

N° D'ORDRE : 09/2008-E/S.N.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENE
USTHB / ALGER
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES**



THESE

**Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat
En Sciences de la Nature**

Spécialité : Physiologie Animale

par Mme KACI Naïma née OUCHFOUN

SUJET

**Etude d'une protéine androgénodépendante de la vésicule séminale de
Psammomys obesus : identification par une approche protéomique.**

Soutenue publiquement le 02 / 12 / 2008 devant le jury composé de :

Mme F. LARABA	Professeur FSB/USTHB	Président
Mme F. HADJ-BEKKOUCHE	Professeur FSB/USTHB	Directeur
Mme T. GERNIGON	Professeur FSB/USTHB	Co-directeur
Mme Z. AMIRAT	Professeur FSB/USTHB	Examineur
Mme Y. BENZAOUG	Professeur FSB/USTHB	Examineur
Mr M.C. ABBADI	Professeur Faculté de Pharmacie	Examineur
Mr H. BAZ	Professeur ENS Kouba	Examineur

Résumé

L'analyse électrophorétique monodimensionnelle, en conditions dénaturantes de l'homogénat et des sécrétions des vésicules séminales du rat des sables *Psammomys obesus* en période de reproduction montre la présence d'une protéine majeure androgéno-dépendante de PM apparent de 21 kDa désignée par POSVP₂₁ (*Psammomys obesus* seminal vesicles protein 21 kDa), dont l'expression présente un cycle saisonnier et semble influencée par les androgènes. Elle représente 22 % des protéines solubles de l'homogénat et 13% de celles des sécrétions des vésicules séminales.

La purification de POSVP₂₁ et la production d'anticorps spécifiques ont permis de localiser la protéine par une approche immunohistochimique. POSVP₂₁ présente une distribution restreinte à l'épithélium et à la lumière de la vésicule séminale. Au niveau de l'épithélium, elle est présente dans le cytoplasme.

L'analyse des ARN totaux des vésicules séminales et des produits traduits *in vitro* révèle un composé de même mobilité électrophorétique que POSVP₂₁ qui serait codé par un messenger majoritaire, ce qui confirme l'origine vésiculaire de POSVP₂₁. L'épithélium représente son site de synthèse.

POSVP₂₁ présente en outre, une parenté immunologique avec deux protéines épидидymaires « P_{21Ep} et P_{21Ed} » de même poids moléculaire apparent. L'approche protéomique (électrophorèse bidimensionnelle et la nanoLC-MS/MS) a permis d'établir les caractéristiques biochimiques (pHi et nombre de polypeptides constitutifs) de POSVP₂₁ et de déterminer sa séquence peptidique et celles de P_{21Ep} et P_{21Ed}.

L'analyse des séquences peptidiques de POSVP₂₁, P_{21Ep} et de P_{21Ed} montre une forte homologie avec la séquence de la transgeline de *Rattus norvegicus*.

La transgeline est un marqueur spécifique de la différenciation du muscle lisse chez l'adulte ; elle est identifiée pour la première fois chez le rat des sables *Psammomys obesus*.

Mots clés : *Psammomys obesus* ; POSVP₂₁ ; P_{21Ep} ; P_{21Ed} ; immunolocalisation ; électrophorèse 2-D ; nanoLC-MS/MS ; transgeline.

« Un spécialiste est une personne qui sait de plus en plus de choses sur un sujet de plus en plus restreint, de telle sorte qu'à la limite c'est une personne qui sait tout sur rien ».

Bernard Shaw

Remerciements

Le présent travail a été réalisé conjointement au laboratoire d'Endocrinologie de la FSB/USTHB, au laboratoire de recherche sur les zones arides et au service d'Immunologie de l'institut Pasteur d'Alger.

J'adresse mes sentiments respectueux et reconnaissants ainsi que mes remerciements les plus sincères au Professeur F. Hadj-Bekkouche pour m'avoir accueillie dans le laboratoire d'Endocrinologie de la FSB, avoir suivi de près ce travail et m'avoir fait profiter de ses connaissances scientifiques très étendues. Ses encouragements sans cesse répétés ont été d'un précieux apport pour l'accomplissement de ce travail. Son esprit scientifique est un exemple.

L'apport du Professeur T. Gernigon qui m'a proposé ce sujet et codirigé cette thèse a été essentiel ; elle m'a guidée et conseillée tout au long de ce travail. Je voudrais dire également combien il m'a été agréable de travailler avec elle et je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour la confiance qu'elle m'a témoignée lors de la réalisation de ce travail ainsi que pour son implication et ses encouragements.

Une grande partie de ce travail a été réalisée au service d'Immunologie de l'Institut Pasteur d'Alger dirigé par le Professeur M.C. Abbadi, je tiens à lui adresser mes remerciements les plus sincères et ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son service et pour son aide précieuse qui m'a permis de mener à bien mes expérimentations, je le remercie aussi pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je suis très honorée que Madame le Professeur F. Laraba, qui malgré ses nombreuses responsabilités a accepté de présider ce jury et d'enrichir ce travail par sa critique. Je l'en remercie vivement.

Je suis infiniment reconnaissante au Professeur Z. Amirat, Directrice du LRZA pour m'avoir facilité toutes les démarches nécessaires pour l'accomplissement de ce travail. Je tiens à lui exprimer mes remerciements et ma gratitude pour ses encouragements, ses conseils et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail en dépit de toutes ses responsabilités.

Je voudrais dire également combien il m'est agréable d'adresser mes remerciements au Professeur Y. Benazzoug pour ses encouragements permanents et pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail et de faire partie de ce jury.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Professeur H. Baz qui malgré ses nombreuses occupations pédagogiques et scientifiques accepte d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury de thèse.

Que le Dr Z. Harrat, le Dr Boudrissa du service de Parasitologie et le Dr T. Benhassine du service de Biologie moléculaire de l'Institut Pasteur d'Alger trouvent l'expression de ma reconnaissance pour leur aide et leur disponibilité.

Je remercie tous les membres du laboratoire de cancérologie mammaire de l'Institut Jules Bordet de Bruxelles, en particulier le Professeur Guy Leclerc et le Docteur D. Larsimont pour leur accueil, leur aide précieuse et surtout leur disponibilité.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Dr L. Bellanger de l'Institut de Biologie et de Biotechnologie du CEA (Valrho de Marcoule) de m'avoir accueillie dans son équipe, initiée aux techniques de protéomique et m'avoir permis de profiter de son expérience avec beaucoup de patience. Mes remerciements vont également A. Incamps et F. Hely-Joly pour leur contribution à l'analyse de spectrométrie de masse.

Mes remerciements chaleureux vont également au Dr W. Aschwak pour ses conseils et son aide précieuse lors de l'interprétation des résultats de protéomique.

Je tiens à remercier vivement le :

- Dr S. Aouichat pour son aide, ses encouragements et ses conseils,
- Dr S. Hammouche pour son aide lors de la prise des photos d'histologie.

Je ne saurais remercier individuellement tous les amis et collègues du laboratoire d'Endocrinologie de la FSB, du LRZA, de la station de recherche de Béni Abbès, du service d'Immunologie de L'IPA et de la FSB.

Je terminerai en remerciant mon époux pour son soutien et ses encouragements et mes enfants pour les sacrifices qu'ils ont fait et qu'il est difficile de faire à leur âge et surtout pour leur compréhension.

Je m'excuse auprès de toutes les personnes omises involontairement en leur demandant d'accepter mes remerciements et de comprendre qu'il est difficile de n'oublier personne.

Abréviations utilisées

A :	ampère
ABP :	androgen binding protein
ABTS :	2,2'-azino-di-éthylbenzthiazoline sulfonate
Ac :	anticorps
ACF	adjuvant complet de Freund
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
Ag :	antigène
AIF :	adjuvant incomplet de Freund
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomal
ARNt :	ARN totaux
ATZ :	anilino-thia-zolinone
BSA :	bovine serum albumin
CHD :	calponin homology domain
CML :	cellules musculaires lisses
DAB :	diamino 3-3' benzidine
DHT :	dihydrotestostérone
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
Dpm :	Désintégration par minute
DTT:	DiThiothréitol
ELISA :	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
hK2 et hK3 :	human Kallikrein 2 et 3
HPLC :	High Phase liquid Chromatography
ICR :	inducible carbonyl reductase
IDD :	Immunodiffusion double
IEF :	Isoélectrofocalisation
Ig :	immunoglobuline
IS ₁ :	immunsérum du lapin 1
IS ₂ :	immunsérum du lapin 2
kDa :	kilo Dalton
LCM :	Laser Capture Microdissection
M :	molaire
mA :	milliampère
MEC :	matrice extracellulaire
mg :	milligramme
min :	minute
ml :	millilitre
MMP-9 :	métalloprotéinase 9
MS :	mass spectrometry
MSVSP99 :	Mouse seminal vesicle secretory protein of 99 aminoacids
MVDP :	Mouse Vas Deferent protein
NepHGE :	Non equilibrium pH gel electrophoresis
nm :	nanometre

PAP	peroxydase-anti-peroxydase
PBP :	Prostatic Binding Protein
PBS :	phosphate-buffered saline
PCI :	inhibiteur de la protéine C
pHi :	pH isoélectrique
PM :	poids moléculaire
PMSF :	Phenylmethylsulfonyl fluoride
POSVP ₂₁ :	<i>Psomomys obesus</i> seminal vesicle protein (21 kDa)
PP5 :	placental protein 5
PSA :	Prostate Specific Antigen
PTH :	phényle-thio-hydantoïne
PVDF:	Polyvinylidène difluoride
RER :	réticulum endoplasmique rugueux
SDS :	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE :	sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SVA :	seminal vesicle autoantigen
SVS:	seminal vesicle secretory
TBS :	tris-buffered saline
TeBG:	testosterone binding globulin
TEMED :	N'N' tetraméthylène diamine
TFA :	trifluoroacétique acid
TGLN:	Transgeline
TIMPS :	Tissue inhibitor of Metalloprotéinase
U.I.:	unités internationales
V :	volt
W :	watt
μM :	micromolaire
HCC :	hépatocarcinomes cellulaires
μm :	micromètre
1-D :	1 dimension
2-D :	2 dimensions

SOMMAIRE

Introduction.....	01
Synthèse bibliographique.....	03
Introduction	
1. le tractus génital mâle	03
1.1. La fonction sexuelle mâle.....	04
1.2. Les glandes génitales annexes	04
1.2.1. Les vésicules séminales	04
1.2.1.1. Structure.....	04
1.2.1.2. Fonctions.....	05
2. Les protéines androgéno-dépendantes spécifiques des vésicules séminales.....	07
2.1. Chez les rongeurs	07
2.2. Chez l'homme.....	09
2.2.1. Protéines androgéno-dépendantes du plasma séminal.....	09
2.2.2. Autres composants du liquide séminal.....	11
3. Expression des protéines androgéno-dépendantes des vésicules séminales au cours du développement.....	11
3.1. Chez les rongeurs.....	12
3.1.1. Le rat.....	12
3.1.2. La souris	12
3.2. Chez l'homme	12
3.3. Conclusion.....	12
4. Caractérisation et identification des protéines	13
4.1. Définition	13
4.2. Objectifs.....	13
4.3. Stratégie de l'analyse protéomique	15
4.4. Recherche de modifications post-traductionnelles.....	16

Matériel et méthodes

1. Animaux et échantillons.....	17
1.1. Animaux.....	17
1.2. Prélèvement des échantillons.....	17
1.3. Extraction des protéines.....	18
1.4. Dosage des protéines.....	18
1.5. Concentration des protéines	18
2. Analyse des protéines.....	18
2.1. Séparation des protéines.....	19
2.1.1. Electrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes ..	19
2.1.1.1. Préparation des gels.....	19
2.1.1.2. Traitement des échantillons	20
2.1.1.3. Dépôt et migration	20
2.1.1.4. Coloration et décoloration	20
2.1.1.5. Révélation	20
2.1.2. Analyse densitométrique.....	21
2.2. Caractérisation des protéines.....	21
2.2.1. Electrophorèse bidimensionnelle.....	21
2.2.1.1. Première dimension.....	21
2.2.1.2. Seconde dimension.....	22
2.2.2. Coloration des gels	23
2.2.3. Décoloration.	23
2.2.4. Conservation des gels.....	23
2.2.5. Transfert des protéines sur membrane et Immunoblotting.....	24
3. Préparation des anticorps	24
3.1. Contrôle de la pureté de POSVP₂₁	24
3.2. Préparation et sélection des anticorps polyclonaux.....	25
3.2.1. Matériel antigénique.....	25
3.2.2. Immunisation	25
3.3. Mise en évidence des anticorps dans le sérum	25
3.3.1. Contrôle de la spécificité antigénique	26
3.3.2. Détermination des titres des sérums	26
3.4. Purification des anticorps.....	27
3.4.1. Chromatographie d'affinité	28
3.4.2. Contrôle de la pureté des anticorps.....	28

4. Immunolocalisation.....	28
4.1. Histologie.....	28
4.2. Immunohistochimie	28
4.2.1. Préparation des coupes.....	29
4.2.2. Traitement des coupes.....	29
4.2.3. Révélation des coupes.....	30
5. Analyse des ARN totaux.....	31
5.1 Extraction des ARN totaux.....	31
5.2. Dosage et analyse.....	31
5.3. Traduction <i>in vitro</i> et analyse électrophorétique	32
6. Identification des protéines.....	32
6.1. Séquençage d'Edman	32
6.1.1. Séquence N-terminale.....	35
6.1.2. Séquences internes.....	35
6.2 Microanalyse des protéines pour la recherche d'empreinte	
peptidique.....	36
6.2.1. Préparation des échantillons.....	36
6.2.2. Stratégies d'identification	37

Résultats et discussion

I. Site de synthèse de POSVP₂₁

Introduction.....	38
1. Analyse des protéines.....	38
1.1. Analyse des profils électrophorétiques.....	38
1.2. Analyse densitométrique des profils électrophorétiques	
de l'homogénat vésicules séminales.	39
1.3. Analyse des profils électrophorétiques de l'homogénat et des	
sécrétions des vésicules séminales en période de reproduction.....	41
2. Localisation de POSVP₂₁.....	43
2.1. Isolement de POSVP₂₁.....	43
2.2. Mise en évidence des anticorps dans le sérum.....	44
2.2.1. Immunodiffusion double	44
2.2.2. Détermination des titres des immunosérums	44
2.3. Purification des anticorps anti-POSVP₂₁.....	44

3. Immunolocalisation de POSVP₂₁ dans la vésicule séminale	46
3.1. Aspect histologique de la vésicule séminale.	46
3.1.1. Période de reproduction	46
3.1.2. Période de repos	48
3.2 Etude immunohistochimique.....	48
4. Analyse des ARN totaux et de leurs produits de traduction.....	51
4.1. Dosage et analyse des ARN totaux	51
4.2. Analyse des protéines traduites in vitro.....	52
5. Conclusion.....	52

II. Approche protéomique : Caractérisation et identification de POSVP₂₁

Introduction.....	53
1. Caractérisation de POSVP₂₁.....	53
1.1. Analyse du protéome des vésicules séminales en période de reproduction .53	
1.2. Analyse du protéome des vésicules séminales en période de repos	55
2. Identification de POSVP₂₁	57
2.1. Détermination des séquences peptidiques constitutives de POSVP₂₁.....	57
2.2. Analyse des séquences peptidiques de POSVP₂₁.....	59
2.3. Analyse comparative de POSVP₂₁, P_{21Ep} et P_{21Ed}	60
2.3.1. Localisation de P_{21Ep} et P_{21Ed}	60
2.3.2. Analyse des séquences peptidiques de P_{21Ep} et de P_{21Ed}	63
3. Conclusion.....	64
Discussion	65
Conclusion générale.....	82
Bibliographie.....	84

Annexes

Liste des figures

- Figure 1.** Appareil génital mâle du rat des sables *Psammomys obesus* en période de reproduction.
- Figure 2a.** Schéma représentant les différentes étapes de la protéomique.
- Figure 2b.** Stratégie générale de l'analyse protéomique.
- Figure 3.** Principales étapes de la réaction d'Edman.
- Figure 4.** Profil électrophorétique des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales à différentes périodes de l'année.
- Figure 5.** Analyse densitométrique des profils électrophorétiques.
- Figure 6.** Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles des vésicules séminales et des sécrétions en période de reproduction.
- Figure 7.** Analyse densitométrique des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat et des sécrétions des vésicules séminales de *Psammomys obesus*.
- Figure 8.** Electrophorèse monodimensionnelle préparative de POSVP₂₁.
- Figure 9.** Profil d'éluion des Ac anti-POSVP₂₁ purifiés par chromatographie d'affinité sur Protéine-A.
- Figure 10.** Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE) des fractions d'anticorps anti-POSVP₂₁ purifiés par chromatographie d'affinité sur Protéine-A.
- Figure 11.** Aspect histologique de la vésicule séminale en période de reproduction.
- Figure 12.** Aspect histologique de la vésicule séminale en période de repos.
- Figure 13.** Détermination de la concentration optimale de l'Ac anti-POSVP₂₁ pour l'étude immunohistochimique.
- Figure 14.** Localisation de POSVP₂₁ dans la vésicule séminale du rat des sables en période de reproduction.
- Figure 15.** Localisation cellulaire de POSVP₂₁ dans la vésicule séminale du rat des sables en période de reprise de reproduction.
- Figure 16.** Analyse des ARN totaux et des produits de traduction.
- Figure 17.** Analyse électrophorétique bidimensionnelle des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales du rat des sables en période de reproduction.

- Figure 18.** Analyse électrophorétique bidimensionnelle des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales du rat des sables en période de reproduction (fin de reproduction).
- Figure 19.** Analyse électrophorétique bidimensionnelle des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales du rat des sables en période de repos.
- Figure 20.** Electrophorèse bidimensionnelle (NepHGE/SDS-PAGE) de POSVP₂₁.
- Figure 21.** Séquences peptidiques de POSVP₂₁ identifiées.
- Figure 22.** Alignement des séquences peptidiques de POSVP₂₁ avec celles de la transgeline du rat (*Rattus norvegicus*).
- Figure 23.** Alignements des séquences peptidiques de la transgeline du rat (*Rattus norvegicus*) avec la transgeline de l'homme (*Homo sapiens*).
- Figure 24.** Profil électrophorétique des protéines solubles de l'homogénat de l'épididyme en période de reproduction.
- Figure 25.** Etude de la réactivité des Ac anti- POSVP₂₁ vis-à-vis de P_{21Ep} et P_{21Ed}.
- Figure 26.** Etude immunohistochimique de l'épididyme du rat des sables en période de reproduction.
- Figure 27.** Séquences peptidiques de P_{21Ep}.
- Figure 28.** Séquences peptidiques de P_{21Ed}.
- Figure 29.** Alignements des séquences peptidiques de la transgeline de *Rattus norvegicus*, de POSVP₂₁, P_{21Ep} et de P_{21Ed}.

Introduction

Malgré la précarité des ressources hydriques (rareté et irrégularité des précipitations, forte évaporation) et en dépit de leur apparente inhospitalité, les déserts abritent de nombreuses espèces de mammifères, qui pour survivre ont développé des stratégies adaptatives du comportement et des fonctions physiologiques.

En effet, face à l'aridité du climat, la reproduction, fonction essentielle assurant la pérennité des espèces, se déroule pendant la période de l'année où les conditions sont les plus favorables pour assurer le développement des jeunes animaux.

Le rat des sables *Psammomys obesus* Cretzschmar, 1828 rongeur saharien diurne présente une reproduction avec un cycle saisonnier de la testostéronémie (Khammar, 1987).

Les répercussions histo-cytologiques et biochimiques de ces variations saisonnières ainsi que le degré d'androgénéodépendance des différents organes de l'appareil reproducteur mâle (épididyme, canal déférent et vésicules séminales) ont été mises en évidence au cours d'un travail antérieur et ont permis de montrer la présence dans la vésicule séminale, d'une protéine majeure androgéno-dépendante de poids moléculaire apparent de 21 kDa, caractérisée par une expression saisonnière (Gernigon *et al.*, 1994).

Le tractus génital mâle élabore de nombreux facteurs spécifiques, qui jouent un rôle important dans les mécanismes de reproduction et principalement dans les phénomènes de maturation et de survie des spermatozoïdes.

Certains d'entre eux produits par l'épididyme, les vésicules séminales ou la prostate ont été isolés et caractérisés chez de nombreuses espèces de mammifères (Pailhoux *et al.*, 1991).

Parmi ces facteurs spécifiques, les protéines ont suscité un grand intérêt et sont utilisées comme des marqueurs de l'effet des androgènes sur les gènes codant pour leur synthèse, en raison de leur abondance dans les sécrétions.

Les trois groupes les plus étudiés sont :

- la « Prostatic Binding Protein » : PBP, (Heyns *et al.*, 1977 ; Parker *et al.*, 1978)
- SVS IV et SVS V (Seminal Vesicle Secretory protein), protéines spécifiques des vésicules séminales (Veneziale, 1977 ; Moore *et al.*, 1984) et
- la clustérine de l'épididyme (Mattmuller et Hinton, 1991 ; Dacheux et Dacheux, 2003a).

Dans le tractus génital, les vésicules séminales sont des glandes annexes dont le contenu est déversé dans le canal déférent, en amont du canal éjaculateur.

Une proportion importante des sécrétions des vésicules séminales est représentée par des protéines ; l'identification de ces protéines permet une meilleure compréhension de la fonction de ces glandes qui est essentiellement sécrétoire.

La sécrétion des vésicules séminales représente 50% à 80 % du volume total de l'éjaculat (Balerna *et al.*, 1985).

Chez le rat (*Rattus norvegicus*) adulte les sécrétions des vésicules séminales contiennent 5 protéines majeures dont la synthèse et la sécrétion sont régulées par les androgènes. Deux d'entre elles « SVS IV et SVS V » (Ostrowski *et al.*, 1979) sont des protéines glycosylées, représentant 25 à 30% des protéines des vésicules séminales (Higgins *et al.*, 1976). Ces deux protéines présentent des homologies de structure qui ne sont toutefois pas suffisantes pour leur conférer des fonctions similaires (Mac Donald *et al.*, 1984).

L'importance des vésicules séminales et de leurs sécrétions dans la fertilité a été montrée chez les rongeurs. En effet, l'ablation des vésicules séminales chez le rat entraîne une diminution significative de la fécondité et de la mobilité des spermatozoïdes dans l'utérus (Peitz et Olds Clarke, 1986 ; Cukierski *et al.*, 1991).

Chez le rat des sables *Psammomys obesus*, les vésicules séminales sont sensibles à l'action des androgènes ; une réduction significative de leur poids (63%) et de leur contenu en protéines (52%) est notée après 30 jours de castration. (Gernigon *et al.*, 1994).

Nous nous sommes intéressées à une protéine androgéno-dépendante majeure de poids moléculaire apparent de 21 kDa mise en évidence dans les vésicules séminales du rat des sables *Psammomys obesus* en période de reproduction. Elle est présente dans l'homogénat, les sécrétions et le bouchon vaginal. Son expression est par ailleurs saisonnière.

Deux approches sont adoptées :

- une approche biochimique et immunologique
- une approche protéomique

Elles ont nécessité plusieurs étapes.

Dans une première étape nous avons isolé, quantifié et purifié la protéine.

La deuxième étape nous a permis de mettre au point la production d'anticorps polyclonaux spécifiques pour une localisation immunohistochimique.

Nous avons caractérisé et identifié la protéine.

Enfin dans une dernière étape nous avons tenté de rechercher son rôle physiologique lors de la reproduction.

1. le tractus génital mâle

Le tractus génital mâle (Fig. 1) est constitué des gonades (testicules), des voies excrétrices des spermatozoïdes (épididyme et canal déférent) et des glandes annexes (vésicules séminales, prostate et glandes bulbo urétrales de Cowper). C'est au niveau de ces voies et des glandes annexes, que sont élaborés, de nombreux facteurs spécifiques responsables de la maturation, de l'acquisition du pouvoir fécondant et de la survie des spermatozoïdes.

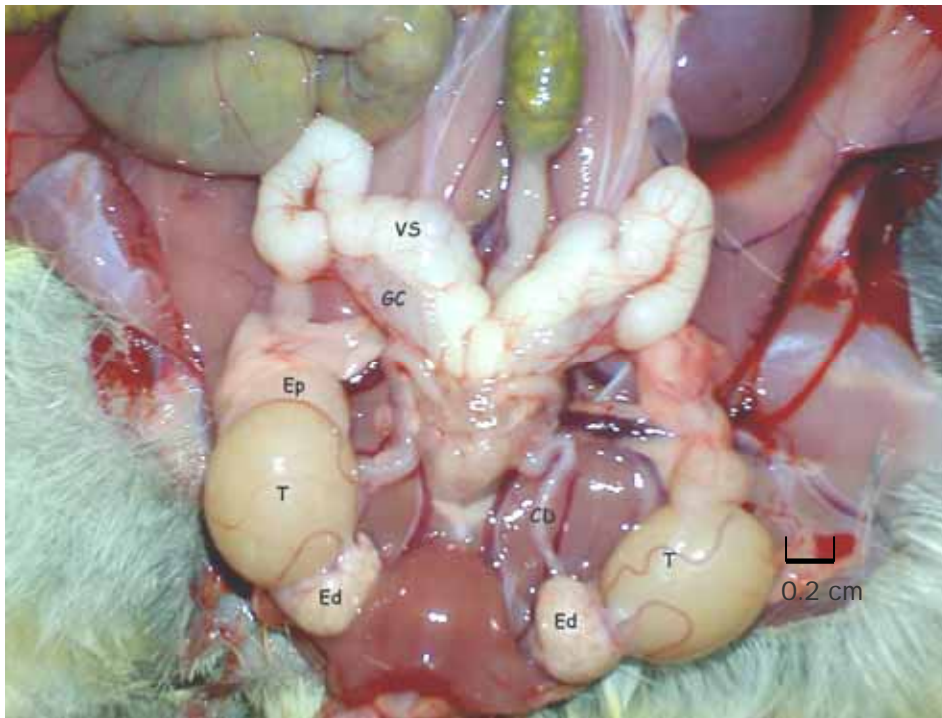


Figure 1. Appareil génital mâle du rat des sables *Psammomys obesus* en période de reproduction.

T : testicule ; VS : vésicule séminale ;
Ed : Epididyme distal ; Ep : Epididyme proximal ;
GC : glande coagulante ; CD : canal déférent.

Chez le rat des sables *Psammomys obesus*, le tractus génital mâle, présente une morphologie comparable à celle des autres rongeurs.

Quelques particularités sont cependant relevées au niveau :

- de la prostate, du point de vue de sa localisation et de son aspect structural. Elle est située au niveau du pelvis ; la prostate ventrale n'apparaît pas subdivisée en glandes tubulo-alvéolaires comme chez les mammifères,
- du canal déférent, qui présente une différence morphologique au niveau de la partie terminale, elle ne se prolonge pas pour former l'ampoule (Clermont, 1954 ; Clermont, 1960 ; Noller *et al.*, 1977 ; Oud et de Rooj, 1977 ; Sinha Hikim *et al.*, 1985 ; Bergmann, 1987).

1.1. La fonction sexuelle mâle

La différenciation du spermatozoïde dans le testicule, sa maturation dans l'épididyme et son activité métabolique dans le plasma séminal, sont l'expression d'une interaction constante de la cellule sexuelle et de son environnement. Les différentes étapes de ce processus qui débute dans le testicule et qui se termine dans le tiers externe de la trompe sont toutes indispensables à l'acquisition du pouvoir fécondant du spermatozoïde (Dadoune, 1988).

Les androgènes sont nécessaires pour le maintien de la croissance et des fonctions de sécrétion dans les organes sexuels mâles. Ils agissent au niveau des tissus différenciés et augmentent la synthèse de nombreuses protéines spécifiques impliquées dans le processus de maturation des spermatozoïdes, telles que la PBP (Parker *et al.*, 1980), la spermine binding protein (Liang *et al.*, 1978), SVS IV et V (Higgins *et al.*, 1976) en régulant la concentration de leurs messagers.

1.2. Les glandes génitales annexes

Les glandes génitales accessoires de l'appareil mâle sont représentées par les vésicules séminales, la glande prostatique et les glandes bulbo urétrales de Cowper. Les deux dernières ont une origine endodermique et dérivent du sinus urogénital, alors que les vésicules séminales d'origine mésodermique dérivent de la portion caudale du canal de Wolff (Jost, 1947)

Les vésicules séminales et la prostate produisent la plus grande partie du fluide séminal et leur fonction est régulée par les androgènes : testostérone et dihydrotestostérone (DHT).

1.2.1. Les vésicules séminales

Les vésicules séminales ont été décrites pour la première fois en 1521 par l'anatomiste italien Berengarius. A cette époque, elles étaient considérées comme des organes, où le plasma séminal était entreposé, d'où la désignation erronée de « vésicules séminales ». Leurs sécrétions contribuent au volume total du plasma séminal sans toutefois emmagasiner des sécrétions de source externe. Le canal excréteur de chaque vésicule séminale pénètre dans la prostate après avoir rejoint le canal déférent pour former le canal éjaculateur qui pénètre dans la prostate ; elles sont assimilées à des glandes exocrines.

Comme la prostate et l'épididyme, les vésicules séminales constituent un organe cible des androgènes. En effet, leur morphogenèse, leur croissance et leur différenciation fonctionnelle sont sous le contrôle des androgènes (Moore *et al.*, 1984). Ces hormones jouent un rôle fondamental dans le contrôle de leur développement en modulant l'expression de gènes spécifiques. La testostérone est le principal régulateur de la structure et de la fonction des cellules épithéliales (Mata, 1995).

Leur développement a été étudié chez de nombreuses espèces, l'homme, le rat, le hamster, le taureau et la souris (Aumüller, 1979 ; Bürki *et al.*, 1953 ; Price, 1936).

1.2.1.1. Structure

Sur le plan histologique, chaque vésicule séminale est constituée de deux compartiments : le compartiment épithélial et le stroma.

Le compartiment épithélial est représenté par une muqueuse mince, très plissée avec un épithélium de type cylindrique pseudo stratifié, constitué de cellules hautes, non ciliées, possédant un noyau volumineux, un cytoplasme éosinophile et des cellules basales.

Les cellules épithéliales sont glandulaires. Au microscope électronique, elles sont caractérisées par un REG, un appareil de Golgi volumineux et des grains de sécrétion, qui occupent la zone apicale de la cellule. Ces derniers sont formés de vésicules claires avec un grain dense excentré ; des saccules golgiens petits et extrêmement dilatés sont observés au voisinage de ces grains de sécrétions (Gernigon, 1992).

Entre les cellules épithéliales, s'insèrent des cellules de forme triangulaire moins abondantes, constituant les cellules basales de remplacement. Ces cellules basales sont similaires à celles décrites au niveau de l'épithélium des autres parties du tractus génital (Mata, 1995). La muqueuse est très ramifiée et forme un système complexe de replis à l'intérieur de la lumière de la vésicule séminale. Ce système de replis épithéliaux permet d'augmenter la surface de sécrétion.

Le stroma est composé de tous les espaces interstitiels et de la paroi fibro-musculaire, située à l'extérieur de la glande. Il renferme les cellules conjonctives logées dans la matrice extracellulaire (MEC) et les cellules musculaires lisses (CML) qui forment la paroi fibro-musculaire.

La paroi fibro-musculaire comprend :

- une musculature constituée d'une couche interne de fibres circulaires et d'une couche externe, comprenant des faisceaux longitudinaux,
- une adventice mince de nature fibro-élastique située sur la face externe de la vésicule séminale.

Le stroma fibro-musculaire est de faible épaisseur contrairement à la lumière de la vésicule séminale, qui est volumineuse et remplie de sécrétions de type éosinophile.

1.2.1.2. Fonctions

L'importance des vésicules séminales dans la fertilité est liée essentiellement à la présence des protéines spécifiques impliquées dans le métabolisme, la motilité et les modifications de surface des spermatozoïdes (Curry et Atherton, 1990).

De nombreuses études **chez les rongeurs** ont montré que les vésicules séminales jouaient un rôle très important dans la fertilité (Carballada et Esponda, 1992; Carballada et Esponda, 1999 ; Mata, 1995 ; Li *et al.*, 2005; Zhang et Jin, 2007).

Chez la souris, l'ablation des vésicules séminales entraîne une diminution significative de la fécondité et de la mobilité du sperme dans l'utérus (Pang *et al.*, 1979 ; Peitz et Olds Clarke, 1986). Des observations similaires sont notées chez le hamster, où l'ablation des vésicules séminales, empêche l'implantation de l'oeuf chez la femelle (Chow *et al.*, 2003).

Le rôle des vésicules séminales, essentiellement sécrétoire est sous le contrôle des androgènes (Flickinger, 1974; Higgins *et al.*, 1976). La testostérone constitue le principal régulateur de la structure et de la fonction des cellules épithéliales, son absence se traduit par une atrophie glandulaire et par la disparition de la sécrétion (Mata, 1995 ; Justulin *et al.*, 2006).

Leurs sécrétions riches en fructose, la principale source d'énergie pour les spermatozoïdes éjaculés, représentent environ 50 à 70% du liquide séminal.

Les sécrétions comprennent des ions, des molécules organiques de faible poids moléculaire, des peptides et des protéines ; elles contiennent plusieurs autres facteurs impliqués dans :

- la coagulation du sperme,
- la motilité des spermatozoïdes,
- le maintien de la stabilité de la chromatine des spermatozoïdes (Richthoff *et al.*, 2002).

Outre l'activité sécrétoire, qui est un reflet de l'action de la testostérone au niveau de l'épithélium, les fonctions principales du complexe ampoulo-vésiculo-ductal sont la résorption de fluides ou de substances dissoutes et la spermatophagie.

Il faut souligner par ailleurs qu'en plus de leur androgénodépendance, les vésicules séminales comme la prostate, pourraient être au cours du développement et à l'âge adulte, sous le contrôle d'autres hormones, telles que la prolactine (Negro-Vilar *et al.*, 1977 ; Krall et Spring-Mills, 1981) et les oestrogènes (Garcia-Florez *et al.*, 2005 ; Thomson et Marker, 2006).

Chez le rat des sables, modèle expérimental de notre étude, la morphologie générale des vésicules séminales a été décrite par Gernigon et ses collaborateurs (1994). Elle est comparable à celle d'autres rongeurs, tels que le rat de laboratoire et le cochon d'inde (Setchel et Brooks, 1988).

Cependant, chez ce rongeur déserticole, le développement de l'appareil génital mâle présente un véritable cycle saisonnier, dont les répercussions au niveau des vésicules séminales, sont très importantes. En effet, parmi les trois organes issus du canal de Wolff (épididyme, canal déférent et vésicules séminales) ce sont les vésicules séminales qui sont les plus sensibles aux fluctuations des androgènes. Ces fluctuations se traduisent par un cycle saisonnier pondéral des vésicules séminales, mis en évidence par Khammar (1987) et Amirat (1989) chez le rat des sables, chez le Hamster par Spring-Mills (1980) et le Macaque par Matsubayashi et Mochizuki (1982). La régression pondérale des vésicules séminales précède celle des testicules et traduit mieux les variations saisonnières de la production hormonale (Khammar, 1987). Elle s'effectue au printemps ; le poids vésiculaire minimum s'observe en juin, mais peut légèrement être avancé au mois de mai, ou au contraire être retardé jusqu'à la mi-juillet.

La reprise a lieu au début de l'été (juin ou juillet pour certains animaux) ; elle est plus importante en septembre (Amirat, 1989).

Un même cycle pondéral est retrouvé chez des rongeurs déserticoles nocturnes tels que la gerbille (Khammar 1987 ; Belkacemi, 1988), le mérion (Gernigon, 1992). Ce cycle est cependant inversé par rapport à celui du rat des sables, puisque chez ces rongeurs, le poids maximal des vésicules séminales est noté au printemps.

Chez l'homme, les vésicules séminales présentent une organogenèse simple (Hatier *et al.*, 1985) ; leur différenciation s'effectue pendant l'enfance et l'adolescence. Après la puberté, les glandes matures forment des structures ayant l'aspect de bourses atteignant une longueur d'environ 2.2 à 2.5 cm, un poids de 5.8 à 8.8 g et une capacité d'environ 3.4 à 4.5 ml, contribue pour environ 70% du volume total du fluide séminal (Aboul-Azm, 1979). Elles acquièrent leurs caractéristiques définitives et principalement leur activité sécrétoire entre 16 et 18 ans (Aumüller, 1979). Chez l'adulte, après l'âge de quarante cinq ans, le système musculaire des vésicules séminales est réduit et des changements régressifs surviennent.

2. Les protéines androgéno-dépendantes spécifiques des vésicules séminales

Dans les vésicules séminales, glandes annexes du tractus génital, l'épithélium synthétise et sécrète un grand nombre de protéines androgéno-dépendantes qui ont été mises en évidence chez différentes espèces de mammifères, dont l'homme. Les fonctions de ces protéines ne sont pas bien connues pour la majorité d'entre elles. Cependant, certaines jouent un rôle clé dans la maturation des spermatozoïdes (Turner *et al.*, 1979 ; Normand *et al.*, 1991). C'est le cas de :

- la séménogéline qui est impliquée dans la constitution de la masse gélatineuse enveloppant les spermatozoïdes éjaculés (Lilja *et al.*, 1989),
- de la caltrine qui inhibe la pénétration du calcium dans les spermatozoïdes probablement en se liant aux transporteurs de calcium localisés dans la membrane plasmique de l'acrosome et du flagelle (San Augustin et Lardy, 1990),
- d'autres protéines se lient aux spermatozoïdes et peuvent affecter leur mobilité (Weil, 1965 ; Rufo *et al.*, 1982 ; De Lamirande et Gagnon, 1984 ; Foresta *et al.*, 1986 ; Scheit *et al.*, 1988).

L'étude des protéines des vésicules séminales a attiré un intérêt croissant ces dernières années et une classification, basée sur leurs fonctions a été établie.

On y retrouve :

- des protéines structurales impliquées dans la constitution protéique du coagulum séminal : la séménogéline (Lilja, 1990 ; Lilja *et al.*, 1989 ; De Lamirande *et al.*, 2001 ; Whang et Zhang, 2007) et la fibronectine (Lilja *et al.*, 1987)
- des protéines de transport et des protéines plasmatiques analogues : la transferrine, la lactoferrine (Tauber *et al.*, 1975).
- des protéines modulant le sperme (l'inhibiteur de la mobilité du plasma séminal (SPMI), De Lamirande et Gagnon, 1984).
- des protéines immuno-modulantes (Scaferrine) (Herr *et al.*, 1986 ; 1989)
- des enzymes (anhydrase carbonique, 5'-nucléotidase) (Kaunisto *et al.*, 1990) et la N acétylglucosaminidase.
- des inhibiteurs d'enzymes : inhibiteur de la protéine C (PCI) (Laurell *et al.*, 1992) et inhibiteur de la trypsine (Min-Long *et al.*, 1991).

2.1. Chez les rongeurs

L'expression d'un petit nombre de gènes spécifiques du tractus génital mâle a fait l'objet de travaux de plusieurs équipes de recherche. Ces travaux ont porté essentiellement sur les mécanismes d'action des androgènes sur les tissus cibles adultes et ont montré, que ces hormones agissaient en contrôlant l'expression de ces gènes spécifiques (Taragnat, 1988 ; Normand, 1991).

Parmi les produits protéiques des gènes régulés par les androgènes, des protéines androgéno-dépendantes spécifiques de la vésicule séminale ont suscité un intérêt particulier et ont été étudiées chez plusieurs espèces, tout d'abord, le cobaye (Veneziale, 1977 ; Moore *et al.*, 1984), la souris (Normand, 1989) et le rat (Higgins *et al.*, 1976).

Chez **la souris**, plusieurs protéines androgéno-dépendantes **majeures** ont été décrites, sept d'entre elles sont désignées comme chez le rat, par SVSI, SVS II jusqu'à SVS VII (seminal vesicle secretory) par ordre de PM décroissant (Luo *et al.*, 2001) et MSVSP99 (Mouse seminal vesicle secretory protein of 99 amino acids) (Morel *et al.*, 2001). Parmi ces protéines, certaines présentent des particularités et des caractéristiques spécifiques :

- SVSII est une protéine basique de 40 kDa, qui constitue un composant structural du bouchon vaginal et un facteur de décapacitation des spermatozoïdes (Kawano et Yoshida, 2007). Elle joue un rôle dans la motilité des spermatozoïdes, mais n'a aucun effet sur la capacitation (Luo *et al.*, 2001 ; Lundwall *et al.*, 2003).
- MSVSP99 est une protéine de 14 kDa sécrétée par les cellules épithéliales et spécifique de la vésicule séminale ; cette protéine est caractérisée par un pHi compris entre 5.23 et 5.7 (Morel *et al.*, 2001).

Parmi les protéines ayant une action stimulatrice sur la fertilité de la souris, une protéine de 39 kDa appelée « CEACAM10 » a été identifiée récemment dans les sécrétions des vésicules séminales. Cette protéine est abondamment exprimée chez la souris adulte, suggérant un rôle dans la reproduction. Des expériences *in vitro* ont permis de localiser « CEACAM10 » sur toute la surface des spermatozoïdes et ont montré qu'elle avait la capacité d'augmenter leur motilité (Li *et al.*, 2005).

D'autres protéines ne sont pas représentées majoritairement chez la souris, mais jouent un rôle déterminant dans la fertilité. Il s'agit essentiellement de la caltrine-like trypsine inhibiteur P12, qui agit comme inhibiteur du transport du calcium (Ca^{2+}) par les spermatozoïdes (Chen *et al.*, 1998), de la SVA (seminal vesicle autoantigen), protéine de 19 kDa synthétisée par l'épithélium des vésicules séminales, qui inhibe la motilité des spermatozoïdes (Huang *et al.*, 1999). Elle agit également comme facteur de décapacitation des spermatozoïdes (Huang *et al.*, 2000 ; 2005 ; 2007).

Il faut souligner également, que parmi les protéines issues des sécrétions des vésicules séminales, quelques unes, pourraient être impliquées dans l'immunité de la reproduction. En effet, Daimon et Wada (2005) ont montré par des expériences réalisées *in vitro*, que les sécrétions des vésicules séminales sont à l'origine, de l'attraction des polynucléaires neutrophiles (PN) au niveau de l'utérus. Les PN agissent en libérant la MMP-9, métalloprotéinase indispensable par son action sur les premiers stades de l'implantation.

Parmi les protéines identifiées **chez le rat**, deux sont des produits majeurs de sécrétion : S et F (Higgins *et al.*, 1976) ou SVS IV et SVS V (Ostrowski *et al.*, 1979) et font partie des protéines structurales du bouchon vaginal (Mac Donald *et al.*, 1984 ; Williams *et al.*, 1985 ; Fawell *et al.*, 1986).

Manco et Abrescia (1988) ont montré que SVS IV se fixait sur les spermatozoïdes lors de l'éjaculation.

SVSIV et SVSV représentent environ 30% des protéines totales des vésicules séminales, elles ont un PM respectif de 18 kDa et 17 kDa, un pHi de 9.7 et sont glycosylées. Les constituants glucidiques sont essentiellement le N-acétylglucosamine, le mannose et le galactose (Higgins *et al.*, 1976) ; leur synthèse est régulée par les androgènes. Dans les sécrétions, ces protéines sont présentes dans les rapports 2 SVS IV pour 1 SVS V. Elles sont spécifiques des vésicules séminales, puisqu'elles ne sont détectées dans aucun autre organe (Higgins *et al.*, 1976). Elles présentent sur le plan structural des homologies, qui ne sont toutefois pas suffisantes pour leur conférer une fonction similaire (Mac Donald *et al.*, 1984).

En plus de ces deux protéines de la vésicule séminale, quatre autres protéines (SVSI, SVSII, SVSIII et SVSIV) de PM respectifs de (100 kDa, 50 kDa, 37 kDa et 16 kDa) sont connues chez le rat (Aumüller et Seitz, 1986 ; Schiffman *et al.*, 1988) ; SVSII comme SVSIV et SVSV sont également des protéines constitutives du bouchon vaginal (Fawell *et al.*, 1986 ; Wagner et Kistler, 1987 ; Harris *et al.*, 1990).

Dans le cas des rongeurs déserticoles, des protéines exprimées en période de reproduction et réprimées en période de repos ont été décrites chez le Mériion de Libye (*Meriones Libycus*), il s'agit essentiellement des composés de PM apparent de 12 ; 17 ; 21 ; 24 ; 34 et 78 kDa, parmi lesquels 4 sont majoritaires (12 ; 17 ; 21 et 78 kDa) (Gernigon, 1992 ; Mataoui, 1999).

Chez le **rat des sables**, la sensibilité de la vésicule séminale aux androgènes s'est traduite par les variations saisonnières observées pour la protéine majeure de 21 kDa, mise en évidence dans la vésicule séminale, directement liées à la testostéronémie. En effet, la vésicule séminale qui ne reçoit les androgènes que par la voie sanguine est très sensible aux variations de la testostéronémie.

La réponse des vésicules séminales à la testostérone est plus rapide que celle du testicule où l'azoospermie n'apparaît qu'à la fin du printemps (Gernigon, 1992).

2.2. Chez l'homme

Chez l'homme les protéines d'origine vésiculaire connues sont la lactoferrine (76-80 kDa), l'albumine (67 kDa), une antitrypsine (45kDa), une protéine spécifique du sperme et le lysozyme (14.5 kDa) qui est d'origine vésiculaire et prostatique (Balerna *et al.*, 1985).

La majorité des protéines androgéno-dépendantes décrites au niveau des vésicules séminales, sont issues des sécrétions et se retrouvent essentiellement dans le plasma séminal, dont la composition est très hétérogène.

Parmi ces protéines, certaines se fixent sur la membrane des spermatozoïdes : la lactoferrine ou scafferin et la seminal plasma n°7 antigen ou ferrisplan, d'autres se retrouvent au niveau des cellules épithéliales des vésicules séminales, telle que la placental protein 5 ou PP5 et la SVSA : specific seminal vesicle antigen ou au niveau des cellules bordant la paroi des capillaires sanguins (Herr *et al.*, 1989 ; 1986).

2.2.1. Protéines androgéno-dépendantes du plasma séminal

Parmi les protéines structurales impliquées dans la constitution protéique du coagulum séminal, la séménogéline et la fibronectine issues des vésicules séminales constituent les protéines essentielles du coagulum.

La séménogéline a été identifiée comme étant la protéine majeure des sécrétions des vésicules séminales humaines Lilja (1990). Elle est produite en grande quantité par les cellules épithéliales des vésicules séminales et est responsable de la coagulation du plasma séminal chez l'homme comme chez la souris (Yoshida *et al.*, 2008). En électrophorèse monodimensionnelle, elle est identifiée comme une protéine majeure de 52 kDa (Lilja et Laurell, 1985).

Sa structure primaire a été déterminée à partir de la séquence nucléotidique du cDNA codant pour son précurseur (Lilja *et al.*, 1989).

C'est une protéine constituée de 439 acides aminés au stade mature ; elle comporte 46 résidus avec une séquence signal de 23 acides aminés. Sa séquence peptidique est caractérisée par une

haute teneur en glycine (13.7%) et en histidine (7%) et par l'absence de méthionine. On relève également la présence de séquences d'acides aminés répétitifs, dont une cystéine en position 216, qui est responsable de la formation d'homodimères.

La séménogéline est caractérisée par la présence d'épitopes, qui peuvent réagir avec d'autres présents au niveau des spermatozoïdes humains. Ce qui suggère une participation de ces épitopes dans la régulation de la mobilité des spermatozoïdes (Lilja, 1990).

Par ailleurs, Shivaji et ses collaborateurs (1990) ont montré que le contenu en acides aminés du plasma séminal augmentait considérablement après l'éjaculation. Cette augmentation pourrait être le résultat d'une dégradation protéolytique des protéines sécrétées par les vésicules séminales par des protéases d'origine prostatique.

En effet, la séménogéline, protéine sécrétée en grande quantité par les cellules épithéliales de la vésicule séminale, subit une dégradation protéolytique par les protéases d'origine prostatique (Yoshida *et al.*, 2008). Parmi les peptides issus de la dégradation par la PSA (Prostate Specific Antigen), certains d'entre eux, jouent un rôle essentiel dans la régulation de la capacitation des spermatozoïdes. Ces peptides agissent sur les spermatozoïdes en inhibant leur capacitation prématurée (De Lamirande *et al.*, 2001 ; Jonsson *et al.*, 2006 ; De Lamirande, 2007 ; Yoshida *et al.*, 2008).

La SVSA, protéine majeure de PM de 69 kDa spécifique des vésicules séminales présente au niveau de l'épithélium avant l'éjaculation, subit une dégradation par la PSA, aboutissant à un peptide de 32 kDa qui serait impliqué dans la fertilité (Herr *et al.*, 1986 ; Mc Gee et Herr, 1987 ; 1988).

Les fibronectines sont issues des sécrétions des vésicules séminales et sont retrouvées à une concentration de 1 mg/ml dans le plasma séminal. Ce sont des glycoprotéines qui se présentent sous deux formes : une forme soluble (LCR, plasma séminal) et une forme tissulaire insoluble qui joue un rôle dans l'adhésion cellulaire. Elles sont constituées de deux sous unités similaires de poids moléculaire de 225 et 250 kDa reliées par des ponts disulfures. La fibronectine est incorporée dans le coagulum constitué de séménogéline et libérée par la suite, après liquéfaction, sous l'action des kallikréines 2 et 3 (hK2 ; hK3) (Lilja *et al.*, 1987).

Les inhibiteurs d'enzymes

- L'inhibiteur de la protéine C (PCI)

L'inhibiteur de la protéine C (PCI), a été découvert en premier lieu dans le sang puis dans l'urine. Sa concentration dans ces fluides est faible et est respectivement de 5.3 µg/ml et 0.1 µg/ml (Laurell *et al.*, 1992).

Espana et ses collaborateurs (1997) démontraient que la source principale de l'inhibiteur de la protéine C était le plasma séminal et que sa concentration est de 220 µg/ml.

La PCI est produite par plusieurs glandes sexuelles annexes, mais les vésicules séminales, constituent l'origine sécrétoire majeure de cette protéine.

Du point de vue structural et fonctionnel, la PCI est une glycoprotéine composée d'une chaîne unique de 57 kDa possédant une activité inhibitrice vis-à-vis des protéases à sérine.

Dans le plasma séminal liquéfié, la PCI est dépourvue d'activité inhibitrice, ceci en raison de sa présence sous deux formes : une forme complexée de haut poids moléculaire et une forme clivée de faible poids moléculaire.

- Protéines immuno-modulantes (Scaferrine)

D'autres protéines des vésicules séminales, se retrouvent fixées à la membrane des spermatozoïdes, il s'agit de la lactoferrine ou scafferin et de la « seminal plasma n°7 antigen » ou ferrisplan, de PM respectifs de 80 kDa et de 15 kDa, protéines retrouvées également dans le lait. Toutes ces protéines sont caractérisées par leurs propriétés antigéniques, à l'exception de la PP5 (placental protein 5), protéine de PM de 36 kDa et de la prolactine de PM de 22 kDa (Herr *et al.*, 1989).

2.2.2. Autres composants du liquide séminal

La composition du liquide séminal est très hétérogène. Outre les protéines, d'autres **composants organiques** sont présents.

Les prostaglandines, dont le rôle reste encore peu connu, constituent le composant du plasma séminal, présent en proportion très élevée. Elles sont néanmoins soupçonnées d'être impliquées dans la mobilité spermatique (Gerozissis *et al.*, 1982).

Des peptides qui semblent dériver de l'épididyme, de la prostate et des vésicules séminales (Mann et Lutwak, 1981).

Parmi les molécules organiques, les sucres constituent des composants essentiels du liquide séminal et principalement :

- **Le fructose** qui est le sucre réducteur principal du plasma séminal. Son implication se situerait au niveau de la coagulation du plasma séminal (Montagnon *et al.*, 1990).
- **Le glucose** formé servirait comme agent énergétique aux spermatozoïdes.
- Le plasma séminal contient aussi une certaine quantité de phospholipides dont la production proviendrait des vésicules séminales.
- On y retrouve également du **glutathion** en faible quantité dont le rôle serait de protéger les spermatozoïdes contre les spermicides intermédiaires provenant de la dégradation de polyamines.
- Le liquide séminal comporte aussi une assez forte concentration de bêta-endorphine dont l'influence se situerait au niveau de la mobilité spermatique.

Une partie du liquide séminal est issue des glandes prostatiques, puisque **chez l'homme**, cette sécrétion constitue 13 à 33% du volume de l'éjaculat et contribue à la motilité des spermatozoïdes, qui dans certains cas peut être perturbée par une acidité du milieu, principalement celle des sécrétions vaginales. Cette acidité est cependant neutralisée par l'alcalinité du liquide séminal, qui favorise ainsi une motilité maximale des spermatozoïdes.

3. Expression des protéines androgéno-dépendantes des vésicules séminales au cours du développement

Pour la majorité des protéines androgéno-dépendantes identifiées dans les tissus reproducteurs adultes, les études de leur expression ont été réalisées afin de voir si leur apparition au cours du développement coïncidait avec l'élévation pubertaire des androgènes (Normand, 1991).

3.1. Chez les rongeurs

3.1.1. Le rat

L'expression des protéines majeures mises en évidence dans la vésicule séminale **du rat**, a été étudiée pour SVS IV et SVS V. Ces deux composés majeurs sont détectables chez des animaux âgés de 5 jours (Kistler *et al.*, 1981) et de 10 à 15 jours, selon Fawell *et al.* (1986).

L'accumulation massive de ces protéines, n'intervient toutefois, qu'après la 4^{ème} semaine de la vie post-natale. Cette accumulation serait due à la prolifération des cellules épithéliales plutôt qu'à une augmentation de leur activité intrinsèque de synthèse. Chez des animaux âgés de 60 jours, la synthèse de SVS IV, mesurée par l'incorporation d'acides aminés radioactifs est 20 fois supérieure à celle d'animaux âgés de 20 jours (Kistler *et al.*, 1981).

L'ARN messenger de SVS IV, est cependant retrouvé en quantité importante chez des animaux immatures, bien avant l'accumulation de la protéine. Au cours du développement, la concentration du messenger est multipliée par 4, alors que celle de la protéine est multipliée par 25, ce qui semble montrer l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle pour SVS IV (Kistler *et al.*, 1981). Les mécanismes par lesquels, la testostérone régule l'expression des gènes de ces protéines fut démontrée par la suite (Brochard *et al.*, 1997 ; 1999 ; Simon *et al.*, 1997).

3.1.2. La souris

la protéine majeure androgéno-dépendante de 14 kDa spécifique de la vésicule séminale MSVSP99, n'est détectable qu'à partir de 27 jours, alors que son gène est actif chez des animaux âgés de 10 jours, (Morel *et al.*, 2001). La détermination de sa séquence peptidique a montré qu'elle présente de fortes homologues avec certaines protéines de la vésicule séminale du rat, notamment avec SVS (Guilbaud *et al.*, 1993 ; Simon *et al.*, 1995).

3.2. Chez l'homme

Pendant la vie embryonnaire, les vésicules séminales apparaissent chez l'embryon de 58 mm de longueur ; elles dérivent du canal déférent à partir du canal de Wolff. Leur développement est sous le contrôle de la testostérone et s'effectue très lentement jusqu'à la puberté.

3.3. Conclusion

L'implication des protéines spécifiques du tractus génital mâle dans l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes a suscité l'intérêt de plusieurs groupes de recherche.

Cependant, la majorité des études a porté essentiellement sur les protéines épидидymaires et a montré que les effets des androgènes sur la synthèse de ces protéines sont peu importants par rapport aux effets observés sur les vésicules séminales et sur la prostate (Normand, 1991).

Le rôle direct des protéines épидидymaires dans la fécondation, n'a pu être démontré que pour quelques protéines, telle que, EP1-EP6 (Epididymal protein 1-6), protéine sécrétée chez le hamster favorisant la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide (Gonzalez-Echeverria *et al.*, 1984). Les protéines B et C spécifiques de l'épididyme, s'incorporent à la membrane des spermatozoïdes au cours de leur transit épидидymaire et joueraient un rôle dans leur maturation post-testiculaire (Brooks et Tiver, 1983). Elles pourraient contribuer également

aux phénomènes de reconnaissance de surface espèce spécifique entre spermatozoïdes et ovules (Cuaniscu *et al.*, 1984).

4. Caractérisation et identification des protéines

Au cours de ces dernières années, la caractérisation et l'identification des protéines ont suscité le développement simultané de techniques séparatives et d'analyse plus résolutes, telles que l'électrophorèse bidimensionnelle et la spectrométrie de masse.

La combinaison de ces deux méthodes de séparation et d'analyse a donné naissance à la **protéomique**.

En plus des différents appareillages mis au point pour l'analyse protéomique, cette approche a considérablement été dotée par tous les programmes de séquençage de génomes ainsi que des outils et moteurs de recherche bioinformatique, permettant la caractérisation et l'identification du protéome des eucaryotes.

4.1. Définition

Le protéome caractérise donc l'ensemble des protéines constituant un organisme vivant dans sa globalité, un tissu, une cellule ou un compartiment cellulaire (ex: les protéines nucléaires, les protéines mitochondriales, les protéines membranaires) (Kenyon *et al.*, 2002).

La protéomique s'intéresse à l'étude du protéome, le terme protéome ayant été proposé pour la première fois en 1995 pour désigner « l'ensemble des produits fonctionnels exprimés par un génome » (Kahn, 1995).

Rapidement, avec l'avancée des techniques dans ce domaine, cette définition a évolué. C'est ainsi que Anderson et Anderson (1998) introduisent le terme « proteomics » et définissent l'analyse protéomique par « l'utilisation de la quantification au niveau de la protéine comme mesure objective de l'expression génique, caractérisant un processus biologique donné et comme un moyen de décodage des mécanismes contrôlant cette expression ».

4.2. Objectifs

Le premier point d'étude de la protéomique est l'identification exhaustive des protéines exprimées par un organisme (Malmstrom *et al.*, 2004 ; Mc Gregor et Dunn, 2006).

Le décryptage de nombreux génomes, aussi bien bactériens, végétaux que mammifères, en particulier, le génome humain annoncé dans les années 2000 a grandement facilité l'émergence du protéome au cours de ces dernières années (Venter, 2001).

Il faut néanmoins souligner que le séquençage de ces différents génomes ne permet pas de connaître les protéines exprimées dans une cellule à un instant donné de sa vie. De plus, le faible nombre de gènes eucaryotes (environ 30000 pour l'homme), et qui reste constant durant toutes les étapes de la vie de la cellule, laisse penser que la complexité des différents organismes est induite par une variation de l'expression des protéines.

Ainsi, l'approche protéomique vise à établir l'identité, la quantité et la fonction de ces protéines, et à en déterminer l'expression en fonction des conditions environnementales (Patterson et Aebersold, 2003).

L'importance prise récemment par l'analyse protéomique s'explique par :

- Les niveaux d'expression protéiques ne sont pas le simple reflet des niveaux d'expression des ARN messagers. En effet, des études ont montré, que pour une population de gènes considérée comme relativement homogène en terme

d'expression des ARN messagers et de demi-vie des protéines codées, des variations significatives du niveau d'expression des protéines peuvent être observées (Anderson et Seilhamer, 1997 ; Gygi *et al.*, 1999).

- Les protéines peuvent subir une série de modifications qui ne sont pas forcément identifiables à partir de la seule séquence de leurs gènes. Beaucoup de ces molécules ne parviennent à leur forme biologiquement active qu'à la suite d'une étape de maturation post-traductionnelle comme, par exemple, la glycosylation ou la phosphorylation.
- L'analyse protéomique est dynamique. En effet, un même génome peut conduire à différents protéomes, selon les étapes du cycle cellulaire ou de la différenciation, de la réponse à des signaux biologiques ou physiques, de l'état physiopathologique. Lottspeich illustre parfaitement ces phénomènes en rapprochant les images d'une chenille d'un papillon (Lottspeich, 1999).

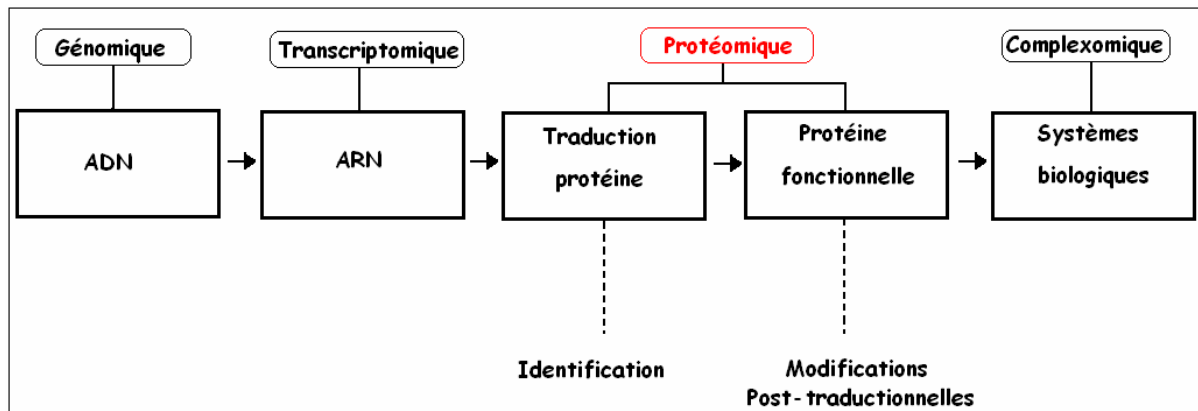


Figure 2a. Schéma représentant les différentes étapes de la protéomique. D'après Patterson et Aebersold (2003).

L'approche protéomique passe par de nombreuses étapes (Fig. 2a) :

1. Approche protéomique descriptive : obtenir un catalogue
2. Approche protéomique différentielle et quantification
3. Recherche de modifications post-traductionnelles
4. Protéomique clinique et recherche de biomarqueurs
5. La complexomique : étude de la machinerie cellulaire

4.3. Stratégie de l'analyse protéomique (Fig. 2b)

L'analyse protéomique se propose de donner une image globale de ces systèmes biologiques et de leur complexité. Mais ce développement n'aurait pas été possible sans les avancées technologiques qui permettent l'étude du protéome telles que :

- le séquençage de génomes complets qui alimentent les banques de données,
- l'évolution des techniques de séparation des protéines et de préparation de l'échantillon avec les gels d'électrophorèse (1D et 2D),
- l'apparition de systèmes de micro et nano chromatographie liquide et leur couplage à la spectrométrie de masse.

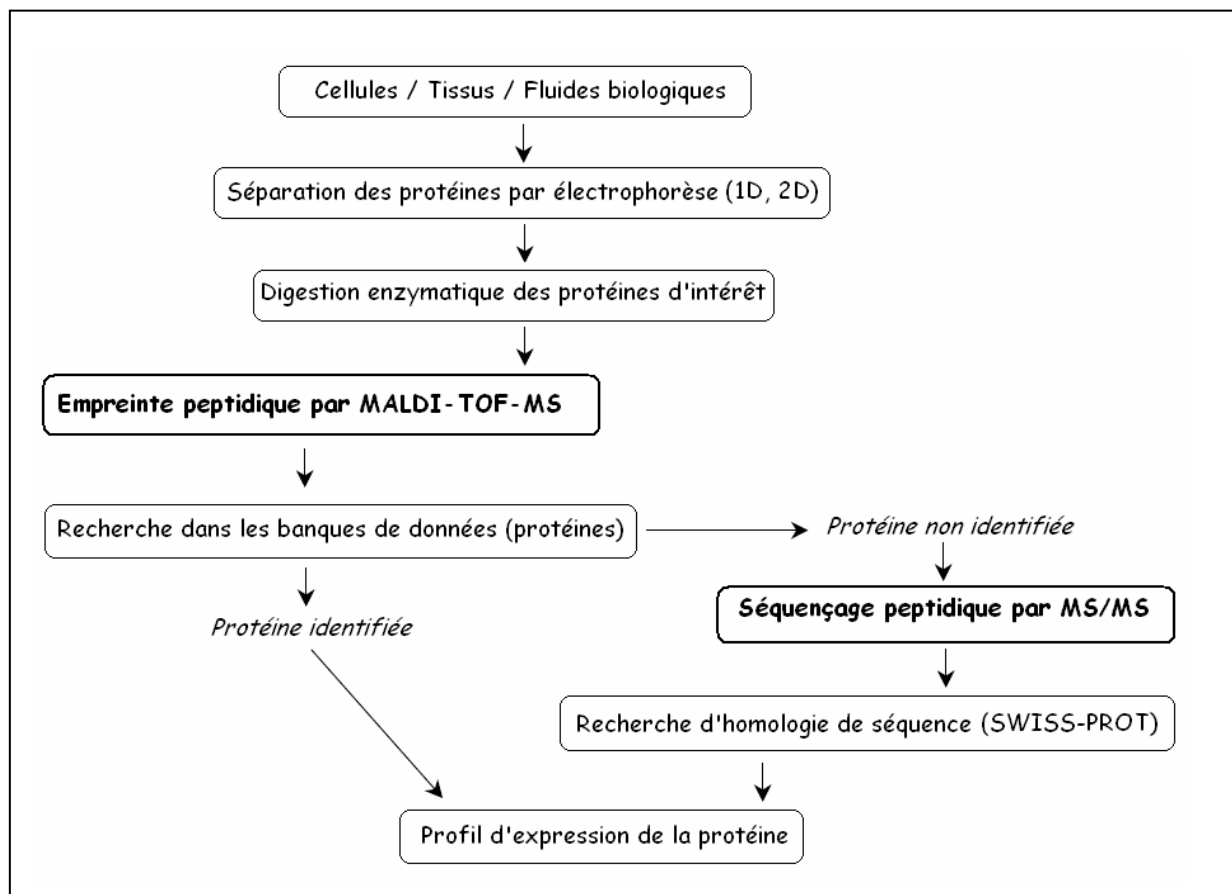


Figure 2b. Stratégie générale de l'analyse protéomique. (Tonella *et al.*, 2001)

D'une manière générale, cette approche consiste à séparer un mélange protéique complexe sur un gel d'électrophorèse, à digérer les protéines et les analyser par spectrométrie de masse (figure 2b) (Tonella *et al.* 2001).

L'application d'une telle technologie de séparation des protéines, couplée à la spectrométrie de masse a permis à un grand nombre de groupes de se lancer dans l'analyse systématique afin de réaliser des cartes protéiques de gel 2D et la mise en place de bases de données construites autour des gels 2D (Toda *et al.*, 1998 ; Mollenkopf *et al.*, 1999).

4.4. Recherche de modifications post-traductionnelles

Un troisième point très important pour l'étude protéomique par spectrométrie de masse est la recherche des modifications post-traductionnelles portées par les protéines d'intérêt. En effet, le faible nombre de gènes eucaryotes laisse à penser que la complexité des organismes va résulter entre autre de la maturation et des modifications post-traductionnelles des protéines.

Ces modifications post traductionnelles regroupent les modifications chimiques covalentes ainsi que la perte d'acides aminés sous l'action d'exopeptidases (Biemann, 1990). La spectrométrie de masse est aujourd'hui l'outil de choix pour répondre aux questions des modifications post-traductionnelles portées par les protéines.

Elle peut en effet identifier le type de modification (phosphorylation, glycosylation, oxydation...), déterminer son emplacement sur la séquence des protéines, voir sa structure (Mann et Jensen, 2003 ; Heintz *et al.*, 2004).

Dans le cadre de notre travail nous avons adopté ces méthodes d'étude pour caractériser et identifier la protéine androgénodépendante majeure de poids moléculaire apparent de 21 kDa mise en évidence dans les vésicules séminales du rat des sables *Psammomys obesus* en période de reproduction.

1. Animaux et échantillons

1.1. Animaux

Les expériences sont réalisées sur le rat des sables mâle adulte (*Psammomys obesus*) (Cretzschmar, 1828) provenant de deux régions d'Algérie Béni Abbès et M'sila (Tableau I).

Tableau I. Caractéristiques des localités de capture.

Lieu de capture	Coordonnées	Etage bioclimatique
Béni Abbès	30° 07' N, 2° 10' W	Aride
M'sila	35° 00' N, 4° 00' E	Semi aride

C'est un rongeur déserticole à activité diurne de la famille des Muridés et de la sous famille des Gerbillidés. Il a une espérance de vie de 3 ans et se nourrit exclusivement de plantes halophiles, riches en eau et en sels minéraux appartenant à la famille des Chénopodiacées : *Traganum nudatum*, *Suaeda mollis* et *Salsola foetida* (Daly, 1973).

Les animaux utilisés pour nos expérimentations sont capturés dans leur biotope naturel dans deux régions d'Algérie : Béni Abbès (zone aride) et M'sila (zone semi aride).

La collecte des animaux s'est effectuée de Mai 2000 à Janvier 2008 (Annexe I), généralement pendant la période de reproduction qui se situe entre le début de l'automne et la fin du printemps (septembre – mai). Les animaux sont capturés au lever du jour dans des pièges placés à proximité des terriers avant la première sortie de l'animal.

Les mâles adultes sont retenus, les femelles et les animaux immatures sont relâchés.

Ils sont ensuite acheminés au laboratoire pour effectuer les prélèvements des échantillons (sang ; organes du tractus génital : vésicules séminales, épидидymes et canaux déférents). Pendant leur court séjour au laboratoire, les animaux sont placés dans des cages à 25°C et nourris de feuilles fraîches de Chénopodiacées rapportées du biotope. La ration alimentaire est calculée sur la base du poids et du sexe des animaux. Pour les mâles un apport de 61% du poids de l'animal / 24 heures est recommandé (Petter, 1961).

1.2. Prélèvement des échantillons

Tous les animaux sont sacrifiés après anesthésie avec de l'uréthane à 20% à raison de (0,4 ml/100 g de poids corporel). Les organes du tractus génital (vésicules séminales, épидидymes proximaux et distaux et canaux déférents) sont rapidement débarrassés de leur tissu adipeux, pesés et conservés à sec à -80°C pour l'analyse des protéines ou l'extraction des ARN ou dans les solutions de fixation pour l'immunohistochimie.

1.3. Extraction des protéines

Les protéines solubles destinées à être ultérieurement analysées par électrophorèse sont extraites des vésicules séminales conservées à -80°C .

Pour faciliter l'extraction des protéines, **les tissus** des vésicules séminales, des épидидymes et des canaux déférents sont placés séparément dans de l'azote liquide, puis broyés pendant 30 secondes dans un homogénéiseur (Braun, Melsungen RFA). Le broyat récupéré est additionné de tampon A (Annexe II), puis centrifugé à $+4^{\circ}\text{C}$ à 12 000 g pendant 10 minutes ; les surnageants sont récupérés et conservés à -20°C , jusqu'à leur utilisation.

Pour **les sécrétions**, les vésicules séminales sont ligaturées et prélevées seules après élimination des glandes coagulantes. Les sécrétions sont récupérées par une légère pression sur la vésicule séminale et sont diluées dans 800 μl de tampon A.

Après centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C , le surnageant est récupéré, puis conservé à -20°C pour l'analyse électrophorétique.

1.4. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par le test BIORAD qui est dérivé du test de Bradford (1976). Il est basé sur le changement d'absorbance maximale de 465 nm à 595 nm d'une solution acide de bleu de Coomassie brillant G250 lors de sa fixation aux protéines.

Le bleu de Coomassie se fixe de façon très sélective sur les protéines et particulièrement au niveau des acides aminés basiques tel que l'arginine.

Le dosage se fait dans des plaques de microtitration (Dynatech M29A), la lecture est réalisée dans un spectrophotomètre (Dynatech MR5000).

1.5. Concentration des protéines (Lyophilisation et Centricon)

Pour la séparation des protéines par électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE ou par isoélectrofocalisation, des concentrations protéiques respectives de 100 μg , 60 μg et 75 μg sont préparées dans un volume final de 50 μl sont nécessaires.

Afin de remédier au problème de la faible concentration protéique de certains échantillons, une étape de lyophilisation suivie d'une dialyse est réalisée.

Pour d'autres extraits protéiques, l'alternative intéressante utilisée a été l'emploi de tubes de concentration de type Centricon (Amicon Corporation, Scientific Systems Division, Denver, Maryland, USA).

L'utilisation de ces tubes permet non seulement une concentration importante des protéines mais aussi l'élimination d'une grande proportion des sels présents dans les extraits protéiques, sels qui peuvent interférer dans les différentes expérimentations qui suivent.

Tenant compte du poids moléculaire de notre protéine d'intérêt (21 kDa), des centricons dont le poids moléculaire d'exclusion est de 10 kDa, sont utilisés.

2. Analyse des protéines

Les protéines sont séparées par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes, selon la méthode de Laemmli (1970). Elles sont séparées sur un gel de polyacrylamide en présence d'un détergent, le SDS, qui, en solubilisant les protéines se fixe sur elles, masque leur charge native et leur confère une charge négative identique. Sous l'action d'un champ électrique, la migration s'effectue alors uniquement en fonction de leur

poids moléculaire (PM) que l'on peut déterminer par comparaison avec des protéines standard de PM connus :

- ✓ phosphorylase b (94 kDa),
- ✓ albumine (67 kDa),
- ✓ ovalbumine (43 kDa),
- ✓ anhydrase carbonique (30 kDa),
- ✓ inhibiteur de la trypsine (20,5 kDa)
- ✓ lactalbumine (14,4 kDa).

2.1. Séparation des protéines

Pour la séparation des protéines, deux techniques électrophorétiques sont utilisées : l'électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) pour l'isolement de protéines d'intérêt et l'électrophorèse bidimensionnelle (O'Farrell, 1975) pour la caractérisation et l'identification.

2.1.1. Electrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

2.1.1.1. Préparation des gels

Pour une meilleure résolution électrophorétique, nous avons utilisé 2 types de gels :

- un gel de séparation à 12,5% d'acrylamide-bisacrylamide pour les protéines solubles de l'épididyme et des canaux déférents.
- un gel à 15% d'acrylamide-bisacrylamide pour les protéines solubles des vésicules séminales, afin d'obtenir une meilleure séparation pour les protéines de faible PM.

Tableau II. Composition des gels de concentration et de séparation.

COMPOSANTS	GELS		Gradient 10 – 20%	
	Gel 4,5%	Gel 15%	Gel 10%	Gel 20%
Tampon de concentration	7.5 ml	-	-	-
Tampon de séparation	-	18 ml	27 ml	7 ml
Acrylamide 30%	-	45 ml	30 ml	60 ml
Bis-acrylamide 1%	-	11 ml	7.5 ml	15 ml
Acrylamide-Bis-acrylamide 30,8%	4.5 ml	-	-	-
H ₂ O	18 ml	16 ml	25.5 ml	3 ml
Saccharose	-	-	-	12 g
Persulfate d'ammonium 10%	90 µl	520 µl	200 µl	
TEMED	30 µl	30 µl	20 µl	

Les volumes sont calculés pour :

- Gel à 4.5% et à 15% (2 plaques)
- Gradient 10-20% (5 plaques)

Tableau III. Compositions des tampons de gels.

	Tampon de concentration	Tampon de séparation
SDS	0.4%	0.4%
Tris-HCl	0.5M	1.5M
pH	6.8	8.8

Le gel supérieur ou gel de concentration est à 4.5 % d'acrylamide-bisacrylamide (tableau II). Il est coulé sur 2 cm de hauteur au dessus du gel de séparation. Les puits sont réalisés avec un peigne de 1,5 mm d'épaisseur, muni de 10 dents de 1 cm de largeur.

2.1.1.2. Traitement des échantillons

Les protéines solubles des différents organes et les protéines étalons, reprises dans du tampon A, sont dénaturées pendant 5 minutes à 90 °C, après addition d'un quart de volume de tampon de charge (annexe III).

2.1.1.3. Dépôt et migration

Les échantillons contenant 60 µg de protéines (canaux déférents, épидидymes), 100 µg de protéines (vésicules séminales) ou 30 000 dpm dans le cas des protéines radioactives, sont déposés dans un volume final de 50 µl, à l'aide d'une seringue Hamilton, dans les puits formés dans le gel de concentration.

La migration se déroule à 4 °C, dans une cuve Biorad modèle 220, en présence de tampon glycine (annexe III).

L'intensité du courant appliqué est de 25 mA/plaque. La migration dure toute la nuit ; elle est arrêtée 15 minutes après que le front de migration coloré par le bleu de bromophénol ait atteint le bas du gel.

2.1.1.4. Coloration et décoloration

Une fois la migration terminée, les gels sont démoulés puis placés dans une solution de coloration pendant 45 minutes sous agitation douce.

La décoloration se fait dans plusieurs bains successifs de décolorant ; les gels sont par la suite soit séchés pour être conservés, soit gardés à 4 °C dans le tampon de décoloration ou dans le tampon de conservation (Annexe III).

2.1.1.5. Révélation

Pour l'analyse des profils électrophorétiques des protéines radioactives, les gels après coloration et décoloration sont séchés sur du papier Whatman 3 MM, puis exposés sur des films Kodak X Omat S pendant 12 jours à -80 °C, dans des cassettes équipées d'écrans

amplificateurs. Les films sont par la suite traités avec le révélateur Kodak LX24 puis le fixateur Kodak AL4.

2.1.2. Analyse densitométrique

Les gels sont scannés à l'aide d'un scanner « Olivetti Studiojet 300 » à haute résolution 2400 dpi. L'image ainsi numérisée est par la suite analysée à l'aide d'un logiciel « UTHSCSA Image Tool » qui permet la détermination des proportions relatives des bandes protéiques d'intérêt.

2.2. Caractérisation des protéines

2.2.1. Electrophorèse bidimensionnelle

C'est une méthode de séparation des protéines décrite par O'Farrell et ses collaborateurs en 1975. Elle s'appuie sur des propriétés physico-chimiques des protéines et met en œuvre successivement deux techniques (IEF, SDS-PAGE) selon des critères indépendants : le point isoélectrique puis la masse, ce qui lui confère un pouvoir de résolution très élevé.

2.2.1.1. Première dimension

La première dimension ou isoélectrofocalisation est une technique de séparation des protéines basée sur leur charge dans un milieu donné et plus précisément sur leur point isoélectrique ou P.I correspondant au pH pour lequel la charge électrique est nulle.

La séparation en fonction du P.I. nécessite l'utilisation de molécules amphotères : les ampholines. Ajoutées au tampon du gel et sous l'influence d'un courant électrique, elles se répartissent selon un gradient de pH (élevé à la cathode ; faible à l'anode). Les protéines déposées migrent jusqu'à la zone de pH des ampholines correspondant à leur propre P.I. A cet endroit précis, leur charge globale devient nulle et elles restent focalisées en ce point : elles peuvent ensuite être séparées en fonction de leur P.M.

L'échantillon protéique est mis en contact avec une bandelette de 7cm de longueur, comportant un gradient de pH (Immobiline dryStrip precast gel). Sous l'effet d'un champ électrique, les protéines vont progressivement se déplacer vers l'électrode de signe opposé à leur charge et migreront jusqu'au pH où leur charge s'annule : c'est le point isoélectrique ou pI. A ce stade, elles s'immobilisent.

Toutes les manipulations sont réalisées avec des gants, afin d'éviter toute contamination par les kératines ; l'utilisation exclusive de l'eau milli Q est recommandée, y compris pour le rinçage de la vaisselle. Les aliquotes de tampon de réhydratation (annexes IV) sont additionnés d'une solution de DTT à 10 mg/ml et du tampon IPG (annexes IV) à 10 µg/ml (avec la gamme de pH appropriée).

Les échantillons sont mis en contact avec le tampon de réhydratation à raison de 350 µl pour les bandelettes ou « strips » de 18 cm et 150 µl pour les bandelettes de 7 cm pendant 1 h sous agitation. Ils sont par la suite centrifugés à 16 000g/min, pendant 30 minutes à 20°C, puis déposés dans des portoirs appropriés. Les bandelettes sont déposées au contact des échantillons.

Après 10 min de contact, l'ensemble est placé dans l'appareil d'iso focalisation (IEF Protean Cell / Biorad) pendant 2 h à 20°C (réhydratation passive).

La réhydratation active et la focalisation se fait selon le programme suivant :

Tableau IV. Paramètres de migration de l'IEF

Etapes	Durée (en heures)	Tension appliquée (en volts)
1	11	50
2	01	250
3	01	1000
4	01	4000
5	02	200

Une fois la focalisation des protéines terminée, les bandelettes sont récupérées puis conditionnées dans des portoirs neufs, puis congelées à - 80 °C jusqu'à leur utilisation pour la 2^{ème} dimension.

Les paramètres de migration sont optimisés en fonction de l'échantillon (salinité, pI des protéines chargées, quantité), du mode de chargement et du gradient employé.

2.2.1.2. Seconde dimension

Une deuxième séparation orientée perpendiculairement à l'IEF est réalisée dans un gel réticulé constitué de polyacrylamide en présence d'un agent chimique dénaturant, le sodium dodécyl sulfate (SDS). La réticulation du gel permet de séparer les molécules suivant leur taille. Le SDS interagit avec les protéines, les dénature et élimine l'influence de leur charge pour la séparation selon la seconde dimension (en les « tapissant » de charges négatives). Dès lors, les protéines sont séparées en fonction de leur masse.

La seconde dimension est réalisée en deux étapes : une étape d'équilibration et une étape de migration.

✓ Equilibration

La dénaturation des protéines au cours de la seconde dimension, nécessite une étape d'équilibration, qui remplace la dénaturation selon Laemmli, car il est difficile de faire bouillir la bandelette de première dimension. Cette dénaturation est réalisée dans une solution d'urée 6 M, de glycérol 30%, de SDS 2% et de DTT 65 mM dans 50 mM de tris pH 8,8 pendant 10 minutes.

Pour l'analyse des protéines par spectrométrie de masse, il est possible de bloquer le groupement SH des cystéines par réaction de carbamidométhylation à l'iodoacétamide à 55 mM pendant 10 minutes (extemporanément dans la même solution d'équilibration, mais sans DTT) (annexe IV). Ainsi traitées, les bandelettes sont aussitôt placées sur les gels de 2^{ème} dimension.

✓ Migration

Les gels sont préparés et coulés selon le protocole décrit précédemment (SDS-PAGE) sans gel de concentration. Un espace de 5 à 10 mm au dessus du gel est réservé à l'emplacement de la bandelette. Une étiquette est insérée entre les plaques avant le coulage des gels (pour l'identification des échantillons).

Les bandelettes sorties du congélateur sont mises en contact du tampon d'équilibration (annexe IV) additionné de DTT (10 mg/ml) et d'iodoacétamide (25 mg/ml) pendant 15 minutes sous agitation. Elles sont ensuite rincées avec du tampon de migration (annexe III). Des marqueurs de PM connus sont déposés entre les 2 plaques sur un côté du gel. La bandelette est placée, puis enfoncée dans le gel ; 1 ml d'agarose à 0,7% est coulé pour la fixer et la stabiliser.

Du tampon de migration est ajouté de façon à recouvrir les plaques (du bleu de bromophénol à 0,1% est ajouté comme témoin de migration).

La migration est réalisée à 10°C dans une cuve réfrigérée sous une intensité de 25 mA/plaque. Elle est arrêtée quand le front du témoin sort du gel.

Après migration, les gels peuvent être soit: **colorés** afin d'obtenir une image des protéines séparées ou **transférés** sur membrane afin de rendre les protéines plus accessibles à d'autres molécules (Western-blots, South et North-western blots).

2.2.2. Coloration des gels (2^{ème} Dimension) au bleu de Coomassie colloïdal G250

L'eau bidistillée est utilisée nécessairement si les gels doivent servir à prélever des protéines pour l'analyse par spectrométrie de masse et/ou pour la coloration à l'argent. Les gels en fin de migration sont placés sous agitation lente pour tous les traitements suivants : ils sont brièvement rincés dans de l'eau bidistillée (2 à 3 minutes) avant d'être colorés. Ils sont tout d'abord fixés dans un mélange (H_3PO_4 2% - éthanol 30%) pendant 3 min 30 s , puis H_3PO_4 à 2% pendant 3 minutes et enfin dans un mélange (H_3PO_4 2% - éthanol 18% - $(NH_4)_2SO_2$ à 12%) pendant 30 minutes. La coloration des gels est réalisée à l'aide d'une solution de bleu de Coomassie G250 à 2 %, à raison de 5 ml par litre.

Pour une coloration à l'équilibre, les gels sont laissés 5 jours dans le colorant.

2.2.3. Décoloration

La décoloration s'opère soit avec les mêmes solvants, ou bien par un mélange un peu moins riche en méthanol et acide acétique (65/30/5). L'éthanol à 10 % peut remplacer le méthanol ; une décoloration trop poussée décolore les protéines. Un premier bain de rinçage dans un faible volume (50 ml) pendant 2 minutes élimine l'excès de colorant, le second bain de 1 à 2 heures dans un grand volume (200 à 400 ml) décolore efficacement le gel et les protéines apparaissent colorées en bleu sur un fond transparent. Plusieurs bains peuvent être nécessaires en fonction de la taille et de l'épaisseur du gel.

2.2.4. Conservation des gels

Les gels peuvent être conservés selon deux techniques :

En milieu humide : Nous faisons subir au gel un dernier bain de 1 à 2% d'acide acétique pour la fixation (conserve la coloration et préserve des moisissures) avant de le stocker sous plastique (films thermo soudables bien refermés et en atmosphère humide).

En milieu sec : l'acide acétique est éliminé par des bains d'eau, le dernier bain comprenant 2 à 3% de glycérol permet de donner au gel un peu plus de souplesse et d'éviter qu'il ne se fendille pendant ou après le séchage. Le séchage sur papier est réalisé à chaud et sous vide à l'aide d'un piège à eau réfrigéré. Le séchage entre deux feuilles de cellophane, plus difficile à réaliser pour des grands gels, se fait sans appareillage lourd, mais l'ajout de glycérol est hautement recommandé pour éviter que le gel sec ne se roule comme un parchemin.

2.2.5. Transfert des protéines sur membrane et Immunoblotting

Après démoulage, nous repérons la face du gel où se trouvent les protéines. Celle-ci devra se trouver contre la membrane de nitrocellulose/PVDF. Après rinçage dans de l'eau distillée puis dans le tampon de transfert, le gel est étendu sur une membrane de nitrocellulose, découpée aux dimensions du gel et équilibrée dans le tampon de transfert (annexe V) en prenant les repères dimensionnels (acide-base ; haut-bas ; poids moléculaire) et en évitant les bulles d'air. Le montage du sandwich se fait dans le sens : cathode (-)/éponge/whatmann 3MM/gel/membrane/whatmann 3MM/éponge/anode (+).

Le transfert se fait pendant 30 à 40 min sous une intensité de 180mA pour un gel et de 220mA pour 2 gels.

A la fin du transfert, la membrane est incubée dans un tampon TBS (annexe V) additionné de 5% de lait écrémé (saturation), pendant 2 heures.

L'anticorps primaire est dilué dans le tampon de saturation et incubé toute la nuit à 4°C sous agitation.

La membrane est ensuite rincée 3 fois 5 min. avec du tampon TBS.

L'anticorps secondaire (immunoglobuline de chèvre anti-IgG de lapin) couplé à l'enzyme est dilué au 1/5000^{ème} dans du tampon de saturation puis incubé pendant une heure sous agitation.

La membrane est enfin rincée plusieurs fois (3 fois 5 min, 1 fois 15 min et 1 fois 5 min dans du tampon TBS).

La **révélation de la membrane** est réalisée par addition d'un réactif (OPD), coloré par action de l'enzyme (peroxydase), permettant la localisation de la protéine recherchée.

Dès l'apparition des bandes protéiques, la membrane est rincée abondamment à l'eau distillée, séchée puis scannée.

3. Préparation des anticorps

Etant donné que nous ne disposons pas d'un élevage standardisé au laboratoire et afin d'obtenir un matériel antigénique le plus homogène possible en évitant toute variabilité individuelle, les vésicules séminales retenues pour l'extraction et la purification des protéines sont toutes issues d'animaux adultes, capturés au même endroit et à la même période, constituant ainsi un même lot.

3.1. Contrôle de la pureté de POSVP₂₁

Pour la préparation des anticorps polyclonaux, POSVP₂₁ représente le matériel antigénique. De ce fait, le contrôle de la pureté de la protéine est un pré requis avant l'immunisation des animaux.

Pour l'obtention d'une quantité d'antigène suffisante pour l'immunisation de 2 lapins, POSVP₂₁ a été purifiée par SDS-PAGE préparative. Plusieurs gels à un seul puits ont été nécessaires pour l'obtention de 4 mg de protéine pure.

3.2. Préparation et sélection des anticorps polyclonaux.

La localisation de POSVP₂₁ a nécessité la production d'anticorps polyclonaux.

3.2.1. Matériel antigénique

Le matériel antigénique est obtenu à partir des protéines solubles de l'homogénat de vésicules séminales séparées par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970).

La séparation des protéines se fait dans un gel à un seul puits. A la fin de la migration, les gels sont colorés pendant 5 min avec la solution de coloration et décolorés à l'eau distillée pendant une heure à 37°C. Cette décoloration réduit la fixation des protéines dans le gel et facilite leur extraction (Tjian *et al.*, 1975). Les bandes correspondant à la protéine d'intérêt sont découpées, les bouts de gel sont séchés dans un évapocentrifugeur, rééquilibrés dans le tampon de dénaturation puis analysés par SDS-PAGE.

Les bandes protéiques sont soumises à une électroélution. Les protéines ainsi éluées seront additionnées d'adjuvant puis injectées aux animaux sous forme d'émulsion. Une étape de dialyse est nécessaire avant l'immunisation afin d'éliminer le SDS qui est toxique pour les animaux.

3.2.2. Immunisation

Avant toute immunisation, un prélèvement de sang est effectué au niveau de la veine marginale de l'oreille des animaux, le sérum est récupéré après centrifugation ; il est utilisé comme témoin pour la suite des expérimentations.

Les immunisations sont réalisées sur 2 lapins de race « Nouvelle Zélande », selon la méthode de Vaitukaitis *et al.* (1974). L'injection primo immunisante bien homogénéisée contient 1ml d'antigène et 1ml d'adjuvant complet de Freund (ACF). Elle est précédée de la première saignée au niveau de la veine marginale de l'oreille. Des injections de rappel sont réalisées tous les 15 jours dans les mêmes conditions que la primo-injection. Une saignée précède chaque rappel, pour lequel l'immunogène est préparé en présence d'adjuvant incomplet de Freund (AIF). Un rappel est effectué 1 mois plus tard dans les mêmes conditions (500µg de protéines pures sont injectées par animal et par injection en sous-cutanée et en plusieurs sites).

L'analyse régulière des sérums obtenus à partir de prélèvements sanguins pratiqués au niveau de la veine marginale de l'oreille permet de suivre l'évolution de la réponse immunitaire. Le maximum d'Ac est obtenu douze semaines après la première immunisation, les lapins sont sacrifiés, 25 ml de sérum sont récupérés pour chaque lapin, ils sont aliquotés puis conservés à -80°C.

3.3. Mise en évidence des anticorps dans le sérum

La présence d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine de 21 kDa a été testée dans un premier temps par immunodiffusion double (méthode qualitative), puis par un dosage immunoenzymatique (ELISA). Cette technique d'analyse rapide, sensible et reproductible permet de tester un grand nombre d'échantillons et d'apprécier la réponse aspécifique instantanément.

Elle comporte 3 étapes principales:

- ✓ fixation de l'antigène sur un support solide,
- ✓ formation du complexe antigène-anticorps,
- ✓ révélation spécifique de ce complexe.

On rappelle que les sérums polyclonaux contiennent des populations d'anticorps très divers, tant en spécificité qu'en affinité et augmentent les chances d'obtenir une réaction détectable car :

- ✓ ils reconnaissent un certain nombre de sites,
- ✓ ils contiennent des anticorps de très haute affinité.

3.3.1. Contrôle de la spécificité antigénique (Immunodiffusion double)

Les protéines en général et les immunoglobulines ou les substances antigéniques en particulier, possèdent la propriété de diffuser dans la gélose. Il suffit donc de percer des puits disposés à égale distance d'un puits central dans de la gélose coulée sur une lame, d'y déposer les substances à tester (Ag et Ac) et d'observer 24 à 48 h plus tard, l'apparition d'arcs ou de lignes de précipitation correspondant au complexe immun.

Ce test rapide peut donc permettre de vérifier la spécificité d'un anticorps.

Il consiste à couler un gel d'agarose à 1% dans du tampon véronal pH 8,3 (annexe VI) solubilisé à 100°C sur des lames en verre. Après solidification de l'agarose (1 h à 4°C), les puits y sont creusés à l'emporte-pièce.

Les Ag et Ac déposés dans les puits diffusent de façon radiale dans le gel et forment un précipité (témoin d'une réaction Ag-Ac). Le temps nécessaire à la fixation définitive du précipité est de 24 à 48h (en chambre humide).

Les lames sont lavées dans plusieurs bains de NaCl 0,15 M, puis rincées à l'eau distillée. Elles sont ensuite recouvertes de papier Wathman et mises à sécher à 56°C pendant toute une nuit.

La coloration des lames se fait dans une solution de bleu de Coomassie (annexe VI) pendant 30 minutes.

Les préparations sont ensuite décolorées dans 2 ou 3 bains de solution de décoloration (Annexe VI).

La lecture des lames se fait à l'œil nu ; le complexe Ag-Ac apparaît sous forme d'un arc ou d'une ligne de précipitation.

3.3.2. Détermination des titres des sérums (ELISA)

Pour la quantification des anticorps anti-POSVP₂₁, nous avons procédé à la détermination des titres des immunosérums par une méthode immunoenzymatique ELISA. Les titres sont déterminés par dilution limite sur microplaque de 96 puits.

Cette technique consiste à fixer l'antigène au niveau des puits d'une plaque ELISA, de bloquer les sites de liaison restants libres et de l'incuber en présence de l'anticorps (présent dans l'immunosérum) que l'on désire détecter. Le second anticorps (couplé à une enzyme) est additionné au complexe (Ag-Ac) formé et la présence de l'anticorps est mise en évidence par le développement d'une coloration due au substrat chromogène.

L'antigène étant en excès, le signal obtenu est proportionnel à la quantité d'anticorps présent dans le sérum. Ainsi, en effectuant une courbe standard avec l'anticorps purifié, il est possible de quantifier simultanément l'antigène dans des échantillons où sa concentration est inconnue.

Comme antigène, nous avons utilisé POSVP₂₁ (la protéine de 21 kDa purifiée par SDS-PAGE préparative). Celui-ci est adsorbé à la paroi des puits en l'incubant toute la nuit à 4°C dans un tampon carbonate pH 9.6 à une concentration de 5 µg/ml. Une étape de 3 lavages à l'aide d'une solution de « PBS/Tween-20 (0.1%) » est effectuée. Les sites de liaison non spécifiques sont saturés à l'aide d'une solution de PBS /BSA 3% pendant 1 heure à 37°C. Les puits sont lavés comme précédemment avant l'addition de l'anticorps contenu dans le sérum à des dilutions allant de 10⁻² à 10⁻³. Ce dernier est incubé pendant 1 h à 37°C et une étape de 3 lavages est effectuée par la suite. L'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase) est ajouté à une concentration de 1/2000 dans du (PBS/BSA 3%) à raison de 100 µl par puits. Il est incubé à 37°C pendant 1 heure. 3 lavages sont réalisés avant l'addition du substrat de la peroxydase (ABTS à 10 µg dans 10 ml de tampon citrate + 100 µl d'H₂O₂ (10V) à raison de 100µl par puits. La plaque est placée à l'obscurité pendant 5 minutes, elle est retirée dès que la coloration est développée. La réaction est arrêtée par addition de 50 µL d'une solution de H₂SO₄ (1M). La coloration passe du bleu au vert et la densité optique est lue à 405 nm sur un lecteur de plaque Bio-Rad. Une correction à 650 nm peut être effectuée.

Les titres des sérums sont déterminés à partir des courbes de DO en fonction de l'inverse des dilutions ; le titre correspond à la dernière dilution de sérum qui donne une réaction positive.

3.4. Purification des anticorps

Le choix de la technique de purification doit répondre à plusieurs critères :

- ✓ le degré de pureté désiré
- ✓ la quantité d'anticorps nécessaire
- ✓ le maintien de l'activité biologique nécessaire

D'autres paramètres relatifs à l'anticorps lui-même sont à considérer :

- ✓ la spécificité de l'anticorps
- ✓ la classe d'immunoglobulines à laquelle il appartient
- ✓ son point isoélectrique
- ✓ son affinité

Tenant compte de tous ces paramètres, la chromatographie d'affinité sur colonne de protéine-A Sépharose s'avère la technique de choix pour la purification des Ac d'isotype IgG.

3.4.1. Chromatographie d'affinité

Pour la purification des anticorps, la chromatographie d'affinité sur Protéine-A (HiTrap rProtéin A FF) est utilisée en raison de sa spécificité et de sa haute résolution.

Après lavage de la colonne et équilibration avec 5 fois son volume de tampon d'équilibration, un échantillon de sérum contenant 50 mg/ml de protéines est appliqué. La fixation des IgG est réalisée à l'aide du tampon de fixation (5 à 10 fois le volume de la colonne).

L'élution est réalisée avec le tampon citrate aux pH variant de 3 à 6 avec un débit de 1ml/min. Des fractions de 1ml sont recueillies dans des tubes Eppendorf contenant 60µl de tampon Tris-HCl 1M, pH9.

La densité optique est lue à 280 nm, les fractions contenant les IgG sont dialysées pendant une nuit à 4°C contre du tampon PBS pH7,4 puis conservées à -80°C.

3.4.2. Contrôle de la pureté des anticorps

La pureté des anticorps est contrôlée par SDS -PAGE selon la méthode de Laemmli (1970).

4. Immunolocalisation

4.1. Histologie

L'étude histologique a été réalisée à partir de vésicules séminales prélevées d'animaux en période de reproduction et en période de repos sexuel fixées dans du formol tamponné à 10% pH 7.

La déshydratation des échantillons a lieu dans un bain d'éthanol à des concentrations croissantes (70° ; 96° et 100°) ; les échantillons sont ensuite inclus dans la paraffine. Les coupes sont réalisées dans les blocs de paraffine à l'aide d'un microtome. Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées puis colorées à l'hématoxyline éosine selon le protocole suivant :

- 10 minutes dans l'hématoxyline de Harris,
- rinçage dans 3 bains d'eau courante,
- 5 à 10 minutes dans l'éosine
- Déshydratation dans de l'éthanol absolu.
- Toluène (10 min)

- Montage des lames.

Après coloration, les noyaux apparaissent au microscope photonique en bleu à bleu noir et le cytoplasme rose à rouge.

4.2. Immunohistochimie

L'immunohistochimie permet de visualiser la distribution tissulaire d'une protéine sur des coupes de tissu fixées à un support solide. Cette technique permet également de localiser la protéine au niveau cellulaire à savoir au niveau cytoplasmique et/ou au niveau nucléaire. La détection se fait habituellement avec un substrat chromogénique.

Elle est basée sur l'affinité existant entre l'antigène et l'anticorps. L'anticorps utilisé pour la recherche de la protéine étudiée (POSVP₂₁) représente l'anticorps primaire (anti-POSVP₂₁). La mise en évidence du complexe Ag-Ac nécessite l'utilisation d'un second anticorps spécifique des immunoglobulines de l'espèce d'où est issu l'anticorps primaire.

Pour notre étude, nous avons utilisé la méthode d'immunohistochimie indirecte utilisant le complexe Steptavidine-Biotine-Peroxydase (Kit DAKO cytomakon). La molécule d'avidine caractérisée par la présence de plusieurs sites de reconnaissance pour la biotine, permet la fixation de cette dernière sur l'anticorps secondaire biotinylé et amplifie ainsi l'intensité du signal.

Cette méthode implique la liaison d'un anticorps primaire (Ac₁) au site antigénique de la molécule à localiser dans le tissu. Cet Ac₁ est lui même reconnu par un anticorps secondaire (Ac₂) dirigé contre les immunoglobulines (Ig) de l'espèce productrice de l'Ac₁. L'Ac₂ biotinylé est couplé à un marqueur qui le rend détectable et qui permet de visualiser le complexe Ag-Ac₁.

Le marqueur utilisé dans notre cas est une enzyme, la peroxydase de raifort (HRP), qui après réaction à la diaminobenzidine permet de visualiser le complexe Ag-Ac₁. Le produit de la réaction apparaît coloré en brun.

4.2.1. Préparation des coupes

L'étude histologique et immunohistochimique sont réalisées sur des coupes transversales de vésicules séminales et d'épididymes (proximaux et distaux), prélevés sur des animaux mâles en période de reproduction.

Nous avons effectué les coupes à partir d'organes qui sont soit directement fixés dans une solution de Bouin Hollande pendant 24 à 48 heures ou dans une solution de formol tamponné neutre à 10%, soit congelés à -80°C.

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un cryostat à -18°C pour les échantillons congelés et à l'aide d'un microtome pour les échantillons fixés. Des coupes, d'épaisseur 5µm sont récupérées, appliquées sur des lames prétraitées (VWR Superfrost®plus) et laissées à sécher pendant 24 heures à 37 °C. Les lames peuvent être conservées à -18°C pendant une durée maximale de 4 semaines.

4.2.2. Traitement des coupes

Les sections de tissus (5 µm) scellées dans la paraffine, déposées sur les lames prétraitées et laissées à sécher pendant 24 heures à 37°C sont soumises à une étape de traitement par le toluène afin de dissoudre la paraffine. Les tissus sont par la suite réhydratés graduellement dans des solutions d'éthanol (100 %, 95 %, 75 % et 50 %) pendant 5 min, puis dans de l'eau distillée pendant 5 min également.

Les coupes sont soumises à une étape de prétraitement dans un tampon citrate 10 mM pH6 pendant 2 fois 10 min à 650 watts (dans un four à micro-ondes).

L'élimination de l'activité des peroxydases endogènes est effectuée en trempant les lames pendant 30 minutes dans une solution d'H₂O₂ (3%).

La saturation des sites de liaison non spécifiques est réalisée à l'aide d'une solution de sérum de chèvre à 10% dans du PBS pendant 45 min à 4°C. Les lames sont placées dans une boîte à fond humide afin d'éviter l'évaporation.

L'anticorps primaire dirigé contre POSVP₂₁, obtenu après purification de l'immunsérum est incubé toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont lavées (3 lavages de 5 min) avec du PBS. Différentes dilutions de cet anticorps (anti- POSVP₂₁) sont testées afin de déterminer la concentration optimale permettant la meilleure révélation du complexe Ag-Ac et par conséquent de POSVP₂₁.

Pour la validation du test immunohistochimique plusieurs contrôles négatifs sont utilisés :

- Des vésicules séminales d'animaux en période de repos (absence de POSVP₂₁).
- Un sérum de lapin non immunisé (absence d'anticorps anti-POSVP₂₁).
- Du tampon PBS en remplacement de la solution de l'anticorps primaire.

4.2.3. Révélation des coupes

La révélation des coupes est réalisée après addition d'une immunoglobuline de chèvre anti-IgG de lapin biotinylée marquée à la peroxydase et appliquée pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées comme précédemment puis révélées par le complexe Streptavidine-peroxydase fourni dans le kit de révélation (Biogenex super sensitive).

Le complexe streptavidine-peroxydase (HRP) préparé extemporanément est appliqué sur les coupes et laissé pendant 20 minutes à température ambiante. L'excédent est rincé ; le substrat chromogène DAB (3,3'-diaminobenzidine) fourni dans le kit est ajouté, puis laissé sur les lames pendant 5 min à température ambiante et à l'obscurité.

Dès l'apparition de la coloration brune caractéristique, les lames sont égouttées, rincées à l'eau distillée, plongées délicatement dans un bain d'héματοxyline pendant 3min (étape de contre coloration permettant de visualiser les noyaux en colorant l'ADN en bleu) puis rincées à nouveau et trempées dans un bain de lithium. Après rinçage des lames, une étape de

déshydratation est réalisée dans des bains d'éthanol successifs à (70%, 90% et 100%) pendant 3 à 5 min et de xylol pendant 2 à 3 min. Des lamelles sont montées sur les lames, l'ensemble est par la suite séché.

L'observation des lames est réalisée à l'aide d'un microscope photonique (Leica DMRB, Orthoplan), muni d'un système de caméra digitale (Canon Power Shot A640, 10 Mega pixels).

Cette technique a permis de localiser POSVP₂₁ au niveau de la vésicule séminale du rat des sables en période de reproduction.

Remarque

Au cours de cette étude immunohistochimique, la première étape a porté sur la recherche de la concentration optimale de l'anticorps primaire. Celle-ci a été déterminée par l'observation de l'intensité et la spécificité du marquage. Différentes dilutions de l'anticorps anti-POSVP₂₁ ont été testées (1/100, 1/200, 1/300 et 1/400). La dilution de l'anticorps au 1/200^{ème} a été retenue.

5. Analyse des ARN totaux

5.1 Extraction des ARN totaux

Toutes les manipulations sont réalisées avec des gants et du matériel stérile afin d'éviter une contamination par des ribonucléases exogènes.

Les vésicules séminales prélevées sur des animaux adultes, conservées à -80°C sont pesées et aussitôt broyées dans un potter en présence d'azote liquide. 800µl de trisol, 200 µl du mélange « chloroforme et phénol V/V » sont ajoutés ; l'ensemble est centrifugé à 10000g/min à 4°C pendant 10 minutes.

Le surnageant est récupéré et additionné d'un même volume phénol/chloroforme/alcool isoamélique. Après centrifugation (mêmes conditions que précédemment), le surnageant est prélevé délicatement.

L'ARN se retrouve exclusivement dans la phase aqueuse supérieure, alors que l'interphase et la phase organique contiennent l'ADN et les protéines. La phase aqueuse supérieure est additionné d'un 1/2 volume d'isopropanol (conservé à -20°C) (400µl) et placée dans une roue (agitation lente) à +4°C pendant 10 minutes. L'ARN est ainsi visible à l'œil sous forme de précipité ; l'ensemble est laissé à 4°C pendant toute la nuit, puis centrifugé à 12000g à +4°C pendant 15 min. Après élimination de l'isopropanol, le culot contenant l'ARN est repris dans de l'éthanol à 70% à raison de 0,8ml d'éthanol pour 50 à 100 µg d'ARN, puis placé à -20°C. Cette étape permet l'élimination des sels.

Après centrifugation à 7500 g à +4°C pendant 8 min et élimination de l'éthanol délicatement, le culot est repris avec 200 à 300 µl d'eau distillée stérile (RNase free). L'ensemble est placé au bain Marie à 50°C (étape qui permet la dissolution de toutes les particules), puis centrifugé pendant 10 min afin d'éliminer toutes les particules en suspension.

Les tubes sont par la suite placés dans de la glace pour le dosage ou à -80°C pour être conservés.

5.2. Dosage et analyse

Le rendement et la pureté de la préparation sont estimés au spectrophotomètre (Beckmann) à 260 et 280 nm. Pour 1 g de tissu, 0,4g d'ARN total environ est obtenu.

Pour l'analyse électrophorétique, les échantillons sont additionnés d'un quart de volume de tampon de dénaturation, puis chauffés à 90°C pendant 5 min.

Détermination de la concentration d'ARN :

$$D.O_{260}/D.O_{280} = 1.60$$

$$D.O_{260} = 0.069$$

1 unité de $D.O_{260}$ correspond à 50 µg d'ARN

0.060 correspond à 3.45 µg/ml ; pour le dosage 10 µl d'ARN q.s.p 1ml H₂O milli Q sont nécessaires soit dilué 100fois.

Une concentration de 100 à 500 ng/µl d'ARN est requise ; la concentration de notre extrait étant située dans cette gamme, la dilution de notre échantillon n'est donc pas nécessaire.

L'extrait d'ARN obtenu a une concentration de 345 ng/µl.

5.3. Traduction *in vitro* et analyse électrophorétique (Pelham et Jackson, 1976)

Les ARN totaux sont solubilisés dans de l'eau bi distillée stérile à raison de 2 µg/µl et dénaturés pendant 5 min à 65°C dans un bain marie, puis placés dans de la glace.

La traduction est réalisée dans un milieu comprenant :

- 45 µl de mélange réactionnel (Annexe VII)
- 5 µl d'ARN à traduire
- 60 µCi de ³⁵[S] méthionine.

Après agitation douce et centrifugation (quelques secondes), l'incubation est effectuée pendant 1 heure à 30°C au bain marie. La réaction est arrêtée en plaçant les produits de traduction à -20°C.

La radioactivité incorporée est estimée par précipitation au TCA (10 µl de TCA à 10% dans 1 µl de mélange réactionnel).

Les produits de traduction sont séparés par électrophorèse (1D). Les échantillons sont déposés à raison de 50 000 dpm/puits et mis en évidence par autoradiographie (§ 2.1.1.5).

6. Identification des protéines

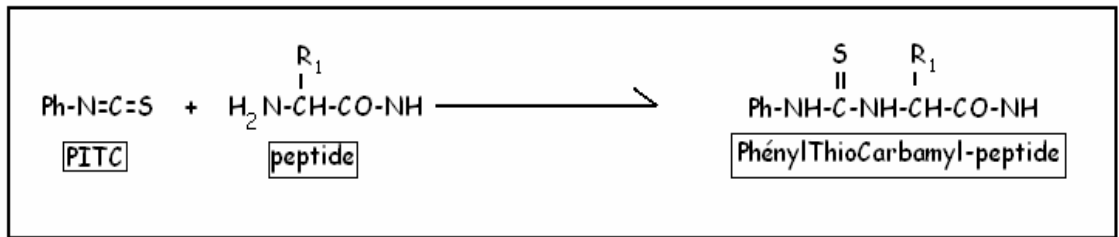
6.1. Séquençage d'Edman (séquence N-terminale)

Le séquençage d'Edman ou séquençage N-terminal est une méthode de séquençage chimique, mise au point dans les années cinquante par Pehr Victor Edman. La réaction d'Edman permet la dégradation d'une protéine par son extrémité N-terminale.

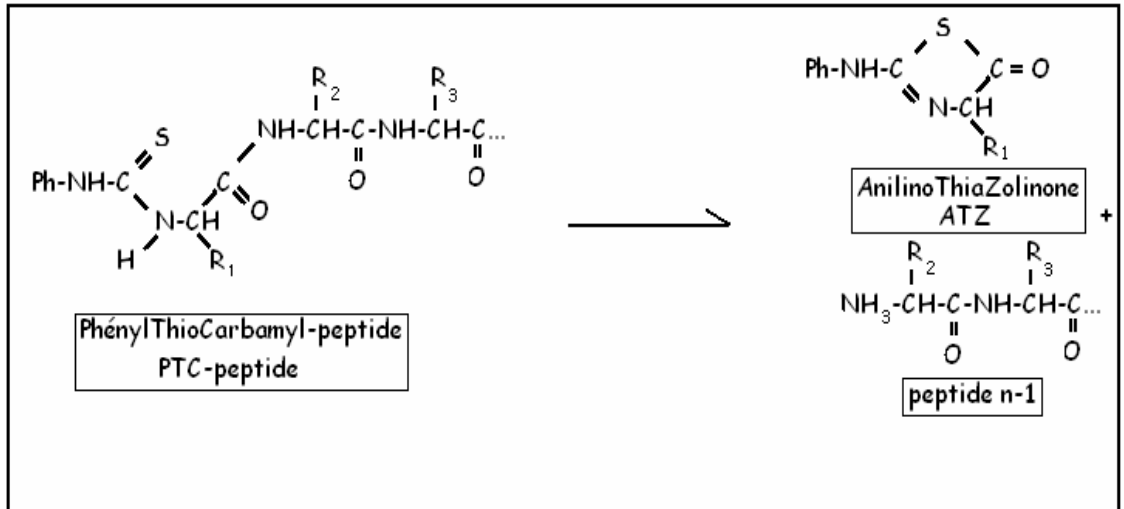
Cette technique est basée sur la réaction d'un groupement amine terminal libre d'une protéine avec l'isothiocyanate de phényle (PITC) ou réactif d'Edman. Elle comporte 3 étapes (**Figure. 3**):

- **une étape de couplage** : le PITC réagit en milieu alcalin avec la fonction amine libre du résidu N-terminal de la protéine. Cette réaction fragilise la liaison peptidique.
- **Une étape de clivage** : un acide anhydre fort (acide trifluoroacétique) coupe la liaison entre le premier acide aminé couplé au PITC et la chaîne polypeptidique. L'acide aminé couplé au PITC se transforme en un composé, le thiazolinone de l'acide aminé (ATZ-aa), instable.
- **Une étape de conversion** : pour être analysé l'ATZ-aa est stabilisé par isomérisation en milieu acide sous la forme d'un phénylthiohydantoïne-aa (PTH aa). Ce dernier est ensuite analysé par HPLC.

Etape 1 : Couplage



Etape 2 : Clivage



Etape 3 : Conversion

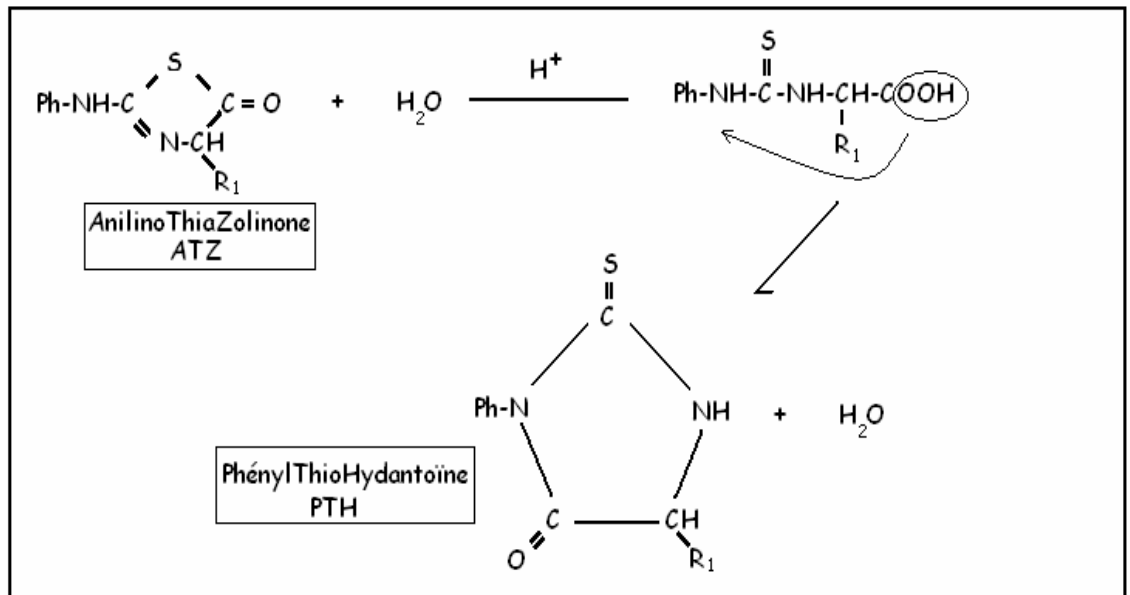


Figure. 3 Principales étapes de la réaction d'Edman.

6.1.1. Séquence N-terminale

✓ Préparation des échantillons

Les protéines contenues dans l'homogénat des vésicules séminales séparées par électrophorèse bidimensionnelle (NEpHGE et SDS-PAGE 12,5%) subissent un électrotransfert sur membrane de PVDF (Immobilon TM, Millipore), selon la technique décrite par Matsudaira (1987) et Bauw *et al.* (1987). Ces membranes PVDF sont traitées dans un bain de méthanol absolu puis rincées abondamment avant d'être appliquées sur les gels équilibrés.

Les gels de polyacrylamide sont équilibrés dans un tampon acide borique 50 mM SDS 0,1% pH 8 pendant 30 min.

L'électrotransfert est effectué dans une unité LKB-Bromma contenant un tampon Tris-Borate 50 mM (pH 8,5) pendant 2 heures à 35 volts. Les membranes sont rincées 4 fois 5 min dans un tampon acide borique 10 mM pH 8.

Pour repérer les polypeptides constitutifs de POSVP₂₁, les membranes sont colorées par une solution de bleu de Coomassie 0,1% dans du méthanol 50% et décolorées dans du méthanol 50%. Elles sont par la suite rincées à l'eau bidistillée, puis séchées. Les « spots » colorés, correspondant aux protéines d'intérêt sont découpés et conservés à -20°C.

✓ Digestion enzymatique et séparation des peptides par HPLC

Après purification des protéines par SDS-PAGE, les bandes correspondant à la protéine de 21 kDa POSVP₂₁ sont localisées, découpées avec précision en petits fragments qui sont ensuite placés dans des tubes Eppendorf et conservés à -20°C.

Lors de la digestion trypsique, les fragments de gel sont lavés à l'eau milliQ. La protéine est ensuite digérée dans 200µl de tampon Tris-HCl (50 mM)/ 0.01% de Tween 20 à 30°C pendant 18 h en présence de 0.17 µg de trypsine (Proméga).

Les PTH-acides aminés obtenus successivement sont séparés et identifiés par RP-HPLC en mesurant l'absorbance à 280 nm et en comparant les temps d'élution.

Les peptides sont séparés en ligne sur une colonne en phase inverse greffée DEAE-C18 de 220 x 2,1 mm. L'analyse est réalisée dans un gradient d'acétonitrile 2-70% et TFA 0,1%, avec un débit de 325 µl/min.

Les séquences des peptides majoritaires obtenus en HPLC sont ensuite séquencées à l'aide d'un séquenceur automatique « Applied Biosystems: ABI 494 ». En répétant les cycles, on obtient ainsi la séquence complète du peptide étudié.

6.1.2. Séquences internes

Pour la détermination des séquences internes, il est indispensable de couper la protéine en fragments, de séparer les fragments peptidiques par HPLC sur colonne DEAE-C18 et d'analyser par la suite les différents peptides sur un séquenceur d'Edman ou par spectrométrie de masse.

Deux types de coupures peuvent être réalisées : des coupures chimiques ou enzymatiques. Pour notre part, nous avons utilisé un traitement enzymatique par la trypsine.

6.2 Microanalyse des protéines pour la recherche d'empreinte peptidique massive

Cette technique nous permet l'identification des protéines contenues dans les spots de gels 2-D ou bandes protéiques de gels 1-D préalablement séparées.

Dans tous les cas, la protéine est digérée par une protéase (trypsine) en ses peptides constitutifs, puis diverses techniques de spectrométrie de masse sont appliquées.

6.2.1. Préparation des échantillons

✓ Lavage et décoloration des spots

Les spots d'intérêt sont soigneusement excisés en morceaux de 1 ou 2 mm³ et placés dans des microtubes stériles, sans poussières ni empreintes de doigts.

Ils sont lavés deux fois 10 minutes avec 50 ml d'eau milli Q pendant 10 minutes. Après élimination du surnageant, les fragments de gel sont recouverts d'un volume d'acétonitrile 100% ; une hydratation du gel avec 1 ml de NH₄HCO₃ 0.1 M est effectuée sous agitation pendant 5 minutes. Le surnageant est à nouveau remplacé par 1,2 volume d'acétonitrile pendant 15 minutes sous agitation, jusqu'à agglutination et blanchiment des gels.

Les portions de gels sont lyophilisées jusqu'à évaporation totale.

✓ Réduction et alkylation

Les réactions de réduction au DTT et d'alkylation à l'iodoacétamide peuvent être évitées si l'échantillon a subi ces étapes entre la 1^{ère} et la 2^{ème} dimension. Elles sont recommandées pour des protéines extraites de gels 1D, ou si la protéine est exceptionnellement riche en cystéines.

La réduction et l'alkylation se fait dans une solution de DTT 10 mM dans NH₄HCO₃ 0.1 M et une incubation de 45 min à 56°C sous agitation.

Après élimination de l'excès de solution, un volume d'acétonitrile est ajouté puis remplacé rapidement par un volume d'iodoacétamide 55 mM dans NH₄HCO₃ à 0.1M, puis incubé pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité.

✓ Digestion trypsique

Le gel, immergé dans la solution enzymatique (annexe VIII), est placé dans la glace pendant 45 minutes. Après élimination de l'excès de solution, un volume de 70µl de NH₄HCO₃ (25 mM) est ajouté, l'ensemble est incubé à 37°C pendant toute la nuit.

✓ Extraction des peptides

L'étape d'extraction doit permettre la diffusion passive des peptides du gel vers la solution d'extraction. Cette étape est primordiale pour avoir un signal le plus intense possible lors de l'analyse par spectrométrie de masse.

L'extraction des peptides est réalisée en trois étapes.

Dans la première étape, nous ajoutons aux fragments de gel 70µl d'acide formique à 1%. Après centrifugation à 500 trs/min pendant 5 min nous récupérons le *surnageant 1*.

Dans la seconde étape nous ajoutons 90µl d'acétonitrile au culot 1 puis centrifugeons l'ensemble à 500 trs/min pendant 10 min et récupérons le *surnageant* 2. Les surnageants 1 et 2, contenant les peptides extraits sont ensuite regroupés.

Dans la troisième étape, nous ajoutons à nouveau 70 µl d'acétonitrile puis centrifugeons l'ensemble à 500 trs/min pendant 5 min. Cette étape est réalisée pour augmenter les rendements d'extraction.

L'ensemble des surnageants est de nouveau regroupé, puis évaporé au « speedvac » pendant 2 heures. Les peptides sont enfin dissous à nouveau dans 20µl d'acide formique 0.1% et dessalé sur micro colonnes Zip-Tip[™] C₁₈ (millipore) (annexe VIII)

Le Zip-tip est activé par 3 lavages de 20 µl acétonitrile/acide formique 1% (1/1), puis équilibré par 3 lavages de 20µl d'acide formique (Annexe VIII). Les peptides sont lentement aspirés et refoulés 10 fois dans le Zip-Tip, puis lavés de leurs sels par 3 x 20 µl d'acide formique 1% (Annexe VIII).

Les peptides sont ensuite concentrés au speed-vac, puis stockés à -20°C en attendant leur identification.

6.2.2. Stratégies d'identification

Deux stratégies peuvent être utilisées pour l'identification d'une protéine :

- ✓ **Stratégie de l'empreinte peptidique** (empreinte peptidique massique ou peptide mass fingerprint). La détermination de quelques masses de peptides obtenus par digestion enzymatique de la protéine et comparées aux masses des peptides de digestion calculées pour toutes les protéines des banques de données.
- ✓ **Stratégie de fragmentation des peptides**, la séquence de certains peptides de la protéine peut être déterminée par MS/MS et comparée aux séquences de toutes les protéines des banques.

Dans notre cas nous avons utilisé la stratégie de l'empreinte peptidique massique. Les échantillons sont ensuite analysés à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap-XL (Thermo Fischer), montée en ligne avec une nano-HPLC Ultimate 3000 (Dionex).

Les identifications protéiques sont réalisées par référence à la banque de données SwissProt.

I. Site de synthèse de POSVP₂₁

Introduction

Dans cette première partie nous présentons les résultats de l'analyse des profils électrophorétiques de l'homogénat des vésicules séminales en période de reproduction et en période de repos, des sécrétions ainsi que l'analyse densitométrique des différents profils protéiques.

Nous présentons dans une deuxième partie les résultats de la localisation de POSVP₂₁ et du site de synthèse de cette dernière.

1. Analyse des protéines

1.1. Analyse des profils électrophorétiques

L'analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales en période de reproduction (automne - printemps) et en période de repos sexuel (été) montre que la composition protéique de la vésicule séminale est complexe (Fig.4).

En effet nous avons retrouvé :

- En période de reproduction

La présence d'une trentaine de bandes qui correspondent à des protéines de PM apparent compris entre 14.4 kDa et 120 kDa ; 9 d'entre elles sont des composés majeurs, dont POSVP₂₁ (*Psammomys obesus* seminal vesicles protein of 21 kDa), protéine androgénodépendante majeure de PM apparent de 21 kDa.

- En période de repos

Nous révélons un profil protéique présentant des différences importantes avec celui obtenu en période de reproduction.

En effet, POSVP₂₁ qui apparaît comme un composé majeur en période de reproduction est fortement réduite en période de régression hormonale et absente en période de repos sexuel.

Les protéines de PM apparent de 35 kDa ; 38 kDa ; 41 kDa ; 43 kDa et 67 kDa, contrairement à POSVP₂₁, sont peu ou pas exprimées en période de reproduction et abondamment exprimées pendant la période de repos sexuel, particulièrement la protéine de 43 kDa qui est absente en période de reproduction et fortement exprimée en saison de repos sexuel.

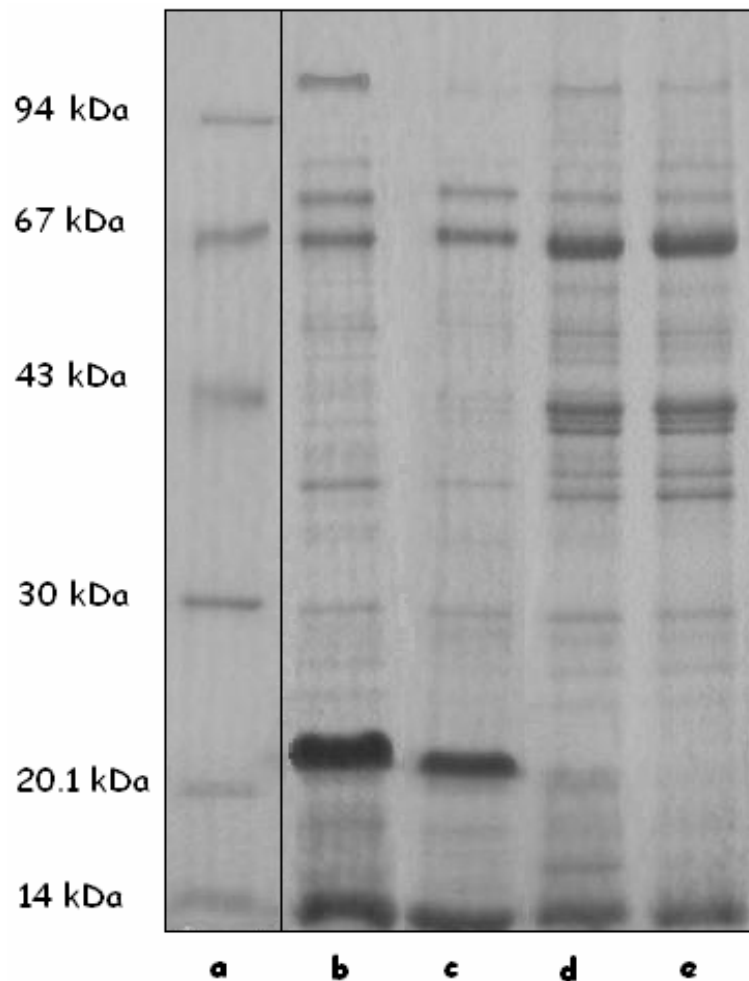


Figure 4. Profil électrophorétique des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales à différentes périodes de l'année.

- (a) Marqueurs de P.M
 - (b) et (c) Période de reproduction (automne)
 - (d) Période de régression hormonale (fin de printemps)
 - (e) Période de repos sexuel (été)
- Dépôt : 100µg d'homogénat par puits
Coloration au bleu de Coomassie

1.2. Analyse densitométrique des profils électrophorétiques de l'homogénat vésicules séminales.

La détermination des teneurs relatives de POSVP₂₁ dans l'homogénat des vésicules séminales en période de reproduction, de régression hormonale et en période de repos, montre une variation de l'expression de cette protéine au cours de ces différents états physiologiques (Fig.5).

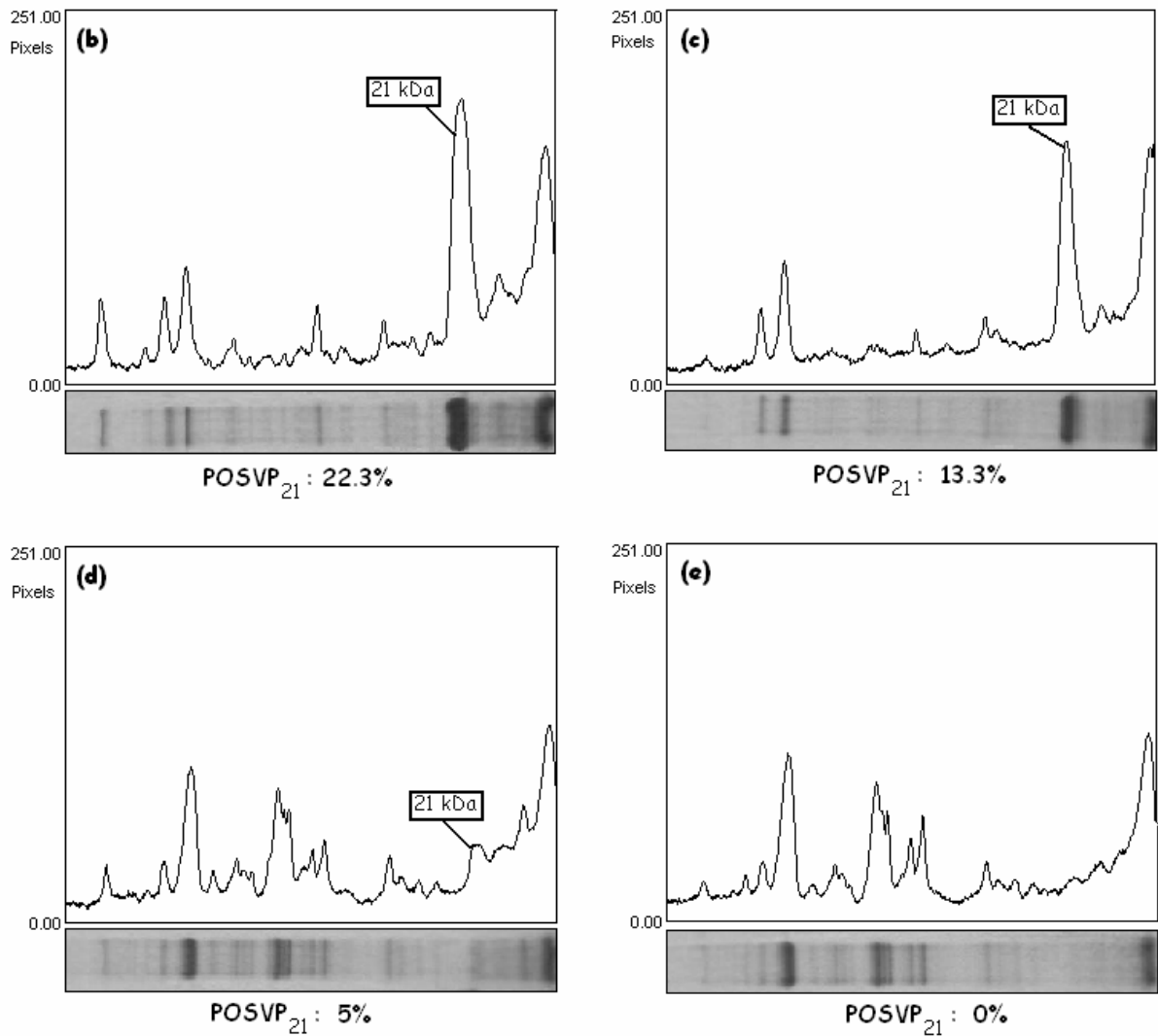


Figure 5. Analyse densitométrique des profils électrophorétiques.

- (b) et (c) Période de reproduction
- (d) Période de régression hormonale
- (e) Période de repos sexuel

En effet, POSVP₂₁ représente 22.3% des protéines solubles de l'homogénat, en période de reproduction (automne) (Fig. 5b), 13.3% en période intermédiaire (début de printemps) (Fig.5c) et 5.14% seulement en période de régression hormonale (Fig. 5d) (fin de printemps). Elle est absente en période de repos sexuel (début de l'été) (Fig. 5e).

De cette étude comparative, il ressort une réduction du taux de POSVP₂₁ estimée à 9% entre le début de la période de reproduction (automne) et la période intermédiaire (début de printemps). Cette réduction est encore plus marquée (17.2%) entre le début de la période de reproduction (automne) et la période de régression hormonale (Fig. 5c) ; ce taux s'annule en période de repos (Fig. 5e).

1.3. Analyse des profils électrophorétiques de l'homogénat et des sécrétions des vésicules séminales en période de reproduction

L'électrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles en conditions dénaturantes est réalisée à partir de l'homogénat (tissu + sécrétions) et à partir des sécrétions des vésicules séminales (Fig. 6).

POSVP₂₁ étant de faible poids moléculaire, nous avons utilisé un gel de séparation à 15% d'acrylamide-bisacrylamide pour sa purification.

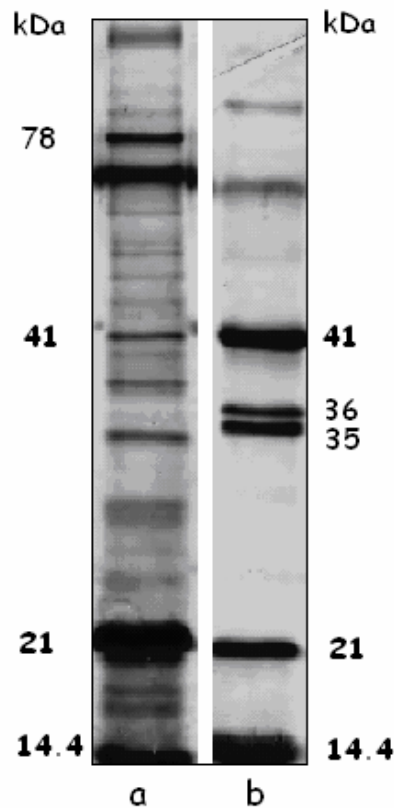


Figure 6. Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles des vésicules séminales et des sécrétions en période de reproduction.

(a) homogénat
 (b) sécrétions
 Dépôt : 100µg par puits
 Coloration au bleu de Coomassie

L'étude comparative des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat et des sécrétions des vésicules séminales chez le rat des sables en période de reproduction révèle :

- dans l'**homogénat**, la présence de 9 composés majeurs de P.M. apparent de : 120 kDa, 78 kDa, 67 kDa, **41 kDa**, 37 kDa, 34 kDa, 30 kDa, **21 kDa** et **14.4 kDa** (Fig. 6a).
- dans les **sécrétions** des vésicules séminales, nous notons la présence de 8 bandes protéiques de P.M. apparent compris entre 14.4 kDa et 92 kDa, avec 5 composés majeurs de P.M. apparent **14.4 kDa** ; 35 kDa ; 36 kDa ; **41 kDa** et un de **21 kDa** (Fig. 6b).

La comparaison de ces 2 profils protéiques, laisse apparaître **3 protéines communes** à l'homogénat et aux sécrétions ; il s'agit de la protéine de **21 kDa** ou POSVP₂₁ et de deux autres composés de PM apparent de **41 kDa et 14.4 kDa**.

Parmi les 9 composés majeurs de l'homogénat, 5 protéines ne se retrouvent pas dans les sécrétions (120 kDa, 78 kDa, 37 kDa, 34 kDa et 30 kDa) et semblent par conséquent spécifiques de la vésicule séminale. D'autres protéines absentes dans l'homogénat (35 kDa et 36 kDa) ou faiblement représentées (41 kDa) sont cependant très abondantes dans les sécrétions.

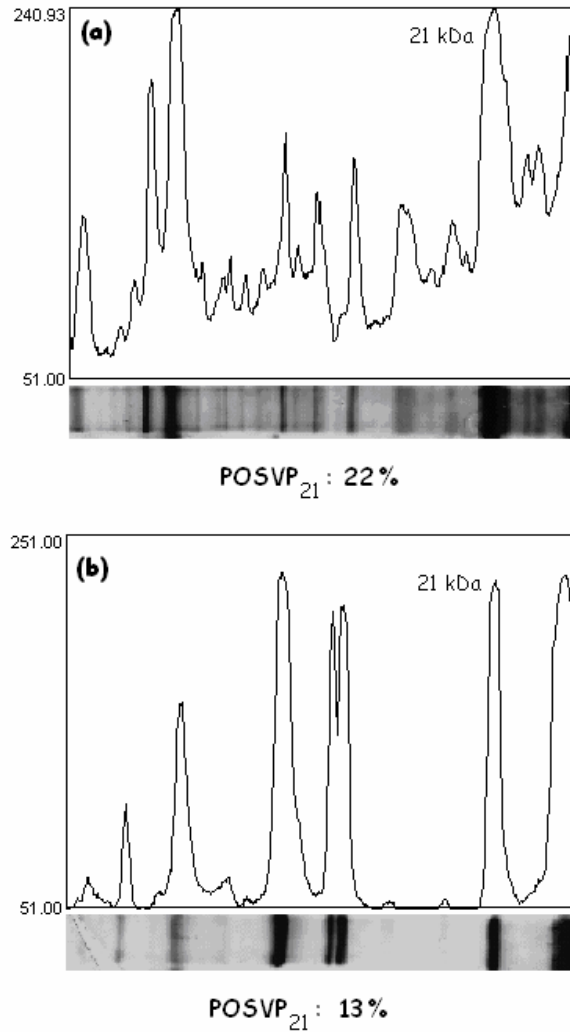


Figure 7. Analyse densitométrique des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat et des sécrétions des vésicules séminales de *Psammomys obesus*.

- (a) Homogénat.
- (b) Sécrétions.

L'analyse densitométrique des profils électrophorétiques montre qu'en période de reproduction, POSVP₂₁ représente 22% des protéines solubles de l'homogénat (Fig. 7a). Dans les sécrétions, la protéine de 21 kDa représente 13% (Fig. 7b).

L'étude comparative des profils protéiques (Fig.6) et l'analyse densitométrique de l'homogénat et des sécrétions des vésicules séminales (Fig. 6), révèle que la majeure partie de la protéine de 21 kDa présente dans l'homogénat serait sous forme sécrétée (13%).

2. Localisation de POSVP₂₁

2.1. Isolement de POSVP₂₁

Une série d'électrophorèses monodimensionnelles en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) préparative (Fig. 8B) nous a permis d'obtenir 4 mg de protéine (POSVP₂₁) pure qui sont utilisés au cours de l'étape suivante pour la préparation des anticorps polyclonaux dirigés contre POSVP₂₁.

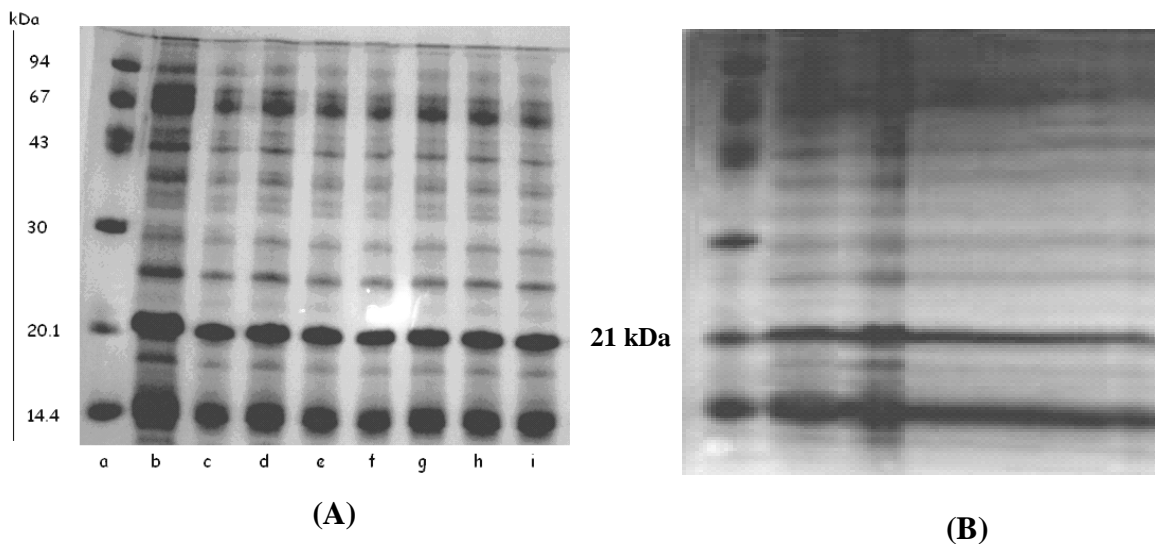


Figure 8. Electrophorèse monodimensionnelle préparative de POSVP₂₁

- (A) : gel à plusieurs puits ;
 - (B) : gel à un seul puits.
 - (a) marqueurs de PM
 - (b) 140 µg de protéines solubles d'homogénat de vésicules séminales
 - (c à i) 100 µg de protéines solubles d'homogénat de vésicules séminales
- Coloration au bleu de Coomassie

2.2. Mise en évidence des anticorps dans le sérum

2.2.1. Immunodiffusion double

La présence d'anticorps dirigés contre POSVP₂₁ dans les immunosérums des 2 lapins est mise en évidence par la présence d'arcs ou lignes de précipitation correspondant aux complexes Ag-Ac. Les immunosérums testés (IS₁ et IS₂) sont comparés à des sérums témoins (S₁ et S₂), issus de lapins non immunisés.

2.2.2. Détermination des titres des immunosérums

Le titre de l'immunosérum du lapin 1 ou (IS₁) est de 1/300^{ème}, celui de IS₂ est de 1/500^{ème}.

Nous notons que pour tous les tests réalisés, aussi bien qualitatifs que quantitatifs, la réponse immunitaire du lapin 2 est nettement supérieure à celle du lapin 1. Le lapin 2 étant un bon répondeur, son sérum est retenu pour la purification des anticorps anti- POSVP₂₁.

2.3. Purification des anticorps anti-POSVP₂₁

La mesure de la densité optique des différentes fractions éluées à partir de l'immunosérum 2 donne le profil suivant.

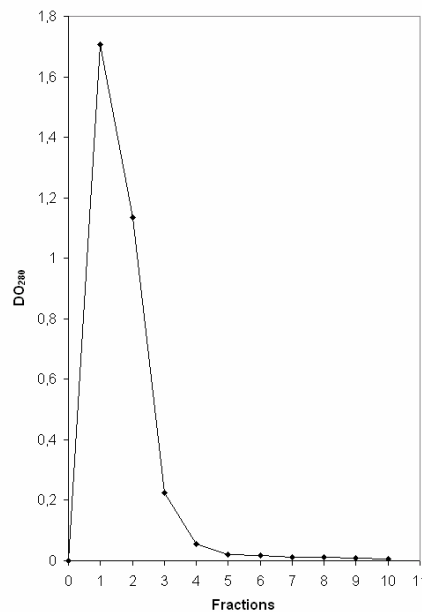


Figure 9. Profil d'élution des Ac anti-POSVP₂₁ purifiés par chromatographie d'affinité sur Protéine-A.

Le contrôle de la pureté des anticorps anti-POSVP₂₁ est réalisé par électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE) en conditions non dénaturantes (Fig. 10a) et en conditions dénaturantes (Fig. 10b).

Le profil électrophorétique des fractions d'Ac anti-POSVP₂₁ en conditions non dénaturantes laisse apparaître une bande protéique de 150 kDa correspondant aux IgG (Fig. 10a).

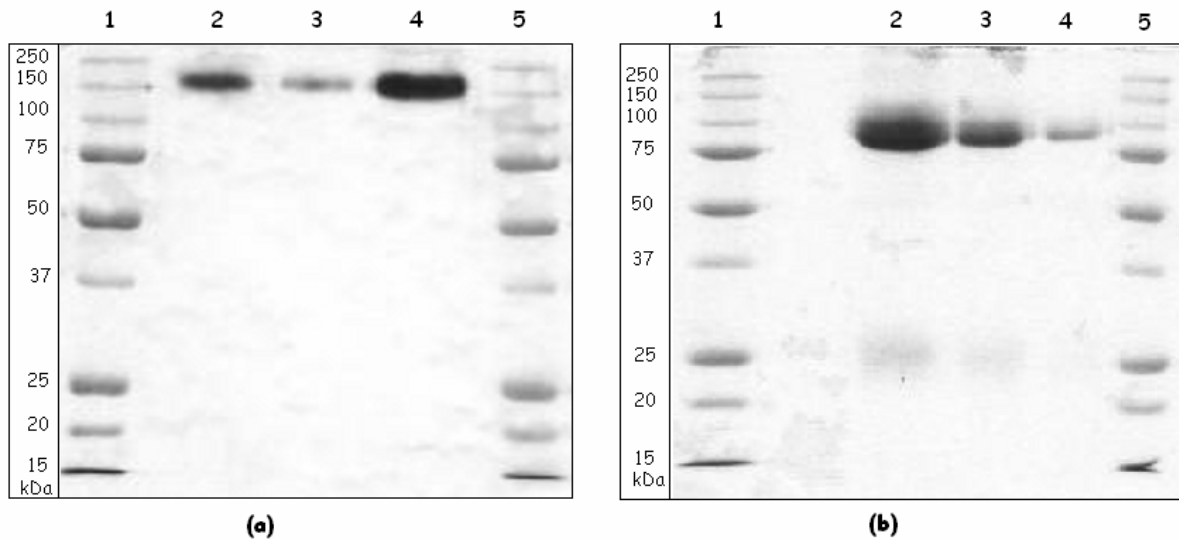


Figure 10. Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE) des fractions d'anticorps anti-POSVP₂₁ purifiés par chromatographie d'affinité sur Protéine-A.
 (a) SDS-PAGE en milieu non dénaturant.
 (b) SDS-PAGE en milieu dénaturant.
 1 et 5 Marqueurs de PM.
 2, 3 et 4 concentrations variables en anticorps purifiés.
 Dépôt : 40µl
 Coloration au bleu de Coomassie

En conditions dénaturantes, la révélation du gel laisse apparaître deux bandes protéiques de P.M. de 25 kDa et de 100 kDa correspondant respectivement à la chaîne légère et à la chaîne lourde de l'IgG. (Fig. 10b)

3. Immunolocalisation de POSVP₂₁ dans la vésicule séminale

La localisation cellulaire des protéines repose sur 4 critères essentiels :

- la préservation des antigènes,
- l'accessibilité aux épitopes,
- la réalisation de la réaction immunologique et
- la visualisation de la réaction.

3.1. Aspect histologique de la vésicule séminale.

3.1.1. Période de reproduction

La paroi de la vésicule séminale est composée :

- d'une muqueuse mince très plissée avec un épithélium pseudostratifié, constitué de cellules hautes, non ciliées, possédant un noyau volumineux et un cytoplasme éosinophile et à la partie basale des cellules de forme triangulaire

moins abondantes. Cet épithélium repose sur un tissu conjonctif sous jacent lâche appelé stroma ou chorion de la muqueuse. La muqueuse est très ramifiée et forme un système complexe de replis à l'intérieur de la lumière de la vésicule séminale.

- D'une musculature constituée d'une couche interne de fibres circulaires et d'une couche externe comprenant des faisceaux longitudinaux.
- D'une adventice mince de nature fibro-élastique située sur la face externe de la vésicule séminale.

Ces deux dernières couches constituent le stroma fibro-musculaire de faible épaisseur. La lumière de la vésicule séminale est volumineuse et est remplie de sécrétions de type éosinophile.

En période de reproduction, l'épithélium de la vésicule séminale est caractérisé par :

- des replis importants,
- des cellules principales mesurant 30 à 50 μm avec un noyau occupant le tiers basal de la cellule et une zone supra nucléaire bien développée et éosinophile (Fig. 11b).

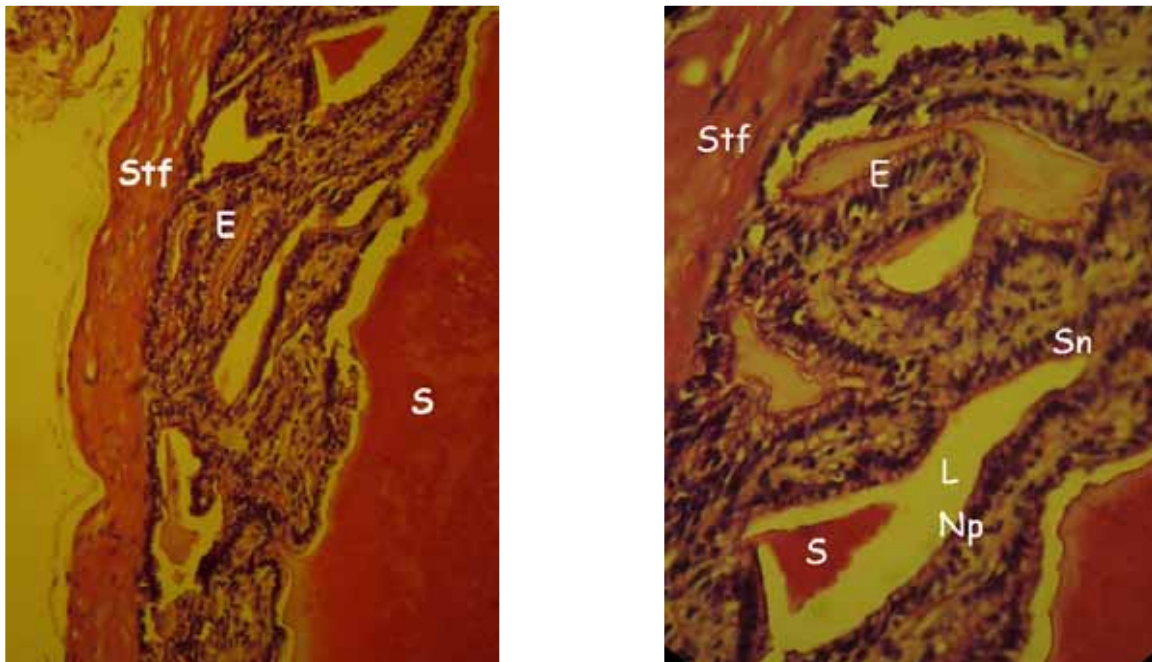


Figure 11. Aspect histologique de la vésicule séminale de *Psammomys obesus* en période de reproduction.

(a) Début automne (Gx750)

(b) Début automne (Gx1000)

E : épithélium ; L : lumière ; S : sécrétion ;

Sn : zone supranucléaire ; St : stroma ; Np : noyaux para basaux.

Stf : stroma fibromusculaire.

Coloration à l'hématoxyline-éosine.

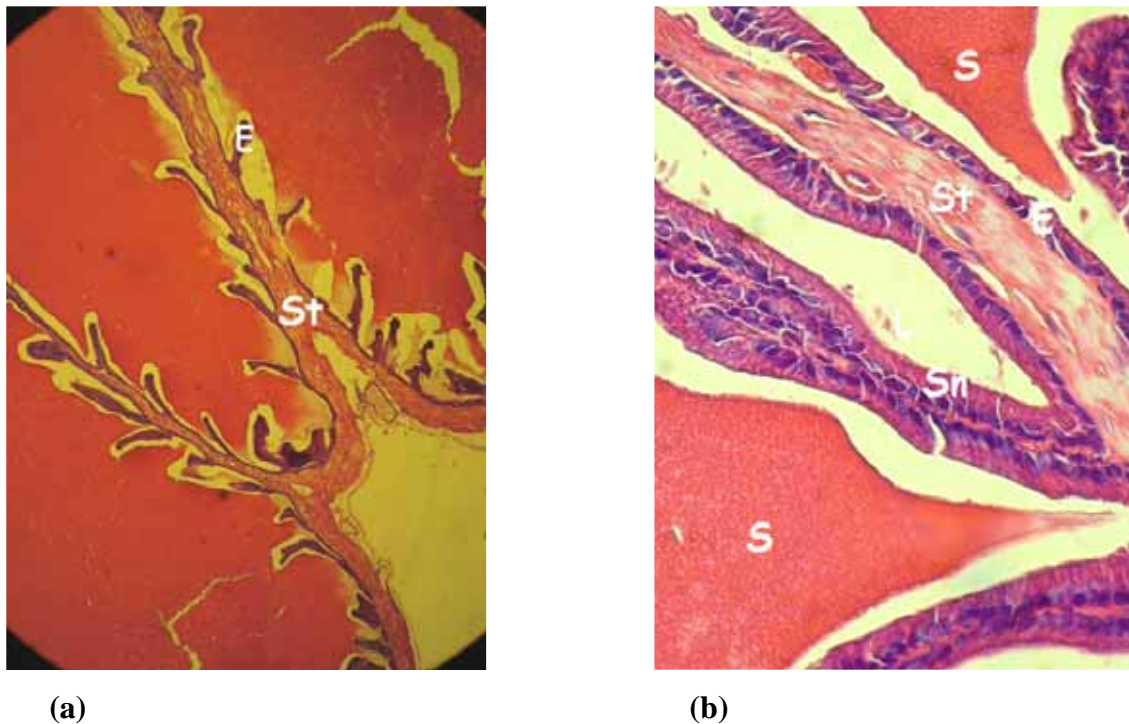


Figure 12. Aspect histologique de la vésicule séminale de *Psammomys obesus* en période de repos.

(a) Début été (Gx75)

(b) Début été (Gx1000)

E : épithélium ; L : lumière ; S : sécrétion ;

Sn : zone supranucléaire ; St : stroma ; Np : noyaux para basaux.

Coloration : Hématoxyline- éosine.

3.1.2. Période de repos

La structure histologique de la vésicule séminale est fortement modifiée en période de repos (Fig. 12a ; Fig. 12b). Ces modifications portent essentiellement sur :

- La lumière de la vésicule séminale, qui est réduite et quasiment dépourvue de sécrétions.
- L'épithélium qui est atrophié ; ses replis sont beaucoup moins nombreux et les cellules moins hautes. Elles ne mesurent que 18 à 20 μ m, avec un noyau occupant les deux tiers du volume cellulaire et une zone supra nucléaire peu développée et basophile.

- Le volume du stroma fibro-musculaire qui est très important, il constitue la majeure partie de la structure de l'organe (Fig. 12a).

Au niveau de l'épithélium, nous notons cependant la présence de quelques cellules en activité, caractérisées par une zone supra nucléaire bien développée (Fig. 12b).

3.2 Etude immunohistochimique

Pour l'étude immunohistochimique des vésicules séminales, la dilution au 200^{ème} de l'Ac primaire (anti-POSVP₂₁) est retenue (Fig. 13a).

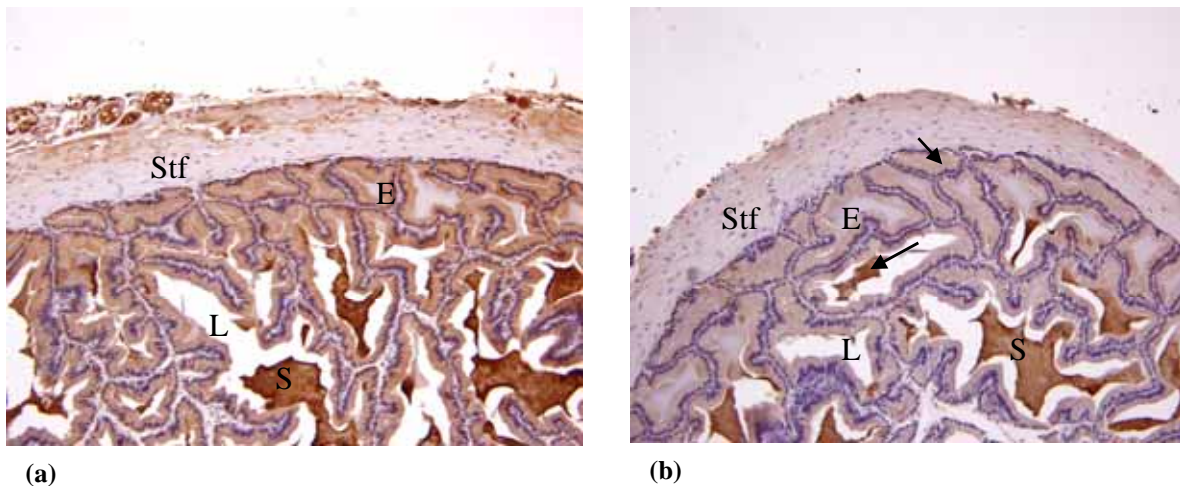


Figure 13. Détermination de la concentration optimale de l'Ac anti-POSVP₂₁ pour l'étude immunohistochimique.

(a) dilution de l'anticorps anti-POSVP₂₁ 1/200^{ème} (Gx250)

(b) dilution de l'anticorps anti-POSVP₂₁ 1/400^{ème} (Gx250)

E : épithélium ; L : lumière ;

S : sécrétion ; St : stroma. Stf : stroma fibromusculaire.

L'immunoréactivité, visualisée par la coloration brune, présente une intensité variable selon la localisation de POSVP₂₁. Nous remarquons que l'intensité de la coloration est plus marquée dans les sécrétions (au niveau de la lumière), que dans l'épithélium de la vésicule séminale (Fig. 13a ; 13b).

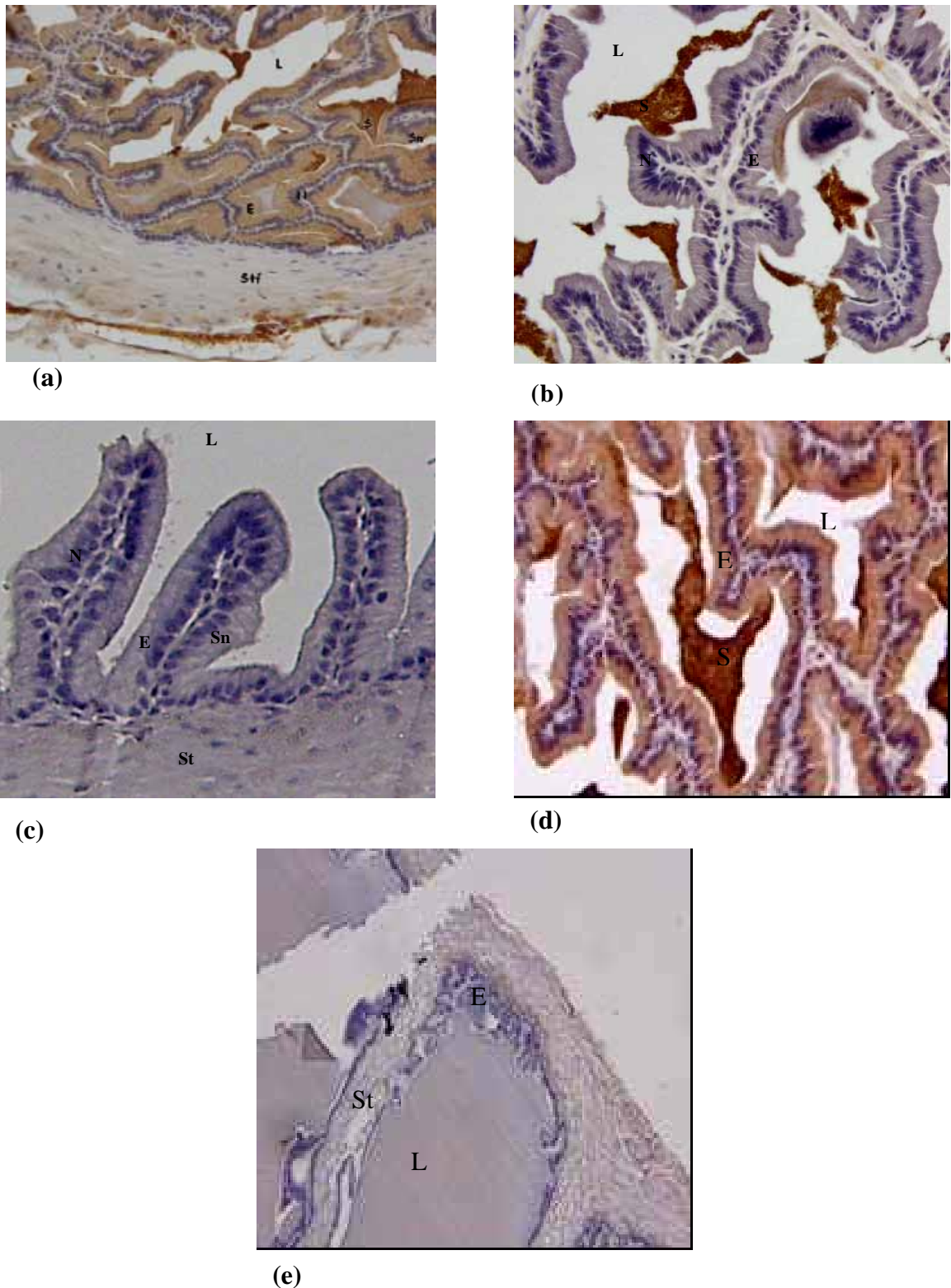


Figure 14. Localisation de POSVP₂₁ dans la vésicule séminale du rat des sables en période de reproduction.

(a) POSVP₂₁ dans l'épithélium et dans les sécrétions (E et S) Gx400

(b) POSVP₂₁ dans les sécrétions (S) Gx750

(c) POSVP₂₁ absente de l'épithélium (E) Gx1000

(d) POSVP₂₁ dans l'épithélium au niveau cytoplasmique Gx750

(e) Témoin (période de repos) Gx200

E : épithélium ; L : lumière ; S : sécrétion ; N : noyau ; Sn : zone supranucléaire ; St : stroma.
Stf : stroma fibromusculaire.

Les anticorps dirigés contre POSVP₂₁ ont permis de mettre en évidence la présence de POSVP₂₁ dans la vésicule séminale en période de reproduction, de la localiser du point de vue tissulaire et de déterminer sa distribution cellulaire (Fig 14 a et d).

La répartition spatiale de POSVP₂₁ est limitée à l'épithélium et à la lumière de la vésicule séminale. En effet, aucune expression de POSVP₂₁ n'est révélée au niveau du tissu conjonctif, ni au niveau du stroma fibro-musculaire de la vésicule séminale (Fig. 14 a et c).

Cependant, POSVP₂₁ n'est pas exprimée avec la même intensité au niveau du compartiment épithélial et au niveau de la lumière de la vésicule séminale. Cette immuno-expression est beaucoup plus importante dans les sécrétions, que dans l'épithélium. Nous notons dans les sécrétions, la présence d'un signal nettement supérieur à celui de l'épithélium (Fig. 13a ; 13b et 14a).

Au niveau cellulaire, POSVP₂₁ présente une répartition cytoplasmique. Elle est présente de façon homogène dans le cytoplasme des cellules épithéliales.

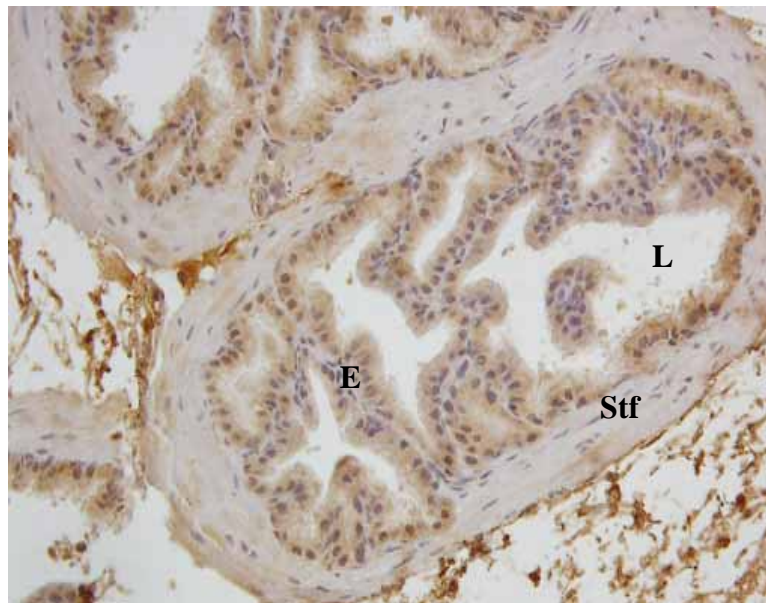


Figure 15. Localisation cellulaire de POSVP₂₁ dans la vésicule séminale du rat des sables en période de reprise de la reproduction. (Gx800) ; E : épithélium ; L : lumière ; St : stroma ; Stf : stroma fibromusculaire.

Nous remarquons par ailleurs, que sur des coupes de vésicules séminales prélevées chez des animaux adultes à la fin de l'été (fin de période de repos et début de la période de reproduction), POSVP₂₁ est faiblement exprimée au niveau de l'épithélium et aucune immuno-expression n'est décelée dans la lumière de la vésicule séminale (Fig. 15).

Conclusion

L'approche immunohistochimique a permis de préciser la localisation de POSVP₂₁ du point de vue tissulaire et cellulaire :

- sa distribution au niveau histologique est restreinte au compartiment épithélial,
- au niveau cellulaire, elle présente une distribution cytoplasmique,
- l'épithélium semble être le siège de synthèse de POSVP₂₁ ; elle est sécrétée dans la lumière de la vésicule séminale.

4. Analyse des ARN totaux et de leurs produits de traduction

La vésicule séminale étant le site de synthèse le plus probable de POSVP₂₁, pour tenter de confirmer cette hypothèse, nous avons procédé dans une première étape, au dosage et à l'analyse des ARN totaux, extraits de la vésicule séminale du rat des sables adulte en période de reproduction et dans une seconde étape à l'analyse des produits de traduction obtenus *in vitro*.

4.1. Dosage et analyse des ARN totaux

Après extraction, les ARN totaux sont dosés par spectrophotométrie ; la concentration d'ARN total est évaluée par calcul du rapport de densités optiques : D.O₂₆₀/D.O₂₈₀.

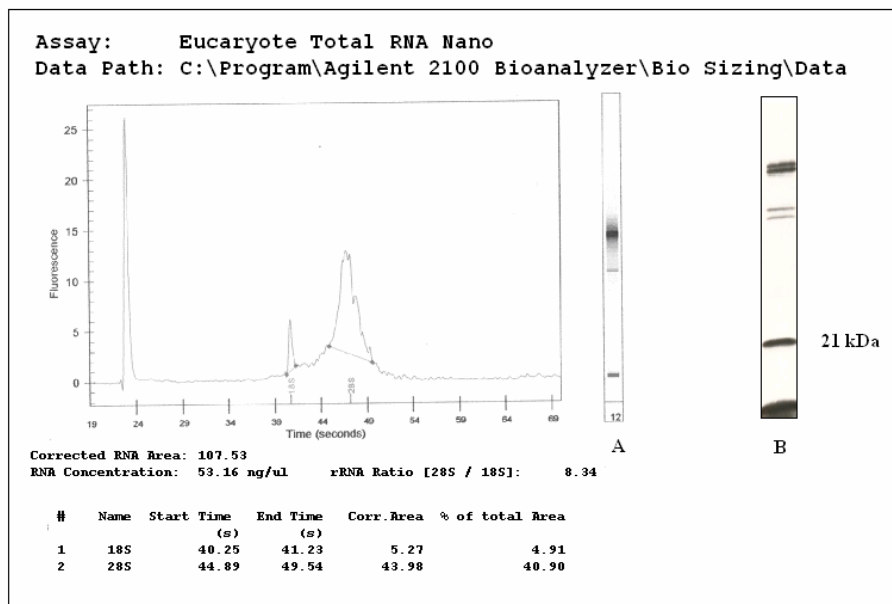


Figure 16. Analyse des ARN totaux et des produits de traduction.
(A) : Profil électrophorétique des ARN totaux de la vésicule séminale
(B) : Profil électrophorétique des protéines traduites *In vitro*

Le profil électrophorétique obtenu (Fig. 16A) montre la présence de deux populations d'ARN :

- Des ARNr représentés par deux bandes distinctes correspondant aux deux sous unités 18s et 28s avec un ratio (28S/18S) de 8.34.
- Des ARN messagers qui apparaissent au niveau du gel sous forme de smears.

4.2. Analyse des protéines traduites *in vitro*.

Le profil des protéines traduites à partir de ces ARN dans un système acellulaire de lysat de réticulocytes en présence de ³⁵S-méthionine, révèle la présence de 5 bandes protéiques dont une majeure et de même mobilité électrophorétique que POSVP₂₁ (21 kDa) (Fig. 16B). Ces résultats viennent conforter l'hypothèse émise précédemment (au cours de l'étude immunohistochimique) concernant le site de synthèse et l'origine vésiculaire de POSVP₂₁.

En effet, en plus de la présence de POSVP₂₁ au niveau épithélial et dans les sécrétions, l'analyse des ARN totaux et de leurs produits de traduction montre au niveau de la vésicule séminale la présence d'un ARNm majeur capable de produire *in vitro* un composé majeur de même mobilité électrophorétique (21 kDa), ce qui confirme l'origine vésiculaire de POSVP₂₁.

L'étude de POSVP₂₁ par l'approche immunohistochimique montre une répartition restreinte de cette protéine majeure de la vésicule séminale à l'épithélium et à la lumière de la vésicule séminale. Ce qui laisse supposer une spécificité tissulaire de POSVP₂₁ vis-à-vis de l'épithélium.

L'épithélium de la vésicule séminale, semble donc représenter le site de synthèse de POSVP₂₁, elle est par la suite abondamment sécrétée dans le fluide au niveau de la lumière de la vésicule séminale.

Ce résultat conforte notre observation à savoir que la majeure partie de la protéine de 21 kDa présente dans l'homogénat correspondrait à la protéine sécrétée.

POSVP₂₁ aurait donc pour site de synthèse l'épithélium de la vésicule séminale.

Le composé de 21 kDa traduit *in vitro* correspond à une pré-protéine et présente la même mobilité électrophorétique que POSVP₂₁, protéine mature synthétisée *in vivo*. Ces résultats laissent supposer que le peptide signal de POSVP₂₁ est soit inexistant, soit de trop faible taille pour générer une différence visible en électrophorèse monodimensionnelle.

5. Conclusion

- **POSVP₂₁ peut être considérée comme un produit spécifique de la vésicule séminale.**
- **Sa distribution cytoplasmique et sa présence dans la lumière sous une forme sécrétée suggèrent un passage dans le milieu extérieur.**
- **POSVP₂₁ aurait un mode de sécrétion « apocrine ».**

La détermination de la séquence peptidique de POSVP₂₁ abordées dans la partie suivante nous permettra de préciser la composition de la protéine, la présence ou l'absence d'un peptide signal et par conséquent de vérifier l'hypothèse d'une sécrétion apocrine.

II. Approche protéomique : Caractérisation et identification de POSVP₂₁

Introduction

Dans la première partie nous présentons les résultats de la caractérisation. Dans une deuxième nous nous intéresserons à l'identification de POSVP₂₁.

Les vésicules séminales du rat des sables (*Psammomys obesus*) synthétisent et sécrètent une protéine majeure androgénodépendante de 21 kDa dénommée POSVP₂₁ ; représentant 22% des protéines solubles de l'homogénat et 13% de celles des sécrétions des vésicules séminales (résultat présenté dans le chapitre III).

Les caractéristiques principales de ce marqueur protéique sont :

- son androgénodépendance,
- son abondance dans les sécrétions,
- sa présence dans le bouchon vaginal.

POSVP₂₁ partage ces caractéristiques avec de nombreuses protéines impliquées dans la fertilité chez de nombreuses espèces de mammifères.

Afin de vérifier cette hypothèse, il est nécessaire de caractériser et d'identifier cette protéine.

1. Caractérisation de POSVP₂₁

Au niveau des vésicules séminales du rat des sables, l'électrophorèse bidimensionnelle (NepHGE+SDS-PAGE) a permis de mettre en évidence dix à vingt fois plus de protéines que l'électrophorèse monodimensionnelle.

En plus de la détermination du point isoélectrique (pHi) et du nombre de polypeptides constitutifs, elle a permis de montrer également une hétérogénéité de POSVP₂₁.

Avant d'aborder la séparation et l'analyse de POSVP₂₁ par électrophorèse bidimensionnelle, une analyse globale du protéome des vésicules séminales du rat des sables par (NepHGE + SDS-PAGE) est réalisée. Celle-ci permet d'apprécier de manière plus fine le nombre de protéines exprimées dans différents états physiologiques.

1.1. Analyse du protéome des vésicules séminales en période de reproduction

L'analyse des gels d'électrophorèse bidimensionnelle des protéines solubles l'homogénat des vésicules séminales du rat des sables en période de reproduction (automne et fin de printemps) montre une séparation des protéines avec une résolution nettement supérieure à celle obtenue par électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE).

La révélation du gel laisse apparaître un nombre de protéines beaucoup plus important que l'électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes (Fig. 4).

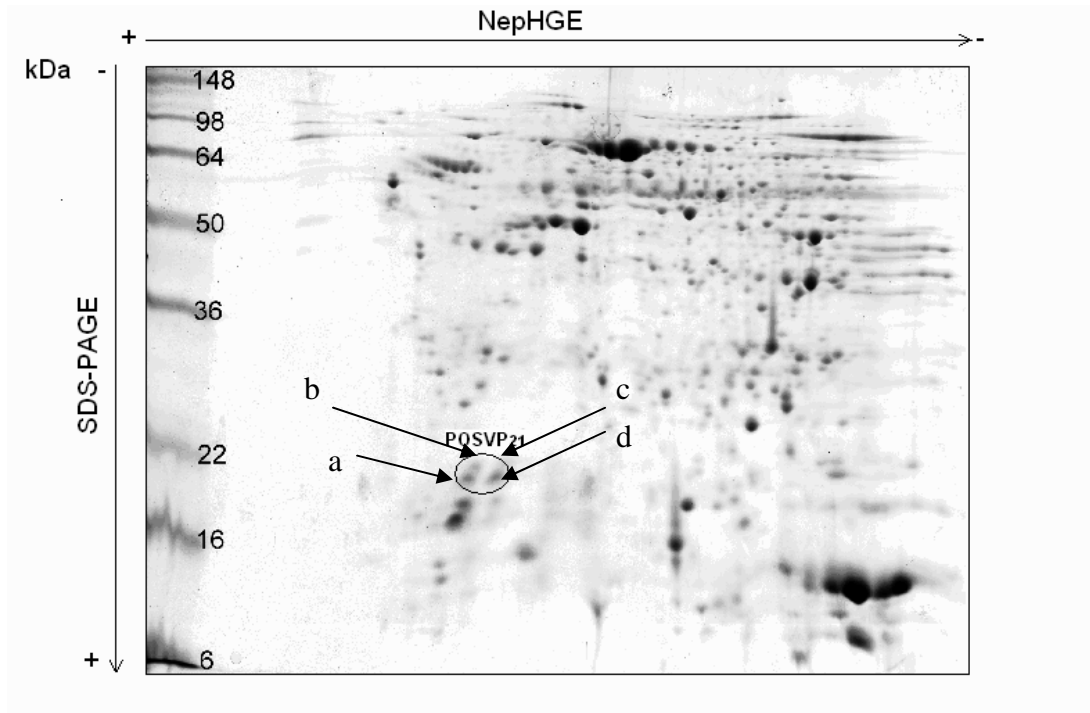


Figure 17. Analyse électrophorétique bidimensionnelle des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales du rat des sables en période de reproduction (début automne).

Première dimension (IEF) dépôt : 75 µg ; pI 3-10 ; migration : 20000Vh total.
 Deuxième dimension (SDS-PAGE) : gel à 15 % d'acrylamide/bis-acrylamide ;
 coloration au bleu de Coomassie colloïdal.

Sur gel d'électrophorèse bidimensionnelle, les protéines majeures apparaissent sous forme de plusieurs spots, conséquence d'une double séparation, en fonction du point isoélectrique (pHi) et du poids moléculaire (PM).

Cet aspect est très net pour les composés de poids moléculaires suivants :

- 78 kDa ; 67 kDa (région de l'albumine) : la protéine de PM voisin de 67 kDa apparaît constituée d'une dizaine de spots d'intensité variable ;
- 41 kDa; 37 kDa et 34 kDa (zone de l'anhydrase carbonique) et
- les deux composés de faible poids moléculaire 21 et 14.4 kDa (zone de l'inhibiteur de la trypsine et du lysozyme).

Au niveau de la zone de PM correspondant à POSVP₂₁, nous notons la présence de 4 spots protéiques.

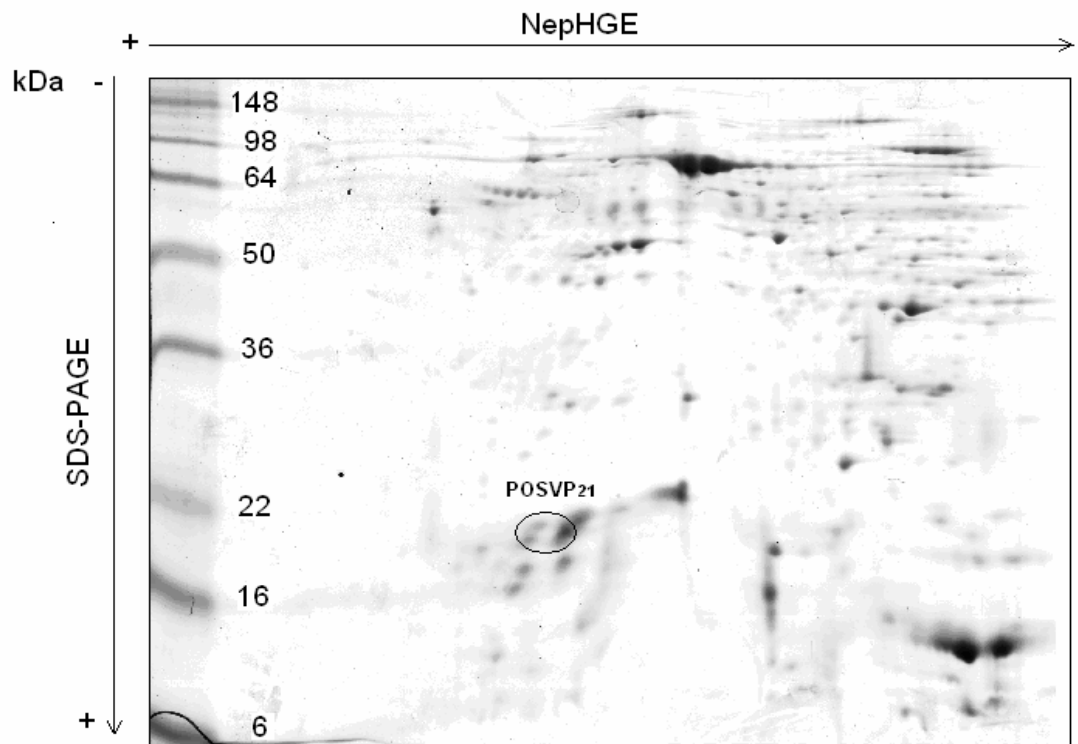


Figure 18. Analyse électrophorétique bidimensionnelle des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales du rat des sables en période de reproduction (début de printemps).

L'analyse des gels 2-D montre une meilleure résolution de la séparation ainsi qu'une variabilité plus fine du protéome de la vésicule séminale pendant la période de reproduction.

Nous remarquons que le protéome des vésicules séminales présente des différences, selon le stade de reproduction. En effet, l'échantillon prélevé au début de l'automne (Fig. 17) révèle un nombre de protéines nettement supérieur à celui obtenu au début de printemps (Fig. 18).

La différence notée au niveau de ces deux échantillons du point de vue, nombre intensité et pHi s'explique par le stade plus ou moins avancé de la reproduction, et par « l'état de maturation des protéines » (modifications post-traductionnelles).

1.2. Analyse du protéome des vésicules séminales en période de repos

L'analyse des gels d'électrophorèse bidimensionnelle, d'homogénats de vésicules séminales d'animaux adultes en période de repos sexuel, montre un protéome beaucoup moins important que celui obtenu à partir d'échantillons d'animaux en période de reproduction.

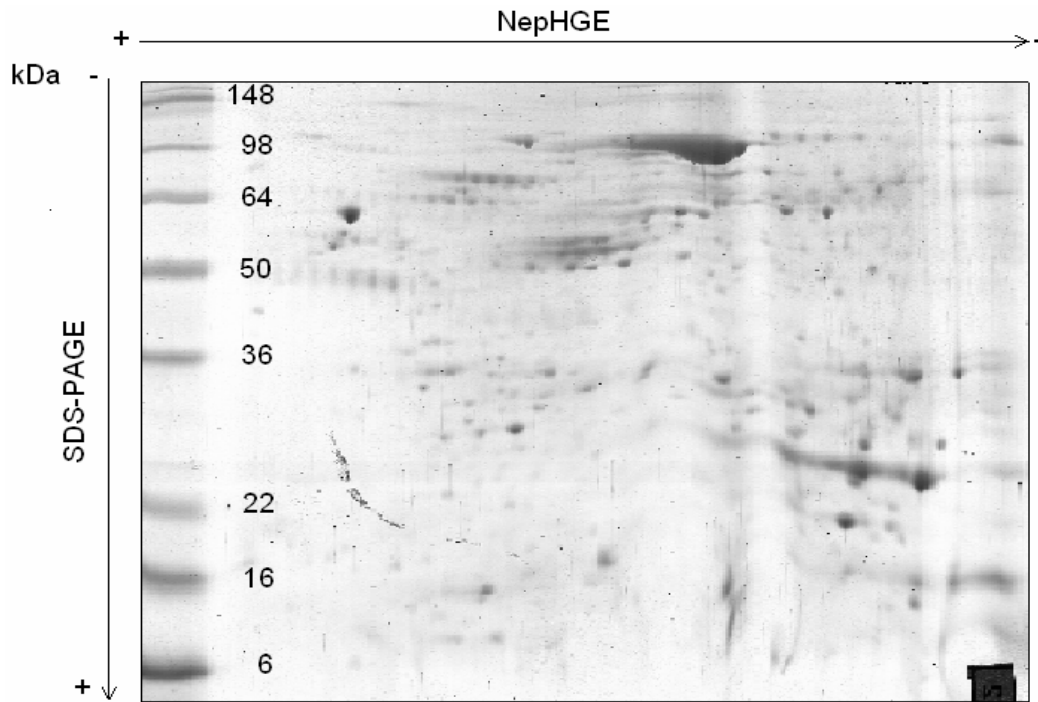


Figure 19. Analyse électrophorétique bidimensionnelle des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales du rat des sables en période de repos (début été).

Cette différence est très visible pour POSVP₂₁, protéine pour laquelle aucun spot révélé en période de reproduction, n'est retrouvé en période de repos (Fig. 19).

Ces différents résultats montrent bien que l'analyse protéomique permet d'identifier le protéome à un moment précis et à un stade physiologique bien défini.

L'absence de ces spots niveau des échantillons protéiques issus de vésicules séminales en période de repos, suggère que les quatre spots de poids moléculaire de 21 kDa, mis en évidence en période de reproduction correspondent à POSVP₂₁.

L'analyse du gel d'électrophorèse bidimensionnelle d'un échantillon de POSVP₂₁ préalablement purifié (**Fig. 20**) laisse apparaître dans la zone de poids moléculaire de 21 kDa, quatre spots distincts par leur point isoélectrique. Il s'agit des spots « a », « b », « c » et « d ». Trois de ces spots (a, b et c) ont le même poids moléculaire de 21 kDa et des pHi différents de (4.4 ; 4.6 et de 7), alors que le spot « d », a le même pHi que le spot « c », c'est-à-dire 7 et un PM légèrement inférieur à 21 kDa.

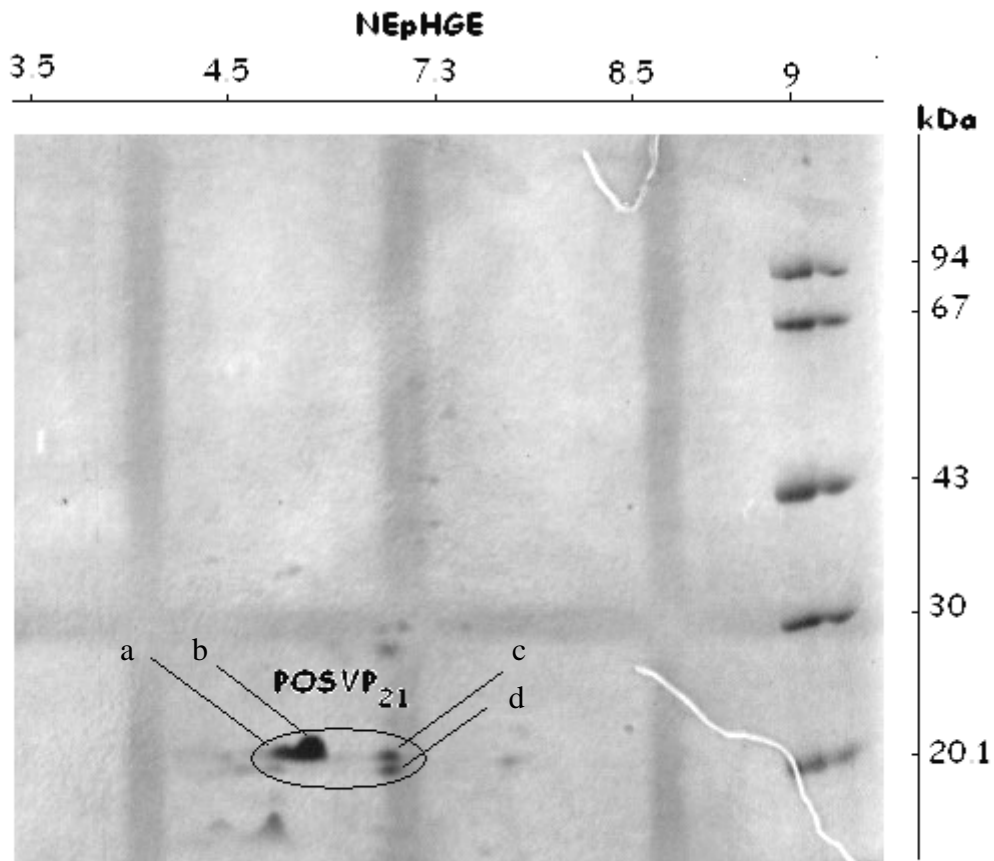


Figure 20. Electrophorèse bidimensionnelle (NepHGE/SDS-PAGE) de POSVP₂₁.

Ces résultats montrent que les spots a, b, c et d correspondent bien à POSVP₂₁ et que POSVP₂₁ est une protéine acide, représentée par 4 polypeptides, dont le pHi est compris entre 4.4 et 7.

2. Identification de POSVP₂₁

2.1. Détermination des séquences peptidiques constitutives de POSVP₂₁

La bande protéique de 21 kDa correspondant à POSVP₂₁ est découpée, soumise à une digestion trypsique et les fragments peptidiques issus de la digestion sont séparés par nano-HPLC. Les peptides extraits correspondant aux pics caractéristiques sont analysés par spectrométrie de masse MS/MS et 16 séquences peptidiques sont déterminées (Fig. 21).

1	RLVEWIVMQCGPDVGRPDRG
2	R.GRLGFQVWLK.N
3	R.LGFQVWLK.N
4	R.LGFQVWLKNGVILSK.L
5	K.LVNSLYPEGSK.P
6	K.LVNSLYPEGSKPVK.V
7	K.PVKVPENPPSMVFK.Q
8	K.VPENPPSMVFK.Q
9	KVPENPPSMVFKQMEQVAQFLKA
10	K.QMEQVAQFLK.
11	KAAEDYGVTKTDMFQTVDLFEGKD
12	KTDMFQTVDLFEGKD
13	RGDPNWFMKK
14	R.GDPNWFMKK.A
15	KHVIQLQMGSNRG
16	R.GASQAGMTGYGRPR.Q

Figure 21. Séquences peptidiques de POSVP₂₁ identifiées.

La comparaison des séquences peptidiques générées par le logiciel Mascot à partir de la banque de données Swiss-Prot a permis l'identification partielle de POSVP₂₁. L'analyse des séquences identifiées et la recherche des homologues de séquences montre que POSVP₂₁ présente un taux de recouvrement de 62% avec la **transgeline** du rat (*Rattus norvegicus*), ce qui représente les 2/3 de la séquence totale de cette protéine (Fig. 22). Les acides aminés non identifiés pour POSVP₂₁ n'ont pas été pris en compte dans le calcul du taux de recouvrement avec la transgeline de *Rattus norvegicus*, ce qui laisse supposer qu'il pourrait être supérieur à cette valeur (62%). Ce taux reste cependant nettement supérieur à la valeur limite qui permet l'identification des protéines.

Toutes les séquences peptidiques de POSVP₂₁ identifiées, sont retrouvées au niveau de la séquence peptidique de la transgeline de *Rattus norvegicus*.

Parmi ces séquences, 9 d'entre elles couvrent le domaine calponine (domaine caractérisant les protéines liant l'actine) de la transgeline de *Rattus norvegicus* avec un taux de recouvrement de 77%. Le domaine calponine se situe entre l'AA₂₄ et l'AA₁₃₉ (Fig. 22).

POSVP₂₁ serait vraisemblablement identique à la transgeline du rat (*Rattus norvegicus*).

1	MANKGPSYGM SREVQSKIEK KYDEELEERL VEWIVMCCGP DVGRPDRGRL	POSVP ₂₁
	MANKGPSYGM SREVQSKIEK KYDEELEERL VEWIVMCCGP DVGRPDRGRL	TGLN R.n
51	GFQVWLKNGV ILSKLVNSLY PEGSKPVKVP ENPPSMVFKQ MEQVAQFLKA	
	GFQVWLKNGV ILSKLVNSLY PEGSKPVKVP ENPPSMVFKQ MEQVAQFLKA	
101	AEDYGVTKTDMFQTVDLFEG KDMAAVQRTVMALGSLAVTK	NDGHYRGDPN
	AEDYGVTKTDMFQTVDLFEG KDMAAVQRTVMALGSLAVTK	NDGHYRGDPN
151	WFMKKAQEHK REFTDSQLQEGKHVIGLQMG SNRGASQAGM TGYGRPRQII	
	WFMKKAQEHK REFTDSQLQEGKHVIGLQMG SNRGASQAGM TGYGRPRQII	
201	S	
	S	

Figure 22. Alignement des séquences peptidiques de POSVP₂₁ avec celles de la transgeline (TGLN) du rat (*Rattus norvegicus*).

Séquence 1 : POSVP₂₁ (les peptides séquencés sont représentés en gras.)

Séquence 2 : Séquences de la transgeline de *Rattus norvegicus* (R.n).

Les séquences surlignées en gris correspondent au domaine Calponine.

2.2. Analyse des séquences peptidiques de POSVP₂₁

A la suite de cette première identification, nous avons recherché des homologues de séquences entre la transgeline de *Rattus norvegicus* et la transgeline identifiée chez l’homme.

L’interrogation de la banque de données Swiss-prot et les alignements de séquences ont permis de montrer l’existence de 96% d’homologie entre ces deux protéines (Fig. 23).

Length=184
 GENE ID: 6876 TAGLN | transgelin [*Homo sapiens*] (Over 10 PubMed links)
 Score = 370 bits (950), Expect = 3e-101, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 177/184 (96%), Positives = 182/184 (98%), Gaps = 0/184 (0%)

Query	1	MANKGPSYGMSREVQSKIEKKYDEELEERLVEWIVMCCGPDVGRPDRGRLGFQVWLKNGV	60
Sbjct	1	MANKGPSYGMSREVQSKIEKKYDEELEERLVEWI++Q GPDVGRPDRGRLGFQVWLKNGV	60
Query	61	ILSKLVNSLYPEGSKPVKVPENPPSMVFKQMEQVAQFLKAAEDYGVTKTDMFQTVDLFEG	120
Sbjct	61	ILSKLVNSLYPDGSKPVKVPENPPSMVFKQMEQVAQFLKAAEDYGVIKTDMFQTVDLFEG	120
Query	121	KDMAAVQRTVMALGSLAVTKNDGHYRGDPNWFMKKAQEHKREFTDSQLQEGKHVIGLQMG	180
Sbjct	121	KDMAAVQRTLALGSLAVTKNDGHYRGDPNWFMKKAQEHKREFTESQLQEGKHVIGLQMG	180
Query	181	SNRG 184	
		SNRG	
Sbjct	181	SNRG 184	

Figure 23. Alignements des séquences peptidiques de la transgeline du rat (*Rattus norvegicus*) avec la transgeline de l’homme (*Homo sapiens*).

La séquence peptidique de la transgéline de *Rattus norvegicus* compte 201 résidus d'acides aminés ; les acides aminés qui distinguent cette séquence de celle de l'homme sont : l'AA₃₅ ; l'AA₃₆ ; l'AA₃₈ ; l'AA₇₂ ; l'AA₁₀₇ ; l'AA₁₃₀ et l'AA₁₆₅.

2.3. Analyse comparative de POSVP₂₁, de P_{21Ep} et P_{21Ed}

Avant de pouvoir émettre des hypothèses quant au rôle de la **transgéline au niveau du tractus génital mâle de *Psammomys obesus***, nous avons tenté de vérifier si les protéines épидидymaires que nous avons désignée par P_{21Ep} (protéine de 21 kDa de l'épididyme proximal) et par P_{21Ed} (protéine de 21 kDa l'épididyme distal) mises en évidence au cours de travaux antérieurs (Gernigon *et al.*, 1992) ne présentaient pas en plus des propriétés électrophorétiques, d'autres caractéristiques identiques ou similaires à celles de POSVP₂₁.

Nous avons alors recherché dans une première étape l'existence d'une parenté immunologique avec POSVP₂₁ et dans une seconde étape une homologie structurale. A cet effet, les mêmes méthodes sont utilisées.

2.3.1. Localisation de P_{21Ep} et de P_{21Ed}

Les résultats montrent que dans l'**épididyme proximal** comme dans l'épididyme **distal**, les profils électrophorétiques révèlent la présence d'une vingtaine de bandes protéiques de PM compris entre 6 kDa et 190 kDa.

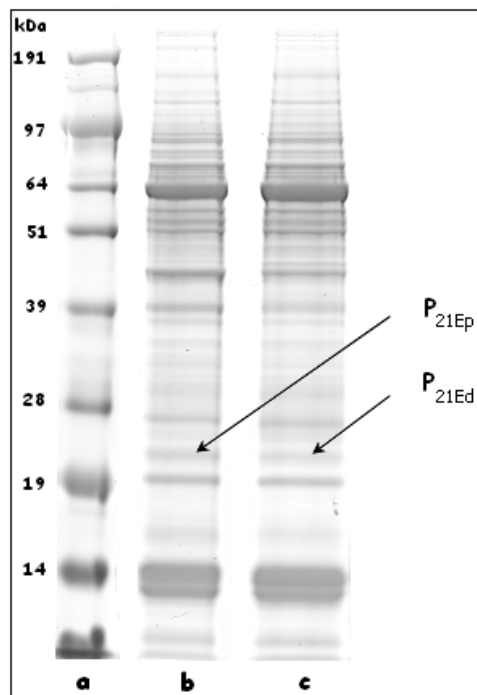


Figure 24. Profil électrophorétique des protéines solubles de l'homogénat de l'épididyme en période de reproduction.

- (a) marqueurs de PM
- (b) 100 µg d'homogénat d'épididyme proximal
- (c) 100 µg d'homogénat d'épididyme distal

Nous notons au niveau de ces profils protéiques, la présence de 5 composés majeurs de PM apparent de 64 kDa ; 45 kDa ; 39 kDa ; **21kDa** et 14 kDa.

La recherche de l'existence d'une éventuelle parenté immunologique entre P_{21Ep} , P_{21Ed} et $POSVP_{21}$ est réalisée à l'aide des anticorps anti- $POSVP_{21}$ par Western Blot et par immunohistochimie (Fig. 25 ; Fig. 26).

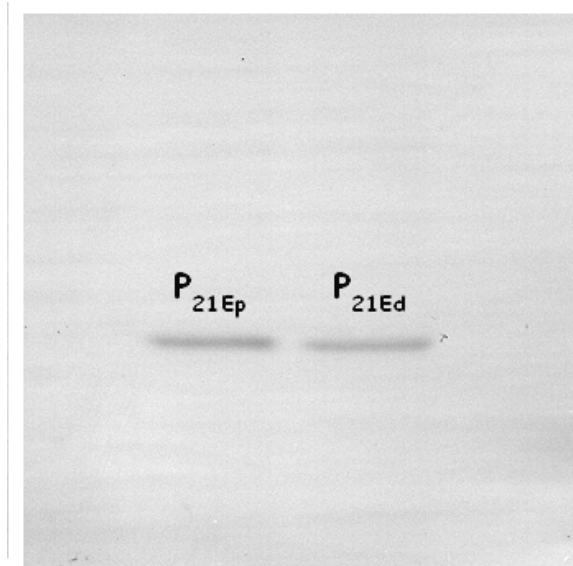


Figure 25. Etude de la réactivité des Ac anti- $POSVP_{21}$ vis-à-vis de P_{21Ep} et P_{21Ed} .
 P_{21Ep} : protéine de 21 kDa de l'épididyme proximal
 P_{21Ed} : protéine de 21 kDa de l'épididyme distal

Après séparation et transfert des protéines solubles des homogénats de l'épididyme (proximal et distal), deux bandes protéiques de 21 kDa sont révélées à l'aide des Ac anti- $POSVP_{21}$; elles correspondent respectivement à P_{21Ep} et P_{21Ed} .

Ces résultats suggèrent l'existence d'une parenté immunologique entre $POSVP_{21}$ (protéine identifiée au niveau de la vésicule séminale) et les deux composés de même PM apparent (P_{21Ep} et P_{21Ed}) retrouvés au niveau de l'épididyme.

La parenté immunologique sera confortée par l'étude d'immunolocalisation et par la détermination et l'analyse des séquences peptidiques de P_{21Ep} et de P_{21Ed} .

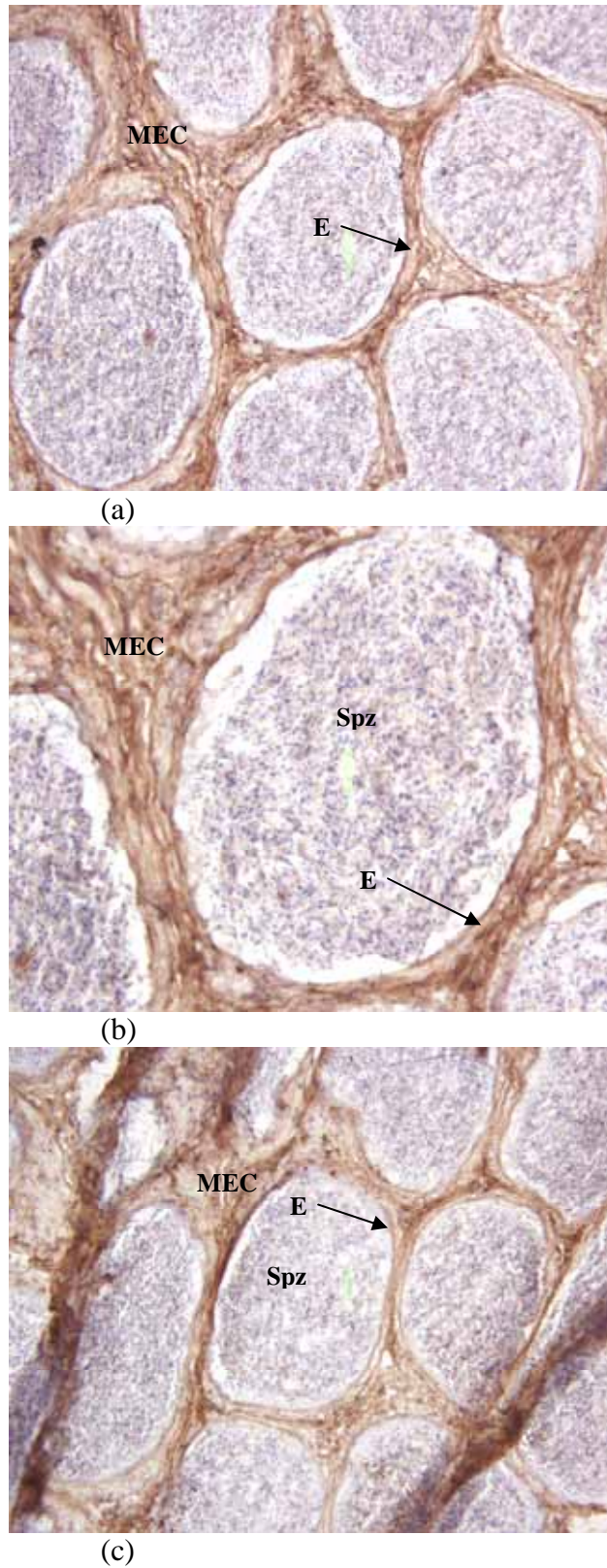


Figure 26. Etude immunohistochimique de l'épididyme du rat des sables en période de reproduction.

(a): Epididyme proximal. Gx250

(b): Epididyme proximal. Gx400

(c): Epididyme distal. Gx250

Spz : Spermatozoïdes ; E : Epithélium ; MEC : Matrice extracellulaire.

La mise en évidence d'une parenté immunologique entre POSVP₂₁, P_{21Ep} et P_{21Ed} nous a permis d'aborder la localisation de ces deux composés de l'épididyme par une approche immunohistochimique.

Celle-ci montre une réactivité des anticorps anti- POSVP₂₁ vis-à-vis de P_{21Ep} et P_{21Ed}, visualisée sur les coupes histologiques par la coloration brune révélée dans la partie périphérique du canal épидидymaire (proximal et distal) au niveau de l'épithélium et de la matrice extracellulaire (MEC).

L'immunolocalisation tissulaire et cellulaire de P_{21Ep} et P_{21Ed} est une donnée complémentaire alléguant la parenté immunologique entre ces deux composés et POSVP₂₁ montrée précédemment (Fig. 25).

2.3.2. Analyse des séquences peptidiques de P_{21Ep} et de P_{21Ed}

Après mise en évidence d'une parenté immunologique entre P_{21Ep}, P_{21Ed} et POSVP₂₁, nous avons procédé à la recherche d'homologies de séquences entre ces trois protéines. Les séquences peptidiques identifiées ainsi que leur analyse sont représentées en figures 27, 28 et 29.

1	MANKGPSYGM	SREVQSKIEK	KYDEELEERL	VEWIVMQCGP	DVGRPDRGRL
51	GFQVWLKNGV	ILSKLVNSLY	PEGSKPVKVP	ENPPSMVFKQ	MEQVAQFLKA
101	AEDYGVTKTD	MFQTVDLFEG	KDMAAVQRTV	MALGSLAVTK	NDGHYRGDPN
151	WFMKKAQEHK	REFTDSQLQE	GKHVIGLQMG	SNRGASQAGM	TGYGRPRQII
201	S				

Figure 27. Séquences peptidiques de P_{21Ep}.

Taux de recouvrement : **41%**

Les peptides communs avec la transgeline de *Rattus norvegicus* sont représentés en gras.

La détermination et l'analyse des séquences peptidiques de P_{21Ep} montre un recouvrement de 41% avec la séquence peptidique de la transgeline du rat *Rattus norvegicus*.

1	MANKGPSYGM	SREVQSKIEK	KYDEELEERL	VEWIVMQCGP	DVGRPDRGRL
51	GFQVWLKNGV	ILSKLVNSLY	PEGSKPVKVP	ENPPSMVFKQ	MEQVAQFLKA
101	AEDYGVTKTD	MFQTVDLFEG	KDMAAVQRTV	MALGSLAVTK	NDGHYRGDPN
151	WFMKKAQEHK	REFTDSQLQE	GKHVIGLQMG	SNRGASQAGM	TGYGRPRQII
201	S				

Figure 28. Séquences peptidiques de P_{21Ed}.

Taux de recouvrement: **48%**

Les peptides communs avec la transgeline de *Rattus norvegicus* sont représentés en gras.

Les séquences peptidiques identifiées à partir de P_{21Ed} montrent comme pour P_{21Ep} un taux de recouvrement important avec la séquence peptidique de la transgeline du rat *Rattus norvegicus* : il est de 48%.

Les alignements des séquences peptidiques de P_{21Ep} et P_{21Ed} avec la séquence peptidique de la transgéline montrent des taux de recouvrement respectifs de 41% et 48% (Fig. 27 et Fig. 28).

1	MANKGPSYGM	SREVQSKIEK	KYDEELEERL	VEWIVMQCGP	DVGRPDRGRL	R. n
	MANKGPSYGM	SREVQSKIEK	KYDEELEERL	VEWIVMQCGP	DVGRPDRGRL	POSVP ₂₁
	MANKGPSYGM	SREVQSKIEK	KYDEELEERL	VEWIVMQCGP	DVGRPDRGRL	P _{21Ep}
	MANKGPSYGM	SREVQSKIEK	KYDEELEERL	VEWIVMQCGP	DVGRPDRGRL	P _{21Ed}
51	GFQVWLKNGV	ILSKLVNSLY	PEGSKPVKVP	ENPPSMVFKQ	MEQVAQFLKA	R. n
	GFQVWLKNGV	ILSKLVNSLY	PEGSKPVKVP	ENPPSMVFKQ	MEQVAQFLKA	POSVP ₂₁
	GFQVWLKNGV	ILSKLVNSLY	PEGSKPVKVP	ENPPSMVFKQ	MEQVAQFLKA	P _{21Ep}
	GFQVWLKNGV	ILSKLVNSLY	PEGSKPVKVP	ENPPSMVFKQ	MEQVAQFLKA	P _{21Ed}
101	AEDYGVTKTD	MFQTVDLFEG	KDMAAVQRTV	MALGSLAVTK	NDGHYRGDPN	R. n
	AEDYGVTKTD	MFQTVDLFEG	KDMAAVQRTV	MALGSLAVTK	NDGHYRGDPN	POSVP ₂₁
	AEDYGVTKTD	MFQTVDLFEG	KDMAAVQRTV	MALGSLAVTK	NDGHYRGDPN	P _{21Ep}
	AEDYGVTKTD	MFQTVDLFEG	KDMAAVQRTV	MALGSLAVTK	NDGHYRGDPN	P _{21Ed}
151	WFMKKAQEHK	REFTDSQLQE	GKHVIGLQMG	SNRGASQAGM	TGYGRPRQII	R. n
	WFMKKAQEHK	REFTDSQLQE	GKHVIGLQMG	SNRGASQAGM	TGYGRPRQII	POSVP ₂₁
	WFMKKAQEHK	REFTDSQLQE	GKHVIGLQMG	SNRGASQAGM	TGYGRPRQII	P _{21Ep}
	WFMKKAQEHK	REFTDSQLQE	GKHVIGLQMG	SNRGASQAGM	TGYGRPRQII	P _{21Ed}
201	S					R. n
	S					POSVP ₂₁
	S					P _{21Ep}
	S					P _{21Ed}

Figure 29. Alignements des séquences peptidiques de la transgéline de *Rattus norvegicus*, de POSVP₂₁, de P_{21Ep} et de P_{21Ed}.

Nous notons par ailleurs que toutes les séquences peptidiques identifiées à partir de P_{21Ep} et de P_{21Ed} sont retrouvées au niveau de la séquence de POSVP₂₁.

En conclusion POSVP₂₁, P_{21Ep} et P_{21Ed} sont apparentées immunologiquement et correspondraient à la **transgéline**.

Conclusion

Nos résultats montrent que les protéines isolées, POSVP₂₁, P_{21Ep}, P_{21Ed} localisées respectivement au niveau des vésicules séminales, de l'épididyme proximal et l'épididyme distal, semblent correspondre à une seule et même protéine : la transgéline.

Discussion

Les résultats rapportés dans ce travail portent sur 2 parties essentielles :

- La détermination du site de synthèse de la protéine majeure androgénodépendante de PM apparent de 21 kDa de l'homogénat, des sécrétions des vésicules séminales et du coagulum (POSVP₂₁).
- la caractérisation et l'identification de POSVP₂₁ et des 2 protéines épидидymaires (P_{21Ep} et de P_{21Ed}).

I. Site de synthèse de POSVP₂₁

La détermination du site de synthèse de POSVP₂₁ a été effectuée à l'aide de deux approches complémentaires (l'analyse différentielle des gels d'électrophorèse et l'immunohistochimie) qui ont permis de montrer que POSVP₂₁, protéine exprimée en période de reproduction représente 22% des protéines solubles de l'homogénat et 13% de celles des sécrétions des vésicules séminales. Les anticorps anti-POSVP₂₁ obtenus après isolement et purification de la protéine ont été utilisés pour la localisation de POSVP₂₁. Cette dernière présente une distribution épithéliale et est sécrétée dans la lumière de la vésicule séminale. La mise en évidence d'une protéine de même PM apparent, traduite *in vitro* à partir des ARN totaux des vésicules séminales, semble confirmer l'origine vésiculaire de POSVP₂₁, l'épithélium serait son site de synthèse.

Les androgènes agissent sur des tissus très variés, essentiellement les tissus sexuels en contrôlant la synthèse et la sécrétion d'un petit nombre de protéines spécifiques telles que l'ABP sécrétée par le testicule (French et Ritzen, 1973) ; la PBP par la prostate (Heyns et De Moor, 1977 ; Parker et Scrace, 1978), les SEP par l'épididyme (Fournier-Delpech *et al.*, 1973 ; Caméo et Blaquier, 1976 ; Brooks et Higgins, 1980 ; Brooks, 1982) et les SVS par les vésicules séminales.

Les vésicules séminales dont la fonction est essentiellement sécrétoire (Flickinger, 1974 ; Higgins *et al.*, 1976) sont sensibles à l'action des androgènes ; cette sensibilité se traduit par une réduction significative de leur poids, ainsi que de leur contenu en ADN et en protéines en absence de testostérone. En effet, chez la souris, après 45 jours de castration, une réduction de 80% du poids des vésicules séminales, de 40% de leur contenu en ADN et de 90% de leur contenu en protéines est notée (Normand *et al.*, 1991). Par ailleurs, l'ablation des vésicules séminales chez les rongeurs entraîne une diminution significative de la fécondité et de la mobilité des spermatozoïdes dans l'utérus (Peitz et Olds Clarke, 1986 ; Cukierski *et al.*, 1991).

Chez le rat des sables, la période de reproduction s'étend du début de l'automne à la fin du printemps, période caractérisée par une abondance alimentaire et hydrique, qui permet d'assurer un bon déroulement de la fonction de reproduction et de couvrir tous les besoins énergétiques. La sensibilité de la vésicule séminale aux androgènes a été démontrée par les effets de la castration qui induit des effets similaires à ceux décrits précédemment, puisqu'une diminution hautement significative du poids des vésicules séminales (62%) et du contenu protéique de ces glandes (52%) est observée après 30 jours de castration. La testostérone est dans tous les cas, le facteur essentiel de la régulation de l'expression des protéines androgénodépendantes puisque l'oestradiol, la progestérone et la corticostérone sont en général sans effet (Gernigon, 1992).

L'étude des répercussions biochimiques des variations saisonnières et du degré d'androgénodépendance des différents organes du tractus génital mâle (vésicule séminale,

épididyme, canal déférent, testicule) a permis de mettre en évidence la présence d'une protéine androgénodépendante de 21 kDa désignée par POSVP₂₁ (*Psammomys obesus* seminal vesicles protein of 21 kDa) abondamment exprimée dans la vésicule séminale et dans les sécrétions pendant la période de reproduction (Gernigon, 1992).

POSVP₂₁ présente des caractéristiques communes avec de nombreuses protéines impliquées dans le mécanisme de la reproduction : (i) androgénodépendance, (ii) abondance dans les sécrétions et (iii) présence dans le bouchon vaginal, justifiant l'intérêt particulier qu'elle suscite dans la problématique globale de la reproduction du rat des sables.

Chez le rat des sables, la composition protéique de la vésicule séminale semble complexe ; l'homogénat des protéines solubles en période de reproduction montre la présence d'une trentaine de protéines, parmi lesquelles, 9 sont des composés majoritaires, dont POSVP₂₁ induite par la testostérone.

POSVP₂₁ présente une expression saisonnière ; elle est exprimée en période de reproduction et représente 22% des protéines solubles totales de l'homogénat de la vésicule séminale. Son taux est estimé à 13% en fin de période de reproduction, il atteint une proportion de 5% seulement en période de régression hormonale et s'annule en période de repos sexuel.

La variabilité d'expression temporelle de POSVP₂₁ s'expliquerait par la sensibilité de la vésicule séminale aux androgènes, par le cycle saisonnier pondéral que présente ces glandes chez le rat des sables (Khammar, 1987; Amirat, 1989) et essentiellement par la réduction significative du contenu protéique des vésicules séminales pendant la période de repos (Gernigon, 1992).

Chez *Psammomys obesus*, une réduction importante du taux de POSVP₂₁ est observée entre le début de la période de reproduction et la période de régression hormonale, elle est estimée à 17.2%.

Au cours de la période de régression hormonale, une involution des vésicules séminales exprimée par une importante réduction pondérale est observée (60%). Cette sensibilité de la vésicule séminale aux androgènes a été également notée chez la souris (Normand *et al.*, 1991).

Higgins *et al.*, en 1976 ont montré une réduction très importante des protéines de l'ensemble des vésicules séminales et des glandes coagulantes (90%), qui se traduit également par une involution des vésicules séminales. Cette involution résulte en fait d'une régression cellulaire, d'une perte de cellules et d'une disparition des récepteurs des androgènes (Rennie *et al.*, 1984).

Chez les rongeurs, particulièrement chez la souris, les sécrétions des vésicules séminales sont responsables de la formation du bouchon vaginal (Williams-Aschman, 1984). Elles influent sur le métabolisme, la mobilité, et les propriétés de la surface des spermatozoïdes. Elles induisent la capacitation et suppriment l'immunocompétence au niveau du tractus génital femelle (Manco et Abrescia, 1988 ; Peitz, 1988 ; Metafora *et al.*, 1989). Les sécrétions des vésicules séminales fournissent en outre, les principaux composants impliqués dans la constitution de la masse gélatineuse enveloppant les spermatozoïdes éjaculés, telle que la séménogéline et des fibronectines I et II (Lilja *et al.*, 1989 ; Lilja et Lundwall, 1992).

Les protéines sécrétées par les vésicules séminales ont fait l'objet de nombreux travaux chez le rat, et des études de résolution structurale et d'identification de gènes impliqués dans la synthèse de ces protéines ont permis de montrer l'implication de certaines d'entre elles dans la fertilité (Higgins *et al.*, 1981 ; Kistler *et al.*, 1981 a ; Mansson *et al.*, 1981 ; Kandala *et al.*, 1983 ; Williams *et al.*, 1983).

Pour le rat des sables, la comparaison des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat et des sécrétions des vésicules séminales montre la présence de 3 protéines majeures communes ; il s'agit des composés de PM apparent de : **41 kDa, 21 kDa (POSVP₂₁)** et **14.4 kDa**. Deux protéines de poids moléculaire apparent de **35 kDa** et **36 kDa** se retrouvent uniquement au niveau des sécrétions (Gernigon *et al.*, 1994).

Parmi ces protéines, seule POSVP₂₁ est induite par la testostérone ; elle présente une différence quantitative dans l'homogénat (22%) par rapport aux sécrétions (13%). Ce qui laisse supposer que la majeure partie de la protéine présente dans l'homogénat (tissu + sécrétions) serait constituée de la protéine sous forme sécrétée. Des résultats similaires sont obtenus chez la souris, où cinq protéines de PM compris entre 12 kDa et 16 kDa, mises en évidence dans l'homogénat de la vésicule séminale sont abondamment exprimées dans les sécrétions (Normand *et al.*, 1989 ; 1991).

L'analyse des résultats rapportés dans cette première partie laisse supposer qu'au niveau de la vésicule séminale, **l'épithélium serait le siège de synthèse de POSVP₂₁ ; la majeure partie de cette protéine serait sécrétée.** »

Cette hypothèse sera vérifiée ultérieurement, puisqu'une réponse définitive ne pourra être apportée qu'après détermination du ou des site(s) potentiel(s) de synthèse de cette protéine par immunohistochimie, l'analyse des ARN et par l'hybridation *in situ*.

Il faut souligner cependant, que les protéines spécifiques du tractus génital ne semblent pas présenter la même dépendance vis-à-vis des androgènes. En effet, l'analyse des profils protéiques nous a permis de montrer, la présence dans l'homogénat de vésicules séminales d'une protéine majeure de PM apparent de 45 kDa exprimée en période de repos présentant une variation saisonnière et réprimée par la testostérone (Gernigon, 1992).

Chez *Psammomys obesus*, seule la protéine de 45 kDa de la vésicule séminale présente ce type de régulation.

Des protéines réprimées par les androgènes ont été étudiées chez le rat et la souris. En effet, chez ces rongeurs, la castration induit l'apparition de nouvelles protéines au niveau de la prostate (Montpetit *et al.*, 1986 ; Lee et Sensibar, 1987) ainsi qu'une augmentation de l'activité enzymatique de la ribonucléase (Engel *et al.*, 1980), de la cathepsine D (Tanabe *et al.*, 1982) et de l'activateur du plasminogène (Rennie *et al.*, 1984). Ceci suggère que certains gènes qui sont normalement réprimés dans la prostate, seraient responsables de l'autolyse active qui apparaît après la suppression des androgènes (Leger *et al.*, 1987).

Des protéines de ce type ont été mises en évidence également chez la souris, aussi bien chez l'adulte que chez l'animal immature (Normand, 1991).

Il existe donc dans les organes sexuels une régulation différentielle de la synthèse protéique par les androgènes.

Du point de vue histologique, la vésicule séminale du rat des sables, est caractérisée pendant la période de reproduction, par un compartiment épithélial très étendu, formant de nombreux replis convergeant à l'intérieur d'une lumière large remplie de sécrétions abondantes.

L'étude de l'immuno-expression de POSVP₂₁ au niveau de la vésicule séminale pendant cette période a montré que POSVP₂₁ est présente :

- dans le compartiment épithélial et plus précisément au niveau cytoplasmique.
- dans la sécrétion au niveau de la lumière de la vésicule séminale.

Nous notons en outre, que POSVP₂₁ est exprimée avec une intensité variable selon sa localisation. Elle est plus abondante dans les sécrétions qu'au niveau de l'épithélium.

Dans les tissus constitutifs de la vésicule séminale, la distribution de POSVP₂₁ semble restreinte à l'épithélium. En effet POSVP₂₁ n'est retrouvée, ni au niveau du tissu conjonctif, ni au niveau du stroma fibro-musculaire. Cette distribution strictement épithéliale est retrouvée pour les protéines vésiculaires : MSVSP99 décrite chez la souris (Morel *et al.*, 2001) et P14 et P20 chez le taureau (Fernandez-Juan *et al.*, 2006).

En ce qui concerne la répartition de POSVP₂₁ au niveau cellulaire, elle serait essentiellement cytoplasmique.

Une immuno-expression de POSVP₂₁ nettement plus faible que celle notée en période de reproduction est retrouvée à la fin de l'été (fin de période de repos et début de période de reproduction). Elle correspondrait probablement à la reprise de la fonction de reproduction. Au cours de cette phase, POSVP₂₁ est faiblement exprimée au niveau de l'épithélium et n'est pas retrouvée dans les sécrétions.

Ceci semble conforter les résultats obtenus lors de travaux antérieurs montrant que l'épithélium des vésicules séminales, longtemps après castration (situation équivalente à l'état de repos sexuel), conservait son activité sécrétrice ; mais que les cellules ne libéraient pas leur sécrétion dans la lumière (Gernigon, 1992).

L'étude de POSVP₂₁ par l'approche immunohistochimique montre une répartition limitée à l'épithélium et à la lumière de la vésicule séminale.

Cette expression de POSVP₂₁ restreinte à l'épithélium, laisse envisager son implication dans les processus cellulaires liés à l'activité reproductrice et suggère une spécificité tissulaire vis-à-vis de l'épithélium, comme c'est le cas pour la protéine constitutive des sécrétions, synthétisée par les cellules épithéliales de la vésicule séminale chez le cochon d'inde (Hudson, 1992) et pour MSVSP99, protéine de 14 kDa sécrétée par les cellules épithéliales et spécifique de la vésicule séminale de souris (Morel *et al.*, 2001). Une autre protéine majeure du coagulum du plasma séminal de l'homme et de la souris : la séménogéline, est produite également en grande quantité par les cellules épithéliales des vésicules séminales. (Yoshida *et al.*, 2008).

Il faut souligner par ailleurs, que chez les rongeurs déserticoles caractérisés par leur adaptation aux conditions extrêmes, la reproduction montre des fluctuations saisonnières. Des variations saisonnières histo-cyto-physiologiques et biochimiques ont été notées au niveau du tractus génital mâle du rat des sables (*Psammomys obesus*) (Gernigon, 1992) ainsi que chez d'autres espèces déserticoles, telles que la gerbille (*Gerbillus gerbillus*) (Kassir, 1983 ; Belkacemi, 1988). Les modifications histologiques saisonnières observées chez ces espèces sont corrélées aux cycles hormonaux (testostéronémie testiculaire et plasmatique) (Khammar et Brudieux, 1984, 1987, 1989 ; Khammar, 1987 ; Zaime *et al.*, 1992 ; Boufermes, 1997 ; Mataoui, 2006).

Ainsi, l'épithélium de la vésicule séminale, siège probable de synthèse de POSVP₂₁ est sujet à des modifications histologiques. En effet, pendant la période de reproduction, le

compartiment épithélial est très étendu et présente un aspect différent de celui observé en période de repos sexuel. Il est caractérisé par la présence de nombreux replis convergeant à l'intérieur d'une lumière large occupée par une sécrétion abondante. Les cellules principales de l'épithélium présentent une zone supra nucléaire, bien développée et riche en granulations. Ces caractéristiques histologiques témoignent d'une importante activité de synthèse, visualisée par les sécrétions abondantes qui occupent la lumière de la vésicule séminale et qui persistent pendant la période de repos.

La paroi fibro-musculaire à l'inverse de l'épithélium, ne subit aucune modification et présente le même aspect qu'en période de repos sexuel. Les protéines androgéno-dépendantes du tractus génital mâle sont synthétisées par les cellules épithéliales ; les variations observées dans leur expression seraient le résultat de modifications du compartiment épithélial, plutôt qu'à celles du stroma (Normand, 1991).

Ces observations ne semblent pas se généraliser à tous les rongeurs, en effet, contrairement à *Psammomys obesus*, des variations saisonnières structurales affectant tous les constituants histologiques des vésicules séminales sont notées chez d'autres rongeurs déserticoles, le mérion *Meriones crassus* (Belhocine et Gernigon, 1994 ; Belhocine, 1998) et la gerbille (*Gerbillus gerbillus*) (Belkacemi, 1988). Des observations similaires sont décrites au niveau des vésicules séminales chez le Hamster doré soumis à une photopériode courte (Schindelmeister et al., 1988).

Pour *Psammomys obesus*, l'hypothèse que le compartiment épithélial constitue le site de synthèse de POSVP₂₁ a été confortée par les expériences de traduction *in vitro*. En effet parmi les protéines traduites à partir des ARN totaux de vésicules séminales, un composé majeur de même mobilité électrophorétique que POSVP₂₁ est mis en évidence. Ceci suggérerait l'existence dans la vésicule séminale d'un ARNm majeur, capable de produire *in vitro* un composé de même poids moléculaire apparent que POSVP₂₁ et confirmerait par conséquent l'origine vésiculaire de cette protéine (Gernigon, 1992).

Généralement, les protéines sécrétées sont présentes dans les cellules eucaryotes sous deux formes :

- une pré-protéine, transitoire, qui est internalisée dans la machinerie de sécrétion (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) par clivage d'un peptide signal N-terminal,
- une protéine mature, sécrétée, de poids moléculaire inférieur.

Les pré-protéines possèdent un peptide signal permettant leur sécrétion ou leur transport dans les différents compartiments cellulaires. Le peptide est clivé lors de la maturation de la protéine, d'où une migration électrophorétique légèrement différente de celle de la protéine mature (Hortsch et Meyer, 1986).

Le composé de 21 kDa traduit *in vitro* correspond à une protéine non mature, car le lysat de réticulocytes ne contient pas les éléments nécessaires à la maturation post-traductionnelle des protéines traduites.

Pour POSVP₂₁, protéine mature synthétisée *in vivo* et le composé de 21 kDa, pré-protéine traduite *in vitro*, nous avons noté la même mobilité électrophorétique.

La traduction *in vitro* d'un composé de même mobilité électrophorétique que POSVP₂₁, laisse donc supposer que la séquence signal nécessaire à la sécrétion et/ou au transport de la protéine est de très faible taille ou inexistante pour générer une différence détectable par

électrophorèse. Ceci laisse envisager pour POSVP₂₁, un mode de sécrétion apocrine, ne nécessitant pas de peptide signal, comme cela a été décrit dans le cas de protéines des vésicules séminales, de l'épididyme et du canal déférent du taureau (Agrawal et Vanha-Pertulla, 1988), de la transglutaminase des glandes coagulantes du rat (Seitz et al., 1990 ; Steinhoff et al., 1994) ainsi que pour MVDP, protéine du canal déférent de souris (Manin et al., 1995) .

Pour ce modèle de sécrétion, des protusions se forment sur la partie apicale des cellules épithéliales puis se détachent, constituant ainsi des vésicules remplies de matériel cytoplasmique (Agrawal et Vanha-Pertulla, 1988). Ce mode de sécrétion apocrine entraînerait une utilisation différée des produits de sécrétion, dont la libération serait assurée par les nombreuses enzymes lytiques, présentes dans le fluide épидидymaire, telles que les phosphatases (Frenette *et al.*, 1986), les glucosidases (Jauhiainen et Vanha-Pertulla, 1986), les peptidases (Agrawal et Vanha-Pertulla, 1986) ou estérases (Abou-Haïla et Fain-Maurel, 1986).

A ce niveau d'investigation, POSVP₂₁ peut être considérée comme un produit « spécifique » de la vésicule séminale.

Sa distribution cytoplasmique et sa présence dans la lumière sous une forme sécrétée, suggèrerait un passage vers le milieu extérieur et une sécrétion de type apocrine.

II. Caractérisation et identification de POSVP₂₁

Dans cette partie, nous avons caractérisé et identifié POSVP₂₁ par une approche protéomique. POSVP₂₁ est une protéine acide représentée par 4 polypeptides de pHi compris entre 4 et 7. Les séquences peptidiques identifiées ont montré une forte homologie avec la séquence peptidique de la transgéline de *Rattus norvegicus*.

Nous avons montré également que deux protéines de 21 kDa (P_{21Ep} et P_{21Ed}) mises en évidence dans l'épididyme, présentent une parenté immunologique avec POSVP₂₁ et sont localisées dans le compartiment épithélial et dans la matrice extracellulaire. L'analyse de leurs séquences peptidiques a montré, comme pour POSVP₂₁ une forte homologie avec la séquence peptidique de la transgéline de *Rattus norvegicus*.

1. Caractérisation de POSVP₂₁

Chez le rat des sables, la période de reproduction est caractérisée par des variations biochimiques importantes. Au cours de cette période, le protéome de la vésicule séminale varie considérablement en fonction des états physiologiques des animaux. En effet, le nombre de protéines exprimées au début de la période de reproduction est nettement supérieur à celui exprimé à la fin de cette même période.

Comme nous l'avons montré dans la première partie de notre travail (Chapitre III), ces variations se répercutent sur l'expression de POSVP₂₁ qui est abondamment exprimée en période de reproduction, très réduite en période de régression hormonale et absente en période de repos sexuel.

L'analyse du protéome de la vésicule séminale pendant la période de reproduction montre que POSVP₂₁ apparaît sous forme de 4 spots de poids moléculaire égal ou voisin de 21 kDa, dont le pHi est compris entre 4 et 7.

En période de repos, les spots correspondant à POSVP₂₁ sont absents.

Ce qui suggère que les quatre spots mis en évidence dans la zone de 21 kDa correspondent à POSVP₂₁.

Cette hypothèse est confirmée au cours d'une étape ultérieure par l'analyse d'un gel 2-D de POSVP₂₁ purifiée, où 4 spots protéiques distincts par leur point isoélectrique, leur poids moléculaire et leur teneur relative sont présents ; POSVP₂₁ est une protéine acide représentée par quatre polypeptides.

Concernant **l'hétérogénéité du poids moléculaire** des 4 spots constitutifs de POSVP₂₁ (a, b, c ont un PM de 21 kDa et d de 20,1 kDa), l'hypothèse que le spot (d) de 20,1 kDa soit le résultat d'une dégradation enzymatique d'un polypeptide de 21 kDa peut être écartée, car les extraits protéiques sont préparés en présence d'inhibiteurs de protéases.

L'hétérogénéité du point isoélectrique des 4 spots « a », « b », « c » et « d » suggère l'existence de 4 isoformes. Cette hétérogénéité serait probablement due à des modifications post-traductionnelles, qui sont fréquentes au niveau du tractus génital mâle (Huong *et al.*, 2007) et peuvent être confortées par l'analyse des séquences peptidiques. L'identification de sites potentiels de glycosylation et/ou de phosphorylation au niveau de la séquence peptidique de POSVP₂₁ permettrait d'expliquer cette micro hétérogénéité. En effet, la micro hétérogénéité électrophorétique de protéines, telles que l'ABP (androgen binding protein) du rat et la TeBG (testosterone binding globulin) du lapin est due à des différences de la glycosylation de leurs sous unités (Danzo et Bell, 1988 ; Danzo *et al.*, 1989).

2. Identification de POSVP₂₁

L'analyse des séquences peptidiques de POSVP₂₁ montre une forte homologie avec la séquence peptidique de la **transgéline** du rat *Rattus norvegicus*. En effet, les 14 séquences peptidiques identifiées au niveau de POSVP₂₁ sont toutes retrouvées au niveau de la séquence peptidique de la transgéline et présentent un taux de recouvrement de 62%, ce qui représente les 2/3 de la séquence totale de la transgéline.

L'identification du domaine « **calponine** » au niveau de la séquence peptidique de POSVP₂₁ (AA₂₄ à AA₁₃₉) laisse envisager l'implication de cette protéine dans la liaison à l'actine. En effet, parmi les séquences de POSVP₂₁ identifiées, 9 d'entre elles couvrent le « **domaine calponine** » de la transgéline de *Rattus norvegicus*.

Parmi les protéines liant l'actine, la calponine (CaP) fut la première à être isolée à partir du muscle lisse du gésier de poulet, elle interagit avec les filaments de la F-actine et de la calmoduline (Takahashi *et al.*, 1986). La calponine et la transgéline sont exprimées de façon synchrone pendant la différenciation cellulaire du muscle lisse (Gimona *et al.*, 1992).

La liaison à l'actine est possible grâce à la présence d'un site potentiel de fixation à l'actine comprenant quatre acides aminés chargés positivement (Prinjha *et al.*, 1994 ; Shapland *et al.*, 1993). Ce site a été identifié au niveau d'un certain nombre de protéines liant l'actine. (Castresana and Saraste, 1995). Le domaine potentiel de fixation à l'actine, contient environ 100 acides aminés, il constitue le domaine CH (calponin homology domain).

La séquence peptidique de la transgéline montre un peptide signal de 6 pmoles, dont la séquence en acides aminés est : KGPSYGMSREV (Shapland *et al.*, 1993), cette séquence semblerait unique. En effet, malgré le haut degré d'homologie avec SM22 α , la protéine de 22 kDa du muscle lisse et avec la calponine, les séquences en acides aminés des séquences signal respectives sont nettement différentes du peptide signal de la transgéline, la séquence du peptide signal de la SM22 α , étant ANKGPAYGMSRDV (Pearlstone *et al.*, 1988) et celle de la calponine, RGPAYGLSAEV (Vancompernelle *et al.*, 1990).

Pour POSVP₂₁, l'existence d'un peptide signal n'a pas été montrée, cependant l'hypothèse d'un peptide signal de faible taille a été évoquée, cette hypothèse semble concorder avec ces données.

Par ailleurs, la transgéline de *Rattus norvegicus* présente 96% d'identité avec la séquence peptidique de la transgéline humaine. Les acides aminés qui la distinguent de la transgéline de l'homme (l'AA₇ ; l'AA₃₅ ; l'AA₃₆ et l'AA₃₇ et l'AA₁₆₅) sont cependant bien conservés au niveau de la séquence peptidique de POSVP₂₁.

« POSVP₂₁ semble identique à la transgéline de *Rattus norvegicus* et proche de la transgéline humaine. »

Après caractérisation et identification de POSVP₂₁, nous avons montré l'existence d'une parenté immunologique entre POSVP₂₁ et 2 protéines épидидymaires P_{21Ep} et P_{21Ed} de même PM apparent localisées dans l'épithélium et dans la MEC de l'épididyme.

L'existence d'une parenté immunologique entre P_{21Ep}, P_{21Ed} et POSVP₂₁ suggère que P_{21Ep}, P_{21Ed} seraient des protéines identiques ou proches de POSVP₂₁.

POSVP₂₁ pourrait donc avoir deux sites de synthèse distincts : **un site vésiculaire** et **un site épидидymaire**.

Le degré de cette parenté immunologique a pu être déterminé par l'identification et l'analyse des séquences peptidiques de P_{21Ep} et P_{21Ed} qui a montré également, comme pour POSVP₂₁ un recouvrement important des séquences peptidiques de ces deux composés avec la transgeline du rat *Rattus norvegicus* (P_{21Ep}: 41 %) et (P_{21Ed}: 48%).

Les trois protéines de PM apparent de 21 kDa mises en évidence, dans la vésicule séminale (POSVP₂₁) et dans l'épididyme (P_{21Ep} et P_{21Ed}) de *Psammomys obesus* sont apparentées à la transgeline de *Rattus norvegicus*.

La transgeline a été identifiée pour la première fois en 1987 au niveau des cellules musculaires lisses du gésier chez le poulet (Lees-Miller *et al.*, 1987a et 1987b). Elle doit son nom au fait qu'elle soit impliquée dans la transformation et la gélification de l'actine (Shapland *et al.*, 1993). C'est une protéine de 22 kDa connue sous le nom de SM22 (smooth muscle protein 22) (Kim *et al.*, 1997). Elle a été identifiée chez plusieurs espèces et est connue sous différentes codifications:

- mouse p27 (Almendral *et al.*, 1989),
- mp-20 (Ayme- Southgate *et al.*, 1989),
- WS3-10 (Thweatt *et al.*, 1992),
- TAGLN (Lawson *et al.*, 1997),
- SM22 (Kim *et al.*, 1997),
- Scp1p (Goodman *et al.*, 2003 ; Winder *et al.*, 2003) et
- Stg 1 (Kentaro *et al.*, 2005).

Chez l'homme, le gène de la transgeline a été identifié et localisé au niveau du chromosome 11 q23.2 (Camoretti-Mercado *et al.*, 1998). Ce gène serait bien conservé au cours de l'évolution, puisque la transgeline est retrouvée aussi bien chez les **organismes unicellulaires** tels que les levures WS3-10 (Thweatt *et al.*, 1992), Scp1p (Goodman *et al.*, 2003 ; Winder *et al.*, 2003), les **invertébrés** (mollusques, crustacés) que chez les **vertébrés** mouse p27 (Almendral *et al.*, 1989) et SM22 (Kim *et al.*, 1997).

La séquence peptidique de SM22 α a été identifiée chez plusieurs espèces de mammifères ; chez la souris cette séquence est constituée de 204 acides aminés et présente 98%, 97% et 84% d'identité avec les séquences peptidiques respectives de la transgeline du rat, de l'homme et du poulet (Li *et al.*, 1995).

Le gène de SM22 α présente une homologie avec le gène de la calponine (Takahashi et Nadal-Ginard, 1991) et de la MP20 de la drosophile (Ayme-Southgate, 1989). La signification de ces homologies n'est pas connue, cependant il a été montré que le RNA messenger codant pour SM22 α possède une stricte spécificité tissulaire vis-à-vis du muscle lisse différencié (Shanahan *et al.*, 1993). Son expression au cours de l'embryogenèse constitue un des premiers marqueurs spécifiques de la différenciation des cellules musculaires lisses (Lees-Miller *et al.*, 1987 ; Shanahan *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 1995).

SM22 α jouerait un rôle dans la contractilité, probablement en agissant sur l'organisation des filaments d'actine (Zeidan *et al.*, 2004).

La transgeline est exprimée exclusivement dans les cellules musculaires lisses chez de nombreux vertébrés adultes. Elle fait partie de la famille des protéines qui lient l'actine et interviennent dans sa polymérisation (Li *et al.*, 1995).

C'est une protéine qui présente la particularité de se lier directement aux filaments d'actine avec un ratio de 1 pour 6 monomères d'actine et une constante d'association de $7.5 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ (Shapland *et al.*, 1993). L'existence d'une relation entre le rôle de la transgeline et le maintien de la stabilité de l'actine a été suggérée par plusieurs auteurs qui ont montré que la SM22/transgeline (protéine caractéristique des vertébrés), comme la Scp1p, identifiée chez (*Saccharomyces cerevisiae*), coopère avec la fibrine pour stabiliser et organiser l'actine du cytosquelette (Ayme-Southgate *et al.*, 1989 ; Goodman *et al.*, 2003).

Des études récentes ont montré que la transgeline identifiée dans les muscles lisses et les vaisseaux sanguins est retrouvée dans les fibroblastes et au niveau de certains épithéliums tels que :

- l'épithélium intestinal (Schields *et al.*, 2002),
- l'épithélium du canal mammaire (Schields *et al.*, 2002 ; Wulkfuhle *et al.*, 2002)
- l'épithélium glomérulaire (Ogawa *et al.*, 2007) et
- l'épithélium de la prostate (Yang *et al.*, 2007).

Ces données confortent donc nos résultats, puisque chez *Psammomys obesus*, aussi bien dans la vésicule séminale qu'au niveau de l'épididyme, la transgeline est retrouvée dans l'épithélium.

La transgeline ne semble pas requise pour le développement du muscle lisse, mais plutôt pour sa contraction calcium-indépendant (Assinder *et al.*, 2008 ; Nair *et al.*, 2008).

L'**actine** constitue le composant principal des microfilaments du cytosquelette. C'est un élément crucial pour de nombreux événements cellulaires, tels que la mobilité, la division cellulaire et les mouvements des récepteurs présents à la surface cellulaire (Schliwa, 1981 ; Stossel *et al.*, 1989 ; Way *et al.*, 1990 ; Weeds, 1982). L'importante distribution de la transgeline au niveau des filaments d'actine plaide en faveur d'un rôle important de cette protéine dans l'organisation du cytosquelette au niveau des tissus adultes normaux (Li *et al.*, 2008).

Un large éventail d'études physiologiques et biochimiques confirme par ailleurs, l'existence de mécanismes secondaires additionnels dépendant du Ca^{2+} qui peuvent modifier ou participer à la régulation de l'état contractile de la cellule musculaire lisse.

Parmi ces mécanismes :

- la calponine, protéine liant l'actine, la tropomyosine et la calmoduline;
- la caldesmone, protéine liant l'actine, la myosine, la tropomyosine et la calmoduline;
- la protéine kinase dépendante du Ca^{2+} et des phospholipides (protéine kinase C).

Le cytosquelette constitue un réseau protéique en trois dimensions, réparti à travers le cytoplasme des cellules eucaryotes, dont les constituants sont décrits comme un système de « câbles » cytoplasmiques classés en trois groupes selon leur taille : les microfilaments (de 7 nm d'épaisseur) ; les filaments intermédiaires (de 10 nm d'épaisseur) et les microtubules (de 25 nm de diamètre).

Le réseau protéique du cytosquelette assure plusieurs fonctions : les mouvements cellulaires, le soutien et la résistance de la cellule, ainsi que l'adhérence entre cellules et entre cellules et matrice extracellulaire.

L'assemblage des monomères d'actine en filaments et l'organisation de ces filaments en épais faisceaux sont contrôlés par différents types de protéines « de liaison de l'actine » (Craig *et al.*, 1982 ; Pollard *et al.*, 1986 ; Kierszenbaum, 2002). En effet, les cellules eucaryotes expriment, un grand nombre de protéines impliquées dans le contrôle de l'architecture et de l'environnement du cytosquelette. La transgeline fait partie de ces protéines liant l'actine (Nakano *et al.*, 2005) .

Elle semble jouer un rôle important dans les fonctions circulatoire, urogénitale, respiratoire et digestive. La détermination de sa structure cristalline caractérisée par la présence du domaine CH, permettrait dans un futur proche de préciser le rôle de cette protéine dans la liaison à l'actine (Li *et al.*, 2008).

3. Rôle de la transgeline dans les vésicules séminales

Les vésicules séminales sont des organes androgénodépendants (Aumüller, 1979) constitués de deux composants essentiels : le stroma fibro-musculaire et l'épithélium, dont la proportion et l'aspect varie au cours du développement et en fonction du stade physiologique de la reproduction. Ces deux compartiments sont caractérisés par une sensibilité différente aux hormones : l'épithélium est le tissu cible des androgènes, le stroma celui des oestrogènes (Gaytan *et al.*, 1986 ; Neubauer et Mawhinney 1981).

L'androgénodépendance des vésicules séminales est démontrée par la présence de récepteurs aux androgènes au niveau des cellules épithéliales, des cellules conjonctives et des cellules musculaires lisses (Pelletier *et al.*, 2000 ; Yamashita, 2004).

Chez les rongeurs déserticoles, l'absence de testostérone, résultant de la castration induit une régression des vésicules séminales, similaire à celle observée en période de repos. Pendant la phase de repos, la testostérone se trouve à une concentration insuffisante pour permettre le maintien de la structure et de la fonction de la glande, c'est le cas de *Psammomys obesus* (Gernigon-Spychalowicz, 1992), de *Meriones crassus* (Belhocine, 1998) et de *Gerbillus gerbillus* (Boufermes, 1997 ; Mataoui, 1999).

L'aspect histologique des vésicules séminales de *Psammomys obesus* pendant la période de reproduction est différent de celui observé en période de repos.

L'épithélium présente des replis importants caractérisés par des cellules principales mesurant 30 à 50 μm et des noyaux occupant le tiers basal de la cellule. Ces cellules sont caractérisées par une zone supra nucléaire très développée et éosinophile.

Contrairement au compartiment épithélial, le stroma ne subit pas de modifications. Cependant, cette situation ne semble pas se généraliser à tous les rongeurs, puisque chez le mérion de Libye *Meriones libycus*, un autre rongeur déserticole, des effets différents sont notés au niveau du stroma de la vésicule séminale. En effet, une hypertrophie de la paroi fibro-musculaire et une désorganisation des cellules musculaires lisses sont observées pendant la période de reproduction. Chez ce rongeur, la persistance de l' α -actine dans le cytoplasme des cellules musculaires lisses des vésicules séminales en période de repos et après castration, ne semble pas refléter à elle seule le maintien de l'état contractile de ces cellules (CMLs) ; d'autres protéines telles que la myosine et la smootheline pourraient être impliquées ; leur absence entraverait la faculté contractile des CMLs (Belhocine *et al.*, 2007). Ces changements morphologiques traduiraient une altération du cytosquelette et probablement des jonctions cellulaires ainsi qu'une accumulation des organites de la synthèse des protéines, tel qu'il a été montré pour les CMLs de la prostate du rat castré (De Carvalho *et al.*, 1997a).

La transgeline, protéine exprimée exclusivement au niveau des cellules du muscle lisse chez l'adulte (Li *et al.*, 1995), dont la présence et la localisation au niveau de l'épithélium de la

vésicule séminale du rat des sables, suggérerait un passage dans le milieu extra cytoplasmique et son implication dans l'organisation du cytosquelette des cellules musculaires lisses, permettant ainsi le maintien de la structure et de l'état contractile de la vésicule séminale.

L'état contractile de la vésicule séminale, est observé lors de l'éjaculation ; en effet, sous l'action de la stimulation nerveuse orthosympathique des fibres musculaires lisses, les sécrétions élaborées et stockées dans la lumière de la vésicule séminale sont libérées, cette dernière est ainsi vidée.

Les protéines spécifiques des sécrétions des vésicules séminales constituent les composants essentiels du liquide séminal et sont impliquées dans des processus complexes tels que :

- la coagulation et la liquéfaction du plasma séminal (Lilja, 1990 ; De Lamirande, 2001 ; Malm *et al.*, 2007),
- la formation d'une couche protéique autour des spermatozoïdes entraînant des modifications au niveau de leur structure fine et de leur mobilité (Weil, 1965 ; Rufo *et al.*, 1982 ; De Lamirande et Gagnon, 1984 ; Foresta *et al.*, 1986 ; Schivaji, 1986 ; Scheit *et al.*, 1988).
- l'effet immunosuppresseur du plasma séminal (Peitz, 1988 ; Gonzalez, 2001 ; Wang et Zhang, 2007).

Hormis leurs rôles dans le tractus génital mâle, les sécrétions des vésicules séminales jouent un rôle dans les voies génitales femelles, au niveau desquelles, elles sont impliquées dans la stimulation de la motilité des muscles lisses (Clavert *et al.*, 1985).

Chez *Psammomys obesus*, au niveau du tractus génital femelle, la protéine de 21 kDa entre dans la constitution du coagulum (Gernigon, 1992). L'importance des protéines du coagulum dans la progression des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles a été montrée par Cukierski et ses collaborateurs (1991) ; elles jouent également un rôle dans la stabilité de la chromatine des spermatozoïdes (Richthoff *et al.*, 2002). Dans le coagulum, l'absence de la protéine de 21 kDa (transgeline) aurait donc des répercussions sur la motilité des muscles lisses des voies génitales femelles, sur la mobilité des spermatozoïdes et par conséquent sur la fécondité.

La présence de la transgeline dans les sécrétions des vésicules séminales et dans le coagulum, lui conférerait probablement un rôle dans la physiologie du plasma séminal et des spermatozoïdes de *Psammomys obesus*.

Il faut souligner toutefois qu'au cours de ces différents processus, les spermatozoïdes stockés dans le canal déférent, se trouvent en présence des sécrétions de la prostate et des vésicules séminales. Au contact de ces différents fluides, les propriétés des spermatozoïdes peuvent être modifiées, d'où la difficulté de l'analyse et de la détermination du rôle des protéines sécrétées et spécifiques des vésicules séminales (Balerna *et al.*, 1984).

4. Rôle de la transgeline dans l'épididyme.

L'épididyme, comme le reste du tractus génital, est sous le contrôle des androgènes qui assurent le maintien de sa structure et de ses fonctions (Brandes, 1974).

Chez les mammifères, l'épididyme assure une variété de fonctions dont dépend directement la fertilité et la viabilité des spermatozoïdes, il est indispensable à la maturation des spermatozoïdes. Parmi les nombreux composants du fluide épидидymaire, les protéines

spécifiquement synthétisées par cet organe sont un élément clé de la maturation des spermatozoïdes (Turner *et al.*, 1979).

Au cours de leur transit épидидymaire, les spermatozoïdes subissent des modifications structurales, biochimiques et métaboliques (Bedford, 1975-1979 ; Oliphant et Singhas, 1979 ; Jones *et al.*, 1980 ; Courot, 1981 ; Orgebin-Crist, 1986 ; Robaire et Hermo, 1988).

Leur mobilité devient directionnelle dans la région distale de la tête ou proximale du corps (Hoskins *et al.*, 1975 ; Hinton *et al.*, 1979 ; Dacheux et Paquignon, 1980 ; Dacheux *et al.*, 1983). Leur pouvoir d'adhésion à la zone pellucide et leur aptitude à la fécondation se manifestent progressivement au niveau du corps et de la partie proximale de la queue de l'épididyme chez la souris (Saling, 1982), le Hamster (Cuasnicu *et al.*, 1984a) et le Verrat (Peterson *et al.*, 1984).

Ce processus séquentiel de maturation des spermatozoïdes dépend essentiellement de l'environnement favorable offert par le fluide épидидymaire dont la composition est conditionnée par les fonctions d'absorption et de sécrétion des cellules épithéliales de l'épididyme (Hamilton, 1975 ; Fournier-Delpech *et al.*, 1982 ; Fournier-Delpech et Thibault, 1991).

Les activités cellulaires d'absorption, de concentration et de synthèse protéique, permettent l'élaboration d'un milieu intra tubulaire constituant le liquide dans lequel baignent les spermatozoïdes (Dacheux et Paquignon, 1981).

L'épididyme produit un certain nombre de protéines spécifiques différentes de celles du plasma sanguin et des fluides entrant dans l'épididyme (Brooks et Higgins, 1980 ; Kohane *et al.*, 1983). Ces protéines sont caractérisées par leur androgénodépendance, la régionalisation de leur synthèse ; elles sont généralement de faible poids moléculaire et sont souvent glycosylées (Cuasnicu *et al.*, 1984a).

Un grand nombre de protéines spécifiques de l'épididyme a été mis en évidence chez de nombreuses espèces telles que la souris (Flickinger, 1979 ; Fain-Maurel *et al.*, 1981 ; Ghyselinck *et al.*, 1989), le lapin (Moore 1981), le bélier (Jones *et al.*, 1982), le singe (Haider *et al.*, 1983) et l'homme (Tezon *et al.*, 1985), les études les plus complètes ont été réalisées chez le rat.

Chez le rat, les protéines D et E qui n'ont pas été détectées dans d'autres tissus que l'épididyme, deviennent au cours du transit épидидymaire des composants de la surface des spermatozoïdes, où elles sont localisées sur la surface antérieure de la tête et sur les parties latérales de la région post-acrosomale. Ces protéines sont caractérisées par une affinité pour les spermatozoïdes nettement supérieure à celle des protéines B et C (Brooks et Tiver, 1983). Ces protéines semblent jouer un rôle important dans l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes, puisque des spermatozoïdes traités par des anticorps dirigés contre les protéines D et E deviennent incapables de féconder les ovules (Cuasnicu *et al.*, 1984b).

L'androgéno-dépendance des protéines D et E varie en fonction du segment de l'épididyme considéré et il a été montré, que la synthèse de ces protéines ne représentait que 2% des valeurs normales dans la tête de l'épididyme contre 35% dans la queue après 4 semaines de castration et que des ARNm codant pour ces protéines sont détectables après 3 mois de castration ; ce qui indique, que la transcription des gènes au niveau de cette région est moins sensible aux androgènes que dans la tête (Brooks *et al.*, 1986b).

De nombreux gènes épидидymaires tels que p26h sont régulés par les androgènes via des mécanismes assez complexes (Ezer et Robaire, 2003 ; Cornwall et Hann, 1995). p26h est une deshydrogénase qui intervient dans le processus métabolique de la 5 α -dihydrotestostérone et

dont la concentration diminue rapidement après castration ; elle est indétectable après 3 jours de castration (Berube *et al.*, 1996)

L'épididyme reste néanmoins, le seul organe cible directement en contact avec les hormones véhiculées à la fois par le sang et par le fluide testiculaire, ce qui explique la régulation multifactorielle que présentent certaines protéines épидидymaires.

Le contrôle de la microcirculation, du système vasculaire et des facteurs de croissance vasculaires endothéliaux par les androgènes et par les facteurs testiculaires a été aussi noté dans le testicule, l'épididyme, les vésicules séminales et la prostate du rat (Bergh *et al.*, 2001 ; Lissbrant *et al.*, 2003 ; Rudolfsson *et al.*, 2003 ; Rudolfsson *et al.*, 2004). Récemment des récepteurs aux androgènes ont été démontrés au niveau des cellules endothéliales de la prostate chez l'homme

Chez le rat des sables l'effet des androgènes sur l'épididyme est montré par des expériences de castration. Une diminution pondérale de l'épididyme distal d'environ 30% ainsi qu'une diminution significative de la concentration protéique de l'épididyme proximal (72%) et de l'épididyme distal (44%) est notée après castration. Cette diminution pondérale observée à la fin de la période de reproduction résulte de l'absence de spermatozoïdes, de la réduction du diamètre de la lumière et de la régression des replis de la muqueuse (Gernigon, 1992). Dans l'épididyme distal, la diminution importante du contenu protéique serait liée à la disparition des spermatozoïdes toujours fortement accumulés dans cette partie de l'épididyme.

Ces observations rejoignent celles décrites chez le rat, où une perte pondérale de 50% est notée après deux semaines de castration et se poursuit pendant une période de deux mois (Brooks, 1981). Il faut souligner cependant que la quantité totale des protéines solubles de l'épididyme est réduite de 73%, alors que le taux de synthèse au niveau de la tête de l'épididyme n'est diminué que de 8%.

Les androgènes contrôleraient donc le turn-over des protéines plutôt que leur synthèse (Brooks et Higgins, 1980 ; Brooks 1981). Chez la souris, la perte pondérale de l'épididyme atteint 75% en 30 jours (Abou-Haïla, 1987).

Comparés aux effets observés sur la vésicule séminale et sur la prostate, les androgènes ont relativement peu d'effets sur la synthèse des protéines totales de l'épididyme, puisque très peu de variations dans la quantité de protéines totales sont notées après castration, ce qui suggère que les androgènes ne régulent qu'une faible proportion des protéines totales (Brooks et Higgins, 1980 ; Brooks 1983a).

Chez *Psammomys obesus*, seules 4 protéines majeures de la partie proximale de l'épididyme sont induites par la testostérone ; il s'agit des protéines de PM apparent de 74 kDa ; 26 kDa ; 21 kDa ou P_{21Ep} et 13 kDa (Gernigon, 1992).

Il semblerait que du point de vue fonctionnel, la partie distale de l'épididyme participerait davantage à l'absorption de fluide, d'électrolytes et au transport transcellulaire de molécules qu'à un processus de sécrétion comme il a également été noté chez la souris (Abou-Haïla, 1987).

Actuellement, les protéines identifiées au niveau de l'épididyme, sont classées en cinq groupes fonctionnels ; leur distribution importante dans une région de l'épididyme est en relation directe avec leur(s) fonction(s).

Les protéines impliquées dans le métabolisme, se retrouvent plutôt au niveau de la tête, qui représente la première région de synthèse et de sécrétion des protéines épидидymaires (Vreeburg *et al.*, 1990 ; Turner *et al.*, 1994). La cartographie du secrétome et du protéome dans le fluide épидидymaire est établie chez de nombreux mammifères (Gatti *et al.*, 2004).

Chez *Psammomys obesus*, l'analyse des séquences peptidiques des deux protéines (P_{21Ep} et P_{21Ed}) mises en évidence au niveau de l'épididyme d'animaux adultes en période de reproduction montre comme pour POSVP₂₁, l'existence d'une forte homologie avec la **transgeline** qui constitue un marqueur spécifique de la différenciation des cellules musculaires lisses chez l'adulte (Li *et al.*, 1995).

Dans l'épididyme, P_{21Ep} et P_{21Ed} sont localisées au niveau de l'épithélium et de la matrice extracellulaire, cette dernière représente un ensemble bien organisé relié aux cellules du stroma et à l'épithélium et constitue un environnement favorable au processus de migration, de division et de différenciation cellulaire (Bosman et Stamenkovic, 2003). La présence de P_{21Ep} et P_{21Ed} dans la MEC, suggère leur implication dans l'organisation du cytosquelette des cellules musculaires lisses, permettant ainsi le maintien de la structure et l'état contractile de l'épididyme.

Sur le plan structural, l'épididyme présente des variations régionales dans l'organisation de la couche musculaire lisse responsable des contractions rythmiques péristaltiques qui mobilise les spermatozoïdes le long du canal épидидymaire.

Les portions terminales de l'épididyme (corps et queue) présentent une couche musculaire lisse circulaire interne plus épaisse et une couche longitudinale externe (Kierszenbaum, 2002). Le muscle lisse de l'épididyme est bordé par un épithélium pseudo stratifié caractérisé par différents types cellulaires:

- les cellules basales qui assurent le renouvellement de l'épithélium.
- les cellules principales, caractérisées par une synthèse protéique importante et par une fonction d'absorption et de dégradation (Hamilton, 1975 ; Robaire et Hermo 1988).
- les cellules à noyau apical comprenant les cellules étroites et les cellules en gobelet riches en mitochondries.
- les cellules claires riches en lysosomes, en vacuoles autophagiques et gouttelettes lipidiques (Sun et Flickinger, 1980).

La forte homologie de P_{21Ep} et P_{21Ed} avec la transgeline de *Rattus norvegicus* et leur présence au niveau de la matrice extracellulaire, suggèrent une éventuelle action sur **la contractilité** des CML via des intégrines et induirait par conséquent **la contraction de l'épididyme lors de l'expulsion des spermatozoïdes** hors du canal épидидymaire.

Ainsi, ces résultats semblent concorder avec ceux obtenus lors d'une récente étude du protéome de l'épididyme chez la souris (Haixin Yuan *et al.*, 2005).

En effet, l'analyse protéomique combinée à la LCM (Laser Capture Microdissection) a montré que l'ARN messager de deux protéines majeures : l'ICR (inducible carbonyl reductase) et **la transgeline**, est en concentration importante exclusivement au niveau de la région caudale de l'épididyme, région au niveau de laquelle les spermatozoïdes sont stockés (Chaurand *et al.*, 2003).

La fonction de l'ICR, est clairement établie ; elle est impliquée dans le métabolisme des androgènes et dans le maintien d'un microenvironnement dans le canal épидидymaire (Haixin Yuan *et al.*, 2005).

La transgeline ou SM22 montre une augmentation graduelle de sa concentration (2 à 3 fois sa concentration normale) au niveau du muscle lisse présent autour du canal épидидymaire, le

long de la partie proximale de la région caudale. La transgeline, protéine du muscle lisse, intervenant dans la polymérisation de l'actine, avec une distribution prédominante et une concentration importante de son ARN messager dans la région caudale expliquerait son implication dans la contraction de l'épididyme (Haixin Yuan *et al.*, 2005).

Ces données constituent un argument supplémentaire montrant l'importance de l'étape de maturation épидидymaire des spermatozoïdes. Cette maturation des capacités fonctionnelles des spermatozoïdes s'accompagne de modifications biochimiques et morphologiques. Elle se fait de façon progressive dans le sens antéropostérieur de l'épididyme et résulte d'une régionalisation de la synthèse des protéines épидидymaires (Dacheux et Dacheux, 2001).

Les spermatozoïdes en pénétrant dans les canaux efférents sont dépourvus de mouvements autonomes (si ce n'est quelques brefs sursauts épisodiques) et sont incapables de se fixer à un ovocyte et de le féconder à ce stade, s'ils sont inséminés dans les voies génitales femelles. Cependant, lorsqu'ils arrivent dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes ont acquis la capacité de féconder un ovocyte et de se mouvoir progressivement, bien qu'*in vivo* ils soient encore immobiles pour ne nager activement qu'après leur largage hors du tractus mâle.

En sortant de l'épididyme, ils entrent dans le canal déférent sous la forme d'une masse compacte et leur transport ne s'effectue plus dès lors, par flux liquidien, mais en fonction de **l'activité musculaire de l'épididyme** et du canal déférent.

Les spermatozoïdes recueillis à la partie terminale du canal épидидymaire (queue) sont animés d'un mouvement vers l'avant ; l'acquisition de cette mobilité est essentielle à leur fonction de fécondation (Johnson et Everitt, 2002).

Tout ce processus de maturation dépend de façon cruciale d'une stimulation de l'épididyme par les androgènes.

Chez l'homme, des études récentes ont montré que des métallo protéinases semblent également impliquées dans la maturation spermatique ; la présence des MMPs et des TIMPs dans le plasma séminal suggère un rôle de ces protéines dans la maturation des spermatozoïdes (Shimokawa *et al.*, 2002, 2003 ; Tentes *et al.*, 2007). Leur accumulation dans le fluide testiculaire et épидидymaire chez les animaux domestiques constitue un argument en faveur de leur implication dans la maturation des spermatozoïdes (Métayer *et al.*, 2002). Une déficience de la MMP-9 (gélatinase B) est corrélée à une diminution de la fertilité (Dubois *et al.*, 2000).

Il a été montré, par ailleurs que la transgeline est identifiée comme un nouveau régulateur de l'expression de la MMP-9 (Nair *et al.*, 2006). Ce qui suggère l'implication éventuelle de la transgeline dans la maturation des spermatozoïdes.

Cependant, parmi les protéines androgénodépendantes de l'épididyme, certaines semblent impliquées dans d'autres processus que la maturation des spermatozoïdes.

L'existence d'une forte homologie de séquences entre les protéines B et C de l'épididyme du rat et la superfamille des α 2U globulines, dont plusieurs membres sont régulés par des complexes multi hormonaux (Brooks, 1987), a permis de montrer que ces protéines, pourraient fonctionner comme transporteur des rétinolides dans le tractus génital ; ce rôle serait en rapport avec les effets bien connus de la vitamine A sur les cellules germinales (Taragnat, 1988).

La protéine androgénodépendante de l'épididyme de lézard appartenant à la famille des lipocalines semble jouer également un rôle dans le transport de l'acide rétinolique des cellules épидидymaires à la membrane plasmique du spermatozoïde (Depeiges *et al.*, 1992 ; Morel, 1992).

Les connaissances actuelles des protéines androgénodépendantes du tractus génital mâle montrent qu'en dépit des récentes découvertes liées aux avancées technologiques (identification et caractérisation de nombreuses protéines), le rôle d'un grand nombre d'entre-elles demeure mal connu.

Il semble donc, selon Li et ses collaborateurs (1995) que la transgeline, marqueur spécifique de la différenciation des cellules musculaires lisses est exprimée dans les tissus adultes normaux. Mais des études récentes ont montré cependant qu'elle est présente également au niveau des cellules ayant subi une transformation maligne ; de nombreux travaux montrent que dans certains types de cancers, tels que l'adénocarcinome gastrique (Aung *et al.*, 2006 ; Srinivas *et al.*, 2001), les hépatocarcinomes cellulaires (HCC) (Shi *et al.*, 2005) et le cancer du pancréas (Micuriya *et al.*, 2007), la transgeline serait surexprimée.

Au contraire, dans d'autres processus tumoraux, une diminution de son expression est notée. En effet, Schields et ses collaborateurs (2002) montrent que la diminution de l'expression du gène de la transgeline constitue un premier marqueur diagnostique dans le développement des cancers du sein et du colon.

La transgeline induit une inhibition de la croissance cellulaire dans le cas du cancer de la prostate (Yang *et al.*, 2007).

Cette diminution de l'expression de la transgeline peut constituer un des premiers signaux marquant le début de la transformation maligne (Huang *et al.*, 2008).

En dépit de son expression abondante au niveau des CML et de sa localisation au niveau du cytosquelette, la fonction de la transgeline reste relativement peu connue (Dong Je et Dong-Sohn, 2007).

Conclusion générale

Chez le rat des sables (*Psammomys obesus*), modèle expérimental de notre étude, des variations saisonnières histo-cytologiques et biochimiques ont été mises en évidence au niveau des vésicules séminales et de l'épididyme.

Les vésicules séminales sont caractérisées par la synthèse de plusieurs protéines dont l'expression est régulée positivement ou négativement par les androgènes.

L'expression saisonnière d'une protéine androgénodépendante de la vésicule séminale « POSVP₂₁ » et de deux protéines de l'épididyme « P_{21Ep} » et P_{21Ed} ont fait l'objet de nos investigations et ont été étudiées par deux approches complémentaires : une approche immunohistochimique qui a permis de montrer que :

La localisation de POSVP₂₁ est limitée au compartiment épithélial, siège de modifications saisonnières importantes, et à la lumière de la vésicule séminale.

Au niveau de l'épithélium, POSVP₂₁ présente une distribution cytoplasmique, sa présence dans la lumière sous une forme sécrétée, suggérerait un passage dans le milieu extérieur.

L'analyse des protéines traduites *in vitro* à partir des ARN totaux de la vésicule séminale montre la présence d'un composé de même mobilité électrophorétique que POSVP₂₁, protéine mature synthétisée *in vivo*, ce qui laisse supposer pour POSVP₂₁ : **l'absence de peptide signal ou l'existence d'un peptide signal de faible taille et suggère par conséquent un mode de « sécrétion apocrine ».**

Une réponse partielle à ces suggestions, a pu être apportée par la détermination et l'analyse des séquences peptidiques de POSVP₂₁ ; puisque aucune séquence signal n'a pu être mise en évidence.

Les séquences peptidiques de POSVP₂₁ identifiées ont montré une forte homologie avec la séquence peptidique de la transgéline de *Rattus norvegicus*.

La transgéline constitue un marqueur spécifique de la différenciation du muscle lisse chez l'adulte. Elle présente au niveau de sa séquence peptidique un domaine calponine ou CHD « Calponin Homology Domain », caractérisant les protéines liant l'actine.

Ces résultats laissent suggérer que **POSVP₂₁ serait liée à l'actine par son domaine calponine et elle serait impliquée dans l'organisation du cytosquelette au niveau des cellules épithéliales.**

La présence de P_{21Ep} et P_{21Ed} au niveau de la MEC de l'épididyme et l'existence également, d'une forte homologie de séquences avec la séquence peptidique de la transgéline de *Rattus norvegicus* permettent de préciser un rôle dans la contractilité des cellules musculaires lisses et dans l'organisation du cytosquelette. Ce qui allègue par conséquent un rôle dans l'expulsion des spermatozoïdes lors de l'éjaculation hors du canal épидидymaire.

En conclusion notre étude a permis de :

- Localiser POSVP₂₁, protéine androgénodépendante de la vésicule séminale caractérisée par une expression saisonnière.
- Déterminer son site de synthèse.
- Caractériser et d'identifier POSVP₂₁ par une approche protéomique.

- Localiser P_{21Ep} et P_{21Ed}, protéines de l'épididyme proximal et distal de *Psammomys obesus*.
- De montrer l'existence d'une parenté immunologique entre POSVP₂₁, P_{21Ep} et P_{21Ed}.
- D'identifier P_{21Ep} et P_{21Ed}.
- De montrer l'existence d'une forte homologie entre les séquences peptidiques identifiées au niveau de POSVP₂₁ et la séquence peptidique de la transgeline de *Rattus norvegicus*.
- De montrer l'existence également d'une forte homologie entre les séquences peptidiques de P_{21Ep}, P_{21Ed} et la séquence peptidique de la transgeline de *Rattus norvegicus*.

La transgeline est identifiée pour la première fois au niveau de la vésicule séminale et de l'épididyme chez le rat des sables *Psammomys obesus*.

La particularité de la transgeline identifiée chez *Psammomys obesus* et chez *Rattus norvegicus* est son androgénodépendance.

Il serait important d'envisager l'étude des mécanismes par lesquels, les androgènes régulent l'expression du gène spécifique de cette protéine au niveau du tractus génital mâle du rat des sables *Psammomys obesus*.

Par ailleurs, il serait intéressant, d'élucider l'origine de la micro hétérogénéité de POSVP₂₁, mise en évidence dans ce travail.

Le mode de sécrétion de cette protéine constitue également une voie d'investigation intéressante.

Enfin l'implication de la transgeline dans la fonction de reproduction de *Psammomys obesus* et particulièrement dans la maturation des spermatozoïdes peut constituer une nouvelle perspective.

- Abou-Haïla A. (1987)- Etude de la régionalisation structurale, métabolique et fonctionnelle de l'épididyme de souris. Thèse doctorat. Université René Descartes, Paris V, 130p.
- Abou-Haïla A. et Fain-Maurel M.A. (1986)- Electrophoretic characterization of mouse epididymal esterases in inbred lines and in a natural population. *Andrologia* **18**: 623-624.
- Aboul-Azm T.E. (1979)-Anatomy of the human seminal vesicles and ejaculatory ducts. *Arch. Androl.* **3**: 287-292.
- Agrawal Y. et Vanha-Perttula T. (1988)- Electron microscopic study of the secretion process in bovine reproductive organs. *J. Androl.* **95**: 307-316.
- Almendral J.M., Santarem J.F., Perera J., Zerial M. et Bravo R. (1989)- Expression cloning and cDNA sequence of a fibroblast serum-regulated gene encoding a putative actin-associated protein (p27). *Exp. Cell. Res.* **181**: 518-530.
- Amirat Z. (1989)- Variations saisonnières des activités glucocorticoïde et minéralocorticoïde de la surrénale d'un rongeur désertique, le rat des sables *Psammomys obesus* : mise en évidence et déterminisme endogène. Thèse doctorat, Alger, 274p.
- Anderson L. et Seilhamer J. (1997)- A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis.* **v18**: 533-537.
- Anderson N.L. et Anderson N.G. (1998)- Proteome and proteomics : new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis.* **19**: 1853-1861.
- Assinder S.J., Stanton J.A.L., Prasad P.D. (2008)- Transgelin : An actin-binding protein and tumour suppressor. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology (IJBCB)*. Article sous presse.
- Aumüller G. (1979)- Prostate gland and seminal vesicles in "Handbuch der Mikroskopischen Anatomie der Menschen" Edited by Oksche A. et Vollrath L. Verlag Berlin Heidelberg New york Springer. Vol VII: 53-246.
- Aumüller G. et Seitz J. (1986)- Immunoelectron microscopic evidence for different compartments in the secretory vacuoles of the rat seminal vesicles. *Histochem. J.* **18**(1): 15-23.
- Aumüller G. et Seitz J. (1990)- Protein secretion and secretory process in male accessory sex glands. *Int. Rev. Cytol.* **121**: 127-232.
- Aung P.P., Oue N. et Mitani Y. (2006)- Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrixmetalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene.* **25**: 2546-2557

- Ayme-Southgate A., Lasko P., French C. et Pardue M. (1989)- Characterization of the gene for mp20: a *Drosophila* muscle protein that is not found in asynchronous oscillatory flight muscle. *J. Cell Biol.* **108** : 521-531.
- Balerna M., Leonardi D., Campana A. et Colpi G.M. (1985)- Human seminal vesicles and their proteic contribution to seminal plasma. *Prog. Reprod. Biol. Med.* **12**: 36-63
- Bauw G., De Loose M., Inze D., Van Montagu M. et Vanderkerckhove J. (1987)- Alterations in the phenotype of plant cells studied by NH₂-terminal amino acid sequence analysis of proteins electroblotted from two-dimensional gel-separated total extracts. *PNAS USA.* **84**: 4806-4810.
- Bedford J.M. (1975)- Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In Handbooc of physiology. Sec. 7: Endocrinology, vol. V: Male reproductive system (D.W. Hamilton and R.O. Greep eds). American physiological society, Bethesda, M.D.: 303-317.
- Bedford J.M. (1979)- Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. In “the spermatozoon”(D.W. Fawcett and J.M. Bedford) eds. Urban et Schwarzenberg Inc. Baltimore Munich: 7-21.
- Belhocine M et Gernigon T. (1994)- Histologie comparée des variations saisonnières de l'appareil reproducteur mâle de deux rongeurs sahariens:*Psammomys obesus* et *Meriones crassus*. *Bull. Soc. Zool. Fr.* **119** (4): 325-333.
- Belhocine M. (1998)- Etude histo-cytologique des variations saisonnières de l'appareil reproducteur mâle d'un Rongeur déserticole nocturne, le Mérion du désert (*Meriones crassus*) et son espèce sympatrique, le Mérion de Libye (*Meriones libycus*). Thèse de Magister, ISN, USTHB, Alger, 175p.
- Belhocine M., Gernigon-Spychalowicz T., Robert A.M., Shoevaert D., Benazoug Y. et Exbrayat J.M. (2007)- Ecophysiological responses of the seminal vesicle of Libyan jird (*Meriones libycus*) to the Saharan conditions: histological, morphometric and immunohistochemical analysis. *Histol. And Histopathol.* **22** : 603-615.
- Belkacemi A. (1988)- Etude histologique des variations saisonnières du testicule, de l'épididyme et des vésicules séminales de la Gerbille (*Gerbillus gerbillus*). D.E.S., ISN, USTHB, Alger, 66p.
- Bergh A., Collin O. et Lissbrant E. (2001)- Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biol Reprod.* **64**(1): 13-20.
- Bergmann M. (1987)- Photoperiod and testicular function in *Phodopus sungorus*. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **105**: 1-73.
- Berube B., Lefievre L., Coutu L., Sullivan R. (1996)- Regulation of the epididymal synthesis of P26h, a Hamster sperm protein. *J. Androl.* **17**: 104-110.

- Biemann K. (1990)- Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.* **193**: 886-887.
- Bosman F.T. et Stamenkovic I. (2003)- Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* **200**(4): 423-428.
- Boufermes R. (1997)- Etude comparative des variations saisonnières testiculaires et thyroïdiennes chez trois espèces de Rongeurs déserticoles, le Mérion (*Meriones crassus*), la Gerbille (*Gerbillus gerbillus*) et le Rat des sables (*Psammomys obesus*). Thèse de Magister, ISN, USTHB, Alger, 150p.
- Bradford M.M. (1976)- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 246-254.
- Brandes D. (1974)- Fine structure and cytochemistry of male accessory organs. In Male accessory organs, structure and function in mammals. D. Brandes ed. Academic press New york: 8-113.
- Brochard D., Morel L., Cheyvialle D., Veyssiere G. et Jean C. (1997)- Androgen induction of SVS family related protein MSVSP99: identification of a functional androgen response element. *Mol. Cell Endocrinol.* **136**: 91-99.
- Brochard D., Morel L., Veyssiere G. et Jean C. (1999)- Structural and functional analysis of the promoter of a mouse gene encoding an androgen-regulated protein MSVSP99. *J. Mol. Endocrinol.* **23**(3): 287
- Brooks D.E. (1981)- Metabolic activity in epididymis and its regulation by androgens. *Physiol. Rev.* **61**: 515-555.
- Brooks D.E. (1982)- Purification of rat epididymal proteins “D” and “E”, demonstration of shared immunological determinants, and identification of regional synthesis and secretion. *Internat. J. Androl.* **5**: 513-524.
- Brooks D.E. (1983)- Effect on androgen on protein synthesis and secretion in various regions of the rat epididymis as the analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **29**: 255-270.
- Brooks D.E. (1987)-The major androgen-regulated secretory proteins of the rat epididymis bear sequence homology with members of the alpha 2U-globulin superfamily. *Biochem. Int.* **14**(2): 235-240.
- Brooks D.E. et Higgins S.J. (1980)- Characterization and androgen dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.* **59**: 363-375.
- Brooks D.E. et Tiver K. (1983)- Location of epididymal secretory proteins on rat spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **69**: 651-657.

- Bürki W. (1953)- Über die Entwicklung der Samenblase und der Ampulle des Ductus deferens beim Menschen. *Z. Anat. EntwGesch.* **117**: 155-165.
- Caméo M.S. et Blaquier J.A. (1976)- Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocrinol.* **69**: 47-55.
- Camoretti-Mercado B., Forsythe S.M., Lebeau M.M., Espinosa R., Vieira J.E., Halayko A.J., Willadsen S., Kurtz B., Ober C., Evans G.A., Thweatt R., Shapiro S., Niu Q., Qin Y., Padrid P.A., Solway J. (1998) - Expression and cytogenetic localization of the human SM22 gene(TAGLN). *Genomics* **49**: 452-457.
- Carballada R. et Esponda P. (1992)- Role of fluid from seminal vesicles and coagulating glands in sperm transport into the uterus and fertility in rats. *J. Reprod. Fertil.* **95**(3): 639-48.
- Carballada R. et Esponda P. (1999)- Effect of antibodies against seminal vesicle secretion on fertility in the rat. *Zygote.* **7**(3): 223-231.
- Castresana J. et Saraste M. (1995)- Does Vav bind to F-actin through a CH domain? *FEBS Lett.* **374**: 149-151.
- Chaurand P., Fouchecourt S., DaGue B., Xu B.J., Reyzer M.L., Orgebin-Crist M.C. et Caprioli R.M. (2003)- Profiling and imaging proteins in the mouse epididymis by imaging mass spectrometry. *Proteomics.* **3**: 2221-2239.
- Chen L.Y., Lin Y.H., Lai M.L. et Chen Y.H. (1998)- Developmental profile of a caltrin-like protease inhibitor, P12, in mouse seminal vesicle and characterization of its binding sites on sperm surface. *Biol. Reprod.* **59**(6): 1498-1505.
- Chow P.H., Jiang H.Y., Poon H.K., Lee K.H. et O.W.S. (2003)- Embryos sired by males without accessory sex glands induce failure of uterine support: a study of VEGF, MMP and TGF expression in the golden hamster. *Anat. Embryol. (Berl).* **206**(3): 203-213.
- Clavert A., Gabriel- Robez O. et Montagnon D. (1985)- Physiological Role of the Seminal vesicle. *Prog. Reprod. Biol. Med.* **12** :80-94
- Clermont Y. (1954)- Cycle de l'épithélium seminal et mode de renouvellement des spermatogonies chez le hamster. *Rev. Can. Biol.* **13**: 208-245.
- Clermont Y. (1960)- Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. A method for identification of the stages. *Fertil. Steril.* **11**: 563-573.
- Cornwall G.A. et Hann S.R. (1995)- Specialized gene expression in the epididymis. *J.Androl.* **16**: 379-383.
- Courot M. (1981)- Transport and maturation of spermatozoa in the epididymis of mammals. *Prog. Reprod. Biol.* **8**: 67-79.
- Craig S.W. et Pollard T.D. (1982)- Actin-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **7**: 55-58.

- Cretzschmar (1828)- In ruppell atlas zu Reise im Nörd Afrika säügethier: **58**.
- Cuaniscu P.S., Gonzalez-Echeverria F., Piazza A.D. Caméo M.S. et Blaquier J.A. (1984b)- Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat. *J. Reprod. Fertil.* **72**: 467-471.
- Cuaniscu P.S., Gonzalez-Echeverria F., Piazza A.D. et Blaquier J.A. (1984a)- Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **70**: 541-547.
- Cukierski M.A., Sina J.L., Prahalada S. et Robertson R.T. (1991)- Effects of seminal vesicle and coagulating gland ablation on fertility in rats. *Repro. Toxi.* **5**: 347-352.
- Curry P.T. et Atherton R.W. (1990)- Seminal vesicles: development, secretory products, and fertility. *Arch Androl.* **25**(2): 107-113.
- Dacheux J.L. et Paquignon M. (1980)- Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* **20**: 1085-1099.
- Dacheux J.L. et Paquignon M. (1981)- Physiologie épидидymaire et maturation des spermatozoïdes. *Act. Gynécol.* **12**: 200-213.
- Dacheux J.L., Gatti J.L. et Dacheux F. (2003a)- Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscop. Res. Tech.* **61**: 7-17.
- Dacheux J.L., Paquignon L. et Combarrous Y. (1983). Head to head agglutination of ram and boar epididymal spermatozoa and evidence for an epididymal antagglutinin. *J. Reprod. Fertil.* **67**: 181-189
- Dadoune J.P. (1988)- Différenciation, maturation et aptitude à la fécondation du spermatozoïde. *APBG.* **2bis**: 15-26.
- Daimon E. et Wada Y. (2005)- Role of neutrophils in matrix metalloproteinase activity in the preimplantation mouse uterus. *Biol. Reprod.* **73**(1): 163-171.
- Daly M. et Daly S. (1973)- On the feeding ecology of *Psammomys obesus* (Rodentia, Gerbillidae) in the wadi Saoura Algeria. *Mammalia.* **37**: 545-561.
- Danzo B.J. et Bell B.W. (1988)- The microheterogeneity of androgen binding protein in rat serum and epididymis is due to differences glycosylation of their subunits. *J. Biol. Chem.* **263**: 2402-2408.
- Danzo B.J., Black J.M. et Bell B.W. (1989)- The microheterogeneity of rabbit testosterone-binding globulin is due to differential glycosylation of its single promoter. *Biol. Reprod.* **41**: 957-965.
- De Carvalho H.F. Vilamaior P.S. et Taboga S.R. (1997a)- Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchietomy. *Prostate.* **32**(1): 27-34.

- De Lamirande E. (2007)- Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin. Thromb. Hemost.* **33**(1): 60-68.
- De Lamirande E., Yoshida K. et Yoshiike T.M. (2001)- Iwamoto T, Gagnon C., Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process. *J. Androl.* **22**(4): 672-679.
- Delamirande E. et Gagnon C. (1984)- Origin of motility inhibitor within the male reproductive tract. *J. Androl.* **5**: 269-276.
- Depeiges A., Morel L. et Dufaure J.P. (1992)- A major androgen-dependent epididymal protein identified a lipocalin protein. *5th Intern. Congress on Cell biology.* :294-416.
- Dong Je H. et Dong-Sohn U. (2007)- SM22 alpha Is Required for Agonist-induced Regulation of Contractility: Evidence from SM22 alpha Knockout Mice. *Mol. Cells.* **23** (2): 175-181.
- Dubois B., Arnold B. et Opdenakker G. (2000)- Gelatinase B deficiency impairs reproduction. *J. Clin. Invest.* **106**(5): 627-628.
- Engel G., Lee C., Grayhack J.T. (1980)- Acide RNase in rat prostate during castration induced involution. *Biol. Reprod.* **22**: 827-831.
- Espana F., Gilabert J., Estelles A., Romeu A., Aznar J. et Cabo A. (1991)- Functionally active Protein C inhibitor/Plasminogen Activator Inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate specific antigen. *Thromb. Res.* **64**: 309-320.
- Espana F., Gilabert J., Estelles A., Romeu A., Aznar, J. et Cabo A. (1991)- Functionally active Protein C inhibitor/Plasminogen Activator Inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate specific antigen. *Thromb. Res.* **64**: 309-320.
- Ezer N. et Robaire B. (2003)- Gene expression is differentially regulated in the epididymis after orchidectomy. *Endocrinology.* **144**: 975-988.
- Fain-Maurel M.A., Dadoune J.P. et Alfonsi M.F. (1981)- High resolution autoradiography of newly formed proteins in the epididymis after incorporation of triated amino acids. *Arch. Androl.* **6**: 249-266.
- Fawell S.E., Pappin D., Mc Donald J. et Higgins S.J. (1986). Androgen regulated proteins of rat seminal vesicle secretion constitute a structurally related family present in the copulatory plug. *Mol. Cell. Endocrinol.* **45**: 205-213.
- Fawell S.E., Pappin D.J.C., Mc Donald C.J. et Higgins S.J. (1986)- Androgenregulated proteins of rat seminal secretion constitute a structurally related family present in the copulatory plug. *Mol. Cell Endocrinol.* **45**: 205-213.

- Fernandez-Juan M., Callego M., Barrios B., Osada J., Cebrian-Perez J.A. et Muino-Blanco T. (2006)- Immunohistochemical Localization of sperm-preserving Proteins in the ram Reproductive Tract. *J. of Androl.* **27**(4): 588-595.
- Flickinger C.J. (1974)- Synthesis intracellular transport and release of secretory protein in the seminal vesicle of the rat as studied by electron microscope autoradiography. *Anat. Rec.* **180**: 407-426.
- Flickinger C.J. (1979)- Synthesis, transport and secretion of protein in the initial segment of the mouse epididymis as studied by electron microscope autoradiography. *Biol. Reprod.* **20**: 1015-1030.
- Foresta C., Caretto A., Indino M., Betterle C. et Scandellari C. (1986)- Calcitonin in human seminal plasma and its localization on human spermatozoa. *Andrologia.* **18**: 470-473.
- Fournier-Delpech S. et Thibault C. (1991)- Acquisition de la fécondance du spermatozoïde. In “La reproduction chez les mammifères et l’homme” coordonnateurs Thibault C. et Levasseur MC. Eds. Ellipses INRA: 251-271.
- Fournier-Delpech S., Bayard F. et Boulard C. (1973)- Contribution à l’étude de maturation du sperme. Etude d’une protéine acide de l’épididyme chez le rat. Dépendance androgène, relation avec l’acide sialique. *C. r. hebd. Séanc. Soc. Biol.* **147**: 1989-1995.
- Fournier-Delpech S., Courtens J.L., Pisselet C.L., Delaleu B. et Courrot M. (1982)- Acquisition of zona binding by ram spermatozoa during epididymal passage, as revealed with interaction with rat oocytes. *Gametes Res.* **5**: 403-408
- French F.S. et 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**: 88-95.
- Frenette C., Dube J.Y. et Tremblay R.R. (1986)- Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. *Arch.Androl.* **16**: 2-241.
- Garcia-Florez M., Oliveira C.A. et Carvalho H.F. (2005)- Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**(4): 487-497.
- Gatti J.L., Castella S., Dacheux F., Ecroyd H., Metayer S., Thimon V. et Dacheux J.L. (2004)- Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* **82**: 321-339.
- Gaytan F., Bellido C., Aguillar E. et Lucena M.C. (1986)- Morphometric analysis of the rat ventral prostate and seminal vesicles during prepubertal development. Effets of neonatal treatment with oestrogen. *Biol. Reprod.* **35**: 219-225.
- Gernigon T., Berger M. et Lecher P. (1994)- Seasonal variations in the ultrastructure and production of androgen-dependent proteins in the seminal vesicles of a saharian rodent (*Psammomys obesus*). *J. Endocrinol.* **142**: 37-46.

- Gernigon-Spychalowicz T. (1992)- Etudes cytologiques et biochimiques des variations saisonnières de l'appareil génital mâle d'un rongeur saharien diurne, le Rat des sables (*Psammomys obesus*). Thèse de doctorat d'état, ISN, USTHB, Alger, 180p.
- Gerozissis K., Jouannet P., Soufir J.C. et Dray F. (1982)- Origin of prostaglandins in human semen. *J. Reprod. Fertil.* **65**: 401-404 .
- Ghyselinck N.B., Jimenez C., Courty Y. et Dufaure J.P. (1989)- Androgen-dependant messenger RNAs related to secretory proteins in the mouse epididymis. *J. Reprod. Fertil.* **85**: 631-639.
- Gimona M., Sparrow M.P., Strasser P., Herzog M. et Small V. (1992)- Calponin and SM22 isoforms in avian and mammalian smooth muscle absence of phosphorylation in vivo. *Eur. J. Biochem.* **205**: 1067-1075.
- Gonzales G.F. (2001)- Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl.* **3**(4): 251-258.
- González-Echeverría F., Cuasnicú P.S., Piazza A., Piñeiro L. et Blaquier J.A. (1984)- Addition of an androgen-free epididymal protein extract increases the ability of immature hamster spermatozoa to fertilize in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **71**(2): 433-437
- Goodman A., Goode B.L., Matsudaira P. et Fink G.R. (2003)- The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp 1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 2617-2629.
- Guilbaud C., Simon A.M., Veyssière G. et Jean C. (1993)- Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding an androgen-dependant mouse seminal vesicle secretory protein. *J. Mol. Endocrinol.* **10**: 279-288.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H. and Aebersold, R. (1999)- Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**(10): 994-999.
- Haider M.Z., Qasi M.J., Khanum A. et Arslan M. (1983)- Effects of testosterone on epididymal proteins in castrated rhesus monkeys. *Amer. J. Primatol.* **4**: 73-80.
- Haixin Yuan, Li Zhang, Aihua Liu, Hu Zhou, Yiguo Wang, Hong Zhang, Guoquan Wang, Rong Zeng, Yonglian Zhang et Zhengjun Chen. (2006)- Proteomic profiling of Regionalized Proteins in Rat Epididymis Indicates Consistency between Specialized Distribution and protein Functions. *J. Prot. Res.* **5**: 299-307.
- Hamilton D.W. (1975)- Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymis and ductus deferens in the rat. In "Handbook of physiology" section 7vol V:259-301. Eds. Hamilton and R.O.Greep. Washington DC: American physiological Society.

- Harris S.E., Harris M.A., Johnson C.M., Bean M.F., Dodd J.G., Matusik R.J., Carr S.A. et Crabb J.W. (1990)- Structural characterization of the rat seminal vesicle secretion II protein and gene. *J. Biol. Chem.* **265**(17): 9896-9903.
- Hatier R., Grignon G. et Guedenet. J.C. (1985)- Development of the Seminal Vesicles. *Prog. Reprod. Biol. Med.* **12**: 4-7.
- Heintz D., Wurtz V., High A.A., Van Dorsselaer A., Reski R. et Sarnighausen E. (2004)- An efficient protocol for the identification of protein phosphorylation in a seedless plant, sensitive enough to detect members of signalling cascades. *Electrophoresis* **25**: 1149-1159.
- Herr J.C., Spell D.R., Conklin D.J. et Flickinger C.J. (1989)- Electron microscopic immunolocalisation of seminal vesicle-specific antigen in human seminal vesicle. *Biol. Reprod.* **40**(2): 333-342.
- Herr J.C., Summers T.A., McGee R.S., Sutherland W.M., Sigman M. et Evans R.J. (1986)- Characterization of a monoclonal antibody to a conserved epitope on human seminal vesicle specific peptides: a novel probe/marker system for semen identification. *Biol. Reprod.* **35**(3): 773-784.
- Hewick R.M., Hunkapiller M.W., Hood L.E. et Dreyer W.J. (1981)- A gas-liquid solid phase peptide and proteine sequanator. *J. Biol. Chem.* **256**: 7990-7997.
- Heyns W. (1977)- Influence of androgen on the concentration of prostatic binding protein (PBP) and its mRNA in rat prostate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**: 1492-1499.
- Higgins S.J. et Füller F.M. (1981)- Effects of testosterone on protein synthesis in rat seminal vesicles analysed by two dimensional gel electrophoresis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **24**(1): 85-103.
- Higgins S.J., Burchell J.M. et Mainwaring W.I.P. (1976)- Androgen-dependent synthesis of basic secretory proteins by the rat seminal vesicle. *Biochem. J.* **158**: 271-282.
- Hinton B.T., Dott H.M. et Setchell B.P. (1979)- Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. *J. Reprod. Fertil.* **55**: 167-172.
- Hortsh M. et Meyer D.I. (1986)- Transfer of secretory proteins through the membrane of the endoplasmic reticulum. *Int. Rev. Cytol.* **102**: 215-242.
- Hoskins D.D., Hall M.L. et Munsterman D. (1975)- Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol. Reprod.* **13**: 168-176.
- Huang Q., Huang Q., Chen W., Wang L., Lin W., Lin J. et Lin X. (2008)- Identification of transgelin as a potentiel novel biomarker for gastric adenocarcinoma based on proteomics technology. *J. Cancer Clin. Oncol.* Sous presse

- Huang Y.H., Chen Y.H., Lin C.M., Ciou Y.Y., Kuo S.P., Chen C.T., Shih C.M. et Chang E.E. (2007)- Suppression effect of seminal vesicle autoantigen on platelet-activating factor-induced mouse sperm capacitation. *J. Cell. Biochem.* **100**(4): 941-951.
- Huang Y.H., Chu S.T. et Chen Y.H. (1999)- Seminal vesicle autoantigen, a novel phospholipid-binding protein secreted from luminal epithelium of mouse seminal vesicle, exhibits the ability to suppress mouse sperm motility. *Biochem. J.* **343** (1): 241-248.
- Huang Y.H., Chu S.T. et Chen Y.H. (2000)- A seminal vesicle autoantigen of mouse is able to suppress sperm capacitation-related events stimulated by serum albumin. *Biol. Reprod.* **63**(5): 1562-1566.
- Huang Y.H., Kuo S.P., Lin M.H., Shih C.M., Chu S.T., Wei C.C., Wu T.J. et Chen Y.H. (2005)- Signals of seminal vesicle autoantigen suppresses bovine serum albumin-induced capacitation in mouse sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**(3): 1564-1571.
- Hudson D.A. (1992)- Constitutive protein secretion by guinea-pig seminal vesicle epithelial cells. *Comp. Biochem Physiol.* **102** (4): 701-706.
- Jauhainen A. et Vanha-Pertulla T. (1986)- Beta- glucuronidase in the bull seminal plasma and reproductive organs. *Enzyme.* **35**: 137-146.
- Johnson M.H. et Everitt B.J. (2002). Reproduction. Sciences médicales collection. 5^{ème} Ed. De Boeck Université, 298p.
- Jones R., Brown C.R., Von Glos K.I. et Parker M.G. (1980)- Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis. Characterization of androgen-dependent and testicular fluid dependent proteins. *Biochem. J.* **188**: 667-676.
- Jones R., Fournier-Delpech S. et Willadson S.A. (1982)- Identification of androgen-dependant proteins synthesized in vitro by the ram epididymis. *Reprod. Nutr. Develop.* **22**: 495- 504.
- Jonsson M., Lundwall A., Linse S., Frohm B. et Malm J. (2006)- Truncated semenogelin I binds zinc and is cleaved by prostate-specific antigen. *J. Androl.* **27**(4): 542-547.
- Jost A. (1947)- Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin III. Rôle des gonades fœtales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp.* **40**: 271-316.
- Justulin L.A.J., Ureshino R.P., Zanoni M. et Felisbino S.L. (2006)- Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. *Cell Biol. Int.* **30**(4): 354-364.
- Kahn P. (1995)- From genome to proteome : looking at a cell's proteins. *Science.* **270**: 369-370.

- Kandala J.C., Kistler M.K., Lawther R.P. et Kistler W.S. (1983)- Characterization of a genomic clone for rat seminal vesicle secretory protein IV. *Nucleic. Acids. Research.* **11**: 3169-3186.
- Kassir L. (1983)- Variations saisonnières de l'activité testiculaire de la Gerbille (*Gerbillus gebillus*). Thèse 3^{ème} cycle, ISN, USTHB, Alger, 109p.
- Kaunisto K., Parkkila S., Tammela T., Rönnerberg L. et Rajaniemi H. (1990)- Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes in the human male reproductive tract. *Histochemistry.* **94**: 381-386
- Kawano N. et Yoshida M. (2007)- Semen-Coagulating Protein, SVS2, in Mouse Seminal Plasma Controls Sperm Fertility. *Biol. Reprod.* **76**(3): 353-361.
- Kentaro N., Fumihide B. et Osamu N. (2005)- Stg 1 is a novel SM22/ transgelin –like actin-modulating protein in fission yeast. *FEBS Letters.* **579**: 6311-6316.
- Kenyon G.L., DeMarini D.M., Fuchs E., Galas D.J., Kirsch J.F., Leyh T.S., Moos W.H., Petsko G.A., Ringe D., Rubin G.M. et Sheahan L.C. (2002)- Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Mol. Cell Proteomics.* **1**(10): 763-780.
- Khammar F et Brudieux R. (1987)- Seasonal changes in testicular contents and plasma concentrations of androgens in the desert gerbil (*Gerbillus gerbillus*). *J. Reprod. Fertil.* **80**(2): 589-594.
- Khammar F. (1987)- Variations saisonnières de l'activité endocrine du testicule de deux espèces de rongeurs désertiques, le rat des sables (*Psammomys obesus*) et la Gerbille (*Gerbillus gerbillus*). Thèse d'état, ISN, USTHB, Alger, 202p
- Khammar F. et Brudieux R. (1984)- Seasonal changes in testicular contents of testosterone and androstenedione and in the metabolic clearance rate of testosterone in the sand rat (*Psammomys obesus*). *J. Reprod. Fertil.* **71**(1): 235-241.
- Khammar F. et Brudieux R. (1989)- Seasonal changes in plasma testosterone concentrations in response to administration of hCG in a desert rodent, the sand rat (*Psammomys obesus*). *J. Reprod. Fertil.* **85**(1): 171-175.
- Kierszenbaum A.L. (2002)- Histology and Cell biology. An Introduction to Pathology by Abraham L. Elsevier Science Limited. 619p.
- Kim S., Lu M.M., Ip H.S., Pharmacek M.S. et Clendenin C. (1997)- A serum response factor-dependant transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2266-2278.
- Kistler M.K., Ostrowski M.C. et Kistler W.S. (1981)- Developmental regulation of secretory protein synthesis in rat seminal vesicle. *PNAS. USA.* **78**: 737-741.

- Kobayashi R., Kubota T. et Hidaka H. (1994)- Purification, Characterization, and partial sequence analysis of a new 25 kDa actin-binding protein from bovine aorta : a SM22 homolog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 1275-1280.
- Kohane A.C., Pineiro L. et Blaquier J.A. (1983)- Androgen-controlled synthesis of specific proteins in the rat epididymis. *Endocrinology* **112**: 1590-1596.
- Krall A. et Spring-Mills E. (1981)- Effects of bromocriptine and perphenazine on male accessory sex glands. I. The seminal vesicles. *Archs. Androl.* **6**: 295-300.
- Laemmli U.K. (1970)- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Laurell C.B., Christensson A., Abrahamsson P.A., Stenflo J. and Lilja H. (1992)- Protein C inhibitor in human body fluids. Seminal plasma is rich in inhibitor antigen deriving from cells throughout the male reproductive system. *J. Clin. Invest.* **89**: 1094-1101.
- Lawson D., Harrison M. et Shapland C. (1997)- Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22 alpha are the same protein, the expression of which is down-regulated in many cell lines. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **38**: 250-257.
- Lee C. et Sensibar J.A. (1987)- Proteins of the rat prostate: 2. synthesis of new proteins in ventral lobe during castration-induced regression. *Journal of Urology.* **138**: 903-908.
- Lees-Miller J.P., Heeley D.H. et Smillie L.B. (1987)- An abundant and novel protein of 22 kDa (SM22) is widely distributed in smooth muscles: purification from bovine aorta. *Biochem. J.* **244**: 705-709.
- Lees-Miller J.P., Heeley D.H., Smillie L.B., Kay C.M. (1987)- Isolation and characterization of an abundant and novel 22-kDa protein SM22 from chicken gizzard smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **262**: 2988-2993.
- Leger J.G., Monpetit M.L. et Tenniswood M.P. (1987)- Characterization and cloning of androgen-repressed messenger RNAs from rat ventral prostate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **99**: 1161-1166.
- Li L., Miano J.M., Cserjesi P. et Olson E.N. (1996)- SM22 α , a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ. Res.* **78**: 188-195.
- Li M., Li S., Lou Z., Liao X., Zhao X., Meng Z. et Bartlam M., Rao Z. (2008)- Crystal structure of human transgelin. *Journal of Structural Biology.* **162** (2): 229-236.
- Li S.H., Lee R.K., Hsiao Y.L. et Chen Y.H. (2005)- Demonstration of a glycoprotein derived from the Ceacam10 gene in mouse seminal vesicle secretions. *Biol. Reprod.* **73**(3): 546-553.
- **Liang et al., 1978 (SB)**

- Lilja E.I. et Laurell C.B. (1985)- The predominant protein in human seminal coagulate. *Scand. J. Clin. Invest.* **45**: 635-641.
- Lilja H. (1990)- Cell biology of semenogelin. *Andrologia.* **22** (1): 132-141.
- Lilja H., Abrahamsson P.A. et Lundwall A. (1989)- Semegolin, the predominant proteins human semen. Primary structure and identification of closely related proteins in the male accessory sex glands and on the spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **264**: 1894-1900.
- Lilja H., Oldbring J., Rannevik G. et Laurell C.B. (1987)-Seminal secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *J. Clin. Invest.* **80**: 281-285.
- Lilja, H. et Lundwall A. (1992)- Molecular cloning of epididymal and seminal vesicular transcripts encoding a semenogelin-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 4559-4563.
- Lissbrant I.F., Lissbrant E., Persson A., Damber J.E. et Bergh A. (2003)- Endothelial cell proliferation in male reproductive organs of adult rat is high and regulated by testicular factors. *Biol Reprod.* **68**(4): 1107-1111.
- Lottspeich F. (1999)- Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **38**(17): 2476-2492.
- Lundwall A., Malm J., Clauss A., Valtonen-Andre C. et Olsson A.Y. (2003)- Molecular cloning of complementary DNA encoding mouse seminal vesicle-secreted protein SVS I and demonstration of homology with copper amine oxidases. *Biol. Reprod.* **69**(6): 1923-1930.
- Luo C.W., Lin H.J. et Chen Y.H. (2001)- A novel heat-labile phospholipid-binding protein, SVS VII, in mouse seminal vesicle as a sperm motility enhancer. *J. Biol. Chem.* **276**(10): 6913-6921.
- MacDonald C.J., Eliopoulos E. et Higgins S.J. (1984)- Divergent protein coding regions in otherwise closely related androgen-regulated mRNAs. *EMBO. J.* **3**: 2517-2521.
- MacDonald C.L., Williams P., Mac Turk F., Fuller E., Mac Intosh E. et Higgins S.J. (1983)- Isolation and characterization of genes for androgen responsive secretory proteins of rat seminal vesicles. *Nucleic Acids Res.* **11**: 917-930.
- Malm J., Jonsson M., Frohm B. et Linse S. (2007)- Structural properties of semenogelin I. *FEBS J.* **274**(17): 4503-4510.
- Malmstrom J., Larsen K., Malmstrom L., Tufvesson E., Parker K., Marchese J., Williamson B., Hattan S., Patterson D., Martin S., Graber A., Juhasz H. P., Westergren-Thorsson G. et Marko-Varga G. (2004)- Proteome annotations and identifications of the human pulmonary fibroblast. *J. Proteome Res.* **3**(3): 525-537.
- Manco G. et Abrescia P. (1988)- A major secretory protein from rat seminal vesicle binds ejaculated spermatozoa. *Gamete Res.* **21**: 71-84.

- Manin M., Lecher P., Martinez A., Tournadre S. et Jean C. (1995)- Exportation of mouse vas deferent protein, a protein without signal peptide from mouse vas deferent epithelium : a model for apocrine secretion. *Biol. Reprod.* **52**: 50-62.
- Mann M. et Jensen O.N. (2003)- Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **21**(3): 255-261.
- Mann T. et Lutwak-Mann C. (1981)- Secretory function of the prostate, seminal vesicle, cowper's gland and other accessory organs of reproduction., In "Male Reproductive function and semen." chapitre VII, Mann T., Lutwak-Mann (Eds): 171-183.
- Mansson P.E., Sugino A. et Harris S.E. (1981)- Use of a cloned double stranded cDNA coding for a major androgen-dependant protein in rat seminal vesicle secretion : the effect of testosterone in gene expression. *Nucleic Acids Research.* **9**: 935-946.
- Mata L.R. (1995)- Dynamics of the seminal vesicle epithelium. *Int. Rev. Cytol.* **160**: 267-302.
- Mata L.R. et David-Ferreira J.F. (1985)- Secretory cell activity in the hamster seminal vesicle following castration. A morphometric ultrastructural study. *J. Biol. Cell.* **53**: 165-178.
- Mataoui H. (1999)- Effet de la castration sur le tractus génital mâle et sur l'activité thyroïdienne chez trois rongeurs sahariens : Le Mérion (*Meriones libycus*), la Gerbille (*Gerbillus gerbillus*) et le rat des sables (*Psammomys obesus*). Thèse de Magister. ENS, Kouba, Alger. 186p.
- Mataoui H., Estabel J., Amirat Z., Exbrayat J.M. et Khammar F. (2006)- Apoptose : réponse cellulaire adaptative. Exemple de l'effet de la castration et de l'injection de testostérone sur l'épididyme de Mérion. *Société d'Histoire Naturelle d'Afrique du Nord.* **73**: 97-105.
- Matsubayashi K. et Mochizuki K. (1982)- Growth of male reproductive organs with observate of on their seasonal morphologic changes in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Vet. Sci.* **44**(6): 891-902.
- Matsudaira P. (1987) - Sequence from picomoles quantities of protein electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035-10038.
- Mattmuller D.R. et Hinton B.T. (1991)- In vivo secretion and association of clusterin (SGP-2) in luminal fluid with spermatozoa in the rat testis and epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* **30**: 62-69.
- McGee R.S. et Herr J.C. (1987)- Human seminal vesicle-specific antigen during semen liquefaction. *Biol. Reprod.* **37**(2): 431-439.
- McGee R.S. et Herr J.C. (1988)- Human seminal vesicle-specific antigen is a substrate for prostate specific antigen (or P-30). *Biol. Reprod.* **39**(2): 499-510.

- McGregor E. et Dunn M.J. (2006)- Proteomics of the heart: unraveling disease. *Circ. Res.* **98**(3): 309-321.
- Metafora S., Peluso G., Persico P., Ravagnan G., Esposito C. et Porta R. (1989)- Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of a major protein secreted from the epithelium of the rat seminal vesicles. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 121-131.
- Métayer S., Dacheux F., Dacheux J.L. et Gatti J.L.(2002)- Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol Reprod.* **66**(5): 1219-1229.
- Mikuriya K., Kuramitsu Y., et Ryozaawa S. (2007)- Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. *Int. J. Oncol.* **30**: 849-855.
- Min-Long Lai, Shun-Wen et Yee-Hsiung Chen. (1991)- Purification and characterization of a trypsin inhibitor from Mouse Seminal Vesicle Secretion. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **290**: 265-271.
- Mollenkopf H.J., Jungblut P.R., Raupach B., Mattow J., Lamer S., Zimny-Arndt U., Schaible U.E. et Kaufmann S.H. (1999)- A dynamic two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database: the mycobacterial proteome via Internet. *Electrophoresis.* **20**(11): 2172-2180.
- Montagnon D, Valtat B., Vignon F. et Koll-Back M.E. (1990)- Secretory proteins of human seminal vesicles and their relationship to lipids and sugars. *Andrologia.* **22** (1): 193-205.
- Montpetit M.L., Lawless K.R. et Tenniswood M. (1986)- Androgen-repressed messengers in the rat ventral prostate. *Prostate.* **8**: 25-36.
- Moore H.D.M. (1981)- Effects of castration on specific glycoprotein secretions of the epididymis in the rabbit and hamster. *J. Reprod. Fertil.* **61**: 347-354.
- Moore J.T., Nortwich M.E., Weiben E.D. et Veneziale C.M. (1984)- Expression of a secretory protein gene during androgen-induced cell growth. *J. Biol. Chem.* **259**: 14750-14756.
- Morel L. (1992)- Expression et étude structurale d'une famille protéique androgénodépendante de l'épididyme de lézard. Thèse doctorat, Clermont-Ferrand II, 70p.
- Morel L., Brochard D., Manin M., Simon A.M., Jean C. et Veyssiere G. (2001)- Mouse seminal vesicle secretory protein of 99 amino acids (MSVSP99): characterization and hormonal development regulation. *J. Androl.* **22**: 549-557.

- Nair R.R., Avila H., Ma X., Wang Z., Lennartz M., Darnay B.G., Boyd D.D. et Yan C.A. (2008)- novel high-throughput screening system identifies a small molecule repressive for matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol. Pharmacol.* **73**(3): 919-929.
- Nair, R. J, et Boyd, D.D. (2006). Expression cloning identifies transgelin (SM22) as a novel repressor of 92-kDa type IV collagenase (MMP-9) expression. *J. Biol. Chem.* **281**: 26424-26436.
- Negro-Vilar A., Saad W.A. et Mc Cann S.M. (1977)- Evidence for a role of prolactin in prostate and seminalvesicle growth in immature male rats. *Endocrinology.* **100**: 729-737.
- Neubauer B. et Mawhinney M. (1981)- Actions of androgen and estrogen on guinea pig seminal vesicle epithelium and muscle. *Endocrinology.* **108**: 680-687.
- Noller D.W., Flickinger C.J. et Howards S.S. (1977)- Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the guinea pig determined by tritiated thymidine autoradiography. *Biol. Reprod.* **17**: 532-534.
- Normand T. (1991)- Etude expérimentale du rôle des androgènes dans l'expression des protéines de la vésicule séminale de souris à l'âge adulte et au cours du développement. Thèse doctorat, Clermon-Ferrand II, 101p.
- Normand T., Jean-Faucher C.H. et Jean C. (1989)- Developmental pattern of androgen regulated proteins in seminal vesicles from the mouse. *Int. J. Androl.* **12**: 219-230.
- O'Farrell P.Z., Goodman H.M. et O'Farrell P.H. (1975)- High resolution two dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**: 1133-1142.
- Ogawa A., Sakatsume M., Wang X.Z., Sakamaki Y., Tsubata Y. et Alchi B. (2007)- SM22 alpha: The novel phenotype marker of injured epithelial cells in anti-glomerular basement membrane nephritis. *Nephron. Exp. Nephrol.* **106**: 77-87.
- Oliphant G. et Singhas A.C. (1979)- Iodination of rabbit sperm plasma membrane: relationship of specific surface proteins to epididymal function and sperm capacitation. *Biol. Reprod.* **21**: 937-944.
- Orgebin-Crist M.C. (1986)- Physiologie de l'épididyme et maturation du sperme: état actuel des connaissances. *Contraception Fertilité Sexualité.* **14**: 487-495.
- Ostrowski M.C., Kistler M.K. et Kistler W.S. (1979)- Purification and cell-free synthesis of a major protein from rat seminal vesicle secretion. *J. Biol. Chem.* **254**: 383-390.
- Oud J.L. et De Rooj D.J. (1977)- Spermatogenesis in the Chinese hamster. *Anat. Rec.* **187**: 113-124.
- Palade G. (1975)- Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Sciences* **189**: 347-358.

- Pang S.F., Chow P.H. et Wong T.M. (1979)- The role of the seminal vesicles, coagulating glands and prostate gland on the fertility and fecundity of mice. *J. Reprod. Fertil.* **56**: 129-132.
- Parker M.G. et Scrace G.T. (1978)- The androgenic regulation of abundant mRNA in Rat ventral prostate. *Eur. J. Biochem.* **85**: 399-406.
- Parker M.G., White R. et Williams J.G. (1980)- Cloning and characterization of androgen-dependant mRNA from rat ventral prostate. *J. Biol. Chem.* **255**: 6996-7001.
- Patterson S.D. et Aebersold R.H. (2003)- Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* **33** (Suppl): 311-323.
- Pearlstone J., Weber M., Lees-Miller J.P., Carpentier M.R. et Smillie L.B. (1987)- Amino acid sequence of chicken gizzard smooth muscle SM22alpha. *J. Biol. Chem.* **262**: 5985-5991.
- Peitz B. (1988) - Effects of seminal vesicle fluid components on sperm motility in the house mouse. *J. Reprod. Fertil.* **83**: 169-217.
- Peitz B. et Olds-Clarke P. (1986)- Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol Reprod.* **35**: 608-617.
- Pelham H.R.B. et Jackson R. (1976)- An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**: 247-256.
- Pelletier G., Labrie C. et Labrie F. (2000)- Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.* **165**(2): 359-370.
- Peterson R.N., Russel L.D. et Hunt W.P. (1984)- Evidence for specific binding of uncapacitated boar spermatozoa to porcine zona pellucida in vitro. *J. Exp. Zool.* **231**: 137-147.
- Petter F. (1961)- Répartition géographique et écologique des Rongeurs désertiques (du Sahara occidental à l' Iran oriental). *Mammalia.* **25**: 1-222.
- Pollard T.D et Cooper J.A. (1986)- Actin and actin-binding proteins: a critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 987-1035.
- Price D. (1936)- Normal development of the prostate and seminal vesicles of the rat with a study of experimental postnatal modifications. *Am. J. Anat.* **60**: 79-127.
- Prinjha R.K., Shapland C.E., Hsuan J.J., Totty N.F., Mason I.J. et Lawson D. (1994)- Cloning and sequencing of cDNA encoding the actin cross-linking protein transgelin defines a new family of actin-associated proteins. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* **28**: 243-255.

- Rennie P.S., Bouffard R., Brukovsky N. et Cheng H. (1984)- Increased activity of plasminogen activators during involution of the rat ventral prostate. *Biochem. J.* **221**: 171-178.
- Richthoff J., Spano M., Giwercman Y.L., Frohm B., Jepson K., Malm J., Elzanaty S., Stridsberg M. et Giwercman A. (2002)- The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Hum. Reprod.* **17**(12): 3162-3169.
- Robaire B. et Hermo L. (1988)- Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure function and their regulation. In “the Physiology of reproduction” eds E. Knobil et J. Neill et al., Raven Press Ltd New York: 999-1080.
- Rudolfsson S.H., Johansson A., Franck Lissbrant I., Wikström P. et Bergh A. (2003)- Localized expression of angiopoietin 1 and 2 may explain unique characteristics of the rat testicular microvasculature. *Biol. Reprod.* **69**(4): 1231-1237.
- Rudolfsson S.H., Wikström P., Jonsson A., Collin O. et Bergh A. (2004)- Hormonal regulation and functional role of vascular endothelial growth factor a in the rat testis. *Biol. Reprod.* **70**(2): 340-347.
- Rufo G.A.W., Singh J.P., Babcock D.F. et Lardy H.A. (1982)- Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma. *J. Biol. Chem.* **257**: 4627-4632.
- Saling P. (1982)- Development of the ability to bind to zona pellucidae during epididymal maturation: reversible immobilization of mouse spermatozoa by Lanthanum. *Biol. Reprod.* **26**: 429-436.
- San Augustin J.T. et Lardy H.A. (1990)- Bovine plasma constituents modulate the activity of Caltrin the calcium-transport regulating protein of bovine spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **265** (12): 6860-6867.
- Scheit K.H. Kemme M., Aumüller G., seitz J., Hagendorf G. et Zimmer M. (1988)- The major protein of bull seminal plasma biosynthesis and biological function. *Bioscience Reports.* **8** (6): 589-608.
- Scheitz K.H., Kemme M., Aumüller G., Scheitz J., Hagendorf G. et Zimmer M. (1988)- The major protein of bull seminal plasma biosynthesis and biological function. *Biosci. Rep.* **8** (6): 589-608.
- Schields J.M., Rogers-Graham K. et Der C. (2002)- Loss of transgelin in breast and colon tumours and in RIE Cells by ras deregulation of gene expression through raf-independent pathways. *J. Biol. Chem.* **277**: 9790-9799.
- Schifman A.L., Mansson P.E., Carter D.B., Yamada K., Harris M.M. et Harris S.E. (1988)- Structure of the androgen dependent SVS VI protein as derived from cDNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* **59**(1): 57-65.

- Schindelmeiser J., Aumüller G., Enderle-Schmitt U., Bergmann M. et Hoffmann K. (1988)- Photoperiodic influence on the morphology and the androgen receptor level of the ventral prostate gland and seminal vesicles of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Andrologia*. **20**: 105-13.
- Schliwa M. (1981)- Proteins associated with cytoplasmic actin. *Cell*. **25**: 587-590
- Seitz J. Keppler C., Rausch U. et Aumüller G. (1990)- Immunohistochemistry of rat secretory transglutaminase from rodent prostate. *Histochemistry*. **93**: 525-530.
- Setchell B.P. et Brooks D.E. (1988) Anatomy vasculature innervation and fluids of the male reproductive tract. In “ The Physiology of Reproduction” Knobil E, Neil JD. Eds. Raven Press NY: 753-856.
- Shanahan C.M., Weissberg P.L. et Metcalfe J.C.(1993)- Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ. Res*. **73**: 193-204.
- Shapland C., Hsuan J.J., Totty N.F. et Lawson D. (1993)- Purification and properties of transgelin: A transformation and Shape Sensitive Actin-gelling Protein. *The journal of Cell Biology*. **121**: 1065-1073.
- Shi Y.Y., Wang H.C. et Yin Y.H. (2005)- Identification and analysis of tumour-associated antigens in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer*. **92**: 929-934
- Shimokawa K., Katayama M., Matsuda Y., Takahashi H., Hara I. et Sato H. (2003)- Complexes of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human seminal plasma. *J. Androl*. **24**(1): 73-77.
- Shimokawa Ki K., Katayama M., Matsuda Y., Takahashi H., Hara I., Sato H. et Kaneko S. (2002)- Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. *Mol. Hum. Reprod*. **8**(1): 32-36.
- Shivaji S. (1986)- Binding of seminal plasmin to the plasma and acrosomal membranes of bovine spermatozoa. *FEBS Lett*. **196**: 255-258.
- Shivaji S., Scheit K-H. et Bhargava P.M. (1990)- Proteins of seminal plasma. Wiley, New York.
- Simon A.M., Brochard D., Morel L., Veyssiere G. et Jean C. (1997)- The androgen-dependent mouse seminal vesicle secretory protein of 99 aminoacids (MSVSP99): regulation of mRNA and preliminary characterization of the promoter. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol*. **61**: 87-95.
- Simon A.M., Veyssiere G. et Jean C. (1995)- structure and sequence of a mouse gene encoding an androgen-regulated protein : a new member of the seminal vesicle secretory protein family. *J. Mol. Endocrinol*. **15**: 305-316.
- Sinha Hikim A.P., Mati B.R. et Ghosh A. (1985)- Spermatogenesis in the bandicoot rat. I. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium. *Arch. Androl*. **14**: 151-154.

- Spring-Mills E. (1980)- The seminal vesicles. In «Male Accessory Sex Glands», edited by Spring- Mills E.ESE Hafez. Elsevier / North-Holland Biomedical Press.
- Srinivas P.R., Kramer B.S. et Srivastava S. (2001)- Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet. Oncol.* **2**: 698-704
- Steinhoff M., Eicheler W., Holterus P.M., Rausch U., Seitz J. et Aumüller G. (1994)- Hormonally induced changes in apocrine secretion transglutaminase in the rat dorsal prostate and coagulating gland. *Eur. J. Cell Biol.* **65**: 49-59
- Stossel T.P. (1989)- From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. *J. Biol. Chem.* **264**: 18261-18264.
- Sun E.L. et Flickinger C.J. (1980)- Morphological characteristics of cell with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis. *Ana. Rec.* **196**: 285-293.
- Takahaschi K., Hiwada K. et Kokuba T. (1986)- Isolation and characterization of 34000 dalton calmodulin and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. commun.* **141**: 20-26.
- Takahashi K. et Nadal-Ginard B. (1991)- Molecular cloning and sequence analysis of smooth muscle calponin. *J. Biol. Chem.* **266**: 13284-13288.
- Tanabe E.T., Lee C. et Grayback J.T. (1982)- Activities of cathepsin D in rat prostate during castration induced involution. *Journal of Urology.* **127**: 826-828.
- Taragnat C., Berger M. et Jean C. (1988)- Preliminary characterization androgen dependance and ontogeny of an abundant protein from mouse vas deferent. *J. Reprod. Fertil.* **83**: 835-847.
- Tauber P.F., Zaneveld L.J.D., Propping D. et Schumacher G.F.B. (1975)- Components of human split ejaculates. I. Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, lactoferrine, transferring and other plasma proteins. *J. Reprod. Fertil.* **43**: 249-267.
- Tentes I., Asimakopoulos B., Mourvati E., Diedrich K., Al-Hasani S. et Nikolettos N. (2007)- Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in seminal plasma. *J. Assist. Reprod. Genet.* **24**(7): 278-281.
- Tezon J.G., Ramella E., Cameo M.S., Vazquez M.H. et Blaquier J.A. 1985. Immunochemical localization of secretory antigens in the human epididymis and their association with spermatozoa. *Biol. Reprod.* **32**: 591-597.
- Thomson A.A. et Marker P.C. (2006)- Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. *Differentiation.* **74**(7): 382-392.
- Thweatt R., Lumpkin C.K. et Goldstein S. (1992)- A novel gene encoding a smooth muscle protein is overexpressed in senescent human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**: 1-7.

- Tjian R., Stinchcomb D. et Losick R. (1975). Antibody directed against Bacillus subtilis rho factor purified sodium dodecyl sulphate slab gel electrophoresis. Effect on transcription by RNA polymerase in crude extracts of vegetal and sporulating cells. *J. Biochem.* **250** (22): 8824-8828.
- Toda T., Kaji K. et Kimura N. (1998)- TMIG-2DPAGE: a new concept of twodimensional gel protein database for research on aging. *Electrophoresis.* **19**(2): 344-348.
- Tonella L., Hoogland C., Binz P.A., Appel R.D., Hochstrasser D.F. et Sanchez J.C. (2001)- New perspectives in the Escherichia coli proteome investigation. *Proteomics.* **1**(3): 409-423.
- Turner T.T. Avery E.A. Sawchuk T.J. (1994)- Assessment of protein synthesis and secretion by rat seminiferous and epididymal tubules in vivo. *Int.J.Androl.* **17**: 205-213.
- Turner T.T., Plesums J.L. et Cabot C.L. (1979)- Luminal fluid proteins of the male reproductive tract. *Biol. Reprod.* **21**: 883-890.
- Vancompernelle K.M., Gimona M., Herzog J., Vanderkhove, et Small V. (1990)- Isolation and sequence of a tropomyosin-binding fragment of turkey gizzard calponin. *FEBS Lett.* **274**: 146-150.
- Veneziale C.M., Burns J.M., Lewis J.C. et Buch K.A. (1977)- Specific protein synthesis in isolated epithelium of guinea pig seminal vesicle general features. *Biochem. J.* **166**: 167-173.
- Venter J.C. (2001)- The sequence of the human genome. *Science.* **291**(5507): 1304-1351.
- Vreeburg J.T., Holland M.K., Cornwall, et Orgebin-Crist M.C. (1990)- Secretion and transport of mouse epididymal proteins after injection of ³⁵S-methionine. *Biol. Reprod.* **43**: 113-120.
- Wagner C.L. et Kistler W.S. (1987) - Analysis of the major large polypeptides of rat seminal vesicle secretion: SVS I, II, and III. *Biol. Reprod.* **36**(2): 501-510.
- Wang Z.J. et Zhang W. (2007)- The role of seminal vesicles in male fertility. *Zhonghua Nan Ke Xue.* **13**(7): 636-638.
- Way M. et Weeds A. (1990)- cytosqueletal ups and downs. *Nature (London).* **344**: 292-294.
- Weeds A. (1982) - Actin-binding proteins; regulators of cell architecture and motility. *Nature (London).* **296**: 811-816.
- Weil A.J. (1965)- The spermatozoa-coating antigen (SCA) of the seminal vesicle. *Ann. NY. Acad. Sci.* **124**: 267-269.

- Williams L., Mc Donald C. et Higgins S.J. (1985)- Sequence organisation of rat seminal vesicle F gene: location of transcriptional start point and sequence comparison with six other androgen regulated genes. *Nucleic Acids Research*. **13**: 659-672.
- Williams L., Mc Donald C., Jackson S., McIntosh E. et Higgins S. (1985)- Isolation and characterization of genomic and cDNA clones for an androgen regulated secretory protein of rat seminal vesicles. *Nucleic Acids Research*. **11**: 5021-5032.
- Williams-Ashman H.G. (1984)- Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluid. *Mol. and Cell. Biochem.* **58**: 51-61.
- Winder S.J., Jess T. et Aysscough K.R. (2003)- SCPI encodes an actin-binding protein in yeast. *Biochem. J.* **375**: 287-295.
- Wulfschlegel J.D., Sgroi D., Krutzsch H., Maclean K.M.C., Garvey K. et Knowlton M. (2002)- Proteomics of human ductal carcinoma *in situ*. *Cancer Res.* **62**: 6740-6749.
- Yamashita S. (2004)- Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **279**(2): 768-778.
- Yang Z., Chang Y.J., Miyamoto H., Ni J., Niu Y.J. et Chen Z.D. (2007)- Transgelin functions as a suppressor via inhibition of ARA54-enhanced androgen receptor transactivation and prostate cancer cell growth. *Mol. Endocrinol.* **21**: 343-358.
- Yoshida K., Kawano N., Yoshiike M., Yoshida M., Iwamoto T. et Morisawa M. (2008)- Physiological roles of semenogelin I and zinc in sperm motility and semen coagulation on ejaculation in humans. *Mol. Hum. Reprod.* **14**(3): 151-156.
- Zaime A., Laraki M., Gautier J.Y. et Garnier D.H. (1992)- Seasonal variations of androgens and of several sexual parameters in male *Meriones shawi* in southern Morocco. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86**: 289-296.
- Zeidan A., Swärd K., Nordström I., Ekblad E., Zhang J.C.L., Parmacek M.S. et Hellstrand P. (2004)- Ablation of SM22 alpha decreases contractility and actin contents of mouse vascular smooth muscle. *FEBS Letters*. **562**: 141-146.
- Zhang X.D. et Jin B.F. (2007)- The role of seminal vesicles in male reproduction and sexual function. *Zhonghua Nan Ke Xue.* **13**(12): 1113-1116

Annexe I

Collection d'animaux et d'organes

Année de capture	Mois de capture	Nombre d'individus capturés	Code	Poids animal (g)	Poids VS droite (g)	Poids VS gauche (g)	Poids EpD (g)	Poids EpP (g)	Lieu de capture	
2000	Mai	05	BM00 ₁	120	0.0455				Beni Abbès	
			BM00 ₂	162	0.0338					
			BM00 ₃	121	0.0253					
			BM00 ₄	174	0.0380					
			BM00 ₅	135	0.0544					
2001	Mars	03	MM01 ₁	184	0.0827	0.0642	0.0209	0.0532	M'sila	
			MM01 ₂	157	0.0847	0.1058	0.1022	0.0488		
			MM01 ₃	130	0.0354	0.0334	0.0686	0.0311		
	Juin	05	MJ01 ₁	217	0.0381	0.0536	nd	nd	M'sila	
			MJ01 ₂	215	0.1549	0.0975	nd	nd		
			MJ01 ₃	148	0.1616		nd	nd		
			MJ01 ₄	171	0.1602	0.1143	nd	nd		
	MJ01 ₅	172	0.1751		nd	nd				
2002	Avril	4	MA02 ₁	137	0.3186		0.0863	0.0646	M'sila	
			MA02 ₂	70	0.0427		0.010	0.049		
			MA02 ₃	101	0.2018		0.0737	0.0358		
			MA02 ₄	93	0.0887		0.0271	0.0563		
	Décembre	3	MD02 ₁	194	0.2874		nd	nd	M'sila	
			MD02 ₂	222	0.5095		nd	nd		
			MD02 ₃	113	0.5613		nd	nd		
2003	Février	05	MF03 ₁	144	0.5027		0.1755	0.1176	M'sila	
			MF03 ₂	180	0.5953	0.6743	0.3137	0.1716		
			MF03 ₃	142	0.4542	0.4319	0.2703	0.1291		
			MF03 ₄	136	0.4136	0.4313	0.2752	0.2156		
			MF03 ₅	270	0.941		nd	nd		
	Mars	03	MM03 ₁	180	0.2068	0.2686	0.2404	0.1697	M'sila	
			MM03 ₂	168	0.3315	0.3472	0.2306	0.1333		
			MM03 ₃	144	0.3683	0.3220	0.3060	0.1359		
	Avril	01	MA03 ₁	148	0.2154	0.1555	0.2074	0.1425	M'sila	
	Octobre	04	MO03 ₁	158	0.2682	0.1358	0.199	0.204	M'sila	
			MO03 ₂	174	0.3179	0.2591	0.233	0.129		
			MO03 ₃	144	0.445		0.179	0.165		
			MO03 ₄	174	0.487		0.200	0.159		
	Novembre	03	MN03 ₁	102	0.606		0.182	0.110	M'sila	
MN03 ₂			118	0.834		0.059	0.213			
MN03 ₃			148	0.721		0.022	0.228			
2004	Janvier	06	MJ04 ₁	102	0.307		0.150	0.120	M'sila	
			MJ04 ₂	154	0.353		0.118	0.112		
			MJ04 ₃	196	1.192		0.267	0.176		
			MJ04 ₄	250	1		0.349	0.15		
			BJ04 ₁	146	0.309	0.168	0.086			Beni Abbès
	BJ04 ₂	150	0.374	0.113	0.105					
	Octobre	06	MO04 ₁	142	0.585		0.200	0.161	M'sila	
			MO04 ₂	161	0.570		0.161	0.043		
			MO04 ₃	158	0.561		0.206	0.289		
			MO04 ₄	189	0.688		0.239	0.144		
			MO04 ₅	162	0.447		0.229	0.213		
			MO04 ₆	161	0.382		0.137	0.221		
	2008	Janvier	07	MJ08 ₁	186	1.0261		nd	nd	M'sila
				MJ08 ₂	178	0.9865		nd	nd	
MJ08 ₃				179	1.0058		nd	nd		
MJ08 ₄				186	1.0658		nd	nd		
MJ08 ₅				160	0.8925		nd	nd		
MJ08 ₆				130	0.7892		nd	nd		
MJ08 ₇				181	1.0689		nd	nd		
TOTAL		55								

Annexe II

Extraction protéines

- tampon A
 - Saccharose 0.25 M
 - MgCl₂ 3 mM
 - Tris 25 mM
 - PMSF 25 mM

Annexe III

Electrophorèse 1D

- tampon de charge (Laemmli)
 - SDS 10 %
 - Bleu de bromophénol 0.1 %
 - β-mercaptoéthanol 25 %
- tampon de migration
 - Glycine 200 mM
 - SDS 0.1 %
 - Tris-HCl 25 mM
 - pH 8.3
- solution de coloration
 - Bleu de Coomassie G250 (0.25M) 0.25 %
 - Méthanol 50 %
 - Acide acétique 10 %
 - Eau distillée 40 %
- solution de décoloration
 - Méthanol 4.5 %
 - Acide acétique 10 %
 - Glycérol 2.5 %
 - Ethanol 10 %
 - Eau distillée 73 %

- tampon de conservation
 - Tris-HCl 1,5M 500 ml
 - SDS 20% 10 ml
 - Eau distillée (qsp) 2000 ml

Annexe IV
Electrophorèse 2D

- tampon de réhydratation
 - Urée 8.4 g
 - Thiourée 3 g
 - Chaps 0.8 g
 - Bleu de bromophénol (0.1%) 0.5 ml
 - Eau milliQ (qsp) 20 ml

- solution de DTT à 10 mg/ml

- solution d'équilibration
 - Tris-HCl (1.5M-pH 8.8) 6.67 ml
 - Urée 72.7 g
 - Glycérol 69 ml
 - SDS 4 g
 - Bleu de Bromophénol (0.1%) 2 ml
 - H₂O MilliQ (qsp) 200 ml

Annexe V

Western Blotting

- Tampon de transfert
 - Tris-HCl 3.03 g
 - Glycine 11.26 g
 - Méthanol 100 ml
 - Eau distillée (qsp) 1000 ml
 - pH 8.3

- tampon TBS
 - Tris-HCl 7.88 g
 - NaCl 8.77 g
 - Eau distillée (qsp) 1000 ml
 - pH 7.5

Annexe VI

Réactifs d'immunodiffusion double (IDD)

- Tampon véronal pH 8.2
 - NaCl 8.5 g
 - Barbitone acide 0.575 g
 - Barbitone sodium 0.185 g
 - MgCl₂ 0.168 g
 - CaCl₂ 0.028 g
 - Eau distillée qsp 1000 ml

- Solution de coloration
 - Méthanol 40 ml
 - Acide acétique 10 ml
 - Bleu de Coomassie 5 ml
 - Eau distillée (qsp) 100 ml

- Solution de bleu de Coomassie
 - Bleu de Coomassie G250 100 mg
 - Méthanol 50 ml
 - Acide acétique 10 ml
 - Eau distillée (qsp) 100 ml

- solution de décoloration
 - Méthanol 20 ml
 - Acide acétique 10 ml
 - Glycérol 2 ml
 - Eau distillée (qsp) 100 ml

Annexe VII

Traduction

- Milieu réactionnel
 - Lysat de réticulocytes 70 %
 - ³⁵[S]-méthionine (10 mCi/ml) 12 %
 - Acides aminés (sans méthionine) 2.5 %
 - RNAsine (40 U/μl) 1 %
 - ARNt de levure (100 μg/ml) 0.5 %
 - Eau bidistillée stérile 14 %

Annexe VIII

Identification des protéines

- solution enzymatique (Quantités pour 1 tube Eppendorf)
 - NH₄HCO₃ (25 mM) 42 μl
 - Trypsine (0.1 μg/μl) 6 μl
 - CaCl₂ (1%) 2 μl
 - Volume total 50 μl

- Solutions de dessalage sur micro colonnes Zip-Tiptm C₁₈ (millipore)
 - Acétonitrile/acide formique 1% (v/v) Etape 1
 - Acétonitrile/acide formique 1% (4v/1v) Etape 2
 - Acide formique 1% Etape 3

Annexe IX

Résultats bruts séquençage

A. Identification de POSVP₂₁

Mascot Search Results

```

User           : isa
Email          :
Search title   : bulletin du 15-04-2008 LB
MS data file   :
\\TOLTEC2\iBEB\SBTN\_Documents_communs\Protéomique\Masse\bulletins\2008-04-
15\L-BELLANGER\ech4.RAW
Database       : SwissProt 55.2 (362782 sequences; 130497792
residues)
Taxonomy       : Rattus (6939 sequences)
Timestamp      : 21 Apr 2008 at 15:05:54 GMT
Enzyme         : Trypsin/P
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
Variable modifications : Oxidation (M)
Mass values    : Monoisotopic
Protein Mass   : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 6 ppm (# 13C = 1)
Fragment Mass Tolerance: ± 0.7 Da
Max Missed Cleavages : 1
Instrument type : ESI-TRAP
Number of queries : 2330

```

<u>TAGL RAT</u>	P31232 TAGL RAT Transgelin - Rattus norvegicus (Rat)
<u>BCLX RAT</u>	P53563 BCLX RAT Apoptosis regulator Bcl-X - Rattus norvegicus (Rat)
<u>MLRN RAT</u>	Q64122 MLRN RAT Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform - Rattus norvegicus (Rat)
<u>MLRB RAT</u>	P18666 MLRB RAT Myosin regulatory light chain 2-B, smooth muscle isoform - Rattus norvegicus (Rat)
<u>COF1 RAT</u>	P45592 COF1 RAT Cofilin-1 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>NDKB RAT</u>	P19804 NDKB RAT Nucleoside diphosphate kinase B - Rattus norvegicus (Rat)
<u>ARF1 RAT</u>	P84079 ARF1 RAT ADP-ribosylation factor 1 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>PRDX2 RAT</u>	P35704 PRDX2 RAT Peroxiredoxin-2 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>PPIA RAT</u>	P10111 PPIA RAT Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A - Rattus norvegicus (Rat)
<u>K2C5 RAT</u>	Q6P6Q2 K2C5 RAT Keratin, type II cytoskeletal 5 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>PPIB RAT</u>	P24368 PPIB_RAT Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor - Rattus norvegicus (Rat)
<u>ALDR RAT</u>	P07943 ALDR RAT Aldose reductase - Rattus norvegicus (Rat)
<u>DEST RAT</u>	Q7M0E3 DEST RAT Destrin - Rattus norvegicus (Rat)
<u>CSRP1 RAT</u>	P47875 CSRP1 RAT Cysteine and glycine-rich protein 1 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>HSPB6 RAT</u>	P97541 HSPB6 RAT Heat shock protein beta-6 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>FRIH RAT</u>	P19132 FRIH RAT Ferritin heavy chain - Rattus norvegicus (Rat)
<u>PRDX5 RAT</u>	Q9R063 PRDX5 RAT Peroxiredoxin-5, mitochondrial precursor - Rattus norvegicus (Rat)
<u>ARP5L RAT</u>	A1L108 ARP5L_RAT Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein - Rattus norvegicus (Rat)
<u>APT RAT</u>	P36972 APT RAT Adenine phosphoribosyltransferase - Rattus norvegicus (Rat)
<u>KCRB RAT</u>	P07335 KCRB RAT Creatine kinase B-type - Rattus norvegicus (Rat)
<u>HBB1 RAT</u>	P02091 HBB1 RAT Hemoglobin subunit beta-1 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>HSPB1 RAT</u>	P42930 HSPB1 RAT Heat shock protein beta-1 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>HBA RAT</u>	P01946 HBA RAT Hemoglobin subunit alpha-1/2 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>SL9A3 RAT</u>	P26433 SL9A3 RAT Sodium/hydrogen exchanger 3 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>GTR1 RAT</u>	P11167 GTR1_RAT Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 - Rattus norvegicus (Rat)
<u>CDC42 RAT</u>	Q8CFN2 CDC42_RAT Cell division control protein 42 homolog precursor - Rattus norvegicus (Rat)

B. Alignement POSVP₂₁ & TAGLN de *Rattus norvegicus*

Mascot Search Results

Protein View

Match to: **TAGL_RAT** Score: 11225

P31232|TAGL_RAT **Transgelin - Rattus norvegicus** (Rat)

Found in search of

\\TOLTEC2\iBEB\SBTN_Documents_communs\Protéomique\Masse\bulletins\2008-04-15\L-BELLANGER\ech4.RAW

Nominal mass (M_r): **22645**;

NCBI BLAST search of TAGL_RAT against nr

Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Rattus norvegicus

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin/P: cuts C-term side of KR

Sequence Coverage: **62%**

Matched peptides shown in Bold Red

1 MANKGPSYGM SREVQSKIEK KYDEELEERL **VEWIVMQCGP DVGRPDRGRL**
 51 **GFQVWLKNGV ILSKLVNSLY PEGSKPVKVP ENPPSMVFKQ MEQVAQFLKA**
 101 **AEDYGVTKTD MFQTVDLFEG** KDMAAVQRTV MALGSLAVTK NDGHYRGDPN
 151 **WFMKKAQEHK REFTDSQLQE GKHVIGLQMG SNRGASQAGM TGYGRPRQII**
 201 S

C. Identification de P_{21Ed}

TAGL_RAT Mass: 22645 Score: 1256 Queries matched: 29 emPAI: 7.25

P31232|TAGL_RAT Transgelin - Rattus norvegicus (Rat)

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<u>88</u>	495.794	989.574	989.570	4.05	0	72	1.3e-007	1	R.LGFQVWLK.N <u>87</u>
<u>91</u>	497.728	993.441	993.438	2.83	0	59	1.7e-006	1	R.GDPNWFMK.K <u>92</u>
<u>364</u>	603.824	1205.634	1205.629	3.87	0	52	3.1e-005	1	K.LVNSLYPEGSK.P <u>363</u>
<u>380</u>	611.320	1220.626	1220.622	3.21	0	70	4.3e-007	1	K.QMEQVAQFLK.A <u>379</u>
<u>394</u>	619.318	1236.621	1236.617	2.75	0	(63)	1.5e-006	1	K.QMEQVAQFLK.A
<u>408</u>	622.823	1243.631	1243.627	2.86	0	65	8.7e-007	1	K.VPENPPSMVFK.Q <u>407</u>
<u>425</u>	630.820	1259.625	1259.622	2.73	0	(63)	1.4e-006	1	K.VPENPPSMVFK.Q <u>426</u>
<u>647</u>	765.864	1529.714	1529.707	4.47	0	80	1.6e-008	1	K.TDMFQTVDLFEGK.D <u>646</u>
<u>649</u>	765.933	1529.850	1529.845	3.35	1	49	2.5e-005	1	K.LVNSLYPEGSKPVK.V <u>648 650</u>
<u>765</u>	523.623	1567.848	1567.843	2.90	1	39	0.00024	1	K.PVKVPENPPSMVFK.Q
<u>1133</u>	579.594	1735.759	1735.753	3.72	1	12	0.074	1	K.NDGHYRGDPNWFMK.K
<u>1557</u>	709.689	2126.046	2126.040	2.79	1	91	2.8e-009	1	R.LVEWIVMQCGPDVGRPDR.G <u>1556 1558 1559</u>
<u>1567</u>	715.022	2142.044	2142.035	4.12	1	(86)	5.2e-009	1	R.LVEWIVMQCGPDVGRPDR.G <u>1566</u>
<u>1649</u>	1233.088	2464.161	2464.147	5.94	1	90	1.9e-009	1	K.AEDYGVTKTDMFQTVDLFEGK.D <u>1647 1648</u>

D. Alignement de P_{21Ed} & TAGLN de *Rattus norvegicus*

Mascot Search Results

Protein View

Match to: TAGL_RAT Score: 1256

P31232|TAGL_RAT Transgelin - Rattus norvegicus (Rat)

Found in search of

\\TOLTEC2\iBEB\SBTN_Documents_communs\Protéomique\Masse\bulletins\2008-04-15\L-BELLANGER\ech2.RAW

Nominal mass (M_r): 22645;

NCBI BLAST search of TAGL_RAT against nr

Unformatted sequence string for pasting into other applicationsTaxonomy: Rattus norvegicus

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin/P: cuts C-term side of KR

Sequence Coverage: 48%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MANKGPSYGM SREVQSKIEK KYDEELEERL **VEWIVMQCGP DVGRPDRGRL**
51 **GFQVWLKNGV** ILSKLVNSLY **PEGSKPVKVP ENPPSMVFKQ MEQVAQFLKA**
101 **AEDYGVTKTD MFQTVDLFEG** KDMAAVQRTV MALGSLAVTK **NDGHYRGDPN**
151 **WFMKKAQEHK** REFTDSQLQE GKHVIGLQMG SNRGASQAGM TGYGRPRQII
201 S

E. Identification de P_{21Ep}

TAGL_RAT Mass: 22645 Score: 904 Queries matched: 25 emPAI: 4.56
 P31232|TAGL_RAT Transgelin - Rattus norvegicus (Rat)

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<u>81</u>	495.794	989.573	989.570	3.65	0	76	4.8e-008	1	R.LGFQVWLK.N <u>80</u>
<u>411</u>	603.824	1205.634	1205.629	3.87	0	47	9.2e-005	1	K.LVNSLYPEGSK.P <u>410</u>
<u>421</u>	611.320	1220.625	1220.622	2.23	0	(49)	4.5e-005	1	K.QMEQVAQFLK.A <u>422</u>
<u>493</u>	619.318	1236.622	1236.617	3.56	0	60	3.4e-006	1	K.QMEQVAQFLK.A
<u>531</u>	622.823	1243.631	1243.627	2.86	0	53	1.5e-005	1	K.VPENPPSMVFK.Q <u>530</u>
<u>542</u>	630.820	1259.625	1259.622	2.57	0	(25)	0.009	1	K.VPENPPSMVFK.Q
<u>826</u>	765.864	1529.714	1529.707	4.21	0	112	1.2e-011	1	K.TDMFQTVDLFEGK.D <u>827</u>
<u>829</u>	765.932	1529.850	1529.845	3.09	1	42	0.00011	1	K.LVNSLYPEGSKPVK.V <u>828 830 831 832</u>
<u>1026</u>	523.624	1567.850	1567.843	4.24	1	48	2.8e-005	1	K.PVKVPENPPSMVFK.Q <u>1025</u>
<u>2113</u>	709.690	2126.049	2126.040	4.21	1	79	3.2e-008	1	R.LVEWIVMQCGPDVGRPDR.G <u>2114 2115 2116</u>
<u>2237</u>	822.394	2464.161	2464.147	5.66	1	65	6.2e-007	1	K.AAEDYGVTKTDMFQTVDLFEGK.D <u>2236</u>

F. Aligement de P_{21Ep} & TAGLN de *Rattus norvegicus*

Mascot Search Results

Protein View

Match to: TAGL_RAT Score: 904

P31232|TAGL_RAT Transgelin - Rattus norvegicus (Rat)

Found in search of

\\TOLTEC2\iBEB\SBTN_Documents_communs\Protéomique\Masse\bulletins\2008-04-15\L-BELLANGER\ech3.RAW

Nominal mass (M_r): 22645;

NCBI BLAST search of TAGL_RAT against nr

Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Rattus norvegicus

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin/P: cuts C-term side of KR

Sequence Coverage: 41%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MANKGPSYGM SREVQSKIEK KYDEELEERL **VEWIVMQCGP DVGRPDRGRL**
 51 **GFQVWLKNGV** ILSKLVNSLY **PEGSKPVKVP ENPPSMVFKQ MEQVAQFLKA**
 101 **AEDYGVTKTD MFQTVDLFEG** KDMAAVQRTV MALGSLAVTK NDGHYRGDPN
 151 WFMKKAQEHK REFTDSQLQE GKHVIGLQMG SNRGASQAGM TGYGRPRQII
 201 S

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publication internationale

- **Kaci-Ouchfoun N.**, Hadj Bekkouche F., Abbadi M.C., and Gernigon-Spychalowicz T. (2008)- Purification preliminary characterization and immunohistochemical localization of POSVP₂₁ in the sand rat (*Psammomys obesus*) seminal vesicles. *Theriogenology*. **69**: 525-535.

Acte de colloque

- **Kaci-Ouchfoun N.**, Abbadi M.C., Hadj Bekkouche F. and Gernigon-Spychalowicz T. (2006)- Purification preliminary characterization and immunohistochemical localization of POSVP₂₁ in the sand rat (*Psammomys obesus*) seminal vesicles. *The Italian Journal Of Mammalogy*. ISSN 1825-5272 : 66

Communications internationales (09)

- Gernigon-Spychalowicz T., Belhocine M. et **Kaci N.** (2004)- Ecophysiologie de deux rongeurs déserticoles *Psammomys obesus* et *Meriones libycus*.. 2^{ème} Congrès International d'Ecologie des Populations et des Communautés Animales de la Méditerranée Occidentale. El Goléa. 3-6 Octobre 2004.
- **Kaci-Ouchfoun N.**, Hadj Bekkouche F., Abbadi M.C. et Gernigon-Spychalowicz T.(2007)- Preliminary characterization and immunohistochemical localization of POSVP₂₁ in the sand rat (*Psammomys obesus*) seminal vesicles. *Congrès de Physiologie de Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T)*. 11-13 Avril 2007, Toulouse, France.
- H. Meriche, S Meriche, **N. Kaci**, N. Djadoun, H. Hamdani et M.C. Abbadi (2002)- Comparaison de deux extraits cellulaires (extrait thymique de veau et extrait de cellules HEP-2) dans la mise en évidence des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles par électrosynérèse au cours des connectivites. *Séminaire International, Institut Pasteur d'Algérie*, Avril 2002.
- **Kaci N.**, Hadj Bekkouche F., Boudrissa A. and Gernigon-Spychalowicz T. (2004)- Androgen-dependent protein in the seminal vesicle of a desert rodent *Psammomys obesus* in two algerian areas (M'sila and Beni Abbes). *IX ème Conférence Internationale sur les Rongeurs et l'Espace* (Lublin, Pologne. Juillet 2004).
- **Kaci-Ouchfoun N.**, Hadj Bekkouche F, Abbadi M.C. et Gernigon-Spychalowicz T. (2004)- Identification d'une protéine androgénodépendante chez un rongeur déserticole (*Psammomys obesus*) d'Algérie. *71^{ème} Congrès de la Société de Physiologie* (Paris Bercy, Septembre 2004)
- **Kaci-Ouchfoun N.**, Abbadi M.C., Hadj Bekkouche F. and Gernigon-Spychalowicz T. (2006)- Purification preliminary characterization and immunohistochemical localization of POSVP₂₁ in the sand rat (*Psammomys obesus*) seminal vesicles.

XX^{ème} Conférence internationale Rodens et Spatium. 24-28 Juillet 2006, Parme Italie.

- **Kaci-Ouchfoun N.**, Abbadi MC., Hadj Bekkouche F. and Gernigon-Spychalowicz T. (2007)- Characterization and site synthesis localization of a major androgen dependent protein from sand rat seminal vesicles. *Symposium d'Endocrinologie de la Reproduction. 5-7 septembre 2007, Mikolajki, Pologne.*
- **Kaci-Ouchfoun N.**, Hadj Bekkouche F., Abbadi M.C. et Gernigon-Spychalowicz T. (2007)- Caractérisation biochimique et détermination du site de synthèse d'une protéine androgénodépendante du tractus génital mâle d'un rongeur déserticole *Psammomys obesus*. *111^{èmes} Journées annuelles de la Société Zoologique de France. 18-25 septembre 2007, Bastia, Corse*
- **Kaci-Ouchfoun N.**, Hadj Bekkouche F., Abbadi M.C., Boudrissa A. et Gernigon-Spychalowicz T. (2008)- Site synthesis determination and partial sequence analysis of a major androgen-dependent protein from sand rat (*Psammomys obesus*) seminal vesicles. *XXI^{ème} Conférence internationale Rodens et Spatium. 24-28 Juillet 2008, Russie.*

Communications nationales (03)

- S. Meriche, H Meriche, **N. Kaci** et M.C. Abbadi (2000)- La maladie coeliaque : aspects immunologiques. *Société Algérienne de Pédiatrie. Novembre 2000 (ENA Alger).*
- Boubekri A., Bahiani M., Belhocine M., Boufermes R., Keddache A., Hammouche S., **Kaci N.**, Mataoui H., Menad R., Smai-Hamdidouche S., Khammar F., Gernigon T. (2006)- Biologie de la reproduction de quelques vertébrés sahariens. *Journée scientifique du LRZA, cité des sciences, Alger, 15 novembre.*
- **Kaci-Ouchfoun N.**, Gernigon-Spychalowicz T., Hadj Bekkouche F et Abbadi M.C. (2005) Caractérisation d'une protéine androgénodépendante dans le tractus génital mâle de *Psammomys obesus*. *Société Algérienne d'Immunologie. Alger 26, 27 Novembre 2005*