

N° d'ordre : 09-2014-11/S.B

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

Faculté des Sciences Biologiques



## MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

EN : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Diététique et Physiologie du Métabolisme et du Système Cardiovasculaire.

Par : M<sup>elle</sup> Nesrine ZEGHLOUL

Sujet

**Isolement, purification et caractérisation d'une protéine  
androgéno-dépendante de la vésicule séminale du rat des sables  
*Psammomys obesus***

Soutenu publiquement le 06-07-2014 devant le jury composé de :

M <sup>me</sup> S.EL AOUI	Professeur (à l'USTHB)	Présidente
M <sup>me</sup> N.KACI	Professeur (à l'USTHB)	Directrice de thèse
M <sup>me</sup> T.GERNIGON	Professeur (à l'USTHB)	Examinatrice
M <sup>me</sup> A.AÏT LOUNIS	Maître de conférences (à l'USTHB)	Examinatrice
M <sup>r</sup> Y.SOLTANI	Maître de conférences (à l'USTHB)	Examinateur

## Résumé

*Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi* sont des rongeurs déserticoles de la famille des Gerbillidae caractérisés par un cycle saisonnier de la reproduction. L'analyse électrophorétique monodimensionnelle en conditions dénaturantes (**SDS-PAGE**) des protéines solubles de l'homogénat des **vésicules séminales** et des **épididymes** de *Psammomys obesus* en période de **reproduction** et en période de **repos** sexuel montre la présence d'une protéine de PM apparent de **92kDa**. Chez cette espèce, en période de repos sexuel, l'analyse **zymographique** sur gel de gélatine révèle la présence d'une activité **gélatinase** pour la protéine de **92kDa** ou **MMP-9**. Cette activité semble être réprimée soit par la testostérone soit par la **transgeline protéine androgéno-dépendante majeure de 22,6 kDa caractérisée et identifiée chez *Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi*** pendant la période de reproduction.

Deux autres activités **gélatinase** correspondant aux protéines de PM de **52kDa (MMP-3)** et de **60kDa (MMP-13)** sont révélées au niveau des **épididymes** de *Meriones libycus* et de *Meriones shawi* pendant la période de **reproduction**.

Chez les rongeurs du genre Méridon : *Meriones libycus* et *Meriones shawi* l'électrophorèse et la zymographie en gel de gélatine révèlent une activité **gélatinase** spécifiques aux protéines de PM de **52kDa (MMP-3)** et de **60kDa (MMP-13)**, exprimées au niveau des épididymes et actives en période de reproduction.

**Mots clés:** *Psammomys obesus*; *Meriones libycus*; *Meriones shawi*; vésicules séminales; épididymes; SDS-PAGE; zymographie; transgeline; MMP-9; MMP-3; MMP-13.

## *Remerciements*

*Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse Mme le professeur **N.KACI**, merci de la confiance que vous m'avez accordé pour ce projet, merci pour votre incroyable réactivité, merci pour votre optimisme à toute épreuve, merci pour votre disponibilité.*

*J'adresse mes remerciements aux membres du jury d'avoir accepté de consacrer leur temps précieux à l'évaluation de ce travail.*

*Je remercie madame le Professeur **S.EL AOUI** de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.*

*Je tiens à témoigner de la profonde gratitude à Mme le professeur **T.GERNIGON** pour l'intérêt permanent porté au domaine de la recherche, et dont la présence dans ce jury m'honore .*

*J'adresse mes vifs remerciements à Mr **Y.SOLTANI** d'avoir accepté d'examiner ce travail malgré ses nombreuses obligations.*

*Je remercie madame **A.AÏT LOUNIS** qui, avec beaucoup de gentillesse, a accepté de juger ce travail.*

*Je remercie monsieur le professeur **A.BOUFERSSAOUI** de m'avoir accueilli dans son laboratoire afin de mener à bien ce travail de recherche. J'ai grandement apprécié votre gentillesse et votre bienveillance. Merci de m'avoir permis de faire mes premiers vrais pas dans la recherche dans votre laboratoire.*

*J'adresse mes remerciements aux membres de l'équipe LRZA.*

*Merci Mr le professeur **Y.KACI** pour l'intérêt que vous avez toujours montré pour ce projet de thèse, merci pour votre soutien, pour votre bienveillance et pour votre disponibilité et pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée durant l'accomplissement de ce travail.*

*Merci à tous les membres du laboratoire de biologie des sols pour votre bonne humeur de tous les jours. Ce fut un réel plaisir de partager tout cela avec vous.*

*Ma mère, c'est ton soutien inconditionnel et ton amour qui m'ont permis d'aller au bout. C'est donc le moment pour moi de te témoigner, maman toute ma reconnaissance. Tout cela c'est grâce à toi !*

*Wafa, merci pour ton enthousiasme sans faille et tellement important dans les moments de doute et de découragement. Merci de ne pas avoir montré tes inquiétudes quand moi j'en avais, ton aide m'a été précieuse mon amie.*

*Les filles du laboratoire, Naima, Wissem, Nassima, Amel, merci d'avoir partagé le quotidien, la recherche, les rires, un peu de pleurs parfois, les problèmes de manips, les potins (beaucoup), les résultats encourageants, les conseils techniques, les discussions futiles et en tout genre...Fanny, merci de m'avoir accompagné dans mes premiers pas.*

*Sarah, ma copine, pendant 3 ans tu as été mon soutien au quotidien. Merci d'avoir été là, en tant qu'amie. Merci d'avoir été là pour partager avec moi le quotidien de la recherche, joie, peur, enthousiasme, larmes, rire, déception, motivation, jubilation, angoisse, excitation, enfin tout autant d'émotions liées à ce travail. Merci d'avoir été présente jusqu'au bout.*

*Djamila et Nour el-houda. Quel plaisir de travailler avec vous, je vous souhaite tout plein de belles choses pour la suite, votre avenir professionnel et personnel.*

*A mes amis, qui me sont si chers : Nadir, Amina, Nadia, Farid, Lydia, Khadija, Fazila, Karima, Salima et Djamila (microscopie électronique).*

*Et un merci particulier aux Psammomys et aux Meriones, sans eux rien ne serait !!!!*

### Liste des abréviations utilisées

ABP	Androgen Binding Protein
APS	Persulfate d'ammonium
BSA	Sérum albumin bovine
CAM	Molécule d'adhésion cellulaire
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GPC	Glycerophosphorylcholine
GPI	Guanosyl Phosphatidyl Inositol
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IGFBP-1	Insulin Growth Factor Binding Protein-1
LH	Luteinizing Hormone
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MMP	Matrice Métalloprotéinase
MSVSP99	Mouse seminal vesicle secretory protein of 99 aminoacids
MT-MMP	Transmembranaire-Matrice Métalloprotéinase Protéine
SVA	Seminal vesicle autoantigen
NO	Monoxyde d'azote
PBS	Phosphate-Buffer Salin
pH	Potentiel de protons
PMSF	Phenylméthylsulfonyl fluoride
RECK	Reversion inducing Cysteine rich protein with Kazal motifs
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SH	Thiol
SVS	Seminal Vesicle Secretory
TEMED	NN Tetraméthylène diamine

TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor- $\alpha$
TIMP	Tissular Inhibitor Metalloproteinase Protein
Tris	Tris hydroxyméthyl amino méthane

## *Index des figures*

1	Appareil reproducteur mâle de <i>Psammomys obesus</i> en période d'activité sexuelle.	2
2	Composition biochimique de la matrice extracellulaire.	8
3	Différents domaines caractéristiques des métalloprotéinases.	16
4	Complexe TIMP-1 et domaine catalytique de la MMP-3	19
5	Composition chimique des monomères d'acrylamide et de bisacrylamide	26
6	Profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de <i>Psammomys obesus</i> en période de reproduction et en période de repos sexuel, de <i>Rattus norvegicus</i> et de <i>Mus musculus</i> .	35
7	Profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de <i>Meriones libycus</i> en période de reproduction et en période de repos sexuel.	38
8	Comparaison des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de trois rongeurs de la famille des Gerbillidae ( <i>Psammomys obesus</i> , <i>Meriones libycus</i> et <i>Meriones shawi</i> ) en période de reproduction.	39
9	Profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales des rongeurs à reproduction saisonnière ( <i>Psammomys obesus</i> , <i>Meriones libycus</i> et <i>Meriones shawi</i> ) et des rongeurs à reproduction continue ( <i>Rattus norvegicus</i> et <i>Mus musculus</i> ).	40
10	Profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des épидидymes de <i>Psammomys obesus</i> en période de reproduction et en période de repos sexuel.	41
11	Profils électrophorétiques des protéines solubles des épидидymes proximaux et distaux de <i>Meriones libycus</i> en période de reproduction et en période de repos sexuel.	43
12	Profils de zymographie des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de <i>Psammomys obesus</i> en période de repos sexuel.	46
13	Profil de zymographie des protéines solubles des vésicules séminales de <i>Meriones libycus</i> en période de repos sexuel.	47

- 14 Zymogrammes des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de *Meriones libycus* en période de repos sexuel et de *Meriones shawi* en période de reproduction. **50**
- 15 Zymogrammes des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de *Meriones libycus* en période de repos sexuel et de *Meriones shawi* en période de reproduction. **51**

## *Liste des tableaux*

<b>I</b>	Composition du gel de séparation d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).	<b>26</b>
<b>II</b>	Composition du gel de concentration d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).	<b>27</b>
<b>III</b>	Composition du gel de séparation de zymographie.	<b>30</b>
<b>VI</b>	Composition du gel de concentration de zymographie.	<b>31</b>
<b>V</b>	Mise en évidence des MMPs et de l'activité gélatinase correspondante au niveau des vésicules séminales et des épидидymes de trois rongeurs déserticoles en période de reproduction et en période de repos sexuel.	<b>52</b>

## SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Rappels bibliographiques</b>	
I. Anatomie de l'appareil génital mâle .....	2
I.1 Les testicules .....	2
I.2 Les voies excrétrices .....	3
I.2.1 <i>Les épидидymes</i> .....	3
I.3 Les glandes annexes.....	4
I.3.1 <i>La prostate</i> .....	4
I.3.2 <i>Les vésicules séminales</i> .....	5
I.3.2.1 Structure histologique de la vésicule séminale.....	5
I.3.2.2 Fonctions de la vésicule séminale.....	6
I.3.3 Le plasma séminal.....	6
I.3.4 Les protéines androgène-dépendantes du liquide séminal.....	7
II. La matrice extracellulaire (MEC).....	8
II.1 Protéines structurales de la matrice extracellulaire.....	9
II.1.1 Les protéines fibreuses.....	9
II.1.2 Les glycoprotéines .....	9
II.1.3 Les protéoglycanes.....	9
II.2 Protéines enzymatiques ou endopeptidases de la matrice extracellulaire.....	9
II.2.1 Les métalloprotéinases matricielles (MMPs).....	10
II.2.1.1 Propriétés structurales des MMPs.....	11
II.2.1.2 Classification des MMPs .....	12
II.2.1.3 Domaines structuraux des MMPs.....	14
II.2.1.4 Fonctions des MMPs.....	16
II.2.1.5 Régulation des MMPs.....	17
1. <i>Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des MMPs</i> .....	17
2. <i>Régulation de la sécrétion des MMPs</i> .....	17
3. <i>Processus de maturation des MMPs</i> .....	17
4. <i>Processus d'inhibition des MMPs</i> .....	18
4.1 Les inhibiteurs exogènes (TIMPs) .....	18
4.1.1 Structure des TIMPs.....	18
4.1.2 Fonctions des TIMPs.....	19
4.2 Les inhibiteurs endogènes.....	19
<b>Matériel et Méthodes</b>	
I. Modèles animaux et biotope .....	20
I.1 <i>Psammomys obesus</i> .....	20

I.1.1	Descriptif de l'animal.....	20
I.1.2	Systématique.....	21
I.1.3	Répartition géographique .....	21
I.1.4	Régime alimentaire .....	21
I.1.5	Rythme d'activité.....	21
I.1.6	Biotope.....	22
I.1.7	Reproduction.....	22
I.2	<i>Meriones libycus</i> .....	22
I.2.1	Descriptif de l'animal.....	22
I.2.2	Systématique.....	23
I.2.3	Répartition géographique .....	23
I.2.4	Biologie de l'animal.....	23
I.3	<i>Meriones shawi</i> .....	23
I.3.1	Descriptif de l'animal .....	23
I.3.2	Systématique.....	24
I.3.3	Répartition géographique .....	24
I.3.4	Biologie de l'animal.....	24
II.	Méthodes .....	25
II.1	Prélèvement des organes et conservation.....	25
II.2	Extraction des protéines.....	25
II.3	Dosage des protéines .....	25
II.4	Analyse des protéines solubles de l'homogénat par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	25
II.4.1	<i>Préparation des gels</i> .....	26
II.4.2	<i>Traitement des échantillons</i> .....	27
II.4.3	<i>Migration des protéines</i> .....	28
II.4.4	<i>Coloration et décoloration</i> .....	28
II.5	Séparation et caractérisation des protéinases par la technique de zymographie... ..	29
II.5.1	<i>Principe de la technique</i> .....	29
II.5.2	<i>Substrats utilisés en zymographie</i> .....	29
II.5.3	<i>Zymographie en gel de gélatine</i> .....	30

1. Préparation des gels.....	30
2. Traitement des échantillons .....	31
3. Dépôt des échantillons.....	31
4. Migration électrophorétique .....	31
5. Renaturation des protéines .....	31
6. Incubation du gel.....	32
7. Coloration et décoloration.....	32

## Résultats

I. Analyse des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épididymes de trois rongeurs de la famille des Gerbillidae ( <i>Psammomys obesus</i> , <i>Meriones libycus</i> et <i>Meriones shawi</i> ) en période de reproduction et en période de repos sexuel.....	33
I.1 Analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de <i>Psammomys obesus</i> , <i>Meriones libycus</i> et de <i>Meriones shawi</i> en période de reproduction et en période de repos sexuel.....	33
- <i>Psammomys obesus</i> en période de reproduction.....	33
- <i>Psammomys obesus</i> en période de repos sexuel.....	33
- <i>Rattus norvegicus</i> et <i>Mus musculus</i> .....	34
- <i>Meriones libycus</i> en période de reproduction.....	36
- <i>Meriones libycus</i> en période de repos sexuel.....	36
- <i>Meriones shawi</i> en période de reproduction.....	36
I.2 Analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des épididymes de <i>Psammomys obesus</i> , <i>Meriones libycus</i> et de <i>Merione shawi</i> en période de reproduction et en période de repos sexuel.....	41
- Epididymes totaux de <i>Psammomys obesus</i> en période de reproduction.....	41
- Epididymes totaux de <i>Psammomys obesus</i> en période de repos sexuel.....	41
- Epididymes proximaux et distaux de <i>Meriones libycus</i> en période de reproduction.....	42
- Epididymes proximaux et distaux de <i>Meriones libycus</i> en période de repos sexuel.....	42
II. Recherche des métalloprotéinases au niveau des vésicules séminales et des épididymes de <i>Psammomys obesus</i> , de <i>Meriones libycus</i> et de <i>Meriones shawi</i> en période de reproduction et en période de repos sexuel.....	44

II.1 Analyse des zymogrammes en gel de gélatine des protéines solubles des vésicules séminales et des épидидymes du rat des sables <i>Psammomys obesus</i> en période de reproduction et en période de repos sexuel .....	44
- Vésicules séminales de <i>Psammomys obesus</i> en période de reproduction.....	44
- Vésicules séminales de <i>Psammomys obesus</i> en période de repos sexuel.....	45
- Epididymes totaux de <i>Psammomys obesus</i> en période de reproduction.....	45
- Epididymes totaux de <i>Psammomys obesus</i> en période de repos sexuel.....	45
II.2 Recherche des métalloprotéinases au niveau des vésicules séminales et des épидидymes chez deux espèces appartenant au genre <i>Meriones</i> en période de reproduction et en période de repos sexuel.....	47
<i>II.2.1 Analyse du zymogramme des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de Meriones libycus en période de repos sexuel.....</i>	47
- Vésicules séminales de <i>Meriones libycus</i> en période de repos sexuel.....	47
- Epididymes proximaux de <i>Meriones libycus</i> en période de repos sexuel.....	48
- Epididymes distaux de <i>Meriones libycus</i> en période de repos sexuel.....	48
<i>II.2.2 Analyse du zymogramme des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de Meriones shawi en période de reproduction.....</i>	48
- Vésicules séminales de <i>Meriones shawi</i> en période de reproduction.....	48
- Epididymes proximaux de <i>Meriones shawi</i> en période de reproduction.....	49
- Epididyme distal de <i>Meriones shawi</i> en période de reproduction.....	49
<b>Discussion.....</b>	<b>53</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>60</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>61</b>

## Annexes

# *INTRODUCTION*

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la continuité des travaux de recherche réalisés au sein de l'équipe 3 du laboratoire de recherche sur les zones arides (LRZA) sur les protéines spécifiques du tractus génital mâle de trois rongeurs déserticoles et semi-déserticoles : *Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi*, caractérisés par une reproduction saisonnière.

Chez le rat des sables *Psammomys obesus* l'analyse du protéome du tractus génital mâle a permis de distinguer au niveau de chaque organe étudié, la présence de plusieurs catégories de protéines dont l'expression est régulée différemment. En effet, on distingue :

- des protéines ne présentant aucune sensibilité aux variations saisonnières, ni aux androgènes,
- des protéines sensibles aux variations saisonnières et dont l'expression est régulée positivement par les androgènes,
- des protéines sensibles aux variations saisonnières et dont l'expression est réprimée par les androgènes (Gernigon *et al.*, 1994).

Dans le deuxième groupe de protéines, une protéine androgéno-dépendante majeure exprimée pendant la période de reproduction a été caractérisée et identifiée au niveau des vésicules séminales de *Psammomys obesus*, *Meriones libycus*, *Meriones crassus* et *Meriones shawi*. (Kaci *et al.*, 2008; 2010; 2013).

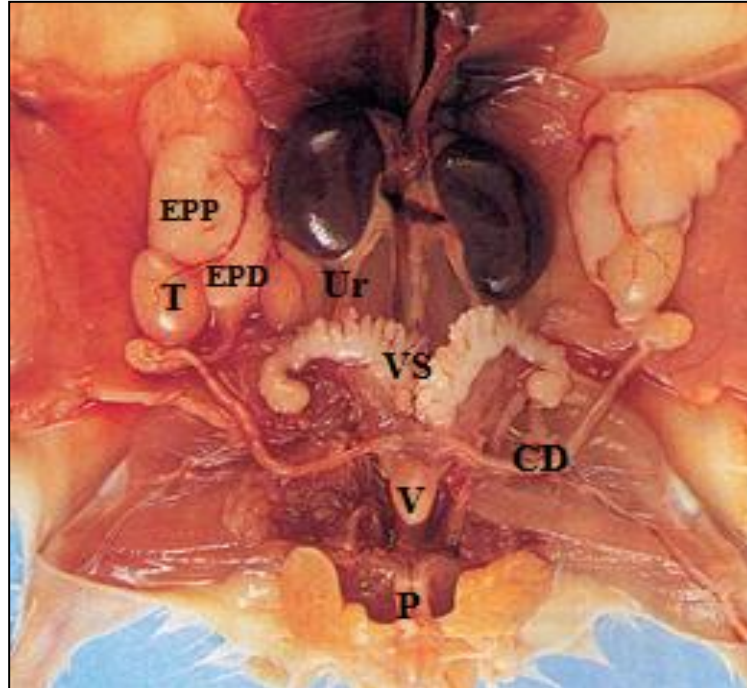
Nous envisageons dans ce travail de :

- d'analyser dans une première étape les protéines exprimées au niveau des vésicules séminales et des épидидymes des rongeurs déserticoles à différentes période du cycle saisonnier de la reproduction,
- de comparer ces protéines à celles exprimées au niveau des vésicules séminales de deux rongeurs à reproduction saisonnière continue (*Rattus norvegicus* et *Mus musculus*),
- de rechercher la présence de protéines à activité enzymatique (gélatinases A et B) au niveau des vésicules séminales et des épидидymes des trois rongeurs de la famille des Gerbillidae : *Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi*,
- et enfin de rechercher l'existence d'une éventuelle corrélation entre l'expression et/ou l'activité enzymatique de ces protéines et l'expression d'autres protéines androgéno-dépendantes telle que la transgeline.

*RAPPELS*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

## I. Anatomie de l'appareil génital mâle

L'appareil reproducteur mâle se compose de deux testicules, des voies excrétrices, des glandes annexes et du pénis, il est responsable de la production, la nutrition et le stockage temporaire des gamètes mâles, ainsi que la production d'hormones sexuelles ou androgènes.



**Figure 1.** Appareil reproducteur mâle de *Psammomys obesus* en période d'activité sexuelle.

**VS :** vésicule séminale ; **EPP :** épидидyme proximal ; **EPD :** épидидyme distal ; **CD :** canal déférent ; **V :** vessie ; **P :** pénis ; **T :** testicule ; **Ur :** urètre

### I.1 Les testicules

Ce sont des organes de forme ovoïde entourés par une enveloppe épaisse parcourue par des vaisseaux sanguins. Ils sont situés à l'extérieur de la cavité abdominale, contenus dans des bourses (ou scrotum) et séparés par un septum. Cette position extra abdominale leur permet d'être maintenus à une température légèrement inférieure à celle du corps, condition indispensable à la formation de spermatozoïdes viables (Weber *et al.*, 1983).

Entre les tubes séminifères, il existe un tissu conjonctif lâche (interstitium) très vascularisé au sein duquel se trouvent des îlots de cellules endocrines (cellules de Leydig), dont la fonction principale est l'élaboration des androgènes testiculaires (la testostérone ses dérivés synthétisés via la voie D4 et D5 androgènes) ainsi que le maintien de l'intégrité de la lignée germinale. Son activité est sous le contrôle de la LH (Caraty, 1988; Coffrey, 1992; Dohn *et al.*, 2003).

Les cellules de Leydig apparaissent à la 8<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire et commencent à sécréter les androgènes nécessaires aux développements des organes génitaux externes (Dong *et al.*, 2003).

La structure histologique des tubes séminifères montre que chaque tube séminifère est entouré d'un épithélium stratifié constitué par les cellules de la lignée germinale et par des cellules somatiques de Sertoli.

La cellule de Sertoli apporte un soutien mécanique et nutritif aux cellules germinales sous la dépendance de la FSH (Feig *et la.*, 1980; Schulze *et al.*, 1984 ; Tostain *et al .*, 2004), et intervient dans la libération des spermatozoïdes dans la lumière.

Les testicules assurent :

- une fonction exocrine représentée par la formation, la nutrition et la protection des cellules germinales contre les réactions immunitaires.
- une fonction endocrine (stéroïdogénèse) représentée par la synthèse et la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone; et la sécrétion d'un liquide riche en protéines (telle que l'ABP et l'inhibine par les cellules de Sertoli), en lactate et en pyruvate permettant le transport des spermatozoïdes (Dunn *et al.*, 1981).

La sécrétion de la testostérone par les cellules interstitielles est régulée par la LH; la spermatogénèse est sous le contrôle de la FSH qui est elle-même sensible à l'action de la testostérone produite localement par les cellules de Leydig (Sherins *et al.*, 1973; Tostain *et al.*, 2004; Hauschild *et al.*, 2008).

## **I.2 Les voies excrétrices**

### **I. 2.1 Les épидидymes**

Ce sont des organes qui coiffent le bord supérieur de chaque testicule. Il comporte un conduit fin, long et pelotonné sur lui même qui reçoit toutes les sécrétions testiculaires (spermatozoïdes et hormones).

L'épididyme est composé de 3 parties : une tête constituant la partie la plus volumineuse représente l'épididyme proximal; un corps plus fin représente l'épididyme intermédiaire et une queue reliée au canal déférent et représente l'épididyme distal.

Les épидидymes assurent :

- Le transit des spermatozoïdes;
- La maturation des spermatozoïdes;
- La décapacitation des spermatozoïdes et acquisition de leur pouvoir fertilisant;
- Le stockage des spermatozoïdes mures au niveau de la partie finale de l'épididyme distal avant l'éjaculation;
- Une fonction de réabsorption des ions, des protéines et de l'eau, ce qui permet une concentration maximale des spermatozoïdes
- La synthèse et la sécrétion de nombreux composés tels que GPC, NO, bicarbonate..., et des protéines telles que TGFβ-1 secrétées dans la lumière tubulaire.
- Ils permettent également aux spermatozoïdes l'acquisition de leur mobilité et de façon progressive.

(Dacheux *et al.*, 1981; Dacheux et Paquignon, 1987 ; Wong *et al.*, 1988; Bomgardner *et al.*, 1999; Carlin *et al.*, 2003).

Les fonctions de l'épididyme sont régulées et soumises à un :

- *Contrôle hormonal* sous l'influence de la testostérone produite par les cellules de Leydig et les ABP produites par les cellules de Sertoli (Tostain *et al.*, 2004).
- *Contrôle neurologique* responsables du péristaltisme spontané dans l'épididyme et qui facilite le transport des spermatozoïdes (Dacheux et Paquignon, 1981).

### **I.3 Les glandes annexes**

#### **I.3.1 La prostate**

C'est un organe musculo-glandulaire, situé en avant du rectum qui entoure le col de la vessie et la partie initiale de l'urètre, elle comprend trois zones principales: la zone centrale, la zone de transition et la zone périphérique (Viennois, 2011).

La prostate est constituée d'un stroma fibromusculaire et d'un épithélium glandulaire composé de trois types cellulaires :

- des cellules sécrétrices qui bordent la lumière et constituent une assise de cellules prismatiques.
- des cellules basales situées entre les cellules sécrétrices et la lame basale.

- des cellules neuroendocrines très peu nombreuses et présentes dans tous les compartiments glandulaires de la prostate (McNeal, 1988).

Le stroma est principalement constitué de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, de cellules endothéliales et de cellules dendritiques. La prostate est séparée des structures adjacentes par une bande de collagène appelée capsule prostatique (Bok, 2002).

Le développement et le fonctionnement de la prostate sont dépendants de la testostérone, elle assure principalement :

- la sécrétion et le stockage du liquide séminal (les sécrétions sont androgène-dépendantes et de nature variée tels que enzymes protéolytiques et les phosphatases acides).
- le maintien de la continence urinaire et de l'émission du sperme lors de l'éjaculation.
- des sécrétions glandulaires constituant le reste du volume spermique (acide citrique, spermine spermidine, ions  $Zn^{++}$  et  $Mg^{++}$ ) (Yeh *et al.*, 1996; Dayon, 2008).

### **I.3.2 Les vésicules séminales**

Ce sont des organes paires, symétriques de structure glandulaire; elles sont situées en arrière du col de la vessie au dessus de la prostate, et débouchent dans la prostate pour se relier aux canaux déférents qui deviennent à ce niveau le canal éjaculateur.

#### ***1.3.2.1 Structure histologique des vésicules séminales***

C'est une structure longue repliée sur elle-même et constituée de capsule conjonctive lâche avec quelques fibres musculaires lisses et d'un long tube très contourné avec de nombreux diverticules délimités par une paroi formant des villosités (Clavert, 2005; Risbridger *et al.*, 2006).

La structure histologique de la vésicule séminale montre la présence d'un épithélium prismatique pseudostratifié à cellules hautes constituant les cellules principales et des cellules basales, d'un chorion conjonctif riche en fibres élastiques et d'une couche mince de cellules musculaires lisses (Brandes, 1974; Aumüller, 1979).

Les vésicules séminales sont androgène-dépendantes, dont les sécrétions glandulaires et l'aspect histologique sont influencés par les fluctuations du taux des androgènes (Meand *et al.*, 2013).

Des études antérieures ont montrées la présence de récepteurs spécifiques aux androgènes au niveau des cellules principales et musculaires (Goyal *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2000; Parlevliet *et al.*, 2006; Pearl *et al.*, 2007).

En effet, la diminution du taux de la testostérone induit une involution importante de la glande et un arrêt de l'activité de synthèse et l'élimination des cellules épithéliales par apoptose (Fan et Robaire, 1998).

Les modifications histologiques se traduisent par une réduction du volume de la glande de 10% où le stroma occupe la plus grande partie.

#### ***1.3.2.2 Fonction des vésicules séminales***

La fonction principale de la vésicule séminale est l'élaboration d'un produit de sécrétion à pH basique qui représente les 2/3 du volume spermatique (Lundquist, 1949).

Ce produit excrété contient beaucoup de fructose nécessaire à la nutrition et la mobilité des spermatozoïdes, des électrolytes, des protéines (telle que la séménogéline), des prostaglandines et de l'acide ascorbique.

Les sécrétions des vésicules séminales contiennent différentes protéines et protéases qui servent à la liquéfaction de l'éjaculat (Schiessler *et al.*, 1976), des amines biogènes ayant une fonction anti-infectieuse (spermine et spermidine ainsi que des inhibiteurs de protéases), de l'acide citrique, du cholestérol et des phospholipides (Mardh et Colleen, 1975; Fair et Wehner, 1971).

#### **I.3.3 Le plasma séminal**

Le liquide séminal est le fluide composant le sperme chargé notamment de nourrir et de véhiculer les spermatozoïdes jusqu'au vagin, constitué essentiellement des sécrétions des vésicules séminales (60% à 75%), le reste provient de la prostate (20 %). Il est caractérisé par :

- un pH légèrement alcalin (situé entre 7.3 et 7.5);
- la présence de divers composants : vitamines (C et B12), testostérone, des oses (fructose et sorbitol) ainsi que des minéraux ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ), de prostaglandines, de glutathion ainsi que de la  $\beta$ -endorphine.
- sa richesse en protéines représentées par les facteurs de:
  - décapacitation, qui se fixent sur les spermatozoïdes au moment de l'éjaculation,
  - coagulation du sperme jouant un rôle de protection des spermatozoïdes dans le vagin,
  - immunosuppression: molécules ayant un rôle antigénique.

(Herr *et al.*, 1987; Lilja *et al.*, 1989; Laurell *et al.*, 1992; Firman et Simmons, 2008).

### **I.3.4 Les protéines androgène-dépendantes du plasma séminal**

Les protéines majoritaires du liquide séminal chez *Rattus norvegicus* sont représentées par des protéines structurales androgène-dépendantes et désignées par SVS I jusqu'à SVS VI de PM respectif de 100kDa, 50kDa, 37kDa, 18kDa, 17kDa et de 16kDa (Higgins *et al.*, 1976; Aumüller et Seitz, 1986), la SVS II représente un composant majeur du bouchon vaginal (Fawell *et al.*, 1986); la MSVSP99 de PM apparent de 14kDa; la séménogéline protéine de 52kDa est responsable de la coagulation du plasma séminal chez l'homme et comme chez la souris; la fibronectine incorporée dans le coagulum après sa liquéfaction.

Ainsi que des protéines de transport plasmatiques analogues telle que la transferrine (Tauber *et al.*, 1975), et des inhibiteurs de protéases telle que les inhibiteurs de la trypsine (Min-Long *et al.*, 1991).

Les protéines minoritaires représentées essentiellement par la caltrine-like trypsine inhibitor/P12, la SVA de 19kDa agissant comme facteur de décapacitation et la glycoprotéine CEACAM de 36kDa qui représente une molécule d'adhésivité cellulaire (Chen *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1999).

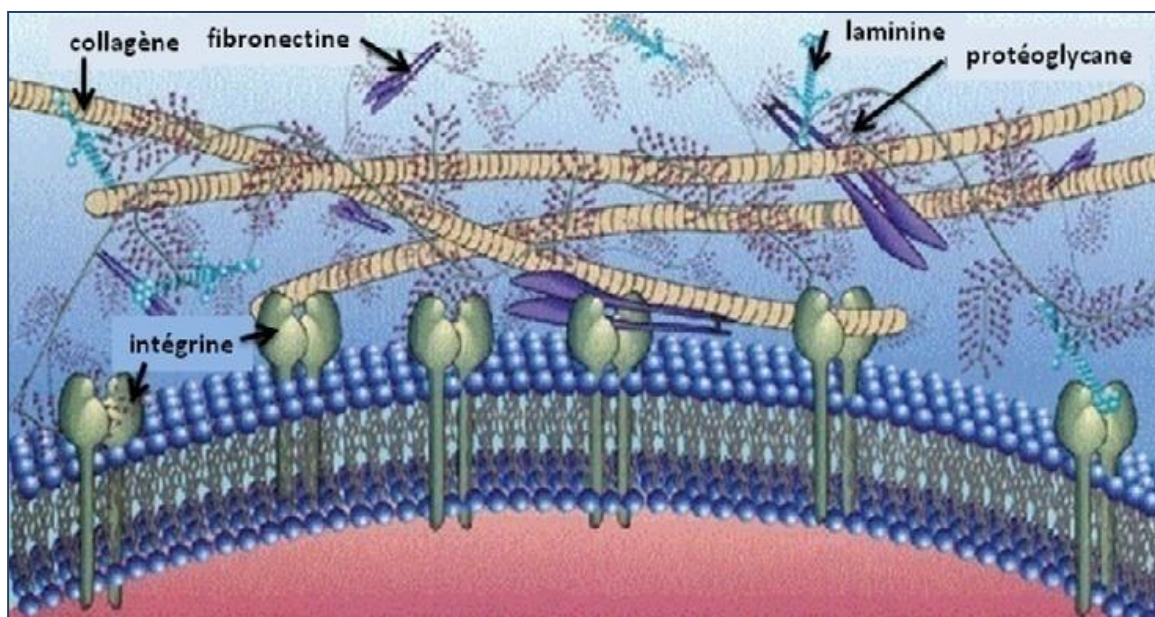
Chez les rongeurs à reproduction saisonnière de la famille des Gerbillidae *Psammomys obesus* et *Meriones libycus*, les cellules épithéliales des vésicules séminales secrètent une variété de protéines dont l'expression est androgène-dépendante.

Les protéines de PM apparent de 45kDa, 43kDa, 38kDa et de 35kDa semblent être réprimées par les androgènes et ne sont exprimées qu'en période de repos sexuel. D'autres protéines sont stimulées par les androgènes et caractérisent la période d'activité sexuelle de ces espèces ont un PM apparent de 34kDa, 12kDa et de 18kDa (Gernigon, 1992; Gernigon *et al.*, 1994; Mataoui, 1999; Izmrne, 2011).

## II. La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire est un réseau complexe de macromolécules qui entoure partiellement ou totalement les cellules de l'organisme, elle représente le principal site de remodelage des tissus assurent la migration, la différenciation, l'organisation et la réorganisation des tissus.

Elle est constituée de polymères fibreux représentés par les fibres de collagènes, les fibres élastiques, et des molécules non fibreuses telles que les glycoprotéines, les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes (Birkedal, 1993; Schusterbauer, 2008).



**Figure 2.** Composition biochimique de la matrice extracellulaire (Hensen, 2005)

## **II.1 Protéines structurales de la matrice extracellulaire**

### **II.1.1 Les protéines fibreuses**

Elles sont représentées essentiellement par les fibres de collagènes et les fibres élastiques. L'unité de base du collagène est la triple hélice de tropocollagène (Brown *et al.*, 1995), il existe 21 classes différentes de collagènes décrites chez l'homme.

L'élastine est sécrétée dans l'espace extracellulaire par les fibroblastes, elle est caractérisée par une forte teneur en acides aminés apolaires responsables de ses propriétés d'élasticité.

### **II.1.2 Les glycoprotéines**

Parmi les glycoprotéines les plus importantes, la fibronectine qui joue un rôle important dans l'adhérence des cellules aux composants de la lame basale, cette protéine est abondante dans le sang et dans la plupart des tissus.

Les laminines, abondantes dans la lame basale, ce sont des hétérotrimères qui peuvent moduler certaines fonctions cellulaires comme la différenciation des cellules épithéliales ou l'ancrage des cellules basales épidermales.

### **II.1.3 Les protéoglycanes**

Composées de longues chaînes de polysaccharides linéaires et sulfatées qui se fixent généralement de manière covalente à une protéine pour former les protéoglycanes.

## **II.2 Protéines enzymatiques ou endopeptidases de la matrice extracellulaire**

La MEC est une structure extrêmement dynamique qui est en perpétuel renouvellement, alternant la synthèse et la dégradation de ses composants.

Le remodelage de la MEC est assuré par un grand nombre d'enzymes protéolytiques, incluant les protéases à aspartate, les protéases à cystéine, les sérines protéases et les métalloprotéinases matricielles ou MMPs (Birkedal, 1995).

- *Les serines protéinases* jouent un rôle fondamental dans l'activation du plasminogène en plasmine (enzyme activatrice des collagénases) et ont la capacité de dégradation des protéoglycanes.
- *Les cystéines protéinases* (de la famille des cathepsines) permettent le clivage des collagènes et la fragmentation des protéoglycanes.
- *Les protéinases à aspartate* (ou *cathepsine D*) assurent la dégradation des protéoglycanes, du collagène type II et de la zone d'ancrage de l'acide hyaluronique (Guenec, 2007).
- *Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)* ont été décrites pour la première fois en 1962 quand Gross et Lapier ont identifié une enzyme isolée de la queue de têtard, capable de dégrader le collagène (Gross *et al.*, 1962).

### **II.2.1 Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)**

Les MMPs sont considérées comme étant les enzymes majeures responsables de la dégradation (Nagas *et al.*, 1999) et du renouvellement (Nelson *et al.*, 2000; Visse, 2003) des composants de la MEC, aussi bien dans les conditions physiologiques que dans les conditions physiopathologiques, d'où l'appellation de matriximes (Huxley *et al.*, 2007).

Elles doivent leur nom à la nécessité de la présence d'un ion métallique pour leur activité enzymatique et à leur capacité à dégrader les composants de la matrice extracellulaire à pH physiologique (protéases neutres) (Marbaix *et al.*, 1996).

Ce n'est qu'en 1970 que la collagénase fut obtenue sous forme pure à partir de peau humaine et de l'utérus du rat blanc (Jeffrey *et al.*, 1970).

Les MMPs sont sécrétées par différents types de cellules stromales qui sont à l'origine de la majeure partie de cette sécrétion et plus particulièrement les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales, sous forme inactive latente (pro-MMPs) (Nabeshima *et al.*, 1991; Almholt *et al.*, 2003).

Les pro-MMPs sont activées à l'extérieur de la cellule par clivage en présence d'autres protéases (y compris d'autres classes de MMPs) permettant l'ouverture de leur site actif (Salamonsen., 1997; Nagase *et al.*, 1999; Gibson *et al.*, 2009).

Les MMPs ont une action extracellulaire, certaines sont solubles dans le milieu extracellulaire et d'autres sont ancrées à la membrane plasmique de certaines cellules. Des études récentes affirment que certaines MMPs sont intracellulaires et peuvent avoir une action dans la cellule (Nagase *et al.*, 1999; Graesslin, 2008 ).

Il existe chez l'homme plus de vingt membres distincts de la famille des métalloprotéinases, codés par des gènes différents. Les MMPs répondent aux critères suivants :

- une homologie structurale (40 à 80% d'homologie en acides aminés) indiquant qu'elles dérivent d'un gène ancestral commun;
- une activité dépendante du zinc et de la biodisponibilité des ions calcium;
- une synthèse et une sécrétion sous forme de inactif (Pro-MMP) (Marbaix *et al.*, 1992);
- une capacité à dégrader les composants de la matrice extracellulaire à pH physiologique;
- une régulation à de multiples niveaux, transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Overall *et al.*, 1991 ; Delany *et al.*, 199);
- une interaction avec des inhibiteurs endogènes (TIMPs) et exogènes ( $\alpha$ -macroglobuline) (Graesslin, 2008; Goffin *et al.*, 2003).

### II.2.1.1 Propriétés des MMPs

Les métalloprotéinases matricielles regroupent l'ensemble des enzymes qui possèdent une structure et des motifs fonctionnels semblables, démontrant un mécanisme de protéolyse identique (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993), et dont l'activité catalytique nécessite un atome de zinc (ce sont des zincines).

Chez l'homme, 186 gènes codant pour des protéases à zinc ont été identifiés. Parmi ces gènes, la moitié possède un motif consensus **HEXXH**, les deux Histidines de la séquence représentent les deux premiers ligands de l'atome  $Zn^{++}$ , alors que le glutamate polarise la molécule d'eau impliquée dans l'hydrolyse de la liaison peptidique lors de l'activation des MMPs.

### II.2.1.2 Classification des MMPs

Les MMPs sont classées en six familles distinctes, chez l'homme, d'après leurs spécificités structurales et leurs substrats de base (Woessner, 2000; Sternlicht et Werb, 2001; David, 2007 ; Sabbah, 2007 ; Gibson *et al.*, 2009) :

➤ *Les collagénases* sont les principales protéases ayant la capacité de cliver la triple hélice des collagènes natifs I, II et III sur des sites spécifiques, et dont les fragments générés se dénaturent spontanément à la température de 37°C en gélatine qui pourra être dégradée par les gélatinases. Cette classe-comprend:

- La MMP-1 (collagénase-1) de PM de 52 kDa, synthétisée sous forme de pro-enzyme de 60kDa et de 52kDa.
- La MMP-8 (collagénase-2) de PM de 73 kDa est synthétisée par les leucocytes, les fibroblastes, les kératinocytes, et les cellules endothéliales en culture.
- La MMP- 13 (collagénase-3) de PM de 48 kDa possède 50% d'homologie avec la MMP-1.

(Verma *et al.*, 2007).

➤ *Les gélatinases* de type A et B assurent le clivage des fibres de collagène dénaturé et du collagène IV :

- La MMP-2 ou gélatinase A de PM de 72 kDa est exprimée par différentes cellules, notamment les fibroblastes dermiques, les kératinocytes, les ostéoblastes, les chondrocytes et de nombreuses cellules tumorales.
- La MMP-9 ou gélatinase B (ou collagénase IV) de PM de 92kDa. Elle est exprimée par les cellules stromales, endothéliales et épithéliales, et est considérée comme marqueur potentiel associé à plusieurs pathologies et à la progression tumorale (Wysocki *et al.*, 1993; Omachi *et al.*, 2011).

Elle est synthétisée sous forme de monomère qui se dimerisent en cas de lésions sévères lorsque les phénomènes d'inhibition se trouvent dépassés en raison d'une forte sécrétion de MMP- 9.

La MMP-9 active les facteurs de croissance et les inhibiteurs de l'angiogenèse tels que l'angiostatine. Elle est activée par différents facteurs tels que le TNF, les androgènes et les interleukines. Elle est inhibée principalement par le TIMP-1 (Rothhut *et al.*, 2007; Giribaldi *et al.*, 2011).

- *Les stromélysines* qui dégradent puissamment les protéoglycanes et divers éléments de la MEC (laminine, fibronectine, gélatine, collagène IV), cette classe comprend:
  - La MMP-3 (stromélysine-1) de PM de 52kDa, caractérisée par sa capacité à activer certaines métalloprotéases comme la collagénase interstitielle, les gélatinases et la matrilysine.
  - La MMP-10 (stromélysine-2) de PM de 47 kDa est synthétisée par les fibroblastes et les kératinocytes, elle est capable de dégrader de nombreux substrats.

Les MMP-3 et MMP-10 ont une structure très proche et agissent sur les mêmes substrats (Hulboy *et al.*, 1997).

- La MMP-11 (stromélysine-3) de PM de 60 kDa a été mise en évidence dans les fibroblastes situés à proximité de carcinome du poumon.

➤ *Les matrilysines*

- La MMP- 7 (matrilysine-1) de PM de 23kDa, agit sur les mêmes substrats que la MMP-3.
- La MMP-26 (matrilysine-2) de PM de 30kDa exprimée essentiellement dans l'utérus (Galant *et al.*, 2004; Pirilä *et al.*, 2007).

➤ *Les métalloprotéinases membranaires (MT-MMPs)* sont intégrées aux membranes plasmiques des cellules grâce à un domaine transmembranaire hydrophobe présent dans la partie carboxy-terminale ou ancrées par un groupement GPI (Galant *et al.*, 2004). Dans cette classe on distingue :

- La MMP-14 de PM de 66 kDa est exprimée essentiellement par les cellules cancéreuses invasives de certains carcinomes, et les fibroblastes des tissus conjonctifs du colon et du sein.
- La MMP-15 de PM de 68 kDa est exprimée dans le cerveau, les poumons, le placenta, le cœur et les hépatocytes tumorales.

- La MMP-16 de PM de 69 kDa est exprimée au niveau des testicules, du placenta, du colon, de l'intestin, du cœur et des muscles squelettiques.
- La MMP-17 de PM de 68kDa est exprimée dans le cœur, les ovaires, le colon, les testicules, et dans le cas de cancers du sein.
- La MMP-24 de PM de 39kDa est très peu connue, elle est exprimée au niveau du pancréas, des poumons et dans les tumeurs du cerveau.
- La MMP-25 de PM de 62kDa est la plus récemment identifiée dans les leucocytes. Elle est exprimée dans le poumon, le foie et le colon, ses substrats et ses fonctions ne sont pas connus.

(Galant *et al.*, 2004).

➤ *Un groupe hétérogène de MMPs* : plus récemment découvert, dans ce groupe on distingue:

- La MMP-12 de PM de 54kDa est sécrétée par les macrophages et les cellules stromales; elle est fortement exprimée dans les cas pathologiques tels que les ulcères intestinaux (Fu *et al.*, 2000).
- La MMP- 19 de PM de 57kDa, capable de dégrader la gélatine, elle est exprimée dans de nombreux tissus tels que la peau.
- La MMP-20 de PM de 54kDa, impliquée dans la formation de l'émail dentaire.
- La MMP-23 de PM de 53kDa ayant une forte expression de l'ARNm dans les ovaires, les testicules et la prostate, elle est impliquée dans la reproduction.
- La MMP-27 de PM et de fonctions inconnues.
- La MMP-28 de PM 59kDa, et dégrade la caséine (Galant *et al.*, 2004).

### II.2.1.3 Les différents domaines structuraux des MMPs

Les MMPs sont caractérisées par la présence :

- *d'un peptide signal (pré-prodomine)* équivalent à une vingtaine d'acides aminés, situé à l'extrémité amino-terminale.
- *d'un pro-domaine* composé d'environ 80 acides aminés, caractérisé par la présence d'une séquence **PRCG(V/N)PD** conservée dans la plupart des MMPs.

Cette séquence contient un résidu cystéine « Cystéine switch » décrit en 1990 par Van Wart et Birkedal Hansen, dont le radical (SH) maintient les pro-MMPs sous la forme inactive.

(Van Wart *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992; Nagase *et al.*, 1999).

Une fois sécrétée sous la forme de pré-MMP le polypeptide doit être activé. Il perd son peptide signal et devient une pro-MMP. La pro-MMP peut ensuite être clivée *in vivo* par des protéases (Murphy *et al.*, 1999).

Le clivage protéolytique du pro-domaine libère l'atome de zinc du résidu cystéine et entraîne l'activation du site catalytique qui fixe le substrat. Ce clivage est la conséquence de l'action des protéases à sérine (plasmine, trypsine) et des métalloprotéases.

- *d'un domaine catalytique* composé d'environ 160 à 170 acides aminés et caractérisé par un site de liaison de l'atome de zinc catalytique **HEXGHXXGXXH** (les 50-54 acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale étant responsables de cette fixation).

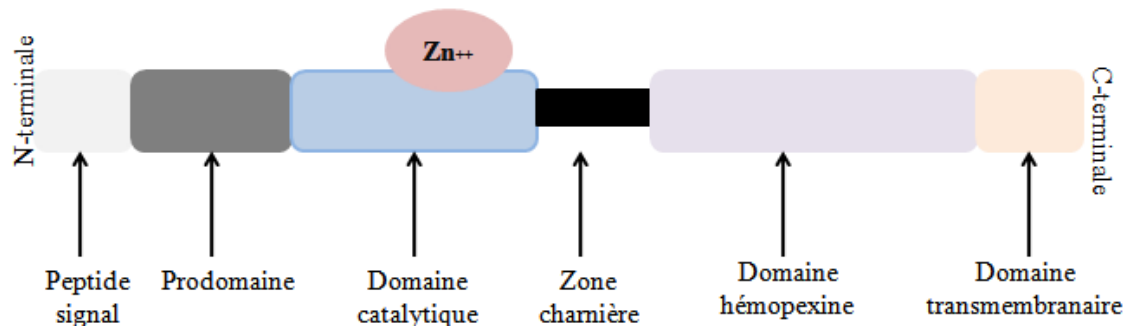
Il existe dans le domaine catalytique des MMP-9 et MMP-2 une insertion longue de 175 résidus qui possède 3 motifs répétitifs proches en structure du domaine de type II de la fibronectine. Cette structure particulière leur confère la capacité de dégrader la gélatine.

(Nagase *et al.*, 1999).

- *d'une séquence charnière* permettant de relier le domaine catalytique des MMPs à leur domaine carboxy-terminal, excepté dans le cas des matrilysine-1 et -2 dont les structures primaires ne sont constituées que de pro-domaine et de domaine catalytique.
- *d'un domaine carboxy-terminal de type hémopexine ou vintronectine like* composé de 210 acides aminés en forme de disque ellipsoïdal caractéristique de la plupart des MMPs (Gomis *et al.*, 1996).

Ce domaine intervient dans la reconnaissance du substrat (Birkedal *et al.*, 1993); il est nécessaire aux collagénases et pour l'activation des MMP-2 et MMP-14 à la surface cellulaire.

- *d'un domaine hydrophobe d'ancrage* additionnel qui permet l'ancrage des MT-MMPs à la membrane plasmique (Bernard *et al.*, 2007).



**Figure 3.** Différents domaines caractéristiques des métalloprotéinases (Marbaix *et al.*, 1992)

#### II.2.1.4 Fonctions des MMPs

La balance entre MMPs et TIMPs au sein d'un tissu est un facteur essentiel quant à leur activité protéolytique.

Au niveau cellulaire, ces enzymes jouent un rôle dans la migration cellulaire, la prolifération, l'apoptose et la différenciation de nombreux types cellulaires, notamment les neurones, les chondrocytes, les ostéocytes et les adipocytes.

Les MMPs essentiellement les gélatinases stimulent l'angiogenèse sous l'influence de plusieurs hormones, elles inhibent la production de plusieurs facteurs tels que l'IGFBP-1 et l'IGF-1 (Manes *et al.*, 1997; Vergo-Gogola *et al.*, 2002), d'autres facteurs pro-antigéniques comme le VEGF, le b-FGF et le TGF- $\beta$  sont induits ou activés par ces enzymes, facilitant ainsi le remodelage vasculaire (Bergers *et al.*, 2000; Belotti *et al.*, 2003).

Le rôle des MMPs dans le développement des cancers et leur sécrétion au sein du tissu tumoral a été étudié dès le début des années 1980 après que Liotta, ait montré que l'invasion tumorale est issue d'une activité de protéolyse importante (Liotta *et al.*, 1980).

Les MMPs sont associées à diverses pathologies, ce sont des modulateurs importants de l'inflammation, l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde et la progression des cancers (Festuccia *et al.*, 2002).

### II.2.1.5 Régulation de la synthèse des MMPs

Pour éviter une protéolyse excessive et des dommages tissulaires, l'activité des MMPs est régulée par de multiples contrôles aussi bien au niveau de leur transcription qu'au niveau de leur traduction et leur sécrétion :

#### 1. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

L'expression des MMPs est faible dans les tissus, elle est induite lorsqu'un remodelage tissulaire est requis sous l'action de certains facteurs:

- les facteurs de croissances tels que le VEGF, et les cytokines comme l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  peuvent stimuler la synthèse des MMPs, d'autres composés tels que le TGF- $\beta$  réprime la transcription des MMPs (Parsons *et al.*, 1997; Toth *et al.*, 1997; Reitmeir *et al.*, 2012; Dasu *et al.*, 2004; Tyagi *et al.*, 1997; Graesslin, 2008; Zhou *et al.*, 2012).
- les hormones, représentées principalement par les androgènes, les corticoïdes, la FSH et la LH (Birkedal *et al.*, 1993; Ishikawa *et al.*, 2007).
- le contact cellule-cellule peut moduler l'expression des MMPs (Birkedal *et al.*, 1993).

Enfin, des régulations post-transcriptionnelles des MMPs sont possibles et correspondent, le plus souvent, à des processus de stabilisation ou de dégradation des transcrits (Jeffrey *et al.*, 1971; Osteen *et al.*, 2002).

#### 2. Régulation de la sécrétion

Les MMPs sont sécrétées par de nombreux types cellulaires, telles que les macrophages et les neutrophiles, qui ont la capacité de stocker les MMPs dans des granules intracytoplasmiques et régulent ainsi leur sécrétion par les actions de la plasmine ou de la thrombine sur le processus de libération des granules (Aparicio *et al.*, 1999).

#### 3. Processus de maturation des MMPs

Les MMPs sont sécrétées sous forme inactif, leur activation résulte de la dissociation du complexe Cys-Zn<sup>++</sup> et de la fixation d'une molécule d'eau sur l'atome de Zn<sup>++</sup>; elle est suivie d'une protéolyse libérant le prodomaine et rendant ainsi le site actif accessible.

Le clivage peut être le résultat de l'action des sérines protéases comme la plasmine et la trypsine (Okada, 1988; Schulz *et al.*, 1988).

Trois voies d'activation des MMPs sont décrites :

1/ En général, l'activation des MMPs se produit à l'extérieur de la cellule par action protéolytique de certaines protéases à serine ou par des MMPs qui induisent un clivage de la liaison Cys-Zn<sup>++</sup> de la séquence **PRCGVPDV** du domaine amino-terminal.

2/ De plus, il a été rapporté que d'autres protéases telles que les kallikréines, les cathepsines et les chymases induisent la maturation de certaines MMPs.

3/ Au niveau de la surface cellulaire, un mécanisme d'activation spécifique de la MMP-2, a été décrit, en présence de MT1-MMP et de la TIMP-2 (Stetler *et al.*, 1989).

#### **4. Processus d'inhibition des MMPs**

##### **4.1 Les inhibiteurs exogènes (TIMPs)**

###### *4.1.1. Structure des TIMPs*

Ce sont des glycoprotéines de 184 à 194 acides aminés, et caractérisées par deux domaines aux extrémités amino et carboxy-terminale respectivement de 125 et 65 acides aminés (Eccles *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 2002; Nagase *et al.*, 1999).

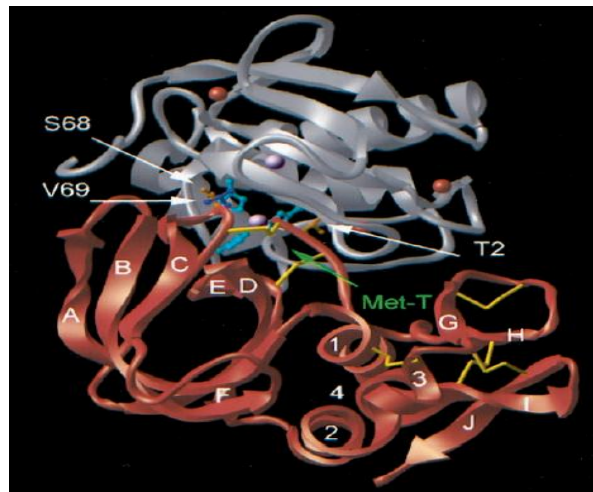
Quatre TIMPs différents ont été identifiés (TIMP-1, -2, -3 et -4) de petite taille (de PM respectif de 30, 20, 22, 22 kDa) (Ruokolainen., *et al* 2005; Yilmaz *et al.*, 2012), et possèdent 30 à 40% d'homologie structurale entre eux.

Les TIMPs sont des protéines solubles (TIMP-1 et la TIMP-2), ou insolubles (TIMP-3) et liées à la membrane plasmique des cellules endothéliales et stromale (Salamonsen et Zhang, 1997).

Ces enzymes sont exprimés par de nombreux types cellulaires, l'expression de TIMP-2 est constitutive, celle des TIMP-1, -3 et -4 est inductible (Matrbian., 1990; Itoh *et al.*, 2004).

Les TIMPs forment un complexe équimoléculaire 1 :1 avec les formes actives des MMPs où le domaine amino-terminal des TIMPs se lie au domaine catalytique des MMPs et, de ce fait, bloque l'accès à la poche contenant l'atome de zinc, cette inhibition est réversible (Gomez *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 2008).

L'expression et l'activation des TIMP-1 et TIMP-2 sont soumises à l'action de la FSH sur les cellules de Sertoli (Ulisse *et al.*, 1994).



**Figure 4.** Complexe TIMP-1 et domaine catalytique de la MMP-3 (Nagase, 1999).

#### 4.1.2. Fonctions des TIMPs

La régulation des MMPs par les TIMPs est un facteur majeur dans le contrôle de la dégradation de la MEC (Bellocq *et al.*, 1990; Galant *et al.*, 2000; Apostolidou *et al.*, 2012).

Les TIMPs sont des inhibiteurs spécifiques qui agissent sur la forme précurseur ou active de certaines MMPs (se fixent spécifiquement sur le site actif de la MMP). Le TIMP-1 inhibe la pro-MMP-9, les TIMP-2 et -4 inhibent la pro-MMP-2, le TIMP-3 inhibe les pro-MMP-9 et -2 (Baker *et al.*, 2002 Grasslin, 2008).

Les TIMPs peuvent stimuler l'activation des MMPs, c'est le cas de la TIMP-2 qui aurait un rôle dans l'activation de la MMP-2, le complexe MMP2/TIMP-2 faciliterait la fixation de la MMP-2 à la surface cellulaire (Yilmaz *et al.*, 2012).

#### 4.2 Les inhibiteurs endogènes des MMPs

L' $\alpha$ 2-macroglobuline, protéine de 722 kDa, abondante dans le plasma, elle est l'inhibiteur endogène non spécifique des MMPs dans les liquides physiologiques. D'autres protéines sont connus pour leur capacité à inhiber certaines MMPs, c'est le cas de la protéine RECK, une glycoprotéine qui inhibe les MMP-2, MMP-9 et MMP-14, et bloque l'angiogenèse (Folgueras *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012).

Matériel  
&  
Méthodes

## **I. Modèles animaux et biotope**

Nos modèles animaux sont trois rongeurs de la famille des Gerbillidae:

- *Psammomys obesus* et *Meriones libycus* espèces déserticoles de la région aride de Béni abbés (30° 07' N.2°10'W).
- *Meriones shawi* espèce semi-déserticole de la région semi aride de M'sila (35° 00' N.4° 00' E).

Deux rongeurs de la famille des Muridés provenant de l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Alger :

- *Rattus norvegicus*
- *Mus musculus*

### **I.1 *Psammomys obesus***

#### **I.1.1 Descriptif de l'animal**

Le rat des sables *Psammomys obesus* est une espèce diurne et nidicole caractérisée par une longueur (tête-corps) de 13 à 19 cm, un pelage fauve-roux, et une queue de 11 à 15 cm entièrement poilue se terminant par un court pinceau de poils. Les oreilles sont petites, arrondies (10 à 12 cm) de couleur jaune ou blanchâtre.

Le dessus du corps est brun-rougeâtre, rougeâtre, jaunâtre ou chamois; le dessous est jaunâtre ou blanchâtre. L'animal pèse à l'âge adulte entre 80 à 200 g et atteint une longévité de trois ans.

Ce rongeur se distingue des rats du genre *Mériones* par ses incisives lisses, sans sillon longitudinal à la face antérieure. Les soles palmaires sont nues et à moitié velues.

### I.1.2 Systématique

- Embranchement : Vertébrés
- Classe : Mammifères
- Super famille : Muroïdae
- Famille : Gerbillidae (Alston, 1846)
- Genre : *Psammomys*
- Espèce : *Psammomys obesus* (Cretzschmar, 1828)
- Nom usuel : Rat des sables.



### I.1.3 Répartition géographique

*Psammomys obesus* est un rongeur diurne décrit pour la première fois en 1826 par Cretzschmar.

C'est une espèce saharo-sindienne (Petter, 1974) qui fréquente les régions arides, semi-arides à sols salés, on le trouve au Maroc, en Tunisie, en Egypte, au Niger, au Tchad et en Algérie.

### I.1.4 Régime alimentaire

*Psammomys obesus* se nourrit exclusivement de plantes halophiles de la famille des Chénopodiacées : *Traganum nudatum*, *Salsola foetida* et *Suaeda mollis*, cette dernière est la plus consommée par le rat des sables (Daly, 1973).

Ces plantes sont très riches en eau 80% et en sels, en particulier le sodium.

Pour assurer l'apport calorique nécessaire, et équilibrer sa balance hydrique, l'animal doit ingérer des quantités importantes de ces plantes (Petter, 1951; 1961).

L'alimentation de *Psammomys obesus* et son adaptation à son biotope ont une influence importante sur certaines fonctions physiologiques et sur la diurèse.

### I.1.5 Rythme d'activité

Très actifs lorsque la température est voisine de 22°C, ils vivent à l'état sauvage dans des terriers individuels excepté pour les femelles avec leurs petits immatures.

### **I.1.6 Biotope**

Les terriers généralement établis sous un buisson, ont une profondeur de 60 cm à un mètre et communiquent à l'intérieur par des galeries. La température à l'intérieur des terriers varie entre 19°C et 22°C.

Le terrier est souvent très complexe, il comporte plusieurs étages de galeries circulaires avec un système complexe et des chambres spécialisées (réserves, nid, élevage)

### **I.1.7 Reproduction**

Les mâles et les femelles ne cohabitent qu'au moment de l'accouplement. La gestation dure 25 jours, il y a plusieurs portées par an, de 3 à 7 jeunes nidicoles qui pèsent 8 g à la naissance et n'ouvrent les yeux qu'à l'âge de 16 jours.

Le développement post-natal est rapide pendant les deux premières semaines. Sa maturité sexuelle est atteinte au bout de 36 jours.

Les périodes d'activité de l'animal varient en fonction de la saison. La reproduction du rat des sables se fait surtout entre la période d'octobre et mai, quand les conditions climatiques sont favorables (Choumowitch, 1954; Khammar, 1987; Gernigon, 1992).

## **I.2 *Meriones libycus***

### **I. 2 .1 Descriptif de l'animal**

*Meriones libycus* est un rongeur de la famille des Gerbillidae, la taille de l'animal à l'âge adulte est d'environ 13 à 17,5 cm; il est caractérisé par une queue unicolore aussi longue que le corps d'environ 14 à 15 cm qui se termine par un pinceau de poils terminal de couleur noire. Il est caractérisé également par des petites oreilles recouvertes de poils chamois, son dos est de couleur fauve et sa face inférieure est blanche. Son poids à l'âge adulte est d'environ 75 à 130 g.

### **I.2.2 Systématique**

- Embranchement : Vertébrés
- Classe : Mammifères
- Super famille : Muroïdae
- Famille : Gerbillidae (Alston, 1846)
- Genre : Meriones
- Espèce : *Meriones libycus* (Lichtenstein, 1823)
- Nom usuel : Méridon de Libye



### **I.2.3 Répartition géographique**

*Meriones libycus* présente une large répartition, il fréquente les zones arides et semi-arides, ainsi que les zones rocheuses et salées caractérisées par leur richesse en végétations (Belhocine, 1994).

### **I.2.4 Biologie de l'animal**

C'est un rongeur ayant une activité nocturne (Petter, 1961) et qui s'adapte à une alimentation très variée (graines, feuilles des plantes et des fruits).

Chez *Meriones libycus*, la phase d'activité sexuelle est relativement courte (printemps et début de l'été) (Belhocine, 1998). Son cycle de reproduction est inversé par rapport au cycle de reproduction de *Psammomys obesus*.

La durée de la gestation est de 24 jours, il y a plusieurs portées par an, qui comprennent 2 à 7 petits.

## **I.3 *Meriones shawi***

### **I.3.1 Descriptif de l'animal**

*Meriones shawi* est caractérisé par des yeux noirs, des pieds épais pentadactyles qui se terminent par des ongles blancs comprimés et peu arqués. Il a des oreilles longues qui mesurent de 1,4 à 1,7 cm. Sa queue mesure entre 12 et 15 cm et se termine par un pinceau à peine marqué.

La taille de l'animal (tête + corps) atteint 13 à 15 cm, et son poids à l'âge adulte reste variable.

### I.3.2 Systématique

- Embranchement : Vertébrés
- Classe : Mammifères
- Super famille : Muroïdae
- Famille : Gerbillidae (Alston, 1846)
- Genre : Meriones
- Espèce : *Meriones shawi* (Duvernoy, 1942).
- Nom usuel : Meriones shawi.



### I.3.3 Répartition géographique

C'est une espèce à large répartition géographique, elle est présente à l'ouest du massif atlantique, à la frontière Egypto-Libyenne ainsi que dans les régions montagneuses de l'Atlas marocain.

Ces rongeurs préfèrent les sols limoneux où ils creusent leurs terriers peu profonds et labyrinthiques, situés sous les touffes de jujubiers et communiquent avec l'extérieur par plusieurs issues.

### I.3.4 Biologie de l'animal

*Meriones shawi* habite les endroits où poussent des jujubiers, des Chénopodiacées et des cultures céréalières, et caractérisé par une activité de *Meriones shawi* est nocturne (Zaïme *et al.*, 1992) ; il est caractérisé par une période de reproduction très courte (au printemps).

La durée de la gestation chez cette espèce est de 24 jours, avec plusieurs portées par an; chaque portée compte 2 à 7 petits.

## **II. Méthodes**

### **II.1 Prélèvement des organes et conservation**

Les animaux sont sacrifiés après anesthésie à l'uréthane à 25% à raison de 1ml pour 100 g de poids corporel; les vésicules séminales et les épидидymes sont débarrassés de leur tissu adipeux. Ils sont pesés et conservés à sec dans des cryotubes dans de l'azote liquide à -180°C ou au congélateur à -70°C pour le dosage et l'analyse des protéines.

### **II.2 Extraction des protéines**

Les protéines cellulaires (solubles) des vésicules séminales et des épидидymes sont extraites après broyage des organes à froid dans de l'azote liquide et dans un volume de 1 ml de tampon A (Annexe I).

L'homogénat (tissus + sécrétions) est récupéré dans des tubes eppendorf et centrifugé à 4500t /min à +4°C pendant 20 min.

Le surnageant (protéines solubles) est aliquoté dans des tubes eppendorf et conservé à -20°C pour les différentes manipulations (dosage des protéines; SDS-PAGE; Zymographie).

### **II.3 Dosage des protéines**

La concentration en protéines contenues dans le surnageant est estimée par la méthode de Bradford (1976), celle-ci est basée sur un changement de coloration de l'échantillon analysé, dû au bleu de Coomassie qui réagit avec les groupements amines libres des protéines.

L'absorbance (DO) des solutions, mesurée à la longueur d'onde de 595nm est proportionnelle à la concentration des protéines présentes dans les échantillons.

### **II.4 Analyse des protéines solubles de l'homogénat par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

Les protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes suivant le protocole décrit par Laemmli en 1970 (Annexe V).

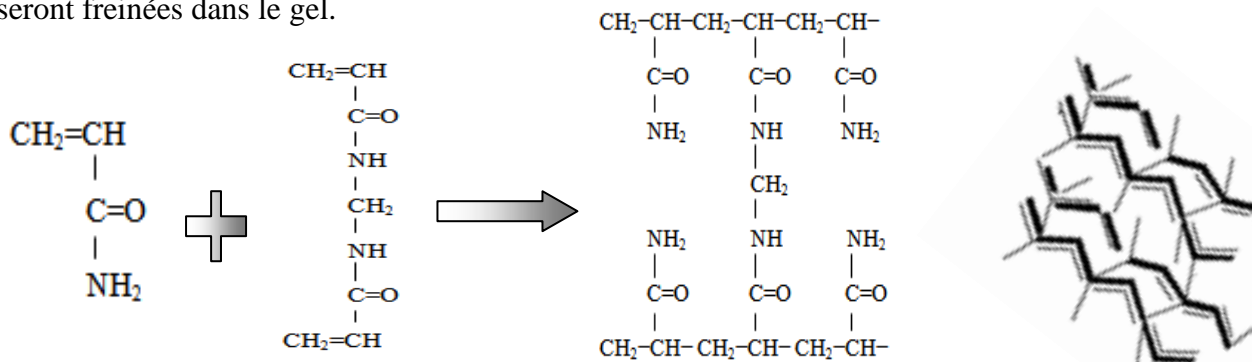
Les protéines, molécules amphotères, placées dans ces conditions prennent une forme «rod-like », acquièrent une charge globale négative et migrent de la cathode (-) vers l'anode (+). Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire.

#### II.4.1 Préparation des gels

Un gel de polyacrylamide est préparé et permet la séparation des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes.

Le support est un gel réticulé, formé par la polymérisation d'acrylamide (constitué de chaînes) et de bis-acrylamide (agent pontant), en présence d'agents de polymérisation TEMED et APS.

Plus la concentration en acrylamide est élevée, plus les pores seront réduits et les protéines seront freinées dans le gel.



**Figure 5.** Composition chimique des monomères d'acrylamide et de bis-acrylamide.

Les protéines, préalablement traitées en conditions dénaturantes et réductrices, sont tout d'abord condensées et concentrées dans un gel de concentration (10 % d'acrylamide) puis séparées dans un gel de séparation (15 % d'acrylamide).

#### *Préparation du gel de séparation (15% d'acrylamide)*

La séparation des protéines est réalisée dans un gel de résolution contenant 15% d'acrylamide, les dimensions du gel hauteur/épaisseur est de 7cm/ 0,75cm. La composition du gel est représentée dans le tableau I.

**Tableau I.** Composition du gel de séparation.

Composant du gel	Volume
Eau distillée	2,83ml
Solution acrylamide/bisacrylamide (30%)	5,83ml
Solution Tris-HCl/SDS (0,4%) pH 8,8	3ml
Solution APS 10%	100µl
TEMED	25µl

Le gel est coulé entre les deux plaques de verre, le sommet du gel est ensuite recouvert d'isopropanol. Lorsque le gel est polymérisé, la surface de celui-ci est rincée avec de l'eau distillée puis séchée à l'aide d'un papier filtre.

*Préparation du gel de concentration (10% d'acrylamide)*

La concentration des protéines se fait dans un gel « de concentration » contenant 10% d'acrylamide, les dimensions du gel hauteur /épaisseur est de 2cm /0,75cm. La composition du gel est représentée dans le tableau II.

**Tableau II.** Composition du gel de concentration

Composant du gel	Volume
Eau distillée	1,57ml
Solution acrylamide/bisacrylamide (30%)	1,5ml
Solution Tris-HCl/SDS (0,4%) pH 6,8	0,62ml
Solution APS 10%	30µl
TEMED	20µl

On insère, par la suite dans la partie supérieure du gel, le peigne qui servira à la formation des puits pendant la polymérisation.

#### **II.4.2 Traitement des échantillons**

Les protéines solubles ainsi que les protéines étalon de PM connu, sont dénaturées dans un tampon contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du SDS, dans un bain Marie à 90°C pendant 5min.

Le rapport volume échantillon /volume tampon est de 4/1. Le tampon à base de SDS et de  $\beta$ -mercaptoéthanol induit la perte de la structure tridimensionnelle des protéines et leur déroulement total en polyanion linéaire avec rupture des ponts disulfures (Annexe V).

La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (inférieure à 100kDa) :

- phosphorylase  $\beta$  (97,4 kDa).
- albumine (67 kDa).
- ovalbumine (45 kDa).
- anhydrase carbonique (29 kDa).
- inhibiteur de trypsine (21 kDa)

### **II.4.3 Migration des protéines**

La migration protéique se fait dans un tampon conducteur d'électrolytes, ce tampon est préparé selon le procédé proposé par Matson en 1965 (Annexe V).

La quantité des protéines soumise à la séparation est de 20 à 30  $\mu$ g par puits, la migration se fait sous une intensité de courant de 30 mA et dure 2h, Les protéines seront focalisées dans le gel et forment des bandes.

### **II.4.4 Coloration et décoloration**

Lorsque les protéines sont séparées, leur visualisation est effectuée par coloration au bleu de Coomassie à 0.25% (Annexe V).

La coloration du gel permet de visualiser toutes les protéines de l'échantillon, dont la concentration dépasse la limite de détection de la coloration.

Le gel coloré fait apparaître un profil de bandes dont l'intensité reflète partiellement l'abondance de chaque constituant dans l'homogénat initial.

Le gel est ensuite décoloré dans une solution de méthanol /éthanol /acide acétique, pour éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux différentes protéines séparées (Annexe V).

## **II.5 Séparation et caractérisation des protéinases par la technique de zymographie**

La séparation et la caractérisation des protéinases présentes dans les différents échantillons analysés précédemment par SDS-PAGE, est réalisée grâce à la technique de zymographie.

Cette technique est utilisée particulièrement pour les protéinases de la famille des métalloprotéinases (MMPs). Elle permet également d'évaluer les facteurs d'activation de ces enzymes (étude de l'effet de différents agents influençant l'activité enzymatique comme la température, la concentration en sels, le pH, les métaux lourds etc...).

### **II.5.1 Principe de technique**

La zymographie est une technique électrophorétique qui repose sur le principe d'une SDS-PAGE pour détecter et mesurer une activité protéolytique, en utilisant un substrat approprié pour l'enzyme recherchée. Le substrat utilisé est piégé dans les mailles de l'acrylamide.

Cette technique permet d'accéder à la fois à la quantification des formes actives et des proformes des enzymes.

### **II.5.2 Substrats utilisés en zymographie**

Un substrat spécifique pour l'enzyme recherchée est copolymérisé dans le gel de polyacrylamide; il permet la détection de différentes enzymes, sous leur forme : mature et précurseur.

Selon le substrat utilisé on distingue :

- La zymographie en gel de gélatine qui permet de mettre en évidence les gélatinases A et B.
- La zymographie en gel de caséine, utilisée pour la détection des MMP-1, MMP-7, MMP-12 et MMP-13.
- La zymographie en gel de collagène, utilisée pour la détection des MMP-1, MMP-13 ainsi que les MMP-9 et MMP-2.
- La zymographie en gel d'héparine.
- La zymographie réverse et la zymographie *in situ*.

Les MMPs que nous nous proposons de mettre en évidence sont des gélatinases, nous utilisons pour notre expérimentation la zymographie en gel de gélatine.

### II.5.3 Zymographie en gel de gélatine

#### 1. Préparation des gels

Pour la préparation des gels de zymographie, nous procédons de la même manière que pour les gels d'électrophorèse (SDS-PAGE) décrite précédemment, un gel de concentration contenant 6% d'acrylamide et un gel de séparation contenant 10% d'acrylamide (Annexe VI).

Pour la préparation des gels, 1% de gélatine sont ajoutés au mélange. La gélatine se prépare par dissolution de 10 mg dissout dans 1ml d'eau distillée, la solution est chauffée à +37°C pendant 15 min. Elle est par la suite aliquotée et conservée à -20°C.

#### *Préparation du gel de séparation (10% d'acrylamide)*

La séparation des protéines est réalisée dans le gel de séparation contenant 10% d'acrylamide, la dimension du gel hauteur/épaisseur est de 7cm/0,75cm. La composition du gel est représentée dans le tableau III.

**Tableau III.** Composition du gel de séparation

Composant du gel	Volume
Eau distillée	4,77ml
Solution acrylamide/bisacrylamide (30%)	3,8ml
Solution Tris-HCl/SDS (0,4%) pH 8,8	3ml
Gélatine	10mg
Solution APS 10%	80µl
TEMED	2µl

La solution de gélatine doit être chauffée à 37°C pendant 30 minutes dans un bain Marie avant son utilisation. Le gel est ensuite coulé entre les deux plaques de verre.

### *Préparation du gel de concentration (6% d'acrylamide)*

Le chargement des protéines se fait dans un gel contenant 6% d'acrylamide, les dimensions du gel hauteur/épaisseur est de 2cm/0,75cm. La composition du gel de concentration est représentée dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Composition du gel de concentration

<b>Composant du gel</b>	<b>Volume</b>
Eau distillée	3,75ml
Solution acrylamide/bisacrylamide (30%)	0,92ml
Solution Tris-HCl/SDS (0,4%) de pH 6,8	2ml
Solution APS 10%	40µl
TEMED	15µl

## **2. Traitement des échantillons**

Les protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes sont dénaturées dans un tampon en conditions dénaturantes (présence de SDS) et non réductrices (absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol); le rapport volume échantillon/volume tampon est de 4/1 (Annexe VI).

## **3. Dépôt des échantillons**

Les échantillons (protéines solubles de l'homogénat ainsi que les protéines sériques) sont déposés dans les puits dans le gel de concentration à raison de 20µg de protéines par puits.

## **4. Migration électrophorétique**

La migration se déroule dans des conditions identiques à celles d'une électrophorèse (SDS-PAGE) classique. Les protéines migrent donc en fonction de leur masse moléculaire respective. La migration se fait sous une intensité de courant de 20 mA et dure 2h.

## **5. Renaturation des protéines**

Après migration des protéines, le gel est démoulé et placé dans deux bains successifs contenant 2,5% (p/v) de Triton X-100 séparés par un lavage dans de l'eau distillée (Annexe VI).

Le Triton X-100 déplace le SDS fixé aux protéines et permet donc leur renaturation. Les enzymes déroulées sous l'effet du SDS récupèrent leur forme native fonctionnelle après traitement au Triton X-100.

## **6. Incubation du gel**

Cette étape reflète les conditions physiologiques nécessaires pour optimiser les fonctions enzymatiques, le gel est incubé dans un tampon contenant une source de  $\text{Ca}^{++}$  à  $+37^{\circ}\text{C}$  pendant 18h (Annexe VI).

## **7. Coloration et décoloration**

Le gel est coloré dans une solution contenant du bleu de Coomassie (concentration), puis décoloré dans une solution d'acide acétique/éthanol/méthanol (Annexe VI).

Après décoloration, le gel laisse apparaître des plages de lyses claires sur un fond coloré. Seuls les endroits où le substrat protéique n'a pas été dégradé sont colorés en bleu.

Nous avons réalisé l'électrophorèse des protéines et la zymographie des différents échantillons dans une cuve verticale de marque APELEX. Des étapes d'optimisation des paramètres de migration et des concentrations protéiques des échantillons se sont avérées nécessaires.

# RESULTATS

## **I. Analyse des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de trois rongeurs de la famille des Gerbillidae (*Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi*) en période de reproduction et en période de repos sexuel.**

Dans cette première partie, nous présentons

- Les résultats de l'analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de trois rongeurs déserticoles à reproduction saisonnière : *Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi* (en période de reproduction et en période de repos sexuel).
- Les résultats des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de deux rongeurs à reproduction continue : *Rattus norvegicus* et *Mus musculus* (espèces témoins).

### **I.1 Analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de *Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et de *Meriones shawi* en période de reproduction et en période de repos sexuel**

#### **- *Psammomys obesus* en période de reproduction**

Le profil électrophorétique des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de *Psammomys obesus* en période de reproduction montre la présence d'une dizaine de bandes protéiques de PM compris entre 14kDa et 100kDa, il s'agit des protéines de PM apparent de 14kDa, **21kDa**, 34kDa, 43kDa, 45kDa, 57kDa, 67kDa, 78kDa et de **92kDa (Fig. 6c)**.

#### **- *Psammomys obesus* en période de repos sexuel**

La période de repos sexuel est caractérisée par un nombre plus réduit de protéines solubles au niveau des vésicules séminales de *Psammomys obesus*.

En effet, nous notons la présence de cinq bandes protéiques principales, dont le PM est compris entre 34kDa et 100kDa, parmi lesquelles trois sont majoritaires, il s'agit des protéines de PM apparent de 67kDa, 78kDa et de **92kDa (Fig. 6c')**.

La comparaison des profils protéiques de la période de reproduction et de la période de repos sexuel, montre la présence de protéines caractéristiques de la période de reproduction, il s'agit des protéines de PM apparent de **21kDa**, 43kDa, 45kDa et de 57kDa (**Fig.6c; 6c'**).

Nous notons par ailleurs qu'un certain nombre de protéines sont présentes aussi bien en période de reproduction qu'en période de repos sexuel, il s'agit des protéines de 14kDa, 57kDa, 67kDa, 78kDa et notamment la protéine de PM apparent de **92kDa** (**Fig.6c; 6c'**).

- ***Rattus norvegicus* et *Mus musculus***

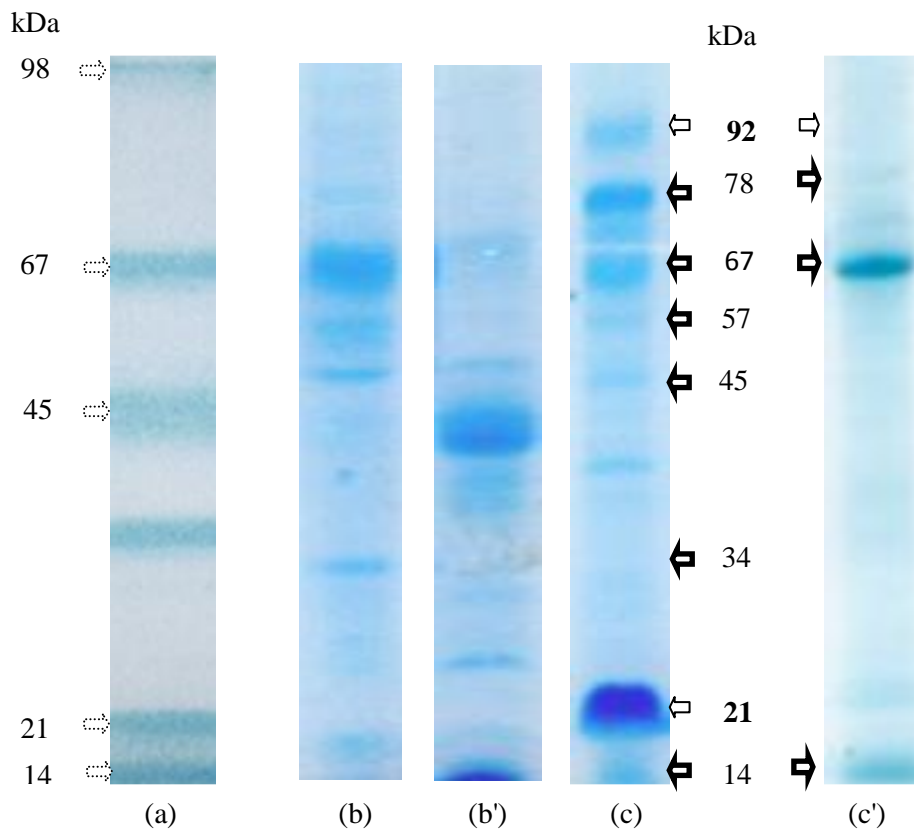
L'analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles des vésicules séminales des deux rongeurs à reproduction continue *Rattus norvegicus* et *Mus musculus* montre la présence de protéines communes aux deux espèces dont le PM apparent est de 14kDa, 34kDa, 45kDa, 57kDa, 67kDa et de 78kDa (**Fig.6b; 6b'**).

La comparaison des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales des deux rongeurs de *Rattus norvegicus* et de *Mus musculus* montre également la présence de protéines communes avec celles de *Psammomys obesus* en période d'activité sexuelle, il s'agit des protéines de PM apparent de 14kDa, 34kDa, 57kDa, 67kDa et de 78kDa (**Fig.6b; 6b'; 6c**).

Nous notons, par ailleurs que les protéines de PM apparent de **21kDa** et de **92kDa** qui sont présentes au niveau des vésicules séminales de *Psammomys obesus*, ne sont pas retrouvées au niveau des vésicules séminales de *Rattus norvegicus* et de *Mus musculus* (**Fig.6**).

## **Conclusion**

- Il existe au niveau des **vésicules séminales** de *Psammomys obesus*, de *Rattus norvegicus* et de *Mus musculus*, des **protéines communes de PM apparent de 14kDa, 34kDa, 45kDa, 57kDa, 67kDa et de 78kDa.**
- Les protéines de PM apparent de **21kDa et de 92kDa ne sont pas retrouvées chez les deux rongeurs à reproduction continue;** elles semblent **caractériser** la période de **reproduction** de *Psammomys obesus*.
- La protéine de **92kDa** semble être exprimée au niveau des **vésicules séminales** de *Psammomys obesus* en période de **reproduction** et en période de **repos sexuel.**



**Figure 6.** Profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales *Psammomys obesus* en période de reproduction et en période de repos sexuel, de *Rattus norvegicus* et *Mus musculus*.

- (a) Protéines standards.
- (b) *Rattus norvegicus*.
- (b') *Mus musculus*.
- (c) *Psammomys obesus* en période de reproduction.
- (c') *Psammomys obesus* en période de repos sexuel.

➡ Protéines communes aux trois rongeurs.

⇨ Protéines spécifiques de *Psammomys obesus*.

- Dépôt : 20µg de protéines par puits.
- Coloration : bleu de Coomassie.

- ***Meriones libycus* en période de reproduction**

Le profil électrophorétique des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales du mérien de Libye ou *Meriones libycus* en période d'activité sexuelle, montre la présence de protéines de PM apparent de 14kDa, **21kDa**, 25kDa, 34kDa, 45kDa, 53kDa, 60kDa, 67kDa, 72kDa, 78kDa et de **92kDa (Fig.7a)**.

- ***Meriones libycus* en période de repos sexuel**

L'analyse du profil électrophorétique des protéines solubles des vésicules séminales pendant la période de repos sexuel, montre la présence d'une dizaine de bandes protéiques de PM variant entre 25kDa et 92kDa, il s'agit des protéines de PM apparent de 25kDa, 34kDa, 43kDa, 45kDa, 53kDa, 57kDa, 67kDa, 78kDa et de **92kDa (Fig.7b)**.

La **comparaison** des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des **vésicules séminales** de *Meriones libycus* en période de **reproduction** et en période de **repos sexuel**, montre la présence d'un nombre de protéines nettement plus faible en période de repos sexuel qu'en période de reproduction.

Les protéines de PM apparent de 14kDa, 21kDa, 53kDa, 60kDa, 72kDa et de 92kDa semblent caractériser la période de reproduction de *Meriones libycus*.

L'analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des **vésicules séminales** de *Psammomys obesus* et de *Meriones libycus* en période de **reproduction**, montre que l'expression de la protéine de **21kDa** est caractéristique de la période de reproduction chez les deux espèces à reproduction saisonnière (**Fig.6c, et Fig.7a**).

L'analyse comparative des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des **vésicules séminales** de *Meriones libycus* et de *Psammomys obesus* en période de **repos sexuel**, montre que *Meriones libycus* présente des protéines qui ne se retrouvent pas chez *Psammomys obesus*, dont les majoritaires des protéines ont un PM apparent de 25kDa, 29kDa, 53kDa et de 57kDa (**Fig.6c', et Fig.7b**).

- ***Meriones shawi* en période de reproduction**

Le profil électrophorétique des protéines solubles des vésicules séminales de *Meriones shawi* en période de reproduction montre la présence d'une vingtaine de bandes protéiques, dont les

plus importantes ont un PM apparent de 14kDa, **21kDa**, 25kDa, 43kDa, 45kDa, 67kDa, 72kDa, 78kDa, **92kDa** et de 100kDa (**Fig.8b**).

L'analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de *Meriones libycus* et de *Meriones shawi* en période de reproduction, montre la présence d'une dizaine de protéines de PM compris entre 14kDa et 94kDa, parmi ces protéines six sont caractéristiques de la période d'activité sexuelle, il s'agit des protéines de PM apparent de 14kDa, 21kDa, 25kDa, 57kDa, 60kDa, 72kDa et de **92kDa** (**Fig.8a; 8b; 8c**).

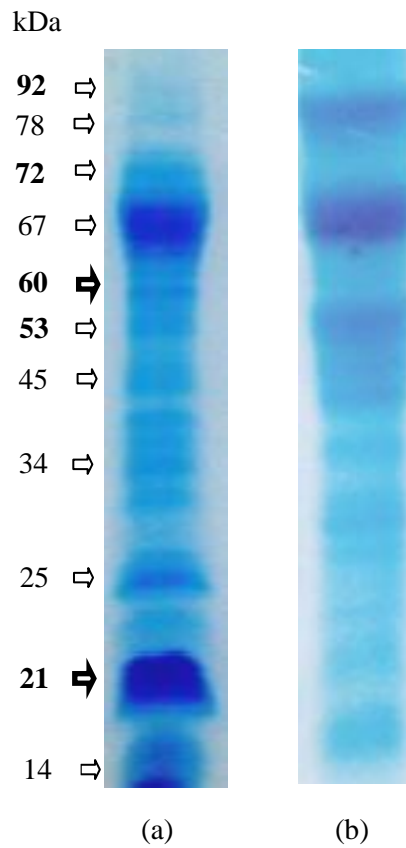
En effet, la comparaison des deux profils électrophorétiques ne montre aucune différence dans la composition du protéome des vésicules séminales des deux Mériens en période de reproduction (**Fig.8a; 8b**).

Les profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales des trois rongeurs déserticoles montre que les protéines de 25KDa, 27KDa, 29KDa, 32KDa, 43KDa, 45KDa, 53KDa et de 60kDa semblent être spécifiques aux deux espèces de Mériens en période de reproduction (**Fig.8a; 8b; 8c**).

En période d'activité sexuelle, les protéines solubles des vésicules séminales du rat des sables *Psammomys obesus*, de *Meriones libycus* et de *Meriones shawi*, montrent la présence de la protéine de 21kDa qui est exprimée chez les **rongeurs à reproduction saisonnière**.

## **Conclusion**

- Les protéines de PM apparent de 14kDa, 21kDa, 34kDa, 45kDa, 67kDa, 78kDa et de **92kDa** sont présentes au niveau des **vésicules séminales** de *Psammomys obesus*, de *Meriones libycus* et de *Meriones shawi* en période de **reproduction**.
- Les protéines de PM apparent de 25KDa, 27KDa, 29KDa, 32KDa, 43KDa, **53KDa** et de **60kDa** semblent être **spécifiques des vésicules séminales** des **deux rongeurs** du genre **Mériens**.
- Les protéines de PM apparent de **21kDa** et de **92kDa** ne sont pas retrouvées chez les **deux rongeurs à reproduction continue**; elles semblent caractériser les **vésicules séminales** des deux rongeurs à **reproduction saisonnière**, *Psammomys obesus* et *Meriones libycus*.



**Figure 7.** Profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de *Meriones libycus* en période de reproduction et en période de repos sexuel.

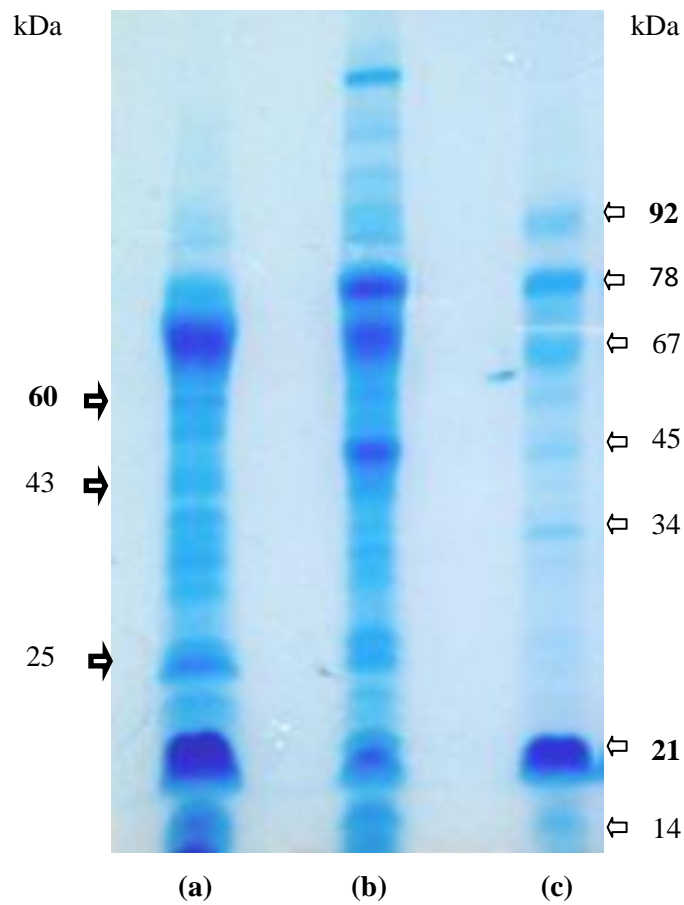
(a) Période de reproduction.

(b) Période de repos sexuel.

⇨ Protéines communes.

⇨ Protéines spécifiques de la période de reproduction.

- Dépôt : 20µg de protéines par puits.
- Coloration : bleu de Coomassie.



**Figure 8.** Comparaison des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de trois rongeurs de la famille des Gerbillidae (*Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi*) en période de reproduction.

(a) *Meriones libycus*.

(b) *Meriones shawi*.

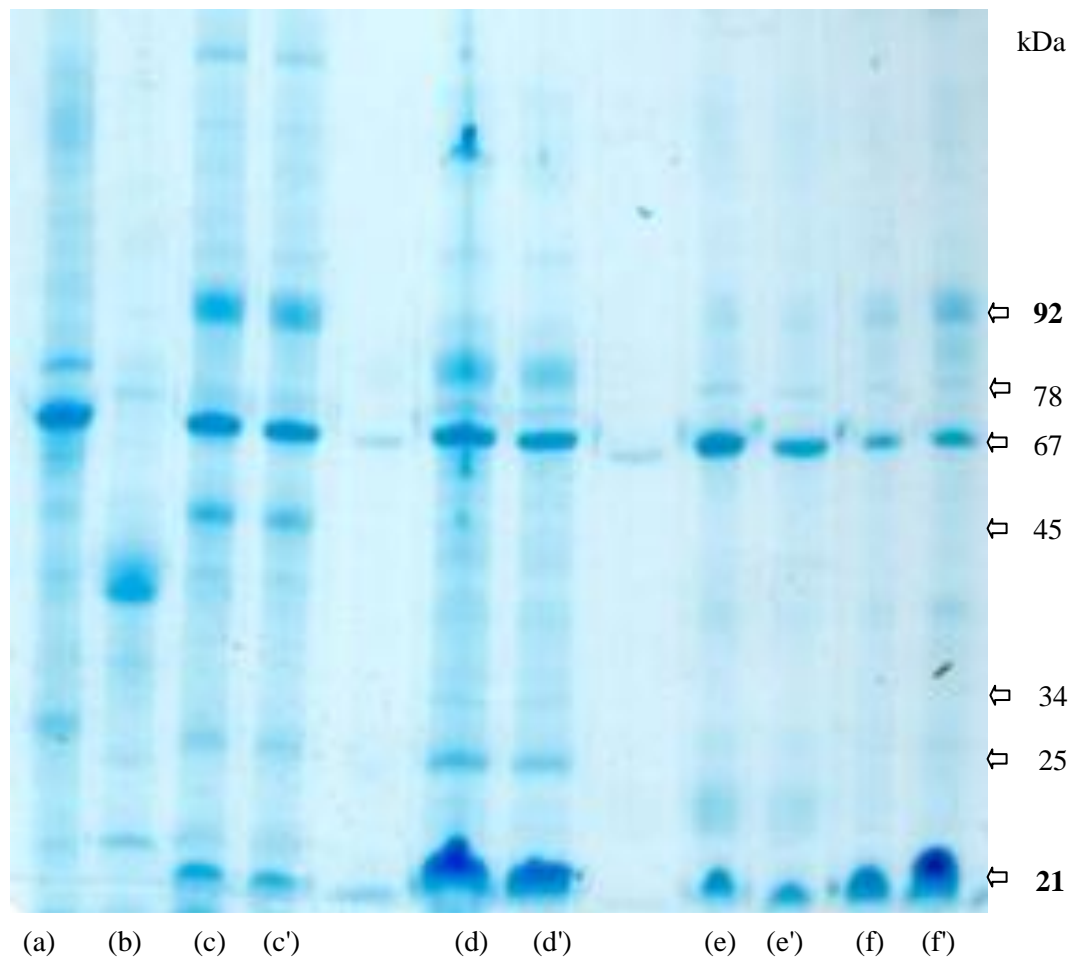
(c) *Psammomys obesus*.

⇨ Protéines communes aux trois rongeurs.

⇨ Protéines spécifiques du genre *Meriones*

- Dépôt : 20µg de protéines par puits.

- Coloration : bleu de Coomassie.



**Figure 9.** Profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de *Psammomys obesus*, *Meriones libycus*, *Meriones shawi*, *Rattus norvegicus* et de *Mus musculus*.

(a) *Rattus norvegicus*.

(b) *Mus musculus*.

(c), (c') *Meriones shawi* en période de reproduction.

(d), (d') *Meriones libycus* en période de reproduction.

(e), (e') *Psammomys obesus* en fin de période de reproduction.

(f), (f') *Psammomys obesus* en période de reproduction.

- Dépôt : 20µg de protéines par puits.
- Coloration : bleu de Coomassie.

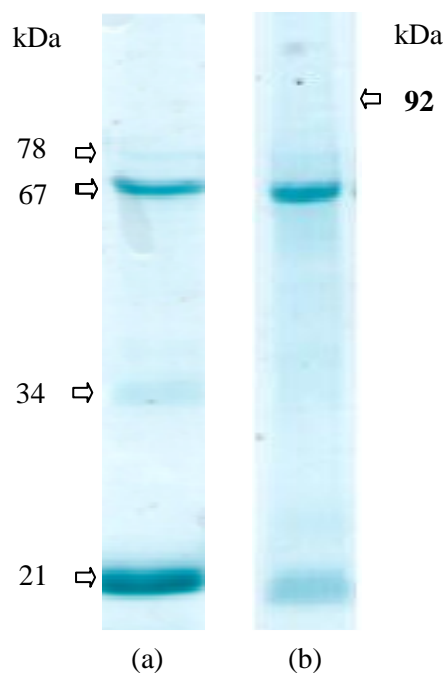
## I.2. Analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des épидидymes de *Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et de *Meriones shawi* en période de reproduction et en période de repos sexuel.

### - Epididymes totaux de *Psammomys obesus* en période de reproduction

Le profil électrophorétique des protéines solubles de l'homogénat des épидидymes totaux de *Psammomys obesus* en période d'activité sexuelle, montre la présence de trois bandes protéiques principales de PM apparent de 21kDa, 67kDa, 78kDa et de **92kDa** (Fig.10a).

### - Epididymes totaux de *Psammomys obesus* en période de repos sexuel

L'analyse du profil électrophorétique des protéines solubles des épидидymes totaux de *Psammomys obesus* en période de repos sexuel montre la présence de protéines de PM apparent de 67kDa, 78kDa, **92kDa** (Fig.10b).



**Figure 10.** Profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des épидидymes totaux de *Psammomys obesus* en période de reproduction et en période de repos sexuel.

(a) Période de reproduction.

(b) Période de repos sexuel.

⇨ Protéines solubles des épидидymes de *Psammomys obesus*.

- Dépôt : 20µg de protéines par puits.
- Coloration : bleu de Coomassie.

- **Epididymes (proximaux et distaux) de *Meriones libycus* en période de reproduction**

L'analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des épидидymes de *Meriones libycus* en période de reproduction, montre la présence de sept bandes protéiques importantes de PM apparent de 25kDa, 34kDa, 45kDa, 53kDa, 57kDa, 67kDa, 72kDa, 78kDa et de **92kDa (Fig.11a; 11a')**.

- **Epididymes (proximaux et distaux) de *Meriones libycus* en période de repos sexuel**

Les profils électrophorétiques des protéines solubles des **épididymes proximaux et distaux** de *Meriones libycus* en période de **repos sexuel** montrent la présence de protéines de PM compris entre 14kDa et 100kDa, il s'agit des protéines de PM apparent de 34kDa, 57kDa, 67kDa, 72kDa, 78kDa, **92kDa (Fig.11b; 11b')**.

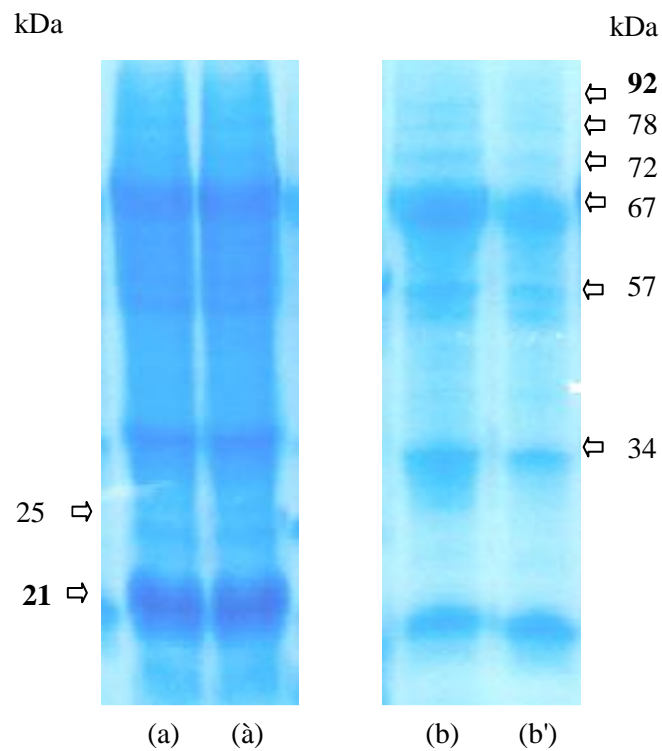
La comparaison des profils électrophorétiques des protéines solubles de l'homogénat des **épididymes** de *Meriones libycus* en période de **reproduction** et de **repos sexuel**, montre que les protéines de PM apparent de 34kDa, 57kDa, 67kDa, 72kDa, 78kDa, **92kDa** semblent présentes pendant le cycle reproducteur.

Les protéines de PM apparent de 14kDa, 21kDa et de 29kDa semblent être absentes chez *Meriones libycus* en période de repos sexuel et caractérise la période de reproduction (**Fig. 11a; 11b**).

L'analyse des profils électrophorétiques des protéines solubles des épидидymes de *Meriones libycus* en période de **reproduction** et en période de **repos sexuel** ne montre **aucune différence** de composition protéique entre les épидидymes **proximaux et distaux (Fig.11)**.

## **Conclusion**

La protéine de **92 kDa** est présente au niveau des **vésicules séminales** et des **épididymes** des **deux rongeurs à reproduction saisonnière**, en période de **reproduction** et en période de **repos sexuel**.



**Figure 11.** Profils électrophorétiques des protéines solubles des épидидymes proximaux et distaux de *Meriones libycus* en période de reproduction et en période de repos sexuel.

- (a) Epididyme proximal de *Meriones libycus* en période de reproduction.
- (a') Epididyme distal de *Meriones libycus* en période de reproduction.
- (b) Epididyme proximal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel.
- (b') Epididyme distal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel.

⇨ Protéines solubles des épидидymes proximaux et distaux.

- Dépôt : 20µg de protéines par puits
- Coloration : bleu de Coomassie

## **II. Recherche des métalloprotéinases au niveau des vésicules séminales et des épидидymes de *Psammomys obesus*, de *Meriones libycus* et de *Meriones shawi* en période de reproduction et en période de repos sexuel.**

Dans la deuxième partie de notre travail, nous présentons les résultats de l'analyse des zymogrammes pour la mise en évidence d'une activité gélatinase des métalloprotéinases présentes dans le tractus génital mâle des rongeurs à reproduction saisonnière *Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi*.

Dans cette partie nous nous proposons de mettre en évidence la présence de métalloprotéinases au niveau des vésicules séminales et des épидидymes des trois rongeurs à reproduction saisonnière, en période de reproduction et en période de repos sexuel, nous présentons :

- Les résultats de l'analyse des zymogrammes en gel de gélatine des protéines solubles de l'homogénat des **vésicules séminales** et des **épидидymes** de *Psammomys obesus* en période de **repos sexuel**.
- Les résultats de l'analyse des zymogrammes en gel de gélatine des protéines solubles de l'homogénat des **vésicules séminales** de *Meriones libycus* en période de **repos sexuel**.
- Les résultats de l'analyse des zymogrammes des protéines solubles de l'homogénat des **épидидymes proximaux** et **distaux** de *Meriones libycus* en période de **repos sexuel** et de *Meriones shawi* en période de **reproduction**.

### **II.1 Analyse des zymogrammes en gel de gélatine des protéines solubles des vésicules séminales et des épидидymes du rat des sables *Psammomys obesus* en période de reproduction et en période de repos sexuel.**

#### **- Vésicules séminales de *Psammomys obesus* en période de reproduction**

Le zymogramme des protéines solubles des vésicules séminales du rat des sables *Psammomys obesus* en période d'activité sexuelle ne laisse apparaître **aucune activité gélatinase (Fig.12e)**.

#### - **Vésicules séminales de *Psammomys obesus* en période de repos sexuel**

L'analyse du profil de zymographie des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de *Psammomys obesus* en période de repos sexuel, montre la présence de deux plages de lyse principales qui correspondent à l'action de gélatinases de PM apparent de **92kDa** et de **100kDa** (**Fig.12b**).

La **comparaison** des profils de zymographie des protéines solubles des **vésicules séminales** en période de **reproduction** et en période de **repos sexuel** montre que cette **activité enzymatique** semble être **spécifique** des **vésicules séminales de *Psammomys obesus*** en période de **repos sexuel**.

Nous rappelons que, pour cette analyse, nous avons utilisé, comme témoins, le zymogramme des protéines sériques d'un individu sain et d'un patient atteint de cancer de poumon au stade avancé.

Le zymogramme en gel de gélatine des protéines sériques de la personne saine ne révèle la présence d'aucune activité gélatinase, contrairement à celui du malade qui montre la présence de quatre plages de lyse qui correspondent à l'action des gélatinases de PM variant entre 72kDa et 100kDa, il s'agit de gélatinases sériques actives de PM apparent de 72kDa, 92kDa et de 100kDa (**Fig.12a**).

#### - **Epididymes totaux de *Psammomys obesus* en période de reproduction**

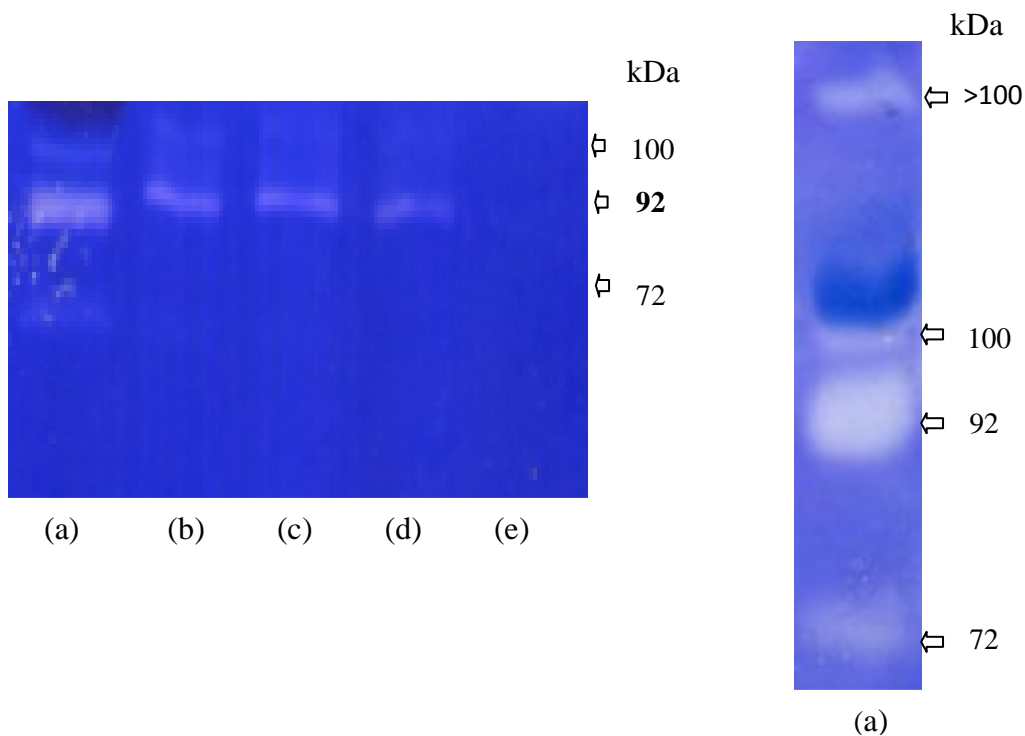
Le profil de zymographie des protéines solubles de l'homogénat des **épididymes** totaux de *Psammomys obesus* ne montre **aucune activité gélatinase** caractéristique des épididymes en période de **reproduction**.

#### - **Epididymes totaux de *Psammomys obesus* en période de repos sexuel**

L'analyse du zymogramme en gel de gélatine des protéines solubles de l'homogénat des **épididymes** de *Psammomys obesus* en période de **repos sexuel** révèle la présence de deux plages de lyses au niveau des bandes protéiques de PM apparent de **92kDa** et de **100kDa** (**Fig.12c**).

## Conclusion

- Les protéines de **92kDa** et de **100kDa** correspondent à des **gélatinases actives** au niveau des **vésicules séminales** et des **épididymes** de *Psammomys obesus* en période de **repos sexuel**.
- Cette **activité gélatinase** semble être **absente** chez *Psammomys obesus* en période de **reproduction**.



**Figure 12.** Profils de zymographie des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de *Psammomys obesus* en période de repos sexuel.

- (a) sérum témoin (Tutton *et al.*, 2003).
- (b) , (c) vésicules séminales de *Psammomys obesus* en période de repos sexuel.
- (d) épидидymes de *Psammomys obesus* en période de repos sexuel.
- (e) vésicules séminales de *Psammomys obesus* en période de reproduction.

☐ Protéines à activité gélatinase.

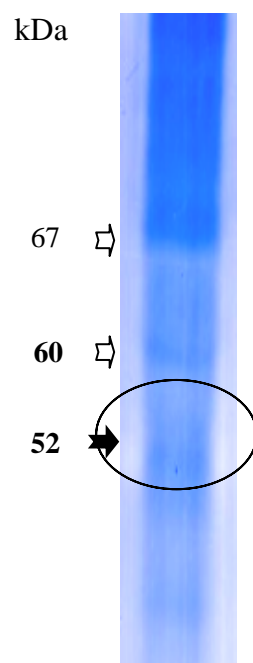
- Dépôt : 20µg de protéines par puits
- Coloration : bleu de Coomassie.

## II.2 Recherche des métalloprotéinases au niveau des vésicules séminales et des épидидymes chez deux espèces appartenant au genre *Meriones* en période de reproduction et en période de repos sexuel

### II.2.1 Analyse du zymogramme des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de *Meriones libycus* en période de repos sexuel

#### - Vésicules séminales de *Meriones libycus* en période de repos sexuel

Le zymogramme en gel de gélatine des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de *Meriones libycus* en période de **repos sexuel** montre la présence d'une plage de lyse au niveau de la bande protéique de PM apparent de **52kDa** (Fig.13, et Fig.14c).



**Figure 13.** Profil de zymographie des protéines solubles des vésicules séminales de *Meriones libycus* en période de repos sexuel.

★ Protéines à activité gélatinase.

- Dépôt : 20µg de protéines par puits.
- Coloration : bleu de Coomassie.

- **Epididyme proximal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel**

Comme pour les vésicules séminales, nous notons au niveau des épидидymes proximaux la présence d'une plage de lyse au niveau de la bande protéique de PM apparent de **52kDa** (Fig.14b).

- **Epididyme distal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel**

Nous notons que pour les épидидymes distaux de *Meriones libycus* en période de repos sexuel, l'analyse du zymogramme en gel de gélatine ne montre **aucune activité gélatinase** (Fig.14a).

La **comparaison** des résultats de l'analyse des zymogrammes des protéines solubles de l'homogénat des **vésicules séminales** et des **épидидymes** de *Meriones libycus* en période de **repos sexuel** montre une activité gélatinase qui correspond à la protéine de **52kDa** caractéristique des **vésicules séminales** et de l'**épидидyme proximal** (Fig.14a; 14b).

### **Conclusion**

Une **plage de lyse** qui correspond à une **action protéolytique** d'une gélatinase de PM de **52kDa** est présente au niveau des protéines solubles de l'homogénat

- des **vésicules séminales** de *Meriones libycus* en période de **repos sexuel**.
- des **épидидymes proximaux** de *Meriones libycus* en période de **repos sexuel**.

### **II.2.2 Analyse du zymogramme des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de *Meriones shawi* en période de reproduction**

- **Vésicules séminales de *Meriones shawi* en période de reproduction**

L'analyse du zymogramme des protéines solubles des **vésicules séminales** de *Meriones shawi* en période de **reproduction** ne révèle aucune plage de lyse, ce qui signifie l'**absence d'une activité gélatinase** pendant la période d'**activité sexuelle** chez cette espèce.

- **Epididymes proximaux de *Meriones shawi* en période de reproduction**

Le zymogramme des protéines solubles de l'homogénat de l'**épididyme proximal** de *Meriones shawi* en période de **reproduction**, montrent la présence de deux plages de lyse au niveau des bandes protéiques de PM apparent de **60kDa** et de **52 kDa** (**Fig.14d**).

- **Epididyme distal de *Meriones shawi* en période de reproduction**

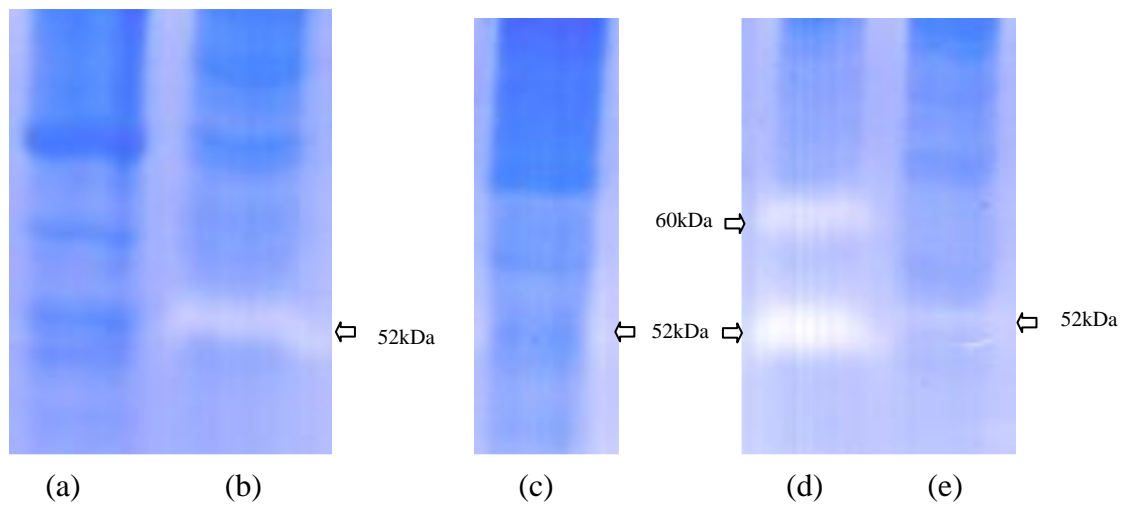
Nous notons par ailleurs que le zymogramme des protéines solubles de l'homogénat de l'**épididyme distal** de *Meriones shawi*, en période de **reproduction** montre la présence d'une plage de lyse de faible intensité correspondant à l'action d'une gélatinase de PM apparent de **52kDa** (**Fig.14e**).

Les zymogrammes des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épididymes de *Meriones shawi* en période de reproduction montre une activité gélatinase des protéines de PM apparent de **52kDa** et de **60kDa** au niveau de l'**épididyme proximal**. La protéine de **52kDa** est faiblement active au niveau de l'**épididyme distal** (**Fig.14d**).

Les **vésicules séminales ne révèlent** la présence d'**aucune activité gélatinase** chez cette espèce en période de **reproduction**.

### **Conclusion**

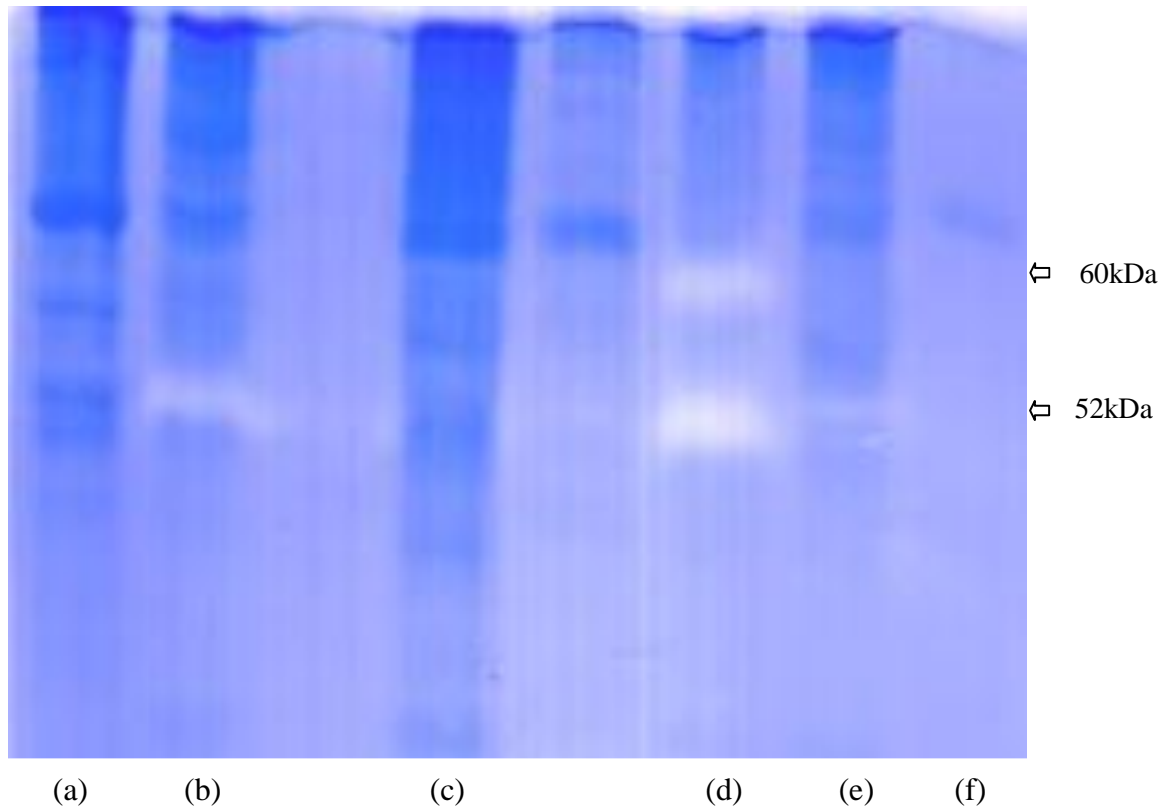
- Une **activité enzymatique importante** correspondant à l'action **gélatinase** de deux protéines de PM apparent de **52kDa** et de **60kDa** est révélée au niveau des protéines solubles de l'homogénat de l'**épididyme proximal** de *Meriones shawi* en période de **reproduction**.
- Au niveau de l'**épididyme distal**, seule la protéine de **52kDa** est révélée avec une faible activité.
- **Aucune activité gélatinase n'est retrouvée** au niveau des **vésicules séminales** de *Meriones shawi* en période de **reproduction**.



**Figure 14.** Zymogrammes des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de *Meriones libycus* en période de repos sexuel et de *Meriones shawi* en période de reproduction.

- (a) épидидyme distal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel.
- (b) épидидyme proximal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel
- (c) vésicule séminale de *Meriones libycus* en période de repos sexuel.
- (d) épидидyme proximal de *Meriones shawi* en période de reproduction.
- (e) épидидyme distal de *Meriones shawi* en période de reproduction.

- Dépôt : 20 $\mu$ g de protéines par puits.
- Coloration : bleu de Coomassie.



**Figure 15.** Zymogrammes des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales et des épидидymes de *Meriones libycus* en période de repos sexuel et de *Meriones shawi* en période de reproduction.

- (a) épидидyme distal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel.
- (b) épидидyme proximal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel.
- (c) vésicules séminales de *Meriones libycus* en période de repos sexuel.
- (d) épидидyme proximal de *Meriones shawi* en période de reproduction.
- (e) épидидyme distal de *Meriones shawi* en période de reproduction.
- (f) vésicules séminales de *Meriones shawi* en période de reproduction.

- Dépôt : 20 $\mu$ g de protéines par puits
- Coloration : bleu de Coomassie

⇒ Protéines à activité gélatinase.

**Tableau V** : Mise en évidence des MMPs et de l'activité gélatinase correspondante au niveau des vésicules séminales et des épидидymes de trois rongeurs déserticoles en période de reproduction et en période de repos sexuel

	<i>Psammomys obesus</i>		<i>Meriones libycus</i>		<i>Meriones shawi</i>	
	reproduction	repos sexuel	reproduction	repos sexuel	reproduction	repos sexuel
VS	<b>MMP-9 (-)</b>	<b>MMP-9**</b>	<b>MMP-9 (?)</b> MMP-3 (?) MMP-13 (?)	<b>MMP-9 (-)</b> MMP-3 (-) MMP-13 (-)	<b>MMP-9 (-)</b> MMP-3 (-) MMP-13 (-)	<b>MMP-9 (?)</b> MMP-3 (?) MMP-13 (?)
EPP	<b>MMP-9 (-)</b>	<b>MMP-9**</b>	<b>MMP-9 (?)</b> MMP-3 (?) MMP-13 (?)	<b>MMP-9 (-)</b> MMP-3* MMP-13 (-)	<b>MMP-9 (-)</b> MMP-3** MMP-13**	<b>MMP-9 (?)</b> MMP-3 (?) MMP-13 (?)
EPD	<b>MMP-9 (-)</b>	<b>MMP-9**</b>	<b>MMP-9 (?)</b> MMP-3 (?) MMP-13 (?)	<b>MMP-9 (-)</b> MMP-3 (-) MMP-13 (-)	<b>MMP-9 (-)</b> MMP-3* MMP-13 (-)	<b>MMP-9 (?)</b> MMP-3 (?) MMP-13 (?)

\*\* : activité gélatinase importante

\* : activité gélatinase de faible intensité

(-) : absence d'activité gélatinase

(?) : activité gélatinase non testée par zymographie.

# DISCUSSION

Les rongeurs de la famille des Gerbillidae représentent un modèle de rongeurs adaptés aux conditions extrêmes des régions arides et semi-arides. Les systèmes d'adaptation sont exprimés par des variations physiologiques, notamment, au niveau des fonctions de nutrition et de reproduction.

*Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi* sont trois espèces de la famille des Gerbillidae caractérisés par une reproduction saisonnière.

*Psammomys obesus*, rongeur diurne est caractérisé par une période de reproduction assez longue et une phase de repos sexuel relativement courte qui dépendent des conditions climatiques et essentiellement de la température externe.

Chez *Psammomys obesus*, l'installation de la phase de repos sexuel se fait progressivement à la fin du printemps (avril -mai) (Khammar, 1987).

Chez *Meriones libycus*, rongeur saharien nocturne, le cycle de reproduction est inversé par rapport à celui du rat des sables *Psammomys obesus*. Il présente une phase d'activité brève (printemps et début de l'été) et une longue période de repos sexuel qui s'étend de la fin de l'été jusqu'à la fin de l'hiver (Belhocine, 1998).

*Meriones shawi*, espèce nocturne, est caractérisé par une phase de reproduction qui s'échelonne de mars à septembre (Le-Berre, 1989). La phase de repos sexuel commence à la fin de l'hiver et atteint le maximum au printemps.

Chez les rongeurs déserticoles, la reproduction dépend des conditions climatiques, cette dépendance se traduit par des variations hormonales (Khammar, 1987), dont les répercussions au niveau histologique et biochimique ont été montrées au cours de travaux antérieurs (Gernigon *et al.*, 1994; Belhocine *et al.*, 1998; Kaci *et al.*, 2008; 2010; Izemrène, 2011; Kaci *et al.*, 2013).

Au niveau du tractus génital mâle, les vésicules séminales sont des glandes annexes, dont le développement ou la régression sont androgène-dépendants (Justulin *et al.*, 2006).

Les androgènes sont des facteurs intervenant dans l'évolution, les sécrétions épithéliales et dans l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales lors du passage de la période d'activité vers la période de repos sexuel.

Ces changements morphologiques excessifs sont modulés également par d'autres facteurs tels que les activateurs de plasminogène, les métalloprotéinases ainsi que les hormones hypophysaires FSH et LH.

L'analyse des protéines solubles, caractérisant chaque période du cycle reproducteur des trois rongeurs déserticoles étudiés est réalisée au niveau des vésicules séminales et des épидидymes de *Psammomys obesus*, de *Meriones libycus* et de *Meriones shawi* en période de reproduction et en période de repos sexuel.

Cette analyse a permis de montrer les variations qui s'opèrent au niveau du protéome des vésicules séminales et des épидидymes de ces trois rongeurs au cours du cycle saisonnier de la reproduction.

En effet, la comparaison des profils protéiques du rat des sables *Psammomys obesus*, de *Meriones libycus* et de *Meriones shawi* en période de reproduction et en période de repos sexuel a montré l'existence d'une dynamique dans l'expression d'un certain nombre de protéines :

- des protéines spécifiques de la période de reproduction des trois rongeurs à reproduction saisonnière et dont l'expression est androgéno-dépendante (Gernigon *et al.*, 1994) notamment la protéine de **21kDa** ou transgeline caractérisée et identifiée par Kaci et collaborateurs (Kaci *et al.*, 2010).
- des protéines exprimées le long du cycle reproducteur, (période de reproduction et période de repos sexuel) au niveau des vésicules séminales et des épидидymes de ces trois espèces, notamment la protéine de PM apparent de **92kDa**.

Cette analyse est complétée par la comparaison des profils électrophorétiques des protéines solubles des vésicules séminales de deux rongeurs à reproduction continue (*Rattus norvegicus* et *Mus musculus*). Elle montre la présence d'un certain nombre de protéines communes avec celles retrouvées chez les espèces à reproduction saisonnière.

Le protéome de ces différentes espèces est analysé par la suite par zymographie. Il révèle la présence, chez les espèces déserticoles, de protéines à activité gélatinase au niveau des vésicules séminales et des épидидymes aussi bien pendant la période d'activité sexuelle que pendant la période de repos.

En effet, cette analyse a permis de révéler une activité gélatinase pour les protéines de PM apparent de :

- **92 kDa** présente au niveau des vésicules séminales et des épидидymes du rat des sables *Psammomys obesus* en période de repos sexuel.
- **52kDa** exprimée au niveau des vésicules séminales et de l'épididyme proximal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel.
- **52kDa** et de **60 kDa** présentes chez *Meriones shawi* au niveau de l'épididyme proximal en période de reproduction.

Dans notre travail, nous avons porté un intérêt particulier aux métalloprotéinases et nous avons mis en évidence au niveau des vésicules séminales et des épидидymes des rongeurs déserticoles, *Psammomys obesus*, *Meriones libycus* et *Meriones shawi*, la présence de trois MMPs de PM apparent de 52, 60 et de 92 kDa.

#### ***Chez les rongeurs à reproduction continue***

La recherche des MMPs chez *Rattus norvegicus* et *Mus musculus* n'a révélé aucune activité gélatinase spécifique de la MMP-9 au niveau des profils électrophorétiques et zymographiques des protéines solubles de l'homogénat des vésicules séminales de l'animal adulte.

Ces résultats rejoignent ceux de Wilson et ses collaborateurs en 1992 qui montrent la présence d'une activité gélatinase de PM apparent de 64 kDa et de 82 kDa correspondant à la forme active des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 au niveau des vésicules séminales de *Rattus norvegicus* jeune et impubère, où la différenciation des organes reproducteurs se fait au bout d'une cinquantaine de jours (Wilson *et al.*, 1992).

Ce résultat montre que la présence de la MMP-9 est nécessaire pour les remodelages tissulaires. Ce qui Justifier sa présence au niveau des vésicules séminales et des épидидymes qui nécessite un remodelage permanent au cours du cycle reproducteur.

#### ***Chez les rongeurs à reproduction saisonnière***

Au cours du cycle reproducteur de *Psammomys obesus*, les organes reproducteurs mâles subissent des variations histologiques et fonctionnelles relatives aux variations des

androgènes. Ces variations sont traduites par des modifications dans l'expression protéique (Fawell *et al.*, 1986; Belhocine et Gernigon, 1994).

Sur le plan histologique, l'état de repos sexuel est caractérisée par une accumulation de la matrice extracellulaire, une hypertrophie de la paroi fibromusculaire, un épithélium présentant des replis importants et une apoptose des cellules épithéliales (Belhocine *et al.*, 2007).

Ces modifications histologiques suggèrent l'intervention d'enzymes impliquées dans les processus de remodelage et de la régression des tissus du tractus génital mâle pendant la période de repos sexuel (Hulboy *et al.*, 1997; Baumgart *et al.*, 2002; Justulin *et al.*, 2006).

En effet, les profils électrophorétiques des protéines solubles montrent que les vésicules séminales et les épидидymes du rat des sables *Psammomys obesus* sont caractérisés par une richesse en protéines solubles en période de reproduction par rapport à l'état de repos sexuel ou de régression hormonale, il s'agit notamment des protéines de PM apparent de 14kDa, 21kDa, 25kDa, 57kDa, 60kDa, 72kDa et la **92kDa**, parmi toutes ces protéines, la protéine de PM apparent de **21kDa** est caractéristique de la période de reproduction (Gernigon, 1992; Kaci *et al.*, 2008).

Les résultats de la SDS-PAGE montrent également la présence d'un produit de 92kDa qui semble être exprimé au niveau des vésicules séminales et des épидидymes de *Psammomys obesus* de façon constitutive en période de reproduction et en période de repos sexuel.

La zymographie en gel de gélatine des protéines des vésicules séminales et des épидидymes de *Psammomys obesus* en période de repos sexuel, montre une activité gélatinase de deux protéines de PM apparent de **92kDa** et de **100kDa**.

Les résultats de l'électrophorèse et de la zymographie montrent que les protéines de PM apparent de **92kDa** et de **100kDa** correspondent à des gélatinases exprimées au niveau du tractus génital mâle le long du cycle reproducteur, et dont l'activité protéolytique est spécifique de la période de repos sexuel.

Ces résultats rejoignent ceux de Belhocine qui a montré la présence de la MMP-9 (par une approche immuno-histochimique) au niveau des vésicules séminales de *Psammomys obesus* et de *Meriones libycus* tout le long du cycle reproducteur, et même après castration, ce qui

suggère que la synthèse de cette protéine chez ces espèces semble indépendante du taux des androgènes, et notamment de la testostérone.

La gélatinase A de **92kDa** correspond à la métalloprotéinase-9 (MMP-9) dépendante des ions  $Zn^{++}$  et du  $Ca^{++}$  et peut être activée par clivage protéolytique dans le milieu extracellulaire quand un remaniement des tissus est requis.

Ce travail a permis de montrer que chez *Psammomys obesus*, la MMP-9 est exprimée aussi bien en période d'activité qu'en période de repos sexuel, mais que l'activité gélatinase n'est révélée qu'en période de repos sexuel.

En effet, au niveau des vésicules séminales et des épидидymes de *Psammomys obesus* aucune activité gélatinase n'a été décelée pendant la période d'activité sexuelle. Cette période étant caractérisée par des concentrations importantes de testostérone et de ses dérivés, laisse supposer que l'activité gélatinase de la MMP-9 serait réprimée par les hormones de la phase de reproduction.

Par ailleurs, la présence de cette enzyme tout au long du cycle reproducteur suggère que sa synthèse serait indépendante du taux d'androgènes, elle semblerait plutôt soumise à un contrôle qui se situerait au niveau de sa sécrétion sous sa forme immature ou bien au niveau de son activation extracellulaire (Rothhut *et al.*, 2007).

Nous avons également essayé de rechercher l'existence d'une éventuelle relation entre l'expression de la MMP-9 et l'expression d'autres protéines androgène-dépendantes au niveau du même organe et chez la même espèce de rongeur.

Parmi les protéines caractéristiques des organes reproducteurs mâles, la transgeline, protéine androgène-dépendante majeure identifiée pour la première fois au niveau des vésicules séminales et des épидидymes des animaux déserticoles pendant la période d'activité sexuelle par Kaci et ses collaborateurs en 2008, semble exercer un effet inhibiteur sur l'expression de la MMP-9 au niveau de ces parties du tractus génital.

Cette hypothèse est confortée par des travaux de Assinder en 2009, et Athanasiou en 2010 qui montrent que la transgeline est un inhibiteur de la MMP-9 (Assinder *et al.*, 2009; Athanasiou *et al.*, 2010;).

L'absence d'activité gélatinase de la MMP-9 en période de reproduction justifie son intervention dans le remodelage requis en période de repos sexuel.

La transgeline ou SM22 est une protéine liée au cytosquelette des cellules musculaires lisses. (Lees-Muller *et al.*, 1987). Son absence favorise un remodelage massif de la MEC par une augmentation de l'expression de la MMP-9. Elle agit à plusieurs niveaux, elle diminue la transcription de l'ARNm de la MMP-9 et régule l'expression et l'activation de la MMP-9 (Athansiou *et al.*; 2010).

Il faut souligner toutefois que pour ces niveaux de régulation, plusieurs MMPs présentes pendant la période de repos sexuel et dont l'expression est soumise à une régulation hormonale, sont impliquées dans l'activation extracellulaire de la MMP-9.

Il s'agit de la MMP-1, qui est un activateur de la MMP-9, elle-même serait inhibée par la testostérone pendant la phase d'activité sexuelle de l'animal (Ishikawa *et al.*, 2007) et la MMP-3 qui active la MMP-9 par atténuation de l'effet inhibiteur exercé par le TIMP-1 sur la MMP-9. Dans ce cas la MMP-3 induit la saturation des sites spécifiques de la MMP-9 sur le TIMP-1 par formation d'un complexe ternaire pro-MMP-9/TIMP-1/MMP-3.

Chez les rongeurs du genre *Meriones* (*Meriones shawi* et *Meriones libycus*), les vésicules séminales montrent en période de reproduction une composition en protéines presque identique. Le protéome est caractérisé par la présence de plus de dix bandes protéiques dont les plus importantes ont un PM apparent de 14kDa, 21kDa, 25kDa, 29kDa, 34kDa, 45kDa, **52kDa**, 57kDa, **60kDa**, 67kDa, 78kDa, 72kDa et de **92kDa**, parmi lesquelles certaines sont androgène-dépendantes.

Les protéines de PM apparent de 52kDa, 72kDa et de 92kDa, présentes au niveau du tractus génital mâle de *Meriones libycus* en période d'activité et en période de repos sexuel correspondent respectivement aux MMP-3, MMP-2 et MMP-9. Ces résultats rejoignent ceux de Belhocine et collaborateurs en 2010.

La zymographie en gel de gélatine des protéines solubles de l'homogénat de l'épididyme proximal de *Meriones libycus* en période de repos sexuel, montre une activité protéolytique de faible intensité de la MMP-3.

Ce qui semble signifier que la MMP-3 est active en période d'activité sexuelle (Belhocine *et al.*, 2010), et que son activité enzymatique serait diminuée ou réprimée en période de repos sexuel.

Chez *Meriones shawi* en période de reproduction, les protéines de l'épididyme proximal montrent la présence d'une activité gélatinase correspondant à la MMP-3 et à la MMP-13. Seule la MMP-3 reste faiblement active au niveau de l'épididyme distal.

L'activité gélatinase de la MMP-13 au niveau de l'épididyme proximal et son absence au niveau de l'épididyme distal chez *Meriones shawi* en période de reproduction, suggère un rôle spécifique aux épидидymes proximaux, et l'implication de ces gélatinases dans le remodelage des tissus en période d'activité sexuelle.

Des études antérieures montrent que la MMP-13 semble être activée par la MMP-3, et que l'absence de la MMP-13 au niveau de l'épididyme distal est justifiée par la diminution du taux de la MMP-3 pendant la phase d'activité sexuel (Curry *et al.*, 2003).

L'absence d'une activité gélatinase caractéristique de ces deux enzymes au niveau des vésicules séminales, suggère qu'elles ne soient libérées que localement et agirait lors du remodelage tissulaire des épидидymes ou des testicules, ou pour la libération de facteurs nécessaires à la fonction testiculaire telle que la formation ou la maturation des spermatozoïdes (Li *et al.*, 2012).

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

La composition en protéines des vésicules séminales et des épидидymes des rongeurs de la famille des Gerbillidae varie au cours du cycle reproducteur, cette variation semble être dépendante du taux des androgènes, et essentiellement de la testostérone.

Ces organes présentent des protéines dont l'expression est dépendante des androgènes, telle que la transgeline, d'autres sont exprimées tout le long du cycle reproducteur et indépendamment des fluctuations du taux des androgènes, dans ce dernier groupe nous avons identifié un produit de 92kDa à activité gélatinase.

La protéine de 92kDa correspond à une métalloprotéinase-9, exprimée au niveau des vésicules séminales et des épидидymes et active en période de repos sexuel chez le rat des sables en période de repos sexuel. Elle semble être inhibée en période de reproduction quand le taux des androgènes est maximal.

L'activité de la MMP-9 est androgéno-dépendante et semble être inhibée en période d'activité sexuelle par la transgeline. La transgeline serait un nouveau régulateur de l'activité de la MMP-9.

La période de reproduction des rongeurs du genre *Meriones* montre une activité gélatinase des protéines de PM apparent de 52kDa et de 60kDa qui correspondent respectivement à la MMP-3 et la MMP-13 caractérisant les épидидymes proximaux.

Les MMP-3 et MMP-13 sont actives au niveau des épидидymes proximaux chez *Meriones libycus* et *Meriones shawi*, cette activité semble être nécessaire pour le remodelage au niveau des épидидymes en période de reproduction ou pour une fonction testiculaire.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude chez ces espèces par :

- une étude complète des différentes MMPs exprimées au niveau de tout le tractus génital mâle des rongeurs de la famille des Gerbillidae, à différentes périodes du cycle de la reproduction.
- une quantification de ces enzymes à différentes périodes du cycle de la reproduction.
- l'étude de l'effet des androgènes sur l'activité de ces gélatinases.
- l'étude approfondie du mode et du niveau d'action de la transgeline sur l'expression et l'activité de la MMP-9.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Almholt K., Johnsen M. (2003)- Stromal cell involvement in cancer. *Cancer Res.***162**:31-42.
- Aparicio T et Lehy T. (1999)- Métalloprotéinases matricielles en pathologies digestives. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **23** : 330-341.
- Apostolidou E., Paraskeva E., Gouroulisanis K., Molyvdas P.A., Hatzoglou C. (2012)- Matrix métalloprotéinases 2 and 9 increase permeability of sheep pleura in vitro. *BCM. Physiologi.* **12**:2.
- Assinder S.J., Stanton J.A. (2009)- Transgelin: An actin-binding protein and tumor suppressor. *J. INT. Bioch Cell Biology.* **41**: 482–486.
- Athanasion S., Lymberopoulos E., Kanellopoulou S., Rodolakis A., Vlachos G., Antsaklis A. (2010)- Proteomic analysis of pubocervical fascia in women with and without pelvic organ prolapsed and urodynamic stress incontinence. *Int. Urogynecol. J.* **21**: 1377-1384.
- Aumüller G. (1979)- Seminal vesicles ; in Prostate glande ande seminal vesicules. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Edition Springer Berlin.***7** : 183-246.
- Aumüller G et Seitz J. (1986)- Immunoelectron microscopic evidence for different compartements in secretory vacuole of rat seminal vesicles. *Histochem.J.* **18** (1): 15-23.
- Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G. (2002)- Metalloproteinase inhibitors : biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell. Sci.* **115**:3719-3727.
- Baumgart E., Lenk S.V., Loening S.A., Jung K. (2002)- Quantitative differences in matrix metalloproteinase (MMP)-2, but not in MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 or TIMP-2, in seminal plasma of normozoospermic and azoospermic patients. *Human Reproduction.* **17**(11) : 2919–2923.
- Bellocq J., Wolf C., Stoll I., Hutin P., Limacher J. (1990)- A novel inhibition metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature.* **348**:699-704.
- Belhocine M., 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 Merion du désert (*Meriones crassu*) et de son espèce sympatrique, le Méridon de Libye (*Meriones libycus*). Thèse de Magister, USTHB, Alger, 175p.
  
- Belhocine M., Gernigon-Spychalowicz T., Robert A.M., Schoevaert D., Benazzoug Y and Exbrayat J.M. (2007)- Ecophysiological responses of the seminal vesicles of Libyan jird (*Meriones libycus*) to the Saharan conditions: histological, morphometric and immunohistochemical analysis. *Cellular and Molecular Biology*. **22**: 603-615.
  
- Belhocine M., Gernigon T., Jacob M.P., Benazzoug Y., Exbrayat J.M. (2010)- Immunoexpression of gélatinases (MMP-2 and MMP-9) in the seminal vesicles and ventral prostate of Libyan jird (*Meriones libycus*) during the seasonal cycle of reproduction. *Histol. Histopathol.* **25**: 619-636.
  
- Belotti D., Paganoni P., Manenti L., Garofalo A., Marchini S., Taraboletti G.(2003)- Matrix métalloprotéinases (MMP-9 and MMP-2) induce the release of VEGF by ovarian carcinoma cells. *Cancer. Res.* **63**:5224-5229.
  
- Bernard R., Ghoneim G., Antonicelli F., Rothlüt M.S. (2007)- Epidermal growth factor matrix metalloproteinase-9 expression and invasion in human follicular thyroid carcinoma cells through factor adhesion kinase. *Biochimie.* **89**: 613-624.
  
- Bergers G., Coussens L.. (2000)- Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: Métalloprotéinases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**:120-127.
  
- Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. (1993)- Matrix métalloprotéinases. *A review. Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **4** (2): 197–250.
  
- Bok R.A., Small E.J. (2002)- Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**(12): 918-926.
  
- Bomgardner D., Wehrenberg U., Rune G.M. (1999)- TGF beta could be involved in paracrine actions in the epididymis of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J. androl.* **20**: 375-383.
  
- Brande D. (1974)-Fine structure and cytochemistry of male sex accessory organs; Structure and functions in mammals. *Academic Press. New. York.* pp 18-133.

- Brown, L.F., Yeo, K.T., Berse, B., Yeo, T.K., Senger, D.R., Dvorak, H.F. (1992)- Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J. Exp. Med.* **176** (5): 1375–1379.
- Caraty A et Locatelli A. (1988)- Effect of time after castration on secretion of LHRH and LH in the ram. *J. Reprod. Fertil.* **82**: 263-269.
- Carlin R.W., Lee J.H., Marcu D.C. (2003)- Adenosine stimulates anion secretion across cultured and native adult human vas defrens epithelial. *Biol. repro.* **68**: 1027-1034.
- Chen L., Noelken M., Nagase H. (1992)- Disruption of the cysteine-75 and zinc ion coordination is not sufficient to activate the precursor of human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). *Biochemistry.* **32**:10289-10295.
- Choumowitch W. (1954)- Observation sur les moeurs et l'éthiologie de quelques mammiferes du sud tunisien. *Bull. Soc. Sc. Tunis.* **7** : 81-88.
- Claver A. (2005)- A propos des vésicules seminlaes: le point de vue du biologist. *Androl.*, **15** (3) : 259-262.
- Coffry D.S. (1992)- The molecular biology, endocrinology and physiology of the prostate and seminal vesicles. *Campbell's Urology.* 221-266.
- Curry T.C., Osteen K.G. (2003)- The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle. *Endocrine Reviews.* **24**(4):428-465.
- Dacheux J.L et Paquignon M. (1981)- Physiologie épидидymaire et maturation des spermatozoides. *Act. Gynecol.***12** : 200-213.
- Dacheux J.L et Paquignon M. (1987)- Maturation épидидymaire des spermatozoïdes, influence sur la qualité des gamètes. *physio de la reproduction.* **19** : 99-106
- Daly M et Daly S. ( 1975)- Behavions of Psammomys obesus (Rodentia, Gerbillidae) in the Algerien Sahara. *Z. Tierpsychol.* **37**: 298-321.
- Dasu M.R., Hawkins H.K., Barrow R.E. (2004)- Gene expression profiles from hypertrophic scar fibroblasts before and after IL-6 stimulation. *J. Pathol.* **202**(4): 476-485.

- David A. (2007)- Protéomique fonctionnelle dédiée aux Métalloprotéases Matricielles (MMPs) : développement d'une méthode extrêmement sensible permettant la détection des formes actives des MMPs dans des protéomes complexes. Thèse de doctorat. 166p.
- Dayon A. (2008)- Rôle de la sphingosine kinase-1 dans la survie et la progression des cellules tumorales prostatiques LNCaP vers l'Androgéno-dépendance. Thèse de doctorat, 103p.
- Dohn G.R., Smit M., Weber R.F. (2003)- Androgens and male fertility. *World. J. Urol.***21** (5): 341-345.
- Dong Q., Hardy M.P. (2003)- Leydig cell function in man. In: Male Hypogonadism: Basic, Clinical, and Therapeutic Principles. *Humana. Press. Inc.* 23-43.
- Dunn J.F., Nisula B.C., Rodbard D. (1981)- Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin .Endocrinol. Metab.* **53**: 58-68.
- Eccles S.A., Box G.M., Court W.J. (1996)- Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a ratmammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat. *Cancer. Res.* **56**:2815- 2822.
- Fair W.R et Wehner N. (1971)- Antimicrobial action of spermine: effect on urinary tract pathogens. *Appel. Microbiol.* **21**: 6-8.
- Fan X., Robaire B. (1998)- Orchidectomy induces a wave of apop-totic cell death in the epididymis. *Endocrinology.* **139**: 2128–2136.
- Fawell S.E., Pappin D.J.C., Mc Donald C.J., Higgins S.J. (1986)-Androgen-regulated proteins of rat seminal vesicle secretion constitute a structurally related family present in the copulatory plug. *Mol. Cell. Endocrino.* **45**: 205-213.
- Feig L.A., Bellve A.R., Erickson N.H., Klagsbrun M. (1980)- Sertoli cells contain a mitogenic polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 4774-4778.
- Festuccia C., Angelucci A., Gravina G.L., Eleuterio E., Vicentini C. (2002)- Bombesin-Dependent Pro-MMP-9 Activation in Prostatic Cancer Cells Requires  $\beta$ -1 Integrine Engagement. *Experimental cell Research* **280**: 1-11.

- Firman R.C et Simmons L.W. (2008)- The frequency of multiple paternity predicts variation in testes size among island population of house mice. *J. Evol. Biol.* **53** (7) : 755-850.
- Folgueras A.R., Pendas A.M., Sanchez L.M., Lopez-Otin C. (2004)- Matrix Métalloprotéinases in cancer : from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* **48**:411-424.
- Fu J.F., Lyga A., Shi H., Blue M.L., Dixon B and Chen D. (2000)- Cloning, Expression, Purification, and Characterization of Rat MMP-12. *Reproduction.* **21** : 268–274
- Galant C., Eeckhout Y., Courtoy P.J., Henriët P., Marbaix E. (2004)- Implication des métalloprotéases matricielles (MMPs) dans la menstruation et les métrorragies dysfonctionnelles. *Med. Ther. Endoc. Reprod.* **6**:16-23.
- Gernigon-Spychalowicz T. (1992)- Etudes cytologiques et biochimiques des variations saisonnières de l'appareil reproducteur mâle d'un rongeur saharien diurne, le rat des sables (*Psammomys obesus*). Thèse de doctorat d'Etat, ISN, USTHB, Alger, 180p.
- Gernigon T., Berger L., Lecher P. (1994)- Seasonal variations in the ultrastructure and production of androgen-dependent proteins in the seminal vesicles of a saharien rodent (*Psammomys obesus*). *J. Endocrinol.* **142**: 37-47.
- Gibson D., Cullen B., Legerstee R., Harding K.G et Schultz G. (2009)-MMP. *Wounds International.* **1**(1): 53-55.
- Giribaldi G., Valente E., Khadjavi A., Polimeni M., Prato M. (2011)- Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  mediates Matrix Metalloproteinase-9 enhancement in human adherent monocytes fed with malarial pigment . *Pacific J. of Tropical Medicine* :925-930.
- Goffin F., Munaut C., Frankenne F., Perrier D'Hauterive S., Beliard A., Fridman V.(2003)- Expression pattern of métalloprotéinases and tissue inhibitors of matrix-métalloprotéinases in cycling human endometrium. *Biol. Reprod.* **69**:976-984.
- Gomez D.E., Alonso D.F., Yoshiji H., Thorgeisson U.P. (1997)- Tissue inhibitors of métalloprotéinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell. Biol.* **74** (1):11- 22.
- Gomis-Ruth F.X., Maskos K., Betz M., Bergner A., Huber R., Suzuki K. (1996)- Mechanism of inhibition of the human matrix métalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* . **389**:77-81.

- Goyal H.O., Bartol F.F., Wiley A.A., Khalil M.K., Chiu J., Vig M.M. (1997)- Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *Anat. Rec.* **249**:54–62.
- Graesslin M.O. (2008)- Etude de l'expression des métalloprotéases (MMP-2, -7 et -9), des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP-1 et -2), des facteurs apoptotiques (P53 et Bcl-2) et des récepteurs hormonaux (RE et RP) dans les cancers et les hyperplasies de l'endomètre par comparaison à l'endomètre sain. Etude de la ploïdie et recherche des anomalies cytogénétiques par FISH. Evaluation de l'implication de ces facteurs dans le processus de carcinogenèse endométriale et de leur intérêt pronostic. Thèse de doctorat. France, 101p.
- Gross J., Lapière C.M. (1962)- Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **48**:1014–1022.
- Guenec B.P. (2007)- Essai de tolérance du RGTA par injection intra-articulaire chez le cheval. Thèse de doctorat. Faculté de médecine France. 157p.
- Hensen B. (1995)- Proteolytic remodeling of the extracellular matrix. *Curr . Opin. Cell. Biol.* **7**:728–735.
- Hauschild M., Lausanne T.G. (2008)- Le développement de la fonction testiculaire. *Endocrinologie*.**19** (3) : 535–549.
- Herr J.C., Summers T.A., Mc Gree R.S., Sutherland W.M., Sigman M., Evans R.J. (1986)- Characterization of a monoclonal antibody to a conserved epitope en human seminal vesicle specific peptides: a novel probe/marker system for semen identification. *Biol. Reprod.* **35** (3): 773-784.
- Higgins S.J., Burchell J.M., Mainwaring W.I .P. (1976)- Androgen-dependent synthesis of basic secretory proteins by the rat seminal vesicle. *Biochim.J.* **158**: 271-282.
- Huang Y.H., Chu S.T., 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 mobility. *Biochem. J.* **343**: 241-248.
- Hulboy D.L., Rudolph L.A., Matrisian L.M. (1997)- Matrix métalloprotéinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reproduction.* **3** (1) : 27–45.
- Huxley-Jones J., Clarke T. K., Beck C., Toubaris G., Robertson D. L., Boot-Handford R. P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC. Evol. Biol.* **7**: 63.

- Ishikawa T., Harada T., Kubota T., Aso T. (2007)- Testosterone inhibits matrix metalloproteinase-1 production in human endometrial stromal cells in vitro. *Reproduction*. **133**:1233–1239.
- Itoh Y and Seiki M. (2004)- MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation. *Biochemical Sciences*. **29** (6): 1000-1016.
- Izemrne D, (2011)- Etude comparative de deux protéines androgénodépendantes des vésicules séminales chez deux rongeurs désertiques: *Psammomys obesus* et *Meriones libycus*. Thèse de magister, FSB, USTHB. 64p.
- Jeffrey J.J., Gross J.(1970)- Collagénase from rat uterus. Isolation and partial characterization. *Biochemistry*. **9**: 268-273.
- Jeffrey J.J., Coffey R.J., Eisen A.Z. (1971)- Studies on uterine collagénase in tissue culture. Effect of steroid hormones on enzyme production. *Biochim. Biophys. Acta*. **252**: 143-149.
- Justulin L.A., Ureshino R.P., Zanoni M.P., Felisbino S.L. (2006)- Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. *Cell .Biology. International*. **30** :354-364.
- Kaci-Ouchfoun N., Hadj-Bekkouche F., Abdi M.C., Gernigon T. (2008)-Purification, preliminary characterization and immunohistochemical localization of POSVP21 in the sand rat (*Psammomys obesus*) seminal vesicles. *Theriogenology*. **69**: 525-535.
- Kaci-Ouchfoun N., Incamps A., Hadj-Bekkouche F., Abadi M.C., Bellanger L., Gernigon T. (2010)- POSVP21, a major secretory androgen-dependent protein from sand rat seminal vesicles, identified as a transgelin. *Asian J. of Andrology*. **12**: 422-430.
- Kaci-Ouchfoun N., Izemrane D., Boudrissa A., Gernigon T., Khammar F., Exbraya J.M. (2013)- Transgelin : an androgen-dependent protein identified in the seminal vesicle of three saharian rodents. *Theriogenology*. **80** (7): 748-757.
- 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 de doctorat, FSB. USTHB. Alger, 202p.
- 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., A brahamson P.A. (1992)- Protein C inhibitor in human body fluids. Seminal plasma is rich in inhibitor antigenderiving from cells throught the male reproductive system.*J.Clin.Invest.***89**: 1094-1101.
- Le Berre M. (1989)-Faune du Sahara-Mammifères. Edition. Lechevalier-R Chabaut, Paris, collection « Terres africaines ».T.2,332p.
- Lees-Miller J.P., Heeley D.H., Smillie L.B., Kay C.M. (1987)- Isolation and caractreization of an abundant and novel 22-kDa protein (SM22) from chicken gizzard smooth muscles. *J. Bio. Chem.* **262** (7): 2988-2993.
- Li R., Zahng J., Churchill J., Sourial M., Southwell B., Hutson J.M.(2012)-Is matrix metalloproteinase required in postnatal testicular tubules for germ cell maturation?. *J. of Pediatric. Surgery.* **47**: 1724-1729.
- Lilja H et Laurell C.B. (1989)- liquefaction of coagulated human semen. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **44**: 447-452.
- Liotta L.A., Tryggvason K., Garbisa S., Hart I., Foltz C.M., Shafie S. (1980)-Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature.* **284**:67-68.
- Lockwood C.J., Krikun G., Hausknecht V.A., Papp C., Schatz F (1998)- Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal. *Endocrinology.* **139**:4607–4613.
- Lundquist F. (1949)- Studies on the biochemistry of human semen; the viscosimetric determination of hyaluronidase. *Act. Physiol.* **17**:44-45.
- Manes S., Mira E., Barbacid M.M., Cipres A., Fernandez-Resa P., Buesa J.M. (1997)- Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* **272**: 25706-25712.
- Marbaix E., Donnez J., Courtoy P.J., Eeckhout Y. (1992)- Progesterone regulates the activity of collagénase and related gélatinases A and B in human endometrial explants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 11789–11793.
- Marbaix E., Kokorine I., Donnez J., Eeckhout Y., Courtoy P.J. (1996)- Regulation and restricted expression of interstitial collagénase suggest a pivotal role in the initiation of menstruation. *Hum. Reprod.* **11**:134–143.

- Mardh P.A et Collen S. (1975)- Antimicrobial activity of human seminal fluid. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **9**: 17-23.
- Mataoui I. (1999)-Effet de la castration sur le tractus génital mâle et sur l'activité thyroïdienne chez trois rongeurs saharien : le Mérion (*Meriones libycus*), la Gerbille (*Gerbillus gerbillus*) et le rat des sables (*Psammomys obesus*). Thèse de Magister. ENS. Kouba, Alger, 86p.
- Matrbian L.M. (1990) - Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Elsevier Science Publishers.* **6** (4) : 9479- 9490.
- McNeal J.E. (1988) -Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* **12**(8): 619-633.
- Menad R., Smaï S., Moudilou E., Khammar F, Exbrayat J.M., Gernigon-Spychalowicz T. (2013)- Immunolocalization of estrogen and androgen receptors in the caputepididymidis of the fat sand rat (*Psammomys obesus*): Effects of seasonal variations, castration and efferent duct ligation. *ScienceDirect*. Article in presse.
- Min-Long L., Shun-Wen., Yee-Hsiung C. (1991)- Purification and characterization of a trypsin inhibitor for Mouse Seminal Vesicle Secretion. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **290**: 265-271.
- Muller M., Trocme C., Lardy B. (2008)- Matrix métalloprotéinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med* . **25**(4): 419-426.
- Murphy G., Unsworth E., Stetler-Stevenson W. (1993)-Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J. Cell. Physiol.* **157**:351-358.
- Murphy G., Stanton H., Cowell S., Butler G., Knauper V., Atkinson S. (1999)- Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation . *AP-MIS.* **107**:38-44.
- Nabeshima K., Lane W., Biswas C.(1991)- Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagénase stimulatory factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **285**:90-96.
- Nagase H and Woessner J.F. (1999)- Matrix Métalloprotéinases. *J. Biol. Chem.* **274**:21491-21494.

- Nelson A.R., Fingleton B., Rothenberg M.L., and Matrisian L.M.(2000)- Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.***18**:1135-1149.
- Okada Y., Watanabe S., Nakanishi I., Kishi J., Hayakawa T., Watorek W., Travis J., Nagase H. (1988)- Inactivation of tissue inhibitor of métalloprotéinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS. Lett.* **229**:157–160.
- Omachi T.A., Eisner M., Rames A., Markovtsova L., Blanc P.D. (2011)- Matrix metalloproteinase-9 predicts pulmonary status declines in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells Corina Vater. *Acta Biomaterialia.* **7**: 463–477.
- Osteen K.G., Bruner-Tran K.L., Ong D.E., Eisenberg E. (2002)- Progesterone or retinoic acid treatment of human endometrial tissue reduces basal cytokine-stimulated MMP expression and increases TIMP-1 secretion. *Biol. Reprod.* **62** (11):230.
- Overall C., Wrana J., Sodek J. (1991)- Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF-beta 1 and concanavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. *J Periodontal Res.* **26**:279-82.
- Paquigon M., Dacheux J.L., Jeulin C ., Fauquenot A. (1982)- The sperm cell. *Ed. J. Anddré.* 332-335.
- Parlevliet J.M., Pearl C.A., Hess M.F., Famula T.R., Roser J.F.(2006)- Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. *Theriogenology.* **66**:755–65.
- Parsons S.L., Watson S.A, Brown P.D., Collins H.M., Steele R.J. (1997)- Matrix métalloprotéinases *Br. J. Surg.* **84**:160-166.
- Pearl C.A., Berger T., Roser J.F.(2007)- Estrogen and androgen receptor expression in relation to steroid concentrations in the adult board epididymis. *Domest Anim Endocrinol.* **33**:451–9.
- Petter F. (1951)- Contribution à l'étude du genre *Psammomys* Cretzchmar (Rongeurs Muridés). *Mammalia.* **15** :39.

- Petter F. (1961)- Répartition géographique et écologie des Rongeurs désertiques (du Sahara occidental à l'Iran oriental). *Mammalia*. **25** : 1-222.
- Petter F. (1974)- Facteurs de répartition des Rongeurs sahariens et présahariens. *Symposium Israel-France* du 11-14.3.1974. Article sous presse.
- Pirilä J.T., Korkiamäki. (2007)- Collagenase-2 (MMP-8) and matrilysin-2 (MMP-26) expression in human wounds of different etiologies. *Wound Repair Regen*. **15** (1): 47-57.
- Reitmeir R., Kilic E., Reinboth B.S., Guo Z., ElAli A., Zechariah A., Kilic U., Hermann D.M. (2012)- Vascular endothelial growth factor induces contralesional corticobulbar plasticity and functional neurological recovery in the ischemic brain. *Acta Neuropathol*. **123**: 273-284.
- Risbridger G., Taylor R.A. (2006)- Physiology of the male accessory sex structures: The prostate Gland, Seminal vesicles, and Bulbourethral Glands. *Physiology of Reproduction*. **23**: 1149-1166.
- Rothhut B., Ghoneim C., Antonicelli F., Rothhut M.S. (2007)- Epidermal growth factor stimulates matrix metalloproteinase-9 expression and invasion in human follicular thyroid carcinoma cells through Focal adhesion kinase. *Biochimie*. **89** : 613-624.
- Ruokolainen H., Pääkkö P and Turpeenniemi-Hujanen T. (2005)- Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 Is Prognostic in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Comparison of the Circulating and Tissue Immunoreactive Protein. *Clin. Cancer. Res*. **11**:3257-3264.
- Sabah N. (2007)- Influence de l'apoptotéine a sur les fonctions inflammatoires des monocytes dans un modèle in vitro, interaction avec le collagène de type I. Thèse de doctorat France. 186p.
- Salamonsen L.A., Butt A., Hammond F.R., Garcia S., Zhang J. (1997)- Production of endometrial matrix métalloprotéinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an *in vitro* model for menstruation. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **82**:1409–1415.
- Schiessler H., Arnhold M., Ohlsson K., Fritz H. (1976)- Inhibitors of acrosin and granulocyte proteinases from human genital tract secretions. *Hoppe- Seyler.Physiol. Chem*. **357**:1251–1260.

- Schultz R.M, Silberman S., Persky B., Bajkowski A.S., Carmichael D.F. (1988)- Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of métalloprotéinases of human amnion invasion and lung invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer. Res.* **48**:5539-5545.
- Schulze C. (1984)- Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* **88**: 1-104.
- Schusterbauer C.M. (2008)- Modulation du TGF- $\beta$ 1 messenger dans les monocytes/macrophages par contact avec les lymphocytes T. Thèse de doctorat, université de médecine. France. 79p.
- Sherins R.J., Loriaux D.L. (1973)- Studies of the role of sex steroids in the feedback control of FSH concentrations in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **36**: 886-893.
- Sternlicht M.D., Coussens L.M., Vu T.H., Werb Z. (2001)- Biology and regulation of the matrix métalloprotéinases. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Humana Press.*
- Stetler-Stevenson W.G., Krutzsch H.C., Liotta L.A. (1989)- Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP-2). *J. of Biological chle Mistry.* **264**(29): 17374-17378.
- Tauber P.F., Zaneveld L.J.D., Propping D., Schumacher G.F.B (1975)- Component of humain split ejaculates. Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, lactoferrine, transferring and other plasma proteins. *J. Repro. Fertil.* **43** : 249-267.
- Tostain J., D. Rossi, P.M Martin. (2004)- Physiologie des androgènes chez l'homme adulte. *Prog. Urol.* **14** (5) : 639-660.
- Toth M., Gervasi D.C., Fridman R. (1997)- Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells. *Cancer.Res.* **57**:3159-3167.
- Tutton M.G., M.L., George., Eccles S.A., Burton S., Swift R.I., Abulaf A.M. (2003) –Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumor expression in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer.* **107**: 541–550
- Tyagi S.C. (1997)- Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. *Mol.Cell. Biochem.* **168**:1-12.

- Ulisse, S., Farina, A.R., Piersanti, D. (1994) Follicle-stimulating hormone TIMP-1 and TIMP-2 and induces TIMP-1 AP-1 site binding complex(es) in prepubertal rat Sertoli cells. *Endocrinology*. 2479–2487.
- Van Wart H., Birkedal-Hansen H. (1990)- The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A*. **87**:5578-5582.
- Vargo-Gogola T., Fingleton B., Crawford H.C., Matrisian L.M.(2002)- Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) selects for apoptosis-resistant mammary cells in vivo. *Cancer.Res.* **62**:5556-5559.
- Verma R., Hansch C. (2007)- Matrix métalloprotéinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.**15**:2223-2268.
- Viennois E. (2011)- Impact d'une invalidation de LXR $\alpha$  sur la physiologie prostatique : un dialogue avec la signalisation androgénique. Thèse de doctorat Spécialité. Paris 100p.
- Visse R., H. (2003)-Matrix métalloprotéinases and tissue inhibitors of métalloprotéinases structure, function and biochemistry. *Circ. Res.* **92**:827-839.
- Weber J.E., Russell L.D., Wong V., Peterson R.N. (1983)- Tree-dimension reconstruction of a rat V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell relationships. *Am.J.Anat.***167** (2): 163-179.
- Wilson M.J., Garcia B., Woodson M., Sinha A. (1992)- Metalloproteinase Activities Expressed during Development and Maturation of the Rat Prostatic Complex and Seminal Vesicles. *Biological of reproduction* **47** : 683-691.
- Wong P.Y.(1988)- Control of anion and fluid secretion by apical P2 purinoceptor in the rat epididymis. *Br. J. pharm acol.* **95**: 1315-1321.
- Woessner JF. (1991)- Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J.* **5**:2145-2154.
- Wysocki A.B., Staiano-Coico L., Grinnell F. (1993)- Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of métalloprotéinases MMP-2 and MMP-9. *J. Invest. Dermatol .* **101**(1): 64-68.
- Yeh S., Change C. (1996)- Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5517-5521.

- Yilmaz A., Bilge I., Kiyak A. (2012)- Matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in vesicoureteral reflux. *Pediatr Nephro.* **27**: 435-441.
- Zaime A., Laraki M., Gautier J.Y. and Garnier D.H. (1992)- Seasonal variations of androgens and of several sexual parameters in male *Mériones shawi* in southern Morocco. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86**: 289-96.
- Zhang X., Healy C., Nothnick W.B. (2012)- Estrogen suppression expression of matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) within the mouse uterus. *Endocrinology.* **42**: 97- 106.
- Zhou J., Lu X., Hua K.Q., Sun H., Hua Y., Feng Y.J. (2012)- Oestrogen receptor  $\alpha$  mediates  $17\beta$ -estradiol enhancement of ovarian cancer cell motility through up-regulation of surviving expression. *Arch. Gynecol.* **286**: 729-737.
- Zhu L.J., Hardy M.P., Inigo I.V., Huhtaniemi I., Bardin C.W., Young A.J.M. (2000)- Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohisto-chemical study. *Biol Reprod.* **63**:368–76.

# Annexes

## Annexe I

### Tampon d'extraction des protéines (Tampon A)

#### 1. Tampon Brooks (pH 7.4)

- Tris Base 25mM
- Saccharose 0.25mM
- Mg Cl<sub>2</sub> 3mM

Le pH de la solution est ajusté à l'aide d'une solution HCl 3M.

Le tampon Brooks se conserve à +4°C.

#### 2. Solution de PMSF

- PMSF 0.5mM
- Ethanol 2.5ml

Le PMSF de nature hydrophobe doit être dilué dans de l'éthanol.

Le tampon est préparé extemporanément par mélange de 10 ml de tampon brooks + 0.25µl de solution PMSF.

## Annexe II

### Dosage des protéines

#### 1. Tampon PBS (pH 7.4)

- NaCl 137mM
- KCl 2.5mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM

La solution se conserve à +4°C, pendant un mois au maximum.

#### 2. Réactif de Bradford

- Ethanol 95% 50ml
- Acide orthophosphorique (85%) 100ml
- Bleu de Coomassie G250 100mg
- Eau distillée qsp 1000ml

La solution se conserve à +4°C pendant trois mois au maximum

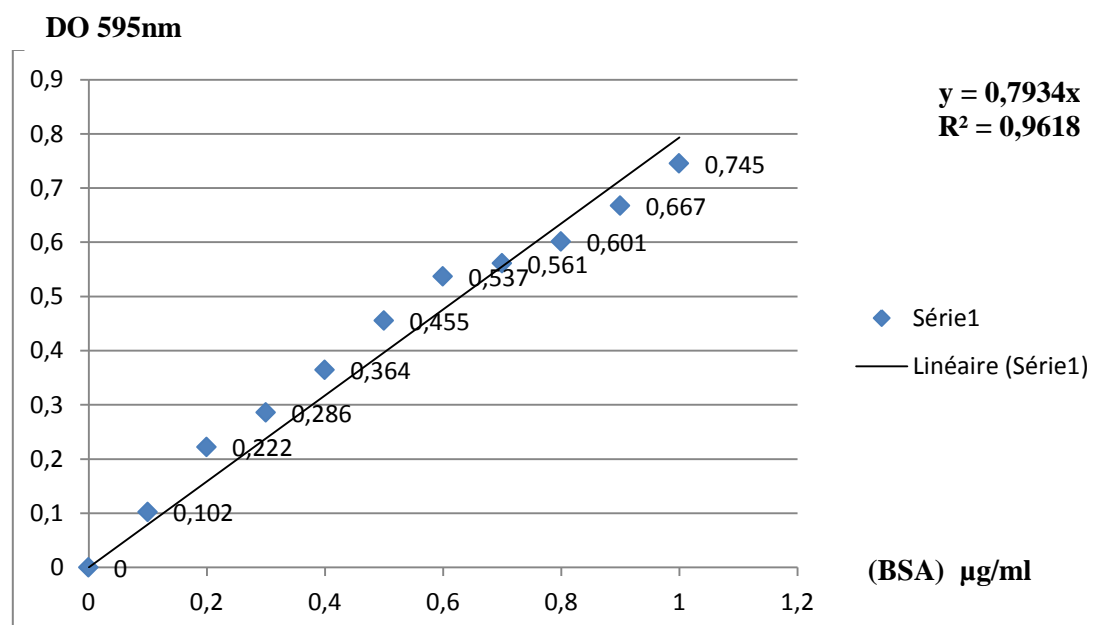
## Annexe III

### Dosage des protéines : courbe étalon

La courbe est réalisée à partir des différentes dilutions de BSA issues d'une solution mère à 10%.

Pour la détermination de la concentration protéique des échantillons, différentes dilutions allant du 1/5 au 1/50 sont réalisés.

Tube	PBS (µl)	BSA (µl) :	Bradford (ml)	DO (à 595 nm):
0	100	0	3	0
1	90	10	3	0.102
2	80	20	3	0.222
3	70	30	3	0.286
4	60	40	3	0.364
5	50	50	3	0.455
6	40	60	3	0.537
7	30	70	3	0.561
8	20	80	3	0.601
9	10	90	3	0.667
10	0	100	3	0.745



**Courbe étalon DO 595nm = f(BSA)**

La concentration des protéines solubles est déterminée à partir de l'équation de la courbe :  
**Y=0.7934X**

**Y : Absorbance (nm).**

**X : Concentration en protéines (µg/µl).**

## Annexe IV

**Tableau récapitulatif des échantillons utilisés**

<b>Espèce</b>	<b>Poids de l'animal (g)</b>	<b>Période du cycle reproducteur</b>	<b>Organes prélevés</b>	<b>Poids de l'organe (g)</b>	<b>Concentration protéines solubles (g/l)</b>
<i>Psammomys obesus</i>	134.5	repos sexuel	VS	0.181	2.5
	130		EP	0.30	2
<i>Psammomys obesus</i>	131	reproduction	VS	0.355	2.8
			EP	0.52	1.45
	138		VS	0.3	2
			EP	0.55	1.3
	90		VS	0.21	1.9
			EP	0.42	1.21
<i>Meriones libycus</i>	77.6	repos sexuel	VS	0.514	1.7
			EPP	0.296	3
	EPD		0.262	2.5	
	101		VS	0.62	1.9
EPP		0.33	3.4		
<i>Meriones libycus</i>	102.82	reproduction	EPD	0.36	3.1
			VS	0.119	2.6
			EPP	0.162	3.2
<i>Meriones shawi</i>	78.9	reproduction	EPD	0.117	4
			VS	0.102	2
			EPP	0.176	2.8
<i>Rattus norvegicus</i>	180.9 (de 72j)	reproduction annuelle	EPD	0.11	2.5
			VS	0.18	2.1
<i>Mus musculus (NOD)</i>	39.8 (de 55j)	reproduction annuelle	VS	0.12	1

VS : vésicule séminale

EPP : épидидyme proximal

EPD : épидидyme distal

## Annexe V

### Electrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

#### 1. Tampon de dénaturation ou tampon de charge Laemmli

- Saccharose 2g
- Bleu de bromophénol 0.25g
- SDS 1.15g
- $\beta$ -mercaptoéthanol 0.1%
- Eau distillée qsp 25ml

#### 2. Tampon de migration (pH 8.3)

- Glycine 192mM
- SDS 0.1%
- Tris Base 25mM

Conservation à +4°C, durée limitée.

#### 3. Solution de coloration

- Méthanol 50%
- éthanol 10%
- Acide acétique 10%
- Bleu de Coomassie R250 (0.25M) 0.25%
- Eau distillée 30%

Conservation à température ambiante.

#### 4. Solution de décoloration

- Méthanol 40%
- Ethanol 10%
- Acide acétique 10%
- Eau distillée 40%

Conservation à température ambiante.

## Annexe VI

### Zymographie en gel de gélatine

#### 1. Solution de gélatine à 10%

La solution est préparé en mélangeant 0,1g gélatine dans un 1ml d'eau distillée, la solution est chauffée à +37°C, aliquotée est conservée à -20°C.

Les aliquotes sont utilisées au moment de l'emploi après chauffage à +30°C pendant 30min.

#### 2. Tampon de dénaturation ou tampon de charge (Laemmli)

- Saccharose 2g
- Bleu de bromophénol 0.25g
- SDS 1.15g
- Eau distillée qsp 25ml

#### 3. Tampon de migration (pH 8.3)

- Glycine 192mM
- SDS 0.1%
- Tris Base 25mM

#### 4. Tampon d'incubation (pH 7.4)

- Tris Hcl 50mM
- CaCl<sub>2</sub> 5mM
- Triton X-100 0.02%
- Eau distillée 100ml

La solution est préparée extemporanément.

#### 5. Solution de coloration

- Méthanol 50%
- éthanol 10%
- Acide acétique 10%
- Bleu de Coomassie G250 (0.25M) 0.25%
- Eau désilée qsp 30%

Conservation à température ambiante.

**6. Solution de décoloration**

- Méthanol 40%
- Ethanol 10%
- Acide acétique 10%
- Eau distillée 40%
- Conservation à température ambiante.