux née vivant par mi-bas), un poids adulte sensiblement plus élevé et une meilleure aptitude à la croissance que la population locale algérienne (Figure 08) (Lebas et Zerrouki, 2010).

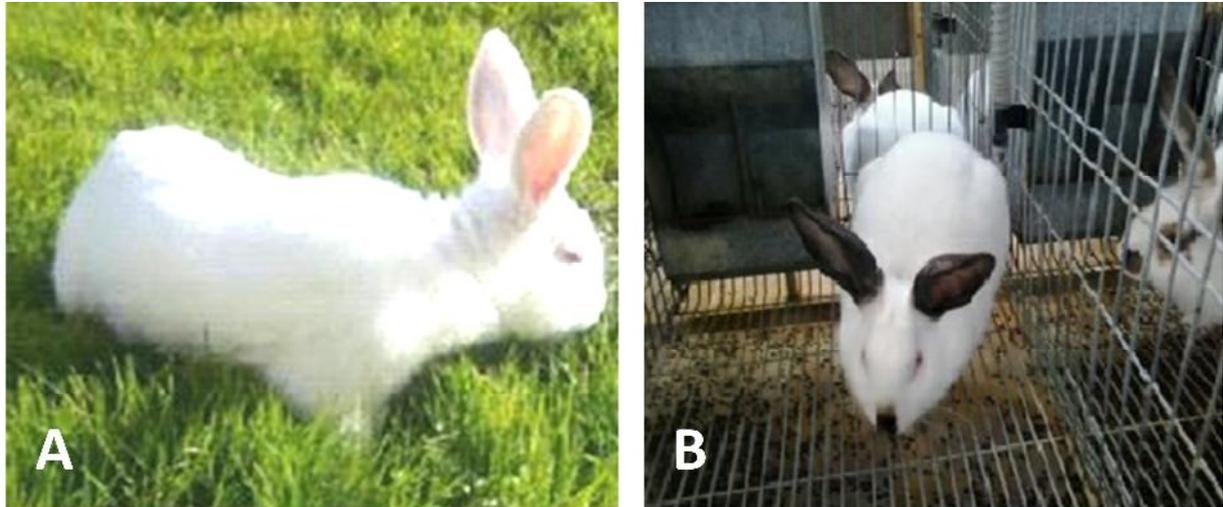


Figure 08 : lapins mâle ; A : lapin de la souche local, B : lapin de la souche synthétique (Originale, 2017).

1.3 Matériel de prélèvement des organes

Étaient nécessaires à la réalisation des sacrifices des lapins et des prélèvements des organes, le matériel suivant :

Bistouri, pinces à dissection, azote liquide, eppendorfs et marqueur pour l'identification des eppendorfs.

1.4 Matériel de laboratoire

1.4.1 Appareillage

Afin de réaliser notre étude nous avons utilisé les appareils suivants :

- Unités d'électrophorèse sur mini cuves verticales comprenant : un couleur de gel, une cuves d'électrophorèse, un générateur de courant (max 250V, 500mA), une plaques en verre et l'autre en hydroxyde d'alumine (10 x 8 cm), des espaceurs de 0.75 à 1.15 mm d'épaisseur et un peigne à 10 puis ;
- spectrophotomètre UV-visible (SCHIMADZU) ;
- pH mètre (HANNA) ;
- centrifugeuse réfrigérée, max 2000 x g (SIGMA) ;

- agitateurs variés (de tube « VORTEX » à barreaux magnétiques chauffant et non chauffant...);
- deux congélateurs l'un réglé à - 20°C et l'autre à - 80°C ;
- bain Marie ;
- balance de précision à 0.001mg (KERN) ;
- balance analytique à affichage digital (0.1g).

1.4.2 Verreries

La verrerie utilisée au cours de notre étude est la suivante :

Béchers (50, 100, 250, 500 et 1000 ml), entonnoir, éprouvettes (50, 250 et 500 ml), pipette (1ml et 5 ml), verre de montre, flacons sombres, Potter en verre.

1.4.3 Autres matériels

D'autres petits matériels ont été nécessaires tout le long de notre étude et on cite :

Barrots magnétiques, gel anti fuite (gel d'agarose), étiquettes, papier filtres, portoirs, micropipettes (10-100 μ l ; 100-1000 μ l), bavettes, gants, papier film, papier absorbant, papier aluminium, pince, spatule, poire, pissettes et eppendorfs.

1.4.4 Produits chimiques et réactifs

- Solvants usuels tel que l'acide acétique glacial, le méthanol, l'éthanol, le glycérol, le MgCl₂ et le SDS.
- Colorants et réactifs spécifiques comme les bleu de bromophénol, bleu de coomassie R250, bleu de coomassie G250, acrylamide, N,N-méthylène-bis-acrylamide, persulfate d'ammonium, glycine, Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane (TRIS), TEMED, Phénylméthyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) et le β -mercaptoéthanol.

2 Méthode

Notre expérimentation s'est déroulée dans différents laboratoires de l'université Mouloud Mammeri de la wilaya de Tizi-Ouzou.

2.1 Extraction des protéines à partir des testicules

Lors de cette expérience, nous avons réalisé l'extraction des protéines à partir des échantillons testiculaires en utilisant le tampon d'extraction (annexe 14).

Principe

Les testicules sont broyés à froid (avec un petit volume d'azote liquide), dans un Potter de verre plongé dans de la glace avec un volume de 200µl du tampon d'extraction (de lyse) pour empêcher la protéolyse. Après broyage pendant quelques minutes, le broyat est récupéré et centrifugé durant 10 à 15 min à une vitesse de 770 g (gravité) pour séparer les protéines des autres débris cellulaires (figure 09).

Les surnageants contenant les protéines sont prélevés puis congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation, pendant que le culot est conservé à -80°C pour des études moléculaires ultérieures.

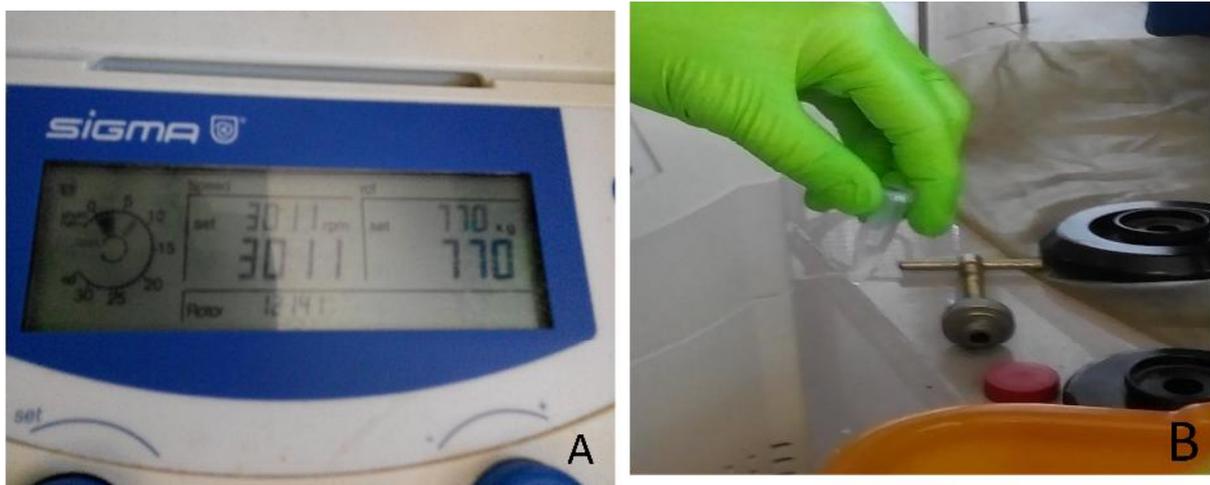


Figure 09 : Séparation des protéines des autres débris cellulaires (Originale, 2017).

A : Centrifugation, B : Mise en évidence du surnageant

2.2 Dosage des protéines

Le dosage des protéines testiculaires a été réalisé dans le laboratoire de recherche en utilisant la méthode de Bradford qui est une méthode spectrophotométrique.

2.2.1 Méthode Bradford (1976)

2.2.1.1 Principe

Le taux de protéine dans les échantillons est dosé par l'emploi de la méthode colorimétrique de Bradford *et al.* (1976), en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme protéine de référence.

Cette méthode est basée sur les propriétés d'adsorption de la molécule du bleu de coomassie G250 (Figure 10). En milieu méthanolique acide, cette molécule s'adsorbe sur les protéines en les complexant. Ceci provoque un transfert de son pic d'absorption qui passe du rouge au bleu. Elle se fait principalement par des liens ioniques avec les trois acides aminés basiques (Arginine, Histidine et Lysine) et des interactions hydrophobes (acides aminés hydrophobes).

C'est une méthode très sensible qui détecte jusqu'à 2-5 μg de protéines. Elle est très rapide, relativement fiable et peu coûteuse. Elle est aussi assez résistante à la plupart des interférents, seuls les détergents et autres surfactants, comme le Triton et le dodécylsulfate de Na (SDS) et des bases fortes interfèrent fortement avec cette méthode.

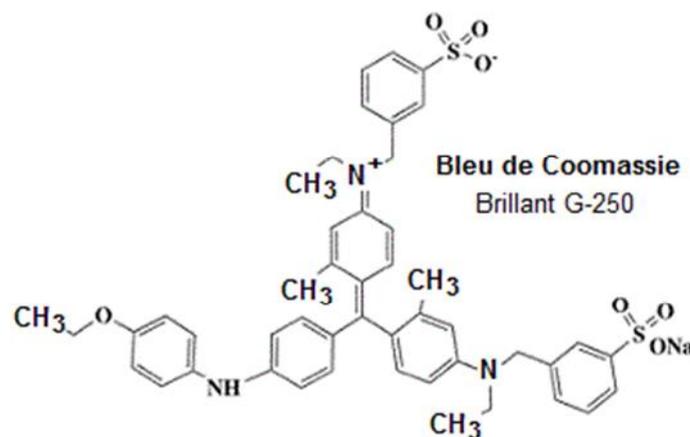


Figure 10 : Structure de bleu de coomassie (Jaspard *et al.*, 2012)

2.2.1.2 Réalisation de la courbe étalon

La courbe étalon des protéines est établie à partir d'une solution mère d'une protéine standard le sérum albumine bovine (BSA) à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (annexe 10) dans des tubes à hémolyse de 5 ml.

Les points de la gamme à obtenir après dilution (annexe 18) sont respectivement : 0.05, 0.125, 0.5, 0.75 et 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

L'équation utilisée pour calculer les dilutions à effectuer dans l'eau distillée et la solution de Bradford pour un volume final de 2 ml est la suivante :

$$\text{Volume BSA (à prendre)} = [\text{BSA}] \times \text{volume final}$$

Le contenu des tubes à hémolyse est mélangé à l'aide d'un vortex (Figure 11), puis incubé à l'abri de la lumière à température ambiante pendant quelques minutes.

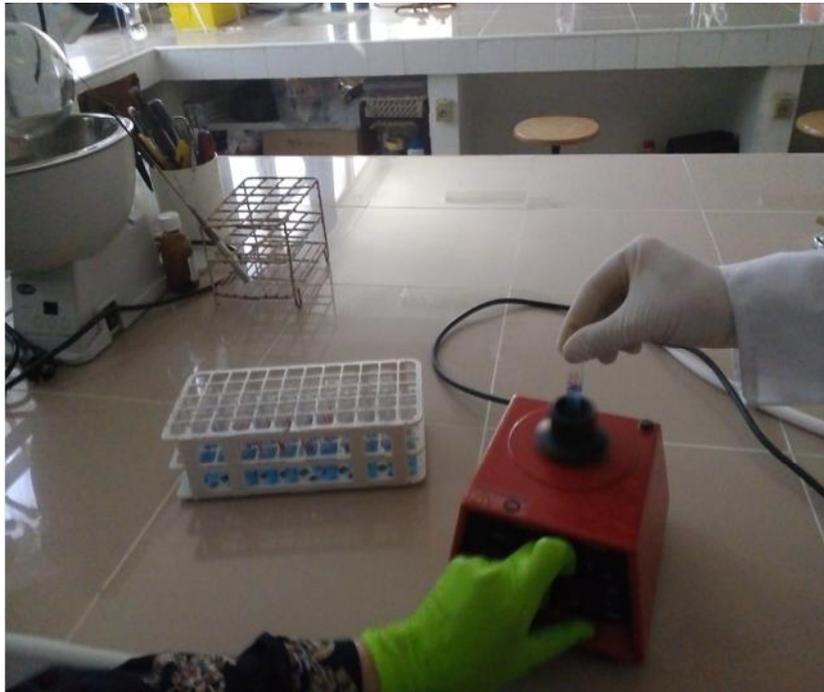


Figure 11 : Homogénéisation à l'aide d'un vortex (Originale, 2017).

2.2.1.2.1 Fonctionnement du spectrophotomètre

Avant le dosage, le spectrophotomètre est étalonné par un échantillon Blanc à 595nm pour le mettre à zéro avant de lire l'ensemble des points de la gamme étalon (Figure 12).

Ainsi les densités optiques (DO) obtenues (annexe 19) permettent de tracer une courbe d'étalonnage $DO = f(C)$ (Figure 13).

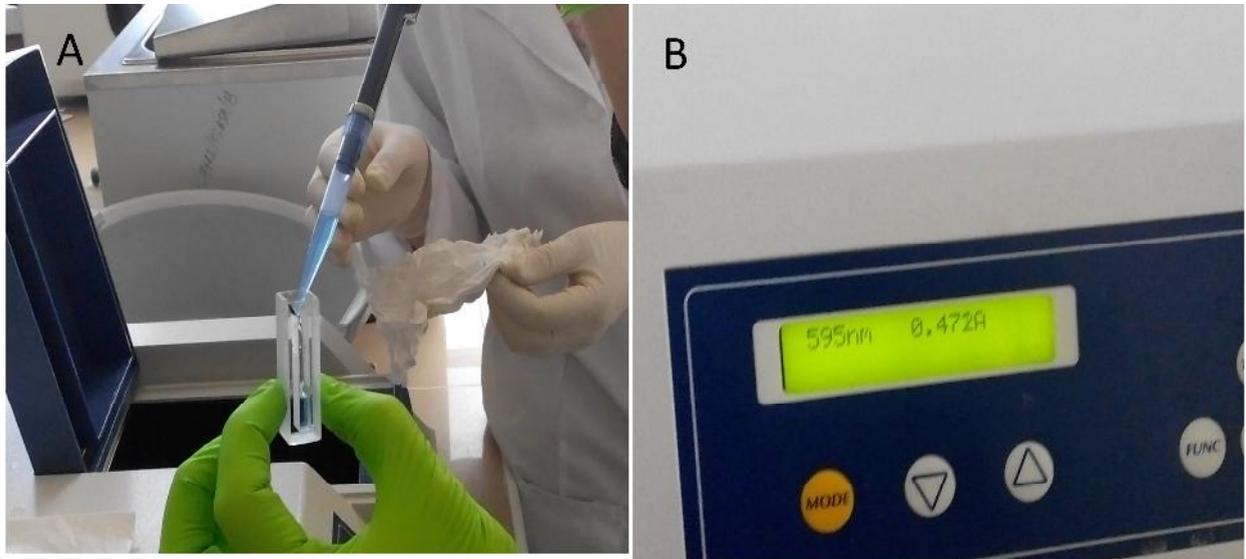


Figure 12 : Dosage spectrophotométrique de la gamme étalon (Originale, 2017).

A : Dépôt de l'échantillon, B : Absorbance de l'échantillon

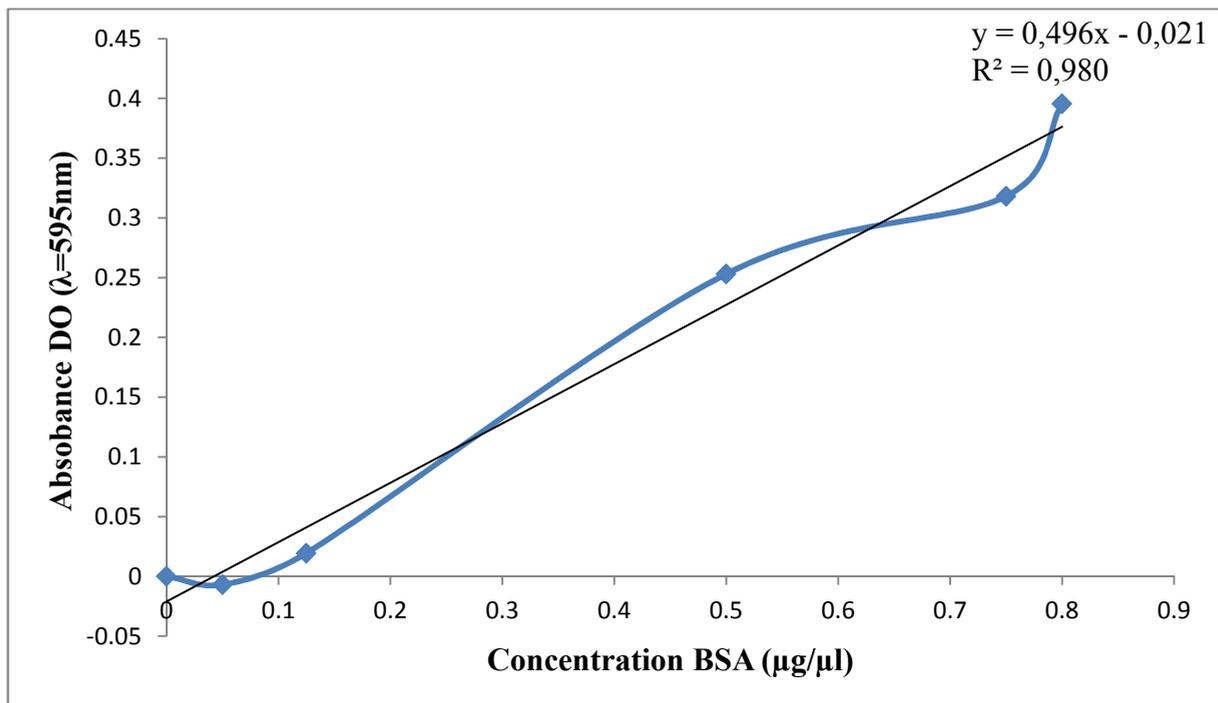


Figure 13 : Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de Bradford et *al.*, 1976.

L'analyse spectrophotométrique des échantillons permet de déterminer la concentration exacte des protéines contenues dans chaque eppendorfs contenant un extrait

protéique (annexe 20). Cette dernière est obtenue en déterminant graphiquement l'équation de la courbe standard qui est de : $y=0.496x-0.021$.

De ce fait le calcul des concentrations protéiques des échantillons est de :

$$\text{Concentration protéine (x)} = (\text{absorbance (y)} - 0.021) / 0.496$$

2.3 Analyse électrophorétique

L'étude électrophorétique a été mise en œuvre dans le laboratoire commun de Biochimie Analytique.

2.3.1 Définition et principe général

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines du fait de leur caractère amphotère peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer de ce fait soit vers l'anode, ou la cathode. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, elles se matérialiseront sur l'électrophorégramme par des bandes de migration plus ou moins distinctes.

2.3.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

2.3.2.1 Conditions générales

La PAGE, est la technique la plus utilisée en raison des avantages qui sont offerts par les propriétés du gel qui sont la transparence, la reproductibilité élevée et une meilleure résolution liée à sa porosité.

La propriété de tamis des gels de polyacrylamide est liée à leur structure particulière, qui est celle d'un réseau tridimensionnel de fibres et de pores résultant du greffage d'unités de N,N-méthylène-bis-acrylamide bi fonctionnels sur des chaînes de polyacrylamide adjacentes. La polymérisation est catalysée par un générateur de radicaux libres composé de persulfate d'ammonium (APS) et de N,N,N,N-tetraméthylènediamine (TEMED).

2.3.2.2 Préparation des gels

Le gel de séparation à 12.5% est préparé en mélangeant les composantes de base : solution polyacrylamide avec une solution tampon et des agents initiateurs de la

polymérisation (APS et TEMED) (annexe 16). Le mélange est immédiatement coulé, avant qu'il n'ait le temps de gélifier, dans le moule formé par deux plaques (en verre et en alumine) séparées par des espaceurs, puis un filament d'eau distillée est ajouté pour avoir une ligne d'interface gel/air.

Juste après, le gel de concentration à 5% est préparé (annexe 17) puis verser sur le premier gel et enfin un peigne y est introduit, permettant la formation des puits dans le gel en cours de polymérisation.

2.3.2.3 Préparation des échantillons

15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'échantillons sont déposés dans chaque puit après dénaturation dans un volume défini au $\frac{1}{4}$ du tampon dénaturant à raison d'un volume total de 20 μl /puit.

Le calcul du volume de protéine à ajouter au tampon de dénaturation pour un volume et une concentration finale de 20 μl et 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivement (annexe 21) est déterminé grâce à l'équation suivante :

$$\text{Volume} = (\text{concentration protéine final} - \text{volume final}) / \text{concentration protéine initiale}$$

La concentration finale et le volume de protéine à prendre permettront de déduire les volumes du tampon de dénaturation, contenant un détergent anionique « SDS » (Figure 14), un agent réducteur chargé de rompre les liaisons disulfures (2- β Mercaptoéthanol) et du bleu de bromophénol à ajouter pour chaque échantillon chargé sur le gel (annexe 22).

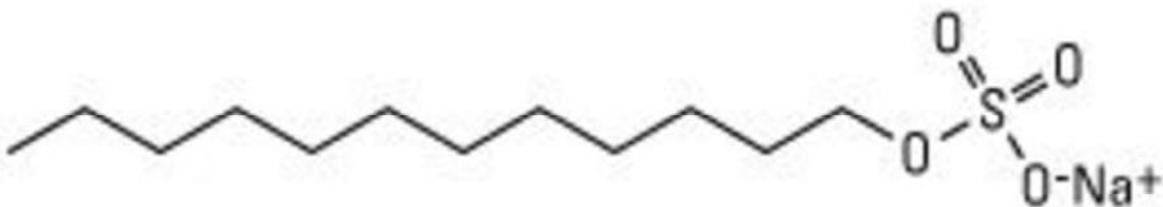


Figure 14 : Structure du détergent anionique Sodium dodecyl sulfate (SDS)

Les échantillons protéiques mélangés avec la solution de dénaturation sont ensuite chauffés à 95°C pendant 5 min, ainsi la plupart des polypeptides sont dans ce cas dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les

polyacrylamides acquièrent alors une forte charge négative et ne seront séparés que suivant leur taille dans un gel de porosité appropriée.

2.3.2.4 Electrophorèse

Les échantillons ainsi préparé sont déposés dans les puits identifiés du gel coulé. L'unité est alors mise sous tension dans les conditions de voltage égale à 130 V et de courant maximale (300 mA). La cuve est mise dans un récipient de glace pour éviter l'échauffement du système, ce qui diminue le voltage. L'électrophorèse est arrêtée quant le front de migration (le bleu de bromophénol) a atteint le bas du gel (Figure 15).

2.4. Révélation des bandes de migration électrophorétique

A la fin de la migration, le gel est démoulé pour subir les opérations successives suivantes : fixation, coloration et décoloration.

2.4.1 Fixation

En effet, lorsqu'on enlève la tension électrique, les protéines vont se mettre à diffuser dans le gel. Ceci va évidemment diminuer la résolution de la séparation, pour éviter cette diffusion on précipite les protéines dans le gel, ou autrement dit on les fixe dans le gel grâce à l'acide acétique contenue dans la solution de fixation (annexe 15) (par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA), 12% pendant 30 minutes). Ces agrégats de protéines entremêlés intimement dans les mailles du gel ne peuvent plus diffuser.

2.4.2 Coloration

La façon la plus simple de visualiser les bandes de migration des protéines est de les colorer. Le gel est immergé 15 minutes dans la solution de coloration (annexe 08), contenant du bleu brillant de coomassie dissous dans une solution constituée du méthanol, eau distillée et TCA 2% qui permet la pénétration rapide du colorant dans le gel pour atteindre les protéines et de combiner la coloration des protéines et leur fixation.

2.4.3 Décoloration

Après un certain temps, le gel est transféré dans une solution acétique (annexe 09) contenant du méthanol, de l'acide acétique et de l'eau distillée pour enlever l'excès de

colorant qui a diffusé dans le gel et empêche de voir les bandes de protéines. A la fin de cette décoloration, on obtient un gel transparent avec les bandes de protéines colorées en bleu.



Figure 15 : Préparation de la cuve à électrophorèse (Originale, 2017).

A-B : Coulage du gel et sa mise dans la cuve, C : Dépôt des échantillons, D : Mise en marche du générateur, E : Migration, F : Récupération du gel et son transfert dans le bac de fixation

3. Analyse densitométrique qualitative des protéines sur gel

La densitométrie a été faite par standardisation de la pixellisation de chaque bande mesurée. Les résultats sont obtenus par pourcentage d'absorption. Les résultats obtenus permettent de quantifier relativement les échantillons.

4. Programmation informatique

Le logiciel Photo Pos Pro est utilisé pour le traitement des photos du gel afin d'adopter le programme Quantity One nécessaire dans l'étude densitométrique des protéines du gel.

5. Analyse statistique

Les données obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel Excel 2007 pour les différents calculs (concentration des protéines et leurs poids moléculaire) et les représentations graphiques (courbe étalonnage). Après l'analyse des résultats, ceux-ci ont été présentés sous forme de tableaux et graphiques.

Le logiciel Origin Lab a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats. Les tests de significativité de variation ont été effectués par l'analyse de variance (ANOVA) ($p < 0.05$).

Nos résultats concernent le dosage des protéines testiculaire ainsi que leurs évolutions sur le profil électrophorétique et densitométrique chez deux populations de lapins : population blanche et souche synthétique durant leur développement postnatale.

1. Résultats

1.1. Poids des lapins

L'évolution du poids vif des lapins de la population blanche et de la souche synthétique âgés de 4, 8, 12 et 16 semaines sont représentées dans la figure 16.

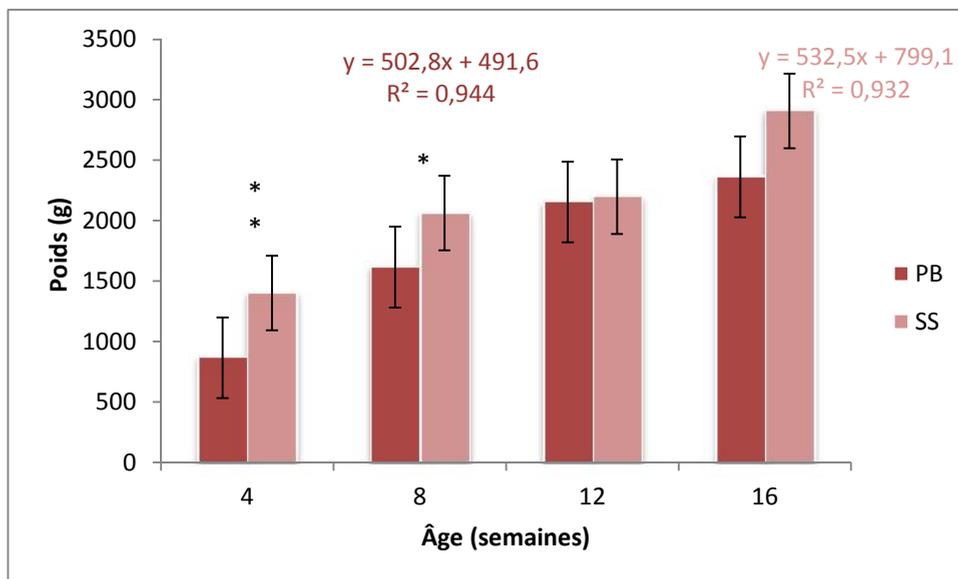


Figure 16 : Evolution du poids vif des lapins de la PB et la SS en fonction de l'âge.

PB : Population blanche ; SS : Souche synthétique

(*) : p 0,05 ; (**) : p 0,01

Le poids vif moyen des lapins de la population blanche augmente progressivement en fonction de l'âge passant de $865 \pm 203,13$ g à 4 semaines à $2361,66 \pm 173,82$ g à 16 semaines d'âge.

Toutefois cette augmentation atteint un pourcentage maximal de 46,43 % entre l'âge de 4 à 8 semaines, puis elle ralentit progressivement dès l'âge de 12 semaines.

Néanmoins chez les lapins de la souche synthétique le poids vif moyen augmente progressivement de $1401,67 \pm 40,97$ g à 4 semaines jusqu'à $2906,67 \pm 205,10$ g à 16 semaines.

Cette augmentation du poids vif chez la souche synthétique est significative de 4 à 8 semaines ($p=0,02$) et de 12 à 16 semaines ($p=0,04$).

Les poids vif des lapins de la souche synthétique sont supérieurs à ceux des lapins de la population blanche à 4, 8 et 16 semaines d'âge avec un écart supérieur à 447,50 g, par contre à 12 semaines le poids vif moyen des deux souches est approximativement le même.

La différence entre les poids vifs des lapins des deux populations est hautement significative ($p < 0,01$), et significative ($p < 0,05$) à 4 semaines et 8 semaines d'âge respectivement.

1.2. Poids des testicules

L'évolution des poids moyens des testicules des lapins des deux populations (population blanche et souche synthétique) en fonction de l'âge est présentée dans la figure 17.

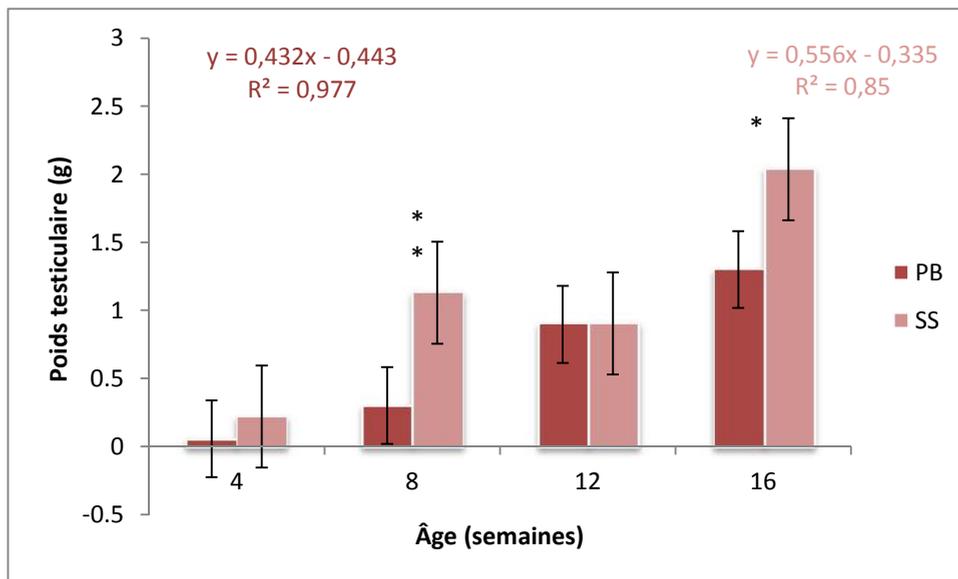


Figure 17 : Evolution du poids des testicules des lapins de la PB et de la SS en fonction de l'âge.

(*) : $p < 0,05$; (**) : $p < 0,01$

Le poids moyen des testicules des lapins de la population blanche augmente progressivement avec l'âge il passe d'un poids de $0,056 \pm 0,028$ g à 4 semaines à $1,3 \pm 0,36$ g à 16 semaines, cette augmentation est supérieure à 31,02 %.

L'évolution du poids testiculaire des lapins de la population blanche est hautement significative ($p=0,01$) entre 4 et 8 semaines.

Néanmoins chez la souche synthétique le poids testiculaire moyen augmente de 4 semaines à 8 semaines d'âge avec un pourcentage d'augmentation de 44,68 % puis diminue à 12 semaines et atteint le maximum à 16 semaines.

L'augmentation du poids testiculaire chez la souche synthétique est hautement significative entre 4 et 8 semaines ($p=0,002$) et entre 12 et 16 semaines ($p=0,004$).

La comparaison des poids testiculaire entre les animaux de la population blanche et de la souche synthétique montre qu'ils sont plus élevés chez la souche synthétique à l'âge de 4, 8 et 16 semaines avec un écart supérieure à 0,16 g, ces variations du poids testiculaire entre les deux population sont hautement significative et significative respectivement à 8 semaines ($p=0,015$) et à 16 semaines ($p=0,02$).

1.3. Dosage des protéines testiculaire

Les concentrations protéiques moyennes obtenues à partir des homogénats des fragments testiculaires approximativement égales des lapins de la population blanche et de la souche synthétique durant leur développement postnatale sont présentées dans la figure 18.

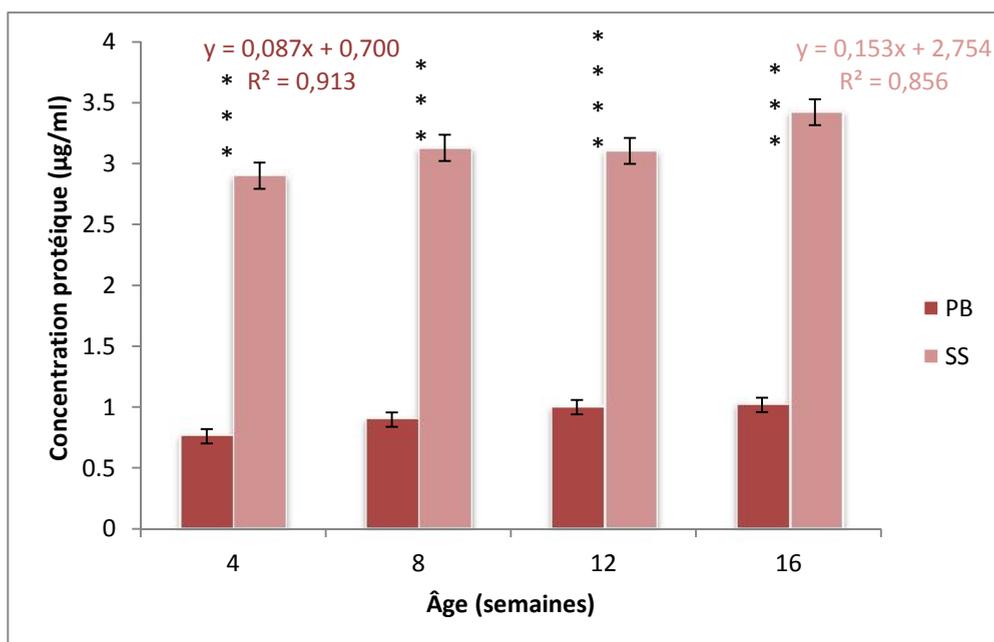


Figure 18 : Evolution de la concentration protéique de l'homogénat testiculaire durant le développement postnatal des lapins de PB et de la SS.

(***) : $p < 0,001$; (****) : $p < 0,0001$

Chez la population blanche les concentrations des protéines de l'homogénat testiculaire augmentent de 4 à 16 semaines d'âge dont les valeurs respectives sont de $0,760 \pm 0,126 \mu\text{g/ml}$ et de $1,017 \pm 0,024 \mu\text{g/ml}$, et un écart supérieur à 10 % à 8 et 12 semaines, où la différence est hautement significative ($p=0,01$).

Tandis que chez les lapins de souche synthétique les concentrations protéiques de l'homogénat testiculaire augmentent de 4 à 8 semaines passant respectivement de $2,90 \pm 0,115 \mu\text{g/ml}$ à $3,13 \pm 0,218 \mu\text{g/ml}$ et avec un pourcentage d'augmentation de 6.68 %, puis diminue légèrement à 12 semaines afin d'augmenter de nouveau à 16 semaines, à la valeur de $3,42 \pm 0,315 \mu\text{g/ml}$ et à un pourcentage supérieur de 9.29 %.

Les concentrations protéiques des homogénats testiculaires sont plus élevées chez la souche synthétique par rapport à la population blanche avec un écart supérieure de $1,49 \mu\text{g/ml}$, ces différences sont très hautement significatives pour tout les âges ($p < 0,0001$).

1.4. Electrophorèse et densitométrie des protéines testiculaire

1.4.1. Electrophorèse des protéines testiculaire

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

1.4.1.1. Marqueur de poids moléculaire

Le profil électrophorétique obtenu pour la BSA montre l'apparition de 4 bandes de migration de protéines de poids moléculaire connus, la protéine de 67 KDa correspond à la protéine BSA, celle de 45 KDa à la protéine ovalbumine, celle de 23 KDa à la chymotripcinogène, et celle de 18 KDa à la protéine β -immunoglobuline. Ce qui nous permet d'identifié et de déterminer le poids moléculaire des protéines constituant l'homogénat du testicule des deux populations.

1.4.1.2. Protéines de la population blanche

Chez les animaux de 4 semaines nous avons remarqué la présence de 8 bandes protéiques dont trois sont visibles à l'œil nu les autres sont moins apparente, à l'âge de 8, 12

et 16 semaines on peu distingué cinq bandes fortement visible et différentes les unes des autres et qui s'épaississent avec l'âge (figure 19).

Parmi ces bandes protéiques certaines disparaissent avec l'âge d'autre réapparaissent à d'autre âges.

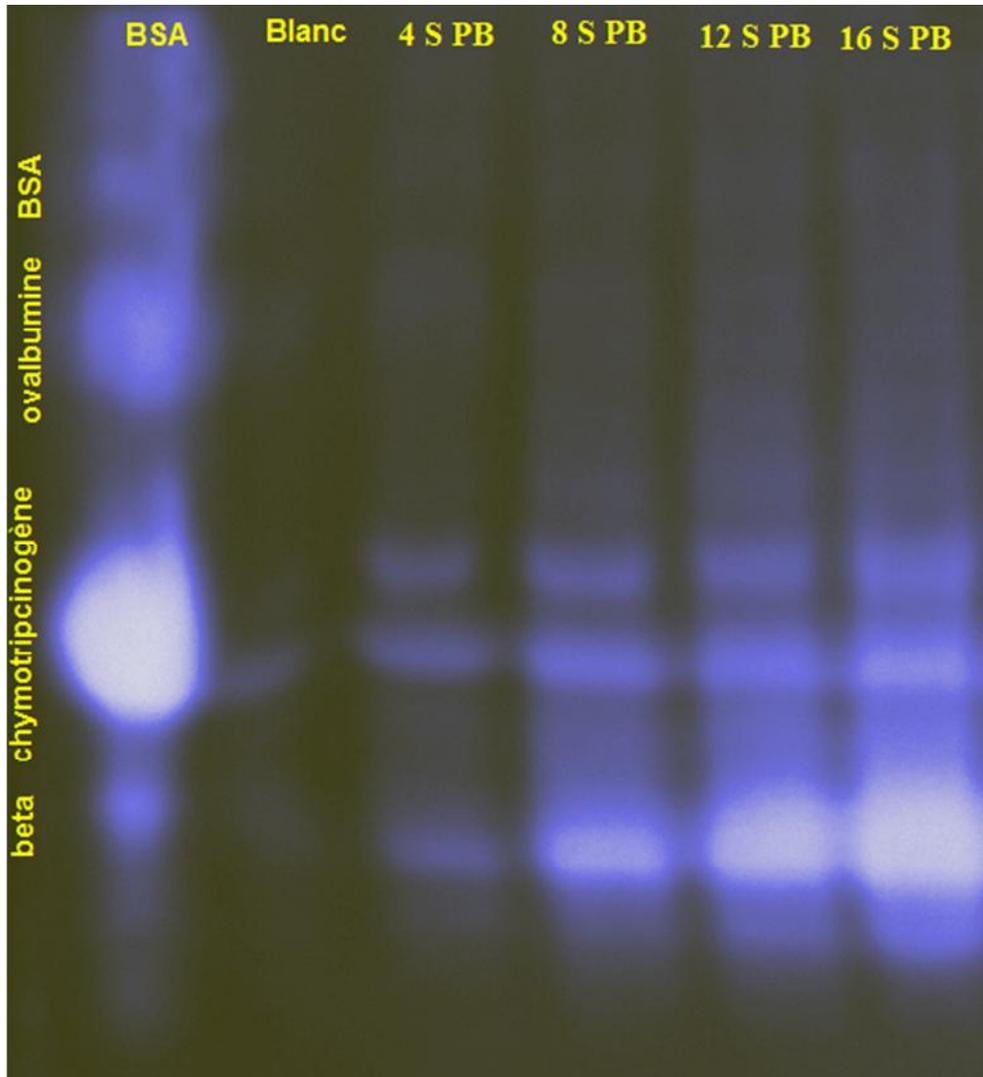


Figure 19 : Analyse électrophorétique monodimensionnelle des protéines testiculaires des lapins de la population blanche.

1.4.1.3. Protéines de la souche synthétique

Chez les lapins de la souche synthétique de 4 semaines d'âge 7 bandes protéiques apparaissent sur le gel, et à partir de l'âge de 8 semaines jusqu'à 16 semaines certaines bandes disparaissent, tandis que d'autres s'épaississent et deviennent plus volumineuses.

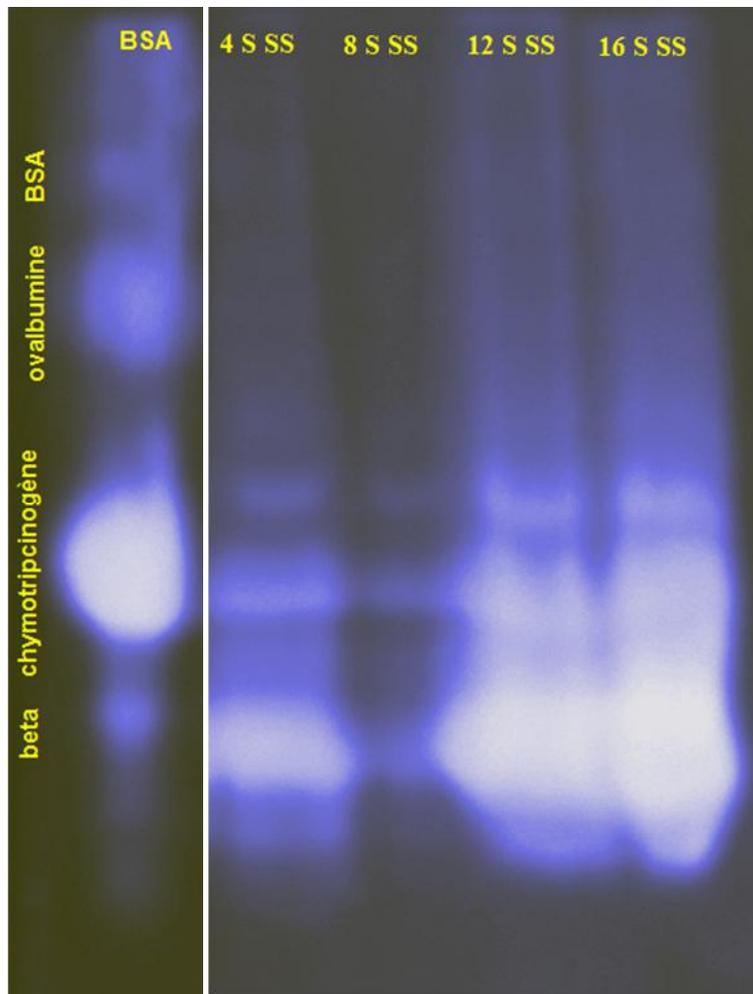


Figure 20 : Analyse électrophorétique monodimensionnelle des protéines testiculaire des lapins de la SS

1.4.1.4. Identification des poids moléculaires des protéines après séparation électrophorétique sur gel

Le poids moléculaire et le nombre des bandes protéique qui apparaissent sur le profil électrophorétique change selon l'âge et le pool génétique (population blanche et souche synthétique), l'électrophorèse de la BSA, dont les poids moléculaire de ses 4 bandes de migration sont connus, nous a permis de tracer une courbe (figure 21) et d'utiliser son équation afin de déterminer le poids moléculaire des bandes de migration de nos échantillons.

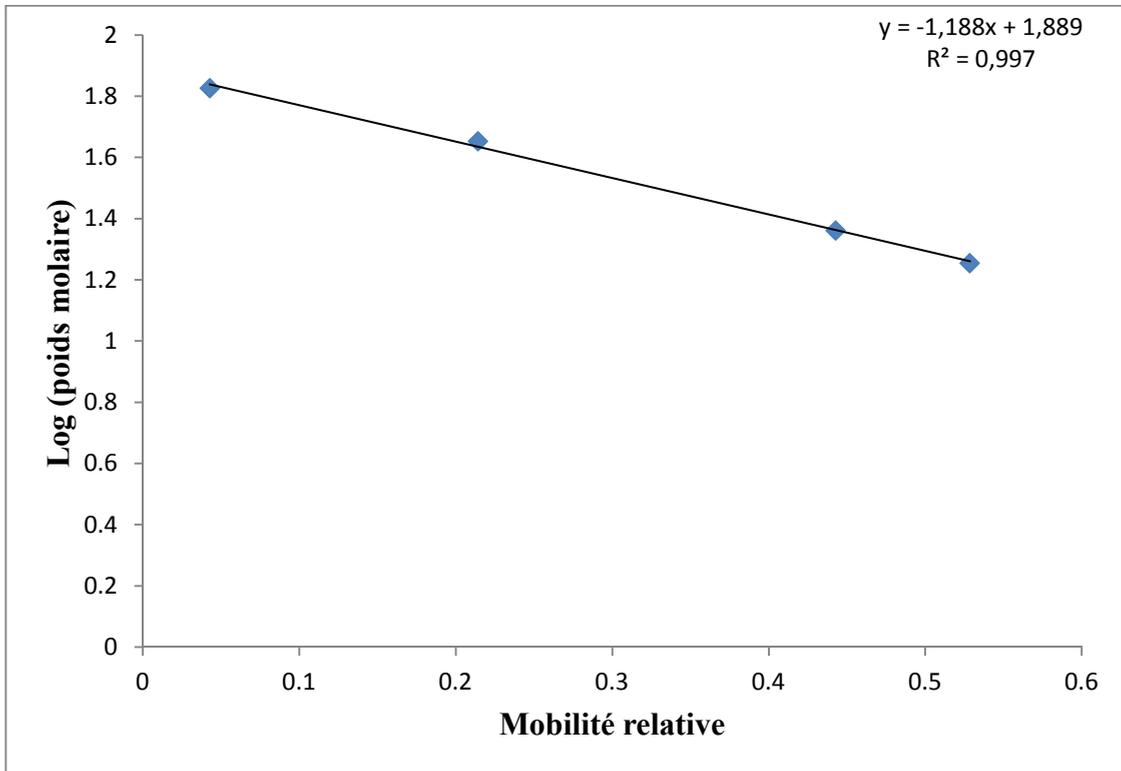


Figure 21 : Courbe de détermination de la masse moléculaire des protéines testiculaires.

1.4.1.4.1. Chez la population blanche

La comparaison des résultats électrophorétiques monodimensionnelle des protéines de la BSA et de l'homogénat du testicule des lapins de la population blanche est représentée dans la figure 22 qui montre une vingtaine de protéines, dont seulement 8 protéines sont plus ou moins visibles.

Chez ces animaux le poids moléculaire des bandes protéique varie selon l'âge de 6 à 74 KDa. Les bandes protéiques de poids moléculaire supérieure à 67 KDa sont spécifiques aux échantillons des lapins de 4 semaines de cette population, tandis que les bandes de migration de poids moléculaire supérieure ou égale 45 KDa et inférieure 18 KDa sont absentes à 8 semaines, toutefois les autres bandes de migration qui sont supérieure ou égale 23 KDa et supérieure ou égale 18 KDa sont présentes durant tout le développement post natal.

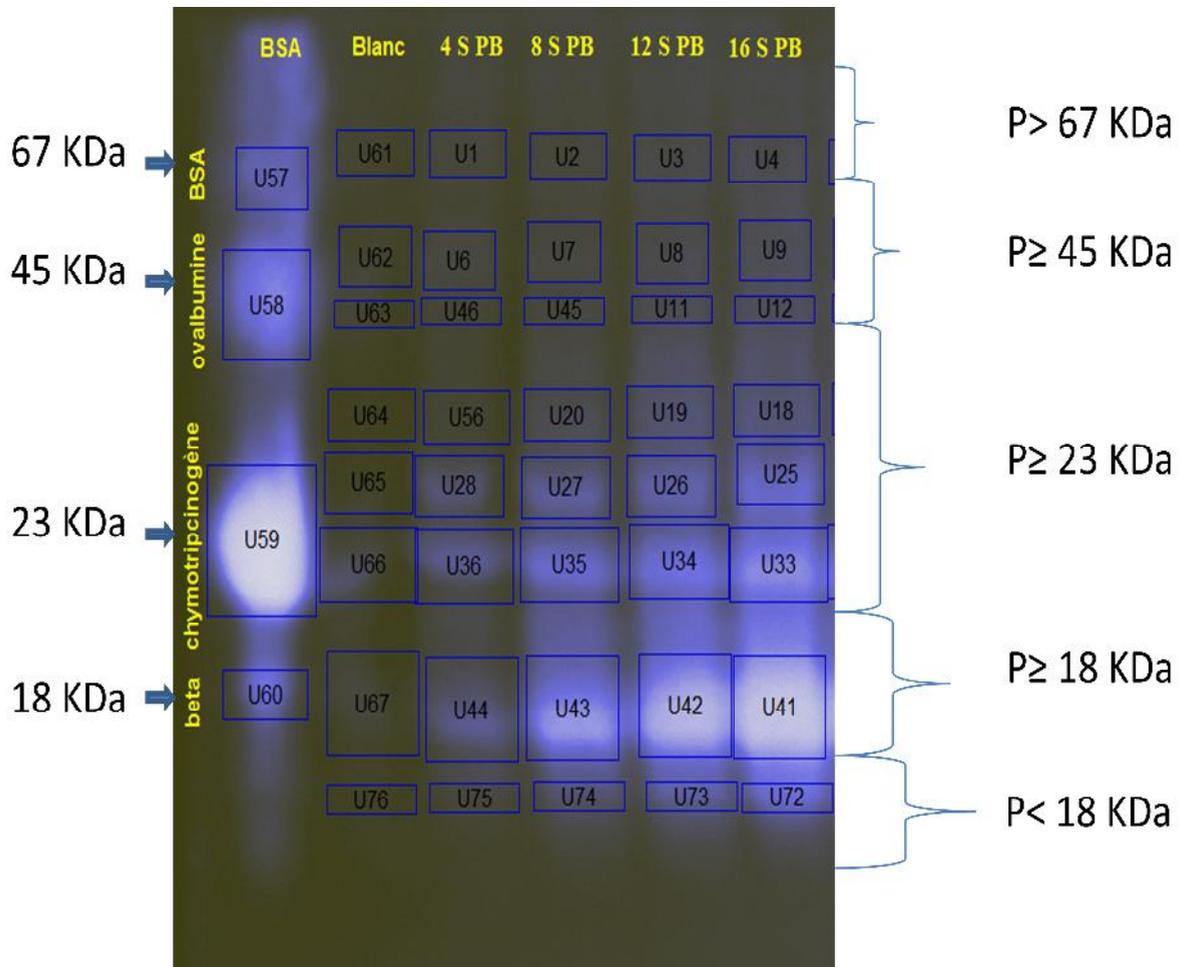


Figure 22 : Profil électrophorétique monodimensionnel des protéines testiculaire des lapins de la PB.
M : Mois ; SB : Souche Locale

1.4.1.4.2. Chez la souche synthétique

La figure 23 illustre un profil électrophorétique monodimensionnel des échantillons testiculaire des lapins de la souche synthétique, ce profil montre une quinzaine de bandes protéiques, parmi lesquelles certaines sont plus visibles que d'autres.

Le poids moléculaire des bandes protéiques appartient à un intervalle qui varie entre 6 et 43 KDa, les bandes de migration ayant un poids moléculaire supérieure ou égale 28 KDa et inférieure à 18 KDa sont spécifiques aux échantillons des lapins de 4 semaines de cette souche, par contre les autres bandes de migration sont présentes durant tout le développement postnatale.

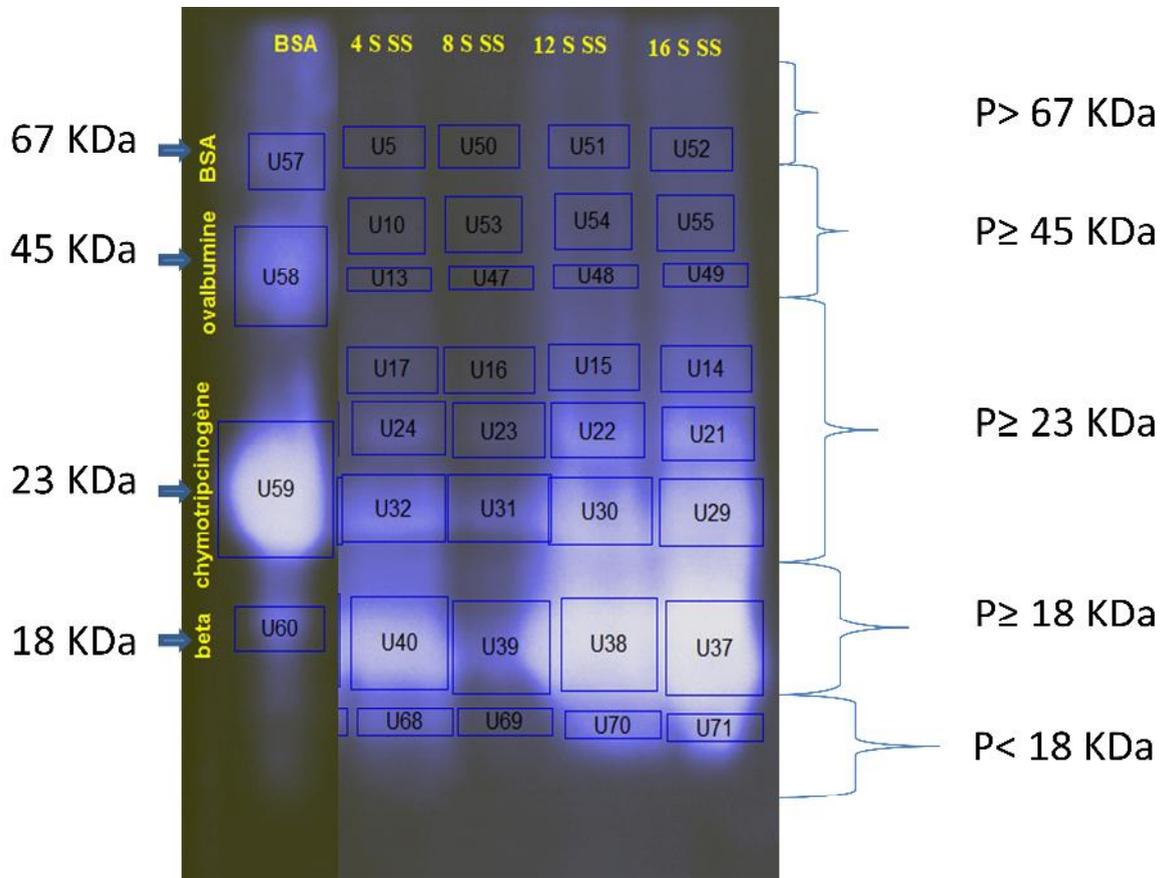


Figure 23 : Profil électrophorétique monodimensionnel des protéines testiculaire des lapins de la SS.
M : Mois ; SS : Souche Synthétique

1.4.1.4.3. Comparaison

La comparaison des profils électrophorétiques de l'homogénat des testicules des lapins de la population blanche et de la souche synthétique révèle que la bande de migration de 74KDa est spécifique aux lapins de la population blanche, tandis que les bandes de migrations supérieures ou égale 28 KDa et inférieures à 18 KDa sont spécifique aux lapins de 4 semaines d'âge de la souche synthétique.

1.4.2. Analyse semi-qualitative des protéines testiculaire

L'analyse densitométrique et volumique du profil électrophorétique confirme la présence et l'évolution des bandes de migration (soit une évolution négative ou bien positive) chez les lapins des deux populations durant leurs vie postnatale (figures 24).

Toutes les bandes de migration des testicules des lapins de la population blanche et de la souche synthétique sont semblables, sauf pour la bande de migration 1 qui est spécifique à la population blanche.

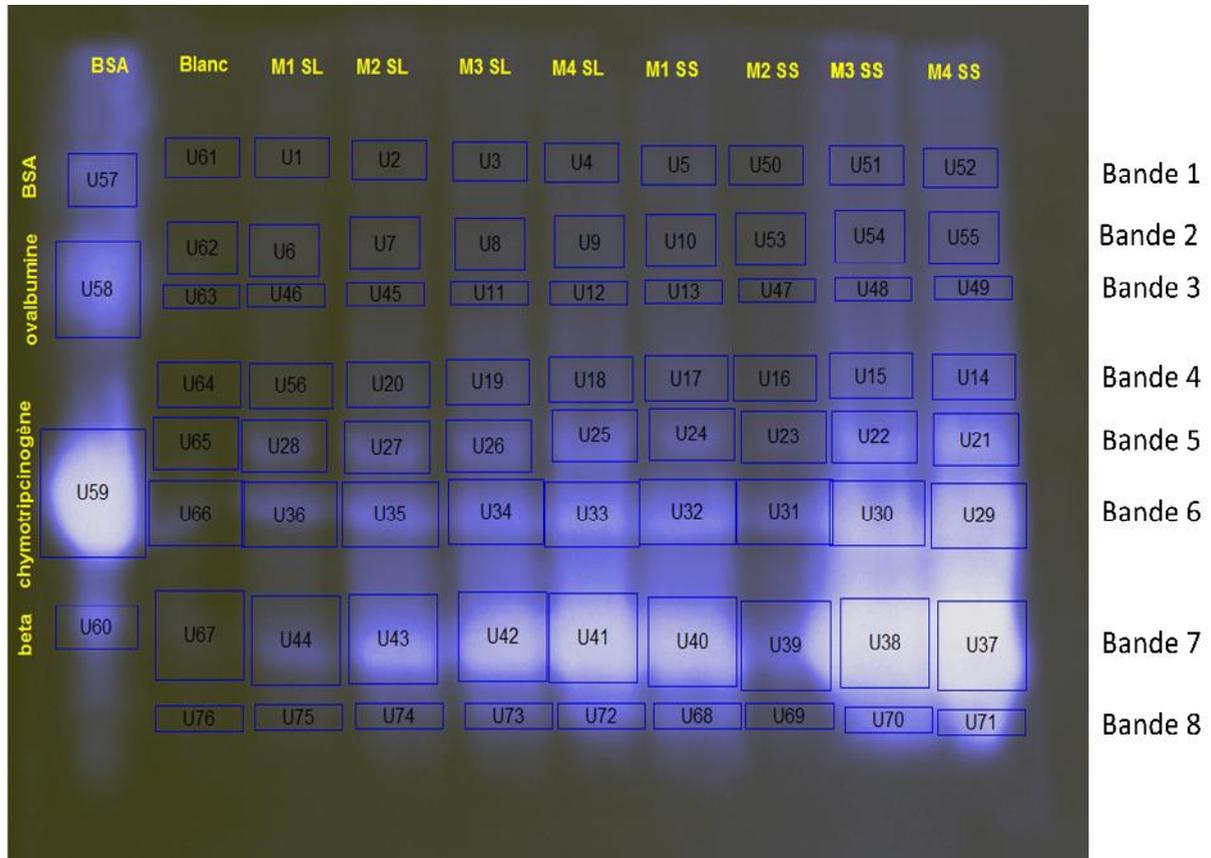


Figure 24 : Localisation des bandes de migrations des protéines testiculaire des lapins de la PB et de la SS (Original, 2017).
SL : Souche Locale ; SS : Souche Synthétique.

1.4.2.1. Chez la population blanche

L'analyse densitométrique semi-quantitative du profil électrophorétique des échantillons testiculaire des lapins de la population blanche montre l'évolution de la densité des bandes de migration tout le long de notre expérimentation (figures 25 et 26).

La densité des bandes de migration des échantillons testiculaire des lapins de la population blanche varie d'une bande à une autre en fonction de l'âge.

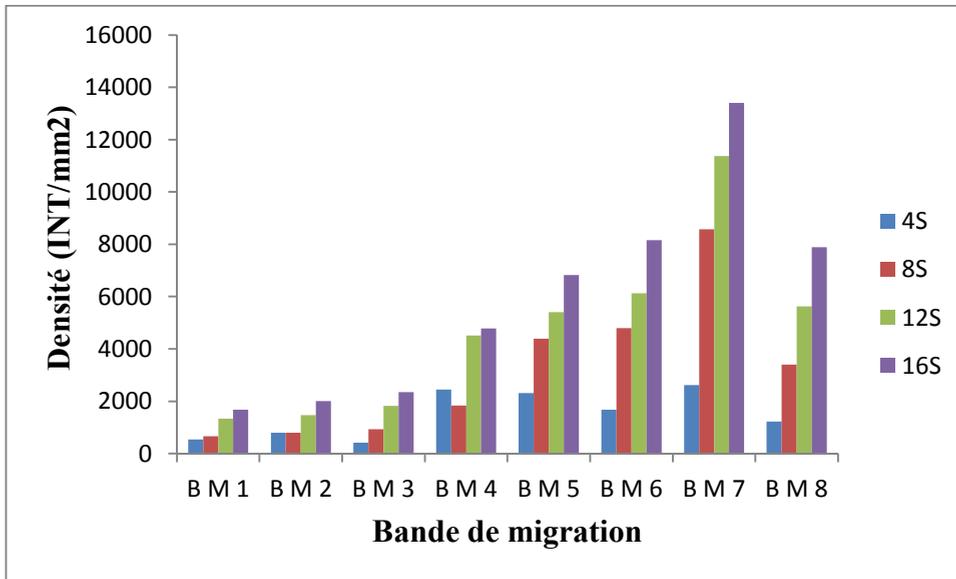


Figure 25 : Evolution de la densité des bandes de migration des échantillons de la PB en fonction de l'âge.
 BM : Bande de Migration ; S : semaines

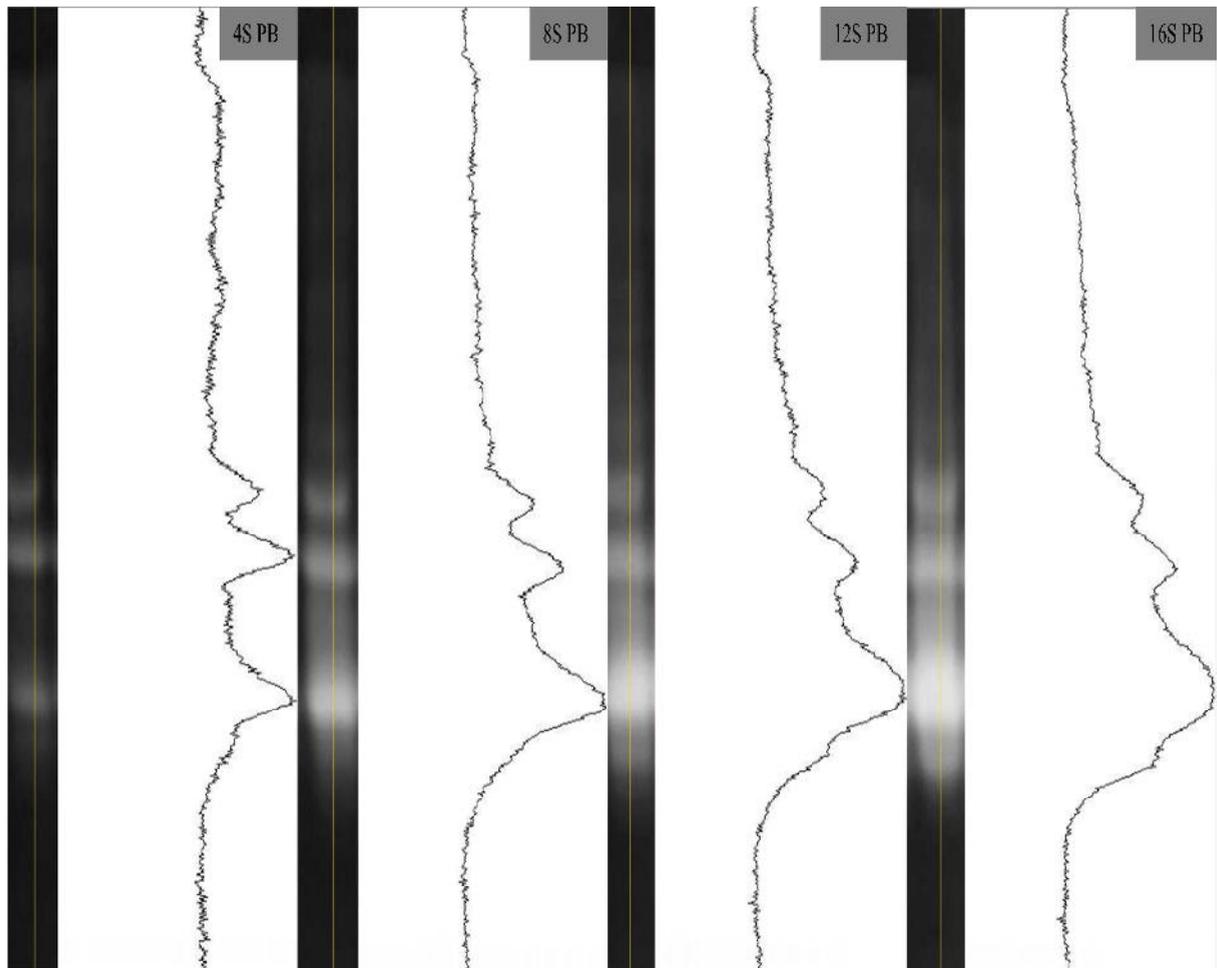


Figure 26 : Analyse densitométrique des profils électrophorétiques des protéines testiculaire des lapins de la PB (Originale, 2017).

La densité des bandes 1, 3, 5, 6, 7 et 8 augmente progressivement avec l'âge, tandis que la densité des bandes 2 et 4 diminue de 4 à 8 semaines d'âge.

1.4.2.2. Chez la souche synthétique

L'analyse densitométrique semi-quantitative du profil électrophorétique des échantillons testiculaire des lapins de la souche synthétique montre l'évolution de la densité des bandes de migration, tout le long de notre expérimentation (figures 27 et 28).

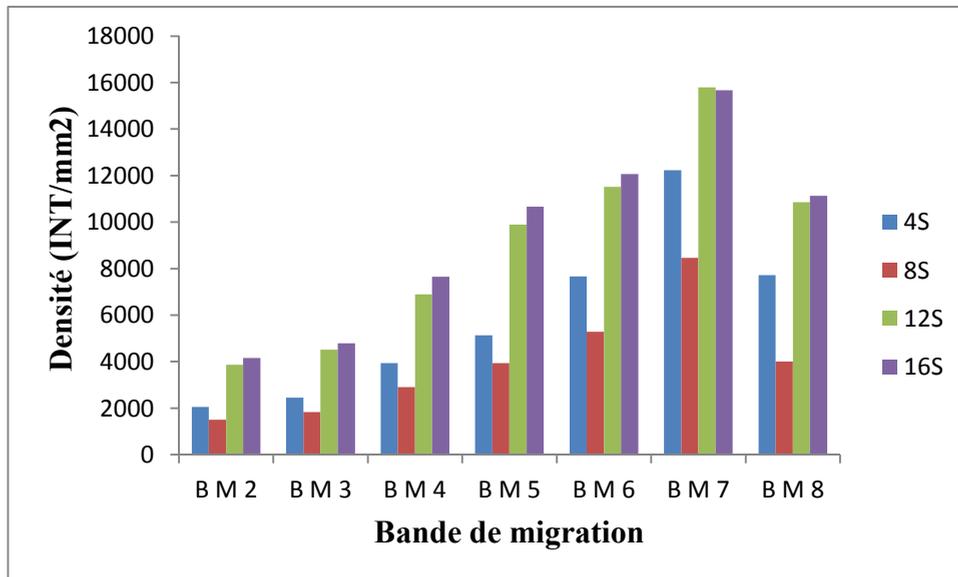


Figure 27 : Evolution de la densité des bandes de migration des échantillons de la SS en fonction de l'âge.

BM : Bande de Migration ; S : semaines

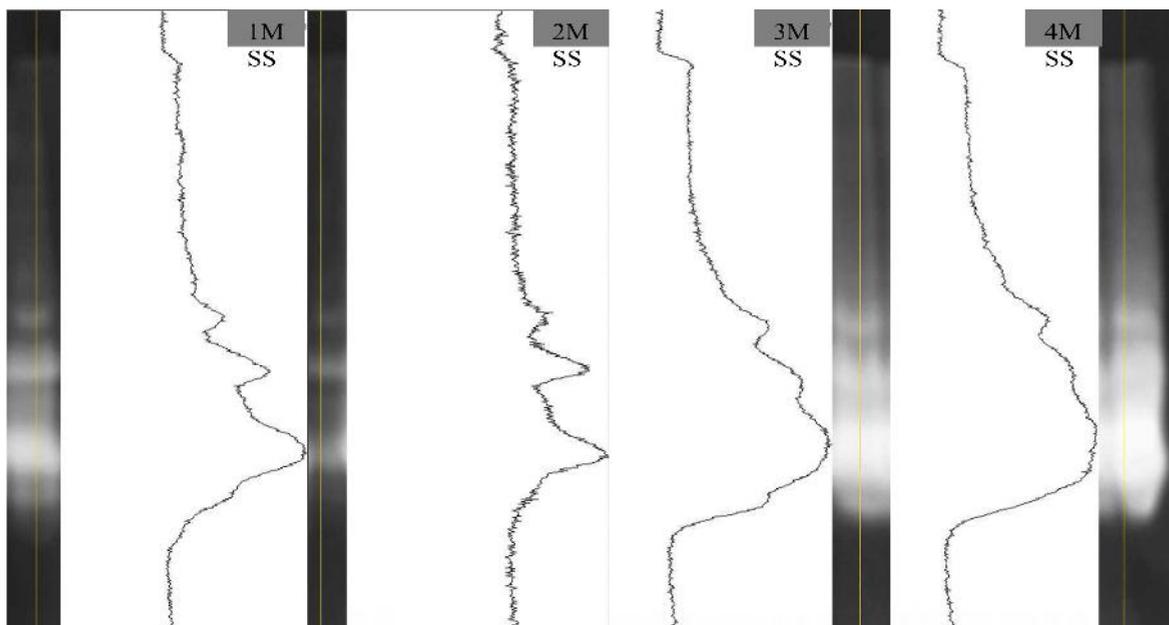


Figure 28 : Analyse densitométrique des profils électrophorétiques des protéines testiculaire des lapins de la souche synthétique (Originale, 2017).

La densité des 7 bandes de migrations des échantillons des testicules des lapins de la souche synthétique diminue de 4 à 8 semaines d'âge, puis elles augmentent progressivement de 8 à 16 semaines d'âge.

1.5. Analyse comparative des résultats électrophorétique et densitométrique

Les courbes de densitométrie permettent de donner un aperçu sur le nombre de protéines pour chaque profil électrophorétique donc chaque échantillon, et de préciser l'état quantitatif des protéines par pic ou par domaine.

Dans notre cas, la comparaison des différentes courbes densitométriques permet de déceler l'évolution de ces domaines, ou de pic isolé en fonction de l'âge et de comparer entre les deux populations d'animaux de 4 semaines à 16 semaines d'âge.

Cette comparaison entre les deux populations d'animaux montre une différence quantitative entre la majorité des bandes de migration.

A l'âge de 4 semaines toutes les bandes de migration sont présentes chez les deux populations, sauf la bande de migration numéro 1 qui est spécifique à la population blanche et la bande de migration numéro 3, qui n'apparaît qu'à partir de 8 semaines chez les lapins de la population blanche.

2. Discussion

Dans la présente étude, nous montrons l'évolution des profils électrophorétiques des protéines testiculaire parallèlement au poids corporels, au poids gonadiques ainsi qu'à l'évolution de la structure histologiques des testicules chez les deux populations : locale et synthétique.

2.1. Poids vif et poids testiculaire

Dans nos résultats les moyennes des poids corporels et testiculaire des lapins de la population blanche et de la souche synthétique évoluent respectivement durant tout le développement post natal, cette croissance suit une courbe sigmoïdale, nos résultats corroborent avec ceux obtenus chez la même espèce par plusieurs auteurs (Garcia-Tomas *et al.*, 2007 ; Garcia-Tomas *et al.*, 2009; Viguera-Villasenor *et al.*, 2013).

La croissance pondérale d'un animal résulte d'un développement en poids de chacun des éléments constitutifs de son corps (Micol *et al.*, 1993). Selon Piles *et al.* (2003), cette croissance est un caractère extrêmement variable en fonction des facteurs génétiques, alimentaire et/ou environnementaux.

Après la naissance la régulation de la croissance pondérale chez le lapin n'atteint la pleine efficacité qu'au bout de 100 jours (Vézinhet, 1968).

Ouhayoun (1976) et Blasco (1993), soulignent que la vitesse de croissance passe par un maximum à l'âge de 5-7 ou 8 semaines, puis elle ralentit progressivement, notamment après 11 semaines d'âge.

Garcia-Tomas *et al.* (2007) ont observé un taux de croissance maximal du testicule des lapins Caldes et Prat à l'âge de 14 semaines, avec un poids de 1,64g, ce qui indiquerait que l'activité spermatogénétique pourrait être enclenchée. Cependant, Garcia-Tomas *et al.* (2009 a,b) considèrent que chez les lapins, les poids testiculaires sont de mauvais indicateurs de la maturité testiculaire, parce qu'un poids plus élevé de testicule à un âge spécifique ne signifie pas forcément un testicule plus développé.

2.2. Dosage et électrophorèse des protéines testiculaire

Les profils électrophorétiques et densitométriques des échantillons testiculaires révèlent des variations quantitatives et qualitatives des protéines chez les lapins des deux populations durant tout le développement post natal.

Peu d'études ont été réalisées sur des profils électrophorétique, sur gel de polyacrylamide, des protéines testiculaires durant le développement postnatal chez les lapins.

Les variables microscopiques comme l'apparition de spermatides allongés et de spermatozoïdes dans les tubes séminifères, le diamètre, le nombre et la taille des cellules interstitielles et germinales ont été utilisées comme indicateurs de maturité. Ces paramètres concordent modérément avec les variables macroscopiques (Schinckel *et al.*, 1983; Chemes, 2001) en donnant une information supplémentaire quant à la maturité fonctionnelle des testicules. Ce qui peut expliquer la variabilité des profils électrophorétiques des protéines testiculaire en fonction de l'âge et du fond génétique obtenus dans notre présente étude.

Selon Gondos *et al.* (1973), Iczkowski *et al.* (1991) et Ricken et Viebahn (2002), la différenciation en spermatogonie se fait entre le 49 et 56 jour post partum (jpp), les premiers

spermatocytes apparaissent à 8 semaines (56 jpp) et les premiers spermatides sont observés à 12 semaines (84 jpp), coïncidant avec l'apparition et au début de l'épaississement des bandes protéiques à faible poids moléculaire.

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.

La production de spermatozoïdes via la spermatogenèse reste le domaine le plus étudié dans le domaine de la reproduction mâle, principalement par le biais d'expériences à grande échelle. Au cours des dix dernières années, la génomique et la postgénomique ont été utilisées avec succès pour l'identification de nombreux gènes et protéines essentiels pour le développement de gamètes mâle fonctionnels. L'utilisation de la protéomique pour l'étude de la spermatogenèse est parfaitement justifiée, car la production de spermatozoïdes est assurée par une succession d'événements complexes et étroitement régulés (Rolland, Jégou, Pineau., 2008).

Les stratégies adoptées étaient basées sur la caractérisation systématique des protéines présentes soit dans les cellules germinales isolées à un instant donné du développement, soit dans le testicule entier. Un ensemble de 132 protéines spermatogéniques abondantes a débouché de l'identification systématique des protéines associées à la chromatine dans les cellules germinales chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Chu, Liu, Nix, *et al.*, 2006).

Une approche gel 2D/MS a été utilisée afin d'établir plusieurs cartes de référence du protéome du testicule chez la drosophile (Takemori et Yamamoto, 2009), le porc (Huang, Lin, Chen, *et al.*, 2005), la souris (Zhu, Cui, Guo, *et al.*, 2006), et l'humain (Guo, Zhao, Wang, *et al.*, 2010). Trente-neuf protéines spécifiques du testicule et potentiellement importantes pour la fonction testiculaire ont été identifiées par fractionnement SDS-PAGE (Guo, Zhang, Huo, Zhou, Sha, 2008), tandis que dans notre étude préliminaire seule 20 bandes protéiques ont été observées.

Des études comparatives des profils d'expression protéique dans les testicules de souris à des moments spécifiques de la première vague de la spermatogenèse ont été mises en place par plusieurs groupes (Huang, Guo, Shen, *et al.*, 2008 ; Paz, Morín, Del Mazo, 2006). Paz *et al.* ont comparé les profils d'expression des protéines solubles présentes dans les testicules de

souris à 8, 18, et 45 jours postpartum (jpp). Ils ont identifié 44 protéines ou formes variantes présentant une expression différentielle au cours du développement (Paz, Morín, Del Mazo, 2006).

De la même façon, Huang *et al.* ont comparé les protéomes des testicules de souris à 0, 7, 14, 21, 28 et 60 jpp. Ils ont identifié 257 protéines présentant une expression différentielle, et potentiellement impliquées dans l'initiation de la spermatogenèse. Ces protéines incluent quelques unes, qui semblent être sous-exprimées, ainsi que d'autres, qui semblent être sur-exprimées au cours du développement testiculaire (Huang, Guo, Shen, *et al.*, 2008).

Au terme de notre étude sur le profil électrophorétique des protéines testiculaires durant le développement postnatal chez deux populations de lapins, la population blanche et la souche synthétique nous pouvons conclure que le poids vifs de ces animaux augmente progressivement avec l'âge suivant une courbe sigmoïdale, allant de la valeur de $865 \pm 203,13$ g à 4 semaines à la valeur de $2361,66 \pm 173,82$ g à 16 semaines pour la population blanche et de $1401,67 \pm 40,97$ g à 4 semaines jusqu'à $2906,67 \pm 205,10$ g à 16 semaines d'âge pour la souche synthétique.

La courbe d'évolution des poids testiculaire des lapins est sigmoïdale progressive passant de la valeur de $0,056 \pm 0,028$ g à 4 semaines à la valeur de $1,3 \pm 0,36$ g à 16 semaines chez la population blanche et de la valeur $0,22 \pm 0,12$ g à 4 semaines à $2,04 \pm 0,20$ g à 16 semaines chez la souche synthétique.

L'analyse électrophorétique et densitométrique semi-qualitative des protéines testiculaire montre qu'il ya une évolution dans le nombre, la densité et l'épaisseur des bandes de migration en fonction de l'âge et du pool génétique. Toutefois, ces paramètres restent nettement supérieure chez la souche synthétique par rapport à la population blanche, probablement due au fait que cette souche est génétiquement améliorée.

Ce travail évoqué dans ce document a permis d'accroître nos connaissances sur la spermatogenèse du point de vue moléculaire (macromolécules). Néanmoins, des efforts importants sont encore nécessaires pour améliorer notre compréhension des réseaux de communication très évolués reliant les activités cellulaires au cours de ce processus.

Il devrait maintenant être possible d'avoir une vision des mécanismes moléculaires intervenant dans quelques étapes de la spermatogenèse, grâce à l'utilisation pertinente de techniques éprouvées en protéomique.

Par ailleurs, ce travail peut être améliorée en utilisant, un effectif d'animaux plus élevée pour avoir des résultats plus significatifs, et d'autre techniques telles le Western blot, la protéomique *top-down* et la peptidomique, qui sont encore des approches émergentes constituent de précieux outils qui permettront de répondre à des questions précises relatives à la spermatogenèse normale et pathologique.

- 1 - Aisen P, Leibman A, Zweier J (1978) Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem* 253(6):1930–1937.
- 2 - Anthony CT, Rosselli M, Skinner MK (1991) Actions of the testicular paracrine factor (P-Mod-S) on Sertoli cell transferrin secretion throughout pubertal development. *Endocrinology* 129(1):353–360.
- 3 - Aussel C., Cynober L., *Marqueurs biochimiques d'une dénutrition et de l'efficacité de la renutrition*. In : Cynober L., Aussel C., exploration de l'état nutritionnel, éditions Médicales internationales, (1998) :83-88.
- 4 - Barone R (2001) Chapitre II: Appareil génital mâle. In : Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Vigot. 896p. 3- Hudson et al. 1993 Urogenital System. In: *Atlas of feline anatomy for veterinarians*. Second Edition. Teton NewMedia.
- 5 - Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in *ram rete testis fluid*. *J Biol Chem* 1983 ; 258 : 7714-20.
- 6 - Blasco A., Bidanel J.P., Bolet G., Haley C.S. et Santacreu M.A. (1993). The genetics of prenatal survival of pigs and rabbits. *Livest. Produ. Sci.* 37: 1-21.
- 7 - Bloch B, Popovici T, Chouham S, et al (1987) Transferrin gene expression in choroid plexus of the adult rat brain. *Brain Res Bull* 18(4):573–576.
- 8 - Blomhoff, M. H. Green, T. Berg et K. R. Norum, « Transport and storage of vitamin A », *Science*, vol. 250, n° 4979, 19 octobre 1990, p. 399-404.
- 9 - Boussit D. (1989). Reproduction et insémination artificielle en cuniculture chez le lapin. Edité par l'association française de cuniculture ; Diffusion Lavoisier TEC & DOC : 240p.
- 10 - Cassia R, Besnard L, Fiette L, et al (1997) Transferrin is an early marker of hepatic differentiation, and its expression correlates with the postnatal development of oligodendrocytes in mice. *J Neurosci Res* 50(3):421–432.
- 11 - Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S. (2004). Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(18): 6876-6881.
- 12 - Chen, Y.-H., Chuang, C.-k., Lin, E.-C., Huang, M.-C., et al. (2005) A reference map and identification of porcine testis proteins using 2-DE and MS. *Proteomics* 5:4205–4212.

- 13 - Chocu. S, (2014) Découverte de nouvelles protéines impliquées dans la spermatogenèse chez le rat. *Biologie de la reproduction*. Université Rennes 1, Français.
- 14 - Christensen AK, Fawcett DW. (1966). The fine structure of testicular interstitial cells in mice. *Am J Anat* 118(2): 551-571.
- 15 – Chemes H.E. (2001). Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int. J. Androl.* 24: 2-7.
- 16 - Christensen, A. K. (1970) Fine structure of testicular interstitial cell in human. In: Rosemberg, F. and Paulsen, C. A.,ed., *The human testis*, New York, Plenum.
- 17 - Chu DS, Liu H, Nix P, *et al.* Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. *Nature* 2006 ; 443 : 101-5.
- 18 - Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *The Journal of biological chemistry* 269(45): 28314-28322.
- 19 - Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man, *Amer. J. Anat.*, 112, 35.
- 20 - Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal, *physiol. Rev.*, 52, 198.
- 21 - Collard MW, Griswold MD. Biosynthesis of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochemistry* 1987 ; 26 : 3297-303.
- 22 - Dadoune J-P. et Demoulin A. (2001) Structure et fonction du testicule. In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA Editions. Ellipses.
- 23 - Danzo B. J., Cooper T. G., Orgebin-crist M. C., (1977). Androgen binding protein (ABP) in fluids collected from the rete testis and cauda epididymis of sexually mature and immature rabbits and observations on morphological changes in the epididymis following ligation of the ductuli efferentes ; *Biol. Reprod.*, 17, 64-77.

- 24 - Davis J.T, Ong DE. : Retinol processing by the peritubular cell from rat testis. *Biology of Reproduction*. 1995 ; 52 : 356-364.
- 25 - Dhvm JT, ONG DE. : Synthesis and Secretion of Retinol-Binding Protein by Cultured Rat Sertoli Cells. *Biol Reprod*. 1992 ; 47 : 528-533.
- 26 - DiconstanzoDufetel J., *Les marqueurs protéiques de l'inflammation et de la dénutrition : pré albumine et retinol binding protein*, euillets biol (1987) ; 157 : 29-32.
- 27 - Dym, M. and Fawcett, D. w. (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartment of the seminiferous epithelium, *Biol. Reprod.*, 3, 308.
- 28 - Fawcette, D. W. and Burgos, M. H. (1956) *Observations on the cytomorphosis of the germinal and interstitial cells of the human testes*. In: *Ciba Foundation Colloquium on Ageing*, vol. 2, p. 86.
- 29 - Frairia R, Fortunati N, Fissore F, Fazzari A, Zeppego P, Varvello L, Orsello M, Berta L. (1992). The membrane receptor for sex steroid binding protein is not ubiquitous. *Journal of endocrinological investigation* 15(8): 617-619.
- 30 - French F. S., Ritzen E. M., (1973). A high affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. *Endocrinology*, 93, 88-93.
- 31 - García-Tomás M., Sánchez 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 Cunicole, Le Mans, France* : 49-52.
- 32 - Garcia-Tomas M., S'anchez J. et Piles M. (2009a). Post-natal sexual development of testis and epididymis in the rabbit: Variability and relationships among macroscopic and microscopic markers. *Animal Reproduc. Sci.* 110: 347–355.
- 33 - Gondos B., Renston R.H. et Conner L.A. (1973). Ultrastructure of germ cells and Sertoli cells in the postnatal rabbit testis. *Am. J. Anat.* 136: 427–39.
- 34 – Gorinski B, Horsburgh C, Lindsey PE, et al (1979) Evidence for the bilobal nature of differic rabbit plasma transferrin. *Nature* 281(5727):157–158.

- 35 - Graham T.E. et al., *retinol binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese and diabetic subjects*, N Engl. J Med 2006; 353,2552-2563.
- 36 - Guder WG, Hofmann W. Clinical role of urinary low molecular weight proteins: their diagnostic and prognostic implication. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2008; 241: 95-98.
- 37 - Guo X, Zhang P, Huo R, Zhou Z, Sha J. Analysis of the human testis proteome by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics Clin Appl* 2008 ; 2 : 1651-7.
- 38 - Guo X, Zhao C, Wang F, et al. Investigation of human testis protein heterogeneity using 2-dimensional electrophoresis. *J Androl* 2010 ; 31 : 419-29.
- 39 - Hansson V., Reusch E., Trygstad O., Torgersen O., Ritzen E. M., French F. S., (1973b). FSH stimulation of testicular androgen binding protein. *Nature New Biol.*, 246, 56-58.
- 40 - Hansson V., Trygstad O., French F. S., Lean W. S., Smith A. A., Tindall D. J., Weddington S. C., Petrusz P., Nayfeh S. N., Ritzen E. M., (1974). *Androgen transport*.
- 41 - Hansson V., Ritzen E. M., French F. S., Nayfeh S. N., (1975). Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis, 173-201. In Greep R. O., Hamilton D. W., Geiger S. R., *Handbook of Physiology, Endocrinology, V*, Am. Physiol. Soc. Publ.
- 42 - Hageni4s L., Ritzen E. M., Svensson J., Hansson V., Purvis K., (1978). Temperature dependance of Sertoli cell function. *Int. J. Androl. Suppl.*, 2, 449-458.
- 43 – Hamon R., Thepot N. et Salaun G. (1999). *Biologie de la reproduction des mammifères d'élevage. Editions Educagri: 132p.*
- 44 - Hayes FJ, Seminara SB, Decruz S, Boepple PA, Crowley WF, Jr. (2000). Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85(9): 3027-3035.
- 45 - Heaphy S, Williams J (1982) The preparation and partial characterization of N-terminal and C-terminal: iron-binding fragments from rabbit serum transferrin. *Biochem J* 205(3):611–617.
- 46 - Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol* 2006 ; 636 : 1-15.

- 47 – Holmes SD, Bucci LR, Lipshultz LI, Smith RG (1983) Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes. *Endocrinology* 113(5):1916–1918.
- 48 - Huang SY, Lin JH, Chen YH, *et al.* A reference map and identification of porcine testis proteins using 2-DE and MS. *Proteomics* 2005 ; 5 : 4205-12.
- 49 - Huang XY, Guo XJ, Shen J, *et al.* Construction of a proteome profile and functional analysis of the proteins involved in the initiation of mouse spermatogenesis. *J Proteome Res* 2008 ; 7 : 3435-46.
- 50 - Hudson L. et Hamilton W. (1993) Urogenital System. In : *Atlas of feline anatomy for veterinarians*. Second Edition. Teton NewMedia.
- 51 – Huggenvik JI, Idzerda RL, Haywood L, *et al* (1987) Transferrin messenger ribonucleic acid molecular cloning and hormonal regulation in rat Sertoli cells. *Endocrinology* 120(1):332–340.
- 52 - Huhtaniemi I. The parkes lecture. mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: What do they teach us about reproductive physiology. *J Reprod Fertil*. 2001 *Jul*; 119(2): 173–86.
- 53 - Hou JW, Collins DC, Schleicher RL. (1990). Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in : *murine Leydig cells*. *Endocrinology* 127(5): 2047-2055.
- 54 - Iczkowski K.A., Sun E.L. *et Gundos B.* (1991). Morphometric study of the prepubertal rabbit testis: germ cell numbers and seminiferous tubule dimensions. *Am. J. Anat.* 190: 266–72.
- 55 - James RW, Hochstrasser AC, Borghini I, Martin B, Pomette D, Hochstrasser D. Characterization of a human high density lipoprotein-associated prote in, NAJ /NA2. Identity with SP40,40, an inhibitor of complement mediated cytolysis. *Arterioscler Thromb* 1991 ; 11 : 645-52.
- 56 - Jegou B., Le Gac-Jegou F., (1978). Androgen-binding protein in the seminal plasma of some mammalian species. *J. Endocr.*, 77, 267-268.
- 57 - Jegou B., Dacheux J. L., Terqui M., Garnier D. H., Courot M., 1978. Studies of the androgen binding protein in the rete testis fluid of the ram and its relation to sexual season. *Mol. cell. Endocr.*, 9, 335-346.
- 58 - Jégou B., Rolland A. *et Albert O.* (2014) Le testicule. In : saint-dizier M. *et chasant-maillard S.* *La reproduction animale et humaine*. Editions Quae. p 752.

- 59 - Joseph DR, Hall SH, French FS. (1987). Rat androgen-binding protein: evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(2): 339-343.
- 60 - Kretser, D. M. de (1969) Ultrastructural features of human spermiogenesis, *Z. mikr.anat. Forsch*, 98, 477.
- 61 - Kotite N. J., Nayfeh S. N., French F. S., (1978). FSH and androgen regulation of Sertoli cell function in the immature rat. *Siol. Reprod.*, 18, 65-73.
- 62 - Lee EY, Barcellos-Hoff MH, Chen LH, et al (1987) Transferrin is a major mouse milk protein and is synthesized by mammary epithelial cells. In *Vitro Cell Dev Biol* 23(3):221–226.
- 63 - Leeson CR. (1963). Observations on the fine structure of rat interstitial tissue. *Acta anatomica* 52: 34-48.
- 64 - Louis B. G., Fritz I. B., (1979). Follicle stimulating hormone and testosterone independently increase the production of androgen binding protein by Sertoli cells in culture. *Endocrinology*, 104,454-462.
- 65 - Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology* 59(1): 1-13.
- 66 - Micol D., Robelin J. et Geay Y. (1993). Composition corporelle et caractéristiques biologiques des muscle chez les bovins en croissance et a l'engrais. *INRA Production Animale. Vol. 6 (1): 61-69.*
- 67 - Migrenne S, Racine C, Guillou F, Habert R (2003) Pituitary hormones inhibit the function and differentiation of fetal Sertoli cells. *Endocrinology* 144(6):2617–2622.
- 68 – Morgan EH (1969) Factors affecting the synthesis of transferring by rat tissue slices. *J Biol Chem* 244(15):4193–4199.
- 69 – Morris MD, Chaikoff IL. (1959). The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland, and testis of the rat: dietary versus endogenous contributions. *The Journal of biological chemistry* 234(5): 1095-1097.
- 70 - Mullaney BP, Rosselli M, Skinner MK. (1994). Developmental regulation of Sertoli cell lactate production by hormones and the testicular paracrine factor, PModS. *Mol Cell Endocrinol* 104(1): 67-73.
- 71 - Muller Y. et Clos J. (1997). La reproduction (Gonades, gamètes et fécondation). Edition Nathan, Paris: 9-31.
- 72 - Musto N. A., Gunsalus G. L., Bardin C. W., (1978). Further characterization of androgen binding protein in epididymis and blood. *Int. J. Androl., Suppl.* 2, 424-433.

- 73 - Norton JN, Skinner MK. (1992). Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: potential role of immediate-early genes. *Mol Endocrinol* 6(12): 2018-2026.
- 74 - Norton JN, Vigne JL, Skinner MK. (1994). Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: analysis of common signal transduction pathways. *Endocrinology* 134(1): 149-157.
- 75 – Ouhayoun J. (1976). Etude comparative de races différente par le poids adulte. Thèse de Doctorat. Université Montpellier.
- 76 - Paz M, Morín M, Del Mazo J. Proteome profile changes during mouse testis development. *Comp Biochem Physiol Part D, Genomics and Proteomics* 2006 ; 1 : 404-15.
- 77 - Petrie RG Jr, Morales CR (1992) Receptor-mediated endocytosis of testicular transferrin by germinal cells of the rat testis. *Cell Tissue Res* 267(1):45–55.
- 78 - Piles M., Gianola D., Varona L. et Blasco A. (2003). Bayesian inference about parameters of a longitudinal trajectory when selection operates on a correlated trait. *J. Anim. Sci.* 81:2714–24.
- 79 - Rabenandrasana et Ramsohoye, (1994) « une nouvelle glycoprotéine protectrice de l'intégrité cellulaire » *rnédecine/scienres* /994 ; JO : 1 2-20.
- 80 - Ricken A.M. et Viebahn C. (2002). Stage-specific expression of the mitochondrial germ cell epitope PG2 during postnatal differentiation of rabbit germ cells. *Biol. Reprod.* 67:196–203.
- 81 - Rolland AD, Jégou B, Pineau C. Testicular development and spermatogenesis: harvesting the postgenomics bounty. *Adv Exp Med Biol* 2008 ; 636 : 16-41.
- 82 - Rommerts F. F. G., Krüger-sewnarain B. Ch., Grootegoed J. A., Van Der Molen H. J., (1977). Analysis of androgen-binding protein in media from Sertoli cell incubations and cytosols from rat testis. *J. Endocr.*, 73, 511-517.
- 83 - Russell, L.D. et al., (1993) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21:776–776.
- 84 - Saez F, Grizard G, Boucher D. Electrophoretic characterization of the human sperm-specific enolase at different stages of maturation. *J Androl* 1994; 25:824–829.
- 85 - Schinckel A., Johnson R.K., Pumfrey R.A. et Zimmerman D.R. (1983). Testicular growth in boars of different genetic lines and its relationship to reproductive-performance. *J. Anim. Sci.* 56(5):1065–76.
- 86 - Sehmitt MC, Onc DE. : Expression of cellular Retinol-Binding protein and Lecithin-Retinol acyltransferase in developing rat testis. *Biol Reprod.* 1993 ; 49 : 972-979.

- 87 - Senger J.L. (2012). Pathways to Pregnancy and Parturition. Third Edition. Current Conceptions Inc. Washington State University.
- 88 – Skinner MK, Cosand WL, Griswold MD (1984) Purification and characterization of testicular transferrin secreted by rat Sertoli cells. *Biochem J* 218(2):313–320.
- 89 - Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in : *gonadotropin-deficient (hpg) mice*. *Endocrinology* 136(12): 5311-5321.
- 90 - Steinberger A., Steinberger E., (1977). The Sertoli cells, 371-399, in Johnson A. D., Gomes W. R., *The Testis*, vol. 4, Acad. Press.
- 91 - Suire S, Fontaine I, Guillou F (1997) Transferrin gene expression and secretion in rat Sertoli cells. *Mol Reprod Dev* 48(2):168–175.
- 92 - Sylvester SR, Griswold MD (1984) Localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes. *Biol Reprod* 31(1):195–203.
- 93 - Takemori N, Yamamoto MT. Proteome mapping of the Drosophila melanogaster male reproductive system. *Proteomics* 2009 ; 9 : 2484-93.
- 94 - Themmen APN, Huhtaniemi IT. (2000). Mutations of gonadotropins and Gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 21(5): 551-583.
- 95 - Tindall D. J., Mena C. R., Means A. R., (1978). Hormonal regulation of androgen binding protein in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 103, 589-594.
- 96 – Viguera-Villasenor R.M., Montelongo-Solís P., Chávez-Saldana M.D., Gutiérrez-Pérez O., Arteaga-Silva M. et Rojas-Castaneda J.C. (2013). Postnatal testicular development in the Chinchilla rabbit. *Acta Histochemica* : 9.
- 97 - Verhoeven G, Swinnen K, Cailleau J, Deboel L, Rombauts L, Heyns W. (1992). The role of cell-cell interactions in androgen action. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 41(3-8): 487-494.
- 98 - Vézinhel A. (1968). Effet de l'hypophysectomie sur la croissance pondérale du Lapin. C. R. Acad. Sci., Paris, 266, 83z-z345r.
- 99 - Wauben-Penris PJ, Strous GJ, van der Donk HA (1988) Kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake by intact isolated rat seminiferous tubules and Sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 38 (4):853–861.
- 100 - Weddington S. C., Brandtzaeg P., Hansson V., French F. S., Petrusz P., Nayfeh S. N., Ritzen E. M., (1975). Immunological cross reactivity between testicular androgen-binding protein and serum testosterone-binding globulin. *Nature*, 258, 257-259.
- 101 - Whaley PD, Chaudhary J, Cupp A, Skinner MK. (1995). Role of specific response elements of the c-fos promoter and involvement of intermediate transcription factor(s) in the

induction of Sertoli cell differentiation (transferrin promoter activation) by the testicular paracrine factor PModS. *Endocrinology* 136(7): 3046-3053.

102 - Yefimova MG, Jeanny JC, Guillonneau X, et al (2000) Iron, ferritin, transferrin and transferrin receptor in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(8):2343–2351.

103 - Zhang FP, Pakarainen T, Poutanen M, Toppari J, Huhtaniemi I. (2003). The low Gonadotropin-independent constitutive production of testicular testosterone is sufficient to maintain spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(23): 13692-13697.

104 - Zhu YF, Cui YG, Guo XJ, et al. Proteomic analysis of effect of hyperthermia on spermatogenesis in adult male mice. *J Proteome Res* 2006 ; 5 : 2217-25.

I - Préparation des solutions

Annexe 01 : solution Brooks

- 758 mg.....tris
- 250 ml.....eau distillé

Dissoudre le tris dans l'eau puis ajuster le pH à 7.5 par le HCL (1N).

- 152.5 mg.....Mgcl₂
- 21.4 g.....sucrose

Homogénéisé à l'aide d'un agitateur puis réajuster le pH à 7.5 par le NAOH (1N).

Annexe 02 : tampon tris-HCL pH=8.8

- 90.855 g.....tris
- 200 ml.....H₂O distillé

Dissoudre le tris dans de l'eau puis ajuster le pH à 8.8 en ajoutant le HCL (1N).

Annexe 03 : tampon tris-HCL pH=6.8

- 15.14 g.....tris
- 200 ml.....H₂O distillé

Dissoudre le tris dans l'eau puis ajuster le pH à 6.8 en ajoutant quelque gouttes d'HCL (1N).

Annexe 04 : tampon de dénaturation

- 12.5 ml.....Annexe 03
- 2.5 g.....SDS

Dissoudre le SDS dans la solution 03 puis ajouter :

- 10 g.....sucrose
- 10 ml.....glycérol

Homogénéisé le tout et conservé dans un flacon sombre à 4°C.

Annexe 05 : tampon de migration ou de charge

- 3 g.....tris
- 1 l..... H₂O distillé
- 14.4 g.....glycine

Homogénéisé et ajuster le pH à 8.3 puis ajouter :

- 1 g.....SDS

Agiter et conserver dans un flacon sombre.

Annexe 06 : solution Acrylamide-bisacrylamide ou polyacrylamide

- 600 g.....Acrylamide
- 1.6 g.....bisacrylamide
- 200 ml..... H₂O distillé

Homogénéisé et conserver dans un flacon sombre à 4°C.

Annexe 07 : solution Bradford

- 0.01 g.....bleu de coomassie G₂₅₀
- 4.7 ml.....éthanol
- 100 ml..... H₂O distillé

Homogénéisé et conservé à 4°C dans un flacon sombre.

Annexe 08 : solution de coloration

- 0.5 g.....bleu brillons de coomassie R250
- 100 ml.....méthanol
- 4 g.....TCA
- 100 ml..... H₂O distillé

Homogénéisé et conservé à l'abri de la lumière.

Annexe 09 : solution de décoloration

- 37.5 ml.....Acide acétique glaciale

- 312.5 ml..... H₂O distillé
- 150 ml.....méthanol

Conserver dans un flacon sombre.

Annexe 10 : solution BSA « Bovin Sérum Albumine »

- 20 mg.....BSA
- 20 ml..... H₂O distillé

Agiter et conserver à -20°C dans des tubes à hémolyse.

Annexe 11 : solution APS 10% « Persulfate d'Ammonium »

- 10 g.....APS
- 100 ml.....H₂O distillé

Agiter et conserver dans des tubes éppendorfe à -20°C.

Annexe 12 : solution SDS 10%

- 10 g.....SDS
- 100 ml H₂O distillé

Conserver à l'abri de la lumière.

Annexe 13 : PMsF

- 48.5 mg.....PMsF
- 1400 ml.....éthanol pur

Faire dissoudre le comprimé se PMsF dans l'éthanol en évitant tout contacte qui risque de mimer l'effet de la PMsF, puis conserver dans des eppendorfs (83 µl) à -20°C.

Annexe 14 : tampon d'extraction ou de lyse

- 10 ml.....brooks
- 150 µl.....PMsF

Homogénéisé et conserver dans des tubes eppendorf à -20°C.

Annexe 15 : solution de fixation

- 15 gTCA
- 100 ml..... H₂O distillé

II - Préparation des gels**Annexe 16 : gel de séparation**

- 1.875 ml..... H₂O distillé
- 1.875 ml.....polyacrylamide
- 2.25 ml.....tris-HCL pH=8.8
- 60 µl.....SDS 10%
- 35 µl.....APS 10%
- 6 µl.....temed

Annexe 17 : gel de concentration

- 1.875 ml..... H₂O distillé
- 375 µl.....polyacrylamide
- 750 µl.....tris-HCL pH=6.8
- 30 µl.....SDS 10%
- 30 µl.....APS 10%
- 6.75µl.....temed

III – Gamme étalon**Annexe 18 : tableau qui résume les dilutions de la solution mère BSA**

N° Tube	BSA (µl)	Bradford (µl)	H ₂ O distillé (µl)
Zero	/	400	1600
1	100	400	1500
2	250	400	1350
3	1000	400	600
4	1500	400	100
5	1600	400	/

IV – Dosage spectrophotométrique

Annexe 19 : tableau qui résume les dosages de la gamme étalon

N° Tube	BSA (µl)	DO
Zéro	/	0
1	100	-0.007
2	250	0.019
3	1000	0.253
4	1500	0.318
5	1600	0.395

Annexe 20 : tableau des dosages des échantillons

	Echantillon	Âge	Concentration protéine	Absorbance
	Brooks+Bradford	0	0	0
S.L	TZD1	M1	0,55439516	0,206
	TZD2	M1	0,85282258	0,257
	TZD5	M1	0,87399194	0,2675
	TZD11	M2	0,88608871	0,2735
	TZD14	M2	0,91834677	0,2895
	TZD15	M2	0,88508065	0,273
	TZD21	M3	0,96572581	0,313
	TZD22	M3	1,04637097	0,54
	TZD24	M3	0,9858871	0,323
	TZD34	M4	1,02822581	0,344
	TZD32	M4	0,97883065	0,3195
	TZD31	M4	1,04435484	0,352
	TG1	6M	2,88709677	0,8185
	TG2	6M	2,89314516	1,266
	TD1	8M	2,88508065	1,4385
TD2	8M	2,84173387	1,456	
TD3	8M	2,85282258	1,4505	
S.S	TGZ1	1M	2,79032258	1,405
	TGZ3	1M	2,82358871	1,4215
	TGZ4	1M	3,08770161	1,5525
	TGZ7	2M	2,97479839	1,4965
	TGZ8	2M	3,28326613	1,6495
	TGZ12	3M	3,27822581	1,647
	TGZ13	3M	2,88205645	1,4505
	TGZ14	3M	3,15120968	1,584
	TGZ18	4M	3,93447581	1,9725
	TGZ19	4M	3,12298387	1,57
TGZ20	4M	3,20766129	1,612	

V – Electrophorèse

Annexe 21 : tableau des volumes des protéines à prendre

	Echantillon	Âge	Le volume de protéine (15µg/µl)
	Brooks+Bradford	0	0
T.S.	TZD1	M1	27,0565132
	TZD2	M1	17,5886525
	TZD5	M1	17,1626298
	TZD11	M2	16,9283276
	TZD14	M2	16,3336992
	TZD15	M2	16,9476082
	TZD21	M3	15,5323591
	TZD22	M3	14,3352601
	TZD24	M3	15,2147239
	TZD34	M4	14,5882353
	TZD32	M4	15,3244078
	TZD31	M4	14,3629344
	TG1	6M	5,19553073
	TG2	6M	5,18466899
	TD1	8M	5,19916143
	TD2	8M	5,27846754
	TD3	8M	5,25795053
S.S.	TGZ1	1M	5,37572254
	TGZ3	1M	5,31238843
	TGZ4	1M	4,85798237
	TGZ7	2M	5,04235852
	TGZ8	2M	4,56862143
	TGZ12	3M	4,57564576
	TGZ13	3M	5,204617
	TGZ14	3M	4,76007678
	TGZ18	4M	3,81245196
	TGZ19	4M	4,80309877
TGZ20	4M	4,67630421	