



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1
Mémoire



En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

*Evaluation immunohistochimique des récepteurs aux androgènes au niveau
ovarien au cours du cycle œstral chez la vache*

Présenté par :

HADJ IDRIS Lydia et MIMOUNI Sihem

Devant le Jury : 23/09/2020

<i>Chelghoum H.</i>	<i>MCB</i>	<i>FSNV, Blida1</i>	<i>Présidente</i>
<i>Zatra Y.</i>	<i>MCB</i>	<i>FSNV, Blida1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Boukenaoui-Ferrouk N.</i>	<i>MCA</i>	<i>ISN, Blida1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Ferrouk M.</i>	<i>MCB</i>	<i>ISN, Blida1</i>	<i>Co-Promoteur</i>

Année universitaire 2019 / 2020

DEDICACE

**On dédié ce modeste travail à nos parents qui nous ont donné la joie de vivre et ont été notre source d'énergie pendant toute notre vie, que dieu les gardes auprès de nous
Que dieu vous préserve une longue vie heureuse.**

A tous nos amis

On vous dédie ce travail et vous souhaite un avenir à la hauteur de vos ambitions. Que notre amitié dure

A nos familles, Tous ceux que nous aimons, qui aiment et nous ont comblez de conseils.

A tous ceux qui, un jour, ont pensé à nous, les plus beaux mots ne sauraient exprimer notre redevance.

Enfin, nous exprimons nos gratitudes envers nos enseignants qui ont participé laborieusement à notre formation durant notre cursus universitaire.

REMERCIEMENTS

On exprime nos reconnaissances à

Mme Boukenaoui-Ferrouk N.

Maitre de conférences « A » à l'université de Blida -1- qui a accepté d'être notre promotrice et qui a parfaitement dirigée notre travail avec une grande efficacité. Nous la remercions pour sa disponibilité permanente au cours de ces mois. Pour cela, nous

Lui exprime toutes nos gratitudees.

M Ferrouk M.

Maitre de conférences « B » à l'université de Blida -1- Pour votre disponibilité ainsi que vos compétences scientifiques qui nous ont été d'une aide précieuse.

Mme Chelghoum H.

Maitre de conférences « B » à l'université de Blida -1- Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse,

Hommages respectueux

Mme ZatraY.

Maitre de conférences « B » à l'université de Blida -1- Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.

On adresse nos sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté de nous rencontrer et de répondre à nos questions durant nos recherches, qui nous ont assurés des études de haut niveau et qui nous permis d'acquérir des connaissances.

A tous les employeurs de l'université de Saad Dahleb merci pour votre service

Sommaire

Introduction.....	1
Partie bibliographique	
Chapitre 1 : Ovaire et physiologie de la reproduction chez la vache	
I. Anatomie de l'appareil génital	2
I.1.ovaires.....	3
I.1.1. Conformation des ovaires	3
I.1.2. Dimensions et poids	3
I.1.3. Structure des ovaires	4
II. Cycle sexuel	5
II.1. Cycle œstral	5
II.2. Cycle ovarien	6
II.2.1. Phase folliculaire ou pré-ovulatoire	6
II.2.2. Ovulation	6
II.2.3. Phase lutéale	6
III. Ovogenèse et folliculogenèse	7
III.1. Ovogenèse	7
III.2. Folliculogenèse	8
III.2.1. Folliculogenèse basale	10
III.2.2. Folliculogenèse terminale	10
IV. Régulation hormonale du cycle œstrale	12
IV.1. Hormone hypothalamique	13
IV.2. Hormone adéno-hypophysaires gonadotropes	14
IV.3. Hormone ovariennes	14
IV.4. Hormone utérines	15
IV.5. Autres Hormones	15
Chapitre II : Androgènes et récepteurs aux androgènes	
I. Androgènes	17
I.1. Origine	17
I.2. Biosynthèse	17
II. Récepteurs aux androgènes.....	19
II.1. Structure du récepteur des androgènes	19
II.2. Mécanisme d'action des androgènes	20
II.2.1. Mécanisme d'action génomique	20
II.2.2. Mécanisme d'action non-génomique	21
II.2.3. androgènes et folliculogenèse	22
III. Interaction récepteurs aux androgènes-protéines co-régulatrice.....	23

Chapitre III : Pathologie liées aux récepteurs aux androgènes

I. Relation entre polymorphismes de répétition "CAG" du gène RA et le risque du cancer de l'ovaire	24
II. Relation entre hyperandrogénie et le syndrome des ovaires polykystiques	25
III. Relation entre hyperandrogénie et les cellules de la granulosa.....	26
IV. Relation entre hyperandrogénie et le stroma ovarien	26
Partie expérimentale	
Matériel et méthodes	
I. Matériel animal	27
II. Méthodes utilisées.....	27
II.1. Protocole de la technique d'histologie	27
II.2. Principe de l'immunohistochimie	30
Résultats et discussion	34
Conclusion	45
Références bibliographiques	46
Annexes.....	53

Liste des figures

Fig. 1 : Localisation de l'appareil reproducteur chez la vache	2
Fig. 2 : Représentation schématique de l'appareil reproducteur de la vache.....	2
Fig. 3 : Représentation schématique d'un ovaire de la vache.....	4
Fig. 4 : Représentation schématique de la structure d'un ovaire chez la vache.....	4
Fig. 5 : Cycle sexuel chez la vache et principales hormones impliquées.....	5
Fig. 6 : Classification et composition des follicules en développement.....	9
Fig. 7 : Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire	9
Fig. 8 : Représentation schématique des vagues folliculaires au cours du cycle œstral.....	11
Fig. 9 : Interaction entre hypothalamus, hypophyse, ovaire et utérus au cours du cycle œstral.....	13
Fig. 10 : Evolution hormonales au cours du cycle sexuel chez la vache.....	13
Fig. 11 : Biosynthèse des androgènes	18
Fig. 12 : Organisation génique et principaux domaines fonctionnels du récepteur des androgènes.....	20
Fig. 13 : Représentation schématique de l'action génomique du récepteur aux androgènes...21	
Fig. 14 : Action non génomique du récepteur aux androgènes	22
Fig. 15 : Mécanismes sous-jacents des actions androgènes dans le développement folliculaire	23
Fig. 16 : Résumé des voies affectées par la signalisation androgène / RA, qui agit de concert pour favoriser la prolifération du cancer de l'ovaire	25
Fig. 17 : Relation entre hyperandrogénie et ovulation.....	26
Fig. 18 : Prélèvement ovarien dans une cassette d'histologie, mis dans le formol 10%	28
Fig. 19 : mise en place centré du prélèvement dans le moule métallique, remplissage du moule métallique par la paraffine liquide, refoiroidissement sur la plaque refregérée, Bloc de paraffine.....	29
Fig. 20 : Microtome et bain marie.....	30
Fig. 21 : Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie.....	30
Fig. 22 : Etapes de la technique d'immunohistochimie.....	32
Fig. 23 : Batterie de déshydratation et d'éclaircissement.....	33
Fig. 24 : Montage de la coupe histologique ; liquide de montage « Eukitt »	33
Fig. 25 : Microscope photonique.....	33

Fig. 26 : Coloration immunohistochimique des récepteurs aux androgènes dans différents types de cellules bovines.....	35
Fig. 27 : Expression des ARNm du récepteur aux androgènes détectée par hybridation in situ en utilisant une sonde d'ARNc [35S].....	37
Fig. 28 : Fréquence d'expression d'ARNm RA dans les follicules bovins déterminée par hybridation in situ.	37
Fig. 29 : Expression des récepteurs aux androgènes dans les follicules antraux bovins précoces et les cellules de granulosa ovocytaire.....	38
Fig. 30 : Observation histologique de l'ovaire de souris témoin avec une coloration HE et immunocoloration de RA dans l'ovaire de souris.....	40
Fig. 31 : Modifications de la distribution RA dans les follicules ovariens de rat au cours de leur maturation.....	41
Fig. 32 : Représentation schématique de la distribution RA dans les cellules de la granulosa des follicules en développement et en maturation.....	41
Fig. 33 : Immunolocalisation du récepteur des androgènes dans l'ovaire de la chèvre bédouine (Capra hircus) en dehors de la saison de reproduction.....	42
Fig. 34 : Expression des récepteurs aux androgènes dans des coupes d'ovaire humain normal et de trompes de Fallope.....	43

Liste des tableaux

- Tab. 1 :** Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement.....8
- Tab. 2 :** Caractéristiques et rôles des principales hormones de la reproduction.....16
- Tab. 3 :** Classification des corps jaunes au cours du cycle œstral des vaches27
- Tab. 4 :** Tableau de synthèse des résultats bibliographiques chez les mammifères.....44

Liste des abréviations

- 3 β -HSD** : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
- 17 β -HSD** : 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
- A4** : Androstènedione
- ADN**: acide désoxyribonucléique
- AF1**: activating function 1
- AF2**: activating function 2
- ARA70** : Androgen receptor-associated protein 70
- ARE** : androgen responsive element
- ARNm** : acide ribonucléique messenger
- CG** : cellules de la granulosa
- CJ** : corps jaune
- CT** : Cellules de la thèque
- DBD**: DNA binding domain
- DHEA**: Dehydroepiandrosterone
- DHT**: Dihydrotestosterone
- E2**: Oestrogènes
- EGFR**: epidermal growth factor receptor
- FSH**: Follicle Stimulating Hormone
- GnRH**: Gonadotropin Releasing Hormone
- LBD**: ligand binding domain
- LBD**: ligand binding domain
- LH**: Luteinizing Hormone
- NF1**: nuclear factor1.
- NLS**: nuclear localization signal
- NTD**: NH₂-terminal domain
- P4**: Progestérone
- P450 aro**: cytochrome P450 aromatase
- P450c17**: cytochrome P450 17 α -hydroxylase 17/20, lyase
- P450scc**: P450 side chain cleavage
- PGF2 α** : Prostaglandine F2 α .
- RA** : Récepteur aux androgènes
- RN** : Récepteur nucléaire

SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

T : Testostérone

TI : Thèque interne

TF : transcription factor

ملخص

الهدف من عملنا هو تحديد توطين مستقبلات الاندروجين (AR) على مستوى المبيض في الأبقار بطريقة الكيمياء الهيستولوجية المناعية. يجب جمع عينات المبيض على مستوى المسلخ. تُظهر نتائج مراجعة الأدبيات ، بشكل عام ، أن التلقيح المناعي للـ AR موجود في البويضة ، والخلايا الحبيبية وخلايا theca في بصيلات ما قبل الغار. مع نمو الجريبات الغارية ، يتناقص التعبير عن التهاب المفاصل الروماتويدي تدريجيًا في الخلايا الحبيبية الجدارية الخارجية ولكنه يظل شديدًا في خلايا المبيض الحبيبية الركامية. تظهر خلايا انسجة المبيض أيضًا تلميحًا مناعيًا. بالإضافة إلى ذلك ، لوحظ التعبير عن AR في العديد من أنواع الثدييات ، وخاصة في الجرذان والأغنام والماعز والأبقار والنساء ، مما يدل على الدور الشامل للاندروجينات عبر ARs في عمل المبيض. . في الختام ، تلعب الأندروجين عبر AR دورًا مهمًا في تنظيم الوظيفة الإنجابية عند الإناث.

الكلمات المفتاحية: مستقبلات الأندروجين ، المبايض ، الكيمياء النسيجية المناعية ، البقرة ، دورة الشبق.

Résumé

L'objectif de notre travail est de déterminer la localisation des récepteurs aux androgènes (RA) au niveau ovarien chez la vache par la méthode d'immunohistochimie. Les prélèvements des ovaires devraient être récoltés au niveau des abattoirs. Les résultats issus d'une synthèse bibliographique montrent, en général, que l'immunomarquage des RA est présent dans l'ovocyte, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque des follicules pré-antraux. Au cours de la croissance des follicules antraux, l'expression des RA diminue progressivement dans les cellules de la granulosa murale externe mais reste intense dans les cellules de la granulosa du cumulus oophorus. Les cellules du stroma ovarien présentent aussi un immunomarquage. De plus, l'expression des RA est observée chez de nombreuses espèces de mammifères, notamment chez la ratte, la brebis, la chèvre, la vache et la femme, montrant le rôle universel des androgènes via leurs RA dans le fonctionnement de l'ovaire. En conclusion, les androgènes via leurs RA jouent un rôle important dans la régulation de la fonction de reproduction chez la femelle.

Mots clés : Récepteurs aux androgènes, ovaires, immunohistochimie, vache, cycle œstral.

Abstract

The objective of our work was to determine the localization of androgen receptors (AR) at the ovarian level in cows by the method of immunohistochemistry. Ovarian specimens should be collected at slaughterhouse level. The results from a literature review showed that, in general, that the immunostaining of AR was observed in the oocyte, the granulosa cells and the theca cells of the pre-antral follicles. During the growth of the antral follicles, the expression of ARs gradually decreases in the cells of the external mural granulosa but remains intense in the cells of the granulosa of the cumulus oophorus. Ovarian stromal cells also show immunostaining. In addition, the expression of AR is observed in many species of mammals, especially in rats, sheep, goats, cows and women, showing the universal role of androgens via their ARs in the functioning of the ovary. In conclusion, androgens via their ARs play an important role in the regulation of reproductive function in females.

Keywords: Androgen receptors, ovaries, immunohistochemistry, cow, estrus cycle.

Introduction

La réussite de la reproduction est primordiale pour la rentabilité économique de l'élevage, elle constitue un préalable indispensable à toute production. Une bonne compréhension de la reproduction bovine notamment du cycle œstral et de sa régulation hormonale chez les bovins permet aux éleveurs de mieux comprendre comment contrôler et synchroniser les cycles œstraux et relever les problèmes liés à la reproduction chez les bovins. D'où la nécessité de connaître la structure et le fonctionnement normal des organes génitaux en particulier l'ovaire (Siddiqui et al., 2005).

Après la puberté, l'activité sexuelle s'initie par l'apparition périodique de cycles œstraux d'environ 21 jours tout au long de l'année chez la femelle non gestante (Thun et Janett, 2007). Au cours du cycle œstral, des mécanismes et des facteurs complexes (notamment des hormones) interviennent pour modifier la morphologie et le fonctionnement de l'ovaire (Martinat Botté et al., 1998). En effet, parmi les hormones intervenant indirectement dans la régulation de la fonction ovarienne, les androgènes principalement la testostérone précurseur des œstrogènes. Leurs mécanismes d'action est médié via des récepteurs membranaires de la super famille des récepteurs nucléaires stéroïdiens (récepteurs aux androgènes) par différentes voies pour arriver à la transcription des gènes cibles (Gelman, 2002).

Objectif de notre travail est de déterminer par la technique d'immunohistochimie, la localisation des récepteurs aux androgènes au niveau ovarien au cours de différents stades du cycle œstral chez la vache.

Après une description d'une synthèse bibliographique sur la physiologie de l'activité ovarienne, la régulation hormonale du cycle sexuel de la vache et le rôle des androgènes ainsi que leurs récepteurs dans les pathologies liés à la reproduction. Suite à la situation du Covid-19, nous décrivons le matériel animal et le protocole de la technique d'immunohistochimie à utiliser pour mettre en évidence les récepteurs aux androgènes. Les résultats et discussion correspondent à une analyse des travaux réalisés par d'autres chercheurs.

Partie bibliographique

Chapitre I :
Ovaire et physiologie de la reproduction
chez la vache

I. Anatomie de l'appareil génital

L'appareil génital de la femelle n'est pas seulement limité à la production d'hormones sexuelles et du développement des gamètes ; il est aussi responsable de la production d'ovocytes, de la fécondation, fourni un environnement favorable pour le développement embryonnaire et la mise bas (Devoe, 2015; TIMOTHY J. EVANS et al., 2006).

Chez la vache, l'appareil génital est localisé dans la région pelvienne (Fig. 1). Les organes impliqués dans la fonction de reproduction (Dairyman, 1996) sont composés de deux ovaires et des voies génitales (Figs. 1 et 2).

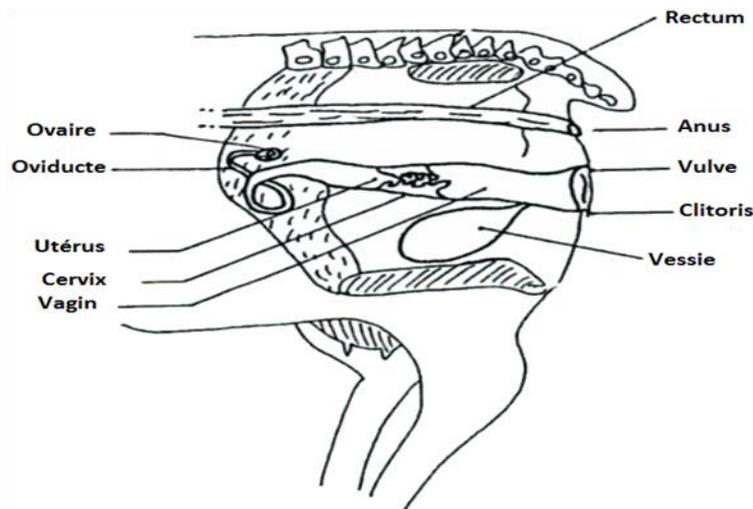


Fig. 1 : Localisation de l'appareil reproducteur chez la vache (Baril, 1993)

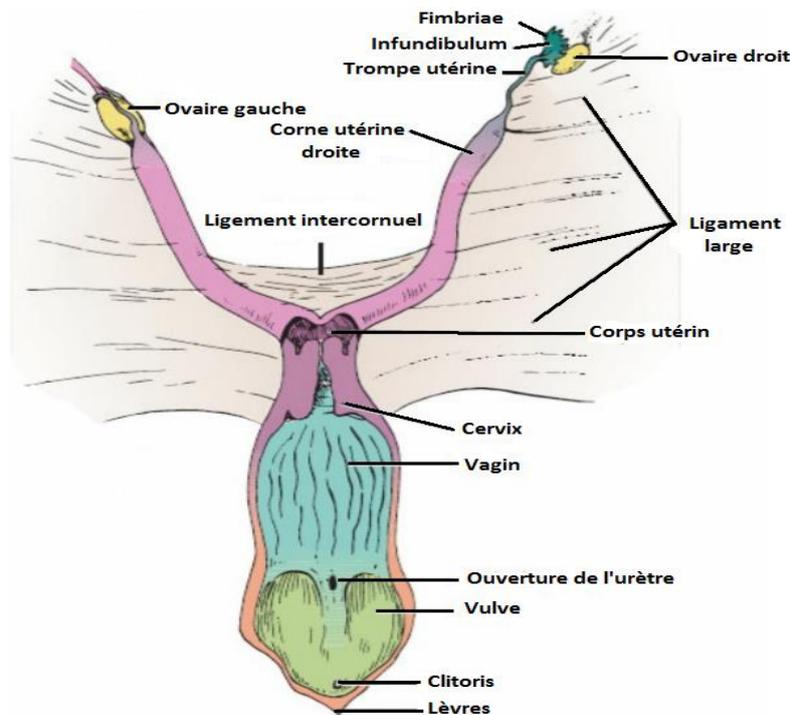


Fig. 2 : Représentation schématique de l'appareil reproducteur de la vache (vue dorsale) (Reece and Rowe, 2017)

I.1. Ovaires

Les ovaires sont à la fois endocrinien et cytogénique car ils produisent des hormones libérés directement dans le sang et des ovules libérés de la surface de l'ovaire au moment de l'ovulation (Frandsen et al., 2013a).

I.1.1. Conformation des ovaires

Les ovaires sont des glandes appariées qui ressemblent à des amandes légèrement aplatis latéralement et sont suspendus à la paroi dorsale de l'abdomen par le péritoine. La surface de l'ovaire est irrégulière, bosselée par des structures folliculaires et de corps jaunes (CJ) (Fig. 3) (Cuq and Agba, 1975; Reece and Rowe, 2017).

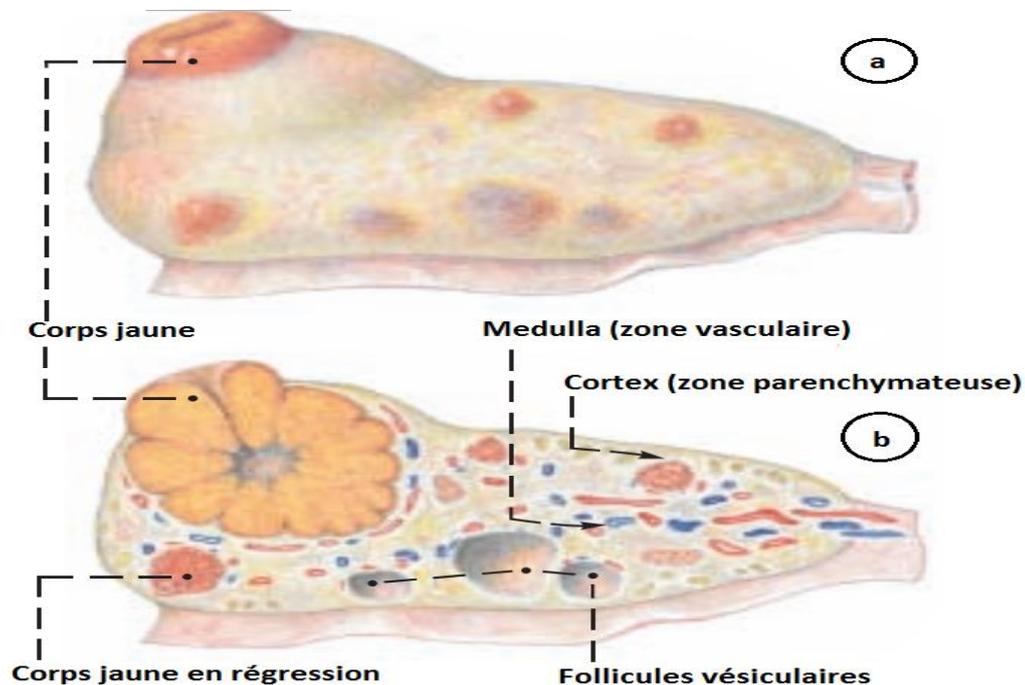


Fig. 3 : Représentation schématique d'un ovaire de vache. (a) vue externe et (b) coupe longitudinale (Liebich and Budras, 2003)

I.1.2. Dimensions et poids

Chez la vache, la taille des ovaires est comprise entre 1,5 à 5 cm de longueur, 1 à 3 cm de largeur et 1,5 cm d'épaisseur. Il pèse entre 10 à 20 g (Ball and Peters, 2004; Leborgne et al., 2013a). Les dimensions et le poids des ovaires augmentent en présence d'un CJ, d'un kyste ovarien ou d'une tumeur (Lefebvre and Gnemmi, 2009). Ces paramètres varient en fonction de la race, de l'âge, de la saison et du stade du cycle œstral.

I.1.3. Structure des ovaires

L'ovaire est revêtu d'un épithélium formé de cellules cubiques au contact avec un stroma ovarien sous lequel on peut distinguer deux zones (Fig. 4) :

A - **Zone médullaire** : est la partie centrale de l'ovaire, richement vascularisée et innervée où les vaisseaux sanguins enroulés lui confèrent un aspect spongieux. Cette zone est composée de tissu conjonctif lâche et de fibres musculaires lisses (Cuq and Agba, 1975; Frandson et al., 2013a; Priedkalns and Leiser, 2006).

B - **Zone corticale** : est la partie périphérique de l'ovaire, contenant un grand nombre de follicules à différents stades de développement et des corps jaunes intégrés dans un stroma ovarien du tissu conjonctif dense et irrégulier. Elle est délimitée d'une tunique albuginée qui se trouve sous l'épithélium de surface (Priedkalns and Leiser, 2006).

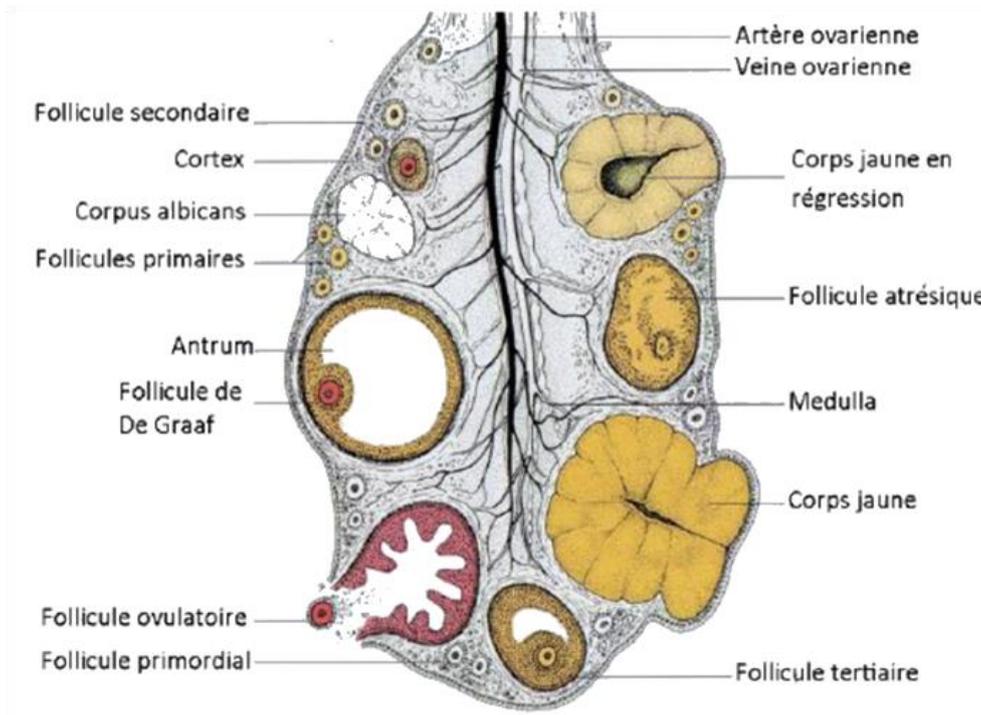


Fig. 4 : Représentation schématique de la structure d'un ovaire chez la vache (König and Liebich, 2007)

II. Cycle sexuel

Le cycle sexuel, d'une durée moyenne de 21 jours, se traduit par l'ensemble des modifications ovariennes, des modifications comportementales (œstrus) et hormonales. Il regroupe le cycle œstral et ovarien (Fig. 5) (Dudouet, 2010).

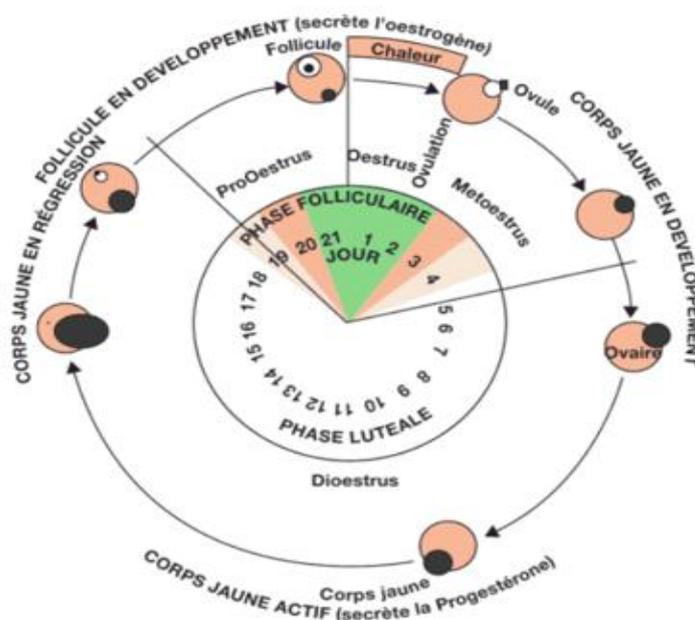


Fig. 5 : Cycle sexuel chez la vache et principales hormones impliquées (Cauty and Perreau, 2009)

II.1. Cycle œstral

Le cycle œstral correspond à la période séparant deux œstrus. Il correspond au passage des femelles d'une période de non-réceptivité reproductrice à la réceptivité ou d'acceptation du chevauchement pouvant aboutir à une gestation (Forde et al., 2011). La vache est une espèce polyœstrienne à ovulation spontanée (Ball and Peters, 2004; Thun and Janett, 2007). Le cycle œstral comprend quatre phases (Fig. 5) :

- **Pro-œstrus :** Dure environ 3 à 4 jours chez la vache, commence par la régression du CJ, se poursuit jusqu'à l'apparition de l'œstrus (Thun and Janett, 2007), caractérisée par la croissance et de maturation folliculaire et une augmentation des œstrogènes (E2) (Beaver, 2008).
- **Œstrus :** Dure environ 12 à 18 heures, correspond à la période où la femelle est réceptive au mâle (acceptation du chevauchement) (Thun and Janett, 2007). Elle est caractérisée par une progestéronémie faible et d'un taux de E2 élevé. L'ovulation spontanée se produit 12-14 heures après l'œstrus (Armstrong et al., 2013; TIMOTHY J. EVANS et al., 2006).
- **Metœstrus :** Dure environ 4 jours, correspond à la formation du CJ qui sécrète la progestérone (P4) (Frandsen et al., 2013b; Wilkinson, 2013).

- **Dioestrus** : Dure environ 14 jours, période la plus longue du cycle (Thun and Janett, 2007), correspond à la période de maturité fonctionnelle du CJ et se termine au début de sa régression (Sherwood et al., 2016).

II.2. Cycle ovarien

A partir de la puberté, l'activité ovarienne se traduit chez les vaches non gestantes par une alternance cyclique de deux phases, phase folliculaire et phase lutéale correspondant au cycle ovarien (Sherwood et al., 2016).

II.2.1. Phase folliculaire ou pré-ovulatoire

Elle est de courte durée (4 à 6 jours), correspond à la croissance folliculaire et à la différenciation terminale du follicule près-ovulatoire (Martinat-Botté et al., 1998). Elle se traduit par une augmentation des E2, induisant ainsi un pic pré-ovulatoire de LH (hormone lutéinisante), celui-ci induit l'ovulation (Hansel and Convey, 1983).

II.2.2. Ovulation

A la fin de la maturation folliculaire, le système vasculaire entourant le follicule favorise l'augmentation de la sécrétion du liquide folliculaire. Cette sécrétion est influencée par une augmentation de la pression et de la perméabilité dans les capillaires sanguins au cours du proœstrus et de l'œstrus. L'accumulation de liquide fait augmenter la taille les follicules mais la pression intrafolliculaire n'augmente pas, des petites hémorragies ont lieu dans la paroi folliculaire. Cette paroi devient très mince et transparente à la périphérie du site d'ovulation, correspond à la stigmatisation (Priedkalns and Leiser, 2006). L'ovulation est déclenchée par un pic de LH lors de l'augmentation maximale de E2 qui assure la rupture de la paroi folliculaire et la libération du complexe cumulus oophorus-ovocyte (Derouin et al., 2019).

II.2.3. Phase lutéale

Elle dure environ 13 à 15 jours et correspond à la période de formation et de maturation du CJ, qui s'étend de l'ovulation jusqu'au moment du début de régression du CJ (Meyer and Denis, 1999). Après l'ovulation, il y a une transformation des cellules de la granulosa et de la thèque en cellules lutéales (Derouin et al., 2019).

Corps jaune

Après expulsion de l'ovocyte au moment de l'ovulation, le follicule rompu se transforme progressivement en une glande endocrinienne transitoire, appelée corps jaune, chez les femelles non gestantes et cyclées (Frandsen et al., 2013b; Martinat-Botté et al., 1998). La lutéogénèse dure environ 4 jours aboutissant à la formation d'un CJ mature et fonctionnelle sécrétant de la P4. En moyenne, au 17^{ème} jour du cycle, la lutéolyse est initiée par les prostaglandines (PGF2 α) sécrétées par l'endomètre utérin. Cette lyse du CJ se traduit par dégénérescence des cellules lutéales, une dégradation de sa vascularisation et le tissu conjonctif envahit la structure formant une masse tissulaire fibreuse appelée *corpus albicans* (Priedkalns and Leiser, 2006; Sherwood et al., 2016).

En se basant sur les critères morphologiques, biochimiques et l'origine cellulaire, le CJ est formé principalement de deux types de cellules stéroïdogènes.

➤ Les **petites cellules lutéales** provenant des cellules thécales du follicule, dont la sécrétion de P4 est entièrement dépendante de la LH.

➤ Les **grandes cellules lutéales** provenant des cellules de granulosa du follicule, dont la sécrétion de P4 est indépendante aux variations de concentration de LH (Baril, 1993; Niswender et al., 2000).

III. Ovogenèse et folliculogénèse

III.1. Ovogenèse

L'ovogenèse est un processus aboutissant à la formation et au développement des ovocytes fécondables. Elle se déroule à partir des ovogonies, cellules germinales souches.

Au cours de la vie embryonnaire, les ovogonies se multiplient puis prolifèrent jusqu'à leur entrée en prophase méiotique qui marque l'arrêt de leur multiplication. La prophase méiotique se poursuit dans les ovocytes primaires et se bloque au stade diplotène tandis que chaque ovocyte s'entoure d'une couche de cellules somatiques, les cellules de granulosa et d'une lame basale pour former des follicules primordiaux.

Au cours de la succession des cycles, certains ovocytes iront jusqu'à la maturation et l'ovulation, tandis que la majorité dégénère par apoptose (Drion et al., 1996a; Mauleon, 1969; Mehlmann, 2005).

III.2. Folliculogenèse

C'est une succession de différentes étapes du développement du follicule qui se produisant dans le cortex ovarien, depuis le moment où il sort de sa réserve jusqu'à sa rupture au moment de l'ovulation ou à son atresie. C'est un phénomène continu : chaque jour des follicules entrent en phase de croissance. Ils deviennent follicules primordiaux, primaires et secondaires constituant les follicules préantraux, puis les stades tertiaires et De Graaf représentant les follicules antraux (Tab. 1 ; Fig. 6) (Hulshof et al., 1994; Leborgne et al., 2013b).

Les principales caractéristiques de la croissance folliculaire concernent (Drion et al., 1996a) la durée, le faible nombre de follicules qui parviennent jusqu'à l'ovulation et le parallélisme entre la croissance du follicule et l'acquisition de la compétence ovocytaire.

Tab. 1 : Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement (Drion et al., 1996a)

Stade folliculaire	Nombre de cellule folliculaire	Structure en formation	Diamètre folliculaire (µm)	Diamètre ovocytaire (µm)
Primordial	30 cellules aplaties	Membrane basale	30-50	20-35
Primaire	Une couche de cellules cuboïdales	Membrane de slavjanski	40-60	30-40
Secondaire	Couche multiples de cellules	- Zone pellucide - Thèques	200-300	60
Tertiaire	Couche multiples de cellules	Cumulus oophorus		100-130
Pré ovulatoire ou « de Graaf »	- Couche multiples de cellules - Différenciation des cellules folliculaires en cellules de granulosa et cumulus.	- Acquisition de la compétence ovocytaire. - Reprise de la méiose	2. 10 ⁴	150

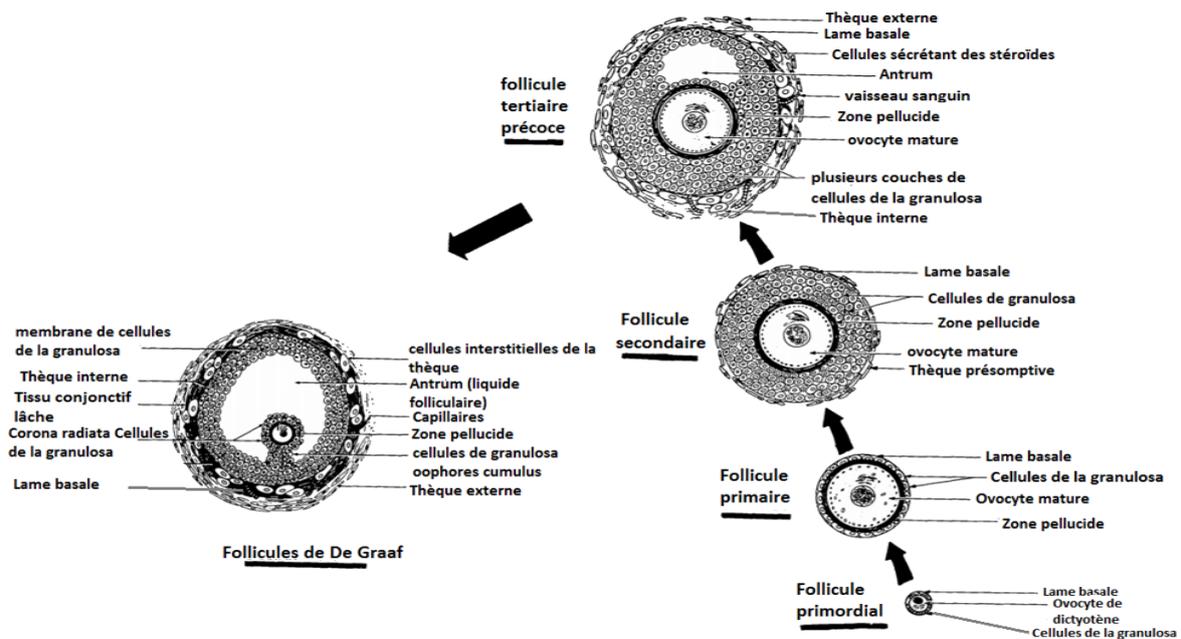


Fig. 6 : Classification et composition des follicules en développement (Erickson et al., 1985)

Le follicule destiné à ovuler est sélectionné par une décharge de LH pré-ovulatoire (Adams et al., 2008).

La croissance folliculaire est divisée en deux phases successives : la folliculogénèse basale et la folliculogénèse terminale (Fig. 7) (Monniaux et al., 2009).

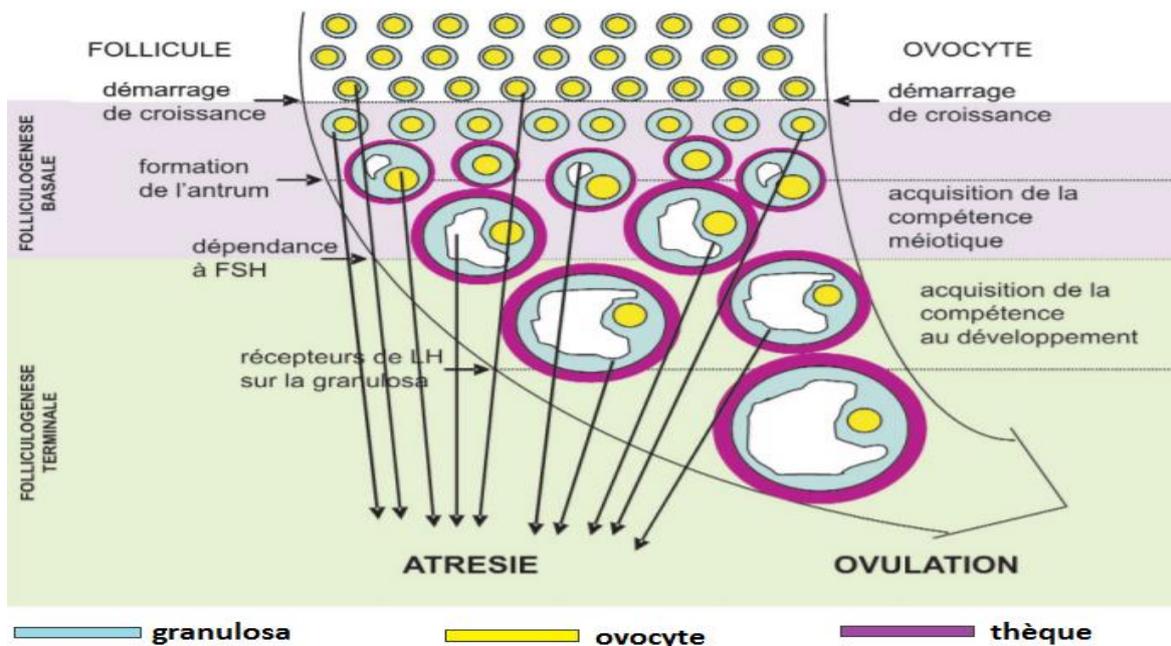


Fig. 7 : Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire (Monniaux et al., 2009)

III.2.1. Folliculogenèse basale

Elle est non gonado-dépendante, en absence des hormones gonadotropes LH et FSH (hormone folliculo-stimulante) (Fig. 7) (Edson et al., 2009; Monniaux et al., 2009).

La folliculogenèse basale est contrôlée par de nombreux facteurs de croissance, d'origines ovocytaire et somatique. C'est au cours de cette phase que s'effectue l'essentiel de la croissance de l'ovocyte dans lequel l'ovocyte acquiert la compétence méiotique (Monniaux et al., 2009).

III.2.2. Folliculogenèse terminale

Elle est gonado-dépendante (Fig. 7). Elle débute lorsque les follicules en fin de croissance deviennent sensibles aux gonadostimulines (LH et FSH), au stade folliculaire à antrum (Leborgne et al., 2013b).

La folliculogenèse terminale est aussi contrôlée par d'autres facteurs tel que les facteurs de croissance, de la matrice extracellulaire, des protéases, des stéroïdes. Ils agissent en synergie avec les gonadotrophines (LH et FSH) pour réguler son développement (McGee and Hsueh, 2000).

La croissance terminale des follicules d'effectue sous forme de vagues folliculaire (Evans, 2003; Mihm et al., 2002).

➤ Notion de vague folliculaire

La plupart des cycles œstraux chez les bovins comprennent 2 ou 3 vagues folliculaires et rarement 4 vagues. Chaque vague consiste en l'émergence, tous les 7 à 9 jours environ, de plusieurs follicules de diamètre ≥ 5 mm, aboutissant à la formation d'un follicule dominant (Ginther et al., 1989; Hanzen et al., 2000). La vague folliculaire est divisée en 3 phases : recrutement, sélection et dominance (Fig.8) (Diancourt et al., 2001).

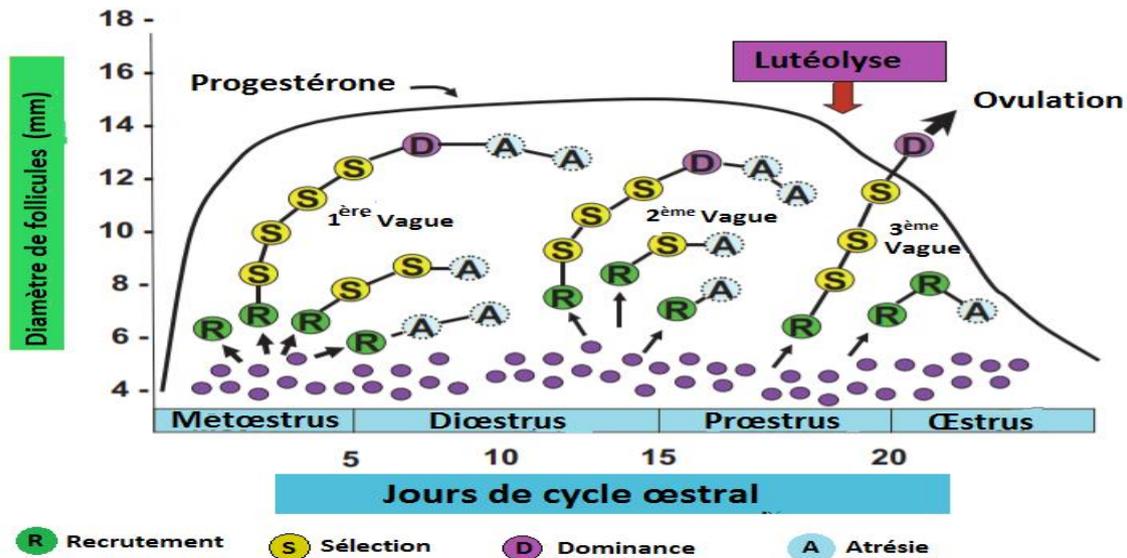


Fig. 8 : Représentation schématique des vagues folliculaires au cours du cycle oestral (Akers and Denbow, 2013)

❖ Recrutement

Le recrutement correspond à l'entrée en croissance terminal d'une cohorte de follicules gonado-dépendants. Les follicules recrutés forment une cohorte de 4 à 5 mm de diamètre sous l'influence d'une augmentation transitoire de la FSH. La FSH agit sur ces follicules en augmentant leur aptitude à aromatiser les androgènes en œstrogènes (Fortune, 1994; Monniaux et al., 2009; Weller et al., 2016).

❖ Sélection

Les follicules recrutés vont poursuivre leur croissance. Un ou rarement deux follicules sont sélectionnés à partir de la cohorte, le reste des follicules s'atrophie. La croissance folliculaire recrutés provoque une augmentation des sécrétions d'œstradiol et d'inhibine, ce qui va exercer un rétrocontrôle négatif sur le niveau de FSH en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La sélection se produit en même temps que la diminution du taux de FSH (Leborgne et al., 2013b).

Le mécanisme de sélection du follicule dominant est basé sur dépendance relative des follicules dans une vague sur la FSH, et leur réactivité relative à LH. L'élévation transitoire de la FSH permet une croissance folliculaire suffisante pour que certains, les follicules acquérir la réactivité de LH. La capacité de répondre à LH donne au follicule la capacité de survivre sans FSH (Adams and Singh, 2014).

❖ Dominance

La dominance d'un follicule est morphologique et fonctionnelle (Sirois and Fortune, 1988). Elle est qualifiée de morphologique parce qu'elle est exercée par le plus gros follicule présent sur l'un ou l'autre ovaire et de fonctionnelle parce que le follicule dominant est le seul qui est capable de provoquer d'inhiber la croissance d'autres follicules (Ko et al., 1991), et d'ovuler dans un environnement hormonal approprié (Gong et al., 1991). Au cours de la dominance, il n'y a pas de recrutement (Webb et al., 1992). En présence d'un CJ fonctionnel, le follicule dominant régresse et s'atrophie. Le follicule dominant ovulatoire provient de la dernière vague du cycle œstral (Leborgne et al., 2013b).

❖ Atrésie Folliculaire

Dans le stroma ovarien, le follicule subit une régression jusqu'à sa disparition par atrésie. Cette dernière se manifeste à chaque stade de la croissance folliculaire (Zhou et al., 2019).

IV. Régulation hormonale du cycle œstral

Le cycle oestral est sous le contrôle hormonaux de l'hypothalamus (GnRH), de l'hypophyse antérieure (FSH, LH), des ovaires (P4, E2 et inhibines) et de l'utérus (prostaglandines). Ces hormones fonctionnent grâce à un système de feed back positive et négative pour réguler le cycle œstral (Roche, 1996). Les interactions entre ces organes au cours d'un cycle sont représentées dans la figure 9 et les variations dans le taux de sécrétions des différentes hormones intervenant dans le développement des follicules ovariens sont représentées dans la figure 10.

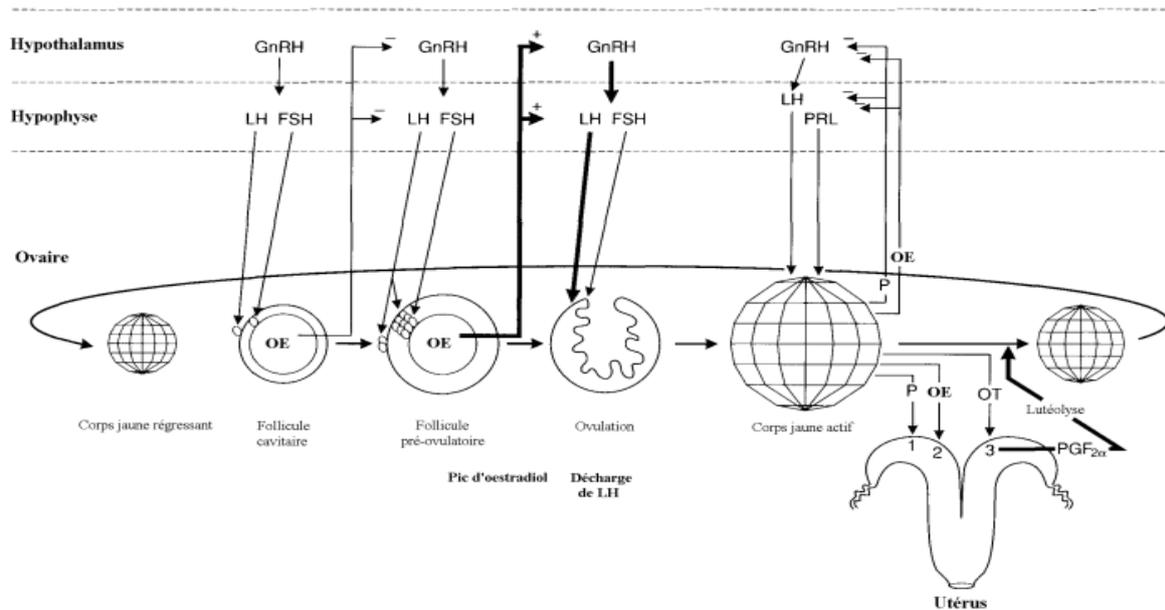


Fig. 9 : Interaction entre hypothalamus, hypophyse, ovaire et utérus au cours du cycle œstral (Meredith, 1995)

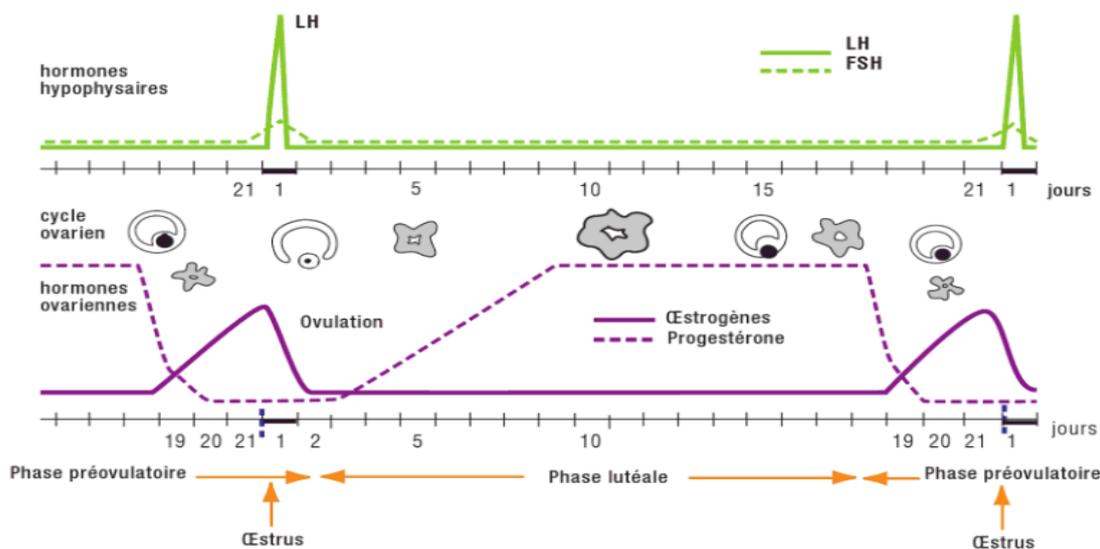


Fig. 10 : Evolution hormonales au cours du cycle sexuel chez la vache (Dudouet, 2010)

IV.1. Hormone hypothalamique

➤ **GnRH** : Synthétisée par l'hypothalamus, elle stimule la synthèse et la sécrétion de LH et FSH. La libération de GnRH peut être modulée par des stéroïdes (E2 et P4) et les hormones peptidiques (inhibine) de l'ovaire (Frandsen et al., 2013b; Thatcher et al., 1993). La fréquence des pulses de GnRH varie au cours de cycle œstral et des pulses très fréquents stimulent la sécrétion de LH. A l'inverse, des pulses plus espacés augmentent de la sécrétion de la FSH (Dalkin et al., 1989).

IV.2. Hormones adéno-hypophysaires gonadotropes

Les hormones adéno-hypophysaires FSH et LH sont sécrétées par l'action de GnRH.

➤ **FSH** : Elle provoque, en synergie avec une sécrétion basale de LH, la maturation et la croissance folliculaire, la formation d'un follicule pré-ovulatoire et la sécrétion des E2 (Vegetti and Alagna, 2006).

La FSH possède deux rôles biologiques au niveau des cellules de granulosa (CG) :

- Stimule l'aromatase des androgènes, produits par les cellules de la thèque interne, en E2 (l'œstradiol).

- Augmente le nombre de récepteurs à LH au niveau de la membrane plasmique des CG (Jia et al., 1985; Xie et al., 2020).

➤ **LH** : Elle est libérée de façon pulsatile sous l'effet permissif de la FSH. La LH déclenche la fin de la maturation et la croissance du follicule de De Graaf et provoque la rupture de la paroi ovarienne à l'ovulation grâce au pic préovulatoire induisant la reprise de la méiose ovocytaire.

En plus, elle induit la lutéinisation des cellules folliculaires pour la formation d'un CJ sécrétant la P4 par les cellules lutéales (Frandsen et al., 2013b; Raju et al., 2013; Sauveroche and Wagner, 1993; Tajima et al., 2007).

IV.3. Hormones ovariennes

Les hormones ovariennes sont des hormones stéroïdiennes, issues du cholestérol, responsables des changements physiques et comportementaux chez la femelle associés au cycle œstral (Reece and Rowe, 2017).

➤ **Œstrogènes** : Chez la vache, les E2 (œstrone et l'œstradiol 17 β) sont sécrétés par les CG et de la thèque interne d'un ou des follicules en développement. Ces hormones sont responsables du comportement d'œstrus (chaleurs) (England, 2012; Morel, 2008).

Le taux des E2 est faible pendant la phase lutéale puis augmente progressivement jusqu'au jour précédant l'œstrus (Henricks et al., 1971).

➤ **Progestérone** : Elle est sécrétée principalement par le CJ pendant la phase lutéale (Wiltbank et al., 2014). La progestéronémie est très faible pendant de la phase folliculaire (< 1 ng/ml) puis augmente progressivement après ovulation et se maintient jusqu'au début de la lutéolyse (Sauveroche and Wagner, 1993).

IV.4. Hormones utérines

➤ **Prostaglandines** : Au niveau de l'appareil génital femelle, les prostaglandines (PG) sont synthétisées au niveau de l'utérus et au niveau de l'ovaire. Elles sont de nature lipidique. Parmi les PG, la $PGF2\alpha$ est la plus importante et intervient dans l'induction de la lutéolyse à la fin de la phase lutéale (England, 2012; Morel, 2008)

IV.5. Autres hormones

➤ **Inhibine** : Les inhibines sont des hormones peptidiques sécrétées par le CG des follicules en développement. Les niveaux circulants d'inhibine augmentent au cours du développement folliculaire. Elles agissent par feed-back négatif sur la libération de FSH (Frandsen et al., 2013b).

➤ **Relaxine** : Est une hormone polypeptidique d'origine à la fois placentaire et lutéale. Elle intervient dans la relaxation des ligaments sacro-sciatiques en fin de gestation, dans la dilatation du col utérin et dans la croissance de l'utérus. Son action intervient dans la sensibilisation des tissus par les hormones stéroïdiennes, notamment les E2 (Drion et al., 1996b).

Tab. 2 : Caractéristiques et rôles des principales hormones de la reproduction (Leborgne et al., 2013b)

Hormones	Lieu de synthèse	Effets
GnRH	Hypothalamus	- Synthèse et libération de FSH et LH
FSH	Adéno-hypophyse	- Développement de l'ovaire et croissance folliculaire - Synthèse des E2 par les follicules
LH	Adéno-hypophyse	- Maturation des follicules (avec FSH) - Ovulation - Formation du CJ
Progestérone (P4)	Corps jaune Placenta	- Maintien la gestation (inhibition de la motricité et prolifération de la muqueuse utérine)
Œstrogènes (E2)	Follicules ovariens	- Manifestation de l'œstrus (chaleur) - Développement des caractères sexuels
Prostaglandine F2 α (PGF2 α)	Utérus Autres tissus	- Rupture du follicule ovulatoire - Régression du CJ - Contractions utérines à la mise bas
Inhibines	Cellules de la granulosa Cellules de Sertoli	- Inhibition de la sécrétion de FSH - Stimulation de la synthèse de LH pas la thèque interne du follicule dominant
Relaxine	Corps jaune Placenta	- Croissance de l'utérus

Chapitre II :
Androgènes et récepteurs aux androgènes

Le développement des follicules ovariens commence au cours de la vie fœtale avec la transformation des cellules germinales primordiales en ovocytes enfermés dans des structures appelées follicules (Hirshfield, 1991; McGee and Hsueh, 2000). Certains de ces follicules sont recrutés pour entamer une longue progression de croissance et de différenciation par des événements qui sont régulés par des signaux appropriés provenant de l'ovocyte lui-même en croissance et des cellules somatiques qui l'entourent (Matzuk et al., 2002; Picton et al., 1998) et également par des interactions complexes entre les hormones gonadotrophines, stéroïdes sexuels et divers facteurs de croissance (Palma et al., 2012), dépendant de l'un des principaux produits stéroïdogènes de l'ovaire, les androgènes.

I. Androgènes

I.1. Origine

Les androgènes sont des hormones de nature stéroïdienne, produits principalement dans les cellules de la thèque interne des ovaires au cours du développement folliculaire. Le précurseur de leur biosynthèse est le cholestérol. Ils sont des intermédiaires dans la biosynthèse des E2, permettent notamment une croissance folliculaire, une régulation de la fonction ovarienne ainsi que l'apparition des récepteurs à la LH. L'androgène le plus important est la testostérone (Drummond, 2006; Franks and Hardy, 2018; Fukuda et al., 2009; Murayama et al., 2012).

I.2. Biosynthèse

La synthèse des androgènes implique une série de réactions enzymatiques, selon le modèle deux cellules-deux hormones (Hillier, 1994; Walters, 2015).

À partir du moment où les cellules de la thèque (CT) se différencient en cellules endocriniennes, elles contiennent des récepteurs de la LH et les principales enzymes stéroïdogènes nécessaires à la biosynthèse des androgènes à partir du cholestérol. Le cholestérol est transporté aux cellules par les lipoprotéines de basse densité (LDL) circulant. Il par à travers la membrane plasmique pour se retrouver dans les mitochondries ou bien il est synthétisé *de novo* à partir de acétate puis il est converti en prégnénolone (stéroïde C21) par le cytochrome P450 (P450_{scc}) (Hillier et al., 1994; Omura and Morohashi, 1995). Il existe deux voies de biosynthèse (Fig. 11) :

- La **voie $\Delta 5$** , voie prépondérante, est celle de la conversion la prégnénolone par la 17 α -hydroxylase/17,20 lyase en :

- 17 α -hydroxyprégnénolone par l'activité 17 α -hydroxylase, puis en,

- déhydroépiandrostérone ou DHEA par son clivage par l'activité 17-20 lyase ou 17-20 desmolase (Walters and Handelsman, 2018).

- La voie $\Delta 4$ conduite à :

- La progestérone (C21) par une déshydrogénation grâce à la 3 β -hydroxystéroïde-déshydrogénase-isomérase (3 β -HSD),
- La 17 α -hydroxyprogestérone par la 17 α -hydroxylase (précurseur du cortisol dans les surrénales),
- l'androsténedione par la 17,20 lyase de la voie $\Delta 5$ (Apolloni et al., 2016).

Dans les gonades, c'est la voie $\Delta 5$ qui est privilégiée, alors que c'est celle de la $\Delta 4$ dans les surrénales, par déficience partielle ou totale (suivant les zones) en CYP17A1 (stéroïdogénèse dans les surrénales).

Les androgènes représentés principalement l'androsténedione et la testostérone synthétisés par les CT sont transportés passivement à travers la membrane plasmique des CT vers les CG où ils sont soit aromatisé en œstradiol (E2) ou estrone par la P450 aromatasase (CYP19A1) soit réduit en dihydrotestostérone (DHT) par 5 α -réductase sous la FSH (Fig. 11) (Hillier et al., 1994; Longcope, 1986).

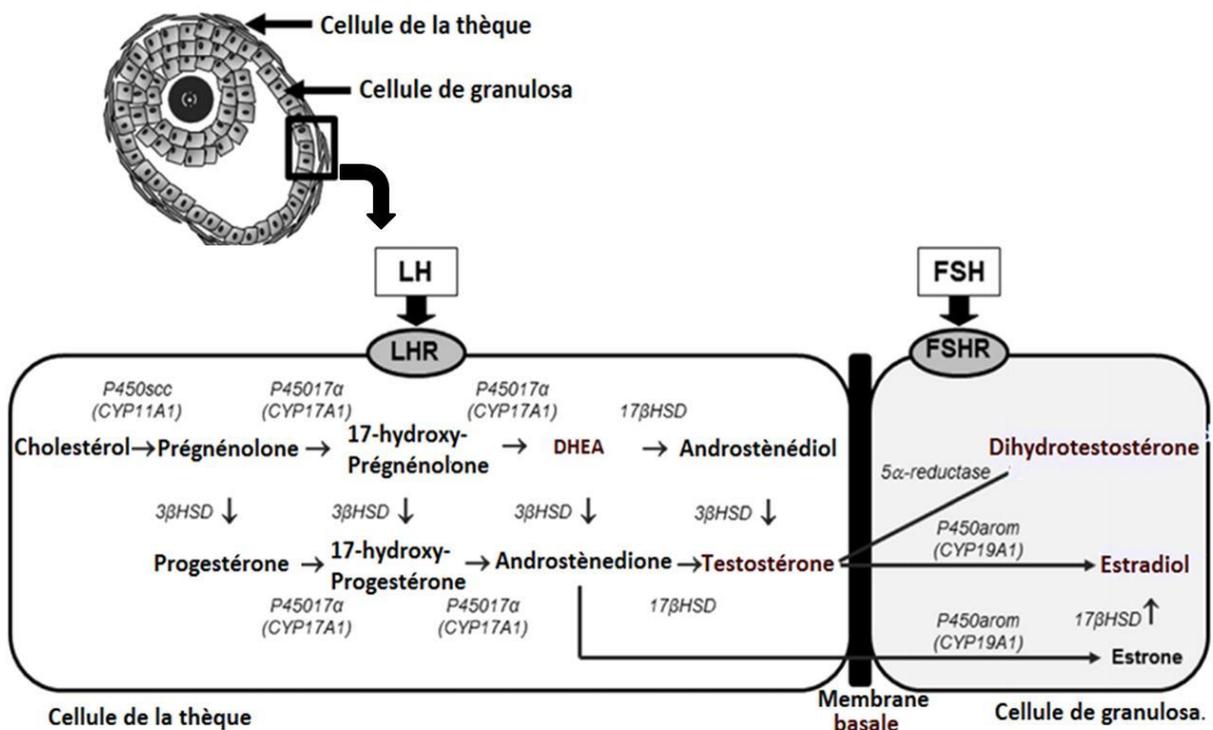


Fig. 11 : Biosynthèse des androgènes (Walters and Handelsman, 2018)

II. Récepteurs aux androgènes

Les androgènes médient leurs actions via le récepteur des androgènes (RA), des protéines membres à la sous famille III de la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens (Laudet, 1997). Classiquement, le RA activé par les androgènes exerce ses effets biologiques en stimulant les gènes cibles via une séquence de processus, y compris la liaison de ligand, l'homodimérisation, la translocation nucléaire, la liaison à l'ADN et la formation de complexes avec des co-régulateurs et des facteurs de transcription (Walters et al., 2008). Le gène du RA se situe sur le bras long du chromosome X (Lamb et al., 2001; Levalle and Lalosa, 2015).

II.1. Structure du récepteur des androgènes

La structure du RA est représentée par 04 domaines, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, on a :

- **Domaine de transcription** : responsable de la transcription du gène en ARNm (Callewaert et al., 2006; Gelmann, 2002b; Zhu et al., 2017).
- **Domaine de liaison à l'ADN** : comprend huit résidus cystéines qui forment deux complexes de coordination, chacun composé de quatre cystéines et d'un ion Zn^{++} . Ces deux doigts de zinc forment la structure qui se lie à l'ADN (Freedman, 1992; Quigley et al., 1995).
- **Domaine charnière** : porte le signal de localisation nucléaire du récepteur pour orienter son transfert dans le noyau à travers des pores nucléaires (Haelens et al., 2007; Quigley et al., 1995).
- **Domaine de liaison à l'hormone** : responsable de la liaison de l'hormone à son récepteur spécifique. Il possède également une surface d'interaction avec les protéines de choc thermique (HSP : heat shock protein), impliquée dans le processus de dimérisation du récepteur (Poujol and Sultan, 2012; Quigley et al., 1995).

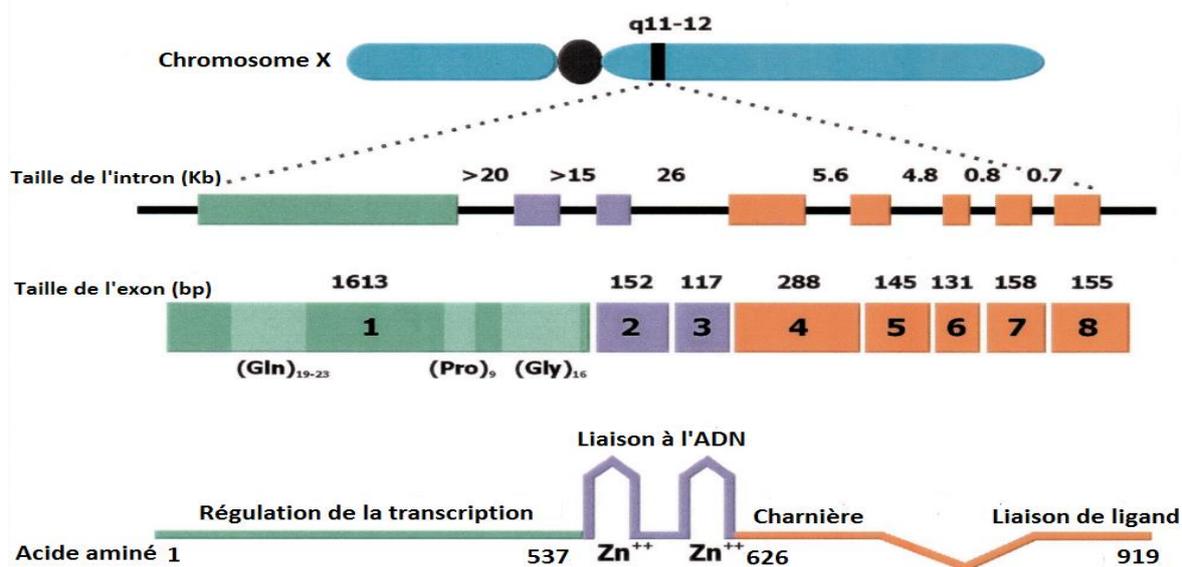


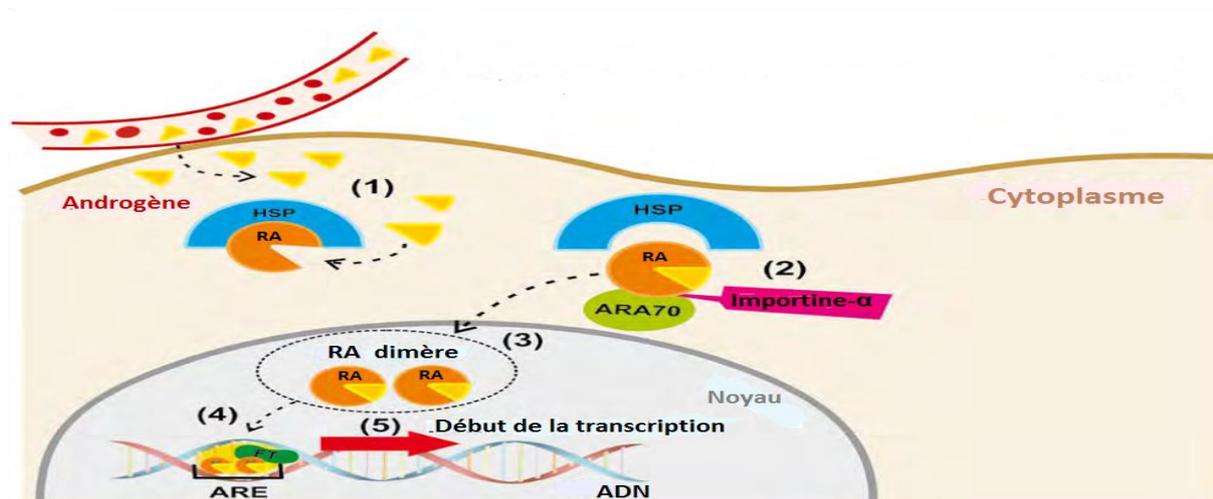
Fig. 12: Organisation génique et principaux domaines fonctionnels du récepteur des androgènes (Gelmann, 2002a)

II.2. Mécanismes d'action des androgènes

Comme toutes les hormones stéroïdiennes, les androgènes exercent principalement leurs fonctions en se liant et en activant des récepteurs nucléaires spécifiques qui déclenchent les événements intracellulaires responsables du début de la transcription des gènes cibles et donc par des actions **génomiques** dépendantes des éléments de réponse aux androgènes (ARE)(Mangelsdorf et al., 1995; Rosenfeld et al., 2006). De plus, les androgènes peuvent également exercer leurs effets en interagissant avec des récepteurs membranaires pour effectuer des actions rapides **non génomiques** impliquées dans l'activation de divers facteurs de transcription (Kousteni et al., 2001; Lutz et al., 2003).

II.2.1. Mécanisme d'action génomique

Initialement, le RA est inactif et couplé à une HSP dans le cytoplasme des cellules. Après avoir lié l'androgène au RA, le complexe est activé et se dissocie de la HSP. D'autres protéines telles que l' α -importine et la protéine 70 associée à RA (ARA70) sont recrutées pour aider à stabiliser le RA et favorisent sa translocation nucléaire. Une fois localisé dans le noyau, ce complexe forme un dimère avec un autre RA activé, qui se lie ensuite à une séquence spécifique de l'ADN appelée ARE (éléments sensibles aux androgènes) (Bennett et al., 2010). On pense que la liaison de RA à ARE stabilise les facteurs de transcription dans les gènes cibles, induisant ainsi un niveau élevé d'initiation de la transcription (Fig. 13) (Jenster, 1998; O'Malley and Tsai, 1992).



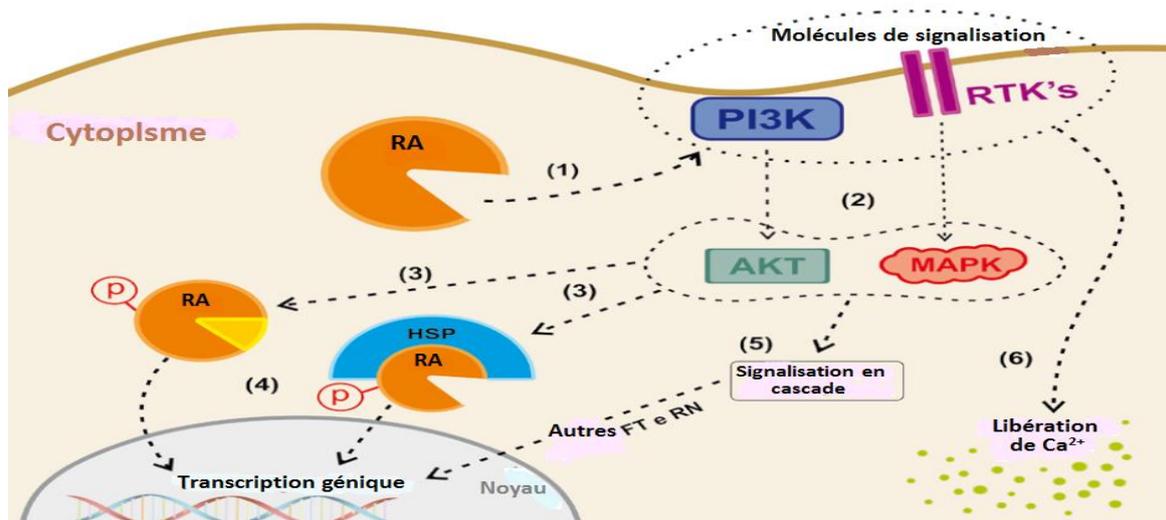
RA : Récepteur aux androgènes ; ARE : Androgen Responsive Element ; ARA70 : Androgen receptor-associated protein 70 ; HSP : Heat Shock Protein ; FT : Facteur de transcription.

Fig. 13 : Représentation schématique de l'action génomique du récepteur aux androgènes (Apolloni et al., 2016)

(1) Liaison de l'androgène à son récepteur (RA) dans le cytoplasme cellulaire ; (2) Dissociation de la protéine de choc thermique (HSP) du complexe et recrutement de l'importine et de la protéine 70 associée au récepteur aux androgènes (ARA70) pour la translocation du complexe vers le noyau ; (3) Formation d'un dimère de complexes récepteur ligand ; (4) Liaison des dimères à la séquence d'ADN sensible aux androgènes (ARE) et ; (5) Début de la transcription génique des gènes cibles.

II.2.2. Mécanisme d'action non-génomique

En plus de l'action génomique classique des androgènes via le récepteur intracellulaire, il existe également l'action non génomique des RA. Le RA peut initier des réponses non génomiques par son activation et son interaction avec des molécules de signalisation, telles que la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et Receptor Tyrosine kinases (RTK) situées dans la membrane plasmique activant respectivement les voies AKT et mitogen activated protein kinases (MAPK). Ces molécules de signalisation peuvent également phosphoryler le RA, empêchant leur dégradation et favorisant leur translocation nucléaire. De plus, une fois activées, ces voies signalent également des cascades régulant d'autres récepteurs nucléaires (RN) et des facteurs de transcription (FT) et/ou des événements de signalisation cytoplasmique, tels que la libération de calcium intracellulaire (Ca^{++}) à travers le réticulum endoplasmique lisse et les mitochondries (Fig. 14) (Bennett et al., 2010).



RA : Récepteur aux androgènes ; HSP : Heat Shock Protein ; MAPK : mitogen activated protein kinases ; PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase ; FT : Facteur de transcription ; RN : Récepteur nucléaire ; RTK'S : Receptor Tyrosine kinases ; AKT : lignée de souris (T).

Fig. 14 : Action non génomique du récepteur aux androgènes (Apolloni et al., 2016)

(1) Activation RA et interaction avec des molécules de signalisation (PI3K et RTK) situées dans la membrane plasmique ; (2) Activation des voies AKT et MAPK par PI3K et RTK, respectivement. (3) Phosphorylation RA par des molécules de signalisation (indépendamment de la liaison de leurs ligands) (4) Translocation AR nucléaire. (5) Signalisation en cascade via les voies AKT et MAPK qui régulent les récepteurs nucléaires (RN) et les facteurs de transcription (FT) et / ou ; (6) Événements de signalisation cytoplasmiques, tels que la libération de calcium intracellulaire (Ca^{++}) par le réticulum endoplasmique et les mitochondries.

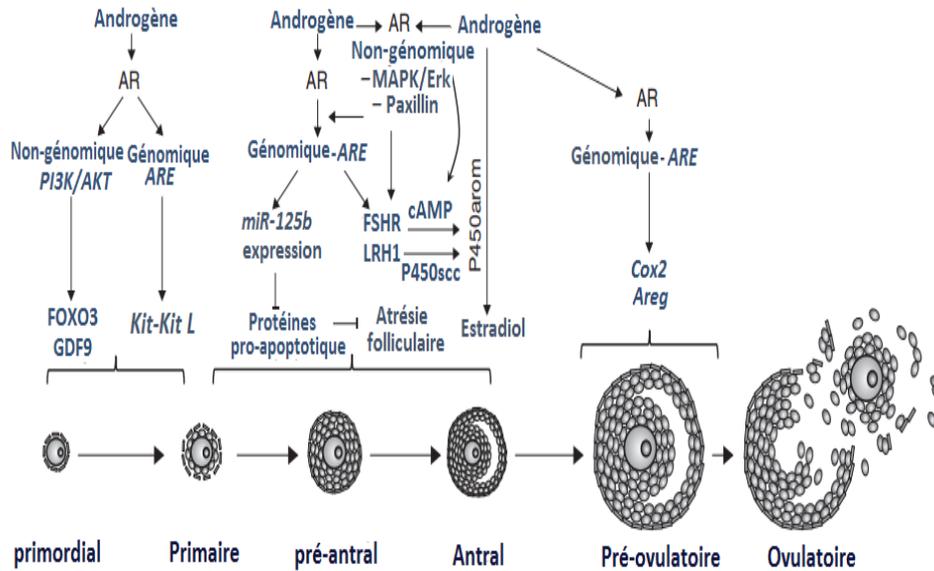
II.2.3. Androgènes et folliculogénèse

Lors du recrutement des follicules primordiaux, les androgènes induisent l'expression du ligand KIT. La figure 14 explique l'action des androgènes au cours du développement folliculaire.

Les androgènes augmentent également le nombre de récepteur à la FSH et de l'AMPC intracellulaire qui améliorent la sensibilité des follicules pré-antraux aux actions de FSH.

De plus, ils stimulent l'expression des principales enzymes stéroïdogènes, l'aromatase (P450arom) et enzyme de clivage de chaîne latérale P450 (P450scc) par un mécanisme médié par l'induction ARE-dépendante d'un récepteur nucléaire orphelin, homologue 1 du récepteur hépatique (LRH1).

Au niveau des CG du follicule pré-ovulatoire, les androgènes peuvent induire l'expression des gènes Cox2 et Areg et peut ainsi directement influencer l'ovulation par des actions génomiques dépendantes de l'ARE (Franks and Hardy, 2018; Prizant et al., 2014; Sen et al., 2014).



Areg: Amphiregulin; COX2: Cyclooxygénase 2; FOXO1: forkhead box O3; GDF9: Growth Differentiation Factor 9; FSHR: Follicle-Stimulating Hormone Receptor; LRH1: Liver receptor homolog-1; MAPK: mitogen activated protein kinases; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; AMPc: adénosine monophosphate cyclique; ARE: Androgen Responsive Element

Fig. 15 : Mécanismes sous-jacents des actions androgènes dans le développement folliculaire (Prizant et al., 2014)

III. Interactions récepteurs aux androgènes - protéines co-régulatrices

Si le RA est l'acteur principal des vastes effets physiologiques dans l'ovaire, son action est sans cesse épaulée et modulée par son interaction avec d'autres protéines. En effet, que ce soit dans le compartiment cytosolique ou nucléaire, le RA se trouve couplé à d'autres protéines appelées co-régulatrices. Ces dernières sont essentielles aux propriétés fonctionnelles de RA telle que sa stabilité, son affinité pour le ligand, sa translocation nucléaire, son affinité pour l'ADN ou encore sa capacité dans le déroulement de la transcription (Lee and Chang, 2003). On décrit deux types de co-régulateurs : les co-activateurs qui exercent une action positive sur la transactivation par le biais du RA et les co-inhibiteurs qui au contraire jouent une action négative sur son activité transcriptionnelle (Bennett et al., 2010; Heinlein and Chang, 2002).

Chapitre III :
Pathologies liées aux récepteurs aux
androgènes

Les effets des androgènes sont médiés par leurs RA et ont un rôle non seulement dans le fonctionnement ovarien normal, mais également dans les pathologies ovariens et plus particulièrement dans le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), cause importante d'infertilité chez les bovins et favorisent la tumorigenèse et les métastases dans plusieurs types de cancers notamment le cancer des ovaires (Salvetti et al., 2012; Walters, 2015; Zhu et al., 2017). Les tumeurs des ovaires et le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) peuvent tous deux provoquer une production excessive des androgènes où le RA est plus largement exprimé dans le cancer de l'ovaire que dans les récepteurs aux œstrogènes et les récepteurs à la progestérone (Cardillo et al., 1998; Chadha et al., 1993).

L'excès d'androgènes est une caractéristique du SOPK et de l'hyperplasie du stroma ovarien. Au cours de l'hyperandrogénémie se déroule le dialogue follicule-stroma, entraînant un arrêt folliculaire et une ovulation perturbée. Par contre, la carence en androgènes est susceptible d'avoir également un impact négatif sur la fertilité, et la nécessité d'une thérapie d'ajouter des androgènes dans le cas d'hypofertilité (Lebbe and Woodruff, 2013).

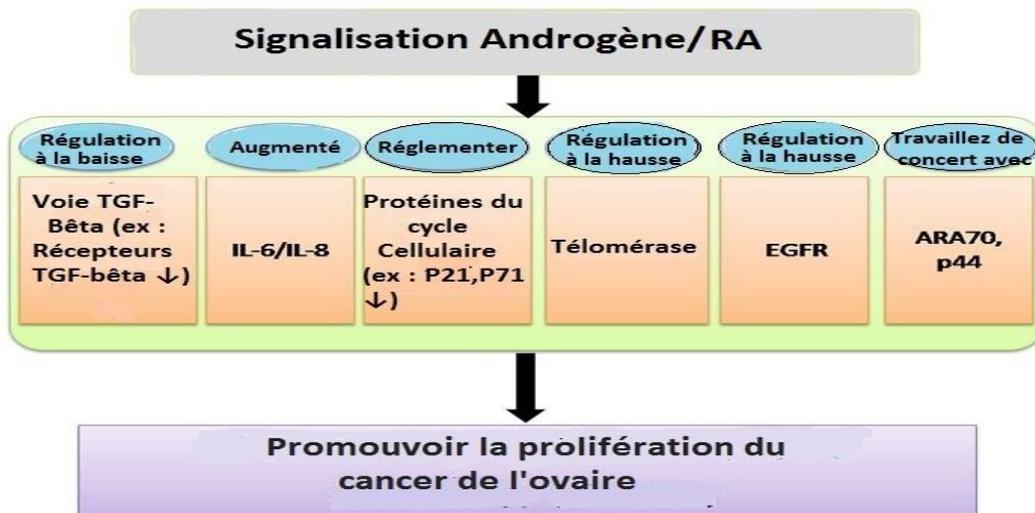
Certaines études ont relié les altérations de la longueur des répétitions du trinuéclotide "CAG" dans l'exon 1 du RA avec les modifications de son activité (Simanainen et al., 2011) et d'autres une association entre les variations de la longueur des répétitions "CAG" et la prévalence du SOPK (Baculescu, 2013). Cependant, l'incidence du SOPK a été associée à la fois à des longueurs de répétition "CAG" courtes (Schüring et al., 2012) et longues (Hickey et al., 2002)

Le cancer de l'ovaire est la principale cause de décès chez les femmes atteintes de tumeurs gynécologiques malignes à cause des anomalies de signalisation androgènes / RA essentiel dans l'étiologie et la progression de cette maladie. Le RA est fréquemment exprimé dans divers sous-types de cancers de l'ovaire et il a été démontré que la signalisation androgénique / RA favorise la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de l'ovaire. Une autre cause est liée au nombre de répétition du trinuéclotide "CAG" (Lebbe and Woodruff, 2013).

I. Relation entre polymorphismes de répétition "CAG" du gène RA et le risque du cancer de l'ovaire

Un certain nombre d'études ont décrit l'association entre les polymorphismes de répétition CAG du gène RA et le cancer de l'ovaire.

Des polymorphismes de répétition des trois bases nucléotidique "CAG" du gène RA plus longues semblaient réduire le risque de cancer de l'ovaire. Étant donné que chaque répétition CAG supplémentaire entraîné une diminution de 2,5% de l'activité transactivationnelle du RA (Li et al., 2008) et des effets de stimulation de la croissance induits par le complexe androgènes / RA dans les lignées cellulaires cancéreuses de l'ovaire. Par plusieurs voies intra-ovariennes, qui répondent à une exposition élevée aux androgènes, fournissant diverses voies possibles pour les actions androgènes médiées par RA (Fig.16) (Walters, 2015).



TGF-β : Transforming growth factor bêta ; IL-6 : interleukine 6 ; IL-8 : interleukine 8 ; EGFR : epidermal growth factor receptor ; ARA70 : Androgen receptor-associated protein 70 ; P21, P71, P44 : Protéines du cycle cellulaire.

Fig. 16 : Résumé des voies affectées par la signalisation androgène / RA, qui agit de concert pour favoriser la prolifération du cancer de l'ovaire (Zhu et al., 2017)

Signalisation androgène/RA favorise la prolifération par l'intermédiaire de l'interaction avec un nombre de composants clés, y compris la voie du TGF-bêta, l'IL-6 / IL-8, les régulateurs du cycle cellulaire, la télomérase, le récepteur du facteur de croissance épidermique et coactivateurs RA.

II. Relation entre hyperandrogénie et le syndrome des ovaires polykystiques

L'excès des androgènes ou hyperandrogénie est une caractéristique clé du **syndrome des ovaires polykystiques** (SOPK), peut être induit par la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie, car ils entraînent une réduction des taux des protéines liantes des hormones sexuelles (globuline), ce qui entraîne une augmentation des androgènes libres et des profils métaboliques défavorables (Pappalardo et al., 2010; Pappalardo et al., 2017) ainsi que une altération de la communication entre les CG entre elles ou les CG et l'ovocyte , entraînant

un dysfonctionnement du développement folliculaire et de l'ovulation (une concentration supraphysiologique en androgènes entraîne une pénétration directe des androgènes dans l'ovocyte et se lie au RA, déclenchant ainsi une série d'actions non génomiques (Fig. 17) (Li et al., 2009).

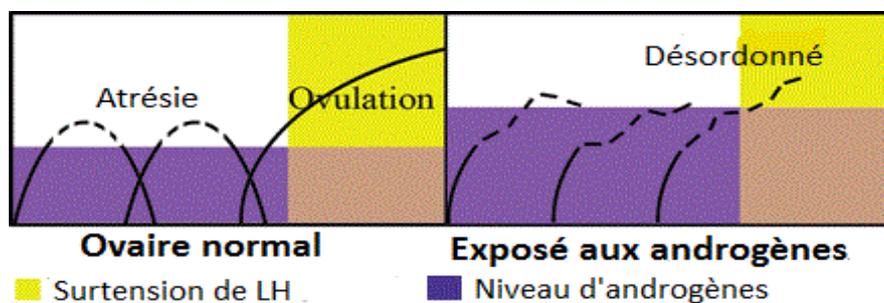


Fig. 17 : Relation entre hyperandrogénie et ovulation (Li et al., 2009)

III. Relation entre hyperandrogénie et les cellules de la granulosa

Les tumeurs à cellules de la granulosa constituent moins de 5% de toutes les tumeurs ovariennes (Kottarathil et al., 2013). La forme principale des tumeurs du stroma ovarien, provient de la prolifération des CG du follicule ovarien. Ces tumeurs sécrètent des hormones stéroïdes, principalement des E2 et moins fréquemment des androgènes et des progestatifs.

Chez les bovins, les tumeurs à CG sont les tumeurs ovariennes les plus courantes (Pérez-Martínez et al., 2004).

IV. Relation entre hyperandrogénie et le stroma ovarien

Les androgènes jouent un rôle crucial dans l'interaction folliculaire-stroma en ajustant avec précision la matrice extracellulaire et le contenu des vaisseaux du stroma ovarien. Un dysfonctionnement peut être à l'origine d'une hyperplasie du stroma ovarien.

L'hyperplasie du stroma ovarien est associée à une production accrue d'androgènes par les ovaires et au développement d'une pathologie de l'endomètre. Suite à la conversion des androgènes ovariens, une réaction catalysée par le cytochrome P450 aromatasase, les œstrogènes peuvent fonctionner comme un facteur mitogène local conduisant éventuellement au développement d'un cancer de l'endomètre (Jongen et al., 2002). Elle est caractérisée par la présence de nids de cellules thécales lutéinisées dans le stroma ovarien en raison de la différenciation des cellules interstitielles ovariennes en cellules stromales lutéinisées à activité stéroïdogènes. L'hyperplasie stromale est la prolifération nodulaire ou diffuse du stroma ovarien (Lozoya Araque et al., 2020).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Vu la situation actuelle dû au Covid-19 nous n'avons pas pu réaliser notre propre manipulation, du coup nous avons réalisé une synthèse bibliographique de différents articles scientifiques.

I. Matériel animal

Notre travail porte sur l'ovaire de la vache adulte, récolté au niveau de l'abattoir. Après abattage, chaque prélèvement est placé dans un sac en plastique et identifié par un numéro. Au laboratoire, après orientation et examen macroscopique, les différents prélèvements sont classés selon les différents stades de cycle œstral : Œstrus, métœstrus, diœstrus et proœstrus (Tab. 3) (Ireland et al., 1980).

Tab. 3 : Classification des corps jaunes au cours du cycle œstral des vaches (Ireland et al., 1980)

Caractéristiques	Stade de cycle œstral			
	Fin de l'œstrus	Métœstrus	Diœstrus	Proœstrus
Externes	CJ rouge, récemment ovulé, point de rupture non couvert par l'épithélium	Le Point de rupture est couvert, l'apex de CJ rouge ou brun	Bronze ou orange	Jaune claire vers blanc
Internes	CJ rouge, de temps en temps rempli de sang, cellules lâchement organisées	CJ rouge ou brun à l'apex seulement, le reste est orange	Orange	Orange vers jaune
Diamètre	0,5-1,5 cm	1,6-2 cm	1,6-2 cm	<1 cm
Vascularisation externe du CJ	Non visible	Généralement limité à la périphérie	mêmes que dans le métœstrus mais lui couvriront l'apex du CJ tard dans cette étape	Non visible
Follicules > 10mm de diamètre	Absent	Présent	Peut être absent	Présent

II. Méthodes utilisées

II.1. Protocole de la technique d'histologie

II.1.1. Fixation

Les ovaires prélevés sont immergés dans le formol du commerce tamponné dilué à 10 % pendant plus de 24h puis, avoir réaliser une coupe longitudinale, un petit fragment est placé dans une cassette d'histologie portant les références de l'animal.

Cette fixation a pour but la conservation des structures tissulaires du prélèvement dans un état aussi proche que possible du vivant.

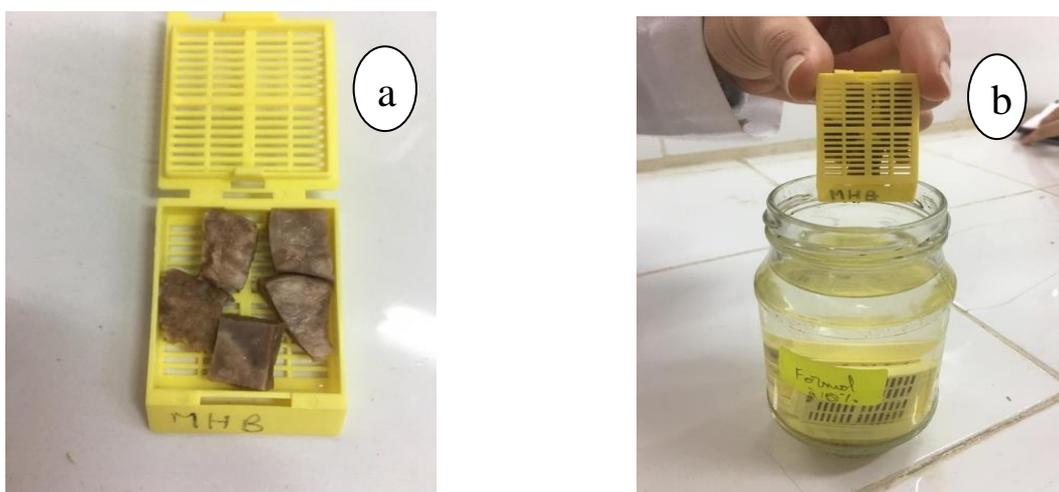


Fig. 18 : Prélèvement ovarien dans une cassette d'histologie (a), mis dans le formol 10% (b)

II.1.2. Inclusion

II.1.2.1. Déshydratation et substitution (éclaircissement)

Les prélèvements doivent être entièrement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. On procède à une double substitution car la paraffine n'est pas miscible dans l'alcool ; pour cela on remplace, selon les étapes, soit :

- L'eau par de l'alcool (déshydratation),
- L'alcool par le xylène (substitution).

Cette étape consiste à faire passer les cassettes renfermant les prélèvements dans des bains alcools à concentration croissante (allant de 70° à 100°) puis dans un solvant organique, le xylène. La durée dans chaque bain est la suivante :

- Alcool 70° : 30 min. (x4)
- Alcool 100° : 1h. (x2)
- Xylène : 1h. (x3)

Les prélèvements déshydratés sont alors immergés dans différents bains de paraffine chauffée à 56° dans une étuve, une température dépassant juste son point de fusion. La durée dans chaque bain de paraffine est la suivante :

Bain de paraffine	1 ^{er} Bain	2 ^{ème} Bain	3 ^{ème} Bain
Durée (min.)	30	30	60

II.1.2.2. La confection des blocs de paraffine

La confection des blocs de paraffine (Figs.19) consiste à :

- Mettre et à centrer le prélèvement au fond du moule métallique,
- Couler la paraffine liquide dans le moule métallique contenant le prélèvement,
- Déposer ensuite la cassette correspondante au prélèvement sur le moule métallique.

Le bloc, ainsi constitué, est refroidi rapidement sur une plaque réfrigérée pendant environ 15 minutes.

Après refroidissement et solidification de la paraffine, le bloc de prélèvement est séparé du moule métallique.

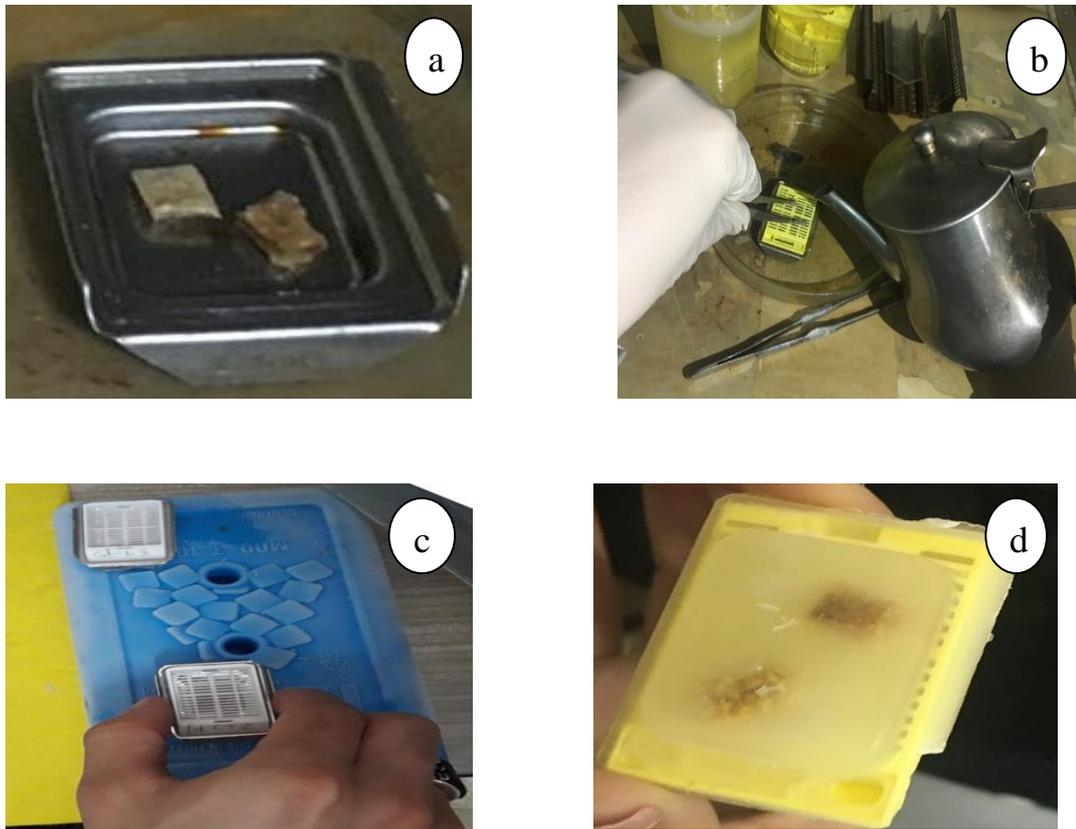


Fig. 19 : mise en place centré du prélèvement dans le moule métallique (a) , remplissage du moule métallique par la paraffine liquide (b), refroidissement sur la plaque réfrigérée(c), Bloc de paraffine (d)

II.1.2.3. Réalisation et étalement des coupes

II.1.2.3.1. Réalisation des coupes

Les coupes tissulaires d'une épaisseur de 5 μm ont été effectuées à l'aide d'un microtome (Fig.20a). Avant de commencer les coupes, on a reporté les références des cassettes sur les lames d'histologie à l'aide d'un crayon.

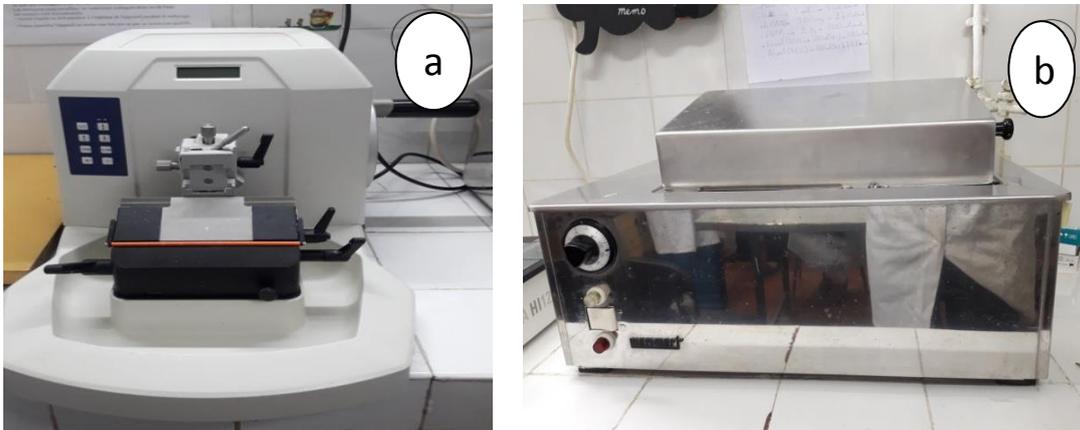


Fig. 20 : Microtome (a) et bain marie (b)

II.1.2.3.2. Etalement des coupes

- Afin de ne pas laisser de plis, les coupes sélectionnées sont déposées dans un bain-marie (Fig.20b) (42°C) et sont récupérées sur des lames silanisées de type « Superfrost plus » pour être utilisées en immunohistochimie. Ces lames permettent une adhésion sur le verre, grâce à laquelle les coupes de tissus sont d'abord attirées, puis fermement attachées à la surface de la lame par des liaisons chimiques.
- Enfin, les lames sont séchées à l'étuve (60°C) pendant 2 heures pour être utilisées en immunohistochimie.

II.2. Principe de l'immunohistochimie

L'immunohistochimie est une méthode associant l'histologie et l'immunologie pour visualiser *in situ* un antigène à l'aide d'un anticorps marqué (Fig.21).

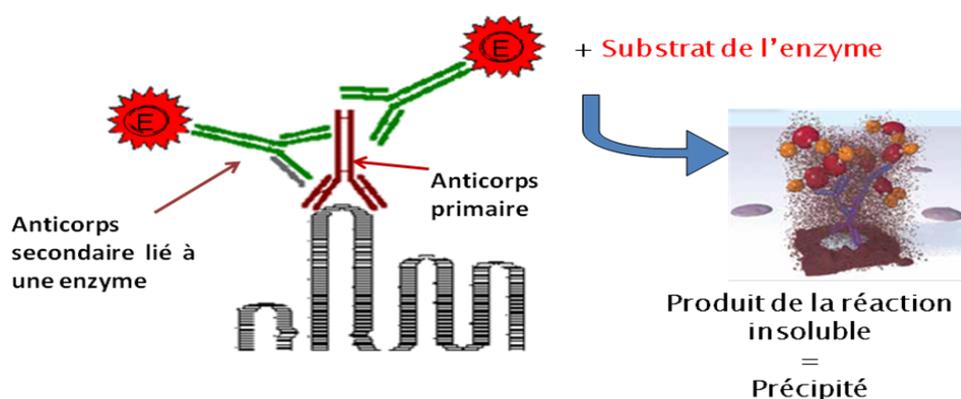


Fig. 21 : Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie

II.2.1. Protocole d'immunohistochimie

Le protocole d'immunohistochimie est divisé en deux étapes :

✚ **Première étape** : Préparation des prélèvements par la **technique d'histologie** (voir technique d'histologie jusqu'au séchage des lames dans l'étuve).

✚ **Deuxième étape** : Avant de commencer l'immunoréaction indirecte, les coupes sont **déparaffinées** et **hydratées**, puis rincées au PBS. L'excès de PBS est enlevé par égouttage des lames sur du papier absorbant. Les différentes étapes sont les suivantes (Fig.22) :

- Démasquage des sites antigéniques avec une solution tampon citratée (pH = 6) par la chaleur en utilisant une cocotte-minute.
- Blocage des peroxydases endogènes par un mélange PBS+H₂O₂ à 3%.
- Rinçage PBS (x2).
- Les coupes sont entourées avec une résine hydrophobe (Dako-pen) et placées dans une chambre humide sur un agitateur va et vient.
- Blocage des sites non spécifiques avec du sérum de cheval (réactif jaune du kit Vectastain).
- Blocage des biotines endogènes par le kit de blocage (Avidin/Biotin Blocking kit).
- Rinçage PBS (x2).
- Incubation des coupes pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-récepteurs aux androgènes polyclonal (RA N-20 : sc – 816, Santa Cruz), produit chez le lapin, dilué au 1/200. Sur certaines coupes, l'anticorps primaire est remplacé par le sérum de cheval ; ces coupes sont utilisées comme des contrôles négatifs.
- Rinçage PBS (x2).
- Application d'un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (réactif bleu du kit Vectastain), produit chez le cheval, pendant 30 min à température ambiante.
- Rinçage PBS (x2).
- Application du complexe Streptavidine-Peroxydase (Réactifs gris du kit Vectastain) pendant 30 min à température ambiante.
- Rinçage PBS (x2).
- Le chromogène utilisé (DAB) est déposé sur les différentes coupes et le contrôle de l'immunomarquage est réalisé sous microscope photonique.

- Rinçage à l'eau distillée.
- Contre coloration à l'hématoxyline.
- Rinçage à l'eau du robinet (c'est le pH alcalin de l'eau du robinet qui fait bleuir l'hématoxyline).
- Déshydratation des lames dans des bains d'alcool à concentration croissante (70, 96 et 100°) et éclaircit dans le xylène.
- Montage des lamelles avec une goutte de liquide de montage « Eukitt ».
- Les lames montées sont séchées à l'air libre puis observées au microscope photonique.

II.2.2. Validité de la technique d'immunohistochimie

L'anticorps utilisé est validé par des contrôles négatifs insérés au cours du protocole d'immunohistochimie pour confirmer l'immunomarquage observé sur les prélèvements

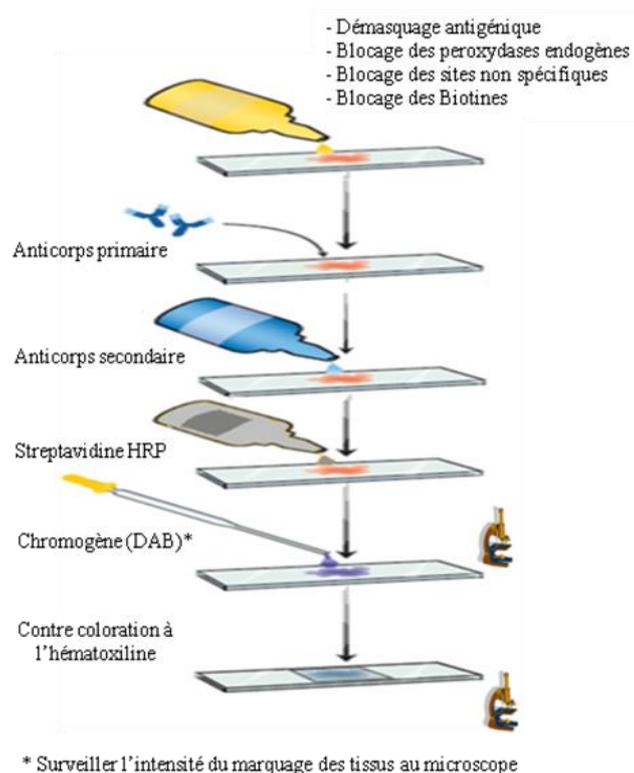


Fig. 22 : Etapes de la technique d'immunohistochimie

➤ Montage des lames

Avant de réaliser le montage des lames (Fig.24), une déshydratation et un éclaircissement des lames a été réalisé.

➤ **Déshydratation**

La déshydratation a consisté à faire passer les lames dans des bains d'alcool à concentration croissante (70°, 96°, 100°) pendant 3 minutes par bain.

➤ **Eclaircissement**

L'éclaircissement a consisté à faire passer les lames dans deux bains de xylène ; le premier bain d'une durée de quelques secondes et le second bain d'une durée de 10 minutes.



Fig. 23 : Batterie de déshydratation et d'éclaircissement

➤ **Montage des lames proprement dit**

Le montage entre lame et lamelle de la coupe histologique a été réalisé en utilisant le liquide de montage « Eukitt » (Fig. 24).

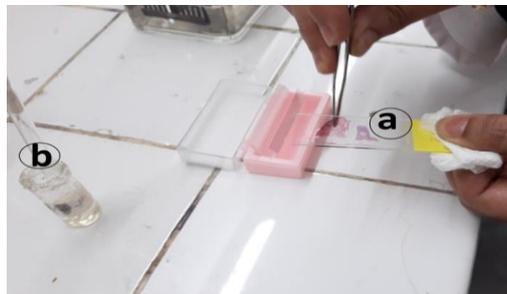


Fig. 24 : Montage de la coupe histologique (a) ; liquide de montage « Eukitt » (b)

➤ **Observation au microscope photonique**

Après séchage des lames à l'air libre, ces dernières ont été observées au microscope photonique et des photos ont été prises à l'aide d'un appareil photo de marque Sony.

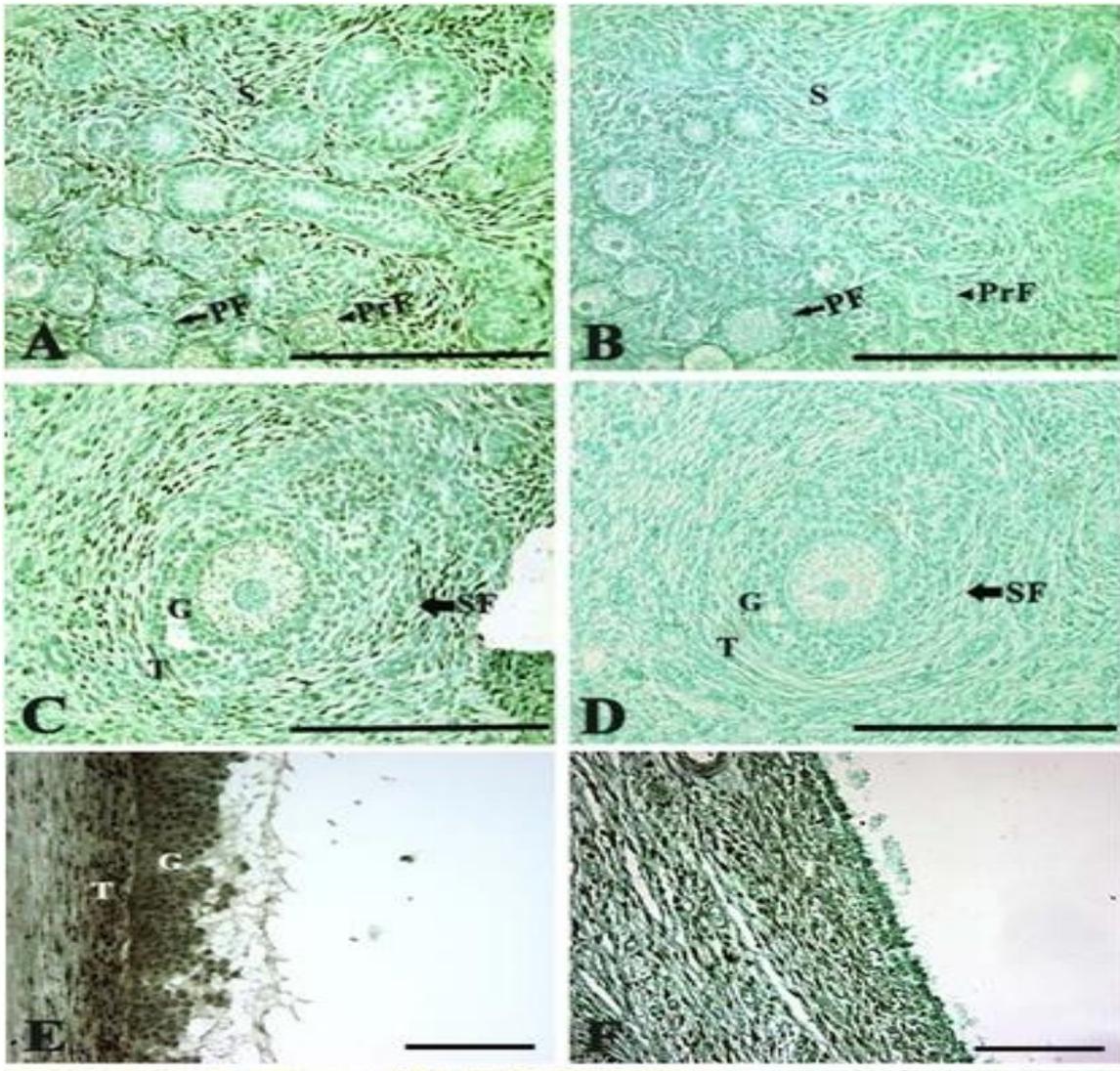


Fig. 25 : Microscope photonique

Résultats et discussion

De nombreuses études ont été réalisées sur différents espèces afin de détecter et localiser les RA au niveau ovarien. La technique la plus utilisée est l'immunohistochimie.

Une expérience réalisée par Yang and Fortune (2006), qui ont travaillé sur des ovaires prélevées sur des fœtus bovins à terme. La technique d'immunohistochimie a été utilisée pour la localisation des RA au niveau de l'ovaire. Les résultats obtenus montrent que les RA ont été observés dans différents types de cellules ovariennes et l'intensité de l'immunomarquage varie en fonction du stade de développement des follicules (Fig.26). Une forte intensité de coloration des RA est localisée dans les cellules du stroma ovarien (Fig. 26A). Par rapport aux témoins négatifs (Fig. 26B et 26D), les CG des follicules primordiaux et primaires n'ont montré aucune immunoréactivité pour le RA (Fig.26A), alors que celles des follicules secondaires présentaient une faible coloration des RA (Fig.26C). Les cellules thèques autour des follicules secondaires présentent des réactivités modérées (Fig. 26C). De plus, les ovocytes de certains follicules pré-antraux sont faiblement colorés (Fig. 26A et 26C). Au stade antral, une forte coloration des RA est généralement présente dans les CG et de la thèque des follicules saints (Fig. 26E), tandis que les follicules atrétiques ont une coloration modérée des RA dans la thèque et aucune immunoréactivité dans les CG en dégénérescence (Fig. 26F).



S : cellules du stroma ; PrF : Primordial follicles (pointe de flèche) ; SF : secondary follicles (grande flèche) ; T : cellules de la théque ; Bar = 100 μ m.

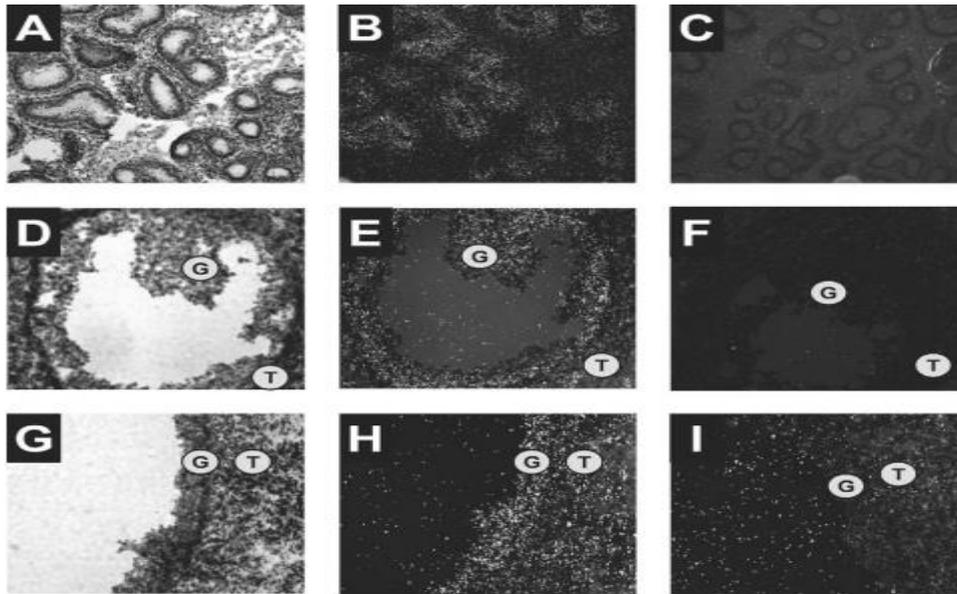
Fig. 26 : Coloration immunohistochimique des récepteurs aux androgènes dans différents types de cellules bovines (Yang and Fortune, 2006)

Dans une autre étude de Hampton et al. (2004), qui ont utilisé un segment de 346 paires de bases du RA **bovin** qui a été cloné et séquencé, la technique consiste à utiliser un test de protection contre la ribonucléase, l'expression des RA a été détectée dans l'ARN total du cortex ovarien bovin. L'expression (absence ou présence) des ARNm des RA a été détectée par hybridation *in situ* dans le cortex ovarien bovin. Les résultats obtenus montrent que l'expression de l'ARNm des RA a été localisée dans les CG de type 2 (1 à 1,5 couches de cellules cuboïdes de CG) au type 4 (4 à 6 couches de forme cubique de CG et formation d'une couche de CT) et type 5 (6 couches de cellules cubiques de CG, 1 couche CT définie et formation du antrum) (Fig. 27). Dans les follicules de type 5, les ARNm des RA semblent être

localisées exclusivement dans les CG des petits follicules antraux, mais peut exprimer dans les CG et les CT des plus gros follicules antraux. L'expression des ARNm des RA est absente dans les follicules de type 1 (1 couche de CG aplaties), alors qu'ils sont présents dans les CG de 41% des follicules de type 2. Dans les follicules de type 3 (2 à 3 couches de CG) au type 5, l'expression des ARNm des RA est exprimée dans les CG à 100 % des follicules examinés et l'expression est supérieure à celle des follicules de type 1 (Fig. 27). Il y a une augmentation de la fréquence d'expression des ARNm des RA au cours de la transition des follicules primordiaux (type 1) aux follicules pré-antraux (types 2-4).

Les résultats rapportés par Hampton et al. (2004), montrent une augmentation dans la fréquence d'expression des ARNm des RA dans les CG, pas d'expression dans les follicules primordiaux (type 1), 41% d'expression dans follicules primaires (type 2) et 100 % d'expression au stade de pré-antral (type 3-5).

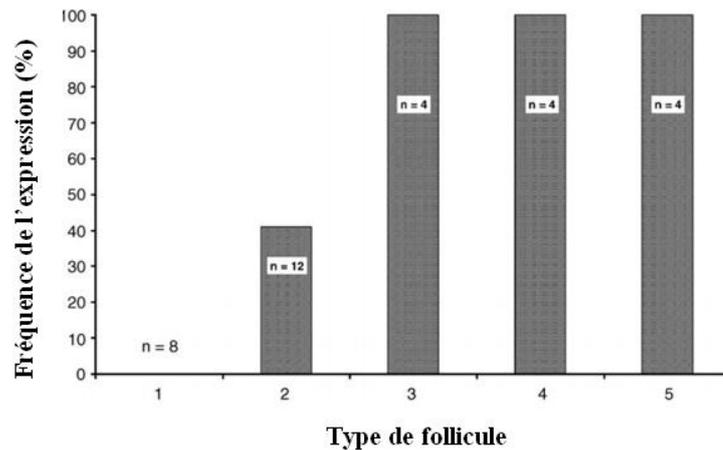
La quantification de l'expression de l'ARNm RA, à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image, suggère que dans les follicules bovins, l'expression de l'ARNm RA peut être la plus élevée dans les follicules antraux. Par contre, les travaux de Yang et Fortune (2006) ont rapporté un résultat contradictoire par rapport à la présence du RA dans les follicules primordiaux et primaires. Aucune immunoréactivité n'a été détectée dans les follicules primaires, mais Hampton et al. (2004) ont détecté l'expression de des ARNm dans environ 40% des follicules primaires, ce qui indique que les actions des androgènes sur les follicules primaires peuvent être indirect via les effets médiés par les RA sur les cellules du stroma ou directement via un petit nombre de récepteurs sur les CG des follicules primaires. Hampton et al. (2004) affirment que les androgènes peuvent être un régulateur important du début de la croissance folliculaire.



G : cellules granulosas : T : Cellules de la thèque

Fig. 27 : Expression des ARNm du récepteur aux androgènes détectée par hybridation *in situ* en utilisant une sonde d'ARNc [35S] (Hampton et al., 2004)

A, D et G sont des photomicrographies représentatives en fond clair de l'épididyme bovin, du petit antral bovin et du gros follicule antral bovin, respectivement. B, E et H sont des photomicrographies à fond noir d'épididyme bovin, de petit antral bovin et de gros follicule antral bovin, respectivement, incubées avec une sonde antisens, tandis que C, F et I sont des photomicrographies à fond noir de l'épididyme bovin, du petit antral bovin et du gros follicule antral bovin, respectivement, incubés avec une sonde sens. Objectif : 20x



1 : couche de cellules de granulosa aplaties ; 2 : 1 à 1,5 couches de cellules de granulosa cuboïdes ; 3 : 2 à 3 couches de cellules de la granulosa ; 4 : 4 à 6 couches de forme cubique cellules de la granulosa et formation d'une couche thèque ; 5 : 6 couches de cellules de granulosa cuboïdes, couche thèque définie et formation d'antre

Fig. 28 : Fréquence d'expression d'ARNm RA dans les follicules bovins déterminée par hybridation *in situ*. Fréquence d'expression RA dans les follicules de type 1 < fréquence d'expression RA dans les types 3-5 follicules (Hampton et al., 2004)

Une autre étude de Makita and Miyano (2015), similaire à celle de Hampton et al. (2004), sur l'évaluation, par immunofluorescence, de l'expression des RA au niveau des CG du cumulus oophorus entourant l'ovocyte (CGCO) et de la capacité d'un antagoniste des RA à inhiber l'effet des androgènes sur les ovocytes des ovaires bovins. Les résultats obtenus ont montré que dans les follicules antraux précoces, l'expression RA est trouvée dans les ovocytes, les CG et les CT (Fig. 29A). Des immunomarquages aux RA intenses sont observés dans les noyaux des CG (Fig. 29A). Des résultats similaires sur des ovaires bovins réalisée par Salvetti et al. (2012) montrent que les RA sont localisés dans le noyau, avec une expression plus intense dans les CG et plus faible dans les CT.

Dans les CGCO isolés des follicules antraux précoces, l'expression des RA dans les ovocytes est visible (Fig. 29B). Les ovocytes ont montré une immunolocalisation des RA sans le cytoplasme et les noyaux sauf dans les nucléoles, tandis que les noyaux des CG ont montré une expression RA plus intense. Ces rapports suggèrent que les androgènes, agissant par l'intermédiaire des RA dans les CG, peuvent réguler l'expression et/ou l'action des principaux facteurs de croissance ovarienne et contribuer à la croissance des follicules ou des ovocytes. Les noyaux des CG ont montré des expressions plus intenses des RA dans les follicules antraux précoces, indiquant que les RA fonctionnels résident dans les CG. Puisque nous avons également trouvé l'expression RA dans les ovocytes bovins, donc les androgènes ont le potentiel d'affecter directement les ovocytes. Il existe des travaux sur l'action des androgènes via les RA dans les ovocytes, en effet, Makita et Miyano (2015) ont montré que les androgènes favorisent la croissance et l'acquisition de la compétence méiotique des ovocytes et que ces effets stimulants des androgènes sont médiés par les RA dans les CG et/ou des ovocytes.

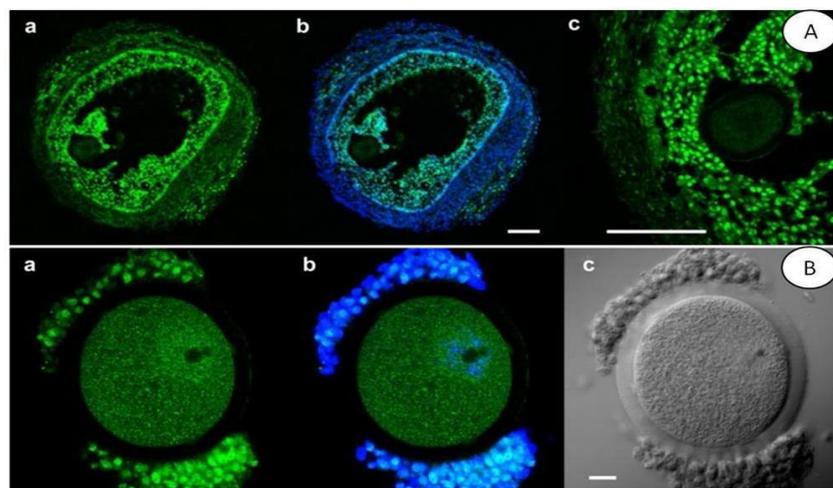


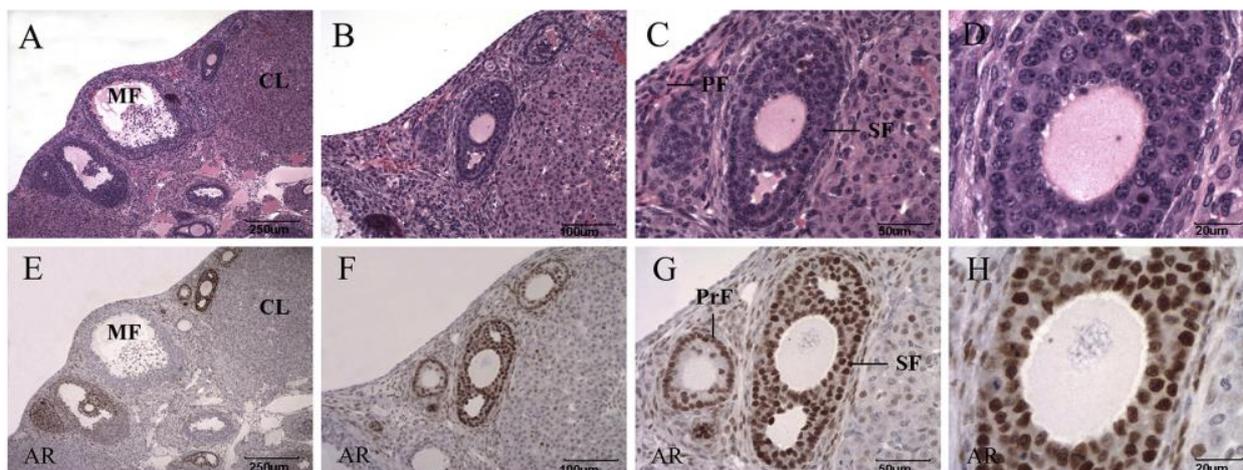
Fig. 29 : Expression des récepteurs aux androgènes dans les follicules antraux bovins précoces et les cellules de granulosa ovocytaire (Makita and Miyano, 2015)

(A) Les cryosections de follicules de 0,4 à 0,7 mm ont été traitées avec un anticorps anti-récepteur aux androgènes et un anticorps d'immunoglobuline marqué Alexa Fluor 488. Alexa Fluor 488 marque les RA en vert (a-c). La coloration DAPI marque la chromatine en bleu (b). Une image agrandie du cumulus oophorus en (a) est montrée en (c). La barre d'échelle : 100 μ m.

(B) CG ovocytaire isolés de follicules de 0,4 à 0,7 mm ont été colorés. Alexa Fluor 488 marque les RA en vert (a, b). La coloration DAPI marque la chromatine en bleu (b). Une image en fond clair est montrée en (c). La barre d'échelle : 20 μ m

Une étude immunohistochimique a été réalisée sur des ovaires de mouton pour localiser la présence ou l'absence de protéines des RA des différents types de follicule par Juengel et al. (2006). Les résultats montrent une expression cohérente des ARNm codant pour les RA pour la première fois au 55^{ème} jour de la gestation au niveau de l'épithélium de la surface ovarienne et au niveau du stroma. L'expression des ARNm aux RA a été observée dans les CG de nombreux follicules de type 2 et 3 et non pas dans les follicules de type 1. Une intense expression de RA a été également observée dans le stroma, les CT et les CG des follicules de type 4 et 5 et dans le tissu lutéal. Ces travaux ont montré également les RA dans de nombreux ovocytes des follicules à différents stade de développement, dans certaines cellules de l'épithélium de surface et la plupart des cellules du stroma. Ainsi les résultats obtenus montrent que les hormones stéroïdes ont le potentiel de réguler de nombreux aspects de la fonction ovarienne, y compris le développement de l'ovaire, la formation du follicule et la croissance folliculaire précoce chez le mouton.

D'autres études chez d'autres espèces ont été réalisées pour déterminer la localisation des RA dans l'ovaire. Chez la souris, Yang et al. (2015) ont montré, par la technique immunohistochimie et de western blot, que les RA (Fig. 30) sont exprimés à des niveaux élevés dans le noyau (Fig. 30E, 30H) des CG dans les follicules ovariens à tous les stades de développement des follicules primordiaux aux follicules secondaires. Une intensité faible est observée dans les ovocytes, et très faible dans le CJ. Par contre, elle est indétectable dans la CG et dans les ovocytes des follicules pré-ovulatoires.



PF : primordial follicles; PrF :primary follicles ; SF :secondary follicles ; MF : Mature follicles ; CL : Corpus luteum

Fig. 30 : Observation histologique de l'ovaire de souris témoin avec une coloration HE (A-D) et immunocoloration de RA dans l'ovaire de souris (E-H) (Yang et al., 2015)

(A-D) L'ovaire normal de souris a été divisé en cortex et la médulla. Le cortex est visible des follicules aux différents stades de développement, y compris les follicules primordiaux, les follicules primaires, les follicules secondaires et les follicules matures. (E-H) Expression et localisation des RA dans les follicules de souris témoins. Immunocoloration des RA positive a été principalement observée dans les noyaux des CG aux différents stades de développement. Expression a été colorée en brun, les noyaux ont été colorés en bleu.

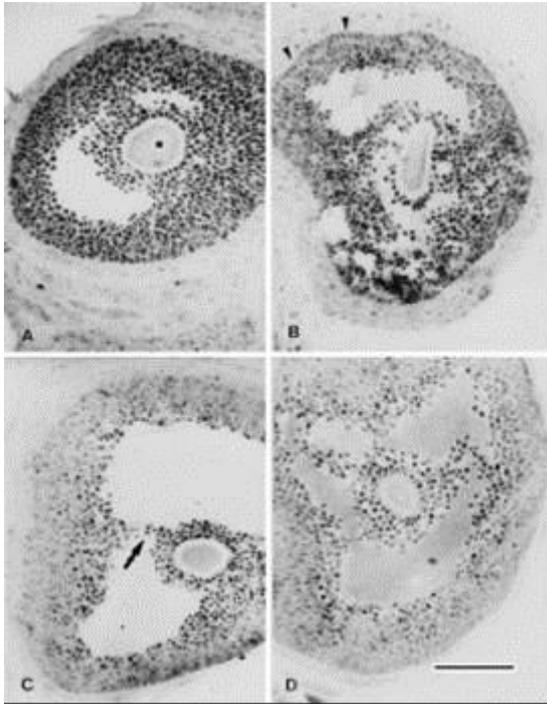
Chez la **ratte** adulte cyclée, Szoltyś and Slomczynska (2000) ont étudié la modification de la distribution des RA dans les follicules au cours de leur développement par immunohistochimie. Les résultats obtenus montrent une immunolocalisation des RA principalement dans le noyau des CG, dans les follicules ovariens à tous les stades de développement folliculaire. Les figures 31 et 32 résument les changements dans la distribution AR dans les follicules durant le cycle œstral.

La fig. 31A. Follicule antral précoce avec une forte immunolocalisation nucléaire dans toute les CG.

La fig. 31B : Follicule antral précoce qui avait commencé à se différencier. Les cellules murales pseudostratifiées présentent un immunomarquage des RA plus faible que dans la partie restante de la couche de granulosa ; oestrus précoce.

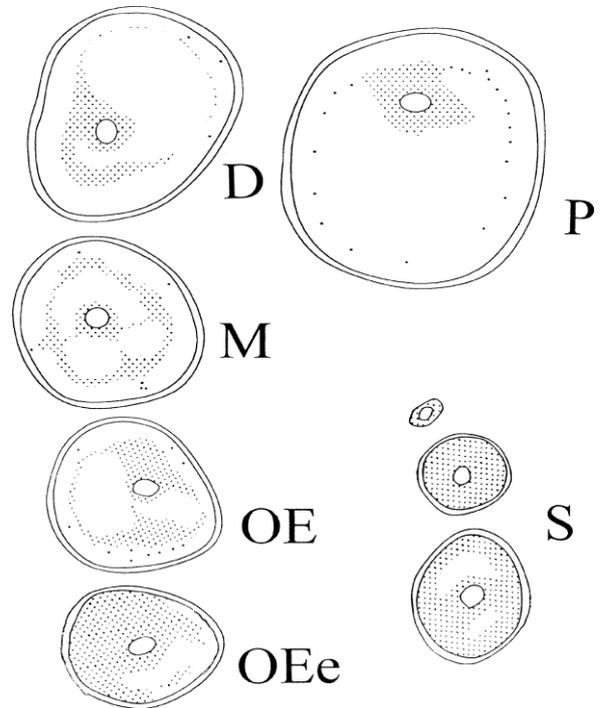
La fig. 31C : Fragment de follicule antral montrant une forte réaction positive en particulier dans Cellules du cumulus oophorus (COC) et les CG adjacentes reliées au COC par une chaîne de CG; oestrus 11:00 h.

La fig. 31D : Fragment de follicule en voie de maturation dans lequel les RA avait déjà diminué dans la plupart des cellules murales mais sont toujours présents dans la région antrale et le COC ; metoestrus 18 :00 h.



→ : cellules de la granulosa.

Fig. 31 : Modifications de la distribution RA dans les follicules ovariens de rat au cours de leur maturation (Szoltys and Slomczynska, 2000). La barre d'échelle : 100 µm

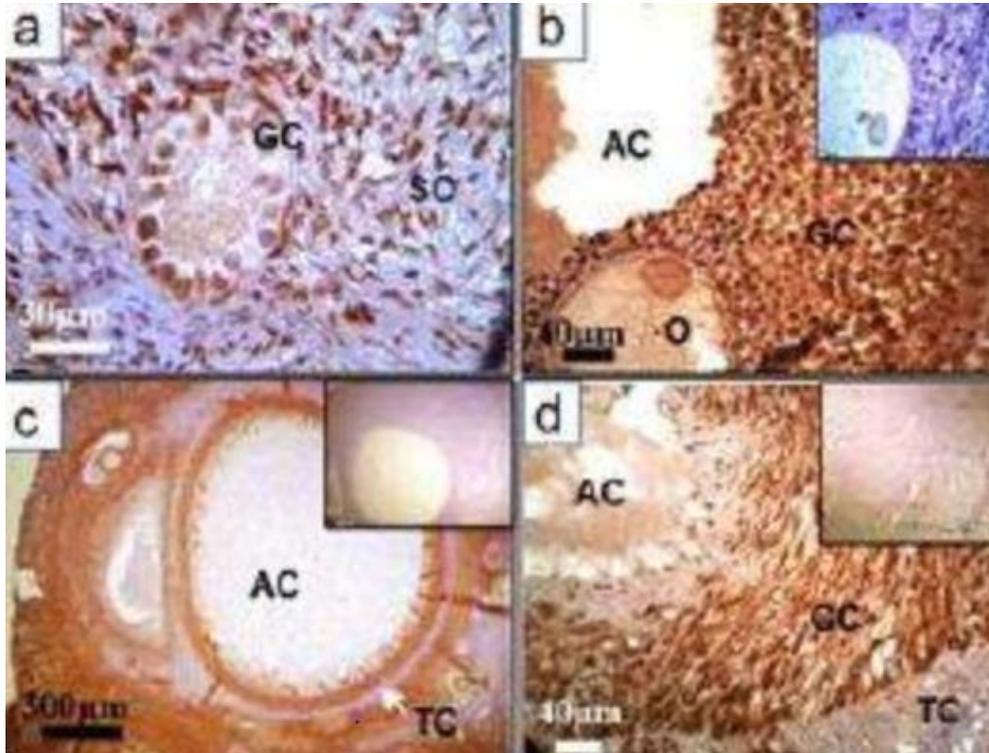


S : Follicules préantraux et antraux précoces. OEe : Follicule antral précoce à l'œstrus. OE : Follicule antral tardif. M : Follicule au metoestrus. D : Follicule au dioestrus. P : Follicule au proestrus.

Fig. 32 : Représentation schématique de la distribution RA dans les cellules de la granulosa des follicules en développement et en maturation (Szoltys and Slomczynska, 2000)

Chez la **chèvre** bédouine (*Capra hircus*), l'étude réalisée par Kassouri et al. (2013) montre que les RA sont détectés dans les différents types de cellules (granulosa, thèque, stroma) et à différents stades du développement folliculaire (Fig. 33). Dans le follicule primaire, la positivité pour les RA a été trouvée dans les cellules de la granulosa et des noyaux interstitiels. Dans les follicules antraux (Fig. 33a) et préovulatoires (Fig. 33b) le marquage dans les noyaux localisés dans les CG, les CT et les cellules du stroma avec un marquage intense au stade préovulatoire. Cependant, le cytoplasme des CG et des CT montre un immunocoloration faible. Les cellules de la thèque externe ne présentent aucune réactivité (Fig. 33c) et les cellules de la thèque interne perdent l'expression du RA (Fig. 33d).

Les résultats obtenus par Kassouri et al. (2013) les androgènes présentent des activités importantes dans la régulation de la croissance et le développement folliculaire comme cela a été rapporté dans les études précédentes.

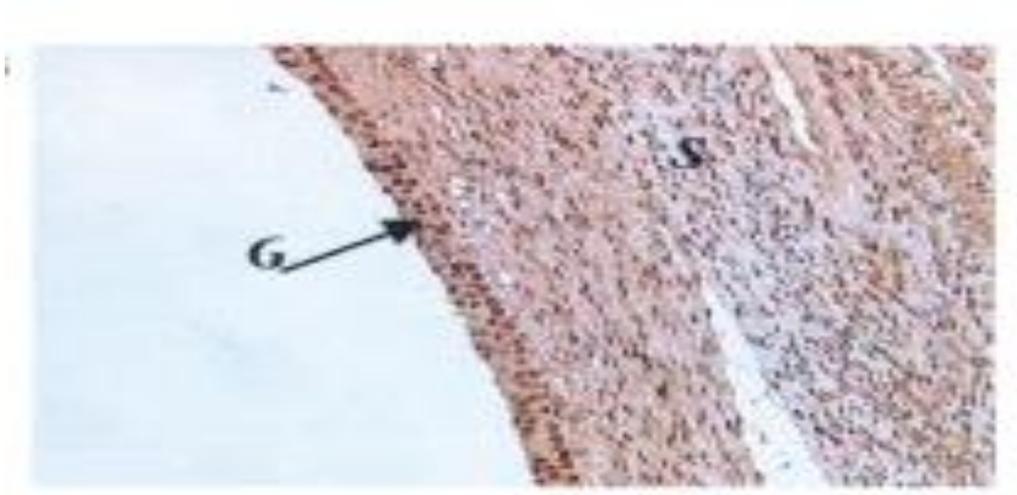


CA : cavité antrale, CG : Cellule germinale, CS : stroma cellule, O : ovocyte, CT : cellule thèque

Fig. 33 : Immunolocalisation du récepteur aux androgènes dans l'ovaire de la chèvre bédouine (*Capra hircus*) en dehors de la saison de reproduction. Le follicule primaire (a), le follicule ovulatoire (b), le follicule antral (c) et les follicules atrétiques (d). Les photos en encadrés montrent les témoins négatifs (Kassouri et al., 2013)

Chez la **femme**, les résultats des travaux de Rice et al. (2007) montrent que l'expression des RA est non détectée dans les follicules primordiaux, mais au cours de la progression de la folliculogénèse, le pourcentage de follicules marqué par RA augmente du stade follicules de transition au stade follicule tertiaire. L'immunolocalisation des RA est observée dans le stroma ovarien et le cortex des follicules pré-antraux. Ces résultats montrent que les androgènes stimulent l'initiation de la croissance folliculaire par l'un des deux mécanismes suivants : soit directement via RA sur le follicule primordial ou indirectement via d'autres facteurs de croissance. Ce dernier a été proposé car l'expression RA était également vue dans les CT et les cellules interstitielles du stroma. Les mêmes résultats sont rapportés par Edmondson et al. (2002) sur des coupes d'ovaire normal prélevées sur six patientes

différentes, montrent un immunomarquage des RA au niveau des CG et les cellules du stroma ovarien (Fig. 34).



G : Cellules de la granulosa ; S : Stroma.

Fig. 34 : Expression des récepteurs aux androgènes dans des coupes d'ovaire humain normal (Edmondson et al.,2002)

Les résultats des articles bibliographiques utilisées dans notre travail sont représentés dans le tableau 4.

Tab. 4 : Synthèse des résultats bibliographiques chez les mammifères

Espèces	Techniques utilisées	Localisation des récepteurs aux androgènes	Références
Bovine	Hybridation <i>in situ</i>	- Cortex ovarien. - CG follicules de type (2-5).	Hampton et al., 2004
Bovine	Immuno-fluorescence	- Follicules antraux précoces. - Ovocytes, CG et CT - Noyaux CG	Makita and Miyano, 2015
Bovine	Immuno-histochimie	- Stroma ovarien. - Follicule II : faible coloration des RA. - Ovocyte : de certains follicules pré-antraux faiblement colorés. - Follicule antral : CG et CT. - Follicules artistiques	Yang and Fortune, 2006
Ovine	Immuno-histochimie	- CG : Follicule type 2 et 3. - Stroma. - CG et CT : follicules de type 4 et 5. - Tissu lutéal. - Ovocyte. - Epithélium de surface.	Juengel et al. 2006
Bovine	Immunohistochimie	-Noyau de CG. -Tous les follicules en développement.	Salveti et al., 2012
Rongeur (Souris)	Immuno-histochimie Et Western blot	-Noyau de CG. -Tous les follicules en développement. -Faible dans l'ovocyte et le CJ.	Yang et al., 2015
Caprine	Immuno-histochimie	- CG. - CT. - Stroma. -Différents stades du follicule.	Kassouri et al., 2013
Rongeur (Ratte)	Immuno-histochimie	-Noyau de GC. -Tous les follicules en développement.	Szołtys and Slomczynska, 2000
Humaine	Immuno-histochimie	- FP et FS, follicules pré-antraux, CT et le stroma ovarien et le cortex.	Rice et al., 2007
Humaine	Immuno-histochimie	- Epithélium de surface de l'ovaire. - CG et S : follicules en développement.	Edmondson et al., 2002

RA : Récepteurs aux androgènes ; CG : Cellule de la granulosa ; CT : Cellule de la thèque ; S : Stroma ; FP : Follicules primaire ; FS : Follicule secondaire ; CJ : Corps jaune.

Conclusion

L'ensemble des travaux réalisés chez les bovins montrent que la localisation des récepteurs aux androgènes au niveau ovarien par immunohistochimie sont retrouvés dans :

- Le stroma ovarien.
- Les ovocytes.
- Les cellules de la granulosa et les cellules des thèques (interne et externe).
- Les follicules primaires et follicules secondaires en croissance.
- Follicule au stade antral.

Les androgènes via leurs RA jouent un rôle important dans la régulation de la fonction de reproduction chez la femelle.

Références bibliographiques

- Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P., 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69, 72-80.
- Adams, G.P., Singh, J., 2014. Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle In, *Bovine Reproduction*, Vol. 816. Wiley, pp. 219-244.
- Akers, R.M., Denbow, D.M., 2013. Reproduction. In, *Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. Wiley.
- Apolloni, L.B., Bruno, J.B., Alves, B.G., de Figueiredo, J.R., 2016. The role of androgens in mammals folliculogenesis. *Acat Scientiae Veterinariae* 44.
- Armstrong, D.T., Daniel, S.A.J., Gore-Langton, R.E., 2013. Intra-ovarian of steroids in regulation. In, *Endocrinology and Physiology of Reproduction*. Springer US, pp. 177-198.
- Baculescu, N., 2013. The role of androgen receptor activity mediated by the CAG repeat polymorphism in the pathogenesis of PCOS. *Journal of medicine and life* 6, 18-25.
- Ball, P.J.H., Peters, A.R., 2004. Anatomy. In, *Reproduction in Cattle*. 3ème Ed. Wiley, pp. 13-27
- Baril, G., 1993. Caractéristique de reproduction des ovins et des caprins. In, *Manuel de formation pour l'insemination artificielle chez les ovins et les caprins*. FAO.
- Beaver, B.V.G., 2008. Female canine sexual behavior In, *Canine Behavior: Insights and Answers*. 2ème. Saunders/Elsevier, pp. 205-222
- Bennett, N.C., Gardiner, R.A., Hooper, J.D., Johnson, D.W., Gobe, G.C., 2010. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 813-827.
- Callewaert, L., Van Tilborgh, N., Claessens, F., 2006. Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor. *Cancer Res* 66, 543-553.
- Cardillo, M.R., Petrangeli, E., Aliotta, N., Salvatori, L., Ravenna, L., Chang, C., Castagna, G., 1998. Androgen receptors in ovarian tumors: correlation with oestrogen and progesterone receptors in an immunohistochemical and semiquantitative image analysis study. *J Exp Clin Cancer Res* 17, 231-237.
- Cauty, I., Perreau, J.M., 2009. La reproduction In, *La conduite du troupeau bovin laitier*. Guides France agricole.
- Chadha, S., Rao, B.R., Slotman, B.J., van Vroonhoven, C.C., van der Kwast, T.H., 1993. An immunohistochemical evaluation of androgen and progesterone receptors in ovarian tumors. *Hum Pathol* 24, 90-95.
- Cuq, P., Agba, K.M., 1975. Les organes génitaux de la femelle zébu. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 28, 331.
- Dairyman, H., 1996. L'appareil reproducteur de la vache. In, *Dairy Cattle Fertility & Sterility*. W.D. Hoard & Sons.
- Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Ellis, T.R., Marshall, J.C., 1989. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 125, 917-923.
- Derouin, F., Beltramo, M., Decourt, C., Fleurot, R., Gérard, N., Charvet, C., Martinet, S., Robert, V., Taragnat, C., Tillet, Y., Duittoz, A., 2019. L'ovulation chez les mammifères. *INRA Productions Animales* 32, 445-460.
- Devoe, R., 2015. Amphibian and Reptilian Anatomy and Physiology. In, *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians*. 3ème Ed. Elsevier Health Sciences, pp. 542-563.
- Diancourt, M.A., Gougen, A., Monniaux, D., Royere, D., Thibault, C., 2001. Folliculogenèse et ovulation In, *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA, p. 928.
- Drion, P.V., Ectors, F.J., Hanzen, C., Houtain, J., Lonergan, P., Beckers, J.F., 1996a. Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogenèse et atresie. *Le Point Vétérinaire* 28, 37-47.
- Drion, P.V., Ectors, F.J., Hanzen, C., Houtain, J., Lonergan, P., Beckers, J.F., 1996b. Régulation de la croissance folliculaire et lutéale: 2. Ovulation, corps jaune et lutéolyse. *Point Vétérinaire* 28, 49-56.

- Drummond, A.E., 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E 4, 16.
- Dudouet, C., 2010. La reproduction. In, *La production des bovins allaitants*. 3^{Éd}. France agricole, p. 414.
- Edmondson, R.J., Monaghan, J.M., Davies, B.R., 2002. The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. *British journal of cancer* 86, 879-885.
- Edson, M.A., Nagaraja, A.K., Matzuk, M.M., 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 30, 624-712.
- England, G., 2012. Endocrinology of the female. In, *Dog Breeding, Whelping and Puppy Care*, Vol. 344. Wiley.
- Erickson, G.F., Magoffin, D.A., Dyer, C.A., Hofeditz, C., 1985. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrine reviews* 6, 371-399.
- Evans, A., 2003. Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. *Reproduction in Domestic Animals* 38, 240-246.
- Forde, N., Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J.F., Crowe, M.A., 2011. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* 124, 163-169.
- Fortune, J.E., 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50, 225-232.
- Frandson, R.D., Wilke, W.L., Fails, A.D., 2013a. Anatomy of the female reproductive system In, *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Wiley, pp. 421-428.
- Frandson, R.D., Wilke, W.L., Fails, A.D., 2013b. The ovary and estrous cycles In, *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Wiley.
- Franks, S., Hardy, K., 2018. Androgen Action in the Ovary. *Frontiers in endocrinology* 9, 452-452.
- Freedman, L.P., 1992. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 13, 129-145.
- Fukuda, S., Orisaka, M., Tajima, K., Hattori, K., Kotsuji, F., 2009. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. *Journal of Ovarian Research* 2, 17.
- Gelmann, E.P., 2002a. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 20, 3001-3015.
- Gelmann, E.P., 2002b. Molecular Biology of the Androgen Receptor. *Journal of Clinical Oncology* 20, 3001-3015.
- Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L., 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 20, 187-200.
- Gong, J.G., Bramley, T., Webb, R., 1991. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod* 45, 941-949.
- Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L., Claessens, F., 2007. The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res* 67, 4514-4523.
- Hampton, J.H., Manikkam, M., Lubahn, D.B., Smith, M.F., Garverick, H.A., 2004. Androgen receptor mRNA expression in the bovine ovary. *Domest Anim Endocrinol* 27, 81-88.
- Hansel, W., Convey, E.M., 1983. Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 2, 404-424.
- Hanzen, C., Lourtie, O., Drion, P.V., 2000. Le développement folliculaire chez la vache I. Aspects morphologiques et cinétiques. *Annales de Medecine Veterinaire* 144, 225-235.
- Heinlein, C.A., Chang, C., 2002. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine reviews* 23, 175-200.
- Henricks, D.M., Dickey, J.F., Hill, J.R., 1971. Plasma Estrogen and Progesterone Levels in Cows Prior to and During Estrus¹. *Endocrinology* 89, 1350-1355.

- Hickey, T., Chandy, A., Norman, R.J., 2002. The Androgen Receptor CAG Repeat Polymorphism and X-Chromosome Inactivation in Australian Caucasian Women with Infertility Related to Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 161-165.
- Hillier, S.G., 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod* 9, 188-191.
- Hillier, S.G., Whitelaw, P.F., Smyth, C.D., 1994. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 100, 51-54.
- Hirshfield, A.N., 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124, 43-101.
- Hulshof, S.C., Figueiredo, J.R., Beckers, J.F., Bevers, M.M., van den Hurk, R., 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet Q* 16, 78-80.
- Ireland, J.J., Murphee, R.L., Coulson, P.B., 1980. Accuracy of Predicting Stages of Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum¹. *J Dairy Sci* 63, 155-160.
- Jenster, G., 1998. Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Molecular and cellular endocrinology* 143, 1-7.
- Jia, X., Kessel, B., Welsh, T.H.J.R., Hsueh, A.J.W., 1985. Androgen Inhibition of Follicle-Stimulating Hormone-Stimulated Luteinizing Hormone Receptor Formation in Cultured Rat Granulosa Cells*. *Endocrinology* 117, 13-22.
- Jongen, V.H.W.M., Sluijmer, A.V., Heineman, M.J., 2002. The postmenopausal ovary as an androgen-producing gland; hypothesis on the etiology of endometrial cancer. *Maturitas* 43, 77-85.
- Juengel, J.L., Heath, D.A., Quirke, L.D., McNatty, K.P., 2006. Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction* 131, 81-92.
- Ko, J.C., Kastelic, J.P., Del Campo, M.R., Ginther, O.J., 1991. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil* 91, 511-519.
- König, H.E., Liebich, H.G., 2007. Female genital organs In, *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals: Textbook and Colour Atlas*. Wiley.
- Kottarathil, V.D., Antony, M.A., Nair, I.R., Pavithran, K., 2013. Recent advances in granulosa cell tumor ovary: a review. *Indian J Surg Oncol* 4, 37-47.
- Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L.I., O'Brien, C.A., Bodenner, D.L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G.B., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., Jilka, R.L., Manolagas, S.C., 2001. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104, 719-730.
- Lamb, D., Weigel, N., Marcelli, M., 2001. Androgen receptors and their biology. *Vitamins and hormones* 62, 199-230.
- Lebbe, M., Woodruff, T.K., 2013. Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Molecular human reproduction* 19, 828-837.
- Leborgne, M.C., Tanguy, J.M., Foisseau, J.M., Selin, I., Vergonzanne, G., Wimmer, E., 2013a. anatomie des appareils reproducteurs. In, *Reproduction des animaux d'élevage Educagri*, pp. 10-33.
- Leborgne, M.C., Tanguy, J.M., Foisseau, J.M., Selin, I., Vergonzanne, G., Wimmer, E., 2013b. Les hormones de la reproduction. In, *Reproduction des animaux d'élevage Educagri*, p. 466.
- Lee, D.K., Chang, C., 2003. Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4043-4054.
- Lefebvre, R.C., Gnemmi, G., 2009. Anatomy of the reproductive tract of the cow. In, *Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography*. Wiley, John Wiley & Sons, pp. 27-34.

- Levalle, O., Lalosa, S., 2015. Implicancias fisiopatológicas del receptor androgénico: Mutaciones, polimorfismos y patologías 52, 79-107.
- Li, A.J., Scoles, D., Armstrong, K., Karlan, B.Y., 2008. Androgen receptor cytosine-adenine-guanine repeat polymorphisms modulate EGFR signaling in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecologic oncology* 109, 220-225.
- Li, M., Schatten, H., Sun, Q.Y., 2009. Androgen receptor's destiny in mammalian oocytes: a new hypothesis†. *Molecular Human Reproduction* 15, 149-154.
- Liebich, H.G., Budras, K.D., 2003. Pelvic cavity and inguinal region, including urinary and genital organs. In, *Bovine Anatomy: An Illustrated Text*. Schluetersche, Germany.
- Longcope, C., 1986. Adrenal and gonadal androgen secretion in normal females. *Clin Endocrinol Metab* 15, 213-228.
- Lozoya Araque, T., Monfort Ortiz, I.R., Martín González, J.E., Jiménez García, A., Navarro Hidalgo, I., Andrade Gamarra, V., Parrell Soler, C., Gil Raga, F., 2020. Ovarian Stromal Hyperplasia: A Rare Cause of Postmenopausal Hyperandrogenism. *J Menopausal Med* 26, 39-43.
- Lutz, L.B., Jamnongjit, M., Yang, W., Jahani, D., Gill, A., Hammes, S.R., 2003. Selective Modulation of Genomic and Nongenomic Androgen Responses by Androgen Receptor Ligands. *Molecular Endocrinology* 17, 1106-1116.
- Makita, M., Miyano, T., 2015. Androgens promote the acquisition of maturation competence in bovine oocytes. *The Journal of reproduction and development* 61, 211-217.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Martinat-Botté, F., Renaud, G., Madec, F., Costiou, P., Terqui, M., 1998. Le cycle oestral. In, *Echographie et reproduction chez la truie: Bases et applications pratiques*. Quae, p. 105.
- Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M., Eppig, J.J., 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296, 2178-2180.
- Mauleon, P., 1969. Oogenesis and Folliculogenesis In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (Eds.), *Reproduction in Domestic Animals 2 Ed Academic Press*, pp. 187-215.
- McGee, E.A., Hsueh, A.J., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21, 200-214.
- Mehlmann, L.M., 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130, 791-799.
- Meredith, M., 1995. *Animal Breeding and Infertility*. Wiley.
- Meyer, C., Denis, J.P., 1999. reproduction. In, *Élevage de la vache laitière en zone tropicale*. Quae, pp. 129-150.
- Mihm, M., Crowe, M., Knight, P., Austin, E., 2002. Follicle Wave Growth in Cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 191-200.
- Monniaux, D., Caraty, A., Clement, F., Dalbiès-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gérard, N., Mermillod, P., Monget, P., Uzbekova, S., 2009. Développement folliculaire ovarien chez les mammifères. *Inra Prod Anim* 22, 59-76.
- Morel, M.C.G.D., 2008. control of reproduction in the Mare In, *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 3Éd CABI.
- Murayama, C., Miyazaki, H., Miyamoto, A., Shimizu, T., 2012. Luteinizing hormone (LH) regulates production of androstenedione and progesterone via control of histone acetylation of StAR and CYP17 promoters in ovarian theca cells. *Molecular and cellular endocrinology* 350, 1-9.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80, 1-29.

- O'Malley, B.W., Tsai, M.J., 1992. Molecular Pathways of Steroid Receptor Action. *Biology of Reproduction* 46, 163-167.
- Omura, T., Morohashi, K., 1995. Gene Regulation of Steroidogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 53, 19-25.
- Palma, G.A., Argañaraz, M.E., Barrera, A.D., Rodler, D., Mutto, A.Á., Sinowatz, F., 2012. Biology and Biotechnology of Follicle Development. *The Scientific World Journal* 2012, 938138.
- Pappalardo, M.A., Russo, G.T., Pedone, A., Pizzo, A., Borrielli, I., Stabile, G., Arsenio, A.C., Amato, A., Calvani, M., Cucinotta, D., Trimarchi, F., Benvenega, S., 2010. Very high frequency of the polymorphism for the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) at codon 972 (glycine972arginine) in Southern Italian women with polycystic ovary syndrome. *Horm Metab Res* 42, 575-584.
- Pappalardo, M.A., Vita, R., Di Bari, F., Le Donne, M., Trimarchi, F., Benvenega, S., 2017. Gly972Arg of IRS-1 and Lys121Gln of PC-1 polymorphisms act in opposite way in polycystic ovary syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation* 40, 367-376.
- Pérez-Martínez, C., Durán-Navarrete, A.J., García-Fernández, R.A., Espinosa-Alvarez, J., Escudero Diez, A., García-Iglesias, M.J., 2004. Biological characterization of ovarian granulosa cell tumours of slaughtered cattle: assessment of cell proliferation and oestrogen receptors. *J Comp Pathol* 130, 117-123.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R., 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 145, 27-37.
- Poujol, N., Sultan, C., 2012. Action moléculaire des androgènes et relation structure-fonction du récepteur des androgènes. *médecine/sciences* 16, 793.
- Priedkalns, J., Leiser, R., 2006. Female reproductive system In, *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*, . Wiley, p. 405.
- Prizant, H., Gleicher, N., Sen, A., 2014. Androgen actions in the ovary: balance is key. *J Endocrinol* 222, 141-151.
- Quigley, C.A., De Bellis, A., Marschke, K.B., el-Awady, M.K., Wilson, E.M., French, F.S., 1995. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine reviews* 16, 271-321.
- Raju, G.A.R., Chavan, R., Deenadayal, M., Gunasheela, D., Gutgutia, R., Haripriya, G., Govindarajan, M., Patel, N., Patki, A., 2013. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *Journal of human reproductive sciences* 6, 227-234.
- Reece, W.O., Rowe, E.W., 2017. Female reproduction in mammals In, *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. Wiley, pp. 609-653.
- Rice, S., Ojha, K., Whitehead, S., Mason, H., 2007. Stage-specific expression of androgen receptor, follicle-stimulating hormone receptor, and anti-Müllerian hormone type II receptor in single, isolated, human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1034-1040.
- Roche, J.F., 1996. Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Rev Reprod* 1, 19-27.
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., Glass, C.K., 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20, 1405-1428.
- Salvetti, N.R., Alfaro, N.S., Velázquez, M.M., Amweg, A.N., Matiller, V., Díaz, P.U., Ortega, H.H., 2012. Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *Reproduction* 144, 723-735.
- Sauveroche, B., Wagner, H.G., 1993. Le cycle sexuel. In, *Physiologie de la reproduction des bovins trypanotolérants : synthèse des connaissances actuelles*

- Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- Schüring, A.N., Welp, A., Gromoll, J., Zitzmann, M., Sonntag, B., Nieschlag, E., Greb, R.R., Kiesel, L., 2012. Role of the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 120, 73-79.
- Sen, A., Prizant, H., Light, A., Biswas, A., Hayes, E., Lee, H.J., Barad, D., Gleicher, N., Hammes, S.R., 2014. Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 3008-3013.
- Sherwood, L., Klandorf, H., Yancey, P., Cornec, J.P., 2016. Systèmes reproducteurs In, *Physiologie animale. De Boeck supérieur*.
- Siddiqui, H.U.R., Ahmad, A., Khan, M.Z., 2005. Biometrical studies of testes of ram. *Short Communication. J. Agri. Soc. Sci* 1, 78-79.
- Simanainen, U., Brogley, M., Gao, Y., Jimenez, M., Harwood, D.T., Handelsman, D.J., Robins, D.M., 2011. Length of the human androgen receptor glutamine tract determines androgen sensitivity in vivo. *Molecular and cellular endocrinology* 342, 81-86.
- Sirois, J., Fortune, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 39, 308-317.
- Szóttys, M., Slomczynska, M., 2000. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 108, 228-234.
- Tajima, K., Orisaka, M., Mori, T., Kotsuji, F., 2007. Ovarian theca cells in follicular function. *Reprod Biomed Online* 15, 591-609.
- Thatcher, W.W., Drost, M., Savio, J.D., Macmillan, K.L., Entwistle, K.W., Schmitt, E.J., De la Sota, R.L., Morris, G.R., 1993. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim Reprod Sci* 33, 27-49.
- Thun, R., Janett, F., 2007. background to reproductive problems in cattle and sheep In, *Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control*
- CABI, p. 309.
- TIMOTHY J. EVANS, GHEORGHE M. CONSTANTINESCU, GANJAM, V.K., 2006. *Clinical Reproductive Anatomy and Physiology of the Mare*. In, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology - E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Vegetti, W., Alagna, F., 2006. FSH and folliculogenesis: From physiology to ovarian stimulation. *Reproductive biomedicine online* 12, 684-694.
- Walters, K.A., 2015. Role of androgens in normal and pathological ovarian function. *Reproduction* 149, 193-218.
- Walters, K.A., Allan, C.M., Handelsman, D.J., 2008. Androgen Actions and the Ovary. *Biology of Reproduction* 78, 380-389.
- Walters, K.A., Handelsman, D.J., 2018. Role of androgens in the ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 465, 36-47.
- Webb, R., Gong, J.G., Law, A.S., Rusbridge, S.M., 1992. Control of ovarian function in cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 45, 141-156.
- Weller, M.M.D.C.A., Fortes, M.R.S., Marcondes, M.I., Rotta, P.P., Gionbeli, T.R.S., Valadares Filho, S.C., Campos, M.M., Silva, F.F., Silva, W., Moore, S., Guimarães, S.E.F., 2016. Effect of maternal nutrition and days of gestation on pituitary gland and gonadal gene expression in cattle. *Journal of Dairy Science* 99.
- Wilkinson, G.T., 2013. obstetrical and paediatric Nursing. In, *Jones's Animal Nursing, Vol. 832*. Elsevier Science, pp. 761-790

- Wiltbank, M.C., Souza, A.H., Carvalho, P.D., Cunha, A.P., Giordano, J.O., Fricke, P.M., Baez, G.M., Diskin, M., 2014. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. *Animal : an international journal of animal bioscience* 8, 1-12.
- Xie, S., Zhang, Q., Hao, J., Fu, J., Li, Y., 2020. MiR-423-5p may regulate ovarian response to ovulation induction via CSF1. *Reproductive Biology and Endocrinology* 18, 01-11.
- Yang, M., Li, J., An, Y., Zhang, S., 2015. Effects of androgen on immunohistochemical localization of androgen receptor and Connexin 43 in mouse ovary. *Tissue and Cell* 47, 526-532.
- Yang, M.Y., Fortune, J.E., 2006. Testosterone Stimulates the Primary to Secondary Follicle Transition in Bovine Follicles In Vitro. *Biology of Reproduction* 75, 924-932, 929.
- Zhou, J., Peng, X., Mei, S., 2019. Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. *International journal of biological sciences* 15, 726-737.
- Zhu, H., Zhu, X., Zheng, L., Hu, X., Sun, L., Zhu, X., 2017. The role of the androgen receptor in ovarian cancer carcinogenesis and its clinical implications. *Oncotarget* 8, 29395-29405.

Annexes

Short communication

Androgen receptor mRNA expression in the bovine ovary

J.H. Hampton^a, M. Manikkam^a, D.B. Lubahn^b, M.F. Smith^a, H.A. Garverick^{a,*}

^a Department of Animal Sciences, 163 Animal Science Research Center, University of Missouri, East Campus Dr., Columbia MO 65211, USA

^b Department of Biochemistry, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA

Received 21 November 2003; accepted 19 January 2004

Abstract

Previous studies have shown that androgen receptor (AR) is expressed in granulosa cells of healthy, growing ovarian follicles in rats and primates. However, AR expression in the bovine ovary has not been examined. Therefore, a 346-base pair segment of the bovine AR was cloned and sequenced. Using a ribonuclease protection assay, AR expression was detected in total RNA from bovine ovarian cortex. Expression (absence or presence) of AR mRNA was detected by in situ hybridization in bovine ovarian cortex. Follicles ($n = 32$) were classified as follows: type 1 (1 layer of flattened granulosa cells), type 2 (1–1.5 layers of cuboidal granulosa cells), type 3 (2–3 layers of granulosa cells), type 4 (4–6 layers of cuboidal granulosa cells and formation of thecal layer), and type 5 (>6 layers of cuboidal granulosa cells, defined theca layer, and antrum formation). Frequency of AR mRNA expression increased ($P < 0.001$) as follicles entered the growing pool. Expression of AR mRNA was absent in type 1 follicles ($n = 8$), but present in the granulosa cells of 41% of type 2 follicles ($n = 12$). In types 3–5 follicles, AR mRNA expression was present in granulosa cells of 100% of follicles examined ($n = 4, 4, \text{ and } 4$, respectively) and was greater than type 1 follicles ($P = 0.002$). These data provide evidence of AR mRNA expression in bovine follicles and suggest that AR mRNA increases during early follicle development.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Androgen receptor; Bovine ovary; AR mRNA expression

—Original Article—

Androgens promote the acquisition of maturation competence in bovine oocytes

Miho MAKITA¹⁾ and Takashi MIYANO¹⁾

¹⁾Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan

Abstract. Recent studies in mice suggest that androgens are important for normal follicle development. However, there have been few reports concerning the action of androgens in the growth of oocytes from large animals. The purpose of this study was to determine the roles of androgens in bovine oocyte growth *in vitro*. Oocyte-granulosa cell complexes (OGCs) collected from 0.4–0.7 mm early antral follicles were cultured for 14 days with 17 β -estradiol (E₂) and a non-aromatizable androgen, dihydrotestosterone (DHT). We also examined the ability of an androgen receptor (AR) inhibitor, hydroxyflutamide, to antagonize the effect of androgens on the oocytes. During growth culture, the OGC structures collapsed in the medium with DHT alone, while in the presence of E₂, the OGC structures were maintained. In the medium with both androgens and E₂, the mean diameter of oocytes was increased from 95 μ m to around 120 μ m, larger than those grown with E₂ alone (115 μ m). Also in the maturation culture, oocytes grown with androgens (A₄ or DHT) and E₂ showed higher percentages of metaphase II oocytes (63% or 69%, respectively) than those grown with E₂ alone (32%). Moreover, these maturation rates were decreased by hydroxyflutamide in a dose-dependent manner. Immunostaining showed that ARs were expressed in oocytes and granulosa cells in early antral follicles, and the nuclei of granulosa cells showed intense AR expression. In conclusion, although E₂ supports the OGC structure, additional androgens promote oocyte growth and their acquisition of meiotic competence via AR during *in vitro* growth culture.

Key words: Androgen, Cow, Oocyte growth, Oocyte maturation

(J. Reprod. Dev. 61: 211–217, 2015)

Testosterone Stimulates the Primary to Secondary Follicle Transition in Bovine Follicles In Vitro¹

M.Y. Yang and J.E. Fortune²

Department of Biomedical Sciences, Cornell University, Ithaca, New York 14853

ABSTRACT

The mechanisms controlling the initiation and early stages of follicular growth are poorly understood. Our laboratory developed a serum-free culture system that supports spontaneous and wholesale activation of primordial follicles in pieces of cortex dissected from the ovaries of fetal calves and fetal baboons. However, very few follicles activated in vitro progressed to the secondary stage. To determine whether androgens can promote the primary to secondary follicle transition, pieces of fetal bovine ovarian cortex were cultured in serum-free medium in the absence or presence of testosterone (T, 10^{-7} and 10^{-6} M) or estradiol (E_2 , 10^{-6} M) for 10 days. Cortical pieces were then fixed and embedded in plastic for serial sectioning and morphometric analysis; fresh cortical pieces fixed on Day 0 served as uncultured controls. Freshly isolated cortical pieces contained mostly primordial follicles, whereas after 10 days in vitro, most primordial follicles had activated, differentiating into primary follicles as expected. Neither T nor E_2 affected the number of primordial and primary follicles compared with controls ($P > 0.05$). However, T (10^{-7} and 10^{-6} M) increased the number of secondary follicles ($P < 0.05$), whereas E_2 had no effect, suggesting that the effect of T was not due to conversion of T to E_2 . In the second experiment, the optimal concentration of T for preantral follicle growth was determined. A range of lower doses of T (10^{-10} – 10^{-7} M)

increased the number of secondary follicles in cultured cortical pieces in a dose-dependent manner, with 10^{-7} M T being the most effective ($P < 0.05$). In the third experiment, addition of a specific androgen receptor blocker, flutamide, inhibited the stimulatory effects of T on the primary to secondary follicle transition ($P < 0.05$), suggesting a receptor-mediated action of T. Localization of androgen receptors by immunohistochemistry revealed immunostaining for the androgen receptor in ovarian stromal cells and increasing immunoreactivity in follicle cells as follicular development progressed from primordial and primary to secondary to antral follicles, suggesting the involvement of the androgen receptor in bovine folliculogenesis. In summary, our results show that T promotes the growth of bovine follicles activated in vitro and suggest that its stimulatory effect is mediated through androgen receptors in the stroma and/or follicular cells.

Oestrogen receptor α and β , androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep

Jennifer L Juengel, Derek A Heath, Laurel D Quirke and Kenneth P McNatty

AgResearch, Wallaceville Animal Research Centre, Ward Street, PO Box 40063, Upper Hutt, New Zealand

Correspondence should be addressed to J Juengel; Email: jenny.juengel@agresearch.co.nz

Abstract

A first step to elucidating the roles that steroids may play in the processes of ovarian development and early follicular growth is to identify the cell types that are likely to be receptive to steroids. Thus, cell types expressing receptors for oestrogen (α and β form; ER α and ER β respectively), androgen (AR) and progesterone (PR) were determined by *in situ* hybridisation and immunohistochemistry in ovine ovarian tissues collected during ovarian development and follicular formation (days 26–75 of fetal life) as well as during the early stages of follicular growth. Expression of ER β was observed early during ovarian development and continued to be expressed throughout follicular formation and also during the early stages of follicular growth. ER β was identified in germ cells as well as in the granulosa cells. At the large pre-antral stage of follicular growth, expression of ER α was also consistently observed in granulosa cells. AR was first consistently observed at day 55 of fetal life in stroma cells throughout the ovary. Within the follicle, expression was observed in granulosa and thecal cells from the type-2 to -3 stage of follicular growth. PR mRNA did not appear to be expressed during ovarian development (days 26–75 of gestation). However, PR (mRNA and protein) was observed in the theca of type-3 (small pre-antral) and larger follicles, with mRNA – but not protein – observed in granulosa cells of some type-4 and 5 follicles. Expression of ER β , ER α and AR, as well as PR, was also observed in the surface epithelium and ovarian stroma of the fetal, neonatal and adult ovary. Thus, in sheep, steroid hormones have the potential to regulate the function of a number of different ovarian cell types during development, follicular formation and early follicular growth.

Reproduction (2006) 131 81–92.

Chapter 4

**IMMUNOLocalIZATION OF ANDROGEN RECEPTOR
IN THE OVARY OF THE BEDOUIN GOAT
(*CAPRA HIRCUS*) IN NON-BREEDING SEASON**

*S. Kassouri¹, N. Boukenaoui^{1,2}, S. Charallah¹,
Z. Amirat¹ and F. Khammar¹*

¹University of Sciences and Technology Houari Boumediene, Faculty of Biological Sciences, Laboratory of Research on Arid Zones, BP 44, Alger Gare, Algiers, Algeria

²University Saad Dahlab Blida, Faculty of Agro-Veterinary Sciences, Department of Veterinary Sciences, BP 270, Road Soumaa Blida, Algeria

ABSTRACT

The role of androgens on the growth and follicular development (by their direct action via their specific receptors, or indirectly by the estrogens), is the subject of many studies in mammals. However, very few works treat androgen localization in ovaries of ruminants living in arid regions. The aim of this study was to determine the androgen receptor localization, by immunohistochemical technique, in the ovaries of the bedouin goat (*Capra hircus*) in the non-breeding season. Ovaries obtained from the mature female goat during the sexual quiescence period (spring), were removed and then immediately fixed in Bouin's solution. After paraffin embedding, sections were realized and used for immunohistochemistry analysis using a polyclonal antibody androgen receptor. At non breeding season, the results obtained showed that androgen receptors: 1/ were detected in different compartments of the ovary and in various stages of follicles; 2/ their localization is essentially nuclear in granulosa, theca and stroma cells; their cytoplasm also exhibited a weak positive immunostaining; 3/ extern theca cells were completely deprived of immunoreactivity; 4/ the immunostaining was more intense at preovulatory stage and 5/ in atretic follicle, the theca intern cells lose the expression of androgen receptor. These findings suggested that in the non-breeding season androgens presented important activities in the regulation of growth and follicular development as it was reported in other species of mammals like the rat, the squirrel, the woman and primates. The present study contributes to a better knowledge of the physiology of the reproduction of this species, thus allowing in the longer term to better plan its reproduction, to increase its productivity and to put conservation strategy for this race living in arid lands.

Complimentary Contributor Copy

Effects of androgen on immunohistochemical localization of androgen receptor and Connexin 43 in mouse ovary

Mei Yang, Jianhua Li, Yulin An, Shuiwen Zhang*

Center of Reproductive Medicine and Genetics, General Hospital of Beijing Army, 5 Nanmenchang, Dongcheng District, Beijing 100700, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2015

Received in revised form 11 June 2015

Accepted 28 June 2015

Available online xxx

Keywords:

Androgen

Androgen receptor

Connexin 43

Ovary

ABSTRACT

Androgens have essential roles in the regulation of follicular development and female fertility. Androgen excess is the leading defect in polycystic ovary syndrome (PCOS) patients and involved in the ovarian dysfunction. The aim of this study was to elucidate the regulatory role of androgen in the follicular development of female mouse. Immunohistochemical staining and Western blot analyses were performed to detect androgen receptor (AR) and Connexin 43 (Cx43) expression in ovaries from both control and testosterone-treated group mice. In this study, localizations of AR and Cx43 were dramatically altered in testosterone-treated mouse ovaries. In addition, AR expression was significantly increased, whereas Cx43 expression was markedly decreased after testosterone treatment. Alterations of AR and Cx43 expression by testosterone with concomitant reduction of MII oocytes. Overall, these results suggest the involvement of androgen in the regulation of AR and Cx43 localizations in mouse ovary. Alterations of AR and Cx43 expression by testosterone may affect normal folliculogenesis. Together these findings will enable us to begin understanding the important roles of AR and Cx43 actions in the regulation of follicular development, as well as providing insights into the role of AR and Cx43 actions in the androgen-associated reproductive diseases such as PCOS.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts

Natalia R Salvetti^{1,2}, Natalia S Alfaro¹, Melisa M L Velázquez^{1,2}, Ayelen N Amweg^{1,2},
Valentina Matiller¹, Pablo U Díaz^{1,2} and Hugo H Ortega^{1,2}

¹Morphological Sciences Department, Faculty of Veterinary Sciences, National University of Litoral (FCV-UNL), R.P. Kreder 2805, 3080 Esperanza, Santa Fe, Argentina and ²Argentine National Research Council (CONICET), Buenos Aires, Argentina

Correspondence should be addressed to H H Ortega at Morphological Sciences Department, Faculty of Veterinary Sciences, National University of Litoral (FCV-UNL); Email: hhortega@fcv.unl.edu.ar

N R Salvetti and N S Alfaro contributed equally to this work

Abstract

Cystic ovarian disease (COD) is an important cause of infertility in cattle. The altered follicular dynamics and cellular differentiation observed in COD may be mediated through a disruption of the expression of steroid receptors and their associated transcriptional cofactors. The aim of this study was to determine the protein expression profiles of ESR1, ESR2, PGR, AR, NCOA3, NCOR2, and PHB2 (REA) in ovarian follicles in an experimental model of COD induced by the administration of ACTH. Ovaries were collected and follicles were dissected from heifers during the follicular phase (control) or from heifers treated with ACTH to induce the formation of ovarian follicular cysts. Ovaries were fixed, sectioned, and stained immunohistochemically for steroid receptors and the associated transcription factors. The relative expression of ESR1 was similar in follicular cysts and in tertiary follicles from both control and cystic cows and was significantly higher than in secondary follicles. The expression of ESR2 in the granulosa was higher in cystic follicles. No differences were seen for PGR. The expression of androgen receptor was significantly increased in tertiary follicles with lower immunostaining in cysts. The expression of NCOA3 was observed in the granulosa and theca with a significantly increased expression in the theca interna of cystic follicles. The highest levels of NCOR2 expression in granulosa, theca interna, and theca externa were observed in cysts. In granulosa cells, NCOR2 levels increase progressively as follicles mature and the treatment had no effect. In summary, ovaries from animals with induced COD exhibited altered steroid receptor expression compared with normal animals, as well as changes in the expression of their regulators. It is reasonable to suggest that in conditions characterized by altered ovulation and follicular persistence, such as COD, changes in the intra-ovarian expression of these proteins could play a role in their pathogenesis.

Reproduction (2012) **144** 723–735

Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles

M. Szoltys, M. Słomczyńska

Laboratory of Animal Endocrinology and Tissue Culture, Department of Animal Physiology, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Cracow, Poland

Key words: Androgen receptors, developing follicles, COCs

Summary: Sequential changes in androgen receptor (AR) distribution were investigated in rat ovarian follicles during their physiological development.

Mature female Wistar rats, exhibiting a regular 4-day oestrous cycle, were killed in succession on the day of oestrus, metoestrus, dioestrus, and pro-oestrus. Excised ovaries were submitted to immunohistochemical procedure in which polyclonal androgen receptor antibody, avidin-biotin-peroxidase complex, and DAB were used. Strong AR immunostaining was located predominantly in the nuclei of the granulosa layer of preantral and very early antral follicles, present in the ovaries at all stages of the oestrous cycle. At early oestrus a decline in AR was noted in the mural granulosa cells of presumably recruited early antral follicles. The

decline involved the area of appearing pseudostratification. During metoestrus and dioestrus AR decline proceeded towards the antrum, but the antral regions connected with COC by strings of granulosa cells or lying in close proximity to COC were always strongly AR-positive. It was only on the day of pro-oestrus that AR was confined to COCs and a few antral cells bordering the antrum. These findings indicate that during the oestrous cycle AR decline starts in the mural granulosa cells of oestrous antral follicles beginning to differentiate and is completed at pro-oestrus, but even before ovulation it does not extend to COC. The persistence of AR immunostaining in the latter region suggests that androgens can play here a paracrine role especially before ovulation. Atretic follicles showed a different pattern of AR distribution, dependent on their stage of development and the advancement of this process.

Stage-Specific Expression of Androgen Receptor, Follicle-Stimulating Hormone Receptor, and Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor in Single, Isolated, Human Preantral Follicles: Relevance to Polycystic Ovaries

Suman Rice, Kamal Ojha, Saffron Whitehead, and Helen Mason

Basic Medical Sciences (S.R., S.W., H.M.), Clinical Development Sciences (S.R., H.M.), and Department of Obstetrics and Gynaecology (K.O.), St. George's, University of London, London SW17 0RE, United Kingdom

Context: Recent evidence indicates that the increase in follicle numbers seen in polycystic ovary syndrome occurs early in folliculogenesis, with androgens being a likely causative candidate. In primates and sheep, androgen excess *in utero* results in ovarian changes similar to those in polycystic ovary syndrome. There is also increasing interest in the role of anti-Müllerian hormone (AMH) in early folliculogenesis because AMH knockout mice have an early depletion of their stock of primordial follicles. Initiation and early folliculogenesis may therefore be under negative control by AMH and positive control by androgens.

Objective: Because AMH signals exclusively through its type II receptor (AMHRII), the aim of this study was to determine and colocalize the stage-specific expression of AMHRII, androgen receptor (AR), and FSH receptor (FSHR) mRNA in individual, well-characterized preantral follicles.

Method: Follicles were isolated from human ovarian cortex obtained from either oophorectomies or cortical biopsies at cesarean section. Expression of AR, FSHR, and AMHRII mRNA was determined using a nested RT-PCR protocol.

Results: AR mRNA was not detected in any primordial follicles but was from the transitional stage onward. The number of AR-positive follicles increased at each progressive growth stage. The expression of AR preceded that of FSHR, and only a small percentage of primary follicles expressed FSHR. AMHRII expression was rarely detected.

Conclusions: This is the first study to identify the expression of AR in human transitional follicles. Results suggest a role for androgens in promoting early follicle growth and challenging the hypothesis that AMH exerts a direct, inhibitory effect on follicles at this stage. (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 1034–1040, 2007)

The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue

RJ Edmondson^{*1,2}, JM Monaghan² and BR Davies¹

¹Department of Surgery, University of Newcastle upon Tyne, Medical School, Framlington Place, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK; ²Northern Gynaecological Oncology Centre, Queen Elizabeth Hospital, Gateshead, Tyne and Wear NE9 6SX, UK

The pathogenesis of epithelial ovarian cancer remains unclear. From epidemiological studies raised levels of androgens have been implicated to increase the risk of developing the disease. The purpose of this study was to determine the responses of normal human ovarian surface epithelium to androgens. We have established primary cultures of human ovarian surface epithelium from patients undergoing oophorectomy for benign disease. Total RNA was isolated from these cultures and expression of mRNA encoding for the androgen receptor was demonstrated using reverse transcriptase polymerase chain reaction. The presence of androgen receptor in sections of normal ovary was also investigated using an antibody against androgen receptor. The effects of androgens on DNA synthesis and cell death were determined. Eight out of eight (100%) cultures expressed mRNA encoding the androgen receptor. The presence of androgen receptor in ovarian surface epithelium of sections of normal ovaries was demonstrated in all sections. Mibolerone, a synthetic androgen, caused a significant stimulation of DNA synthesis in 5 out of 9 (55%) cultures when used at a concentration of 1 nM. Mibolerone also caused a significant decrease in cell death in 2 out of 5 (40%) cultures tested. We have demonstrated that the ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue and that androgens can cause an increase in proliferation and a decrease in cell death. These findings have important implications for the pathophysiology of ovarian carcinogenesis.

British Journal of Cancer (2002) **86**, 879–885. DOI: 10.1038/sj/bjc/6600154 www.bjcancer.com
© 2002 Cancer Research UK

Keywords: ovarian surface epithelium; epithelial ovarian cancer; androgens; androgen receptor