

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb, Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie des Populations et des Organismes



Mémoire de Fin d'Études en vue de l'Obtention du Diplôme de Master II

En Sciences de la Nature et de la Vie

Option : *Biologie et physiologie de la reproduction*

Thème :

**Histologie de l'appareil génital mâle de cheval  
« *Equus caballus* » et sa position dans l'arbre  
phylogénétique**

Date de la soutenance : 09/09/2018

Présenté par :

*M<sup>elle</sup> BOUSSAIDANE Bahia*

&

*M<sup>elle</sup> SAYAHOUI Hadjer*

Jury de soutenance :

*M<sup>me</sup> Chaichi W*

*MCB*

*USD Blida 1*

*Présidente*

*M<sup>me</sup> SAYAD M*

*MCA*

*USD Blida 1*

*Examinatrice*

*M<sup>me</sup> DEROUICH L*

*MCB*

*EPSNV*

*Promotrice*

*M<sup>elle</sup> ZATRA Y*

*MAA*

*USD Blida 1*

*Co-promotrice*

Promotion : 2017 – 2018

# Remerciements

*Nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience ainsi que la force afin de réaliser ce travail.*

*Tous nos remerciements et notre profonde gratitude à Notre promotrice Mme DEROUICHE .L Maitre de Conférence A à l'École préparatoire en sciences de la nature et de la vie –Alger Pour son dévouement incomparable, son orientation scientifique son encadrement et pour la confiance qu'elle nous accordé pour mener à bien ce travail.*

*Et*

*Notre Co-promotrice M elle ZATRA .Y Maitre de Conférences B au département de biologie Pour son encadrement, aide, encouragement et la sympathie qu'elle nous a montrée et grâce à ces conseils que nous avons pu terminer et compléter notre mémoire*

*J'adresse également mes vifs remerciements à tous les membres du jury :*

***Mme Chaïchi .W:** Maitre de Conférences B, qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.*

***Mme SAYAD.M:** Maitre de Conférences B, à la faculté des sciences biologiques Blida 1, qui a eu l'amabilité d'examiner ce travail en participant au jury. Qu'elle soit vivement remerciée pour toutes les critiques constructives qu'elle ne manquera pas d'apporter.*

*Aussi, je remercie vivement tous les enseignants et les enseignantes du Département Biologie des Populations et des Organismes qui nous ont enseigné durant notre cursus universitaire,*

*Mes profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu de près ou de loin ...*

*A vous tous, un grand Merci.*

# Dédicace

*Je dédie ce mémoire*

*Pour ceux qui m'ont mis au monde, pour qui et pour quoi je vive sont en ayant à l'esprit une grande reconnaissance à tout ce qu'ils ont sacrifié pour moi de leur temps et de leur vie ;*

*Mon cher père qui m'a été d'un grand appui et soutiens moral et matériel,*

*Ma chère maman qui malgré les difficultés de la vie quotidienne m'a été d'un grand secours moral par ses encouragement*

*Ainsi que mon oncle qui n'a pas hésité à m'aider par ses conseils et orientations dans toute ma démarche,*

*Mes frères :*

*RADHOUANE, FOUAD et AYMEN et ma sœur DJAMILA, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*Mon binôme BAHIA à qui je souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.*

*Toutes mes amies en particulier : HASNAA, KARIMA, AMIRA, ZHIRA KHAWLA ET RANIA.*

*Toutes les étudiantes de l'option Biologie et physiologie promotion 2017.*

*A toutes ces personnes que je remercie de toute mes amis, je garderais cette précieuse aide comme étant non seulement comme un couronnement de fruit d'études mais comme un stimulant pour le reste de ma vie tous entière.*

**HADJER**

# Dédicace

*Je dédie ce mémoire à*

*Mes très chers parents*

*qui sont toujours dans cœur, qui ont consacré leur vie à mon éducation et ma réussite, qui m'ont encouragé dans les moments les plus difficiles de ma vie.*

*Que Dieu les garde et les protège pour nous.*

*Mes sœurs :*

*MBARKA, HASSIBA, SAIDA ET F. ZAHRA.*

*Mes frères :*

*ABDE ELRAHMEN, RABEH ET MOSTAFA.*

*Fils de mes frères et sœurs :*

*YOUCEF, ZAID, ASMAA, KHAWLA, MARIA, CHAIMA, MOAAD, ISHAK,  
ARWA, RITAJ ABDE ELLAHE, HADJER, SALSABIL.*

*Mon fiancé ZAKI et sa famille.*

*Toutes mes amies en particulier : DJAMILA, AMINA, CHAIMAA, KARIMA, AMIRA,  
ZHIRA KHAWLA ET RANIA.*

*Mon binôme HADJER à qui je souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.*

*Toutes les étudiantes de l'option Biologie et physiologie promotion 2017.*

*Tous ceux qui m'aiment et que j'aime.*

**BAHIA**

## *Liste des abréviations*

---

- **ADN**: Acide **D**éoxyribo Nucléique.
- **ADNmt** : Acide **D**éoxyribo Nucléique **m**itochondrial.
- **cyt b** : cytochrome **b**.
- **DAMBE**: **D**ata **A**nalysis in **M**olecular **B**iology and **E**volution.
- **DDBJ**: **D**NA **D**ata **B**ank of **J**apan
- **DnaSP**: **D**NA **S**equence **P**olymorphism.
- **D-loop** : **D**isplacement-loop.
- **EMBL**: **E**uropean **M**olecular **B**iology **L**aboratory.
- **FSH** : **F**ollicle **S**timulating **H**ormone.
- **GnRH** : **G**onadotrophine **R**eleasing **H**ormone.
- **LH** : **L**uteinizing **H**ormone.
- **MEGA**: **M**olecular **E**volutionary **G**enetics **A**nalysis using **M**aximum **L**ikelihood.
- **NCBI** : **N**ational **C**enter for **B**iotechnology **I**nformation.
- **PCR** : **P**olymerase **C**hain **R**eaction / **R**éaction de polymérisation en chaîne.
- **Sp** : **S**permatozoïde.
- **UPGMA**: **U**nweighted **P**air-**G**roup **M**ethod using **A**rithmetic **A**verages.

## Liste des figures

Numéro	Titre	page
<b>Figure 1</b>	Cheval domestique <i>Equus caballus</i> (Originale, 2018).	<b>3</b>
<b>Figure 2</b>	Anatomie du cheval (Malone, 1980).	<b>4</b>
<b>Figure 3</b>	Âne <i>Equus asinus</i> (Originale, 2018).	<b>5</b>
<b>Figure 4</b>	Représentation schématique des particularités anatomiques de l'âne (Roset, 2004).	<b>6</b>
<b>Figure 5</b>	Mulet (Originale, 2018).	<b>7</b>
<b>Figure 6</b>	Répartition géographique initiale des 7 espèces d'équidés sauvages (Short, 1975).	<b>7</b>
<b>Figure 7</b>	Dessin du tractus reproductif de cheval vu en coupe sagittale (Pickett, 1989).	<b>8</b>
<b>Figure 8</b>	Représentation schématique des enveloppes testiculaires (Barone, 2001).	<b>10</b>
<b>Figure 9</b>	Testicule et épидидyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité (Barone, 2001).	<b>11</b>
<b>Figure 10</b>	Schéma montrant le testicule, l'épididyme et la portion intra-scrotale du déférent (Mills, 2007).	<b>12</b>
<b>Figure 11</b>	Coupe histologique montrant des tubes séminifères (T) bordés par l'épithélium germinal et délimité par la tunicapropria. Au niveau de l'interstitiel on trouve des vaisseaux et des cellules de Leydig (L) (Stevens et Lowe, 1997).	<b>13</b>
<b>Figure 12</b>	Photographies d'une coupe histologique de tube séminifère d'un testicule d'un étalon âgé de sept ans au grossissement x20 (a) et x40 (b) (Mylène, 2015).	<b>14</b>
<b>Figure 13</b>	Cellule de sertoli ME x3400 (Weather, 2006).	<b>14</b>
<b>Figure 14</b>	Coupe histologique montrant une cellule de Leydig au niveau de l'interstitiel testiculaire (Mills, 2007).	<b>15</b>
<b>Figure 15</b>	Schéma de la conformation interne du testicule et de l'épididyme (Barone, 1956).	<b>16</b>
<b>Figure 16</b>	Schéma de l'aspect médial du canal déférent droit de cheval (Barone, 2001).	<b>17</b>
<b>Figure 17</b>	Coupe transversale du canal déférent du cheval (Grau et Walter, 1975).	<b>17</b>
<b>Figure 18</b>	Schéma de l'aspect médial de l'urètre droit du cheval (Barone, 2001).	<b>18</b>
<b>Figure 19</b>	Partie libre du pénis et prépuce du cheval (Constantinescu, 2010).	<b>19</b>
<b>Figure 20 a</b>	Coupe transversale du pénis du cheval, au niveau de la partie moyenne du pénis (Barone, 2001).	<b>20</b>
<b>Figure 20 b</b>	Coupe transversale du pénis du Cheval, en arrière de la couronne du gland (le gland isolé est vu par derrière) (Barone, 2001).	<b>20</b>
<b>Figure 21</b>	Étapes de la spermatogénèse (Amann, 2011)	<b>22</b>
<b>Figure 22</b>	Schéma de la régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez le cheval (Amann, 2011).	<b>23</b>
<b>Figure 23</b>	Spermatocytes de cheval, mulet et bardot au stade pachytène de prophase de méiose B (Chandley et al., 1975).	<b>25</b>
<b>Figure 24</b>	Exemple d'un arbre phylogénétique.	<b>28</b>
<b>Figure 25</b>	Dessin illustre la réalisation des coupes au niveau de testicule et du pénis dans	<b>31</b>

## Liste des figures

	le sens des aiguilles d'une montre.	
<b>Figure 26</b>	photos représente la capture d'une image d'aspect histologique par un appareil photo numérique (HiROCAM, MA88-500, BME lab and Science, St. Paul, USA) connecté à un microscope photonique (Optika B 235, Italie) via le logiciel TS View	<b>34</b>
<b>Figure 27</b>	Méthode de mesure des surfaces de tube séminifère (exemple délimité par le tracé rouge) à l'aide du logiciel Axio Vision 4.6.3.0.	<b>35</b>
<b>Figure 28</b>	la page d'accueil de la GenBank	<b>38</b>
<b>Figure 29</b>	Représente les étapes initiales pour récupérer les séquences de la GenBank	<b>38</b>
<b>Figure 30</b>	taxonomie de l'espèce d' <i>Equus</i> .	<b>39</b>
<b>Figure 31 a</b>	Donnée globale disponible sur le genre <i>Equus</i> selon la Genbank (gène, protéine)	<b>39</b>
<b>Figure 31 b</b>	Les données disponibles sur la GenBank concernant les espèces	<b>40</b>
<b>Figure 32</b>	Format FASTA ont été téléchargé à partir de la Genbank.	<b>40</b>
<b>Figure 33</b>	Représente le logiciel de MEGA5.	<b>41</b>
<b>Figure 34</b>	Barre d'outils du logiciel MEGA version 5.	<b>42</b>
<b>Figure 35</b>	Le programme ClustalW utilisé pour l'alignement multiple des séquences du marqueur moléculaire choisi	<b>42</b>
<b>Figure 36</b>	La méthode UPGMA utilisée pour la construction de l'arbre phylogénétique	<b>43</b>
<b>Figure 37</b>	Les paramètres utilisés pour la reconstruction phylogénétique.	<b>43</b>
<b>Figure 38</b>	Appareil génital mâle, a : cheval ; b : mulet	<b>44</b>
<b>Figure 39</b>	Morphologie des trois testicules des équidés	<b>45</b>
<b>Figure 40</b>	Morphologie deux testicules des équidés cheval mulet	<b>45</b>
<b>Figure 41</b>	Représente la coupe longitudinale et transversale de testicule.	<b>46</b>
<b>Figure 42</b>	Aspect structural du tube séminifère chez les trois animaux étudiés colorée par hématoxyline éosine et observer au microscope photonique à G×10	<b>47</b>
<b>Figure 43</b>	Variation de la surface du tube séminifère (A) de la surface de la lumière séminifère(B) chez le cheval, l'âne et mulet.	<b>48</b>
<b>Figure 44</b>	Aspect structural du tube séminifère coloré à Hématoxyline Éosine chez les trois espèces et observée au microscope photonique au G×40.	<b>49</b>
<b>Figure 45</b>	Aspect structural du tube séminifère coloré au trichrome de Masson, chez les trois espèces, observée au microscope photonique au G×40	<b>49</b>
<b>Figure 46</b>	Aspect structural du tube séminifère chez les trois espèces colorées à l'hématoxyline Éosine observé au microscope photonique à G×100,	<b>50</b>

## *Liste des figures*

<b>Figure 47</b>	Aspect structural du Cellule de Leydig chez les trois animaux étudié colorée au Rouge congo et observé au microscope photonique au G×100	<b>50</b>
<b>Figure 48</b>	Représente les coupes transversales et la coupe longitudinale de l'épididyme	<b>52</b>
<b>Figure 49</b>	: Aspect structural du l'épididyme chez les trois animaux étudiés colorée par Trichrome de Masson (TM) et observer au microscope photonique à G×4	<b>53</b>
<b>Figure 50</b>	Morphométrie d'épididyme chez les trois espèces.	<b>54</b>
<b>Figure 51</b>	Aspect structural du l'épididyme chez les trois animaux étudiés colorée par hématoxyline éosine (HE) et observer au microscope photonique à G×40	<b>55</b>
<b>Figure 52</b>	La hauteur de l'épithélium des épididymes (A), la hauteur supra noyau des épididymes (B), des 3 espèces étudiées.	<b>56</b>
<b>Figure 53</b>	Aspect structural du l'épididyme chez les trois animaux étudiés colorée par hématoxyline éosine (HE) et observer au forte grossissement G×100.	<b>57</b>
<b>Figure 54</b>	Représente les coupes transversales et la coupe longitudinale de canal déférent.	<b>58</b>
<b>Figure 55</b>	: Aspect structural du canal déférent chez les trois animaux étudiés colorée par rouge congo et observer au microscope photonique à G×4.	<b>59</b>
<b>Figure 56</b>	Morphométrie de canal déférent chez les trois espèces. <b>A</b> ; la surface de canal, <b>B</b> ; la surface de la lumière de canal	<b>60</b>
<b>Figure 57</b>	Aspect structural de canal déférent chez les trois animaux étudiés colorée par hématoxyline éosine (HE) et observer au microscope photonique à G×10	<b>61</b>
<b>Figure 58</b>	Morphométrie de la longueur de l'invagination de canal déférent chez les trois espèces.	<b>62</b>
<b>Figure 59</b>	Aspect structural du canal déférent chez les trois animaux étudiés colorée par Trichrome de Masson et observer au microscope photonique à G×40	<b>63</b>
<b>Figure 60</b>	: Coupe histologique longitudinale au niveau de canale déférent montre des spermatozoides dans la lumière colorée par rouge congo et observer sous microscope photonique à G×100	<b>64</b>
<b>Figure 61</b>	: Représente les coupes transversales de pénis du cheval.	<b>65</b>
<b>Figure 62</b>	: Aspect structural du pénis chez le cheval au niveau de corps caverneux colorée au l'hématoxyline Éosine et observé au microscope photonique à G×4.	<b>65</b>
<b>Figure 63</b>	: Aspect structural du pénis chez le cheval au niveau de corps caverneux colorée au trichrome de Masson et observé au microscope photonique à G4,	<b>66</b>
<b>Figure 64</b>	: Aspect structural du pénis chez le cheval au niveau de corps spongieux colorée au l'hématoxyline Éosine et observé au microscope photonique à G×4	<b>66</b>
<b>Figure 65</b>	: Aspect structural du muscle lisse striés au niveau de corps spongieux du pénis chez le cheval colorée par rouge congo et observer au microscope photonique à G×40,	<b>67</b>
<b>Figure 66</b>	: Aspect structural au niveau de corps spongieux à la partie proximal du pénis	<b>67</b>

## Liste des figures

---

	chez le cheval colorée au trichrome de Masson et observé au microscope photonique au G×10	
<b>Figure 67</b>	: La position de <i>cytb</i> dans l'ADN mitochondrial (Reddy, 2011)	<b>70</b>
<b>Figure 68</b>	: Arbre UPGMA basée sur des données morphologiques de 37 espèces de genre <i>Equus</i>	<b>72</b>

## Liste des tableaux

Numéro	Titre	page
<b>Tableau I</b>	Représente le nombre des échantillons	<b>31</b>
<b>Tableau II</b>	Représente les différentes tailles de testicule, épидидyme et l'âge des animaux	<b>45</b>
<b>Tableau III</b>	Représente le poids des testicules droit et gauche chez le cheval et mulet.	<b>46</b>
<b>Tableau IV</b>	Les gènes nucléaires extraits de la GenBank pour le genre <i>Equus</i>	<b>68</b>
<b>Tableau V</b>	Les gènes mitochondriaux extraits de la GenBank pour le genre <i>Equus</i>	<b>69</b>
<b>Tableau VI</b>	Les données du logiciel Axion version 4.6.3.0 dans l'étude morphométrique	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau VII</b>	Variation Morphométrique tissulaire des Tubes séminifères (surface) chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau VIII</b>	Variation Morphométrique tissulaire des Tubes séminifères (lumière) chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau IX</b>	Variation morphométrique de la surface des épидидymes chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau X</b>	Variation morphométrique de la lumière des épидидymes chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XI</b>	La variation morphométrique de la hauteur de l'épithélium des épидидymes et la hauteur supra noyau des épидидymes, chez 3 espèces étudiées <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XII</b>	Variation morphométrique de la surface du canal déférent chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XIII</b>	Variation morphométrique de la lumière du canal déférent chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XIV</b>	Variation morphométrique de la longueur des invaginations du canal déférent chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XV</b>	Variation testiculaire, chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i> , différences en pourcentage et signification	<b>Annexe II</b>

## Liste des tableaux

	statistique des différences	
<b>Tableau XVI</b>	Variation de la lumière des testicules, chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i> , différences en pourcentage et signification statistique des différences	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XVII</b>	Variation de la surface des épидидymes, chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i> , différences en pourcentage et signification statistique des différences	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XVIII</b>	Variation de la lumière des épидидymes, chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i> , différences en pourcentage et signification statistique des différences	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XIX</b>	Variation de la surface du canal déférent, chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i> , différences en pourcentage et signification statistique des différences	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XX</b>	Variation de la lumière du canal déférent, chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i> , différences en pourcentage et signification statistique des différences	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XXI</b>	La variation de la hauteur de l'épithélium des épидидymes, chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i> , différences en pourcentage et signification statistique des différences	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XXII</b>	La variation de la hauteur supra noyau des épидидymes, chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i> , différences en pourcentage et signification statistique des différences	<b>Annexe II</b>
<b>Tableau XXIII</b>	La variation de la longueur des invaginations, chez <i>Equus caballus</i> , <i>Equus asinus</i> et <i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i> , différences en pourcentage et signification statistique des différences	<b>Annexe II</b>

# Résumé

L'objectif de notre travail est basé sur trois éléments : le premier élément réside sur le positionnement de notre espèce *Equus caballus* par rapport aux autres espèces du genre *Equus* dans un arbre phylogénétique. Le deuxième élément réside sur la comparaison histologique et morphométrique de l'appareil reproducteur mâle de : *Equus caballus*, *Equus asinus* et *Equus caballus* × *Equus asinus*.

Les appareils de reproduction de *Equus caballus* et *Equus caballus* × *Equus asinus* ont été récupérés entre le mois de mars et avril 2018 à l'abattoir EL HARRACH, willaya d'Alger alors que celle de *Equus asinus* a été récupéré le mois de mai 2018 à l'unité zoologique et botanique (parc de Ben Aknoun) willaya d'Alger. L'arbre phylogénétique obtenu dans ce travail a été élaboré à l'aide du logiciel MEGA5 avec la méthode UPGMA à partir de 37 séquences de cytb de l'ADNmt de 8 espèces qui appartiennent au genre *Equus* prises dans différentes régions géographiques.

Nous avons commencé par une étude morphologique réalisée sur les différents organes de l'appareil reproducteur chez les trois espèces étudiées, puis une étude histologiques réalisée sur ces organes qui sont fixés au formol à 10% ; les colorations réalisées dans ce travail sont l'Hémalun éosine, le trichrome de Masson, et le rouge Congo.

L'ensemble des résultats phylogénétique nous ont permis de caractériser d'une part les espèces les plus proches à notre modèle d'étude (*Equus asinus* et *Equus caballus* × *Equus asinus*) et d'autre part les espèces sœurs (cas de complexe : (*E. Zebra* / *E. grevyi*)). Les résultats histologiques montrent une similitude entre les trois espèces pour le testicule, l'épididyme et le canal déférent sur le plan structural, la différence se présente sur les données morphométriques, ces derniers sont plus volumineux chez *Equus caballus* et *Equus asinus* que *Equus caballus* × *Equus asinus*, les différences sont statistiquement hautement significatives pour la surface des tubes séminifères et pour l'épididyme. Nous avons trouvé que le pénis du cheval est formé par deux types de tissu érectile, chaque type possède deux types de muscle.

**Mots clés :** *Equus caballus*, *Equus asinus*, *Equus caballus* × *Equus asinus*, structure, morphométrie, phylogénétique.

## ملخص

ويستند هذا الهدف من عملنا على ثلاثة عناصر: العنصر الأول موجود على المواقع جنسنا ايكوس الحصانية مقارنة مع الأنواع الأخرى من جنس ايكوس في شجرة النشوء والتطور. العنصر الثاني هو المقارنة النسيولوجية والمورفومترية *Equus caballus* × *Equus asinus* و *Equus caballus* و *Equus asinus* للنظام التناسلي الذكري لـ

ايكوس بين مارس وأبريل 2018 المسلخ *asinus* × جمعت جهاز استنساخ لايكوس الحصانية وايكوس الحصانية ايكوس مايو 2018 الوحدة الحيوانية والنباتية (حديقة بن عكنون) *asinus* الحراش، ولاية الجزائر في حين تم العثور على مع MEGA5 في ولاية الجزائر. وقد وضعت شجرة النشوء والتطور التي تم الحصول عليها في هذا العمل مع البرنامج أنواع تنتمي إلى جنس ايكوس التي اتخذت في مناطق 8 cytb من 37 تسلسل الحمض النووي الميتوكوندري UPGMA جغرافية مختلفة.

بدأنا بدراسة مورفولوجية أجريت على الأعضاء المختلفة للجهاز التناسلي في الأنواع الثلاثة المدروسة ، ثم أجريت دراسة نسيجية على هذه الأعضاء التي تم تثبيتها بنسبة 10٪ فورمالين ؛ البقع التي أنتجت في هذا العمل هي هيمالون إيوسين ، وملائي تريشومر ، والكونغو الأحمر.

ايكوس وايكوس (*asinus*) سمح لنا جميع النتائج النشوء والتطور لوصف من جهة أقرب الأنواع إلى تصميم دراستنا تظهر النتائج النسيجية تشابه (*E. grevyi* / زيبرا *E.*) ، وكذلك الأنواع أخت (إن مجمع *asinus* الحصانية × ايكوس بين الأنواع الثلاثة للخصية، البربخ والأسهر هيكلية، يظهر الفرق على البيانات المظهرية، وهذه الأخيرة هي أكبر في ايكوس، والاختلافات إحصائية هامة للغاية لسطح *asinus* × ايكوس الحصانية *asinus* ايكوس الحصانية وايكوس الأنابيب المنوية والبربخ. لقد وجدنا أن القضيب حسان يتكون من نوعين من الأنسجة الانتصاب، كل نوع له نوعان من العضلات.

**الكلمات المفتاحية:** هيكلية ، *Equus caballus* × *Equus asinus* و *Equus caballus* ، *Equus asinus* ، *Equus caballus* فيلوجينية، مورفومترية

# Abstract

The objective of our work is based on three elements: the first element lies in the positioning of our species *Equus caballus* compared to other species of the genus *Equus* in a phylogenetic tree. The second element is the histological and morphometric comparison of the male reproductive system of *Equus caballus*, *Equus asinus* and *Equus caballus* × *Equus asinus*.

The reproductive devices of *Equus caballus* and *Equus caballus* × *Equus asinus* were recovered between March and April 2018 at the EL HARRACH slaughterhouse, Algiers willaya, while that of *Equus asinus* was recovered in May 2018, the zoological and botanical unit (Ben Aknoun Park) willaya of Algiers. The phylogenetic tree obtained in this work was developed using the MEGA5 software with the UPGMA method from 37 mtDNA cytb sequences of 8 species belonging to the genus *Equus* taken in different geographical regions.

We began with a morphological study performed on the different organs of the reproductive system in the three species studied, then a histological study performed on these organs that are fixed at 10% formalin; the stains produced in this work are Hemalun Eosin, Masson's Trichrome, and Congo Red.

The overall phylogenetic results allowed us to characterize on the one hand the species closest to our study model (*Equus asinus* and *Equus caballus* × *Equus asinus*) and on the other hand the sister species (case of complex: (*E. Zebra* / *E. grevyi*)). The histological results show a similarity between the three species for the testis, the epididymis and the vas deferens on the structural level, the difference is on the morphometric data, the latter are more voluminous in *Equus caballus* and *Equus asinus* as *Equus caballus* × *Equus asinus*, the differences are statistically highly significant for the surface of the seminiferous tubules and for the epididymis. We found that the horse's penis is formed by two types of erectile tissue, each type having two types of muscle.

**Key words:** *Equus caballus*, *Equus asinus*, *Equus caballus* × *Equus asinus*, structure, morphometry, phylogenetics

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I.1.PRESENTATION DE LA FAMILLE DES EQUIDE</b> .....	3
I. 1.1. Le cheval .....	3
I.1.1.1. Généralité sur Le cheval domestique ( <i>Equus caballus</i> ) .....	3
I.1.1.2. Classification du Cheval domestique .....	3
I.1.1.3. Anatomie du cheval .....	4
I.1.2. L'âne.....	4
I.1.2.1. Généralité sur L'âne domestique ( <i>Equus asinus</i> ) .....	4
I.1.2.2. Classification du L'âne domestique ( <i>Equus asinus</i> ) .....	5
I.1.2.3. Anatomie de L'âne.....	5
I.1.3. Le Mulet .....	6
I. 1.3.1. Généralité sur le mulet ( <i>Equus asinus x Equus caballus</i> ) .....	6
I.1.4. La répartition géographique initiale des 7 espèces d'équidés sauvages.....	7
<b>I.2.ANATOMIE DES ORGANES GÉNITAUX</b> .....	8
I.2.1. Développement et descente des testicules.....	9
I.2.2. Les enveloppes des testicules ou bourses testiculaires.....	9
I.2.2.1. Les enveloppes superficielles.....	9
I.2.2.2. Les enveloppes profondes .....	9
I.2.3. Les testicules .....	10
I.2.3.1.Caractères généraux, conformation et moyens de fixité.....	10
I.2.3.2. Histologie du testicule.....	12
I.2.3.2.1. Histologie du Tubes séminifères.....	13
I.2.3.2.2. Tissu interstitiel .....	15
I.2.4. Les voies spermatiques .....	15
I.2.4.1. L'épididyme .....	15
I.2.4.2. Le canal déférent.....	16
I.2.4.3. Urètre du mâle (canal uro-génital) .....	18
I.2.5. Verge ou pénis .....	19
<b>I.3. PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION</b> .....	20
I.3.1. La spermatogénèse et ses spécificités chez l'espèce équine .....	21
I.3.2. La régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez le cheval.....	23
I.3.3. La puberté chez le cheval .....	23
I.3.4. La reproduction chez l'âne .....	24
I.3.5. Les causes des stérilités de mulet .....	24
<b>I.4. ETUDE PHYLOGÉNÉTIQUE</b> .....	26
I.4.1. Définition de la phylogénie .....	26

I.4.2. phylogénie moléculaire.....	26
I.4.3. Représentation phylogénétique .....	27
I.4.4. Arbre phylogénétique .....	28
I.5. Analyses moléculaires et phylogénétiques .....	28

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

II.1. Matériel non biologique .....	30
II.2. Matériel biologique .....	30
II.3. Technique histologique .....	32
II.3.1. Fixation.....	32
II.3.2. Inclusion .....	32
II.3.3. Microtomie .....	32
II.3.4. Coloration.....	33
II.3.5. Montage et observation.....	33
II.4. Etude morphométrique .....	34
II.5. Etude statistique .....	36
II.6. Analyses phylogénétiques .....	37
II.6.1. Etude de la GenBank .....	37
II.5.3. Traitement des séquences ADN .....	40

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>III.1. Résultats</b> .....	44
III.1.1. Résultat morphologique .....	44
III.1.2. Résultats histologique .....	46
III.1.2.1. Testicule .....	46
III.1.2.2. Épididyme .....	52
III.1.2.3. Canal déférent.....	58
III.1.2.4. Pénis.....	65
III.1.3. Résultats phylogénétique.....	68
<b>III.2. Discussion</b> .....	73
III.2.1. Etude morphologique .....	73
III.2.2. Etude histologique : .....	75
III.2.2.1. Testicule .....	75
III.2.2.2. Épididyme.....	77
III.2.2.3. Canal déférent.....	78
III.2.2.4. Pénis.....	78
III.2.3. Etude phylogénétique.....	80
<b>CONCLUSION</b> .....	81

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **ANNAXE I**

### **ANNAXE II**

La famille Équidea est constituée de 8 espèces très différentes incluant à la fois les chevaux, les ânes et les zèbres. Mais on oublie bien souvent d'y intégrer également les hybrides issus de croisements interspécifiques. La mule et le bardot sont les hybrides les plus répandus et les plus connus. En raison des divergences tant phénotypiques que caryotypiques qui existent entre ces 8 espèces, la production de tels hybrides se caractérise d'une part par une gestation présentant des particularités immunologiques et hormonales propres, d'autre part par une pathologie immunitaire du post-partum particulièrement fréquente (**Petrus, 2003**). L'apparition des équidés en Algérie, remonte à la période préhistorique au cours du 4ème millénaire (**Alimen, 1955**). Les chevaux, les ânes et les mules appartiennent à la famille des équidés. On les trouve principalement dans presque toutes les zones agro-climatiques (tempérées, semi-arides, montagneuses...etc) (**Roamba, 2014**).

Notre travail sur l'appareil génital du cheval *Equus Caballus*, et afin d'enrichir notre étude nous avons introduit deux autres espèces de la famille des Équidea *Equus asinus* (âne) et *Equus Caballus* × *Equus asinus* (mulet). Le travail est constitué de trois parties :

La première partie dont l'intérêt est de mener une comparaison morphologique sur l'appareil reproducteur mâle entre les trois espèces *Equus Caballus*, *Equus asinus* et *Equus Caballus* × *Equus asinus*.

Deuxième partie concerne l'étude structurale et morphométrique chez les trois espèces, nous avons réalisées des coupes transversales et longitudinales au niveau du testicule, l'épididyme, canal déférent et pénis. Les coupes obtenues sont passées par différentes étapes d'histologie. Les colorants utilisés sont : coloration de routine, trichrome de Masson, Rouge congo, pour bien précisées la différence entre nos espèces. A la fin de la technique, les coupes histologiques sont observées sous microscope photonique au niveau du laboratoire L.R.Z.A. Les images sont capturées par un appareil photo numérique (HiROCAM, MA88-500, BME lab and Science, St. Paul, USA) connecté à un microscope photonique (Optika B 235) via le logiciel TS View (Microscopes America, Cumming, GA, USA).

Concernant l'étude morphométrique, afin de comparer la surface du tubes séminifères et l'épididyme et la longueur des invaginations du canal déférent ainsi que la hauteur de épithélium et du noyau jusqu'à le pole apicale de épididyme, ils ont été mesurés via un logiciel d'analyse et de traitement d'image "Axio Vision 4.6.3.0" développé par la société Carl Zeiss. Ce système d'analyse d'images a été étalonné à l'aide d'une lame micrométrique

## Introduction

---

graduée afin d'obtenir les mesures, les longueurs et les diamètres et périmètres en  $\mu\text{m}$ , les surfaces en  $\mu\text{m}^2$ , de testicule, d'épididyme et de canal déférent. Les résultats sont représentés sous forme des histogrammes.

La dernière partie rapporte l'étude phylogénétique qui a été réaliser au niveau de laboratoire de Biodiversité et Environnement : interactions, génomes (LBEIG) de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB) d'Alger, dont l'intérêt est d'étudier la phylogénie du genre *Equus*, afin de voir s'ils sont proches sur le plan moléculaire à partir des données de la GenBank et de trouver la position exacte des espèces *Equus caballus*, *Equus asinus*, *Equus asinus* x *Equus caballus* dans l'arbre phylogénétique.

## I.1.PRESENTATION DE LA FAMILLE DES EQUIDE :

La famille des équidés comprend 7 espèces différentes selon le plan morphologique et histologique, parmi lesquelles le cheval et l'âne et l'hybride mulet.

### I.1.1. Cheval :

#### I.1.1.1.Généralité sur cheval domestique (*Equus caballus*) :

*Equus caballus* est l'espèce la plus connue et la plus répandue de la famille des équidés. Elle se subdivise elle-même en de nombreuses races. Cette espèce est caractérisée par un caryotype de 32 paires de chromosomes (soit  $2n = 64$ ) (Benirschke et Ryder, 1985).

Le cheval (*Equus caballus* Linné, 1758) est un mammifère euthérien périssodactyle de la famille des équidés (*Equidae*) (figure 1). Généralement de grande taille, il est plus grand que l'âne, aux formes élégantes, aux oreilles plus petites, à queue garnie de crins depuis la base, et au cou muni d'une crinière. Il semble originaire d'Asie centrale et il a été domestiqué à l'époque magdalénienne vers - 3500 à - 3000 en Ukraine.



Figure 1 : Cheval domestique *Equus caballus* (Originale, 2018).

#### I.1.1.2. Classification du cheval domestique (*Equus caballus*) :

Règne	Animalia
Embranchement	Chordata
Sous-embranchement	Vertebrata
Classe	Mammalia
Ordre	Perissodactyla
Famille	Équidea
Genre	<i>Equus</i>
Espèce	<i>caballus</i>

### I.1.1.3. Anatomie de cheval :

Le cheval est un animal de grande taille (figure 2), possède de membres avant et arrière, tête, ainsi que d'un grand dos et d'épaules, des coudes, des genoux et d'hanches, des jambes et une belle queue.

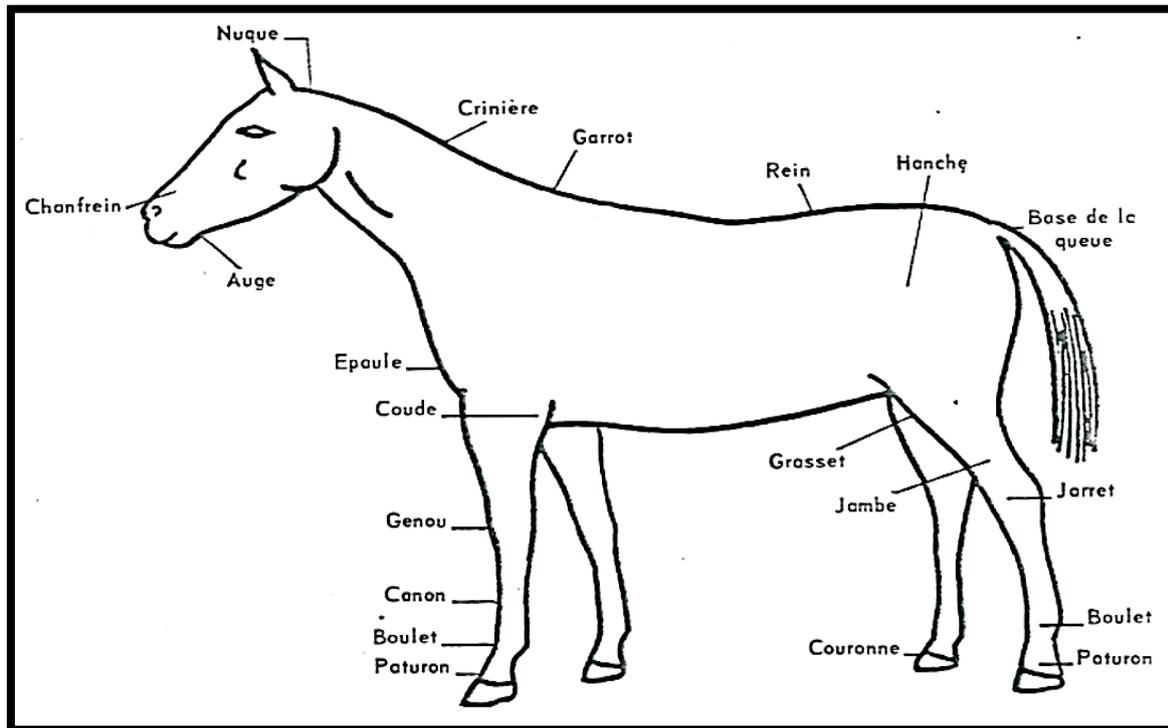


Figure 2 : Anatomie du cheval (Malone, 1980).

### I.1.2. Âne :

#### I.1.2.1. Généralité sur l'âne domestique (*Equus asinus*) :

*Equus asinus* est originaire de l'Afrique du Nord. On en distingue plusieurs sous-espèces : *Equus asinus africanus*, *Equus asinus somalicus*, *Equus asinus asinus*, *Equus asinus atlanticus* (l'âne d'Algérie), *Equus asinus taeniopus*.

Les ânes sont caractérisés par une décoloration ventrale de la robe, par la présence de trois particularités : une raie de mulet, une bande scapulaire et des zébrures ; et surtout par des oreilles démesurément longues (figure 3).

Le caryotype des ânes est composé de 31 paires de chromosomes ( $2n = 62$ ) (Benirschke et Ryder, 1985).



**Figure 3 : Âne *Equus asinus* (Originale, 2018).**

**I.1.2.2. Classification du l'âne domestique (*Equus asinus*) :**

<b>Règne</b>	<b>Animalia</b>
Embranchement	Chordata
Sous-embranchement	Vertebrata
Classe	Mammalia
Ordre	Perissodactyla
Famille	Equidea
Genre	<i>Equus</i>
Espèce	<i>asinus</i>

**I.1.2.3. Anatomie du l'âne :**

L'âne est un animal plus petit que le cheval (figure 4), possède de membres avant et arrière, tête avec des oreilles démesurément longues, ainsi que d'un grand dos et d'épaules, des coudes, des genoux et d'hanches, des jambes et queue.

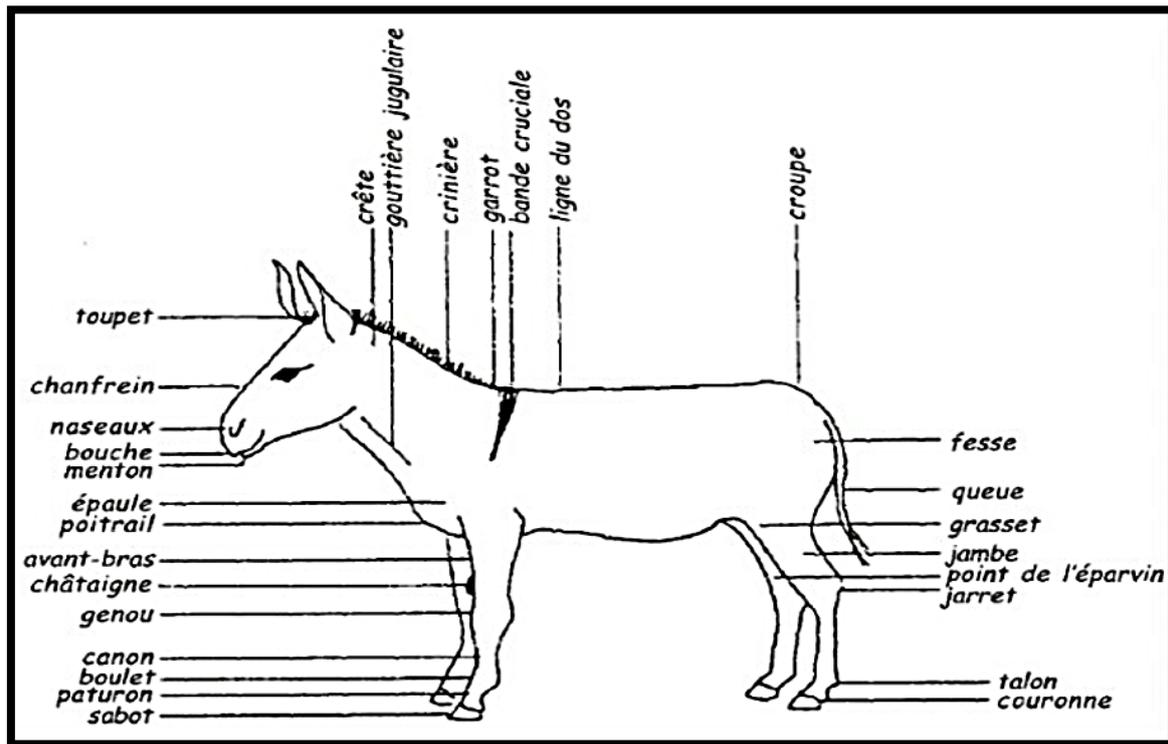


Figure 4 : Représentation schématique des particularités anatomiques de l'âne (Roset, 2004).

### I.1.3. Mulet :

#### I.1.3.1. Généralité sur mulet (*Equus asinus x Equus caballus*) :

Dans le croisement *Equus asinus x Equus caballus*, on distingue deux types d'hybrides selon le sens du croisement :

- **Le mulet** : Résulte du croisement d'un âne et d'une jument (*Equus asinus x Equus caballus*).
- **Le bardot** : Résulte du croisement d'un étalon et d'une ânesse (*Equus caballus x Equus asinus*).

Le mulet juxtapose les caractères morphologiques de ses deux parents : il dispose d'une taille intermédiaire entre l'âne et la jument, avec la physionomie de l'âne (svelte, poitrine étroite, encolure courte, garrot bas, membres grêles mais très robustes, oreilles longues). La force et la taille du cheval, associées à la rusticité, la robustesse et au caractère paisible de l'âne, en font un animal de bât idéal, très apprécié, notamment sur les sentiers difficiles de montagne grâce à un pied très sûr. Cette combinaison de qualités respectives des deux géniteurs a favorisé l'élevage du mulet.

Les mules et la question de leur infertilité ont toujours attiré l'intérêt des scientifiques. (Marcenac et al., 1980).

Concernant l'anatomie de mulet nous n'avons pas trouvé des articles de référence.



Figure 5: Mulet (Originale, 2018).

#### I.1. 4. La répartition géographique initiale des 7 espèces d'équidés sauvages :

Cette répartition géographique résulte de son utilisation (figure 6) (Haras, 2014a).

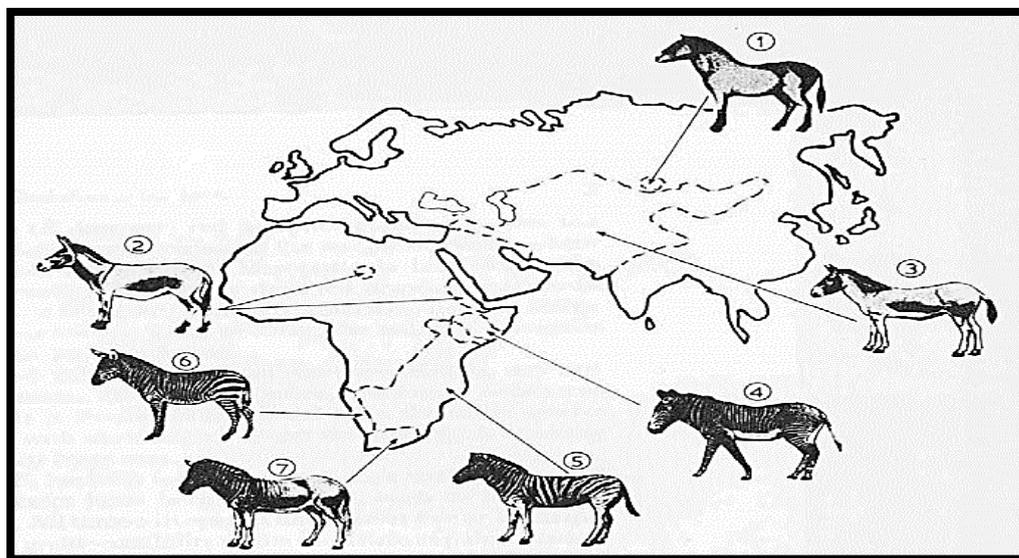


Figure 6 : Répartition géographique initiale des 7 espèces d'équidés sauvages (Short, 1975).

1 : *Equus przewalskii*. 2 : *Equus asinus*. 3 : *Equus hemionus*. 4 : *Equus grevyi*.  
5 : *Equus burchellii*. 6 : *Equus zebra*. 7 : *Equus quagga*.

## I.2. ANATOMIE DES ORGANES GÉNITAUX :

L'appareil génital mâle cheval est formé par l'ensemble des organes chargés de l'élaboration du sperme et du dépôt de celui-ci dans les voies génitales de la femelle (figure 7). Il comporte trois grandes parties :

**1- La section glandulaire :** Constituée par les deux testicules. Ceux-ci assurent la production des spermatozoïdes et sont la principale source d'androgènes du mâle.

**2- La section tubulaire :** Qui assure le stockage et le transport des spermatozoïdes jusqu'au sinus uro-génital, et qui comprend l'épididyme, le conduit déférent et la glande vésiculaire.

**3- La section uro-génitale :** Formée par l'urètre auquel sont annexées des glandes (prostate et glandes bulbo-urétrales et des formations érectiles comme le corps caverneux. C'est l'union de la partie extrapelvienne de l'urètre à ce dernier qui constitue le pénis (**Barone, 2001**).

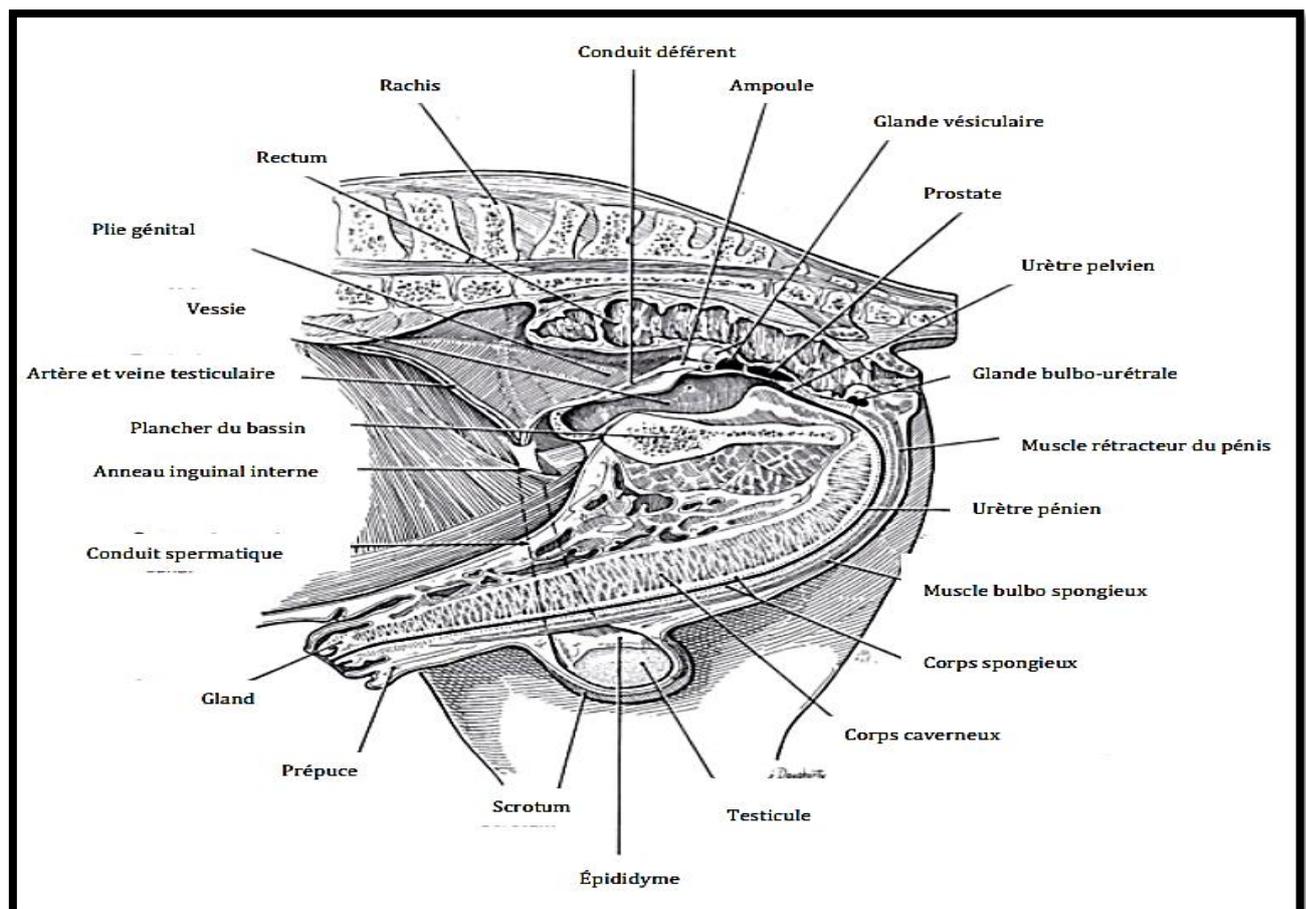


Figure 7: Dessin du tractus reproductif de cheval vu en coupe sagittale (Pickett, 1989).

**I.2.1. Développement et descente des testicules :**

Dans la première période de son développement, l'appareil génital est indifférencié. Deux systèmes de conduits, l'un mâle (conduits mésonéphrotique), l'autre femelle (conduit paramésonéphrotique) coexistent ; un seul se développera en fonction de l'évolution de la gonade. Chez le mâle la descente des testicules correspond à la migration par laquelle la glande génitale quitte l'abdomen pour franchir l'espace inguinal et se loger finalement dans des enveloppes particulières en région sois-inguinale (**Barone, 2001**).

**I.2.2. Les enveloppe des testicules ou bourses testiculaire :**

De la surface vers la profondeur, ces bourses sont constituées de cinq tuniques superposées, elles-mêmes pouvant être subdivisées en plusieurs plans. Il s'agit du scrotum, du dartos, du fascia spermatique externe, du crémaster et de la fibro-séreuse, divisée en fascia spermatique interne et tunique vaginale (**Barone, 2001**).

**I.2.2.1. Les enveloppes superficielles :****I.2.2.1.1. Scrotum :**

Il s'agit de l'enveloppe testiculaire la plus superficielle, simplement constituée par la peau et le dartos. La peau du scrotum présente des caractères particuliers : elle est mince, élastique et recouverte par un duvet fin. Contrairement aux autres enveloppes testiculaires, le scrotum constitue un sac commun aux deux testicules (**Barone, 2001**).

**I.2.2.1.2. Dartos :**

Il s'agit d'une couche de tissu musculaire composée de fibres conjonctives et de fibres élastiques qui tapisse la face interne de la peau scrotale. Il s'agit d'un véritable muscle peaucier qui joue un rôle important dans la suspension des testicules (**Barone, 2001**).

**I.2.2.1.3. Fascia spermatique externe :**

Cette enveloppe constitue un premier plan de clivage entre les différentes structures des bourses testiculaires. Elle est constituée de deux couches d'aspect lamellaire séparées par du tissu conjonctif lâche. Il s'agit d'une zone de désolidarisation entre enveloppes superficielles (scrotum et dartos) et testicules, ce qui assure une protection mécanique par exemple contre les chocs (**Roger, 2009**).

**I.2.2.2. Les enveloppes profondes :****I.2.2.2.1. Muscle crémaster :**

Il s'agit d'un muscle rouge vif issu du muscle oblique interne de l'abdomen. Il prend origine au niveau de l'anneau inguinal profond, traverse le canal inguinal et couvre les faces latérale et caudale du fascia spermatique interne (**Barone, 1956**).

### I.2.2.2. Fascia spermatique interne :

Le fascia spermatique interne forme un sac piriforme débutant à l'anneau inguinal profond. Il est fortement solidarisé à la lame pariétale de la tunique vaginale ; ils constituent à eux deux la tunique fibro-séreuse (**Barone, 1956 ; Roger, 2009**).

### I.2.2.3. Tunique vaginale :

La tunique vaginale constitue la séreuse du testicule et de son cordon. Elle est constituée de deux lames, une lame pariétale et une lame viscérale, unies par le mésorchium et qui délimitent une cavité, la cavité vaginale, diverticule de la cavité péritonéale, avec laquelle elle communique au niveau de l'anneau vaginal (**Barone, 2001**). La cavité vaginale contient une faible quantité de liquide séreux qui facilite les mouvements du testicule au sein de ses enveloppes (**Little et Holyaok, 1992**). La figure 8 illustre l'anatomie des différentes enveloppes testiculaires.

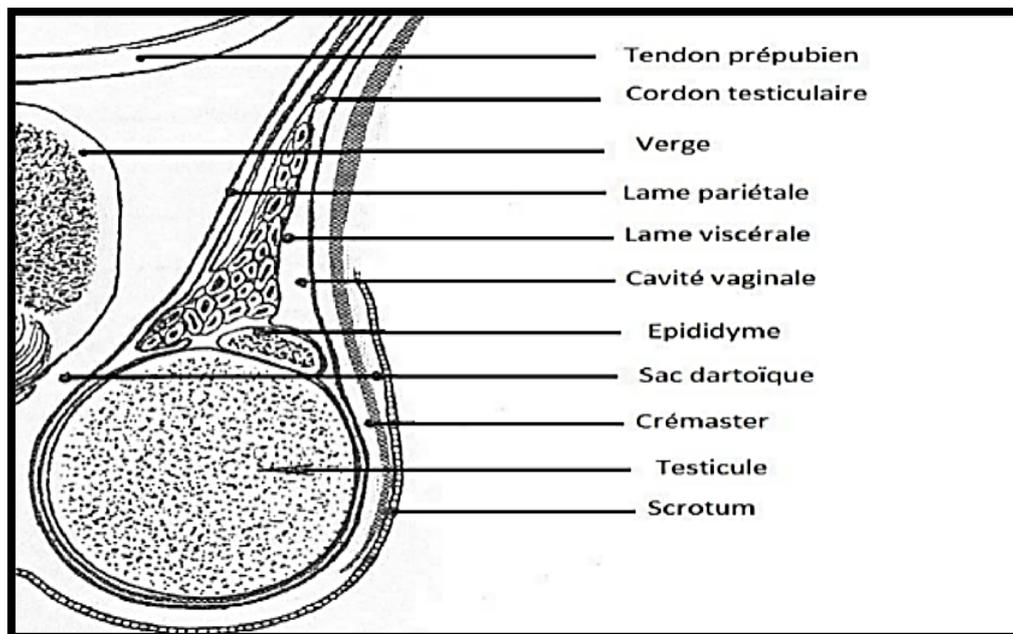


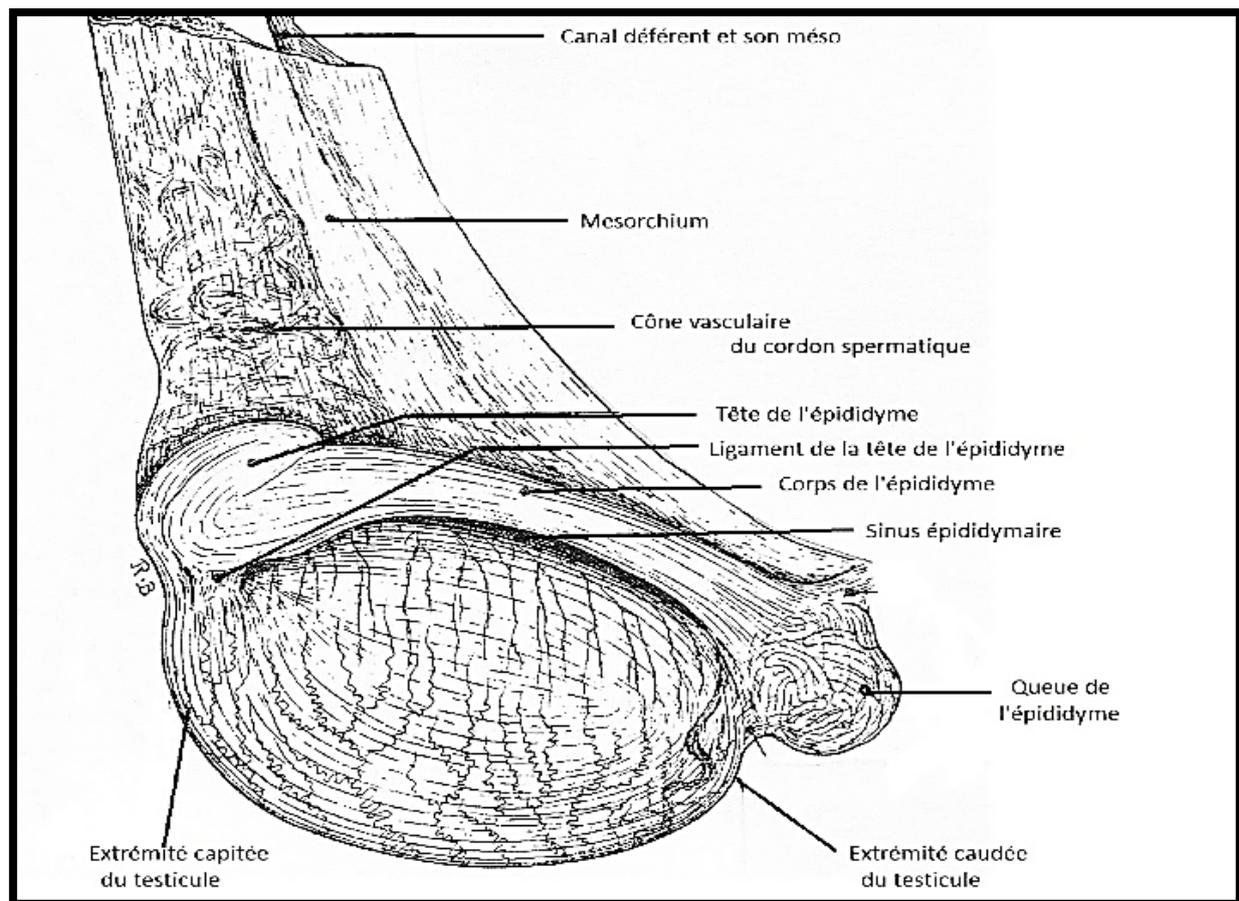
Figure 8 : Représentation schématique des enveloppes testiculaires (**Barone, 2001**).

## I.2.3. Les testicules :

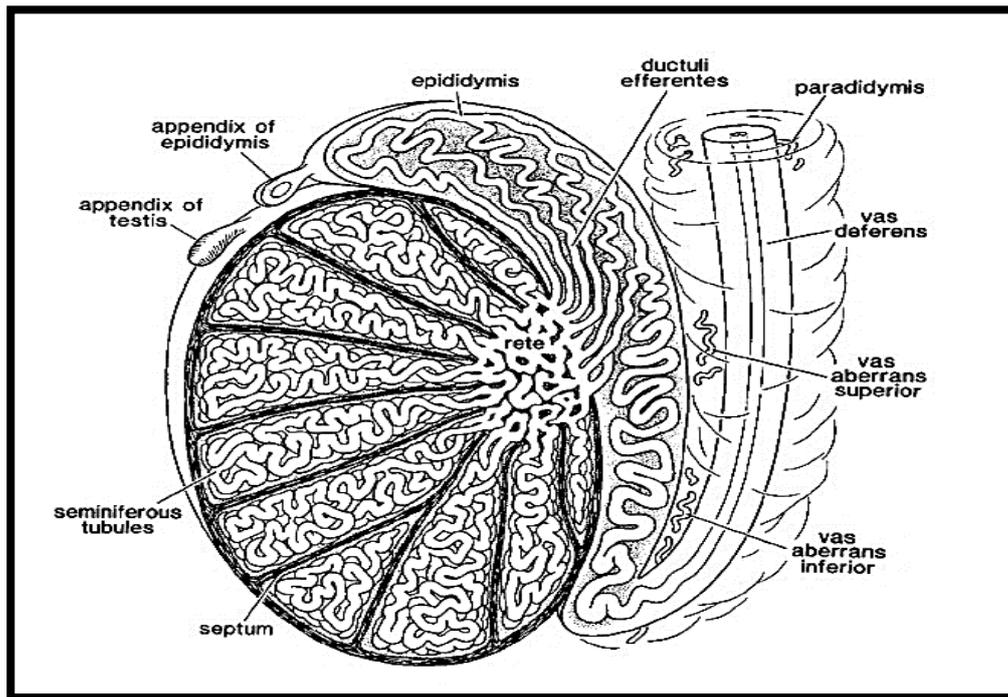
### I.2.3.1. Caractères généraux, conformation et moyens de fixité :

Le testicule du cheval est un organe ovoïde dont le grand axe est presque horizontal, légèrement oblique vers le bas vers l'arrière. Sa couleur est en général blanc bleuâtre, qui correspond à celle de l'albuginée. Sa consistance est variable avec les sujets et les conditions physiologiques ; elle est en général ferme et élastique. Le poids du testicule varie beaucoup avec l'âge et l'état physiologique. Il est particulièrement volumineux chez le fœtus où se développe un important

tissu interstitiel. Il régresse ensuite, son volume relativement faible à la naissance, s'accroît alors dans la première année de vie. Chez l'adulte, il mesure sans l'épididyme une dizaine de centimètres de longueur pour 6 à 7 centimètre de hauteur et 5 à 6 de largeur et son poids est d'environ 200 à 300 grammes. Le testicule gauche est légèrement plus gros que le droit, il est également situé légèrement plus caudalement et plus bas que le testicule droit (Barone, 2001). Les figures 9 et 10 illustrent la conformation et les moyens de fixité du testicule.



**Figure 9 :** Testicule et épидидyme gauches du cheval. Conformation et moyen de fixité (Barone, 1956).



**Figure 10** : Schéma montrant le testicule, l'épididyme et la portion intra-scrotale du déférent (Mills, 2007).

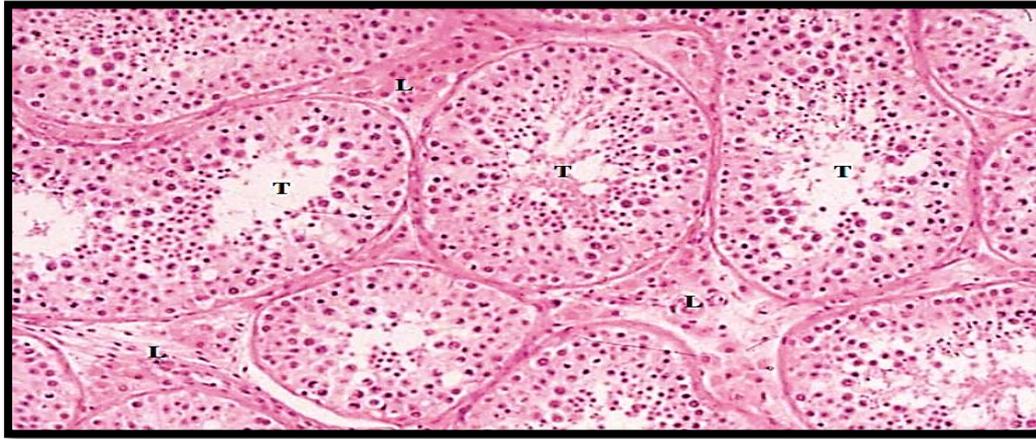
### I.2.3.2. Histologie du testicule :

La structure histologique de la glande testiculaire comprend : un revêtement séreux, une charpente fibreuse (tunique albuginée) et un parenchyme (Barone, 2001).

**-Le revêtement séreux** : Est une portion de la lame viscérale de la tunique vaginale ; il est continu avec le revêtement de l'épididyme et des mésos. Il est également très adhérent à la tunique albuginée.

**-La tunique albuginée** : Est une membrane fibreuse épaisse et blanchâtre, creusée de canalicules dans lesquels courent des vaisseaux. Elle constitue ainsi autour du testicule une sorte de coque continue dont la face profonde forme des cloisons qui subdivisent en lobules le tissu propre du testicule. Les cloisons convergent vers un axe conjonctif épais présent à l'extrémité capitée du testicule ; il s'agit du mediastinum testis.

**-Le parenchyme testiculaire** : Correspond à la partie non capsulaire du testicule. Chaque lobule du parenchyme testiculaire regroupe deux à quatre tubes séminifères contournés, siège de la spermatogénèse (figure 11). Ces tubes sont fortement intriqués et échangent des anastomoses ; ils sont collectés par les tubes séminifères droits, situés au sommet de chaque lobule (Barone, 1956).



**Figure 11** : Coupe histologique montrant des tubes séminifères (T) bordés par l'épithélium germinatif et délimités par la tunicapropria. Au niveau de l'interstitium on trouve des vaisseaux et des cellules de Leydig (L) (Stevens et Lowe, 1997).

#### **I.2.3.2.1. Histologie du tubes séminifères :**

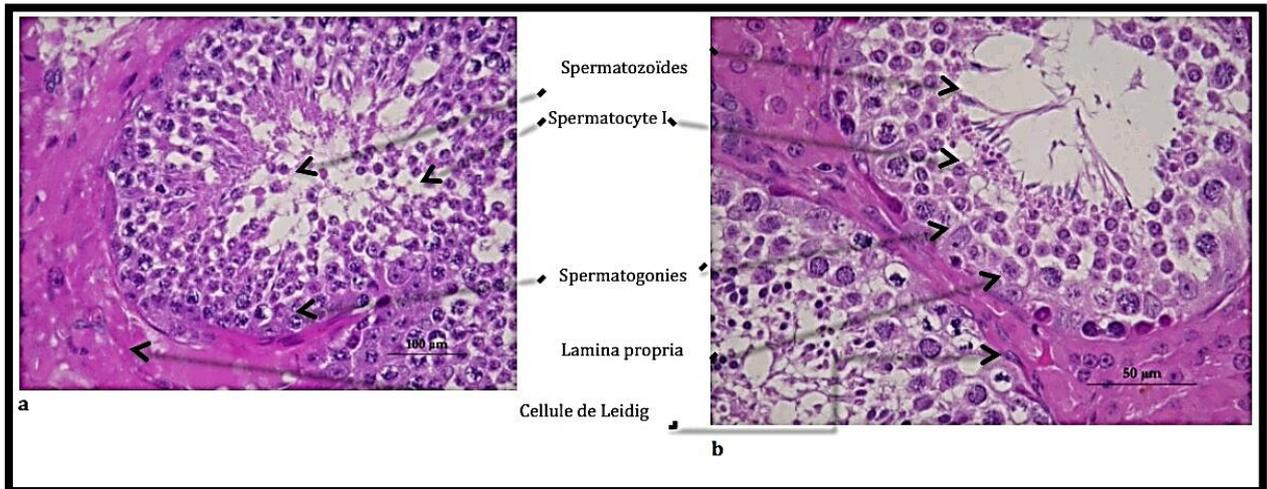
Chaque tube séminifère est limité par une paroi propre, la gaine péri-tubulaire et renferme l'épithélium séminal constitué par les éléments de la lignée germinale et les cellules de Sertoli.

##### **I.2.3.2.1.1. Gaine péri-tubulaire :**

La gaine péri-tubulaire apparaît au microscope photonique comme une lame homogène de 3 à 5 µm d'épaisseur, ayant une affinité marquée pour les colorants acides. En fait, l'examen au microscope électronique révèle une structure hétérogène. Elle est formée par une membrane basale bien définie, entourée par plusieurs assises de cellules semblables à des cellules musculaires lisses, les cellules péri-tubulaires, entourées par des trousseaux de fibrilles de collagène. Elle est revêtue, sur son versant externe, par une fine couche de fibroblastes qui sont parfois en contact avec la paroi des capillaires sanguins et des vaisseaux lymphatiques.

##### **I.2.3.2.1.2. Lignée germinale :**

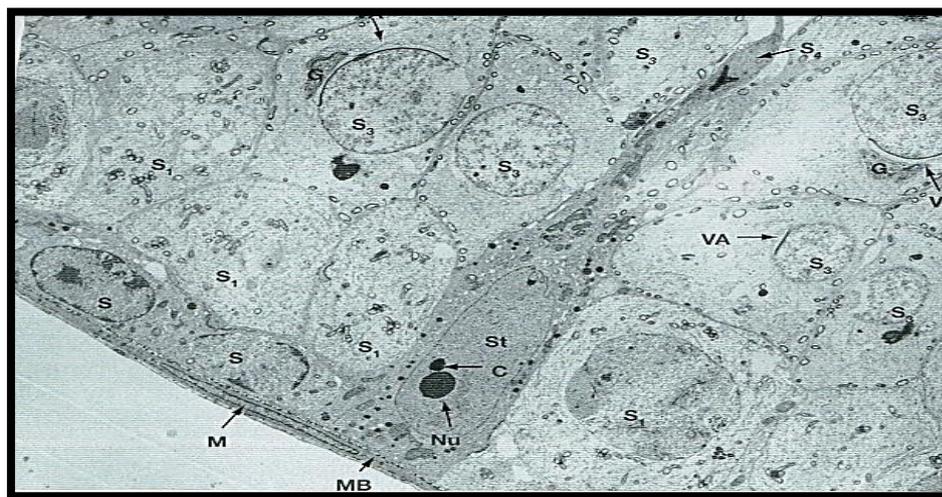
La spermatogenèse, mise en place à la puberté, est le processus de différenciation cellulaire qui, à partir des cellules souches, aboutit à la production des spermatozoïdes. Les cellules germinales sont disposées en couches superposées qui s'étendent entre la membrane basale et la lumière du tube séminifère (figure 12). L'étude au microscope électronique a permis de préciser leur caractéristique cytotologique. Trois types de cellules germinales sont impliqués dans la spermatogenèse : les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides. À chaque type cellulaire correspond une phase du processus génétique (Alami el Sabeh, 2011).



**Figure 12 :** Photographies d'une coupe histologique de tube séminifère d'un testicule d'un étalon âgé de sept ans au grossissement x20 (a) et x40 (b) (Mylène, 2015).

### I.2.3.2.1.3. Cellule de Sertoli :

La cellule de Sertoli est une grande cellule pyramidale qui s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium séminifère (figure13). Le corps cellulaire repose sur la lame basale de la gaine péri-tubulaire. Ses faces latérales sont en contact étroit avec les cellules de Sertoli adjacentes et les cellules germinales aux divers stades de la spermatogénèse. Chaque cellule est connectée aux cellules adjacentes par des jonctions serrées disposées au pôle basal limitant deux compartiments : un compartiment basal, périphérique, qui contient les spermatogonies et les spermatoocytes I et un compartiment central ou adjacent à la lumière qui contient les spermatoocytes II et les spermatoïdes. D'autres types de jonctions relient les cellules de Sertoli entre elles et avec les cellules germinales (Baronne, 2001 ; Thibault, 2001).



**Figure 13 :** Cellule de sertoli ME x3400(Weather, 2006).

VA : vésicule acrosomiale.

C : amas de chromatine.

G : appareil de Golgi.

L : cellule de Leydig.

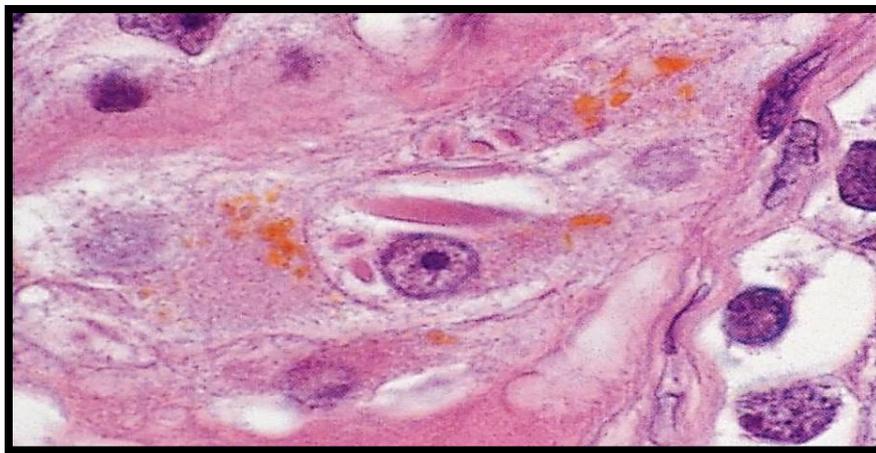
**M** : myofibroblaste.      **MB** : membrane basale.      **ML** : muscle lisse.      **NU** : nucléole.      **S** : spermatogonies.  
**ST** : cellule de sertoli.      **S1** : spermatoocytes de premier ordre.      **S3** : spermatide.      **S4** : spermatozoïde.

### **I.2.3.2.2. Tissu interstitiel :**

Entre les tubes séminifères, l'espace est comblé par une trame conjonctivo-vasculaire dans laquelle sont disséminées les cellules interstitielles, encore appelées cellules de Leydig. Ces cellules sont notamment à l'origine de la sécrétion d'une hormone sexuelle : la testostérone (Roger, 2009).

#### **I.2.3.2.2.1. Cellules de Leydig :**

Les cellules de Leydig (figure 14) sont des éléments polyédriques de 15 à 20 µm de diamètre, au noyau arrondi avec un cytoplasme dense ou spongiocyttaire.



**Figure 14 :** Coupe histologique montrant une cellule de Leydig au niveau de l'interstitiel testiculaire (Mills C, 2007).

### **I.2.4. Les voies spermatiques :**

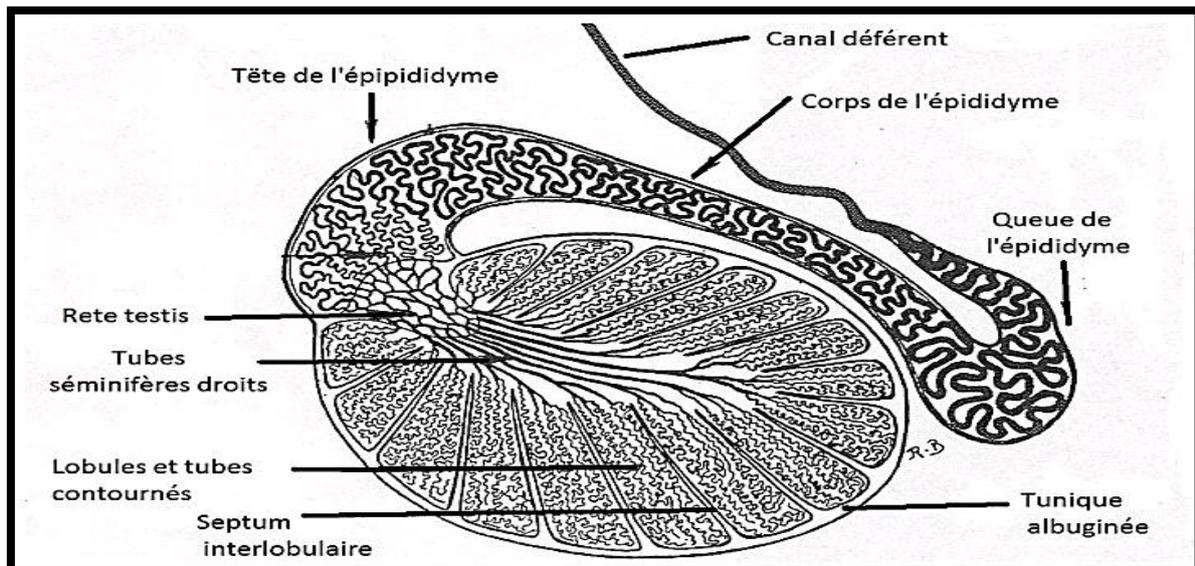
Les voies d'excrétion du sperme ou voies spermatiques s'étendent des testicules jusqu'au sinus uro-génital. Les premiers segments de ces voies sont constitués par les tubes droits, le rete testis et les canalicules efférents, précédemment décrits dans l'étude des testicules. Puis ces voies spermatiques se poursuivent par un long conduit qui présente deux segments nettement différenciés, la partie proximale, l'épididyme, et la partie distale, le canal déférent. Ce dernier va jusqu'à l'urètre, qui représente le sinus uro-génital. Dans sa partie terminale, le canal déférent présente des dépendances glandulaires, dont la principale est la glande vésiculaire ou glande séminale (Barone, 2001).

#### **I.2.4.1. L'épididyme :**

L'épididyme est un organe allongé, qui suit le bord supérieur du testicule. Il reçoit de l'extrémité capitée de la glande testiculaire les canalicules efférents et se continue caudalement

par le canal déférent. Il joue un rôle important dans le stockage des spermatozoïdes, qui subissent une maturation lors de sa traversée. La longueur de l'organe en place est de 12 à 13 centimètres mais en réalité (**Barone, 1956**).

L'épididyme est constitué par un long système canaliculaire pelotonné à l'intérieur d'une membrane albuginée, qui fait suite à la tunique albuginée du testicule. Cette membrane se réduit peu à peu à un mince tissu conjonctif sous-séreux à l'origine du canal déférent. Le système canaliculaire est d'abord formé par les canalicules efférents issus de la glande testiculaire, puis ceux-ci se rejoignent et constituent un canal unique : le canal épидидymaire dont les circonvolutions forment la quasi-totalité du corps et de la queue de l'épididyme (**Barone, 1956**). La figure 15 représente de manière schématique la structure du testicule et de l'épididyme de cheval.



**Figure 15 :** Schéma de la conformation interne du testicule et de l'épididyme (**Barone, 1956**).

#### I.2.4.2. Le canal déférent :

Le canal déférent fait suite au conduit épидидymaire et s'étend jusqu'à la portion pelvienne de l'urètre (figure 16), au niveau de laquelle il s'abouche par le conduit éjaculateur, en même temps que la vésicule séminale correspondante. Le canal déférent chemine tout d'abord avec le cordon testiculaire, puis travers l'anneau vaginal. Il vient ensuite caudalement dans la région du bassin, passe au-dessus de la vessie et se rapproche du canal déférent issu du deuxième testicule avant de s'aboucher à l'urètre. Ce trajet permet de définir quatre portions : testiculaire, inguinale, abdominale et pelvienne. Le canal déférent présente un calibre régulier sur toute sa longueur

excepté dans sa portion terminale, pelvienne : ce renflement est désigné sous le terme d'ampoule du canal déférent. (Barone, 2001 ; Roger, 2009). La figure 17 représente une coupe transversale du canal déférent du cheval.

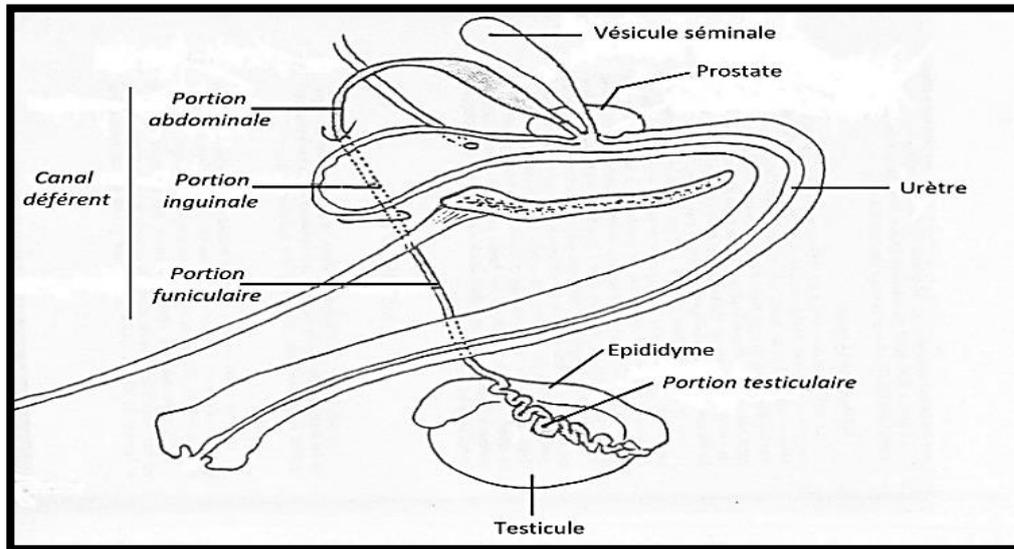


Figure 16 : Schéma de l'aspect médial du canal déférent droit de cheval (Barone, 2001).

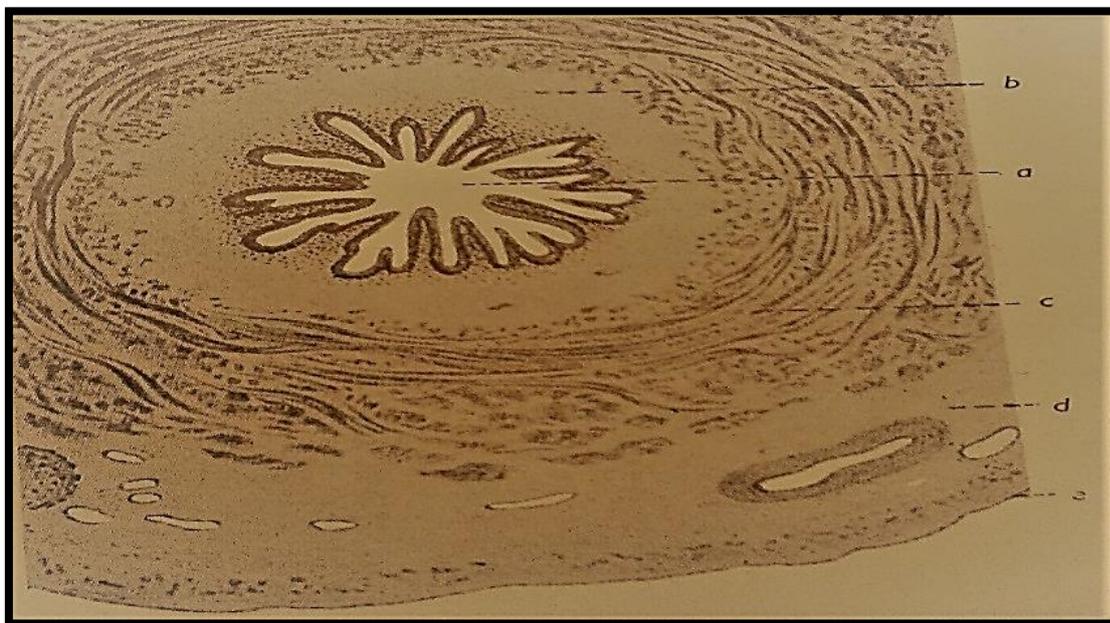


Figure 17 : Coupe transversale du canal déférent du cheval (Grau et Walter, 1975).

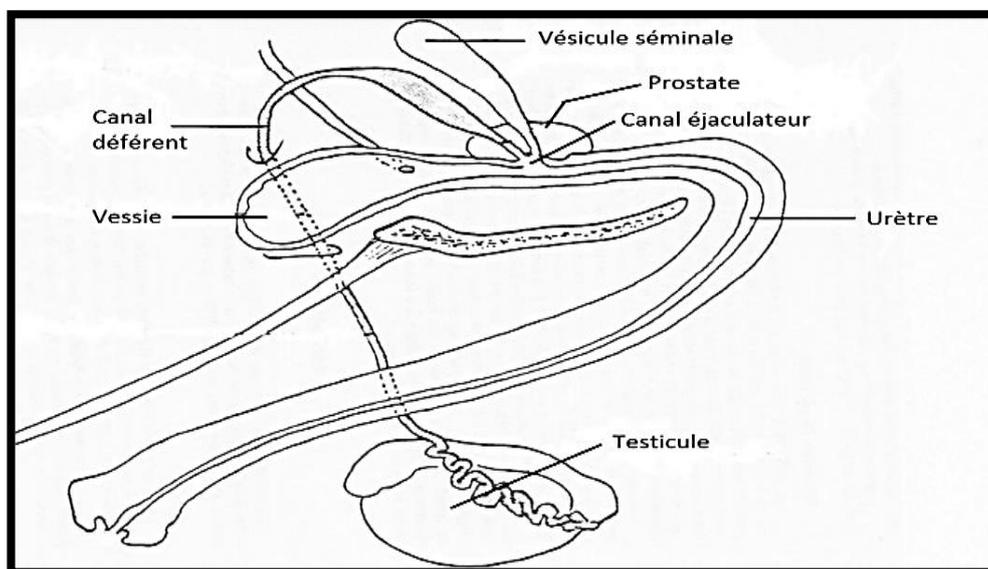
a : lumière rétrécie en forme d'étoile et épithélium superficiel.. b : propria mucosae.c ; prémysium lisse.  
d : Adventitia. e : séreuse.

### I.2.4.3. Urètre du mâle (canal uro-génital) :

#### I.2.4.3.1. Caractère généraux :

L'urètre mâle est un long conduit impair ayant pour fonction l'excrétion de l'urine et aussi celle du sperme. Il fait suite au col de la vessie ; près de son origine, il reçoit le débouché des voies spermatiques. Il longe le plancher pelvien, puis sort du bassin et se poursuit dans le pénis, à l'extrémité duquel il se termine par le méat urinaire (**Barone, 2001**).

La longueur totale de l'urètre est de 60 à 70 centimètres, dont 10 à 15 seulement appartiennent à la portion pelvienne (**Barone, 2001**). La figure 18 représente de manière schématique la disposition générale de l'urètre et de ses glandes annexes.



**Figure 18:** Schéma de l'aspect médial de l'urètre droit du cheval (**Barone, 2001**).

#### I.2.4.3.2. Glandes annexées à l'urètre :

A l'urètre sont annexées des glandes dont les sécrétions sont déversées au moment de l'éjaculation et diluent le sperme, lui donnant ainsi sa composition finale. L'une de ces glandes est impaire et volumineuse : il s'agit de la prostate. Les autres, plus petites et paires, constituent les glandes bulbo-urétrales (**Barone, 2001**).

##### I.2.4.3.2.1. Prostate :

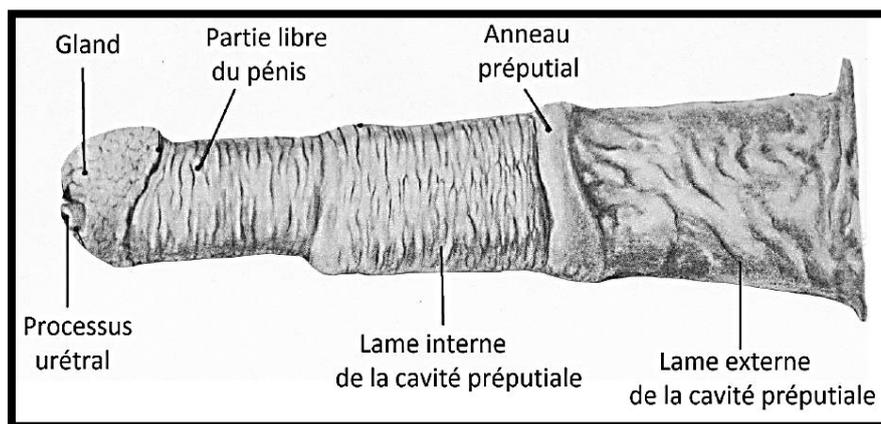
La prostate est une glande impaire volumineuse située à cheval sur le col vésical. Elle résulte en fait de l'agglomération de glandules multiples, unies par un stroma commun, mais débouchant par des conduits distincts (10 à 20 de chaque côté, chez le cheval) dans la partie initiale de l'urètre (**Barone, 2001**).

##### I.2.4.3.2.2. Glande bulbo-urétrales ou de Cowper :

Elles forment une paire de corps globuleux, de consistance ferme et de texture plus dense que la prostate. Chacune d'elles est longue de 4 à 6 centimètre et large de 2 à 3 centimètres chez l'animal entier. Elles sont situées en avant et au-dessus de l'arcade ischiale et couvertes par leur muscle compresseur, qui leur donne une teinte rougeâtre. Leur structure est assez comparable à celle de la prostate (**Barone, 2001**).

### I.2.5. Verge ou pénis :

Le pénis est l'organe copulateur du mâle (figure 19) ; il est essentiellement constituée de formations érectiles (corps caverneux, corps spongieux de l'urètre et du gland). Chez les équidés, il commence au niveau de l'arcade ischiale ; il descend entre les deux cuisses, passe entre les deux sacs dartoïques et se prolonge sous le ventre, où sa partie libre est contenue dans le fourreau. En effet, cet organe comporte deux parties : une partie fixe, proximale, qui est maintenue par un système d'aponévrose et de ligaments et une partie libre, mobile et détachée, qui peut être portée dans les voies génitales femelles lors de l'érection (**Barone, 2001**).



**Figure 19** : Partie libre du pénis et prépuce du cheval (**Constantinescu, 2010**).

Les principaux composants du pénis ont déjà été décrits. Il s'agit du corps caverneux, du corps spongieux de l'urètre et du corps spongieux du gland, qui sont des formations érectiles annexées à la portion pénienne de l'urètre. Ils sont complétés par des fascias, des muscles et un tégument (**Barone, 2001**). Les figures 20 a et b représentent la structure interne du pénis chez le cheval.

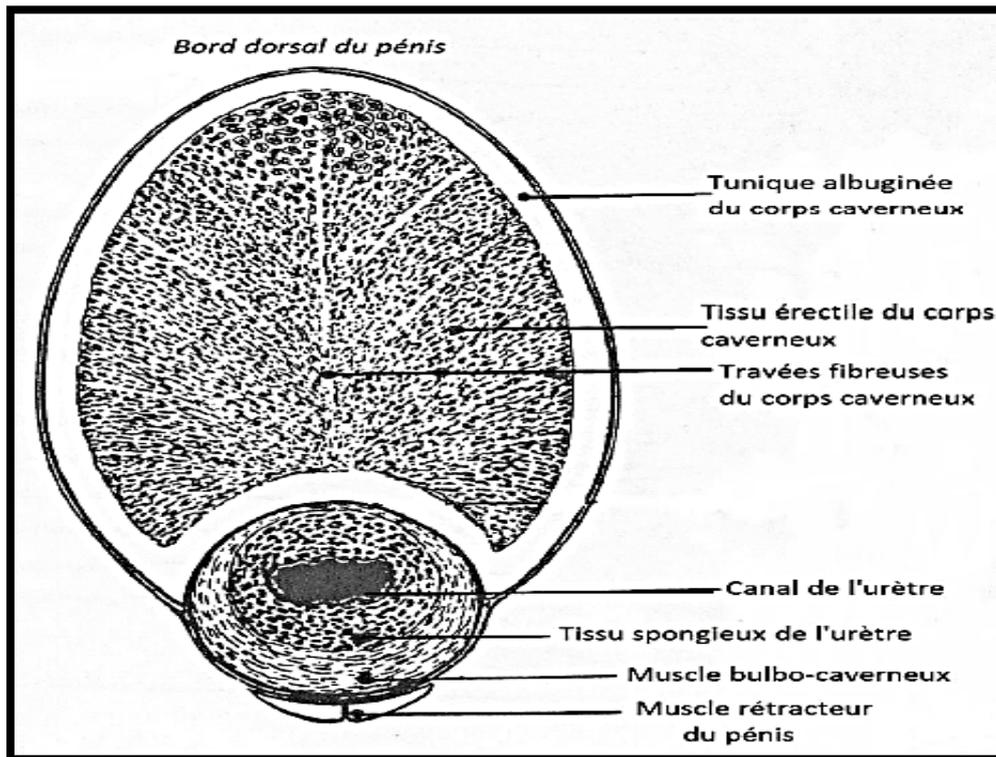


Figure 20. a : Coupe transversale du pénis du cheval, au niveau de la partie moyenne du pénis (Barone, 2001).

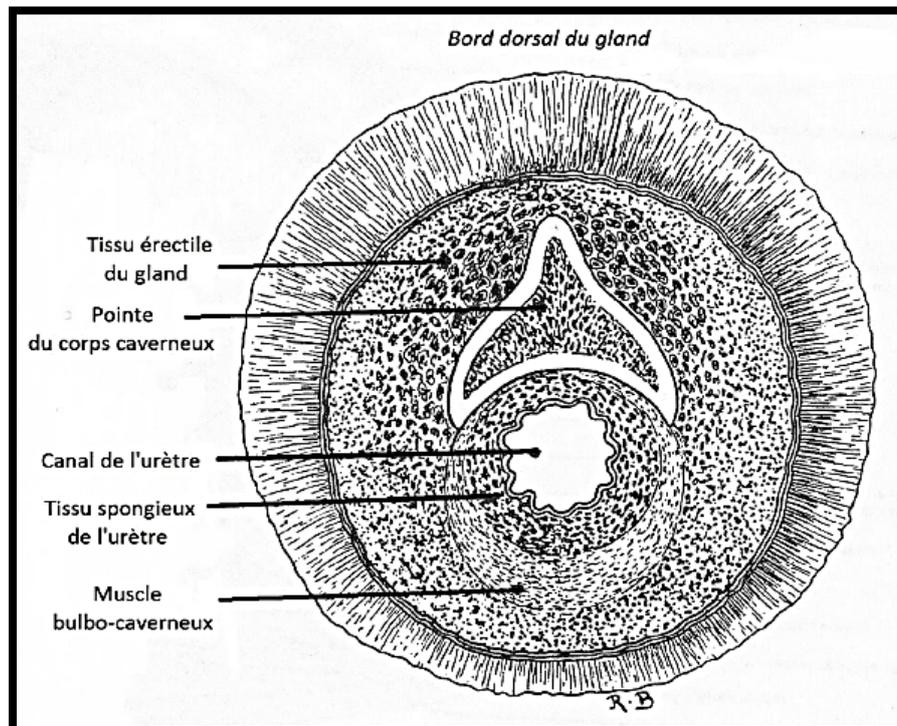


Figure 20. b : Coupe transversale du pénis du cheval, en arrière de la couronne du gland (le gland isolé est vu par derrière) (Barone, 2001).

### **I.3. PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION:**

#### **I.3.1. La spermatogénèse et ses spécificités chez l'espèce équine :**

La spermatogénèse débute au moment de la puberté, qui survient entre 15 et 21 mois d'âge chez l'étalon (**Amann, 2011**).

L'épithélium spermatogène, situé au niveau des tubules séminifères, est constitué par l'ensemble des cellules dérivées des gamétoctes (cellules à l'origine des spermatogonies) et qui interviennent dans les différentes étapes de la spermatogénèse : spermatogonies, spermatocytes primaires, spermatocytes secondaires et spermatides (**Amann, 1993**).

La durée de la spermatogénèse est d'environ 57 jours chez l'étalon (**Amann, 2011**).

##### **I.3.1.1. Etapes de la spermatogénèse :**

La spermatogénèse se déroule au sein des tubules séminifères des testicules (figure 21). Trois grandes étapes sont nécessaires pour passer d'une spermatogonie à un spermatozoïde : La spermatocytogénèse, la méiose et la spermiogénèse (**Amann, 1993**).

La spermatocytogénèse dure 19,4 jours chez l'étalon. Elle est caractérisée par une phase de multiplication (par mitoses) et de différenciation des spermatogonies, ce qui aboutit à la formation des spermatocytes. La phase de multiplication cellulaire assure également le renouvellement des spermatogonies, nécessaire au maintien d'un nombre suffisant de cellules souches (**Little et Holyoak, 1992**).

La deuxième étape, qui fait intervenir le phénomène de méiose, dure également 19,4 jours chez l'étalon. Dans un premier temps, cette étape se caractérise par l'échange de matériel génétique entre les chromosomes homologues des spermatocytes primaires. Ensuite, les deux divisions successives de la méiose produisent les spermatides haploïdes (**Amann, 1993**). La spermiogénèse dure 18,6 jours chez l'étalon. Elle se caractérise par l'acquisition de fonctions, à la fin de cette étape, les spermatides sont complètement différenciées. Elles sont alors nommées spermatozoïdes quand elles quittent l'épithélium spermatogène (**Amann, 1993**).

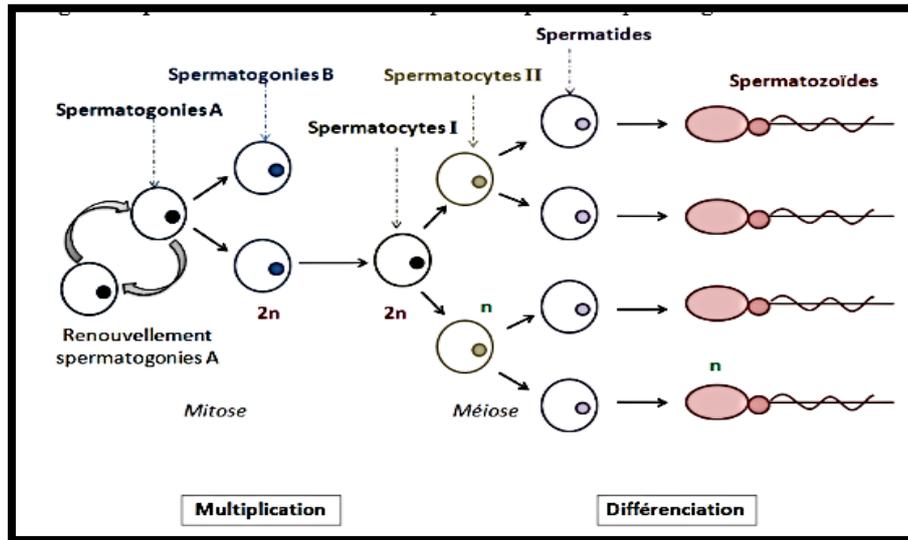


Figure 21 : Etapes de la spermatogénèse (Amann, 2011).

### I.3.1.2. Les cellules de Sertoli :

Les cellules de Sertoli sont des cellules de soutien qui reposent sur la lame basale des tubules séminifères. L'activité des cellules de Sertoli est sous la dépendance de la FSH (Follicle-Stimulating Hormone), hormone hypophysaire et la testostérone, sécrétée par les cellules de Leydig (Amann, 2011). Le nombre de cellules de Sertoli présentes dans un testicule conditionne le nombre de spermatozoïdes que peut produire ce testicule. Les cellules de Sertoli se multiplient seulement au cours de la vie fœtale et de la première année de vie de l'individu et leur nombre est caractéristique de l'espèce (Amann, 2011).

### I.3.1.3. Les cellules de Leydig :

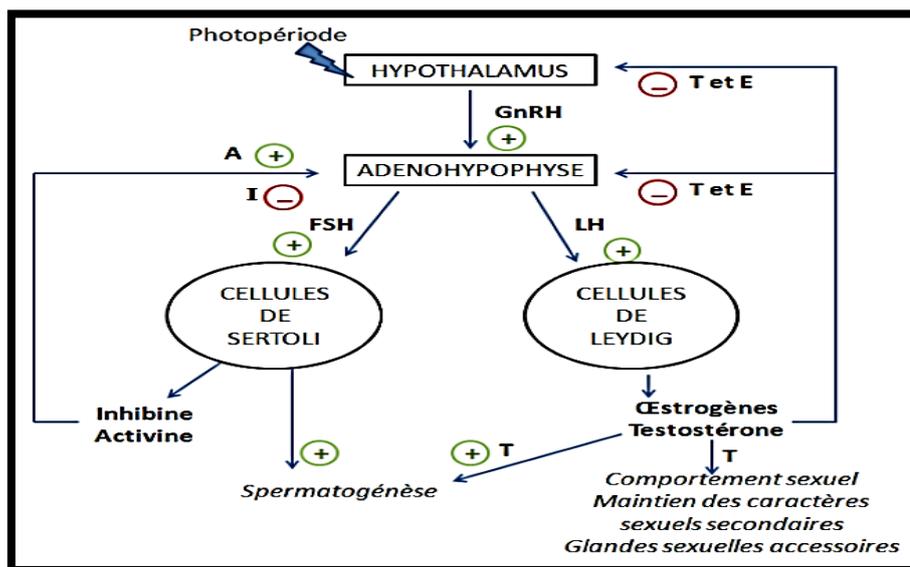
Les cellules de Leydig sont localisées dans le tissu interstitiel, en dehors des tubes séminifères, et à proximité des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Leur rôle principal est la synthèse et la sécrétion d'hormones stéroïdiennes. Ces hormones vont participer à la régulation de l'activité de l'épithélium spermatogène, de l'axe hypothalamo-hypophysaire et des glandes sexuelles accessoires (Amann, 1993).

Les hormones stéroïdiennes sécrétées par les cellules de Leydig sont : la testostérone, l'androstènedione, l'androstènediol, la dihydrotestostérone, la 3 alpha-androstanédiol et la 3 bêtaandrostanédiol, l'œstrone, l'œstradiol et la progestérone. Bien que les cellules de Leydig sécrètent plus d'œstrogènes que de testostérone chez l'étalon, la testostérone constitue l'hormone stéroïdienne avec la plus grande importance physiologique dans la régulation de la fonction de reproduction (Amann, 2011).

Notamment, la LH (luteinizing hormone), sécrétée par l'adénohypophyse, stimule la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig (Amann, 2011).

### I.3.2. La régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez le cheval :

Chez la grande majorité des espèces mammifères, dont les équidés, l'activité sexuelle normale est sous le contrôle du fonctionnement dynamique de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire. Des stimuli environnementaux tels que la photopériode régulent la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus ; le taux plasmatique de GnRH contrôle la synthèse et la sécrétion de LH et FSH par l'adénohypophyse et les hormones gonadotropes (LH et FSH) régulent la production des androgènes, œstrogènes, protéines et autres facteurs locaux sécrétés par les testicules. Finalement, les androgènes, œstrogènes et hormones glycoprotéiques (inhibine, activine) testiculaires exercent des rétrocontrôles négatifs sur l'hypothalamus et l'hypophyse (Roser, 2011). La figure 22 représente de manière schématique et synthétique les contrôles hormonaux impliqués dans la fonction de reproduction chez cheval.



**Figure22** : Schéma de la régulation endocrinienne de la fonction de reproduction chez le cheval (Amann, 2011).

A : activine ; E : œstrogènes ; I : inhibine ; T : testostérone.

### I.3.3. La puberté chez le cheval :

Chez l'étalon, la puberté se définit comme le moment à partir duquel l'individu est capable de prendre part avec succès dans l'acte de reproduction. Elle a lieu entre 19 et 21 mois dans l'espèce équine (Amann, 2011).

#### **I.3.4. La reproduction chez l'âne :**

L'appareil génital des équidés a la propriété de se développer précocement au cours de la vie fœtale. En effet, les gonades augmentent rapidement de volume dès le milieu du deuxième mois de gestation par le déploiement d'un tissu interstitiel particulier au sein duquel des tubes séminifères pleins, de faible calibre et peu flexueux s'intercalent. Cette croissance est maximum au sixième mois de gestation. On observe ensuite une diminution de volume due au développement lent des tubes séminifères au détriment du tissu interstitiel. A la naissance, les gonades présentes dans l'espace inguinal semblent remonter dans ce dernier et leur descente ne s'opère qu'entre six et dix-huit mois, parfois plus (Barone, 1978).

#### **I.3.5. Les cause de stérilité de mulet :**

La recherche des causes de stérilité des hybrides commence par l'étude des anomalies au niveau de l'appareil reproducteur.

Macroscopiquement, les testicules de mulets sont de taille inférieure à ceux des ânes. Pathak et al. (2013) ont surtout mis en évidence des différences significatives de poids des testicules, du nombre de cellules de Leydig entre le testicule d'âne et celui de mulet. Le diamètre cellulaire et le noyau des cellules de Leydig apparaissent également plus importants chez l'âne par rapport au mulet.

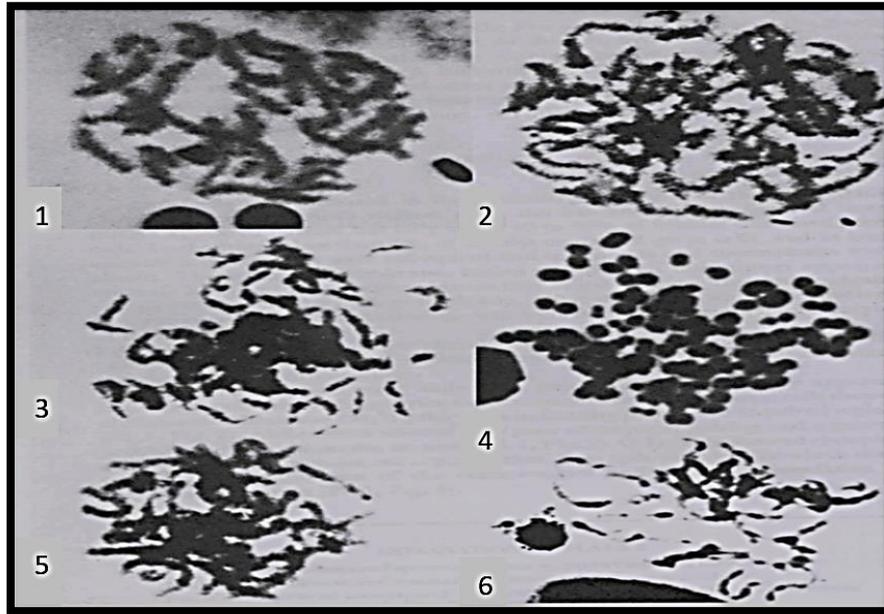
##### **I.3.5.1. Etude cytogénétique des hybrides (mule et bardot) :**

De nombreuses recherches ont été entreprises pour découvrir la cause de l'infertilité des mâles et femelles mules et bardots. Des études concernant la méiose chez le mulet et le bardot ont mis en évidence des irrégularités d'appariement des chromosomes au stade pachytène, dues aux différences de caryotypes entre les espèces parentales : *Equus caballus*  $2n = 64$  chromosomes et *Equus asinus*  $2n = 62$  chromosomes.

Chandley et al. (1975) ont par exemple observé des spermatoocytes au stade pachytène de prophase de méiose chez mulet et bardot (figure 23), après avoir confirmé à partir de lymphocytes du sang périphérique que ces animaux étaient réellement des hybrides ( $2n = 63$  et de nombreuses paires de chromosomes inégalement appariées).

Chez le mulet, ces irrégularités d'appariement apparaissent dans les chromosomes de tous les spermatoocytes au stade pachytène examinés (figure 23 2-4). Certaines cellules présentent des branches de chromosome d'épaisseur variée, indiquant des régions appariées et non-appariées,

tandis que les autres semblent avoir des difficultés à s'apparier et il règne un désordre général dans le réseau de chromatine. Certaines autres cellules présentent des amas de chromatine et semblent subir une dégénérescence. Dans deux cellules observées, les chromosomes sont extrêmement condensés, et il existe une apparente association en éléments de taille similaire.



**Figure 23:** Spermatocytes de cheval, mulet et bardot au stade pachytène de prophase de méiose B (Chandley *et al.*, 1975).

- (1) : Spermatocyte au stade pachytène chez un étalon arabe. (2-3) : Spermatocyte au stade pachytène chez un mulet. (4) : Spermatocyte au stade pachytène chez un mulet montrant une association d'éléments chromosomiques de taille égale. Ceci pourrait être une image de diakinèse de métaphase I tétraploïde. (5) : Spermatocyte au stade pachytène chez un bardot, présentant un appariement quasi-normal. (6) : Spermatocyte dégénéré de bardot.

### I.3.5.2. La stérilité des hybrides reconnue de tous temps :

La stérilité légendaire des mules et des mulets est reconnue depuis l'époque d'Aristote en 350 avant Jésus Christ. Stensen en 1675 a cependant décrit que des follicules et des corps jaunes peuvent parfois être présents dans les ovaires de mules.

La première explication concernant la stérilité des mulets a été fournie par Wodsedalek en 1916, qui a étudié les testicules de nombreux mulets et qui a conclu qu'il existait un blocage au cours de la méiose en raison d'une incompatibilité entre le lot de chromosomes paternels d'âne et le lot de chromosomes maternels de cheval.

Hsu et Benirschke en 1969 (Taylor et Short, 1973) ont renforcé cette idée, puisqu'une étude a montré que l'âne avait 62 chromosomes dont 38 étaient métacentriques, alors que le cheval disposait de 64 chromosomes dont 26 métacentriques. Ainsi, la mule et son hybride réciproque,

le bardot, ont chacun 63 chromosomes avec de multiples possibilités d'arrangement de paires. Il existe également un blocage de la spermatogenèse au stade pachytène de la méiose dans les testicules d'hybrides interspécifiques issus de croisement zèbre x cheval et zèbre x âne, où le phénomène d'incompatibilité chromosomique est encore plus grand.

#### **I.4. ETUDE PHYLOGÉNÉTIQUE :**

Parmi les méthodes modernes de classification des espèces vivant la phylogénie, les espèces peuvent être classées par cette méthode pour les comparer.

##### **I.4.1. Définition de la phylogénie :**

La phylogénie ou phylogenèse se définit, en général, dans l'encyclopédie comme « l'histoire de la formation et de l'évolution d'une espèce ». Le terme phylogenèse provient du grec phûlon « tribu » et genesis « origine » et il a été présenté par Haeckel dès 1860 (**Haeckel, 1860**), qui l'a définie comme « l'histoire du développement paléontologique des organismes par analogie avec l'ontogénie ou histoire du développement individuel ». La phylogénie constitue un procédé pour construire des classifications d'espèces. La phylogénie moléculaire, dont certaines méthodes de reconstruction seront présentées par la suite, l'étude de l'histoire évolutive des espèces en se basant sur une portion de leur séquence moléculaire.

##### **I.4.2. Phylogénie moléculaire :**

La phylogénie moléculaire consiste à reconstruire les relations de parenté entre les séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Elle permet d'étudier l'évolution des séquences et la relation de parenté entre espèces. La nature quantitative des relations, ainsi établies, a permis le développement de méthodes et de règles rigoureuses pour la construction des arbres phylogénétiques (**Cheikh, 2006**). Elle étudie l'histoire évolutive des espèces étudiées à la base d'une portion de leur séquence moléculaire (**Diallo, 2009**).

La phylogénie moléculaire est basée sur les principes suivants :

- Les mutations se produisent au hasard.
- Les mutations s'accumulent au cours du temps.
- Les mutations se produisant chez un individu et se fixent dans sa descendance.

Pour reconstituer des phylogénies, on peut utiliser différents gènes, ou les protéines correspondantes, appelés marqueurs phylogénétiques (**Alauzet, 2009**).

Un marqueur génétique est basé sur la variation dans le génome, cette variation est aussi nommée polymorphisme. Selon le niveau taxonomique étudié, il est essentiel de choisir un type de marqueur qui lui est adapté. Par exemple, si le but visé est de distinguer des groupes

d'individus au niveau de l'espèce, les marqueurs utilisés devront être plus conservés que dans le cas des études de populations (**Beaulieu, 2007**).

Les polymorphismes ADN peuvent être détectés dans l'ADN nucléaire et l'ADN d'organites, trouvé dans les mitochondries et les chloroplastes. Les marqueurs moléculaires concernent la molécule d'ADN elle-même, et, comme tels, sont considérés comme des mesures objectives de la variation (**Vicente et Fulton, 2003**).

#### **I.4.2.1. Marqueurs d'ADN nucléaire :**

Un certain nombre de marqueurs sont à présent disponibles pour détecter les polymorphismes d'ADN nucléaire. Dans les études sur la diversité génétique, les marqueurs les plus fréquemment utilisés sont les microsatellites (**Rischkowsky et Pilling, 2008**).

#### **I.4.2.2. Marqueurs d'ADN mitochondrial :**

Les polymorphismes d'ADN mitochondrial (ADNmt) ont été largement utilisés lors des analyses de la diversité phylogénétique et génétique. L'ADNmt haploïde transporté par les mitochondries du cytoplasme cellulaire, possède un mode maternel d'hérédité (les animaux héritent l'ADNmt de leurs mères et non de leurs pères) et un taux de mutation élevé ; il ne se recombine pas. Ces caractéristiques consentent aux biologistes de reconstruire les relations évolutives intra et interraciales par l'évaluation des modèles de mutation de l'ADNmt.

Les marqueurs d'ADNmt peuvent également fournir un moyen rapide de détecter l'hybridation entre les espèces et les sous-espèces d'animaux d'élevage (**Nijman et al., 2003**) ou même sauvage.

#### **I.4.3. Représentation phylogénétique :**

L'élaboration de technologies à haut débit serait inutile si l'on ne disposait pas des capacités d'analyse des données biologiques en croissance exponentielle. Ces données doivent se stocker dans des bases de données électroniques associées à des logiciels spécialement conçus pour la mise à jour, l'interrogation et l'extraction. Les informations doivent être facilement accessibles et flexibles aux interrogations pour faciliter l'extraction des informations pouvant être analysées pour éclaircir les voies métaboliques et le rôle des protéines et des gènes impliqués (**Rischkowsky et Pilling, 2008**).

La bioinformatique est fondamentale pour associer les informations provenant de sources différentes et générer une connaissance nouvelle à partir de données existantes. Elle dispose également des potentialités pour simuler la structure, la fonction et la dynamique des systèmes moléculaires et est donc utile pour la formulation des hypothèses et pour la conduite du travail expérimental (**Rischkowsky et Pilling, 2008**).

Pour réaliser une phylogénie, un bon nombre de programmes informatiques sont disponible sur la grande toile avec plus de 367 logiciel (**Djekoun et Hamidechi, 2010**).

#### I.4.4. Arbre phylogénétique :

Un arbre phylogénétique ou un dendrogramme est une représentation graphique de la phylogénie (figure 24). Il exprime les liens entre les taxa sous la forme d'une succession de branchements (**Rasmont, 1997 ; Gattolliat, 2002 ; Schmidt, 2003**).

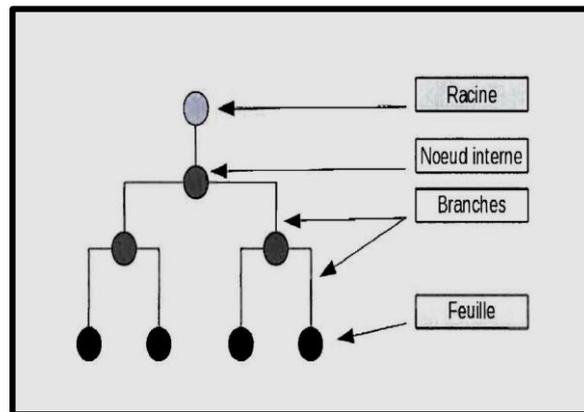


Figure 24: Exemple d'un arbre phylogénétique.

#### I.5. Analyses moléculaires :

- **Echantillonnage** : Les prélèvements utilisés pour les analyses moléculaires sont : os, tissu, poils, sang ou matériel fécal.
- **Extraction et quantification de l'ADN** : L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité de débris cellulaires. Il existe beaucoup de kits d'extraction et de purification de l'ADN qui sont commercialisés. Cependant il a été montré que la sensibilité de détection par PCR de l'ADN extrait varie selon le kit utilisé (**Yoshikawa et al., 2011**).
- **Amplification de l'ADN par PCR** : La Polymérase Chain Réaction (PCR) (**Kleppe et al., 1971**) est une méthode *in vitro* d'amplification de séquences spécifiques d'ADN en un très grand nombre de copies. Elle permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN dans un mélange réactionnel approprié.
- **Séquençage** : Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN précédemment amplifié par PCR. La méthode utilisée

aujourd'hui (**Sanger, 1977**) repose sur l'utilisation de didésoxynucléotides, qui bloquent la synthèse de l'ADN après leur incorporation.

- ✚ Cette étude est réalisée au niveau de l'université des sciences et de la nature et de vie Blida -1- sur une période étalée du mois de février au mois de septembre.
- ✚ Notre étude sera présentée en deux parties :
  - Une partie histologique dont l'intérêt est d'étudier et comparer l'histologie de l'appareil génital mâle du cheval (*Equus caballus*) avec des testicules de l'âne (*Equus asinus*) et des testicules du mulet.
  - ✓ Nous avons réalisé les techniques histologiques au niveau du laboratoire d'anatomie pathologie du centre hospitalier universitaire Issad Hassani de Béni messous, Alger.
  - ✓ L'interprétation des lames et l'étude morphométrie sont réalisées au niveau du laboratoire de recherche sur les zones arides (LRZA) de l'université des sciences et de la technologie Houari Boumediene (USTHB) d'Alger.
  - Une partie génétique, dont l'intérêt est d'étudier la phylogénie du genre *Equus*, afin de trouver la position exacte des espèces *Equus caballus*, *Equus asinus*, *Equus asinus x Equus caballus* dans l'arbre phylogénétique.
  - ✓ L'étude phylogénétique est réalisée au niveau du laboratoire de biodiversité et environnement : interaction, génome (LBEIG) FSB de l'université des sciences et de la technologie Houari Boumediene (USTHB) d'Alger.

## II. MATERIEL ET METHODE:

### II.1. Matériel non biologique :

L'ensemble du matériel non biologique utilisé dans ce mémoire est présenté en annexe I.

### II.2. Matériel biologique :

Notre travail sur l'histologie de l'appareil génitale mâle du cheval (*Equus caballus*), et sa position dans l'arbre phylogénétique des *Equus caballus* de différentes régions, mais pour bien positionner notre espèce sur le plan histologique et phylogénétique nous avons comparé avec d'autres espèces qui sont l'âne (*Equus asinus*) et le mulet (hybride).

- Nous avons récupéré l'appareil génitale mâle des chevaux, ainsi que l'appareil génitale mâle de mulet à l'abattoir d'EL HARRACH, 24 avenue Ben Youcef El Khateb El Harrach willaya d'Alger.
- Nous avons récupéré les testicules de l'âne à l'unité zoologique et botanique (parc Ben Aknoun) willaya d'Alger.
- Le nombre des échantillons est représenté dans le tableau suivant :

Tableau I : Représente le nombre des échantillons.

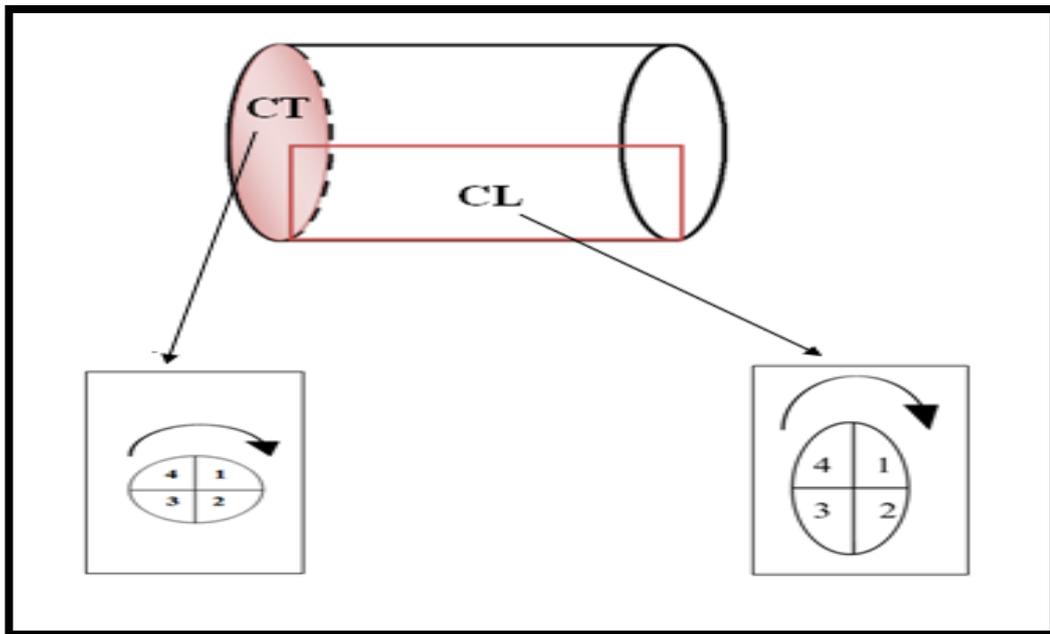
Échantillon \ Espèce	Cheval	Âne	Mulet
Testicule	3	3	6
Appareil génitale	4	-	1

### II.2.1. Dissection de l'appareil génitale mâle du cheval et du mulet :

La dissection est une opération qui est principalement réalisée en cours d'anatomie, dans notre cas nous avons nettoyé l'appareil génitale mâle, nous avons enlevé le tissu adipeux et gardé ce qui est montré dans la figure 25 a et b.

### II.2.2. Réalisation des coupes :

- Nous avons réalisé deux types de coupes, transversale et longitudinale.
- En raison de la grande taille du testicule et du pénis nous avons divisé en quatre sections numérotées dans le sens des aiguilles d'une montre, comme le montre l'image suivante (figure 25).



**Figure 25 :** Dessin illustrant la réalisation des coupes au niveau du testicule et du pénis dans le sens des aiguilles d'une montre.

CT : Coupe transversale.

CL : Coupe longitudinale.

### **II.3. Technique histologique**

La confection des coupes histologiques permet l'observation des tissus au microscope photonique après une coloration spécifique. Elle comporte plusieurs étapes, rapportées essentiellement dans Martoja et Martoja (1967) et Gabe (1968).

Le matériel spécifique utilisé pour la technique histologique est présenté en annexe I.

#### **II.3.1. Fixation :**

Etape primordiale, elle permet d'immobiliser et conserver les structures cellulaires et tissulaires dans un état aussi proche que possible du vivant ; les organes sont plongés dans un volume de fixateur (formol à 10%) environ 60 fois supérieur à celui de l'organe.

Chaque pièce est accompagnée d'une étiquette portant toutes les indications utiles.

#### **II.3.2. Inclusion :**

Ce processus comporte quatre étapes :

**II.3.2.1. Déshydratation :** L'inclusion dans la paraffine nécessite au préalable la déshydratation des pièces histologique (bains successifs d'alcool de degrés croissants, jusqu'à l'absolu, (annexe I). La paraffine étant insoluble dans l'eau et soluble dans les hydrocarbures benzéniques benzène, toluène ou xylène.

**II.3.2.2. Eclaircissement :** Il permet l'élimination complète des traces d'alcool et l'imprégnation par les 5 bains de xylène, (annexe I).

**II.3.2.3. Pénétration des pièces par la paraffine :** Cette étape consiste à éliminer le butanol et à le remplacer par la paraffine. Les pièces sont placées successivement dans deux bains de paraffine chacune à l'étuve à 80°C pendant une heure.

**II.3.2.4. Confection des blocs de paraffine :** Dans cette étape, ont été utilisés des moules de métal (tissus-TEK111) et des cassettes en plastique sur lesquelles sont inscrites les indications de la pièce traitée. La paraffine fondue est versée dans les moules légèrement préchauffés à 70°C où on dépose délicatement l'organe imprégné. La cassette est déposée sur le moule. Le bloc n'est démoulé qu'après refroidissement total sur une plaque froide et il est conservé en congélation à une température de -4°C jusqu'à la réalisation des coupes.

#### **II.3.3. Microtomie :**

**II.3.3.1. Confection des coupes :** Tout d'abord, installer le bloc sur le porte bloc du microtome qui est réglé à 20 µm afin d'éliminer le surplus de la paraffine. Lorsque la pièce apparaît dans le plan de coupe, on ramène l'échelle à 1 µm pour obtenir des coupes fines sous forme de rubans.

**II.3.3.2. Etalement des coupes :** On dépose les rubans obtenus sur des lames nettoyées à l'eau chauffée sur une plaque chauffante réglée à 45°C. A l'aide d'un diamant, les indications de l'organe sont gravées sur la lame correspondante.

#### **II.3.4. Coloration :**

Le but de la coloration est de rendre plus évidents les différents constituants cellulaires et tissulaires. Ceci est obtenu à l'aide de coloration topographique : hématoxyline éosine, trichrome de Masson, rouge congo. Les coupes ne seront prêtes à recevoir les colorants qu'après les trois étapes suivantes :

**II.3.4.1. Déparaffinage :** Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent pénétrer. Le réactif utilisé est le xylène. Les coupes sont passées dans 3 bains de xylène pendant 5 à 10 min pour chacun.

**II.3.4.2. Réhydratation :** Elle a pour objet de retirer le xylène du tissu et le remplacer par l'eau. Les lames sont passées dans les trois bains successifs d'alcool de degrés décroissants (100°, 96°, 70°). Les pièces sont enfin lavées à l'eau distillée pendant 5 min environ avant coloration.

#### **II.3.4.3. Coloration :**

-Hématoxyline Éosine (HE) (la coloration proprement dite, voire annexe I), c'est une coloration qui se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine. L'hématoxyline colore notamment les noyaux en bleu/violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs selon leur acidophilie.

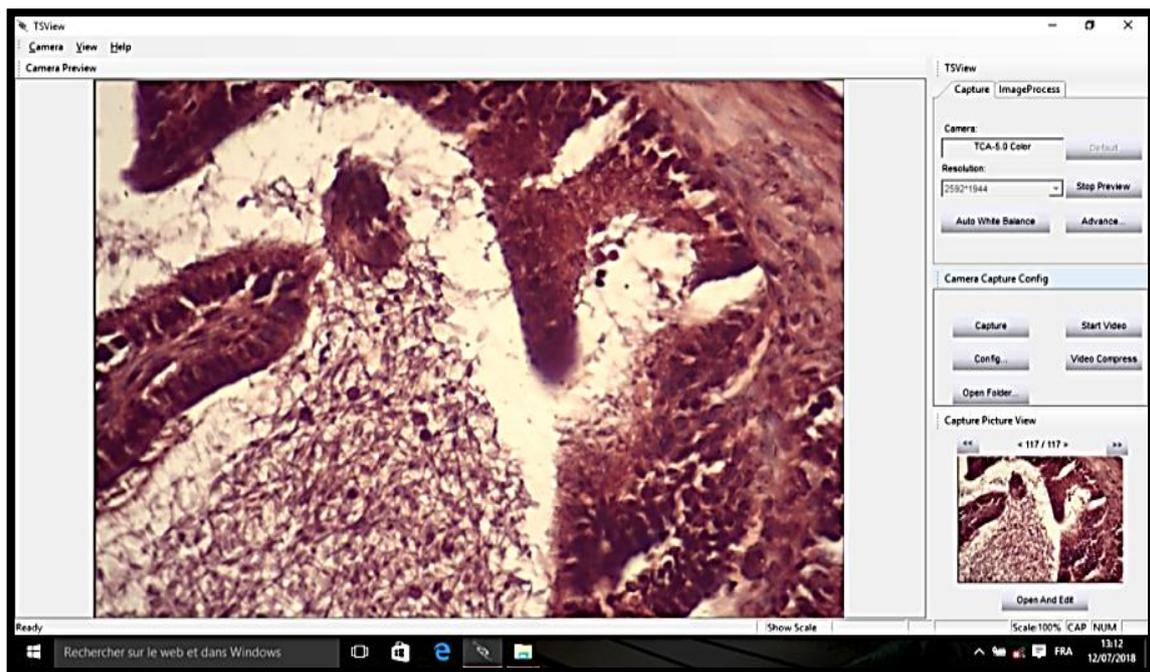
-Trichrome de Masson (la coloration proprement dite, voire annexe I), met en évidence les éléments du tissu conjonctif en particulier le collagène en vert, le noyau en noir et le cytoplasme en rouge.

-Rouge Congo est une molécule diazoïque (la coloration proprement dite, voire annexe I), il est aussi utilisé comme colorant histologique, cette coloration marque en rouge les dépôts d'amylose (biréfringence en lumière polarisée) fibres rouges (équivalent d'une réticuline) polynucléaires éosinophiles rouges.

**II.3.5. Montage et observation :** Le montage est l'opération qui consiste à conserver les colorations à l'aide de l'Eukitt qui permet l'adhérence entre la lame et la lamelle. Après montage, les lames sont séchées sur papier absorbant et enfin observées au microscope photonique (Leica). Cet appareil permet d'obtenir une image agrandie (40 à 1000 fois) par une combinaison optique de la coupe éclairée par une lumière qui la traverse.

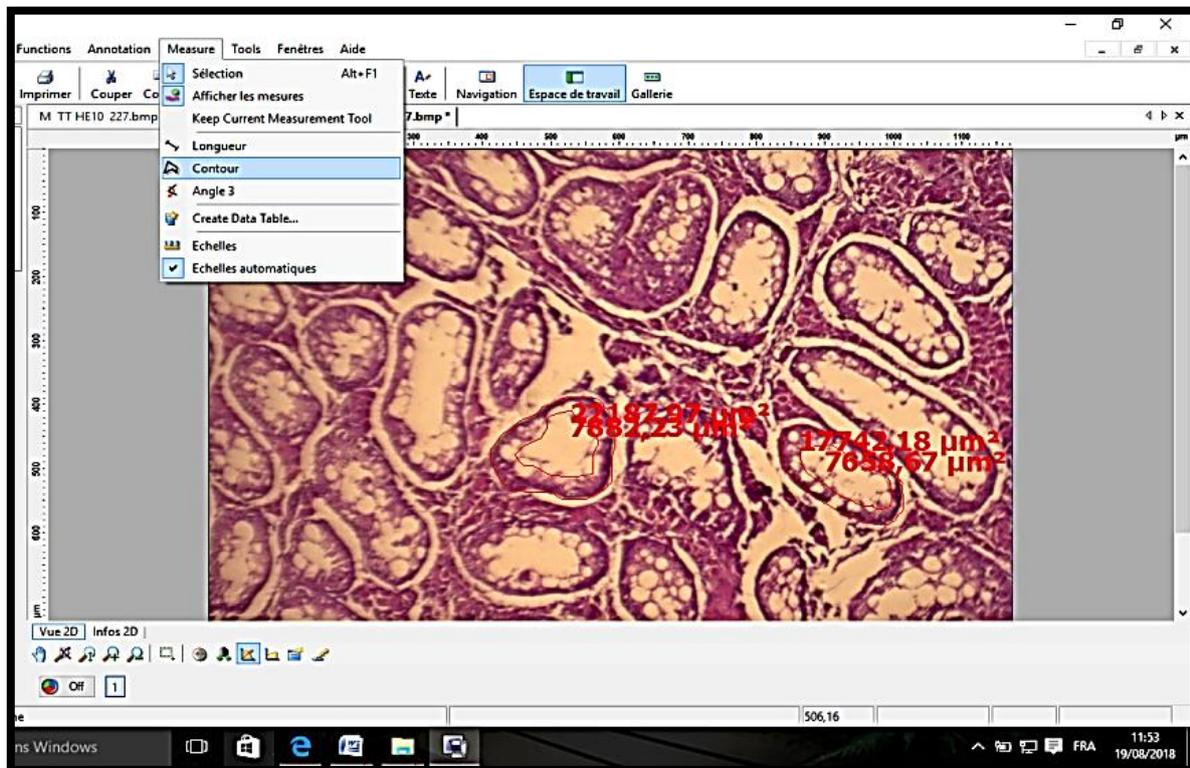
#### II.4. Etude morphométrique :

Nous avons tracé des histogrammes pour la comparaison entre les tailles des tubes séminifères, l'épididyme et le canal déférent du cheval *Equus Caballus* et l'âne *Equus asinus* et l'hybride mulot, les mesures ont été réalisées sur des coupes histologiques de nos animaux. Les images sont capturées par un appareil photo numérique (HiROCAM, MA88-500, BME lab and Science, St. Paul, USA) connecté à un microscope photonique (Optika B 235, Italie) via le logiciel TS View (Microscopes America, Cumming, GA, USA) (figure 26).



**Figure 26 :** Photo représentant la capture d'une image d'aspect histologique par un appareil photo numérique (HiROCAM, MA88-500, BME lab and Science, St. Paul, USA) connecté à un microscope photonique (Optika B 235, Italie) via le logiciel TS View.

Le contour du tube séminifère et l'épididyme et la longueur des invaginations du canal déférent ainsi que les cellules et les noyaux de l'épididyme, ont été mesurés via un logiciel



d'analyses et de traitement d'image "Axio Vision 4.6.3.0" (figure 27) développé par la société Carl Zeiss. Ce système d'analyse d'images a été étalonné à l'aide d'une lame micrométrique graduée afin d'obtenir les mesures, des longueurs et des diamètres et périmètres en  $\mu\text{m}$ , les surfaces en  $\mu\text{m}^2$ . Notre étude morphométrique sur 3 animaux (cheval, âne, mulet), pour chaque animal nous avons effectué 150 mesures au niveau des testicules, au niveau de l'épididyme 60 mesures à G4 et 60 mesures à G40, au niveau du canal déférent 10 mesures à G4 et 30 mesures à G10, nous avons effectuées des mesures de surfaces tubulaires et cellulaires et nucléaires dont le contour a été délimité manuellement.

**Figure 27:** Méthode de mesure des surfaces du tube séminifère (exemple délimité par le tracé rouge) à l'aide du logiciel Axio Vision 4.6.3.0.

## II.5. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  ESM. □ **Moyenne arithmétique ( $\bar{x}$ ) des valeurs individuelles**

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$\Sigma x$  : Somme des valeurs individuelles

$N$  : nombre de valeurs

- **Erreur Standard à la Moyenne (E.S.M)**

$$\text{ESM} = \frac{\delta}{\sqrt{n}} \quad \delta^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

$\delta$  : Écart type

$x_i$ : Valeur individuelle

- **Coefficient de corrélation**

$$r = \frac{\sum x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

$x_i$  et  $y_i$  : valeur individuelle comparées  $x$  et  $y$  :

moyenne des valeurs individuelle comparées

- **Validité statistique**

La validité statistique des différences est calculée par student en utilisant le logiciel **statistica**.

La différence entre deux moyennes comparées est statistiquement significative si la probabilité "p", lue en fonction du nombre de degrés de liberté ( $d.d.l = n_1 + n_2 - 2$ ) est égale ou inférieur à 5%.

Si  $p > 0,05$  : la différence n'est pas significative (ns).

Si  $0,01 < p < 0,05$  : elle est significative (\*).

Si  $0,001 < p < 0,01$  : elle est très significative (\*\*).

Si  $p < 0,001$  : elle est hautement significative (\*\*\*)

## II.6. Analyses phylogénétiques :

L'objectif de cette partie repose sur le positionnement de différentes espèces de genre *Equus* dans un arbre phylogénétique général réalisé à partir des séquences d'ADN des gènes codants traités par le logiciel MEGA version 5 (logiciel de la bioinformatique), pour cela nous décrirons les étapes d'analyse moléculaire et la méthodologie utilisée depuis l'échantillonnage, l'extraction d'ADN, la PCR, le séquençage, jusqu'au traitement des séquences qui se trouvent au niveau de la Genbank en vue de leur utilisation dans l'étude phylogénétique.

### II.6.1. Etude de la GenBank :

Il existe trois grandes banques publiques d'ADN :

- EMBL d'EMBO (European Molecular Biology Organization Europe).
- GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information États-Unis).
- DDBJ (Dna Data Base of Japon).

Les trois banques stockent les mêmes séquences, avec les mêmes numéros d'accès, dans notre travail nous avons utilisé la GenBank.

#### II.6.1.1. Présentation de la GenBank :

GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> a été créé au début des années 1980 au Los Alamos National Laboratory. Cette banque (figure28) est maintenant maintenue et distribuée par le NCBI (National Center For Biotechnology Information) et regroupe l'intégralité des séquences nucléotidiques publiquement disponibles. Elle fait partie de l'International Nucleotide Sequence Database Collaboration qui vise à unifier les données par un échange quotidien entre les trois banques nucléotidiques majeures que sont GenBank, L'EMBL Nucleotide Séquence Database et la DDBJ (DNA Data Bank of Japan). Cette structure d'échanges, ainsi que le libre accès à la soumission de séquences, ont permis une croissance quasi-exponentielle du nombre de séquences dans la banque (Benson et al., 2009).

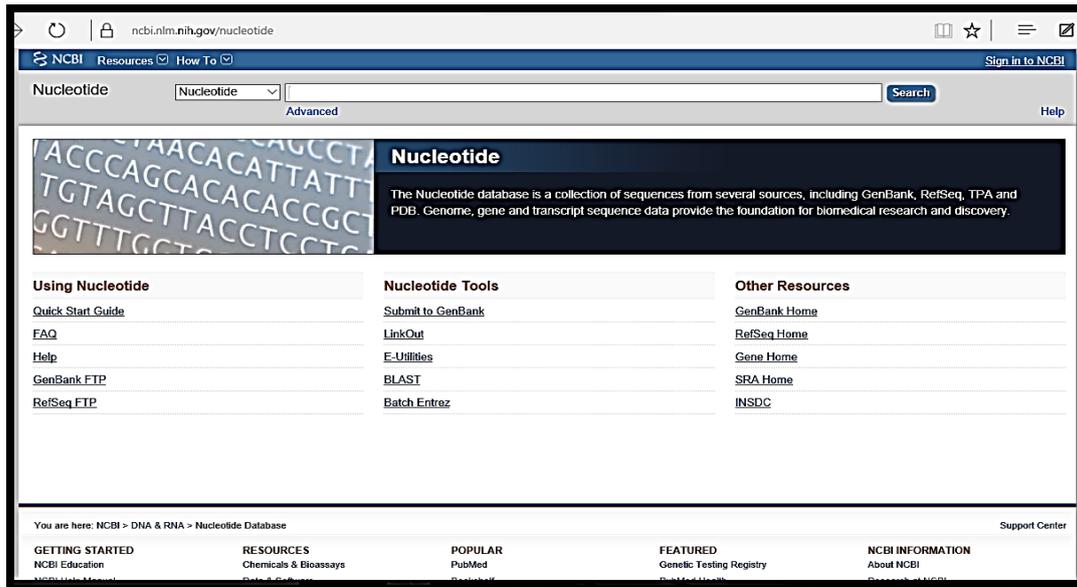


Figure 28: La page d'accueil de la GenBank.

### II.6.1.2. Utilisation de la Genbank :

- Toutes les séquences étudiées dans notre travail ont été téléchargées à travers la GenBank, nous sommes passés par plusieurs étapes successives (figure 29) :
  - Entré le lien suivant : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
  - Choisi recherche par taxonomie.
  - Écrit le nom du genre *Equus*.

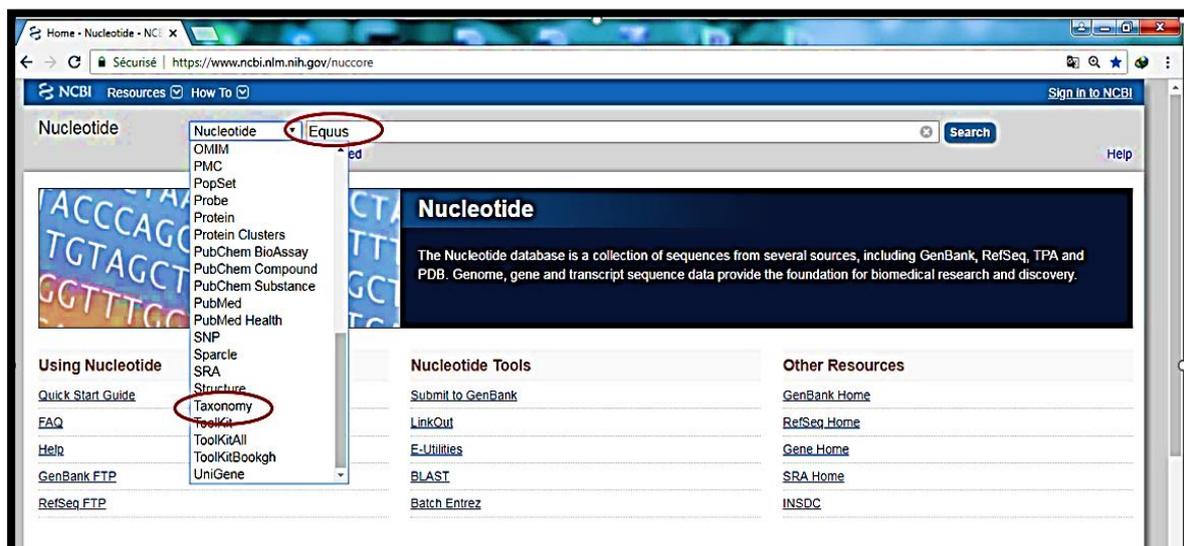


Figure 29 : Représente les étapes initiales pour récupérer les séquences de la GenBank.

- Obtention de toutes les espèces qui appartiennent au genre *aquus* (figure 30).

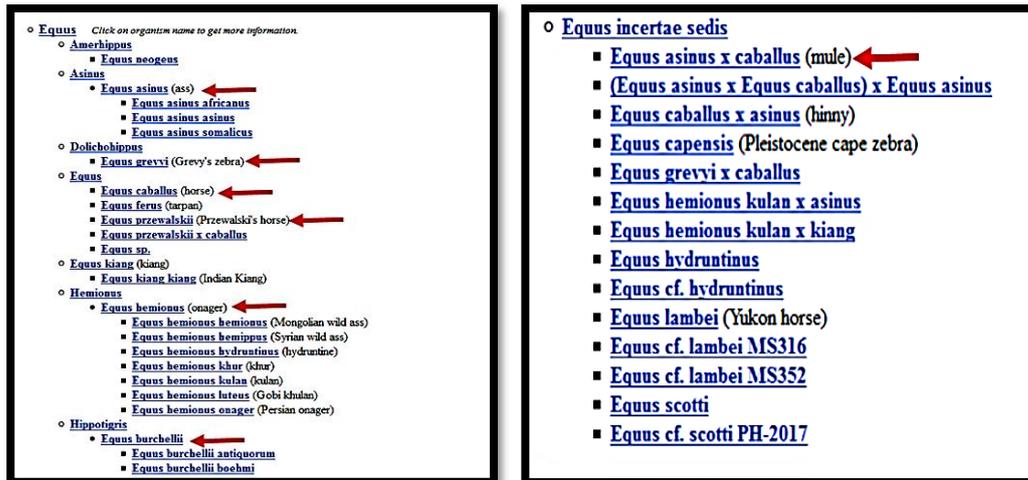


Figure 30 : les espèces du genre *Equus*.

- Nous avons analysé toutes les espèces une par une pour identifier le nombre des séquences nucléotidiques trouvées dans cette banque (figure 31a et b).

Entrez records		
Database name	Subtree links	Direct links
Nucleotide	341,763	-
Nucleotide EST	37,756	-
Nucleotide GSS	316,770	-
Protein	159,992	-
Structure	329	-
Genome	9	-
Popset	414	166
GEO Datasets	1,333	-
UniGene	9,411	-
PubMed Central	2,768	2,755
Gene	98,713	-
SRA Experiments	5,500	-
Protein Clusters	13	-
Bio Project	224	2
Bio Sample	4,381	-
Bio Systems	492	-
Assembly	7	-
Clone DB	163,628	-
Probe	9,007	-
PubChem BioAssay	471	-
Taxonomy	122	1

Figure 31a : Données globales disponibles sur le genre *Equus* selon la Genbank (gène, protéine).

A		B			C	
Entrez records		Entrez records			Entrez records	
Database name	Direct links	Database name	Subtree links	Direct links	Database name	Direct links
Nucleotide	178,062	Nucleotide	52,909	52,802	Nucleotide	12
Nucleotide EST	37,756	Nucleotide GSS	30	30	Protein	10
Nucleotide GSS	316,740	Protein	43,106	43,019	Popset	2
Protein	77,178	Structure	1	1	GEO Datasets	11
Structure	328	Genome	1	1	PubMed Central	1
Genome	1	Popset	74	74	SRA Experiments	52
Popset	323	GEO Datasets	8	8	Bio Project	4
GEO Datasets	1,314	PubMed Central	285	238	Bio Sample	33
UniGene	9,411	Gene	27,044	27,044	Taxonomy	1
PubMed Central	1,840	SRA Experiments	193	25		
Gene	43,360	Protein Clusters	13	13		
SRA Experiments	3,706	Bio Project	14	9		
Protein Clusters	13	Bio Sample	45	29		
Bio Project	201	Assembly	2	1		
Bio Sample	4,104	Probe	3	3		
Bio Systems	492	PubChem BioAssay	1	1		
Assembly	4	Taxonomy	4	1		
Clone DB	163,628					
Probe	8,991					
PubChem BioAssay	470					
Taxonomy	1					

Figure 31 b : Les données disponibles sur la GenBank concernant les espèces :

A : *Equus caballus*. B : *Equus asinus*. C : *Equus caballus* × *Equus asinus* (mulet).

- Les séquences représentatives de chacune des différentes espèces ont été téléchargées sous format FASTA à partir de la GenBank (figure 32).

```

GenBank: MG847601.1
GenBank Graphics PopSet
>MG847601.1 Equus burchellii isolate S7 cytochrome b (cytb) gene, partial cds;
mitochondrial
ATGACAAATATCCGAAAATCCCACCCGCTAATATAAAATTATCAATCACTCTTTCATCGACCTACCAGCCC
CCTCAAACATTTATCATGATGAACTTTGGCTCCCTCCTAGGAATTTGCCTAATCCTCAAATCCTAAC
AGGCCTATTCCTAGCCATACACATACACATCAGACACAACAACCTGCCTTCTCGTCTGTCAACCATATCTGC
CGAGACGTTAACTACGGATGAATCATTGCTACCTCCATGCCAACGGAGCATCCATATTTTCATCTGCC
TCTTATCCACGTAGGACGTGGCTCTACTATGGCTTTACACATTCTAGAAACATGAAACATTGGAAT
TATCTACTTCTCACAGTAATAGCCACAGCATTATAGGCTATGTCTACCATGAGGACAAATATC
    
```

Figure 32 : Format FASTA téléchargé à partir de la Genbank.

### II.6.2. Traitement des séquences d'ADN :

Pour le traitement des séquences, il existe plusieurs logiciels permettant de générer des arbres phylogéniques environ 367 logiciels de bioinformatique, nous avons choisi MEGA version 5 (MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood (Tamura et al., 2011)).

### II.6.2.1. Présentation de logiciel MEGA :

C'est un programme informatique permettant d'explorer et d'analyser des séquences nucléotidiques (figure 33). En effet il est le meilleur de la collection d'outils d'analyse phylogénétique puisqu'elle a été améliorée pour rendre l'utilisation plus facile, elle a la possibilité d'inclure le maximum de vraisemblance entre les séquences grâce à la nouvelle fonctionnalité de marquage (\*). Par rapport aux autres logiciels, il est le meilleur en termes de calculs, l'efficacité et la précision des estimations des arbres (Kumar et Dudley, 2007 ; Kumar et al, 2008).

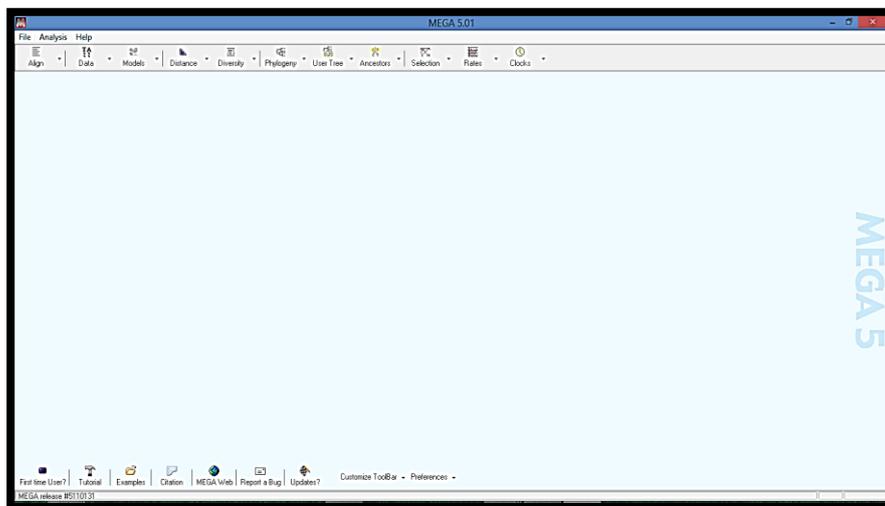


Figure 33 : Représente le logiciel MEGA5.

### II.6.2. 2. Utilisation de MEGA :

- Nous pouvons alors procéder à l'analyse phylogénétique à partir des séquences nucléotidiques de chaque espèce du genre « *Equus* » par différentes étapes :
  - ✚ L'insertion des séquences nucléotidiques forme FASTA dans le logiciel MEGA5.
  - ✚ Les alignements multiples des séquences nucléotidiques ont été réalisés au moyen du logiciel MEGA version 5 (Tamura et al., 2011) (figure 34), par la méthode d'alignement progressif ClustalW (Thompson et al., 1994), nous avons choisi ce type d'alignement parce qu'il est très utile et permet d'étudier les différences et les similitudes entre les séquences d'un même marqueur moléculaire (figure 35).

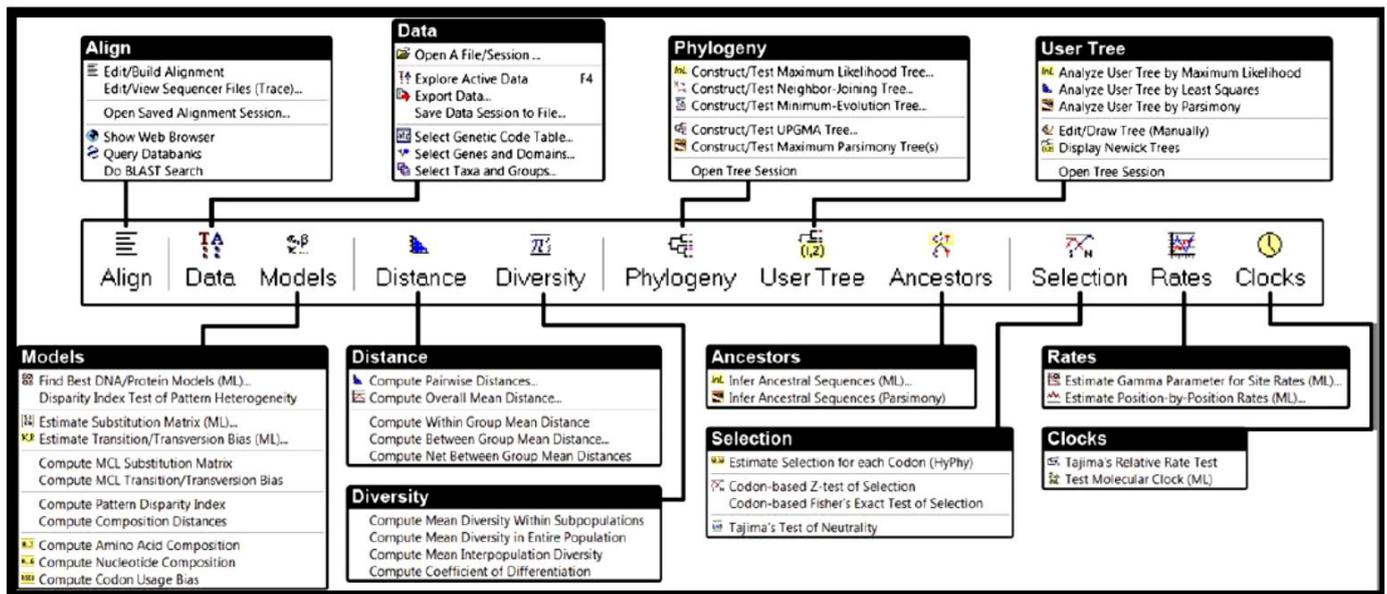


Figure 34: Barre d'outils du logiciel MEGA version 5.

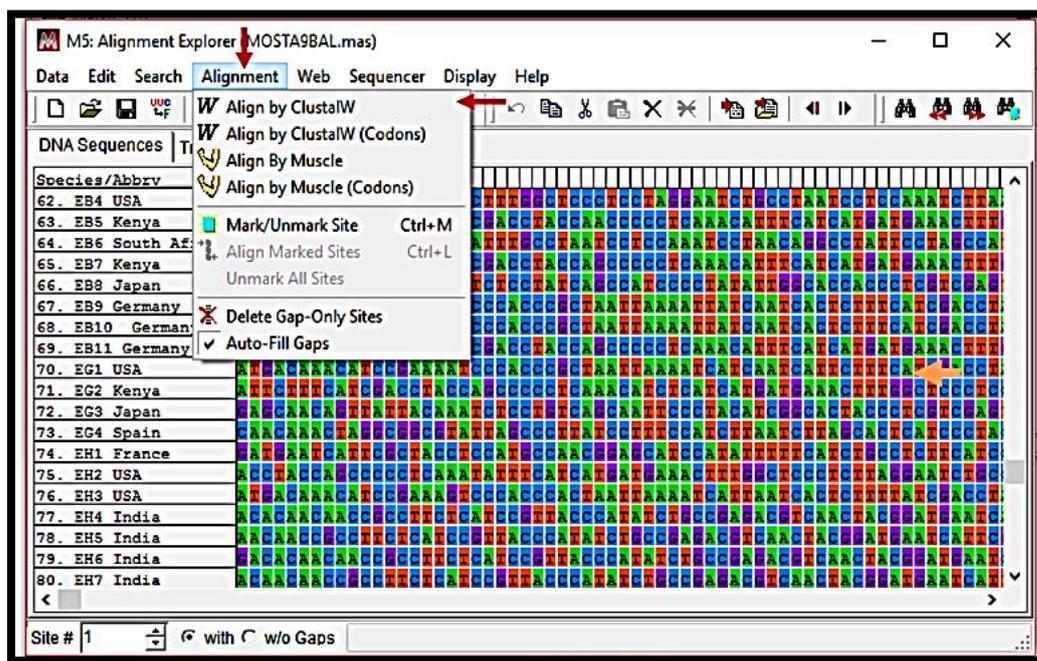
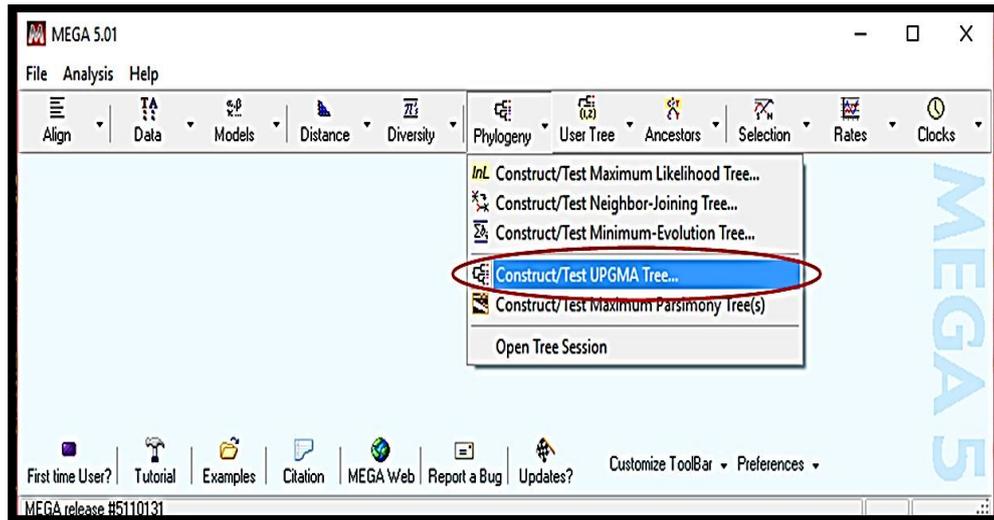


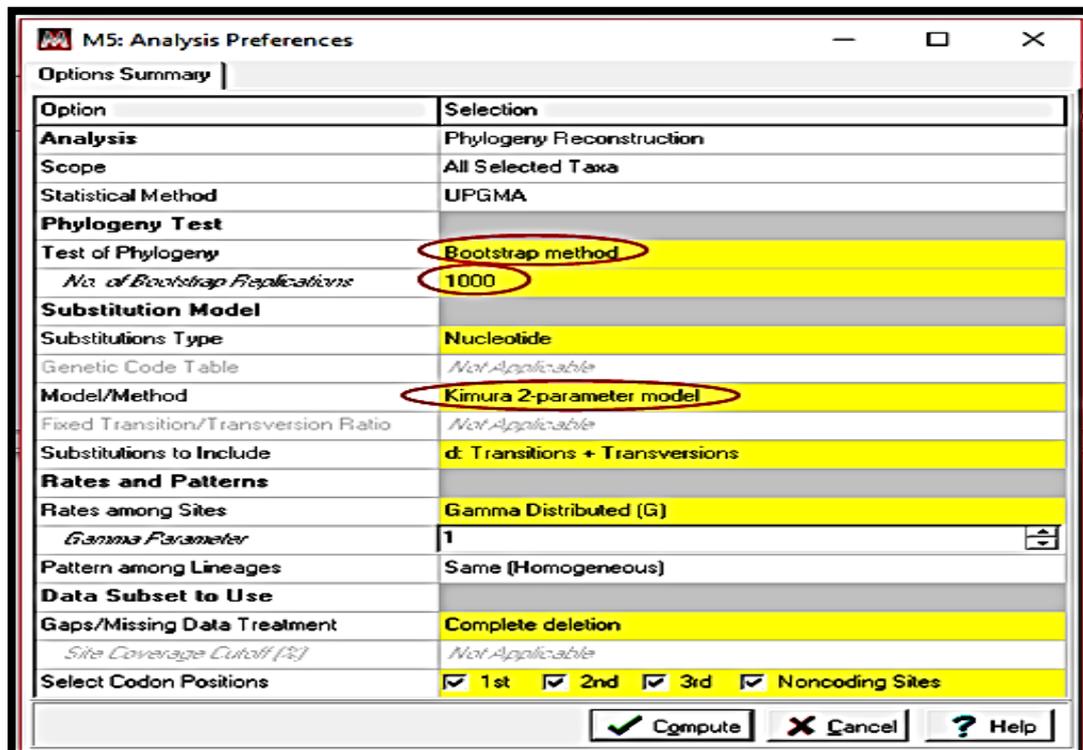
Figure 35 : Le programme ClustalW utilisé pour l'alignement multiple des séquences du marqueur moléculaire choisi.

Une fois les séquences alignées elles sont ensuite comparées et servent à la construction d'arbres phylogénétiques en utilisant l'une des méthodes fondées sur les distances, la méthode UPGMA (figure 36), la plus simple, basée sur l'hypothèse que les taux de mutation et donc les vitesses d'évolution sont identiques sur les différentes branches de l'arbre, en utilisant le modèle de « Kimura 2-paramètres ».



**Figure 36 :** La méthode UPGMA utilisée pour la construction de l'arbre phylogénétique.

- ✚ Pour la construction de l'arbre phylogénétique ; nous avons utilisé la méthode de « Bootstrap », nous avons choisi la valeur 1000, et nous avons utilisé aussi le modèle « Kimura 2-parameter », (figure 37).



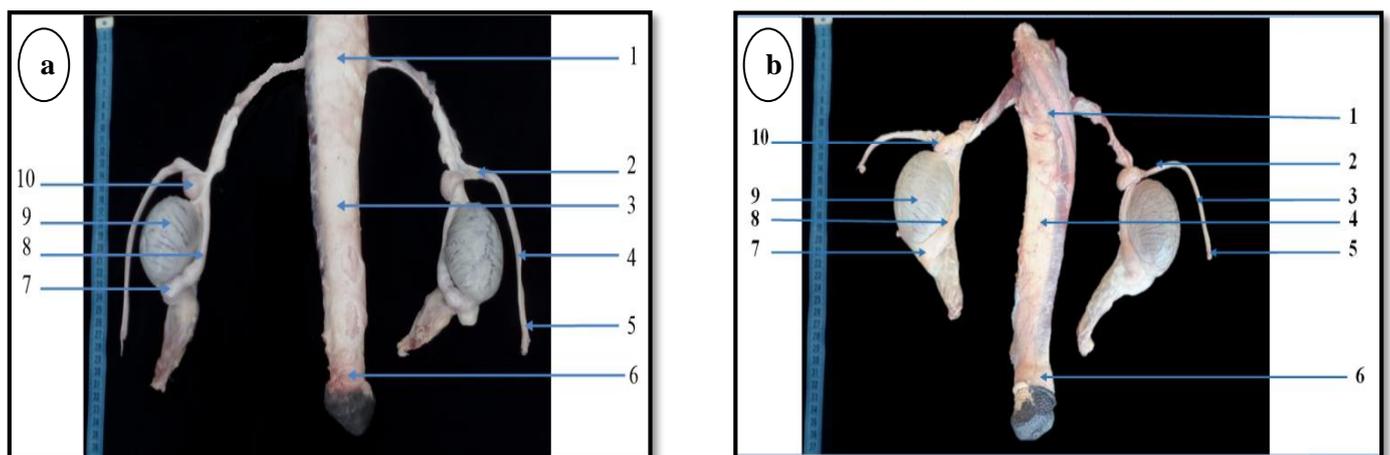
**Figure 37 :** Les paramètres utilisés pour la reconstruction phylogénétique.

### III.1. Résultats :

Notre étude porte sur la comparaison entre trois espèces appartenant à la famille des équidés (cheval : *Equus Caballus* ; âne : *Equus asinus* et mulet : *Equus caballus* × *Equus asinus*). Nos résultats seront présentés en trois parties : la première concerne l'aspect morphologique (macroscopique) de l'appareil génital mâle des trois espèces étudiées, la seconde concerne l'étude structurale et morphométrique chez les trois espèces et la dernière rapporte l'étude phylogénétique.

#### III.1.1. Résultat morphologique :

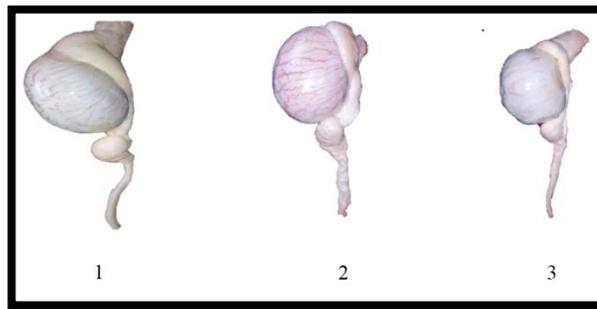
Nous avons effectué une comparaison macroscopique de l'appareil génital mâle obtenu après dissection (figure 38a et b) du cheval et du mulet. C'est ainsi que nous avons observé que l'appareil génital mâle est constitué d'un pénis (de 35cm chez le cheval et 30cm chez le mulet) intermédiaire entre deux testicules identiques (7cm chez les deux espèces), chaque testicule est coiffé par l'épididyme et le canal déférent.



**Figure 38** : Représente l'appareil génital mâle, a : cheval ; b : mulet.

1 : pénis proximal ; 2 : canal déférent proximal ; 3 : pénis corps ; 4 : canal déférent corps ; 5 : canal déférent distal ; 6 : pénis distal (la tête) ; 7 : épидидyme proximal ; 8 : testicule ; 9 : corps de l'épididyme ; 10 : épидидyme distal (la queue)

Nous nous sommes concentrés sur la comparaison macroscopique du testicule et de l'épididyme des trois espèces (figure 39), le tableau montre l'âge de l'animal et les différentes mesures pondérales du testicule et de l'épididyme.



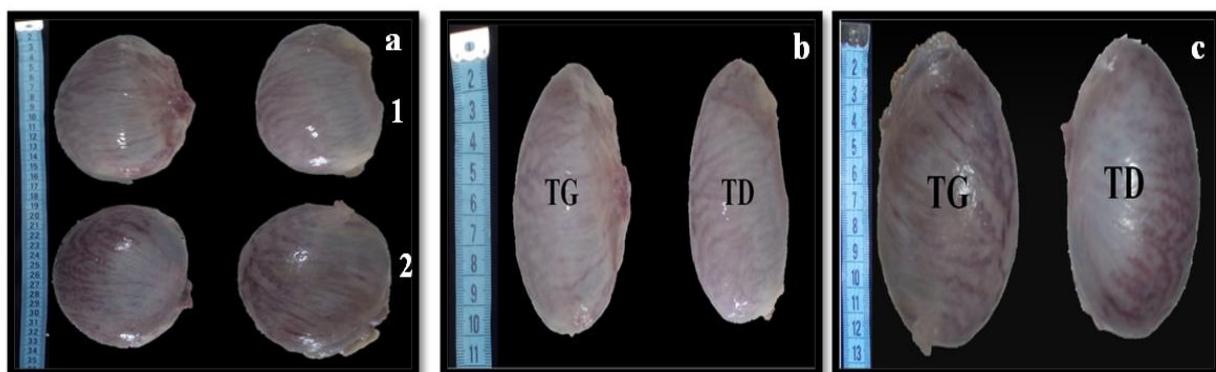
**Figure 39:** Morphologie des trois testicules des équidés.  
(1 : Cheval. 2 : Âne. 3 : Mulet).

**Tableau II :** Mesures du testicule, de l'épididyme et l'âge des animaux.

Organe Espèce	Âge moyenne (ans)	Testicule (cm)			Epididyme (cm)		
		Longueur	Largeur	Hauteur	Longueur	Largeur	Hauteur
Cheval	14	10	7.5	6.5	14	8.5	-
Âne	-	9.5	6.5	5	11	3.5	-
Mulet	10	8	4.5	4.4	9	3	2

La figure 40a montre la comparaison morphologique du testicule du cheval et du mulet sans l'enveloppe externe, l'épididyme et le canal déférent.

La figure 40 b et c illustrent la comparaison entre les testicules droit et gauche du cheval et du mulet respectivement.



**Figure 40:** Morphologie des deux testicules des équidés, cheval mulet.  
a : Les testicules du cheval (1) et du mulet (2)    b: Les testicules droit et gauche du cheval    c: Les testicules droit et gauche du mulet TG : Le testicule gauche TD : Le testicule droit

Le tableau ci-dessous montre le poids des testicules chez les deux espèces sans l'enveloppe externe, l'épididyme et le canal déférent.

**Tableau III :** Poids des testicules droit et gauche chez le cheval et le mulet.

Espèce \ Testicule	Droit (g)	Gauche (g)
Cheval	124	130
Âne	-	-
Mulet	151	154

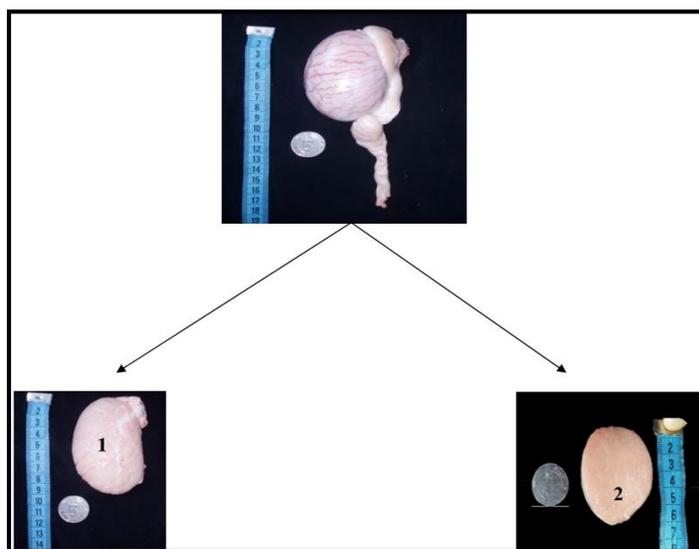
### III.1.2. Résultats histologique :

Nous avons réalisée des coupes transversales et longitudinales au niveau du testicule, épiddyme et canal déférent du cheval, de l'âne et du mulet et au niveau dupénis du cheval sur lesquelles nous avons effectué trois colorations :

- ✓ Coloration à Hémalunéosine (HE) : L'hématoxyline colore les noyaux en bleu/violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose.
- ✓ Coloration trichrome de Masson : Met en évidence les éléments du tissu conjonctif en particulier le collagène en vert, le noyau en noir et le cytoplasme en rouge.
- ✓ Coloration au rouge congo : Cette coloration marque en rouge les dépôts d'amylose, fibres rouges, noyaux rouges foncé.

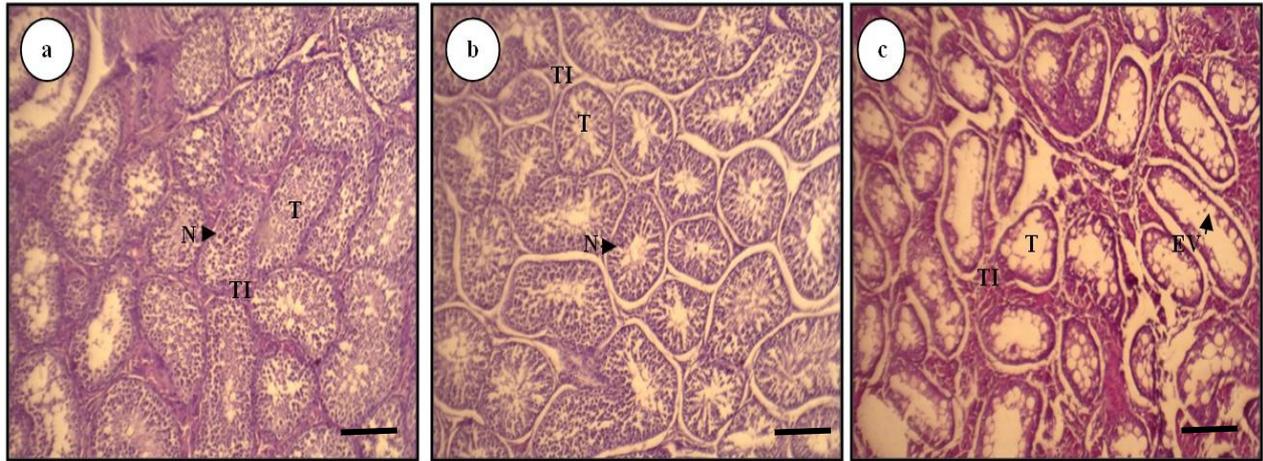
#### III.1.2.1. Testicule :

La figure 41 montre les coupes des testicules selon la position de la coupe (transversale et longitudinale).



**Figure 41:** Représente la coupe longitudinale et la coupe transversale du testicule.  
 1 : Coupe longitudinale (CL).      2 : Coupe transversale(CT).

- Observation au faible grossissement ( $G \times 100$ ) :



**Figure 42** : Aspect structural du tube séminifère chez les trois animaux étudiés colorés à l'hématoxyline éosine et observé au microscope photonique  $G \times 100$ , Scal bar :  $100\mu\text{m}$ .

a : Cheval.      b : Âne.      c : Mulet.  
 T : Tube séminifère. TI : Tissu interstitiel. N : Noyau. EV : Espace vide.

Les observations des coupes histologiques au niveau du testicule des trois espèces étudiées sont représentées par la figure 42a, b et c, elles montrent que : chez le cheval les tubes séminifères sont volumineux organisés de façon très rapprochés, séparant les uns des autres par un espace interstitiel ; ils sont formés par un épithélium séminifère avec une lumière réduite (possibilité de présence des spermatozoïdes selon la période). Chez l'âne les tubes séminifères sont volumineux avec une lumière centrale (possibilité de présence des spermatozoïdes selon la période), ils sont formés par un épithélium séminifère, la surface se rapproche de celle du cheval, ils sont séparés les uns des autres par un espace interstitiel. Chez le mulet les tubes séminifères sont de taille moyenne organisés de façon rapprochés, possédant une large lumière avec la présence d'espace vide, ils sont séparés les uns des autres par un espace interstitiel.

Les résultats morphométriques renforcent et confirment les résultats histologiques (figure 43 A et B). En effet cette étude a montré que la surface du tube séminifère et celle de la lumière est respectivement de  $26170,3 \mu\text{m}^2 \pm 795,4$  ;  $706,2 \mu\text{m}^2 \pm 76,3$  chez le cheval. Elle est de :  $25081,3 \mu\text{m}^2 \pm 720,7$  ;  $4304,9 \mu\text{m}^2 \pm 186,8$  chez l'âne. Elle est de :  $21101,7 \mu\text{m}^2 \pm 923,5$  ;  $9299,7 \mu\text{m}^2 \pm 332,8$  chez le mulet.

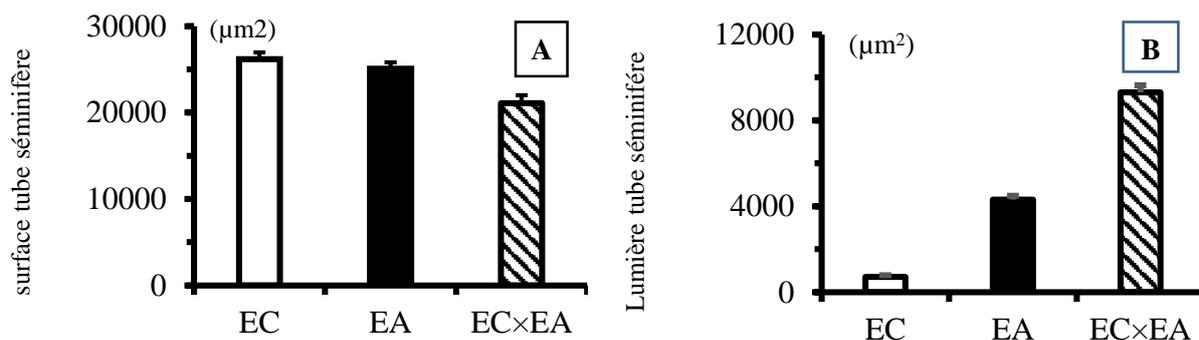
- ✓ Le diamètre moyen des tubes séminifères chez le cheval était de 191,2  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Le diamètre moyen des tubes séminifères chez l'âne était de 174,7 $\mu\text{m}$ .
- ✓ Le diamètre moyen des tubes séminifères chez le mulet était de 164,4  $\mu\text{m}$ .

La figure 43 représente les variations de la surface des tubes séminifères et celle de la lumière de ces tubes chez le cheval, l'âne et le mulet, il apparait qu'il y'a une différence entre les trois animaux, en effet :

La surface du tube séminifère chez le cheval se rapproche de celle de l'âne (26170,4  $\mu\text{m}^2$  vs 25081,4  $\mu\text{m}^2$ ), la différence n'est pas statistiquement significative (-5,1% ; P= 0,208575), cependant la surface de la lumière de ces tubes chez le cheval est inférieure à celle de l'âne (706,3  $\mu\text{m}^2$  vs 4305  $\mu\text{m}^2$ ), la différence est statistiquement hautement significative (509,5077 % ; P= 0,000000).

La surface des tubes séminifères chez le cheval est plus élevée que celle du mulet (26170,3  $\mu\text{m}^2$  vs 21101,8 $\mu\text{m}^2$ ), la différence est statistiquement hautement significative (-18,5% ; P=0,000002), alors que pour la surface de la lumière chez le cheval elle est plus basse que chez le mulet (706, 3  $\mu\text{m}^2$  vs 9299, 7 $\mu\text{m}^2$ ), la différence est statistiquement hautement significative (1216,6830 % ; P= 0,000000).

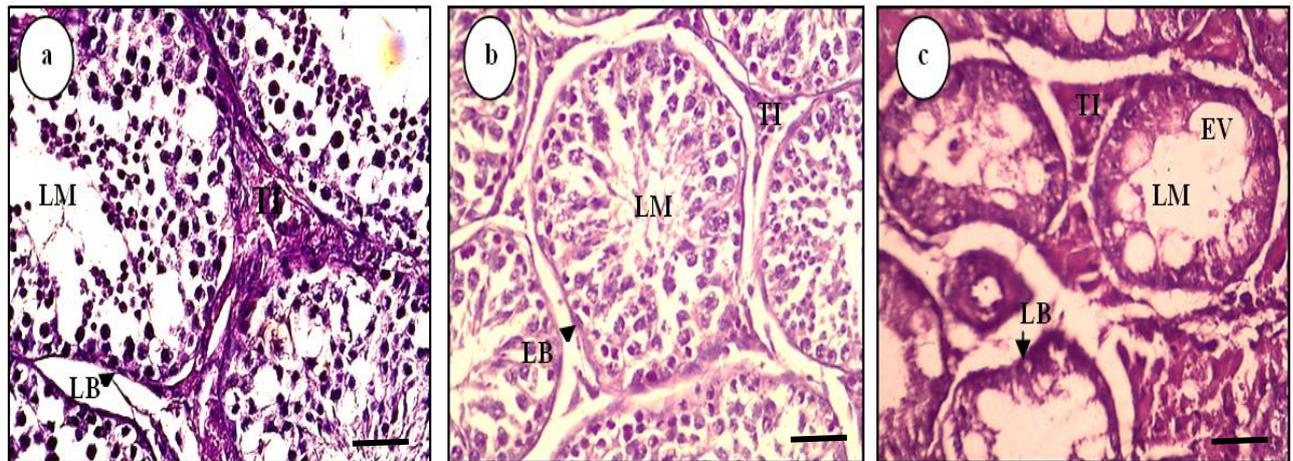
La surface moyenne du tube séminifère chez l'âne est plus élevée par rapport à celle du mulet (25081,4  $\mu\text{m}^2$  vs 21101,8  $\mu\text{m}^2$ ), la différence est statistiquement hautement significative (-14,1% ; P=0,000157), alors celle de la surface de la lumière séminifère chez l'âne est inférieure à celle du mulet (4304,94267  $\mu\text{m}^2$  vs 9299,7098  $\mu\text{m}^2$ ), la différence statistiquement hautement significative (116,0240% ; P= 0,000000).



**Figure 43 :** Variation de la surface du tube séminifère (A) et de la surface de la lumière du tube séminifère (B) chez *Equus caballus*, *Equus asinus* et *Equus caballus* x *Equus asinus*.

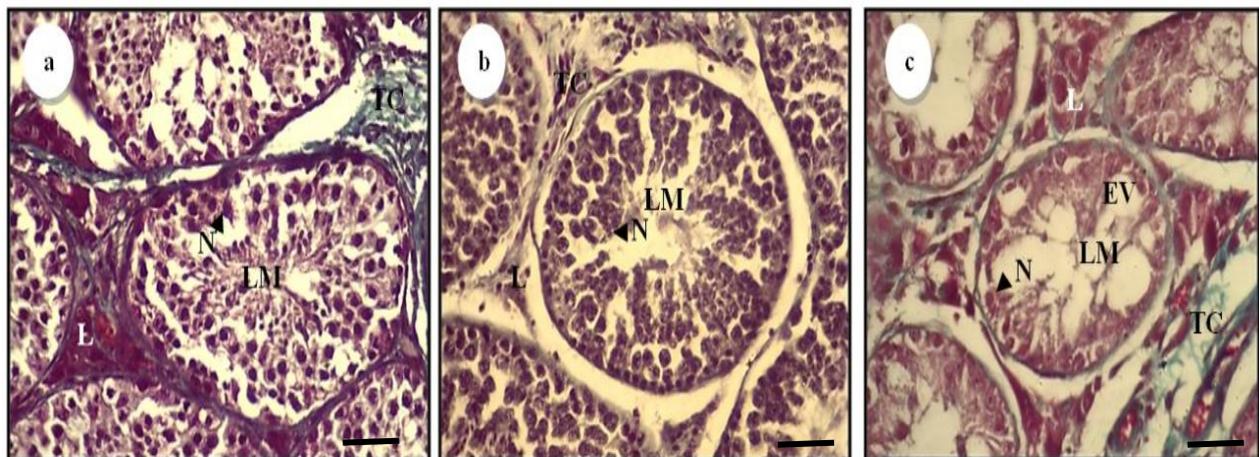
EC : *Equus caballus*. EA : *Equus asinus*. EC x EA : *Equus caballus* x *Equus asinus*

• Observation au moyen grossissement (G ×400) :



**Figure 44** : Aspect structural du tube séminifère chez les trois animaux étudié colorés à l'Hématoxyline éosine et observés au microscope photonique G×400, Scal bar : 50µm.

A : Cheval.                      b : Âne.                      c : Mulet.  
 LM : Lumière.                      TI: Tissu interstitiel LB: Lame basale                      EV : Espace vide .



**Figure 45** : Aspect structural du tube séminifère chez les trois animaux étudiés colorés au Trichrome de Masson et observés au microscope photonique G×400, Scal bar : 50µm.

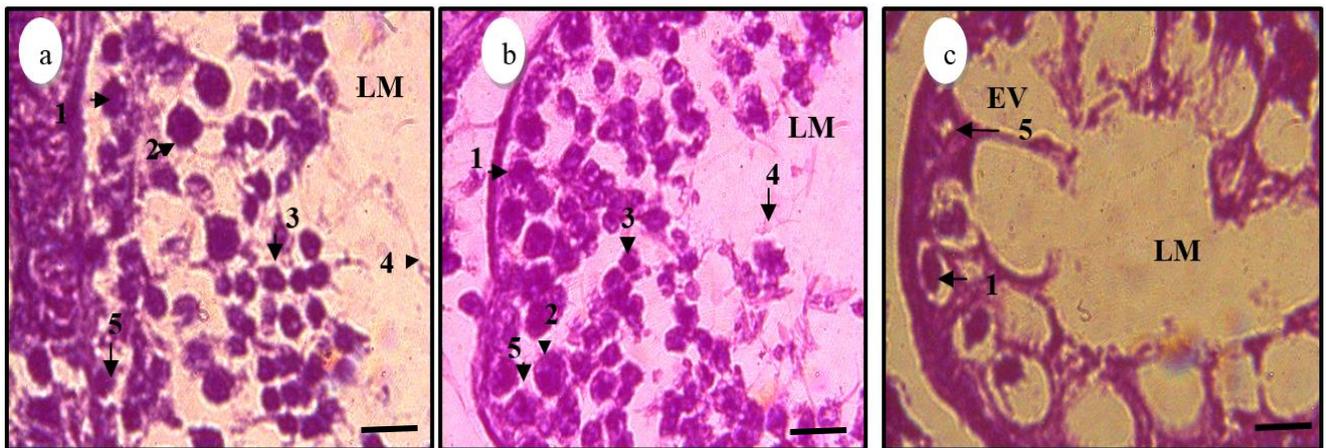
A : Cheval.                      b : Âne.                      c : Mulet.  
 LM : Lumière.                      L: Cellule de Leydig.                      N : Noyau                      TC : Tissu conjonctif                      EV : Espace vide.

Les observations des coupes histologiques colorées à l'Hématoxyline éosine ont permis de voir un cytoplasme rose clair, le noyau bleu violé et rond et une lumière au centre est très claire (figure 44), alors que les coupes histologiques colorée par trichrome de Masson ont permis de voir la distribution du tissu conjonctif en vert (figure 45). Chez le cheval et l'âne le tube séminifère est entouré par une lame basale et avec une lumière centrale réduite bordée par un épithélium séminifère contenant les cellules germinales séparées par un tissu

interstitiel ; ce tissu interstitiel est attaché aux tubes séminifères chez le cheval et espacés aux tubes séminifères chez l'âne, il contient le tissu conjonctif dans lequel sont disséminées les cellules de Leydig.

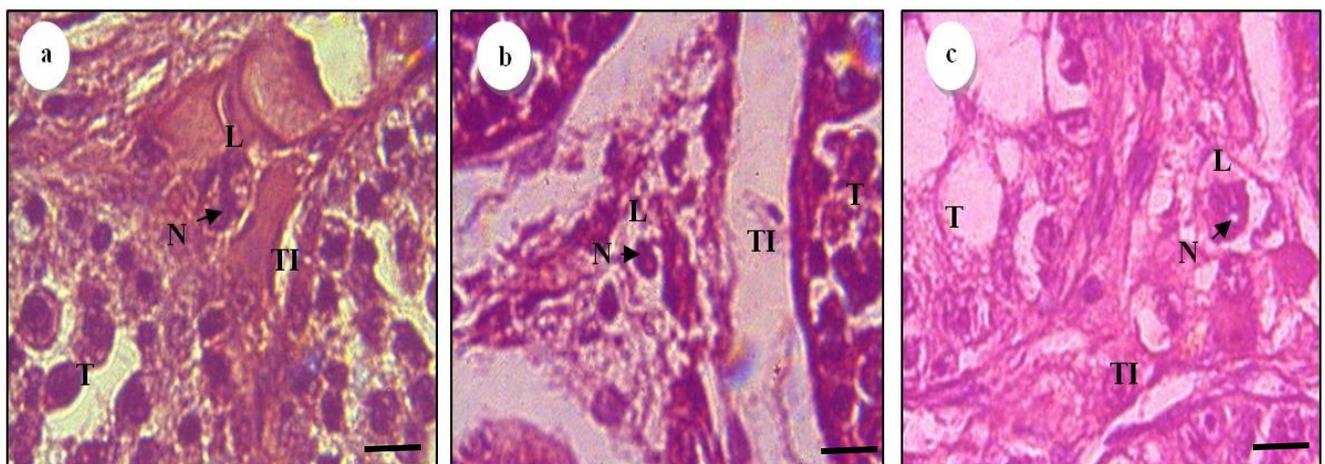
Chez le mulet le tube séminifère est entouré par une lame basale et avec une large lumière bordée par un épithélium séminifère sans cellules germinales avec l'apparition d'espaces vides, séparées par un tissu interstitiel espacés aux tubes séminifères et contient le tissu conjonctif dans lequel sont disséminées les cellules de Leydig.

• Observation au fort grossissement ( $G \times 1000$ ) :



**Figure 46 :** Aspect structural du tube séminifère chez les trois espèces colorées à l'Hématoxyline Éosine observées au microscope photonique  $G \times 1000$ , Scal bar :  $10\mu\text{m}$ .

a : Cheval ; b : Âne ; c : Mulet ; LM : Lumière ; EV : Espace vide ; 1 : Spermatogonie ; 2 : Spermatocyte I ; 3 : Spermatide ; 4 : Spermatozoïde ; 5 : Cellule de Sertoli .



**Figure 47 :** Aspect structural de la cellule de Leydig chez les trois animaux étudiés colorés au rouge Congo et observés au microscope photonique au  $G \times 1000$ , Scal bar :  $10\mu\text{m}$ .

a : Cheval ; b : Âne ; c : Mulet ; T : Tube séminifère ; TI : Tissu interstitiel ; L : Cellule de Leydig ; N : Noyau cellule de Leydig Afin de bien voir le détail des cellules présentes au niveau des tubes séminifères (figure 46), et les cellules de Leydig (figure 47) nous avons observé au

microscope photonique  $G \times 1000$ . Ce grossissement permet de mieux voir les trois types de cellules germinales qui sont impliqués dans la spermatogenèse (les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides).

Les observations des coupes histologiques montrent que chez le cheval comme chez l'âne la spermatogenèse est normale, avec présence de spermatogonie, spermatocyte I, spermatides et de spermatozoïdes avec des flagelles très claire dans la lumière, alors que chez le mulet nous avons l'absence de spermatogenèse sauf la présence de quelques spermatogonies.

Les caractéristiques histologiques de chaque type de cellule observée dans l'épithélium séminifères sont:

**Spermatogonies :** Sont retrouvées à la périphérie.

**Spermatocytes :** On les distingue par leur grande taille du noyau et une position plus avancée dans l'épithélium séminifère.

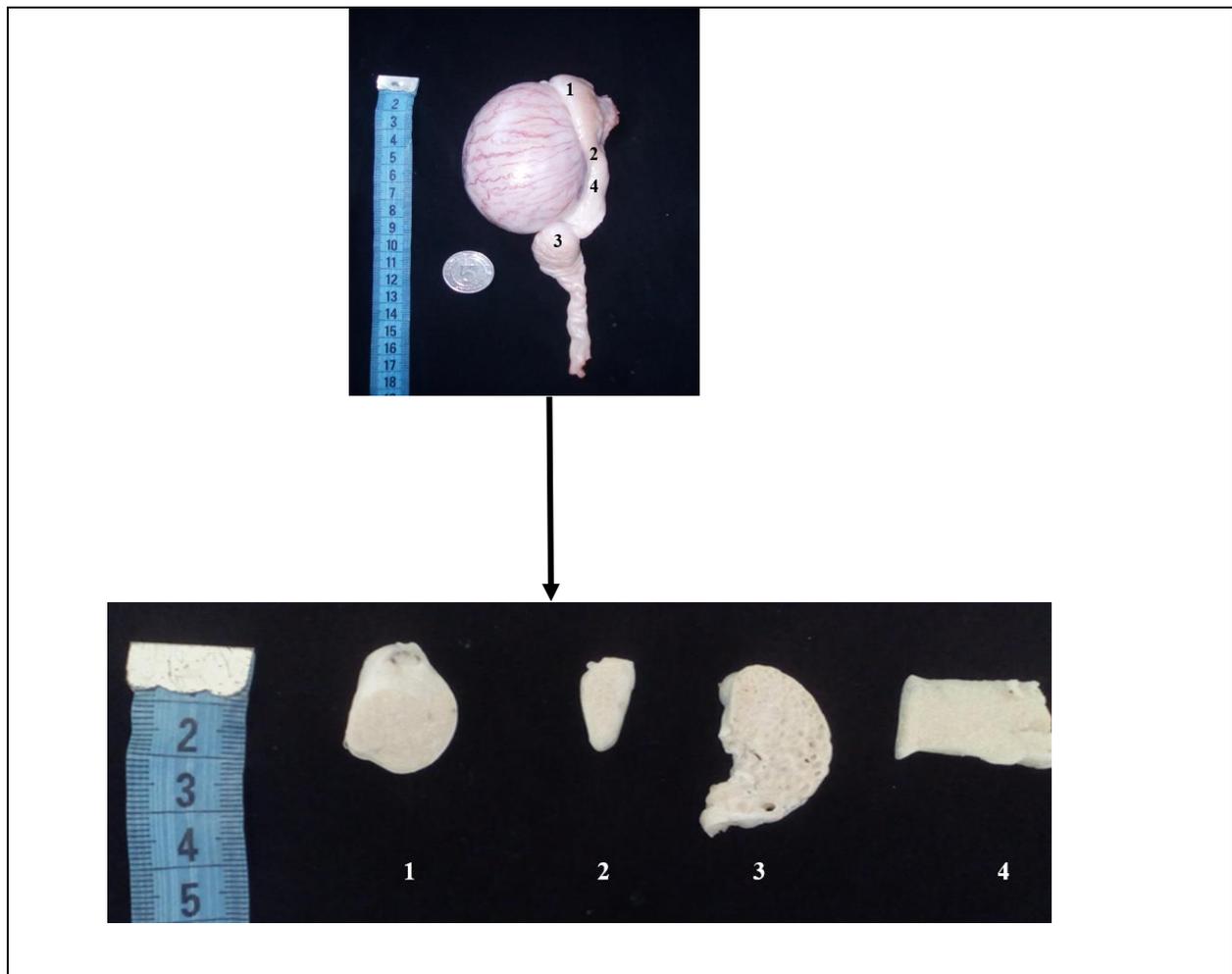
**Spermatides:** Ce sont les plus petites cellules rondes observées dans l'épithélium séminifère.

**Spermatozoïdes:** Ce sont des petites cellules ovales et allongées avec une tête sombre et longue, et un flagelle qui fait saillie dans la lumière.

- ✓ Chez le cheval (*Equus Caballus*) : Amas de cellules de Leydig avec un grand noyau arrondi, attaché aux tubes séminifères.
- ✓ Chez l'âne (*Equus asinus*) : Amas de cellules de Leydig avec un petit noyau aplati, espacées aux tubes séminifères.
- ✓ Chez le mulet (hybride) : Amas de cellules de Leydig avec un grand noyau arrondi, légèrement espacées aux tubes séminifères.

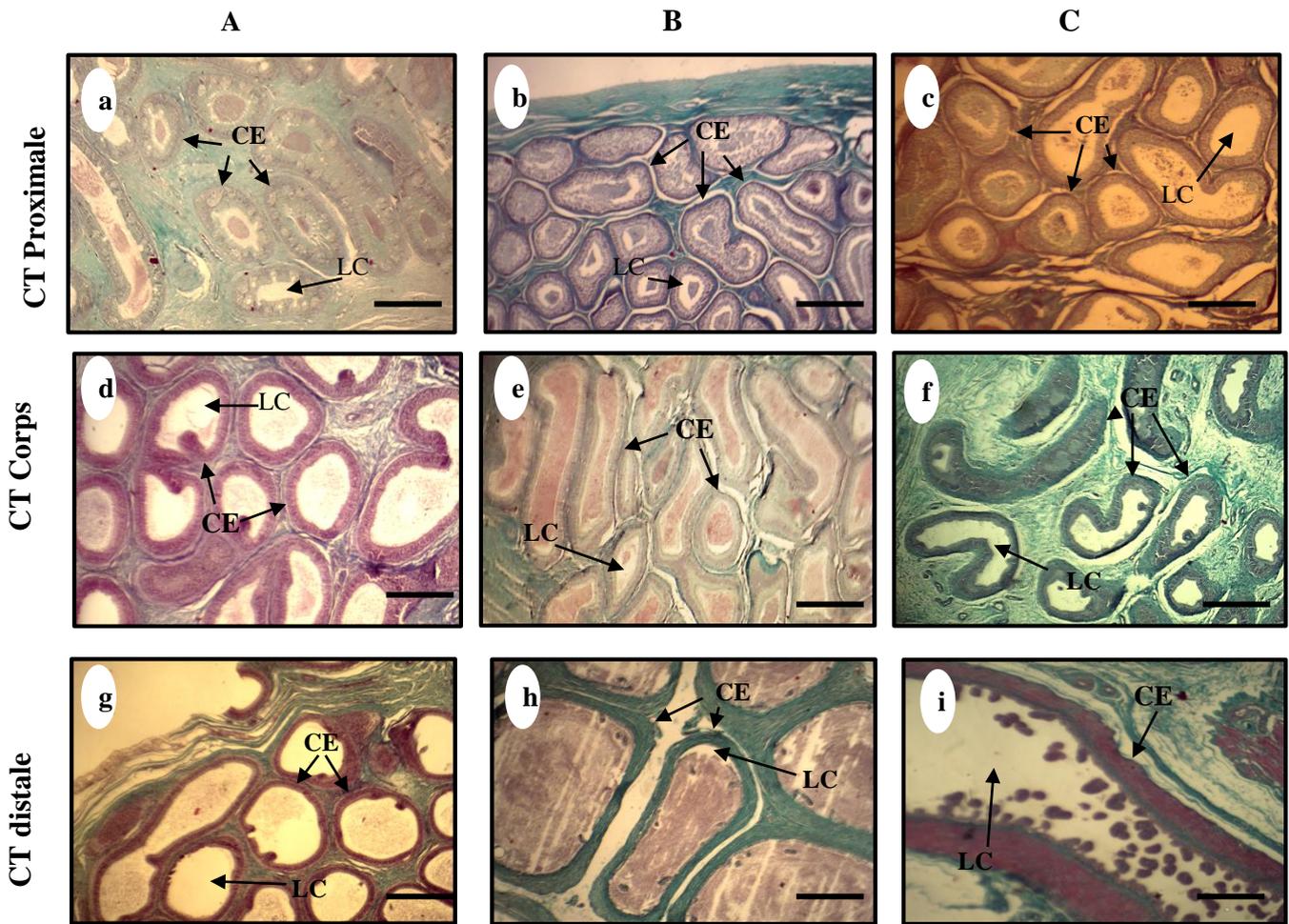
### III.2.2. Épididyme :

Nous avons réalisé des coupes transversales au niveau de l'épididyme du cheval, âne et mulet dans trois régions, proximale, corps et distale, et des coupes longitudinales au niveau de la partie du corps de l'épididyme. Les résultats sont représentés dans la figure 48 suivante :



**Figure 48** : Représente les coupes transversales et la coupe longitudinale de l'épididyme.  
1 : la tête ; 2 : le corps ; 3 : la queue ; 4 : Coupe longitudinale au niveau du corps de l'épididyme.

• Observation au faible grossissement G×40 :



**Figure 49** : Aspect structural de l'épididyme chez les trois animaux étudiés coloré au trichrome de Masson (TM) et observé au microscope photonique G×40. Scal bar : 200µm, **A** : Cheval ; **B** : Âne ; **C** : Mulet ; CT : Coupe transversale ; CE : Canal épидидymaire, LC : Lumière du canal épидидymaire.

➤ Pour les observations histologiques de l'épididyme au faible grossissement nous avons choisi la coloration au trichrome de Masson (figure 49) afin de voir la taille et la forme générale des canaux épидидymaires et leur distribution avec le tissu conjonctif dans les différents segments de l'épididyme chez les trois espèces, la figure (49 a, d et g) montre que chez le cheval les canaux épидидymaires sont nettement séparés par un tissu interstitiel (en vert) de façon très importante dans la tête avec une taille normale. Cette taille augmente dans les deux autres régions, ou elle est maximale dans la région de la queue, leur lumière est plus pleine de spermatozoïdes dans la tête que le corps et la queue., chez l'âne la figure 49 (b, e, h) montre que les canaux épидидymaires sont très rapprochés les uns des autres dans la tête et le corps, la taille est irrégulière mais pour la queue ils sont plus volumineux que les autres segments et plus ou moins séparés, avec des quantités importantes de spermatozoïdes qui ont

été observés dans la lumière des différents segments, chez le mulet la figure 49 (c, f, i) montre que les canaux épидидymaire sont très rapprochés les uns des autres dans la tête alors qu'ils sont séparés dans le corps et la queue avec une augmentation du volume des canaux de la tête vers les autres segments, la lumière n'est pas de spermatozoïdes.

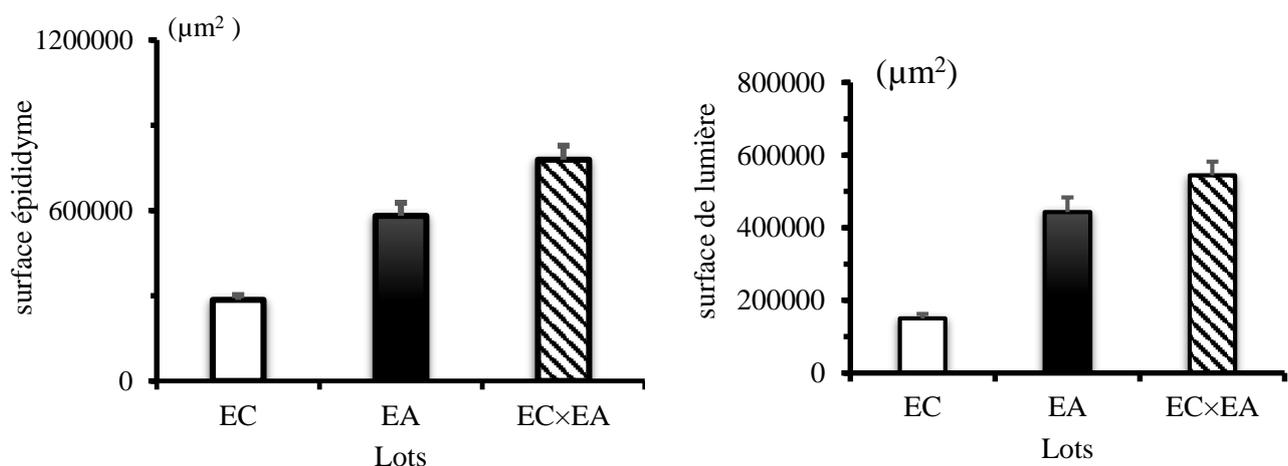
-Les résultats morphométrique renforcent et confirment les résultats histologiques (figure50). En effet cette étude a montré que la surface des canaux épидидymaire et celle de la lumière est respectivement de  $284653,5 \mu\text{m}^2 \pm 17239,5$  ;  $1 50276,2 \mu\text{m}^2 \pm 11779$  chez le *Equus caballus*, de  $580351,0 \mu\text{m}^2 \pm 46799,1$  ;  $442600,0 \mu\text{m}^2 \pm 40789,1$  chez *Equus asinus* et de  $778399,8 \mu\text{m}^2 \pm 48897,9$  ;  $543995,4 \mu\text{m}^2 \pm 38115$ .chez *Equus caballus*  $\times$  *Equus asinus*.

La figure 50 représente les variations de la surface des canaux épидидymaire et celle de la lumière de ces canaux chez le cheval, l'âne et le mulet, il apparait qu'il y'a une différence entre les trois animaux en effet :

-une différence statistiquement hautement significative entre le cheval et l'âne de 103,8 % ;  $P=0,000000$  pour la surface des tubes et de 194,5% ;  $P=0,000000$  pour la lumière de ces tubes.

-une différence statistiquement hautement significative entre le cheval et le mulet, de 173,4% ;  $P=0,000000$  pour la surface des tubes et de 261,9% ;  $P=0,000000$  pour la lumière de ces tubes.

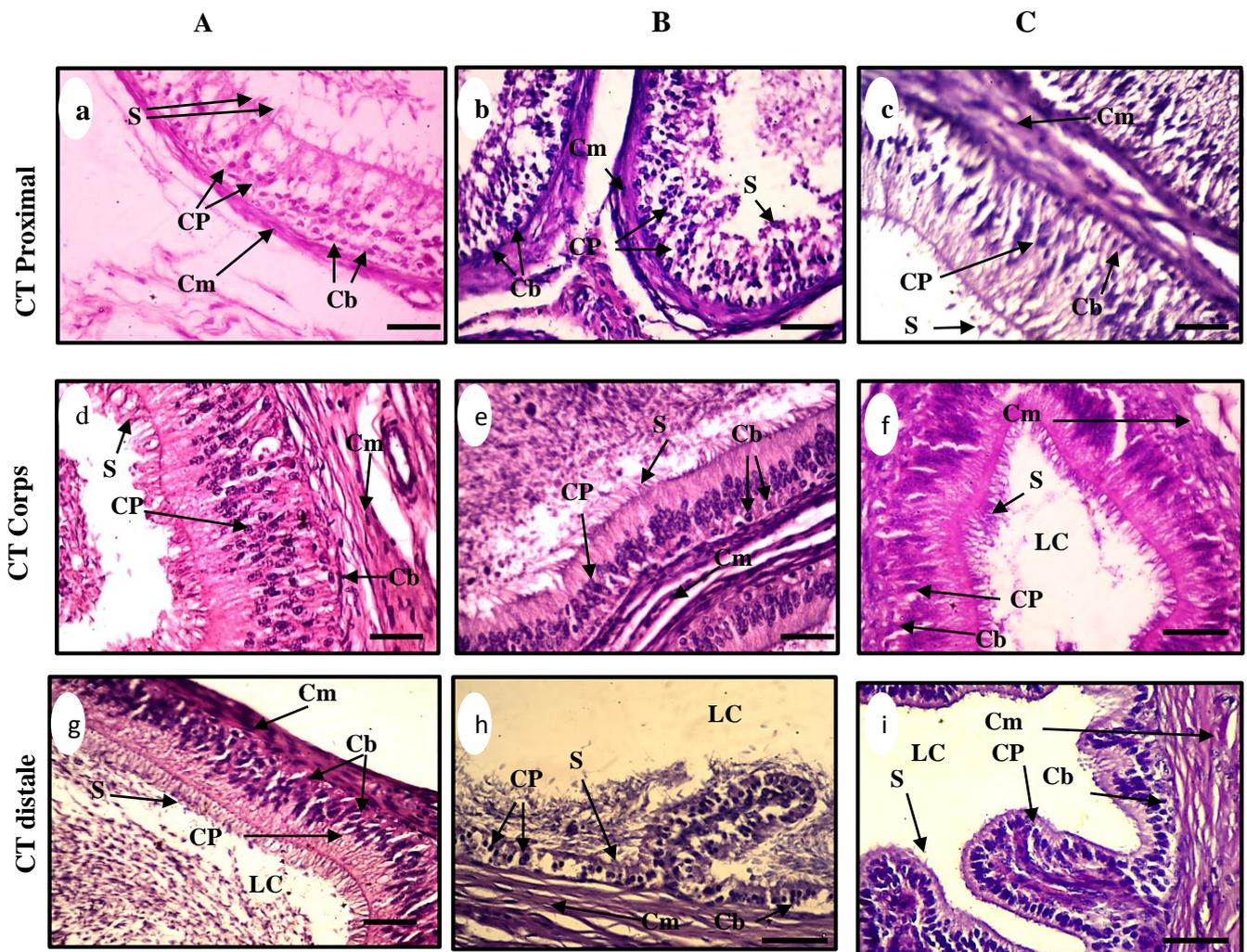
-une différence statistiquement significative entre l'âne et mulet de 34,1% ;  $P=0,004396$  pour la surface des tubes et de 22,9% ;  $P=0,072637$  pour la lumière de ces tubes.



**Figure 50** : Morphométrie d'épididyme chez les trois espèces.

EC : *Equus caballus*. EA : *Equus asinus*. EC×EA : *Equus caballus*  $\times$  *Equus asinus*

• Observation au G×400 :

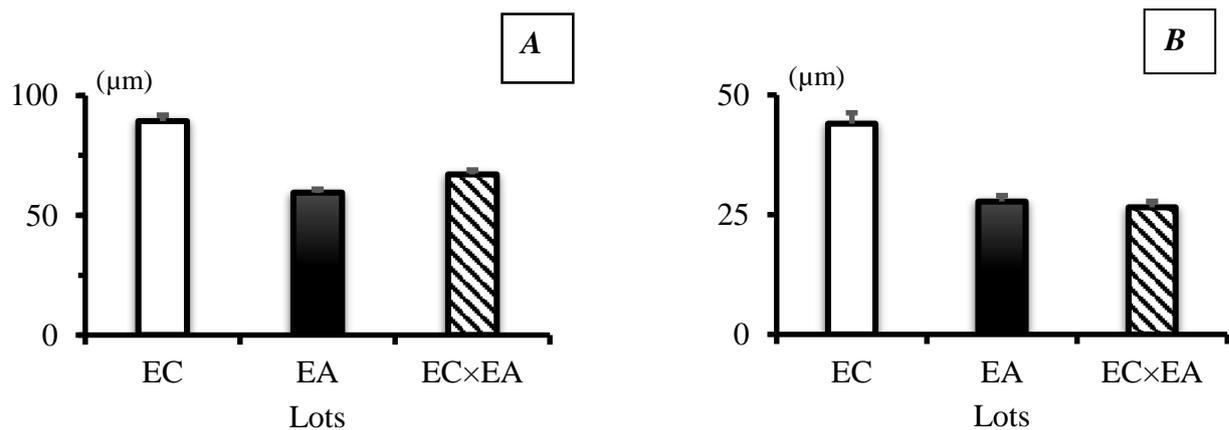


**Figure 51** : Aspect structural du l'épididyme chez les trois animaux étudiés coloré au l'Hématoxyline Éosine (HE) et observé au microscope photonique G×400. Scal bar :50µm CP : Cellules principales ; Cb : Cellules basales ; Cm : Couche circulaire de cellule musculaire lisse ; S : Stéréocils ; LC : lumière du canal épидидymaire.

➤ Pour les observations histologiques d'épididyme au fort grossissement nous avons choisi la coloration à l'Hémato-éosine (figure 51) pour bien voir les cellules de l'épithélium épидидymaire avec son noyau chez les trois espèces : La figure 51 (a, d, g) montre que chez le cheval, la lumière des canaux épидидymaire est entourée par un épithélium cylindrique pseudostratifié. Les différents types des cellules observées sur cet épithélium comprenaient une couche discontinue de cellules basales et cellules principal, ces dernières sont de forme allongée avec extrémité libre coté lumière qui présente des stéréocils, la hauteur de l'épithélium est plus élevée dans le corps par rapport aux autres segments, ainsi la longueur des stéréocils dans cette partie est plus longue que les autres, la lumière des trois segments est pleine de spermatozoïdes. Chez l'âne la figure 51 (b, e, h) montre que la hauteur de l'épithélium varie en

fonction du segment épидидymaire considéré. L'épithélium est plus haut dans les régions tête et corps, bas dans celle de la queue, avec lumière pleine de spermatozoïdes au niveau des 3 segments épидидymaire, chez le mulet, la figure 51 (c, f, i) montre que la hauteur de l'épithélium est plus grande dans les régions tête et corps et basse dans la queue, ainsi la longueur des stéréocils varie en fonction du segment épидидymaire (le corps est plus long que les différents segments) avec peu de présence de spermatozoïdes dans la partie intermédiaire et absence dans les autres segments. La longueur des cellules épithéliales est de  $76,06\mu\text{m}\pm 1,7$  et celles de leurs noyaux basal est de  $26,5\mu\text{m}\pm 1,2$ .

-Les résultats morphométrique renforcent et confirment les résultats histologiques (Figure 52). En effet cette étude a montré que la longueur des cellules épithéliales et celles de leurs noyaux basal est respectivement de  $89,3\ \mu\text{m}\pm 2,4$  ;  $43,9\ \mu\text{m}\pm 2,2$  chez *Equus Caballus*, de  $59,4\ \mu\text{m}\pm 1,3$  ;  $27,7\mu\text{m}\pm 1,2$  chez *Equus asinus* est de  $76,06\mu\text{m}\pm 1,7$  ;  $26,5\mu\text{m}\pm 1,2$  chez *Equus caballus* × *Equus asinus*.



**Figure 52** : La hauteur de l'épithélium des épидидymes (A), la hauteur supra noyau des épидидymes (B), des 3 espèces étudiées. EC : *Equus caballus*. EA : *Equus asinus*. EC×EA : *Equus caballus* × *Equus asinus*.

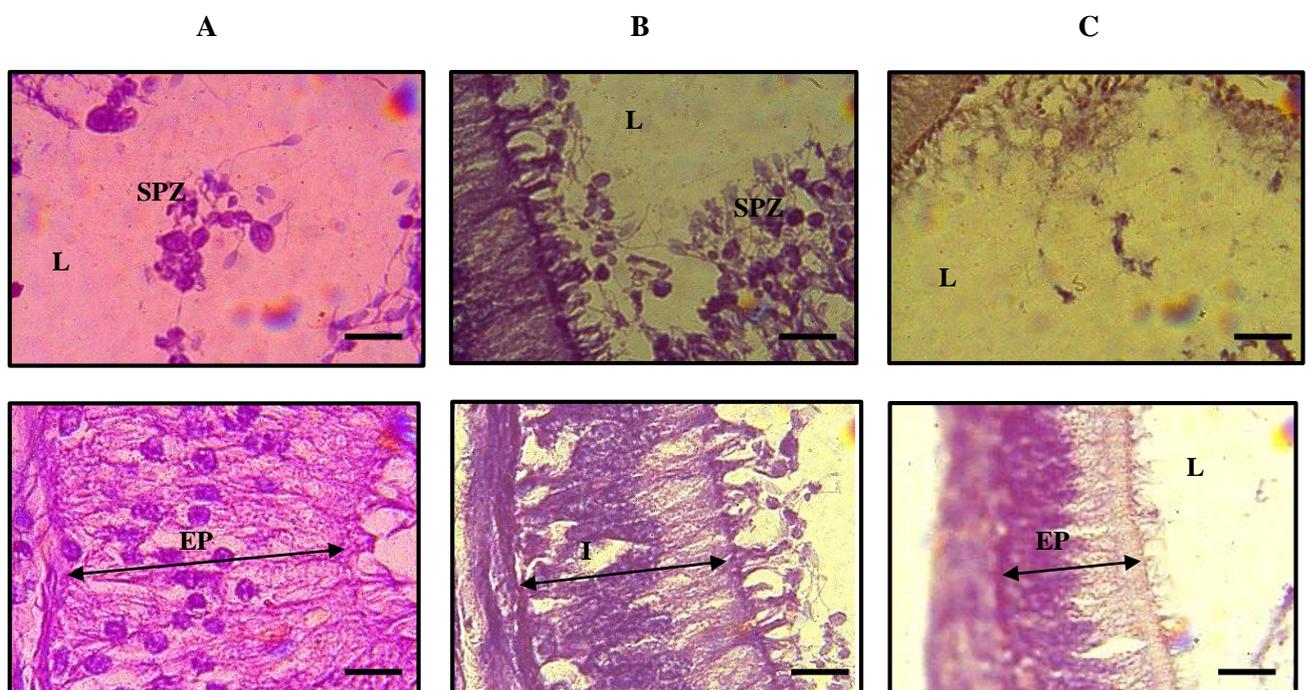
L'étude statistique a montré qu'il existe une différence statistique entre les trois espèces en effet :

-différence statistiquement hautement significative entre le cheval et l'âne, la différence est de -33,4% ( $p=0,000000$ ) pour la longueur des cellules épithéliale est de -36,8% ( $p= 0,000000$ ) pour la longueur du noyau basal.

- différence statistiquement hautement significative entre le cheval et le mulet, la différence est de -24,8% ( $p= 0,000000$ ) pour la longueur des cellules épithéliales et de -39,6% ( $p= 0,000000$ ) pour la longueur du noyau basal.

-une différence statistiquement hautement significative entre l'âne et le mulet, la différence est de 12,7% ( $p= 0,000000$ ) pour la longueur des cellules épithéliales, est une différence statistiquement hautement non significative de -4,3% ;  $p=0,484633$  pour la longueur du noyau basal.

- **Observation au G×1000**



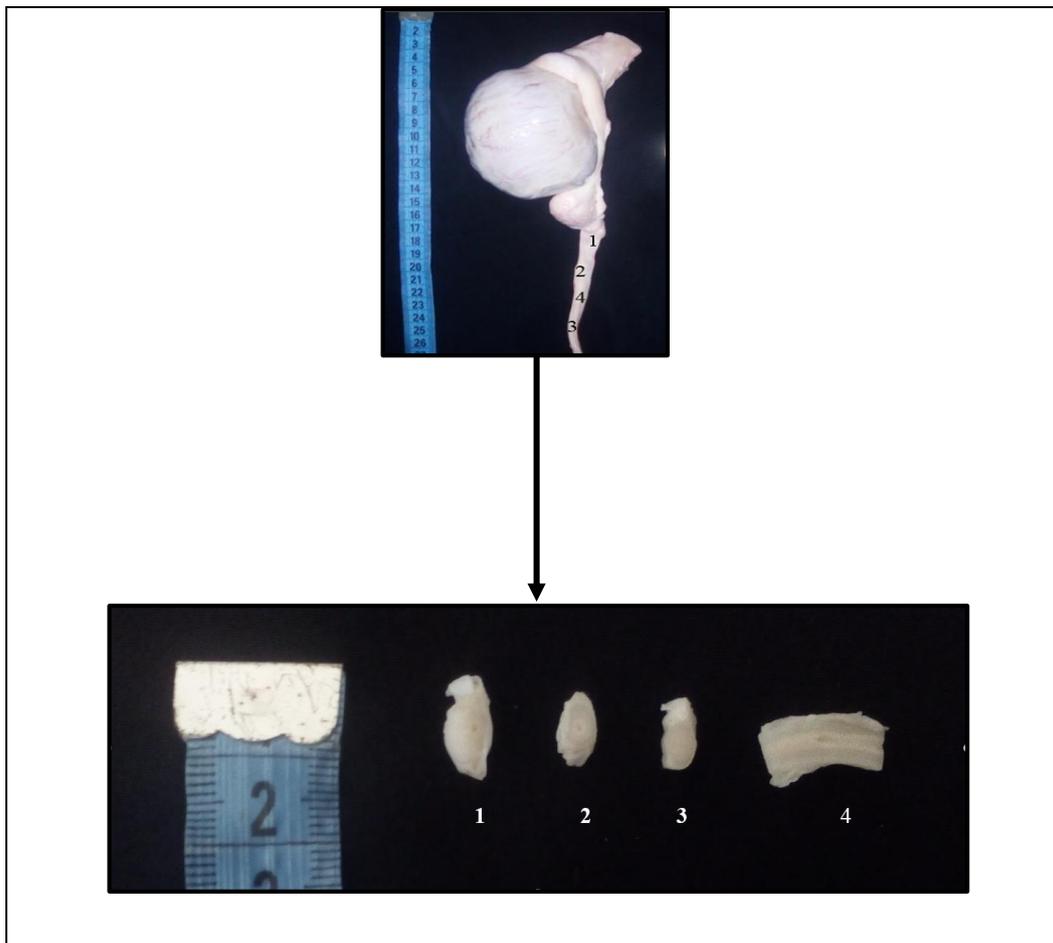
**Figure 53** : Aspect structural du l'épididyme chez les trois animaux étudiés coloré en Hématoxyline Éosine (HE) et observé au fort grossissement G×1000. Scal bar :10 $\mu$ m. **EP** : Épithélium épididymaire ; **L** : lumière ; **SPZ** : Spermatozoïdes

Figure (53) montre que l'épithélium du cheval est plus haut, les cellules principales reposent sur la lame basale jusqu'à la lumière, chez le mulet ces cellules sont basses, cependant l'âne présente des hauteurs intermédiaires entre les deux espèces ; la lumière est pleine de spermatozoïdes chez le cheval et l'âne, et absence de spermatozoïdes chez le mulet.

### III.1.2.3. Canal déférent :

Nous avons réalisé des coupes transversales au niveau du canal déférent du cheval, âne et mulet dans trois régions, proximale, corps et distale, et des coupes longitudinales au niveau de la partie corps du canal, avec des colorations d'Hématoxyline Éosine (HE), trichrome de Masson et rouge Congo. Observés sous microscope photonique G×40, G×100, G×400, G×1000.

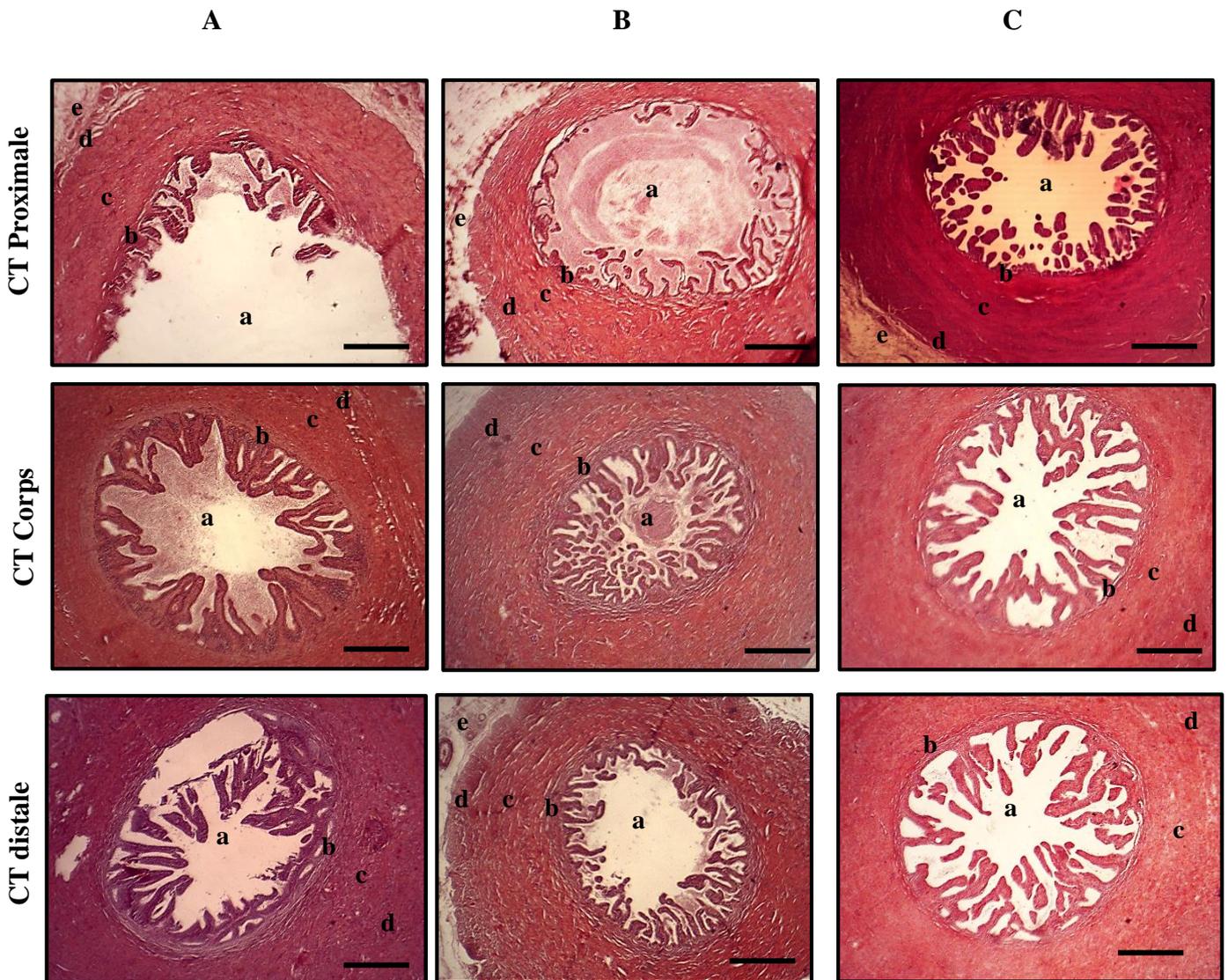
Les résultats sont représentés dans la figure 54 suivante :



**Figure 54** : Représente les coupes transversales et la coupe longitudinale du canal déférent.

- 1 : Coupe transversale au niveau de canal déférent proximal (CT P) ;
- 2 : Coupe transversale au niveau de canal déférent corps (CT C).
- 3 : Coupe transversale au niveau de canal déférent distale (CT D).
- 4 : Coupe longitudinale au niveau de canal déférent corps (CL C).

• Observation au faible grossissement G×40



**Figure 55** : Aspect structural du canal déférent chez les trois animaux étudiés colorée au rouge Congo et observer au microscope photonique à G×40. Scal bar :200µm  
**A** : Cheval ; **B** : Âne ; **C** : Mulet ; **a** : lumière rétrécie en forme d'étoile et épithélium superficiel. **b** : propria mucosae. **c** ; prémysium lisse **d** : Adventitia. **e** : séreuse.

Chez le cheval, la figure (55 a, d et g) montre que dans la lumière du canal déférent on trouve des invaginations quel que soit la région. Cependant, au niveau de la région proximale, la lumière est plus large avec des invaginations courtes par rapport aux autres régions. Chez l'âne la figure (55 b, e et g) montre qu'il y a une large lumière avec de courtes invaginations au niveau de la partie proximale par rapport aux autres régions, chez le mulet la figure (55 c, f et i) montre une large lumière avec une longue invagination qui est étroite au niveau du corps et la région distale par rapport à la partie proximale.

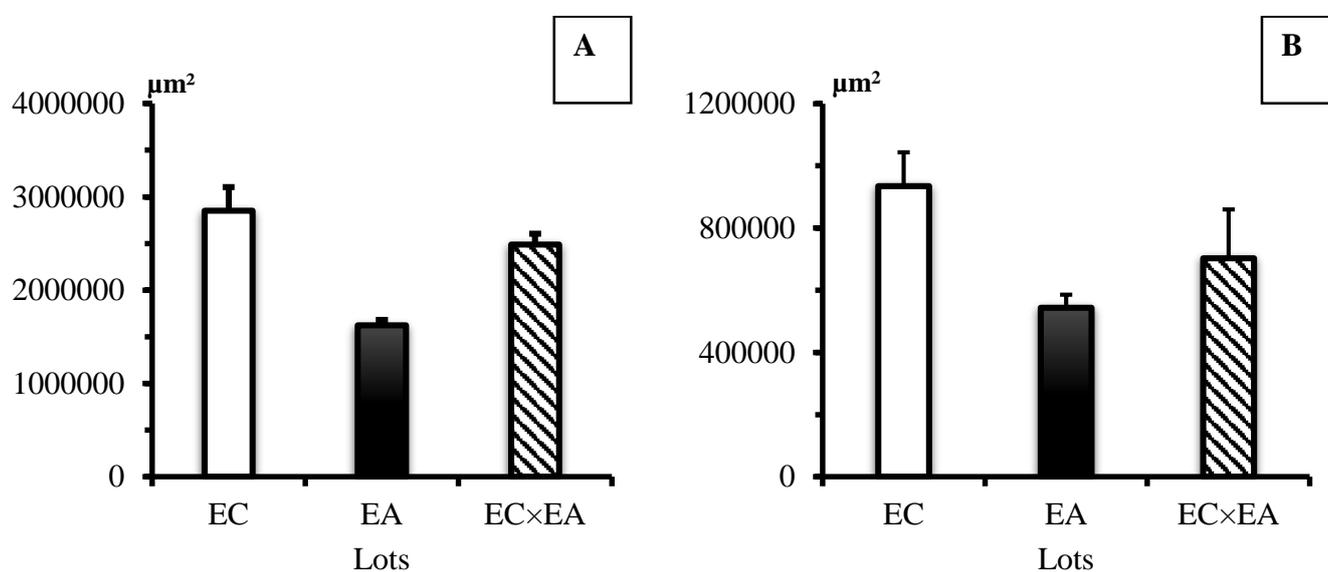
-Les résultats morphométriques renforcent et confirment les résultats histologiques (figure 56). En effet cette étude a démontré que la surface du canal déférent et celle de la lumière sont respectivement de  $2849994\mu\text{m}^2 \pm 253854,1$  ;  $934359,7 \mu\text{m}^2 \pm 109061,3$  chez *Equus Caballus*, de  $1623709 \mu\text{m}^2 \pm 57433,2$  ;  $543831,4 \mu\text{m}^2 \pm 41885,3947$  chez *Equus asinus* est de  $2487166 \mu\text{m}^2 \pm 118281,2$  ;  $702782,2 \mu\text{m}^2 \pm 157388,1$  chez le *Equus caballus*  $\times$  *Equus asinus*.

L'étude statistique a montré qu'il existe une différence entre les trois animaux :

- une différence statistiquement hautement significative entre le cheval et l'âne, qui est de -43% ;  $p=0,000101$  pour la surface du canal et de -41,7% ;  $p=0,004291$  pour la lumière de ce canal.

- aucune différence statistiquement significative n'a été signalée entre le cheval et le mulet ; la différence non significative signalée est de -12,7% ;  $p=0,191508$  pour la surface du canal et de -24,7% ;  $p=0,246864$  pour la lumière de ce canal.

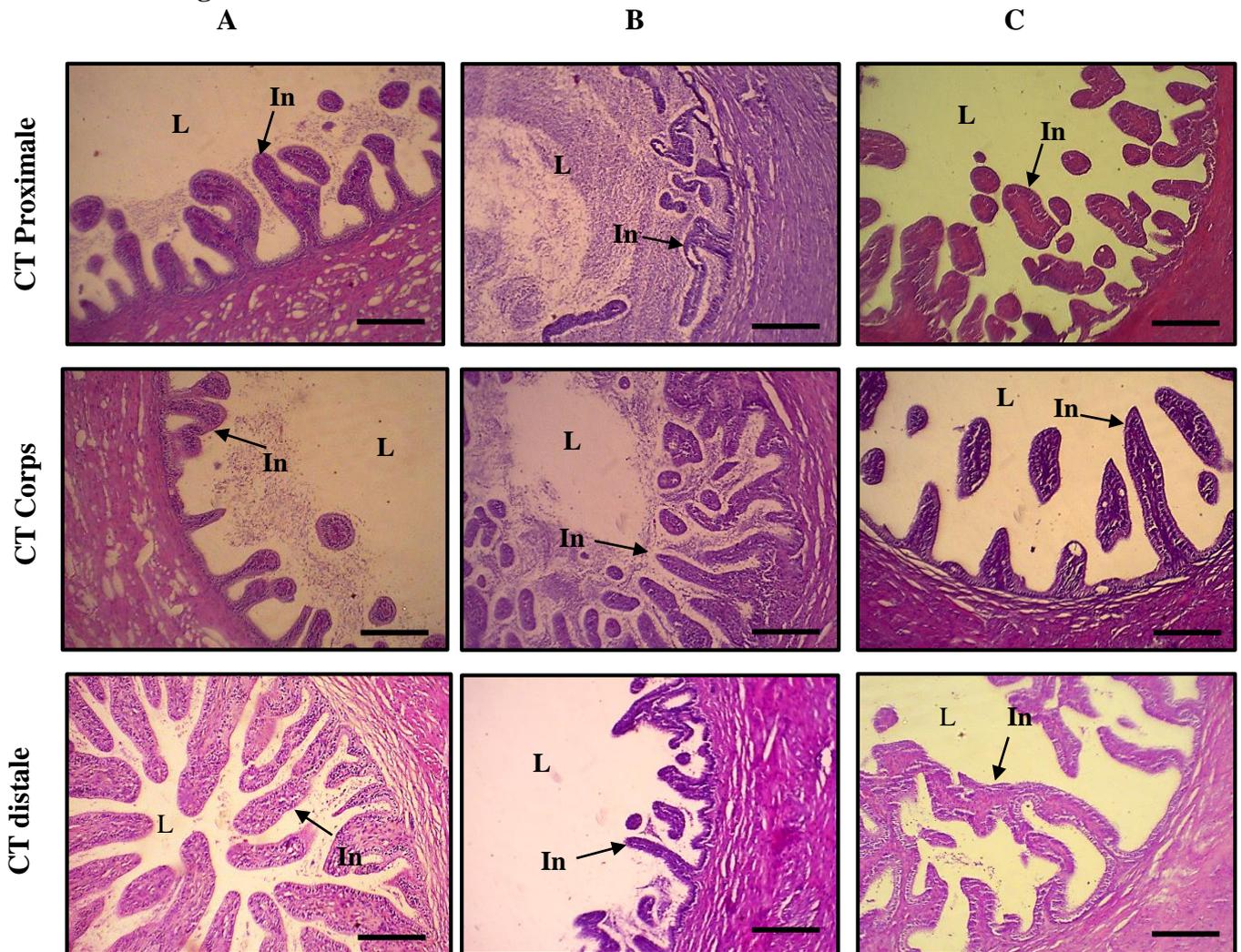
- il y'a une différence statistiquement hautement significative entre l'âne et le mulet, cette différence est de 53,1% ;  $p=0,000003$  pour la surface du canal, alors il est non significative de 29,2% ;  $p= 0,341134$  pour la lumière de ce canal.



**Figure 56** : Morphométrie de canal déférent chez les trois espèces. **A** ; la surface de canal, **B** ; la surface de la lumière de canal.

EC : Equus Caballus EA : Equus asinus EC x EA : Mulet (hybride)

- Au grossissement G×100



**Figure 57** : Aspect structural de canal déférent chez les trois animaux étudiés colorée par hématoxyline éosine (HE) et observer au microscope photonique à G×10. Scal bar :100µm  
 EC : Equus Caballus ;EA : Equus asinus ; EC× EA : Mulet (hybride) ;CT: Coupe transversal.  
 L : Lumière ; In : Invagination.

Chez le cheval la paroi du canal déférent est formé de tunique muqueuse, tunique sous-muqueuse, tunique musculaire et adventice (figure 57 a, d et g), la paroi du conduit déférent du cheval présente une muqueuse pliée appelée invagination, entourant une lumière irrégulière centrale arrondie. Chez l'âne la paroi du canal déférent est formée comme celle du cheval, pour le mulet elle est comme le cheval et l'âne mais avec une différence dans la structure précisément dans la longueur des invaginations (figure 57 c, f et i).

-Les résultats morphométriques renforcent et confirment les résultats histologiques (figure 58). En effet, ils ont montré que la longueur des invaginations est de  $493,9\mu\text{m}\pm 19,1$  chez le

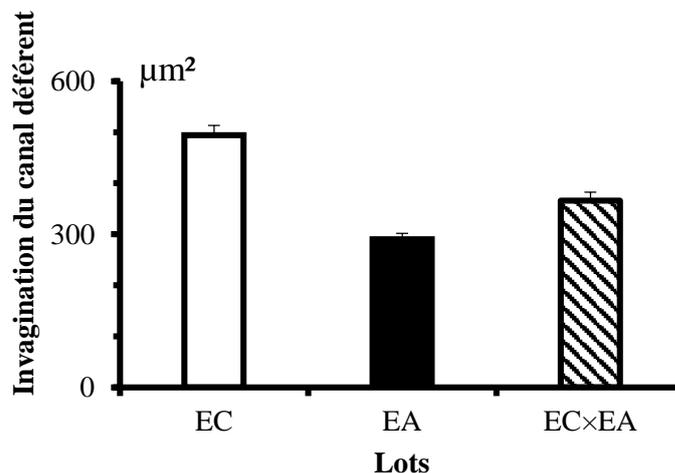
*Equus Caballus*, de  $289,8\mu\text{m}\pm 12,1$  chez le *Equus asinus* est de  $365,9\mu\text{m}\pm 16,6$ . chez le *Equus caballus*  $\times$  *Equus asinus*.

-Les résultats morphométriques ont montré qu'il existe une différence entre les trois animaux :

-il y'a une différence statistiquement hautement significative entre le cheval et l'âne qui est de  $-41,3\%$  ;  $p=0,000000$ .

-il y'a une différence statistiquement hautement significative entre le cheval et le mulet de  $25,9\%$  ;  $p=0,000003$ .

-il y'a une différence statistiquement hautement significative entre l'âne et le mulet de  $25,9\%$  ;  $p=0,000003$ .



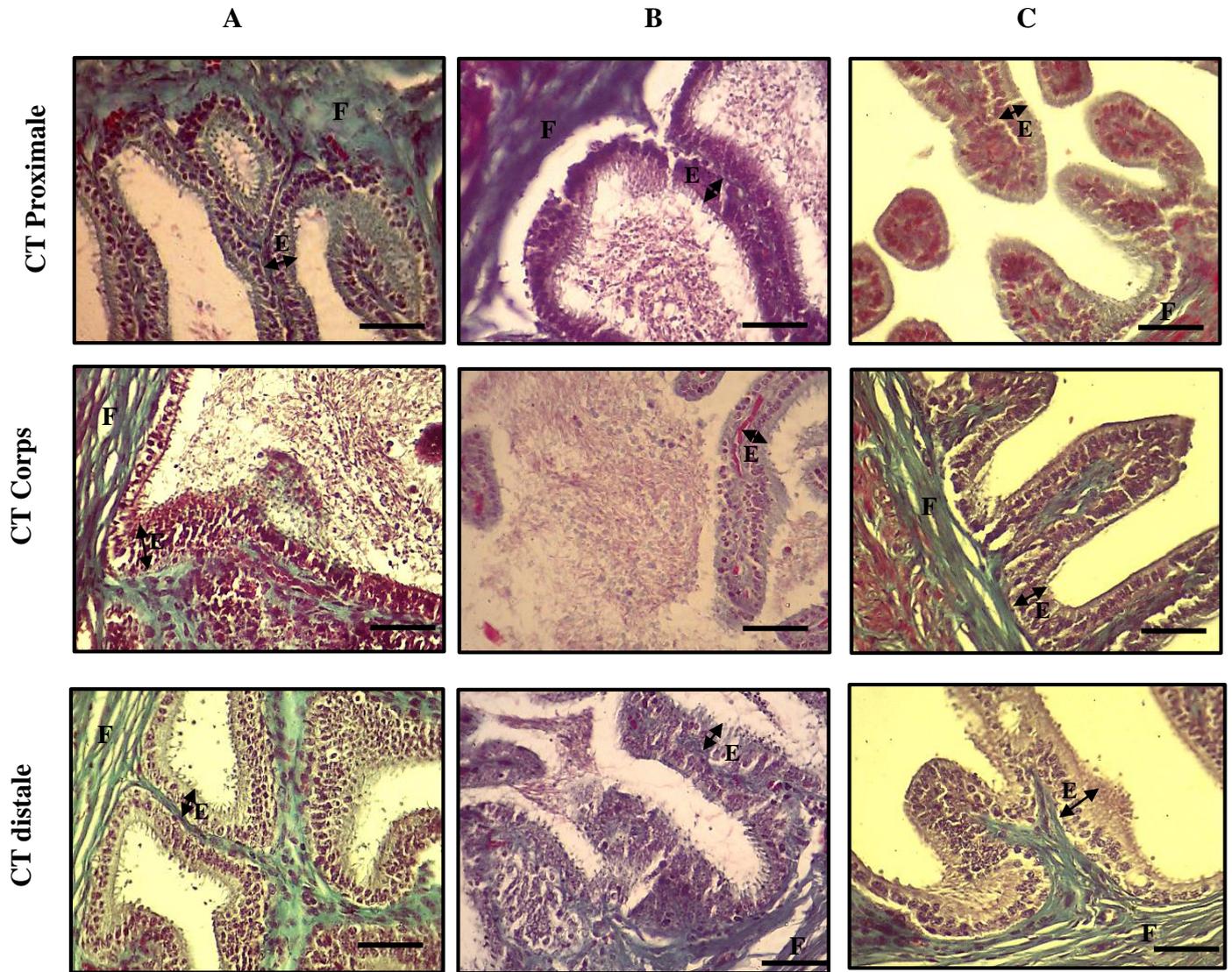
**Figure 58 :** Morphométrie de la longueur de l'invagination de canal déférent chez les trois espèces.

EC : *Equus Caballus*

EA : *Equus asinus*

EC×EA : Mulet (hybride)

- Au moyen grossissement G×400

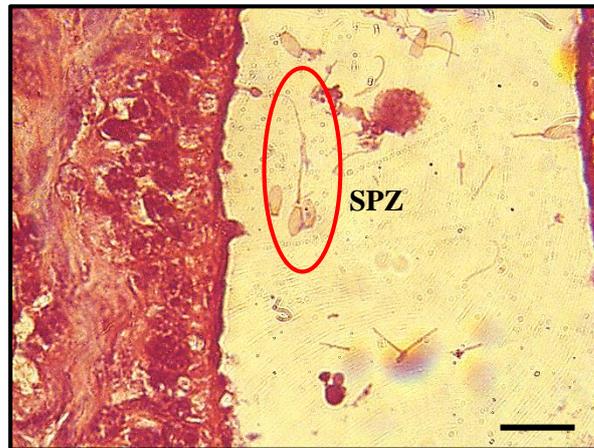


**Figure 59:** Aspect structural du canal déférent chez les trois animaux étudiés colorée au trichrome de Masson et observé au microscope photonique à G×400. Scal bar :50µm ; F : fibre de collagènes E : Épithélium

La figure 59 (a, d et g) montre les détails des invaginations du canal déférent chez le cheval, ces dernières sont formées d'une couche dense de tissu conjonctif contenant des fibres de collagènes en vert et un épithélium formée de cellules cylindrique bordée à la lumière, avec présence des spermatozoïdes à l'intérieur de cette lumière. Pour l'âne dans la figure 59 (b, e et h) comme pour le cheval la lumière est pleine de spermatozoïdes, avec la présence de tissu conjonctif ainsi que l'épithélium. Chez le mulet, figure 59 (c, f et i), nous avons l'absence totale de spz au niveau de la lumière du canal avec un épithélium qui est entourée par un tissu conjonctif contenant les fibres de collagènes.

**Au fort grossissement G×1000.**

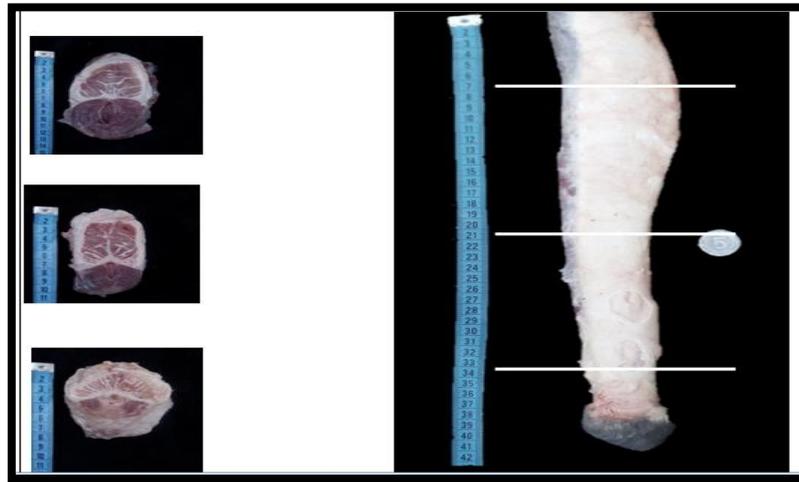
L'observation au fort grossissement du canal déférent de l'espèce hybride (mulet) nous a permis de voir la présence d'un spermatozoïde au niveau de la lumière.



**Figure 60** : Présence de spz au niveau de canal coloré pa rouge congo et observer au microscope photonique à G×1000 Scal bar :10µm.

### III.1.2.4. Pénis:

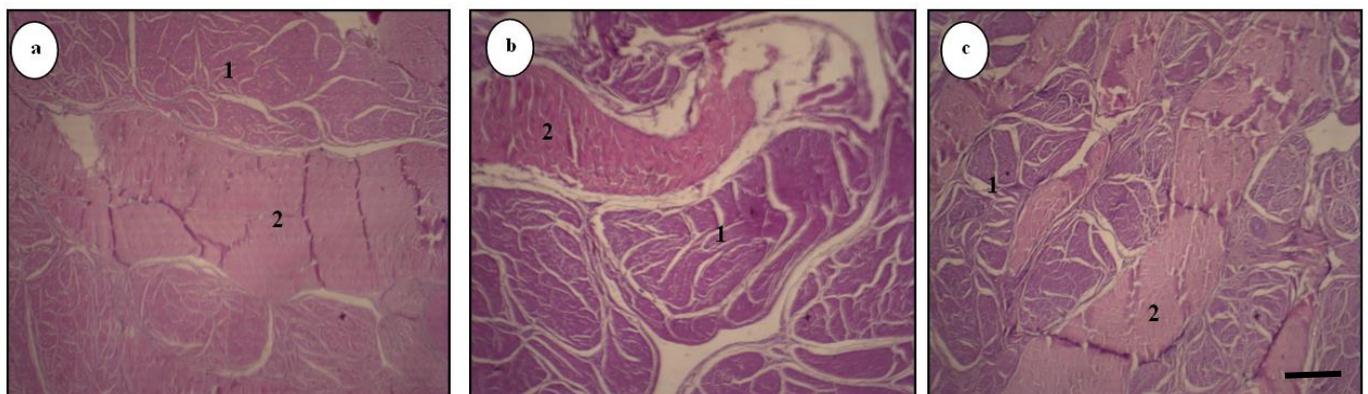
Nous avons réalisée des coupes transversales au niveau du pénis de cheval (figure 61) en trois régions déférents : proximal, corps et distal.



**Figure 61** : Représente les coupes transversales de pénis du cheval.

Le pénis, organe de copulation, est formé de trois masses de tissu érectile, les deux corps caverneux à la partie dorsale, et à la partie médiane le corps spongieux.

#### III.1.2.4.1. Corps caverneux :



**Figure 62:** Aspect structural du pénis chez le cheval au niveau de corps caverneux colorée au l'hématoxyline Éosine et observé au microscope photonique à G×40, Scal bar : 200µm.

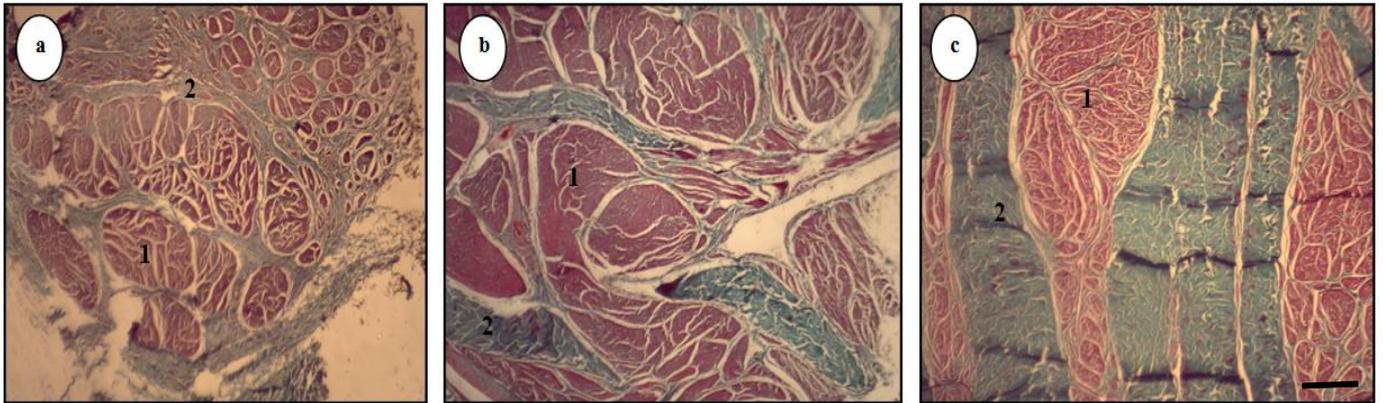
a : Corps caverneux proximal. b : Corps caverneux corps. c : Corps caverneux distal.

1 : Muscle ischio – caverneux.

2 : Muscle lisse.

Pour voir la forme générale de corps caverneux au niveau de pénis nous avons observés les coupes histologiques sous microscope photonique à G× 40 coloré au Hématoxyline éosine.

Les observations des coupes (figure 62) montrent que dans les trois parties du pénis proximal, corps et distal possèdent deux types de muscles, muscle ischio – caverneux (1) et muscle lisse (2).

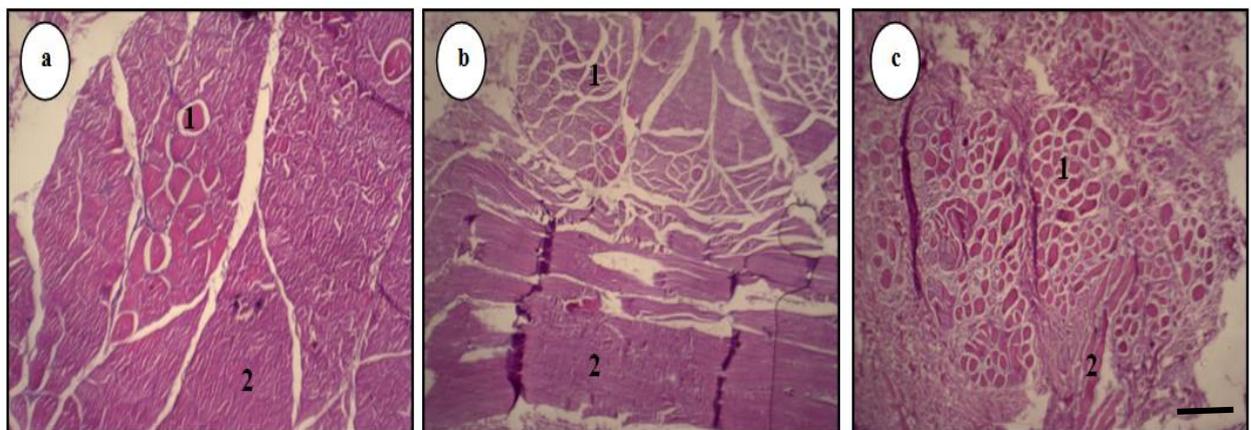


**Figure 63 :** Aspect structural du pénis chez le cheval au niveau de corps caverneux colorée au trichrome de Masson et observé au microscope photonique à G40, Scal bar : 200µm.

a : Corps caverneux proximal.    b : Corps caverneux corps.    c : Corps caverneux distal.  
 1 : Tissu érectile.                      2 : Tissu conjonctif.

Pour voir la distribution du tissu conjonctif dans le corps caverneux au niveau de pénis (figure 63) nous avons observés les coupes histologiques sous microscope photonique à G× 40 coloré par trichrome de Masson et remarqué que les trois parties du pénis proximal, corps et distal possèdent un tissu érectile séparer par un tissu conjonctif très important.

#### III.1.2.4.2. Corps spongieux :

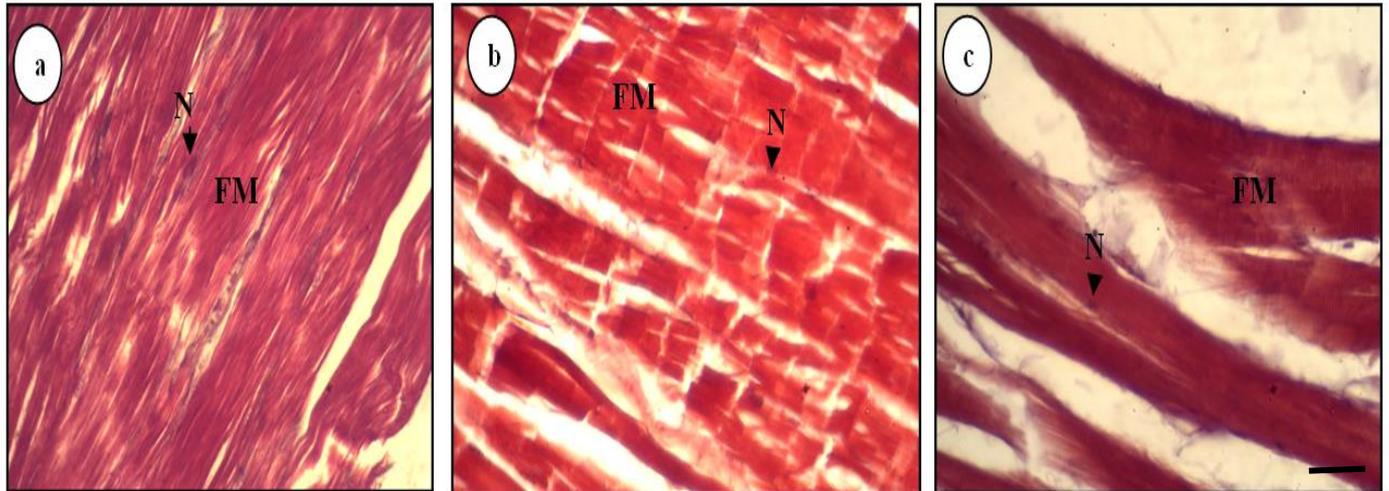


**Figure 64 :** Aspect structural du pénis chez le cheval au niveau de corps spongieux colorée au l'hématoxyline Éosine et observé au microscope photonique au G×40, Scal bar : 200µm.

a : Corps spongieux proximal.    b : Corps spongieux corps.    c : Corps spongieux distal.  
 1 : Muscle bulbo- spongieux.                      2 : Muscle lisse.

Pour voir la forme générale de corps spongieux au niveau de pénis nous avons observés les coupes histologiques sous microscope photonique à G× 40 coloré au l'hématoxyline éosine.

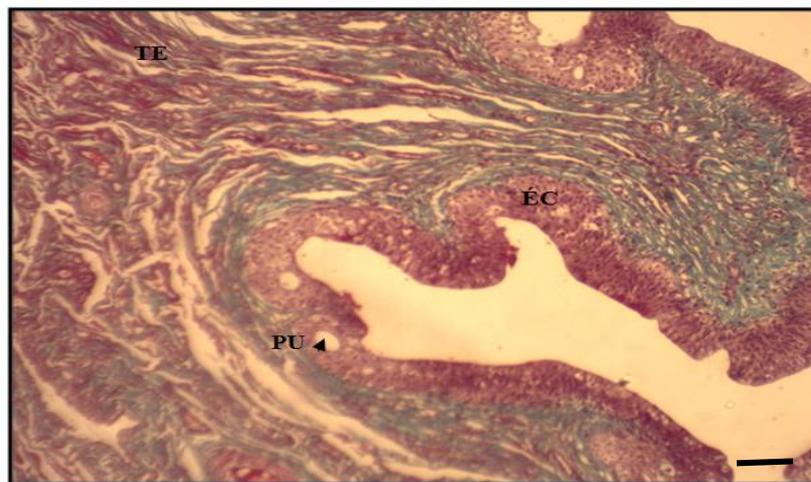
Nous remarquait que les trois parties du pénis proximal, corps et distal possèdent le muscle bulbo- spongieux et le muscle lisse.



**Figure 65** : Aspect structural du muscle lisse striés au niveau de corps spongieux du pénis chez le cheval colorée au rouge congo et observer au microscope photonique au G×400, Scal bar : 50µm.

a : Corps spongieux proximal b : Corps spongieux corps c : Corps spongieux distal  
 FM : Fibre musculaire. N : Noyau.

Les observations des coupes histologiques du muscle lisse au niveau de corps spongieux du pénis chez le cheval (figure 65) montrent que les trois parties du pénis possèdent des muscles lisses striés avec des noyaux périphériques.



**Figure 66** : Aspect structural au niveau de corps spongieux à la partie proximal du pénis chez le cheval colorée au trichrome de Masson et observé au microscope photonique au G×100, Scal bar : 100µm.

TR : Tissu érectile. PU : Glande péri-urétrale. ÉC : Épithélium cylindrique.

Les observations du la coupe histologiques au niveau de corps spongieux dans la partie proximal du pénis chez le cheval (figure 66) montre que l'urètre formé par un tissu érectile et glande péri-urétrale et un épithélium cylindrique.

III.2. Résultat génétique :

- Nous avons extrait le nombre de gènes nucléaires et mitochondriaux à travers la GenBank pour chaque espèce dans le tableau suivant :

**Tableau IV:** Les gènes extraits de la GenBank pour le genre *Equus*

ADN \ Espèce	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus asinus</i>	<i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<i>Equus przewalskii</i>	<i>Equus hemionus</i>	<i>Equus grevyi</i>	<i>Equus burchellii</i>	<i>Equus zebra</i>
ADN génomique	71,083	3,761	11	64,067	100	171	124	73
ADN mitochondrial	9,390	1,053	2	38	90	76	38	27

- Nous avons basées dans l'étude phylogénétique sur l'ADN mitochondrial pour établir des liens de parenté entre nos espèces parce qu'en général le taux de mutation de l'ADN mitochondrial est plus grand que ceux de l'ADN nucléaire (**Ballard et al, 2004**).
- Nous avons extrait les gènes mitochondriaux à travers la GenBank en spécifiant le nombre pour chaque espèce dans le tableau suivant :

**Tableau V:** Les gènes mitochondriaux extraits de la GenBank pour le genre *Equus*

Gène \ Espèce	<i>Equus caballus</i>	<i>Equus asinus</i>	<i>Equus caballus</i> × <i>Equus asinus</i>	<i>Equus przewalskii</i>	<i>Equus hemionus</i>	<i>Equus grevyi</i>	<i>Equus burchellii</i>	<i>Equus zebra</i>
Cytb	631	318	02	2	49	6	26	6
D-loop	6300	292	-	-	193	09	20	12
NADH	605	90	-	-	-	-	19	-
Mitochondrion	566	06	-	22	05	06	-	06
Cytochrome c oxidase subunit I	520	65	-	-	-	-	-	-
16S RNA	19098	14	-	-	06	-	06	-
12S RNA	448	17	-	-	10	08	10	11
ATP6	16	13	-	-	-	-	-	-
16S RNA and tRNA	01	-	-	-	-	-	-	-
Breed deqin	01	-	-	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase subunit	27	105	-	-	01	02	07	09
Mitochondrial DNA	3137	516	-	09	-	-	-	-
tRNA-thr tRNA-pro	728	34	-	-	-	-	-	-
ATP synthase	609	18	-	-	-	-	-	-

- Le gène utilisé pour tracer l'arbre phylogénétique est le cytb parce qu'il est présent pour toutes les espèces, la figure sus-dessus illustre la position de gène cytb dans l'ADN mitochondrial.

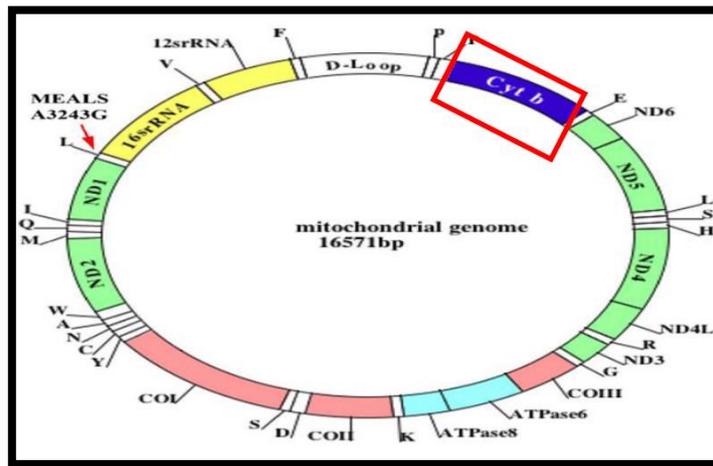


Figure 67 : La position de cytb dans l'ADN mitochondrial (Reddy, 2011).

### III.2.1. Élaboration de l'arbre phylogénétique:

L'élaboration de l'arbre phylogénétique a été réalisée à l'aide du programme MEGA5, l'objectif de cette étape est basé sur le classement des espèces *Equus*. D'après les résultats de la GenBank on s'est basé sur le gène de cytochrome b (cytb), l'origine géographique des espèces et la taille des séquences d'ADN :

- **Pour l'espèce *E. Caballus*** : Au total, nous avons 20 séquences de cytb, 6 séquences sont d'Allemagne de différentes tailles ( entre 1213pb à 370 Pb ), 4 séquences sont de la Chine de différentes tailles (entre 1139 pb à 421pb), 3 séquences sont de la Corée de différentes tailles (1213 pb et 892 pb), une séquence du Japon (1140), une séquence de l'Angleterre (1111pb), une séquence du Mexique (789), une séquence de Hongrie (686 pb), une séquence de Panama l'Amérique Central (759pb), une séquence de l'Espagne (517pb) et une séquence de la Mongolie (850 pb).
- **Pour l'espèce *E. asinus*** : Au total, nous avons 4 séquences de cytb, 2 séquences sont de la Chine de différentes tailles (1140 pb et 1137pb), une séquence de l'Espagne (517pb) et une séquence de la Mongolie (857pb).
- **Pour l'espèce *E. burchelli*** : Au total, nous avons 4 séquences de cytb, 2 séquences sont des USA de différentes tailles (1140 pb et 321pb), une séquence de l'Espagne (517pb), une séquence du Japon (857pb).
- **Pour l'espèce *E. hemionus*** : Nous avons choisi 2 séquences de cytb des USA (1140pb et 1082pb).
- **Pour l'espèce *E. grevyi*** : Nous avons choisi 2 séquences de cytb, une séquence des USA (1140pb) et une séquence du Japon (382pb).

- **Pour l'espèce *E. Caballus* × *E. asinus* (Mulet) :** nous avons une séquence de cytb de l'Egypte (358pb).
- **Pour l'espèce *E. Zebra* :** Nous avons choisi 2 séquences de cytb, une séquence du Japon (1140pb) et une séquence des USA (1140pb).
- **Pour l'espèce *E. przewalskii* :** Nous avons choisi 2 séquences de cytb, une séquence des USA (1082pb) et une séquence de la Chine (1140pb).

L'arbre phylogénétique a été construit avec la méthode UPGMA sur le gène cytb de l'ADNmt des 8 espèces de *Equus* en utilisant le modèle Kimura-2 paramètres (Kimura, 1980). On considère généralement que les branches définies par une valeur de "Bootstrap" supérieure à 50% sont fiables. Il faut 1000 répliquions de "Bootstrap" pour que cette méthode soit statistiquement valable.

Les arbres phylogénétiques obtenus sont présentés dans la figure 63.

Notre arbre phylogénétique est divisé en deux clades principaux :

Clade I : Il comprend toutes les séquences de cytb de genre *Equus*. Ce clade est subdivisé en 2 sous clades A et B selon les espèces que nous avons étudié du genre *Equus*.

-Sous clade A : comprend les espèces *E. Caballus* et *E. przewalskii*

-Sous clade B : comprend les espèces *E. asinus*, *E. Zebra*, *E. grevyi*, *E. hemionus*, *E. burchelli*.

Clade II : Il comprend la séquence de cytb de l'espèce l'hybride (*E. Caballus* × *E. asinus*)

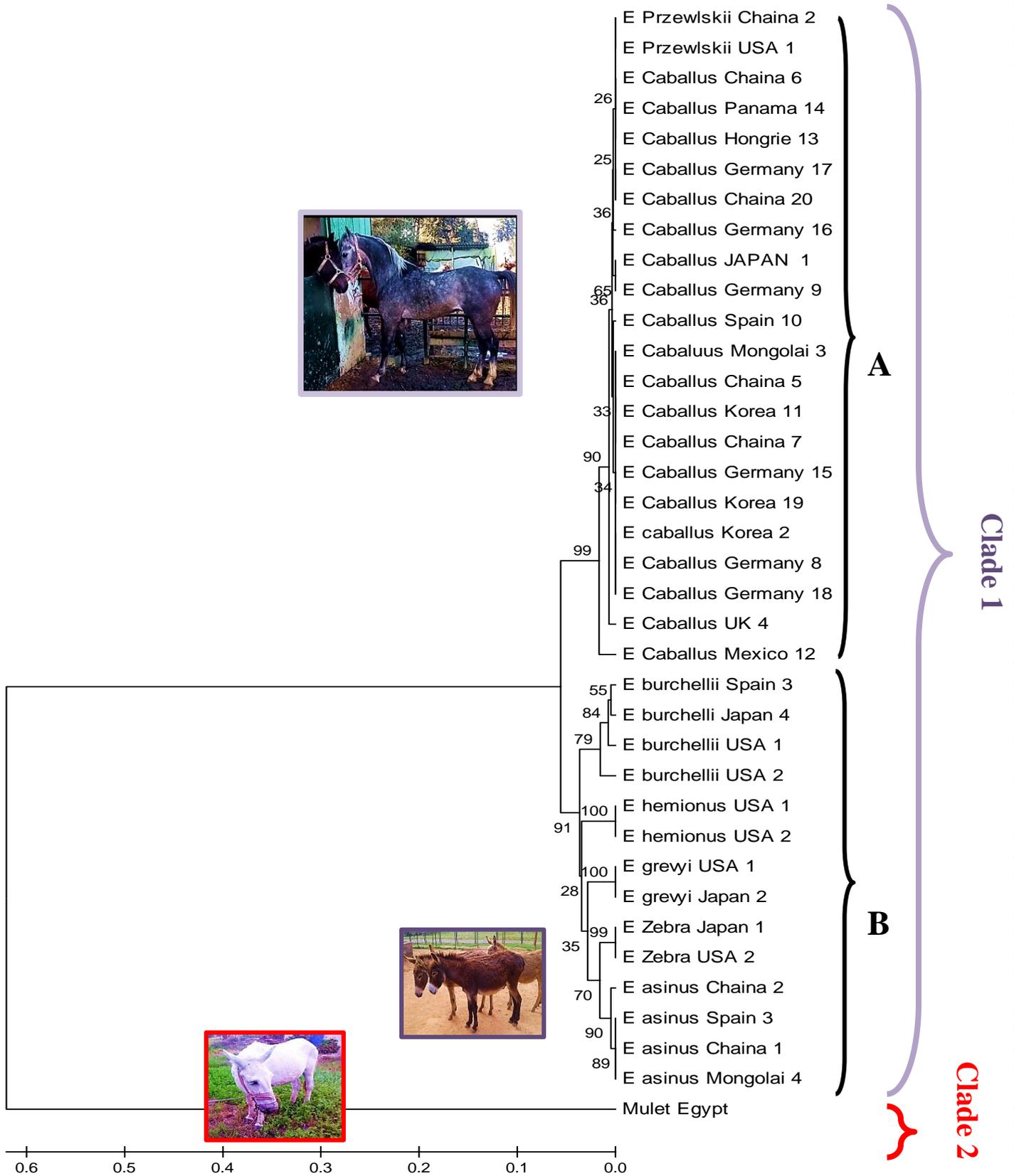


Figure 68 : Arbre UPGMA basé sur des données morphologiques de 37 espèces du genre *Equus*.

## III.2. Discussion

Notre étude a été réalisée sur l'appareil génital mâle du cheval *Equus caballus*. Nous avons également étudié d'autres types de la famille des équidés qui sont l'âne *Equus asinus* et l'hybride mulet (*Equus caballus* × *Equus asinus*). Nous allons comparer et discuter les résultats rapportés dans ce travail concernant la morphologie, l'histologie, la morphométrie et la phylogénie avec d'autres travaux de la littérature.

### III.2.1. Etude morphologique :

Concernant l'appareil génital mâle du cheval et du mulet nous avons trouvé que :

#### ✚ Pour les testicules et l'épididyme :

Les testicules, du mulet sont de taille inférieure à ceux du cheval et de l'âne, et même ceux de l'âne sont de taille inférieure à ceux du cheval, ce résultat est similaire à ceux de **Pathak (2013) et Neves (2002)**. **Pathak (2013)** 'qui indique que les testicules chez les mulets sont de taille inférieure à ceux de l'âne, et **Neves (2002)** montre que, la taille et le poids des testicules chez l'âne sont presque cinq fois plus élevés que chez le mulet. Une étude similaire avec la même observation a été noté en comparant les 3 espèces par **Hernandez et Marquez (1977)** qui a remarqué que le poids moyen des testicules du mulet (350 g) est nettement inférieur à celui d'un étalon (900 g) ou d'un âne (750 g)

**Chabchoub (2007)** a noté que l'appareil génital de l'âne est plus volumineux que celui du cheval. Il a proposé deux hypothèses, soit le cheval est moins âgé que l'âne qui est la même constatation de **Nipken (1997)** qui montre que la taille du testicule augmente avec l'âge, soit elle est liée à la saison de reproduction. Ces résultats confirment les nôtres où les testicules de nos espèces sont récupérés entre mars et avril donc saison de printemps, période pendant laquelle le cheval est en activité sexuel et l'âne au repos. En effet, **Carluccio (2013b)** a montré que le volume et le poids des testicules augmentent pendant la saison de reproduction qui coïncide avec les jours longs (printemps-été) chez le cheval et **Godiot (2016)** indique que le volume de spermes obtenu chez l'âne est plus important durant les jours courts (automne-hiver).

Les mêmes constatations ont été trouvé chez le bélier, les variations saisonnières de la spermatogénèse se traduisent par des modifications du volume et du poids des testicules

(Pelletier et al., 1977 et 1988 ; Dacheux et al., 1981 ; Colas et al., 1986 ; Chemineau et al., 1988 ; Lindsay et al., 1991 ; Baril et al., 1993 ; Meyer et al., 2004). Chez deux races grecques de moutons, Avdi (2004) a trouvé que le volume des testicules varie de façon saisonnière.

En comparant les testicules droits et gauches du cheval et du mulet, nous avons remarqué que la taille et le poids du testicule gauche est plus élevé que le testicule droit chez les deux espèces donc il existe un dimorphisme testiculaire en faveur du testicule gauche. Ce Résultat est similaire à ceux de Jones (1998) qui a trouvé que chez le cheval, le testicule gauche est habituellement de 5% plus lourd que le testicule droit, il a relié cette différence en raison du développement précoce du testicule gauche.

Le résultat obtenu concernant l'épididyme et le canal déférent est cohérent avec les résultats de Hernandez et Marquez (1977) qui indiquent que l'épididyme et le canal déférent du mulet présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que ceux du cheval et de l'âne.

#### Pour le pénis :

Le pénis chez le cheval est plus long que celui du mulet, et celui de l'âne est plus long que celui du cheval et du mulet, nous avons noté aussi que la partie proximale de pénis du cheval est plus large que celle du distal, ces différences ne sont pas observées chez le mulet ; la forme chez le cheval est arrondie alors celle du mulet est aplatie. Le canal déférent chez le cheval est plus long que celui du mulet.

La particularité observée entre nos espèces influencerait sur le taux de fertilité plutôt faible dans les croisements interspécifiques d'une ânesse et d'un étalon, ce dernier ayant un organe reproducteur de plus faible longueur (Gray, 1972). Selon Tibary (2006) chez l'âne au repos, la mesure du pénis est de 50cm de long. Les travaux de Tibary (2006) montrent que chez l'âne, la dilatation du gland est plus importante que chez le cheval, ceux de Chabchoub (2007) montrent que l'appareil génital de l'âne est plus volumineux que celui de l'étalon.

### III.2.2. Etude histologique :

#### III.2.2.1. Testicule :

Après toutes les lames étudiées et observées à  $G \times 40$  avec coloré aux Hématoxyline éosine et trichrome de Masson, l'étude structurale a montré qu'en plus de l'épithélium séminifère il y a toutes les cellules de la lignée germinale chez le cheval et l'âne donc la spermatogenèse est normale avec la présence des cellules germinales à différents stades de division et des spermatozoïdes avec des flagelles très claire dans la lumière ; cependant chez le mulet l'épithélium séminifère ne contient que quelques spermatogonies donc spermatogenèse arrêtée avec une large lumière, les autres stades sont absents et remplacés par des espaces vides qui apparaissent très claire

L'absence des cellules germinales chez le mulet a été aussi signalée par **Wodsdalek (1916)**, **Hsu et Benirschke (1969)** (cités par **Taylor et Short, 1973**) et **Hernandez et Marquez (1977)**, cette absence est dû au blocage au cours de la méiose, donc l'absence des cellules germinales (**Wodsdalek, 1916**) ; blocage de la spermatogenèse au stade pachytène de la méiose dans les testicules d'hybrides interspécifiques (**Hsu et Benirschke 1969 ; Hernandez et Marquez, 1977**). Des spermatocytes I sont présents mais des signes de dégénérescence sont aussi visibles donc dégénérescence des cellules germinales mâles durant les stades précoces de la prophase de méiose (**Makino, 1955 ; cité par Chandley, 1975**)

Nos résultats sont aussi confirmés par **Landim (1994)** qui a étudié des testicules et des cellules germinales de trois bardots en microscopie électronique, afin d'observer le développement des cellules germinales et de vérifier les modifications morphologiques liées à l'hybridation, il a noté dans les tubes séminifères d'hybrides, une importante diminution du nombre de cellules germinales en comparaison des testicules de cheval et d'âne. Certains de ces tubes sont exclusivement composés par des cellules de Sertoli. Les autres contiennent seulement un faible nombre de spermatogonies normales, avec parfois des spermatocytes de type I dégénérés, présentant un large noyau et un cytoplasme avec de nombreuses vacuoles. On constate l'absence complète de spermatocytes II, de spermatides ou de spermatozoïdes. La lumière des tubes contient une grande quantité de débris. Cette étude a permis de montrer que l'infertilité des hybrides est attribuable à une détérioration de la méiose induisant une dégénérescence des cellules germinales à partir du stade spermatocyte I et engendrant des modifications structurelles au sein de l'épithélium séminifère et des testicules des hybrides.

Dans une étude qu'il a menée par **Godiot (2016)** a également obtenu un résultat identique à notre résultat, il a observé des tubes séminifères du bardot et trouvé que ces tubes séminifères présentant un nombre de cellules de Sertoli et de cellules germinales réduit, des espaces intercellulaires élargis créant des lacunes et une lame basale irrégulière.

Et selon **Horie et Nishikawa (1959 ; cités par Chandley, 1975)** n'ont pas non plus observé de spermatozoïdes dans une étude attentive de testicules de mulet.

Après plusieurs observations des coupes histologiques au niveau du tissu interstitiel au microscope photonique à  $G \times 100$ , nous avons bien vu les cellules de Leydig à partir des lames colorés par le rouge congo et illustrent des noyaux en rouge foncé, nous remarquons que chez le cheval et le mulet la cellule de Leydig possède un grand noyau arrondi mais chez l'âne la cellule de Leydig possède un petit noyau arrondi. Chez le cheval, amas des cellules de Leydig attaché aux tubes séminifères, mais chez l'âne et le mulet, amas des cellules de Leydig espacée aux tubes séminifères.

Notre résultat obtenu est similaire à celui de **Alami (2011)** qui a noté que les cellules de Leydig sont des éléments polyédriques, au noyau arrondi avec un cytoplasme dense. Selon **Johnson (1981)** le nombre total de cellules de Leydig trouvées chez l'âne est identique à celui des chevaux adultes étudiés pendant la saison de reproduction et avec une taille du testicule comparable.

Nous avons mesuré la surface des tubes séminifères, en effet, ces tubes sont volumineux chez le cheval et l'âne elle est moyenne chez le mulet et donc d'une surface identique au niveau du testicule chez les trois animaux étudiés ces résultats sont similaires aux résultats de **Hernandez et Marquez (1977)** et **Neves (2002)**, ces auteurs ont mesuré le diamètre des tubes.

Nous avons aussi effectué le dénombrement des tubes séminaires sur quelques coupes et nous avons trouvé que ce nombre est plus grand chez le mulet par rapport au cheval et l'âne, un résultat similaire à **Hernandez et Marquez (1977)**, qui a compté une moyenne de 70 tubes séminifères par champ microscopique chez le mulet tandis que l'étalon et l'âne elle est respectivement de 42 et 30.

L'étude récente de **Figueiro (2016)** portant sur la morphologie et la morphométrie des tubes séminifères chez les chevaux criollo, a signalé que le diamètre moyen des tubes

séminifères est de 205µm, donc ce résultat se rapproche à celui qu'on a retrouvé chez le cheval.

### III.2.2.2. Épididyme :

Après plusieurs observations des coupes histologiques au microscope photonique Gx40 colorées par trichrome de Masson au niveau d'épididyme des trois espèces, nous remarquons que chez le cheval les canaux épидидymaires sont séparés au niveau des trois segments (tête, corps et queue) alors que chez l'âne ces canaux sont soudés, chez le mulet sont attachés dans la tête mais séparés dans le corps et la queue. Chez le cheval, la lumière est pleine de spermatozoïde dans la tête et légèrement dans le corps et la queue. Cependant chez l'âne la lumière est pleine de spermatozoïdes dans les différentes parties d'épididymes par contre chez le mulet nous avons remarqué la présence de quelques spermatozoïdes. La structure des différents segments épидидymaire (trois régions tête, corps et queue) a aussi été identifié d'une manière identique chez la chèvre par **Goyal et Williams (1991)**.

Chez le cheval, l'âne et le mulet l'épididyme représente un tube long, le même résultat est retrouvé chez le singe (**Ramos et Dym, 1977**), chez le taureau (**Goyal, 19851; Nicander1957 ;Sinowatz, 1981**), chez le mouton (**Nicander 1957, 1979**), chez le chien (**Connell et Donjacour, 19851**), chez le buffle (**Goyal et Dhingra, 19751**), chez le cobaye (**Hoffer et Greenberg, 1978**), chez le lapin (**Nicander, 1957 ; Jones et al., 1979**) et chez l'humain (**Holstein, 1969**).

La pauvreté en spermatozoïdes retrouvée dans la lumière de la partie corps de l'épididyme chez l'hybride, a été aussi noté par **Trujillo (1969) et Chandley (1975) (cité par landim et al., 1994)**.

Nos résultats morphométriques montrent que la hauteur de l'épithélium au niveau du corps de l'épididyme diffère selon l'espèce. Chez le cheval elle est plus haute que l'âne alors que chez le mulet elle est intermédiaire ; chez la chèvre, **Goyal et Williams (1991)** a constaté que la hauteur de l'épithélium, le diamètre de la lumière et l'épaisseur de la paroi musculaire varient dans chaque région, l'épithélium est plus haut au niveau de la tête alors que plus courte au niveau de la queue.

Nous avons aussi constaté la présence des plis au niveau de la queue chez l'âne et le mulet et absences chez le cheval. Ce résultat est similaire à celui de **Alkafafy (2009)** chez l'âne où l'épithélium de la queue présente beaucoup de plis.

### III.2.2.3. Canal déférent :

Notre analyse histologique observé au microscope photonique G×40 coloré par rouge congo, montre que nos espèces représentent la même structure de canal déférent mais avec une particularité sur le plan histologique, la présence de spermatozoïdes en grande quantité au niveau de la lumière du canal chez *Equus caballus* et *Equus asinus* par contre chez l'hybride on trouve peu de spermatozoïdes. Résultat similaire retrouvé par **Selim (2012)**, chez l'âne l'ampoule du canal déférent de l'âne avait une muqueuse pliée et sa lumière contenait des spermatozoïdes. Nos résultats sont similaires aussi à ceux de **Benirschke et Ryder (1985)**, ces auteurs ont noté que le mulet et le bardot seraient-ils occasionnellement aptes à produire quelques rares spermatozoïdes. Toutefois, il persiste un doute considérable sur le fait que le mulet et le bardot puissent un jour produire une quantité suffisante de spermatozoïdes disposant d'une aptitude correcte à la fécondation. **Horie et Nishikawa 1959 (cités par chandley, 1975)** n'ont pas non plus observé de spermatozoïdes dans une étude attentive de testicules de mulet.

La lumière du canal déférent est entourée chez les 3 espèces d'une couche muqueuse avec invaginations, et couche sous-muqueuse, couche musculaire et adventice, résultats similaires à ceux retrouvés chez plusieurs espèces : l'étalon (**Ellery, 1971**), le chameau (**Goswami et al., 1990**), le cerf rouge (**Aughey, 1969**). Chez le chameau la muqueuse du canal déférent est pliée et doublée d'un épithélium cylindrique pseudo stratifié, sa hauteur semble inconstante, le contenu luminal se compose de spermatozoïdes (**Ali et al., 1977**). Nos résultats morphométriques de la longueur des invaginations du canal déférent chez les trois espèces montrent que la hauteur des invaginations est plus longue chez le cheval que l'âne alors que le mulet est intermédiaire.

### III.2.2.4. Pénis :

Après l'analyse des coupes histologiques au niveau du pénis colorée au Hématoxyline éosine et observé au microscope photonique a G×40, nous avons obtenu que les trois parties du pénis proximal, corps et distal sont formés par deux types de tissu érectile, le corps caverneux et le corps spongieux, ce résultat est confirmé par **Barone (2001)** qui a noté que le pénis l'organe copulateur du mâle est essentiellement constitué de formations érectiles (corps caverneux, corps spongieux de l'urètre et du gland).

Les observations des coupes histologiques aux niveaux du corps caverneux et corps spongieux sous microscope photonique au Gx40 et Gx400 colorées au Hématoxyline éosine

et rouge congo montrent que les trois parties du pénis étudiées possèdent trois types de muscles, muscle ischio – caverneux et bulbo- spongieux, muscle lisse et muscle strié avec des noyaux périphériques. Nos résultats sont identiques à ceux de **Barone (2001)** qui a trouvé que les muscles du pénis sont au nombre de trois. Le muscle bulbo-spongieux est un muscle impair, strié et appartient au corps spongieux de l'urètre, le muscle ischio-caverneux est aussi un muscle strié mais pair et il couvre la racine du pénis correspondante, il joue un rôle important lors de l'érection en comprimant les vaisseaux et la racine du pénis, enfin, le muscle rétracteur du pénis est un muscle pair, formé de fibres musculaires lisses et de fibres élastiques, ce muscle permet de ramener le pénis dans sa position de repos, après l'érection.

Nous remarquons d'après l'étude des coupes histologiques sous microscope photonique au Gx40 colorées par trichrome de Masson qui a mis en évidence le tissu conjonctif en vert que la distribution de ce dernier dans le corps caverneux au niveau du pénis est très importante, nous avons observé et remarqué que les trois parties du pénis possèdent un tissu érectile.

Notre résultat est identique à celui de **Barone (2001)** qui a trouvé que la constitution complexe du pénis, physiologie et ses importantes variations de volume, liées au mécanisme de l'érection, imposent aux vaisseaux et aux nerfs une topographie complexe. **Barone (2001)** a aussi trouvé que le pénis est vascularisé par plusieurs artères dont l'artère profonde du pénis et l'artère dorsale du pénis qui longe la face dorsale de l'organe. Ces artères font suite à l'artère honteuse interne après sa sortie de la cavité pelvienne et assurent l'irrigation des corps caverneux. Les terminaisons de l'artère honteuse externe, dont l'artère crâniale du pénis, assure quant à elle, l'irrigation du gland. Les veines du pénis sont volumineuses ; elles constituent un important plexus le long du bord dorsal de l'organe. Ce plexus dorsal s'étend jusqu'aux racines du pénis sous la forme de deux gros troncs flexueux, largement anastomosés entre eux. Ce plexus est drainé par deux systèmes, l'un antérieur, qui se jette dans la veine fémorale, et l'autre postérieur, qui aboutit à la veine honteuse.

Nos résultats sont aussi similaires aux résultats obtenus par **Roger (2009)** qui a remarqué que les formations érectiles correspondent à des lacunes sanguines entourées par une enveloppe conjonctive. Lors d'un afflux sanguin au niveau de ces lacunes, l'augmentation de pression cavitaire déforme l'organe, le pénis, et le rigidifie.

### III.2.3. Etude phylogénétique :

Notre arbre phylogénétique a été divisé en 2 clades principaux selon l'origine géographique et les tailles des séquences que nous avons pris.

*Equus caballus* et *Equus przewalskii* sont dans le même sous clade (A), ce résultat est similaire à celui de **Petrus (2003)**, qui a trouvé que les huit espèces peuvent être regroupées en 3 sous-genres selon leurs caractéristiques morphologiques : le premier sous-genre cheval, comprenant 2 espèces : *Equus caballus* (cheval domestique) et *Equus przewalskii* (cheval de Przewalskii)

La position de *Equus asinus*, *Equus Zebra*, *Equus grevyi*, *Equus hemionus* et *Equus burchelli* en sous clades B est différente de **Petrus (2003)**, pour lui selon le plan morphologique le sous-genre âne, comprenant 2 espèces *Equus asinus* (âne sauvage) et *Equus hemionus* (hémione), et le sous-genre zèbre, comprenant 4 espèces : *Equus grevyi* (zèbre de Grevyi), *Equus burchellii* (zèbre des plaines), *Equus zebra* (zèbre des montagnes) et *Equus quagga* (quagga).

## Conclusion

Notre travail portant sur la comparaison entre trois espèces appartenant à la famille des équidés le cheval (*Equus caballus*), l'âne (*Equus asinus*) et le mulet (*Equus caballus* × *Equus asinus*). Cette comparaison est étudiée sur le plan morphologique, histologique et morphométrique de l'appareil reproducteur mâle chez ces trois espèces et d'un autre part sur le positionnement de ces espèces dans un arbre phylogénétique, ainsi nous pouvant conclure :

- **Sur le plan morphologique :**

Une similitude d'aspect anatomique et structurale au niveau de l'appareil génital chez les espèces, la différence s'observe dans les mesures et le poids.

- **Sur le plan histologique et morphométrique**

- ✓ **Du testicule**

Une similitude d'aspect anatomique et structurale de l'organisation des tubes séminifères chez les espèces, la différence s'observe dans le rapprochement de ces tubes et une lumière réduite et plein de spermatozoïdes chez *Equus caballus* et *Equus asinus* par rapport *Equus caballus* × *Equus asinus* qui possède une large lumière bordée par un épithélium séminifère sans cellules germinales avec l'apparition des espaces vides et l'absence total de spermatozoïdes. Ces tubes séminifères sont plus volumineux chez *Equus caballus* et *Equus asinus*.

- ✓ **De l'épididyme**

Une similitude d'aspect anatomique et structurale de l'organisation des canaux épидидymaires chez les trois espèces. Les lobules épидидymaires sont volumineux présente d'un épithélium fin avec une lumière large et un peu de spermatozoïdes chez le mulet, alors qu'ils petit et épais avec une lumière réduite et plein des spermatozoïdes chez le cheval et l'âne, avec la présence d'un tissu conjonctif chez les trois espèces.

- ✓ **Du canal déférent**

Une similitude d'aspect anatomique et structurale au niveau du canal déférent. La différence s'observe dans la surface et la lumière du ce canal et la longueur des invaginations. La surface élevée avec une large lumière et des invaginations longs chez le cheval et le mulet par rapport l'âne.

- ✓ **Du pénis**

-Les trois parties du pénis proximal, corps et distal sont formées par deux types de tissu érectile, le corps caverneux et le corps spongieux.

## Conclusion

---

- **Sur le plan phylogénétique :**

Pour la reconstruction des relations phylogénétiques du genre *Equus* nous avons :

- Trouver les caractéristiques d'une part des espèces les plus proche à notre modèle d'étude *Equus caballus*, *Equus asinus* et *Equus caballus* × *Equus asinus* et d'autre part les espèces sœurs (cas de complexe : (*E. Zebra* / *E. grevyi*) et (*E. caballus*/ *E. przewalskii*).

- Nous avons trouvé que *Equus caballus* et *Equus caballus* × *Equus asinus* sont éloigner, et *Equus asinus* et *Equus caballus* × *Equus asinus* aussi sont éloigner.

Après avoir analysé les résultats, nous avons constaté que nos espèces sont similaire sur le plan morphologique, mais qu'il y avait un rapprochement entre le cheval et l'âne sur le plan histologique et moléculaire, par contre l'hybride est plus loin sur le plan histologique et moléculaire avec leur parent.

## Références bibliographiques

### A

- **Alauzet C, 2009.** Taxonomie des bactéries anaérobies : de la reclassification a la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse doctorat, université de Nancy.
- **Alami el sabe M, 2011.** les tumeurs testiculaires à cellules de leydig pp .77
- **Amann R, 1993,** physiology and endocrinology. In : voss jl (eds), equine reproduction, 1ed, lea & febigereds, philadelphia, pp. 1137-1154
- **Amann R, 2011,** physiology and Endocrinology. In: mc kinnnon ao, squires el, vaala we, varner dd (eds), equine reproduction, 2ed. united kingdom : wiley-blackwell, pp.881-908.
- **Avdi.M., Banos.G., Stefos.K., Chemineau.P.2004.** Seasonal variation in testicular volume and sexualbehavior of chios ans serra rams. Theriogenology.62 :275-282.

### B

- **Ballard J. et M Whitlock., 2004.** “The incomplete natural history of mitochondria.” Molecular Ecology 13:729-744.
- **Baril, G., Chemineau, P., Cognié, Y., Guérin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P., Vallet, J.C., 1993.** Manuel de formation pour l’insémination artificielle chez les ovins et les caprins. Et. FAO Ed.de FAO : Production et santé animales. FAO Ed., No. 83.
- **Barone R., 1978.** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome troisième : splanchnologie. Fascicule II appareil uro-génital, Fœtus et ses annexes, Péritoine et topographie abdominale. Lyon : Ecole Nationale Vétérinaire. 951p.
- **Barone R., 2001.** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Appareil uro-génital, Fœtus et annexes, Péritoine et topographie abdominale. 3ème Edition. EdsVigot, Paris., 896p
- **Barone R., Tagand R., 1956.** Anatomie des équidés domestiques. Tome second. Splanchnologie et angiologie. Fascicule III. Appareil uro-génital. Péritoine, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, pp. 633-1010.
- **Barone R., 2001.** Anatomie comparée des mammifères domestiques, Tome 4 : Splanchnologie II. Appareil Uro-génital, foetus et ses annexes. Péritoine et topographie abdominale., Paris: Vigot. 896.
- **Barone R., 2001.** Anatomie comarée des mammifères domestiques, Tome 4 : Splanchnologie II. Appariel Uro-génital, fœtus et ses annexes. Péritione et topographie abdominale. Paris : Vigot. 896.

## Références bibliographiques

- **Baronne R., 2001.**Appareil génital mâle. In : Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot, 83-250.
- **Beaulieu M. E., 2007.** Caractérisation moléculaire des champignons ophiostomatoïdes associés à quatre espèces de scolytes de l'écorce colonisant l'épinette blanche au Québec et phylogénie multigénique d'une nouvelle espèce de leptographium. *Thèse doctorat, Université Laval, Québec.*
- **Benirschke K, Ryder O., 1985** genetic aspects of equids with particular reference to their hybrids. *Equine Vet. J., Suppl 3,1-10.*
- **Benson J, D., Nielsen, H., Von Heijne, G., et Brunk, S. 2004.** Improved prediction of signal peptides : signal IP 3.0. *J.Mol.Biol 340, 340, 783-795.*

### C

- **Carluccio A, Panzani S, Contri A, Branzo V, Robbe D, Veronesi M., 2013b.** Influence of season on testicular morphometry and semen characteristics in Martina Franca jackass. *Theriogenology, 79, 502-507.*
- **Chabchoub A, Tibary A, Trimeche A 2007b.** Particularités et spécificités de la reproduction du baudet. *Le nouveau praticien vétérinaire équine, 4(14), 36-40.*
- **Chaffaux S, 1985.** Anatomie et physiologie de l'appareil génital de l'étalon. In : La reproduction chez le cheval, physiologie-pathologie, ENVA, Maisons-Alfort, 53-66.
- **Chandley AC, Short RV, Allen WR., 1975** cytogenetic studies of three equine hybrids. *J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 365-370.*
- **Cloas G., Guerin Y., Lemaire Y., Montassier, Despierres J.,1986.** Variations saisonnières du diamètre testiculaire et de la morphologie des spermatozoïdes chez le bélier Vendéen et le bélier Texel. *Repr. Nutr. Dév. 26, (3) \_863-875.*
- **Constantinescu GM., Constantinescu IA., 2010,** The Pelvis, PelvicViscera, Tail and External Genitalia. In: *Clinical dissection guide for large animals : Horses and large Ruminants. 2nd eds., Omphaloskepsis books, pp. 313-337.*

### D

- **Diallo A.B., 2009.** Bioinformatique avancée. Université du Québec à Montréal. Canada.

## Références bibliographiques

### F

- **Figueiro G., 2016.** Morphology and morphometry of seminiferous tubules in crioulu horses.

### G

- **Godiot, 2016.** Physiologie et pathologie de la reproduction chez l'âne : étude bibliographique PP.36, 104.
- **Grau H, Walter P., 1975.** précis d'histologie et d' anatomie microscopique des animaux domestique, 155p.
- **Gray AP, 1972.** Family equidea. In : mammalian hybrids. 2<sup>nd</sup> Ed. Slough : Commonwealth Agricultural Bureaux, p. 94-113.

### H

- **Haeckel E., 1860.** Überneue, lebende Radiolarien des Mittelmeeres, Monatsberichte der Kdniglichen. 794-817.
- **Hernandez-jaurgegui P, : Marquez-monter H 1977,** Fine strusture of mullet testes : light and electronmicroscopystudy. Am. J.Vet. Res., 38 , n°4, 443447.
- HARAS NATIONAUX (2014a). Stats& cartes (en ligne). Disponible sur [http://statscheval.haras-nationaux.fr/core/zone\\_menus.php?zone=229&r=1318](http://statscheval.haras-nationaux.fr/core/zone_menus.php?zone=229&r=1318).  
Tableau de bord/ Elevage et production (consulté le 05/08/2015).

### J

- **Johnson L., Neaves WB., 1981** Age-related changes in the Leydig cell populations, seminiferous tubules and sperm production in stallions. Biol Reprod;24:703- 712.
- **Johnson L., 1987.**Thompson DLJr. Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. J Reprod Fertil;81:227–232
- **Jones DN., 1998.** Desenvolvimen to testicular d'equin osmestiços da raça Brasileira de hipismo, de 1 a 30 mesesde idade ( dissertação) . Belo horizonte MG : Universidade Federal de Minas Gerais
- **Jourdan H., 2006.** Méthode comparative : Evolution d'une méthode vers un noeud interdisciplinaire. Thèse doctorat, University of British Columbia

### K

- **Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G., 1971.** Studies on polynucleotides. XCVI. Repairreplications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J. Mol. Biol., 56: 341-361.

## Références bibliographiques

### L

- **Landin FC, Bortolozzi J., 1994** Ultrastructure of the hinny (*Equus asinus* x *Equus caballus*) seminiferous epithelium. *Anat. Histol. Embryol.* 23, 343-351.
- **Linné., 1758.**
- **Little TV, Holyoak ,. 1992** . Reproductive anatomy and physiology of the stallion. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 8 (1), pp. 1-29.
- **Linnaeus.,1758.** Disponible sur [https://fr.wikipedia.org/wiki/Equus-\(genre\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Equus-(genre)).

### M

- **Malone S.A., 1980.** Le cheval et ses maladies, 14p.
- **Marcenac LN, Aublet H, D'authevillr P., 1980** Encyclopédie du cheval. 4ème ed Paris : Maloine, 704-709, 1350p.
- **Mckinnon A., Squires E., Vaala W., Varner D.,1993.**
- **Mills E., 2007** Tstacey histology for pathologists LWW. p944.
- **Mylène C., 2015.** Les alternatives a la castration chirurgicale chez l'étalon pp.24.

### N

- **Neves SE, Chiarini-garacia H, Fanca LR., 2002.** Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biology of Reproduction*, 67, 247-255.
- **Nijman I., Otsen M. Verkaar E.L., Ruijter C., Hanekamp E., 2003.** Hybridization of banteng (*Bosjavanicus*) and zebu (*Bosindicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity*, 90: 10–16.
- **Nipken C., Wrobel KH., 1997.** A quantitative morphological study of age - related changes in the donkeytestis in the period between puberty and senium. *Andrologia* 29 (3), 149-161.

### P

- **Pathak V., Sheih A, Rajput R, Bherdwaj RL, Sharma A., 2013.** Morphometric and histological observations on the testis of mule and donkey of himalayan region. *Indian Journal of Veterinary Anatomy*, 25 (2), 99-101.
- **Pelletier, J., Chemineau, P., Thimonier, J. & Volland-Nail, P., 1986.** Environment and changes in reproductive activity in sheep and goats. 8th

## Références bibliographiques

Conf. Eur. Soc. Comp. Bio chem., 31 août-2 septembre 1986, Strasbourg, France.

- **Pichett BW., 1989.** Management of the stallion for maximum reproduction efficiency. II. Animal reproduction and biotechnology laboratory bulletin. Vol. No. 05. Colorado state university : Fort Collins.

### R

- **Rischkowsky B., Pilling D., 2008.** L'Etat des ressources zoogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde, pp393-410.
- **Roger T., 2009.** L'appareil génital mâle des mammifères domestiques. Documents de cours de l'Unité d'anatomie, Vetagro-sup, Campus vétérinaire de Lyon, 54pp.
- **Roser JF., 2011.** endocrine-paracrine-autocrine regulation of reproductive function in the stallion. in: mc kinnon ao, squires el, vaala we, varner dd (eds), Equine Reproduction, 2ed. United Kingdom, Wiley-Blackwell, pp. 996-1014.
- **Roset J., 2004.** Identification et signalement de l'âne. [En ligne] Accès Internet : [http://www.adada-assos.org/legislation\\_1\\_2.html](http://www.adada-assos.org/legislation_1_2.html) .
- **Roamba C, R., 2014 .** *Thèse* caractérisation morphobiométrique et Biochimique des asins (*Equus asinus*) du Sénégal.

### S

- **Sanger F., Nicklen S., Coulson A., 1977.** DNA Sequencing with chain terminating inhibitors Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467.
- **Short RV., 1975 a.** The evolution of the horse. J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 1-6.
- **Short RV. 1975 b.**The contribution of the mule to scientific thought. J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 359-364.
- **Stevens A., James L., 1991.** Human histology mosby 1997 Ch16 FIG 16-4 Cancer, , 68, 2324- 2329

### T

- **Taylor MJ, Short RV., 1973.** Development of the germ cells in the ovary of the mule and hinny. J. Reprod. Fert. 32, 441-445.
- **Thibault C., 2001.** La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses
- **Tibary A, Sghiri A, Bakkoury M, Fite C., 2006.** Reproductive patterns in donkeys. In : Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association, 22-26 janvier 2006, Marrakech, Morocco. 311-319.

## Références bibliographiques

- **Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S., 2011** - MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*
- **Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673-4680.

### V

- **Vicente M. C. and Fulton T., 2003.** Utilisation des marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité génétique végétale. International Plant Genetic Institute for genomic diversity resources Institute

### W

- **Weather., 2006.**Atlas d'histologie fonctionnelle de, Traduction de la 5<sup>e</sup> édition anglaise par pierre Validire et Patricia Validire –Charpy, Ouvrage Original : Wheater's Functional Histology .A Text and Atlas, Fith Edition by J.W.Heath, J. Lowe, A. Stevens, B. Young .
- Wiley B, Equine Reproduction Second *Edition*. london. 3288 p.

### Y

- **Yoshikawa H., Dogruman-AI F., Dogruman-Ai F., Turk S., Kustimur S., Balaban N., et al., 2011.** Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocyst issub types from fecalsamples. *ParasitolRes.*;109:1045-50

**FICHE TECHNIQUE N°1 : DÉSHYDRATATION**

	<b>Durée</b>
1. Bain formol 10%.....	1 heure
2. Bain d'alcool 65° .....	1 heure
3. Bain d'alcool 75° .....	1 heure
4. Bain d'alcool 90° .....	1 heure
5. Bain d'alcool 96° .....	1 heure

**FICHE TECHNIQUE N°2 : ECLAIRCISSEMENT**

	<b>Durée</b>
1. BainXylène.....	1heure
2. BainXylène.....	1heure
3. BainXylène.....	1heure
4. BainXylène.....	1heure
5. BainXylène.....	1heure

**FICHE TECHNIQUE N°3 : IMPREGNATION (Pénétration Des Pièces Par Paraffinage)**

	<b>Durée</b>
1. Bain de paraffine.....	1 heure
2. Bain de paraffine.....	1 heure

**FICHE TECHNIQUE N°4 : COLORATION TOPOGRAPHIQUE AU HEMATOXYLINE EOSINE**

**1. Réactifs :**

1.1. Hématoxyline de Groat.

1.2. L'éosine à 1%.

**2. Mode opératoire :**

<b><u>Hydratation</u></b>	<b><u>Durée</u></b>
▪ 3 bains xylène.....	20min
▪ 3 bain d'alcool.....	passage
▪ L'eau .....	Rinçage
<b><u>Coloration</u></b>	<b><u>Durée</u></b>
▪ Colorer par Hématoxyline de Goat.....	5min
▪ L'eau .....	Rinçage
▪ L'éosine .....	1min
▪ L'eau .....	Rinçage
<b><u>Déshydratation</u></b>	<b><u>Durée</u></b>
▪ 3 bain d'alcool.....	passage
▪ 3 bains xylène.....	passage

- Monter à l'Eukit.

**3. Résultats :**

Noyaux bleus à bleus-noirs, cytoplasmes roses à rouges, hématies roses vifs, collagène roses très pâle, fibres élastiques roses vifs.

**FICHE TECHNIQUE N°5 : COLORATION TOPOGRAPHIQUE AU TRICHROME DE MASSON**

**1. Réactifs :**

- 1.1. Hématoxyline de Groat
- 1.2. Fuchsine acide-Ponceau
- 1.3. Orange G acide phosphomolybdique
- 1.4. Vert lumière acétique
- 1.5. Eau acétifiée à 1%

**2. Mode opératoire :**

<u>Hydratation</u>	<u>Durée</u>
▪ 3 bains xylène .....	20min
▪ 3 bain d'alcool.....	passage
▪ L'eau .....	Rinçage

<u>Coloration</u>	<u>Durée</u>
▪ Colorer par Hématoxyline de Goat.....	5min
▪ Rincer à l'eau courante pendant.....	5 min
▪ Colorer par la fuchsine Ponceau pendant.....	5 min
▪ Rincer à l'eau acétifiée à .....	1%
▪ Colorer par l'orange G acide phosphomolybdique pendant .....	5 min
▪ Rincer à l'eau acétifiée à .....	1%
▪ Colorer par vert lumière pendant.....	5 min
▪ Rincer à l'eau acétifiée à.....	1%

<u>Déshydratation</u>	<u>Durée</u>
▪ 3 bain d'alcool.....	passage
▪ 3 bains xylène.....	passage
▪ Monter à l'Eukit.	

**3. Résultats :**

Noyaux bleus-noirs, mucus vert, cytoplasme rose à rouge, kératine rouge vif, hématies rouges vifs, collagènevert, fibres élastiques roses.

**FICHE TECHNIQUE N°6 : COLORATION TOPOGRAPHIQUE AU ROUGE CONGO**

**1. Réactifs :**

- 1.1. Hématoxyline de Groat
- 1.2. Le Rouge Congo

**2. Mode opératoire :**

<u>Hydratation</u>	<u>Durée</u>
▪ 3 bains xylène.....	20min
▪ 3 bain d'alcool.....	passage
▪ L'eau .....	Rinçage

<u>Coloration</u>	<u>Durée</u>
▪ Le Rouge Congo .....	30min
▪ L'eau .....	10 min
▪ Colorer par Hématoxyline de Goat.....	1min
▪ L'eau .....	Rinçage

<u>Déshydratation</u>	<u>Durée</u>
▪ 3 bain d'alcool.....	passage
▪ 3 bains xylène.....	passage
▪ Monter à l'Eukit.	

**3. Résultats :**

Amylose rouge (biréfringence en lumière polarisée) Fibres rouges (équivalent d'une réticuline) Polynucléaires éosinophiles rouges. Nécessaire.

**MATERIEL ET LES REACTIFS NÉCESSAIRE POUR L'HISTOLOGIE :**



**Automate de marque Leica (TF 1020)**

## Annexe I



**Station d'enrobage de marque Leica (LEICA EG 1150H, LEICA EG 1150C)**



**Collage des cassettes en plastique sur les moules de métal**



**Les différents types des moules**



**Microtome de marque Leica (LEICA RM 22350)**

## Annexe I



**La plaque chauffant (45°)**



**Les lames en verre**



**Les lamelles en verre**



**Etuve à 80°**

## Annexe I



**Les bains d'Hydratation et déshydratation des coupes histologique**



**Coloration topographique au hématoxyline éosine**

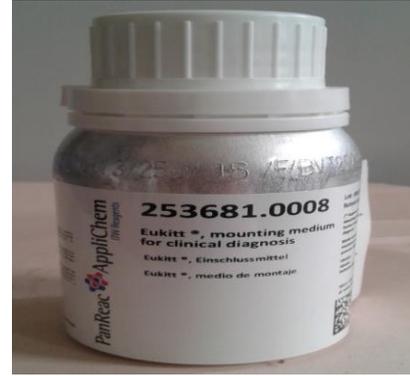


**Coloration topographique au Trichrome de Masson**

## Annexe I



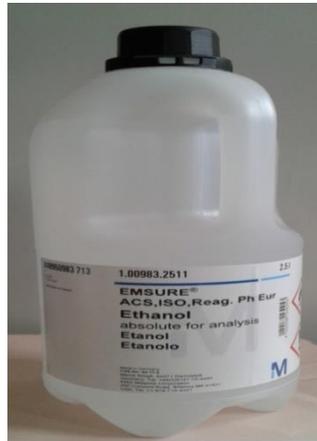
**Coloration topographique au Rouge congo**



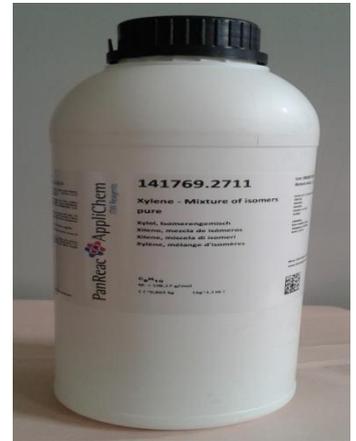
**Eukit**



**Formol liquide 37%**



**Alcool Éthanol**



**Xylène**



**Paraffine solide**



**Balance électronique marque CLATRONIC**