

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Saad Dahleb Blida 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie et physiologie des organismes



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Master 2
Biologie et physiologie de la reproduction

**Immunolocalisation des récepteurs aux œstrogènes au niveau des
ovaires de vache au cours du cycle œstral**

Présenté par
Bougobba Imene et Benguettaf Zineb Ahlem

Soutenu le : 24 septembre 2020

Devant le jury :

Présidente :	Sayad M.	MCB, FSNV	USDBlida1
Examinatrice :	Zatra Y.	MCB, FSNV	USDBlida1
Promotrice :	Boukenaoui-Ferrouk N.	MCA, ISV	USDBlida1
Co-promoteur :	Ferrouk M.	MCB, ISV	USDBlida1

Année : 2019/2020

Résumé

Dans cette étude, notre objectif est de déterminer la localisation des récepteurs aux œstrogènes au niveau des ovaires de vache au cours du cycle œstral. La méthode utilisée dans notre travail est l'immunohistochimie sur des ovaires de vaches récoltés au niveau des abattoirs. L'analyse des résultats obtenus par différents auteurs chez les bovins montre que des variations d'expression des deux types de récepteurs aux œstrogènes (RE α et RE β) sont observées au niveau des cellules folliculaires (cellules de la granulosa, cellules des thèques interne et externe ainsi que les cellules lutéales du corps jaune), aux niveaux des différents types de follicules (primordial, primaire, secondaire, tertiaire et de De Graff). L'expression de ces récepteurs varie en fonction des phases du cycle (œstrus, metœstrus, diœstrus et proœstrus). En conclusion, les récepteurs RE α et RE β jouent un rôle important dans la croissance folliculaire ovarienne, le développement et l'ovulation. Les RE α sont nécessaires au maintien du corps jaune et les RE β à la lutéolyse.

Mots clés : Récepteurs aux œstrogènes α , Récepteurs aux œstrogènes β , ovaire, bovin, Immunolocalisation

Abstract

In this study, our objective was to determine the location of estrogen receptors in cow ovaries during the estrous cycle. The method used in our work is immunohistochemistry on ovaries of cows collected at slaughterhouse. Analysis of results obtained by various authors in cattle showed that variations in the expression of the two types of estrogen receptors (RE α and RE β) were observed in follicular cells (granulosa cells, internal and external theca cells, and luteal cells of the corpus luteum), in different types of follicles (primordial, primary, secondary, tertiary and De Graff). The expression of these receptors varied according to the phases of the cycle (estrus, metoestrus, diestrus and proestrus). In conclusion, the RE α and RE β receptors play an important role in ovarian follicular growth, development and ovulation. RE α were necessary for the maintenance of the corpus luteum and RE β for luteolysis.

Keywords: Estrogen receptors α , Estrogen receptors β , ovary, bovine, immunolocalization

ملخص

في هذه الدراسة، هدفنا هو تحديد موقع مستقبلات هرمون الاستروجين في مبيض البقر خلال دورة هرمون الاستروجين. الطريقة المستخدمة في عملنا هي الكيمياء النسيجية المناعية على مبايض البقر التي يتم حصادها من المسالخ. يظهر تحليل النتائج التي حصل عليها مؤلفون مختلفون في الماشية أن الاختلافات في التعبير عن نوعي مستقبلات هرمون الاستروجين (ألفا وبيتا) لوحظت في الخلايا الجريبية (الخلايا الحبيبية وخلايا ثيكا الداخلية والخارجية). وكذلك الخلايا الأصفرية في الجسم الأصفر)، على مستويات الأنواع المختلفة من البصيلات (البدائية، الأولية، الثانوية، الثالثة والناضجة). يختلف التعبير عن هذه المستقبلات وفقاً لمراحل الدورة (الشبق، مرحلة ما بعد الشبق، مرحلة اللاشبق، مرحلة ما قبل الشبق). في الختام، تلعب مستقبلات ألفا وبيتا دوراً مهماً في نمو حويصلات المبيض وتطورها والتبويض. تعد ألفا ضرورية للحفاظ على الجسم الأصفر وبيتا لتحلل الجسم الأصفر .

الكلمات المفتاحية: مستقبلات الأستروجين ألفا، مستقبلات الأستروجين بيتا، المبيض، الأبقار، التنظير المناعي.

Remerciements

Tout d'abord nous remercions Allah notre Dieu de nous avoir donné les efforts pour arriver à ce stade du succès et de nous orienter vers la lumière de la science et du savoir.

*Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus vifs et les plus sincères à notre Promotrice **Madame Boukenaoui-Ferrouk N**, qui a su nous guider et nous aider dans ce travail avec beaucoup de tact et de gentillesse, qu'elle soit aussi remerciée pour sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'elle nous a prodigués, Qu'elle trouve ici notre estime et notre profond respect.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à notre Co-promoteur **Mr Ferrouk M**.*

On tient également à exprimer notre gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail

*Que **Madame Sayad M**, Maitre de conférences **B**, trouve nos plus vifs remerciements pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant la présidence du jury.*

*A **Madame Zatra Y** Maitre de conférences **B** d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

Un merci est adressé à nos enseignants, on tient à leurs exprimer notre reconnaissance pour tout ce qu'ils nous ont donné comme savoir et savoir-faire.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes deux plus belles personnes, mes parents. Tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour vos sacrifices. Je n'aurais pu réussir mes études sans vous. Je tiens ici à vous remercier de m'avoir donné tant d'amour, Grâce à vous j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Puisse Dieu, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

*A mes adorables frères **Bilal et Noufel**. A ma jolie petite sœur Sara, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, vous protège.*

*A ma chère binôme **Imene**. Ma douce sœur qui a eu la patience de me supporter durant ce mémoire, et qui m'a soutenu pendant tous les moments difficiles vécus. Toute mon affection pour ton admirable famille en particulier ta maman.*

*A ma chère tante **wahiba** et son mari **Aissa**. Qui m'ont ouvert la porte de leur maison. Je les remercie de tout ce qu'ils ont fait pour moi durant toutes mes années d'étude.*

*A mes deux grands-mères chéries **Zohra et Zahr-enoujoum** et à mon cher grand-père paternel **Abdelkader**. Que ce modeste travail soit l'expression des vœux que vous avez formulé dans vos prières. Que Dieu vous préserve longue vie et beaucoup de santé.*

*A la mémoire de mon grand-père maternelle **Omar**. Tu es toujours présent dans mon esprit et dans mon cœur. Aussi dans ce moment de joie, tu as toutes mes pensées.*

*A mes très chères **Manel et Sarah**. Vous êtes pour moi des sœurs et des amies. En souvenir de notre sincère amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble, Je vous aime.*

A une personne chère à mon cœur, Tu m'as toujours encouragé, incité à faire de mon mieux, ton soutien m'a permis de réaliser le rêve tant attendu. Je prie dieu de te garder pour moi.

*A mes chers oncles, tantes, leurs époux et épouses et à mes chers cousins et cousines en particulier **Ibtissem, Neila, Tarek, Rayen et Sabri**. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond, et mon affection la plus sincères.*

Zineb

Je dédie ce travail

A mes chers parents. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos sacrifices, bien que je ne vous en acquitte jamais assez. Que dieu vous procure bonne santé et longue vie je vous aime maman et papa.

A ma belle amie, mon binôme dans ce mémoire de recherche, Zineb. Je te remercie pour ton soutien continu, Je suis chanceuse de t'avoir à mes côtés et je souhaite que l'amitié qui nous a réunie persiste pour toujours et que nous arrivons à réaliser nos rêves...

A tous mes agréables frères Youcef, Khaled, Abderrahmane et en particulier à mon petit Joujou. Pour leur appui et leur encouragement. Que Dieu vous garde, et vous protège.

A mes chères amies Rania et Cherifa. En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A ma grand-mère paternelle Houria et mon grand-père maternel Saïd. Qui m'ont accompagné par leurs prières, leurs douceurs, puisse, Dieu les prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.

A toute ma famille. Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

Imene

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Abréviations

Résumé

Partie bibliographique

Introduction	6
Chapitre I : Cycle sexuel de la vache	
I. Anatomie de l'appareil génitale de la vache	2
II. Anatomie de l'ovaire.....	3
III. Cycle sexuel de la vache.....	4
III. 1.Cycle ovarien.....	4
III.1.1. Phase folliculaire	4
III.1.1.1. Follicules ovariens.....	4
III.1.1.2. Folliculogenèse.....	4
III.1.1.3. Dynamique de croissance folliculaire.....	7
III.1.2. Phase lutéale	10
III.1.2.1. Corps jaune	10
III.1.2.2. Lutéolyse	10
III. 2. Cycle œstral	11
III.2.1. Proœstrus	11
III.2.2. Œstrus	11
III.2.3. Metœstrus	12
III.2.4. Dicœstrus.....	12
IV. Régulation hormonale du cycle œstral	12
IV.1. Phase folliculaire	13
IV.2. Phase lutéale.....	13
Chapitre II : Œstrogènes et récepteurs aux œstrogènes	
I. Œstrogènes	14
I.1. Biosynthèse	14
I.2. Rôles des œstrogènes	15

II. Récepteurs aux œstrogènes	15
II.1. Domaines de récepteurs aux œstrogènes	15
II.2. Rôle des récepteurs	16
II.2.1. Récepteurs aux œstrogènes α	16
II.2.2. Récepteurs aux œstrogènes β	16
II.3. Mécanisme d'action de récepteurs œstrogènes.....	17

Partie expérimentale

Matériel et méthode

I. Matériel animal	18
II. Méthodes utilisées.....	19
II.1. Technique d'immunohistochimie	19
II.1.1. Protocole de la technique d'histologie	20
II.1.1.1. Fixation	20
II.1.1.2. Inclusion.....	20
II.1.1.3. Confection des blocs de paraffine	21
II.1.1.4. Réalisation et étalement des coupes.....	22
II.1.2. Protocole de la technique d'immunohistochimie.....	23
II.1.2.1. Principe	23
II.1.2.2. Protocole d'immunohistochimie	23
II.2. Contrôle de la validité de la technique d'immunohistochimie	25

Résultats et discussion

I. Stade du cycle et type de follicule.....	27
I.1. Stade du cycle œstral.....	27
I.2. Type de follicule.....	28
II. Localisation tissulaire	30
II.1. Cellules folliculaires	30
III.1.1. Cellules de la thèque interne et externe.....	30
III.1.2. Cellules de la granulosa.....	32
II.2. Cellules lutéales	33
II.3. Cellules du stroma ovarien.....	35
Conclusion	36
Références bibliographies	37

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades	6
Tableau 2: Classification des corps jaunes au cours du cycle œstral des vaches	19
Tableau 3: Synthèse des articles scientifiques	26

Liste des figures

Figure 1 : Localisation de l'appareil génital de la vache	2
Figure 2: Représentation schématique de l'appareil génital de la vache	2
Figure 3 : Représentation schématique des structures ovariennes de la vache	3
Figure 4: Représentation schématique de différents stades de développement folliculaire ovarien chez la vache	5
Figure 5 : Dynamique folliculaire des cycle œstraux à 2 vagues et à 3 vagues chez les bovins	7
Figure 6 : Événements cellulaires ovariens du cycle œstral de la vache	8
Figure 7 : Mécanisme d'ovulation	9
Figure 8: Mécanisme de lutéolyse.....	10
Figure 9: Représentation schématique des différentes phases du cycle œstral chez la vache .	11
Figure 10: Représentation schématique des interrelations de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique	12
Figure 11 : Modifications relatives des concentrations circulantes LH, FSH, E2 et P4 pendant le cycle œstral chez la vache	13
Figure 12: Schéma de biosynthèse des œstrogènes	14
Figure 13: Représentation schématique des récepteurs aux œstrogènes α et β	16
Figure 14: Représentation schématique du domaine C : domaine de liaison à l'ADN des récepteurs aux œstrogènes.....	16
Figure 15: Modèle simplifié de mécanisme d'action des œstrogènes.....	17
Figure 16: Appareil génital de la vache	18
Figure 17: Ovaire de vache	18
Figure 18: Prélèvement ovarien dans une cassette d'histologie.....	20
Figure 19: Mise en place centrée du prélèvement ovarien dans le moule métallique.....	21
Figure 20 : Remplissage du moule métallique par la paraffine liquide	21
Figure 21 : Mise en place de l'ensemble moule- cassette sur un bain de glace.....	21
Figure 22: Microtome	22
Figure 23 : Bain marie.....	22

Figure 24 : Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie.	23
Figure 25 : Montage de la coupe histologique ; liquide de montage « Eukitt »	24
Figure 26 : Microscope photonique.	25
Figure 27: Pourcentage de noyaux positifs pour les récepteurs aux œstrogènes	28
Figure 28 : Micrographies de différents types de cellules ovariennes bovines à différents stades du cycle œstral.	29
Figure 29 : Coloration immunohistochimique pour la protéine RE β dans les follicules ovariens bovins.	30
Figure 30 : Localisation immunohistochimique des RE α dans follicule secondaire l'ovaire bovin.	31
Figure 31 : Photomicrographies représentatives de l'expression des RE α dans le follicule dominant.	31
Figure 32: Localisation immunohistochimique de RE α dans le follicule primaire de l'ovaire bovin.	32
Figure 33: Intensités moyennes de coloration pour RE α dans les cellules folliculaires du follicule dominant chez les bovins	33
Figure 34 : Immunolocalisation de RE β dans le corps jaune bovin tout au long du cycle œstral.	34
Figure 35 : Immunolocalisation de RE α dans le corps jaune bovin tout au long du cycle œstral.	34
Figure 36 : Localisation immunohistochimique des RE α dans le stroma ovarien et contrôle négatif dans l'ovaire bovin dans lequel un sérum non-immun est utilisé à la place de anticorps primaire	35

Liste des abréviations

CG : Cellule de granulosa

CGa : Cellules de granulosa antrale

CGm : Cellules de granulosa murale

CJ : Corps jaune

E2 : Œstrogènes

FD : Follicule dominant

FSH: Follicle Stimulating Hormone

GnRH: Gonadotropin releasing hormone

IHC : Immunohistochimie

LH : Luteinizing Hormone

P4 : Progestérone

RE α : Récepteur aux œstrogènes α

RE β : Récepteur aux œstrogènes β

TE : Thèque externe

TI : Thèque interne

Introduction

Chez les mammifères, la fonction de l'ovaire est de produire à chaque ovulation un ou plusieurs ovocytes fécondables et de créer un environnement hormonal propice au démarrage d'une éventuelle gestation. Au sein de l'ovaire bovin, il se déroule deux processus de développement étroitement imbriqués, l'ovogenèse et la folliculogenèse (Monniaux et *al.*, 2009).

Les hormones produites par l'hypophyse circulent dans le sang pour atteindre l'ovaire où elles dirigent la croissance folliculaire avant l'ovulation du follicule dominant (Parish, 2016). Lorsque le follicule dominant est présent, une production asymétrique d'estrogènes (E2) peut être indiquée (Gronemeyer et Laudet, 1995), par conséquent, ces derniers exercent une grande variété d'effets sur la croissance, la différenciation et le fonctionnement de nombreux organes, y compris l'ovaire (Baulieu, 1975). Pour exercer leurs fonctions, les E2 ont une affinité et une spécificité élevée dans les cellules cibles en se liant à des protéines spécifiques de liaison intracytoplasmique ou intranucléaire, les récepteurs des œstrogènes (RE) (Gronemeyer et Laudet, 1995). Chez de nombreuses espèces particulièrement les bovins, deux sous-types de RE ont été démontrés, à savoir les récepteurs aux œstrogènes α (RE α) et récepteur aux œstrogènes β (RE β) (Heard et *al.*, 2000). Un troisième type de récepteur d'œstrogène RE γ a été détecté chez la souris (Lorke et *al.*, 2000) et chez l'homme (Heard et *al.*, 2000).

Cette étude a pour but de déterminer par l'immunohistochimie la localisation tissulaire des RE dans les différentes cellules de l'ovaire bovin au cours des différents stades du cycle œstral.

Notre travail est divisé en deux parties :

- Une partie bibliographique qui repose en premier lieu sur le cycle sexuel de la vache et en second lieu sur les hormones femelle et les mécanismes physiologiques des RE au cours du cycle œstral bovin.
- Une partie expérimentale qui consiste à utiliser la technique d'immunohistochimie pour déterminer la localisation des RE dans l'ovaire bovin au cours du cycle œstral. En raison de la situation sanitaire actuelle causée par le Covid-19, cette partie n'a pas été réalisée. Les résultats attendus sont présentés à partir d'une synthèse des travaux réalisés uniquement chez bovins et traitant de la localisation des RE au niveau uniquement ovarien.

Partie

bibliographique

Chapitre I :

Cycle sexuel de la vache

I. Anatomie de l'appareil génital de la vache

Chez la vache l'appareil génital, localisé dans la cavité pelvienne, est composé de la vulve, du vagin, du col de l'utérus, de l'utérus, de l'oviducte, des ovaires et des structures de soutien (Reece, 2004) (Figures 1 et 2) :

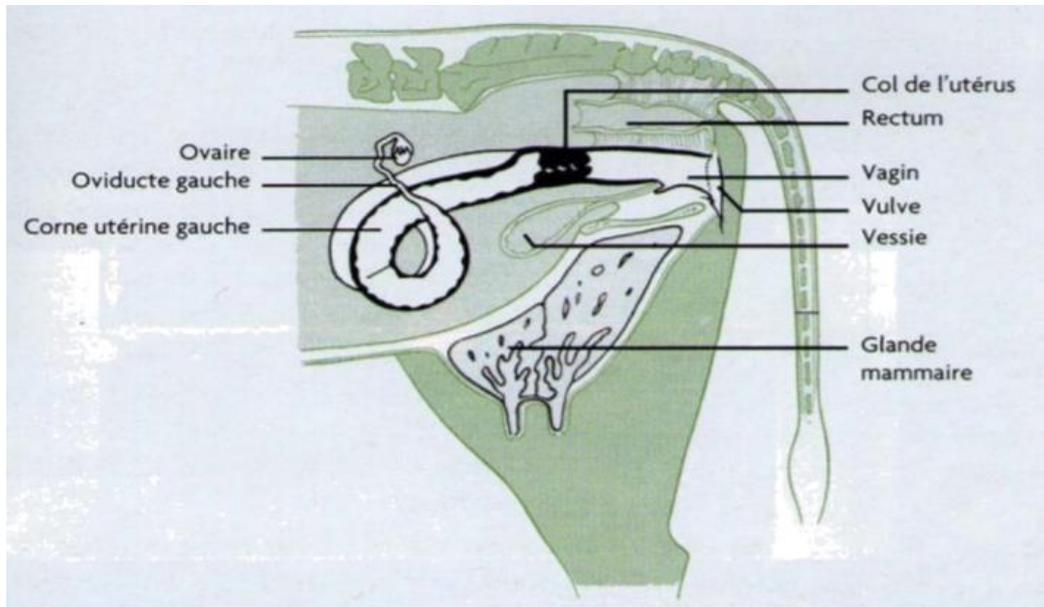


Figure 1 : Localisation de l'appareil génital de la vache (Gourreau et Bendali, 2008)

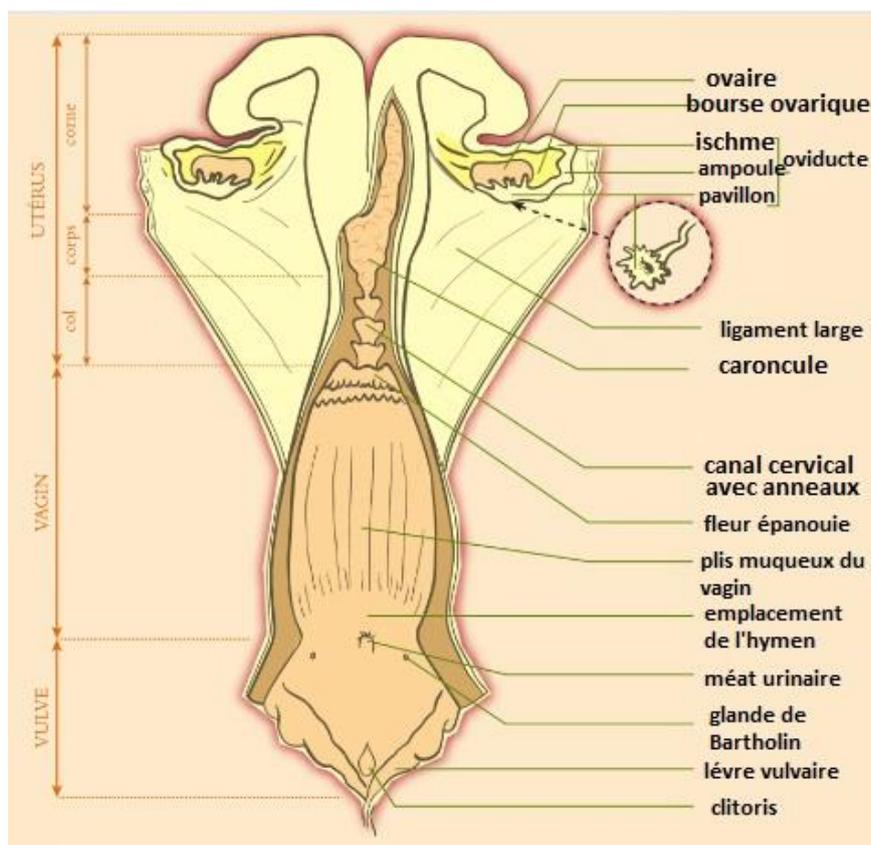


Figure 2: Représentation schématique de l'appareil génital de la vache (Laborgne et *al.*, 2014)

II. Anatomie de l'ovaire

L'**ovaire** est le principal organe reproducteur de la femelle. Il a deux fonctions importantes : la production de la cellule reproductrice femelle, l'œuf ou l'ovule et la production des hormones sexuelles, les E2 et la progestérone (P4) (Rich et Turman, 1980).

Ils sont de forme ovale et varient en taille d'environ 1,5 à 5 cm de longueur et 1 à 3 cm de diamètre, selon le stade du cycle de reproduction. La structure de l'ovaire n'est pas statique car il y a l'apparition des changements en surface au cours des cycles de croissance et de régression folliculaires ou d'ovulation (Figure 3) (Ball et Peters, 2004).

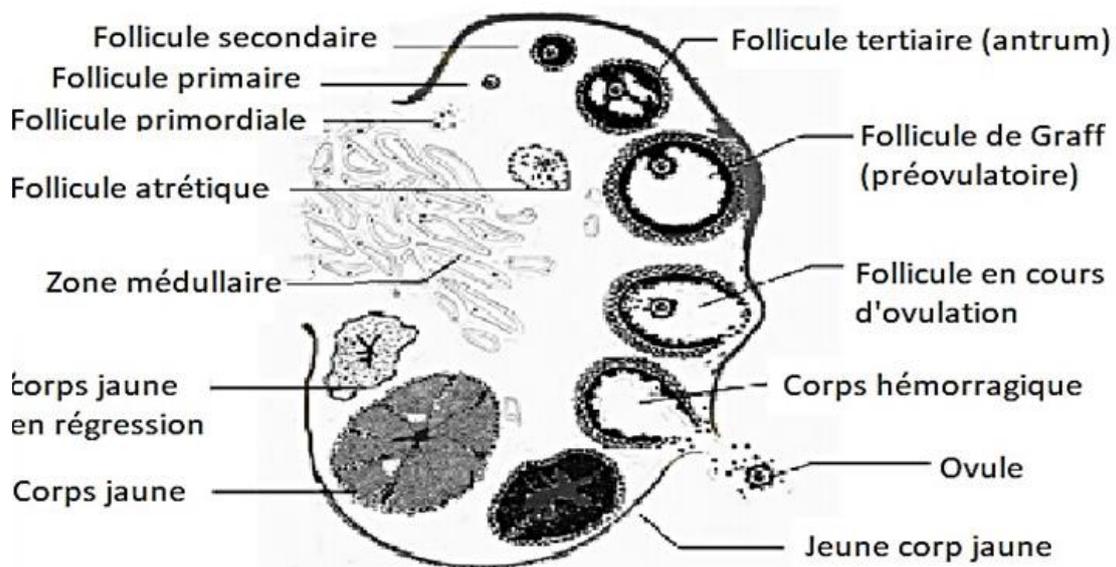


Figure 3 : Représentation schématique des structures ovariennes de la vache (Bonnes et *al.*, 1988)

III. Cycle sexuel de la vache

Le cycle sexuel chez la femelle regroupe à la fois le cycle ovarien et le cycle œstral (Amstalden et Williams, 2014) :

III. 1. Cycle ovarien

Les ovaires subissent des changements morphologiques cycliques dans les gonades (recrutement et croissance folliculaires) et physiologiques (régulation endocrinienne) conduisant à l'ovulation. Le cycle ovarien est classiquement divisé en deux phases : la phase folliculaire et la phase lutéale entre les deux se produit l'ovulation (Fatet et *al.*, 2011).

III.1.1. Phase folliculaire

La phase folliculaire (4–6 jours) est la période qui suit la disparition du corps jaune (lutéolyse) jusqu'à l'ovulation (souvent désignée comme proœstrus et œstrus). Pendant la phase folliculaire, la maturation finale et l'ovulation du follicule ovulatoire se produit ; l'ovocyte est libéré dans l'oviducte permettant le potentiel de fécondation (Fatet et *al.*, 2011).

III.1.1.1. Follicules ovariens

Les follicules ovariens sont les unités fonctionnelles des gonades femelles (Palermo, 2007), ils sont classés de diverses manières en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, telles que le nombre de couches de cellules de la granulosa entourant l'ovocyte, les caractéristiques morphologiques des cellules de la granulosa, le diamètre de l'ovocyte et du follicule, et l'absence ou la présence d'un antrum, cavité remplie de liquide folliculaire (Lussier et *al.*, 1987).

III.1.1.2. Folliculogenèse

La folliculogenèse est la succession des différentes étapes du développement folliculaire, depuis le moment où le follicule sort de sa réserve jusqu'à l'ovulation ou jusqu'à l'atrésie (Drion et *al.*, 1996a) , elle se déroule en 3 phases : la phase de multiplication, la phase de croissance et la phase de maturation (Forde et *al.*, 2011).

➤ Phase de multiplication

Les cellules germinales souches d'origine extra-embryonnaire migrent vers l'embryon pour donner naissance aux ovogonies : formation d'un stock de 2 millions d'ovogonies puis elles se multiplient entre le 60^{ème} et le 170^{ème} jour de gestation, une fois la phase mitotique

terminée, entament une division méiotique qui se trouve bloquée en prophase I : elles se transforment en ovocyte primaire. A cette période, quelques cellules viennent entourer l'ovocyte primaire formant ainsi les follicules primordiaux. Chez la plupart des mammifères cette phase est terminée avant ou peu après la naissance (Erickson, 1966; Russe, 1983; Wandji et *al.*, 1992).

➤ **Phase de croissance**

Cette phase est particulièrement longue, elle se déroule entre le moment où le follicule quitte la réserve folliculaire et l'ovulation, elle ne concerne que 10 % du stock folliculaire. Cette phase se caractérise par des modifications du follicule et même de l'ovocyte qu'il renferme (Hulshof et *al.*, 1994; Lussier et *al.*, 1987; Monniaux et *al.*, 1983) (Tableau 1) (Figure4).

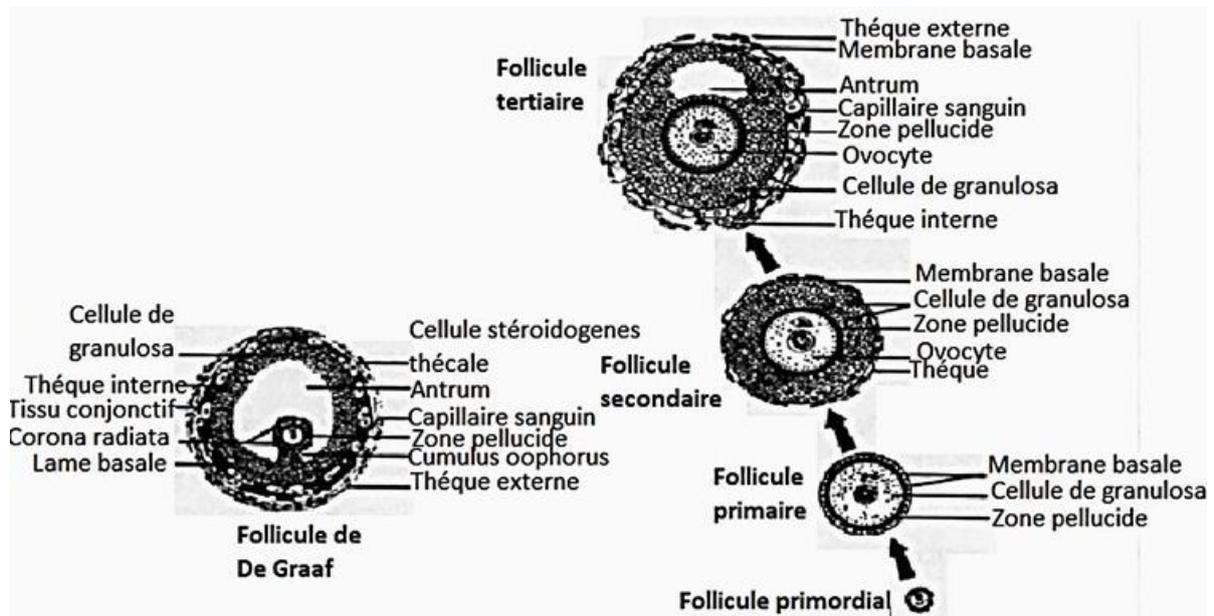


Figure 4: Représentation schématique de différents stades de développement folliculaire ovarien chez la vache (Gayrard, 2007)

Tableau 1 : Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades (Hanzen et *al.*, 2000)

	Follicules pré-antraux			Follicules antraux	
Caractéristiques	Follicule primordial	Follicule primaire	Follicule secondaire	Follicule tertiaire	Follicule de De Graaf
Diamètre Folliculaire	40 µm	60-80 µm	200-400 µm	3 à 4 mm	25 mm
Diamètre ovocytaire	20-35 µm	30-40 µm	60 µm	100-130 µm	150 µm
Formation spécifique entourant l'ovocyte	- Quelques cellules folliculaires Endothélioformes	- Couche de cellules cubiques - Enveloppe hyaline poreuse : zone pellucide	- Zone pellucide bien différenciée - Granulosa - Membrane de Slavjanski	- Corona radiata - Membrane Slavjanski - Thèque interne et thèque externe	- Cumulus oophorus - Thèques interne et externe
Caractéristiques Spécifiques	- Follicule localisé en périphérie de l'ovaire - Ovocyte bloqué au stade diplotène de la prophase I	- Augmentation du volume ovocytaire - Agencement à sa surface d'une couche régulière de cellules cubiques		- Présence d'une petite cavité - Formation de l'antrum	Le follicule affleure en surface de l'ovaire en raison de son gonflement par le liquide

➤ Phase de maturation

Elle concerne surtout l'ovocyte. Cette phase implique des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte. Elle permet : l'aptitude de l'ovocyte à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, la formation des pronuclei paternel et maternel et permettant le début du développement embryonnaire grâce à ses réserves. Lorsque l'ovocyte a atteint 80 % de sa taille finale, qui s'accorde à la reprise de la méiose. Celle-ci correspond à la disparition de la membrane nucléaire, à la condensation des chromosomes et finalement à l'émission du premier globule polaire : l'ovocyte I se transforme en ovocyte II (Forde et *al.*, 2011).

III.1.1.3. Dynamique de croissance folliculaire

Chez les bovins, les follicules se développent en forme de vagues folliculaires, pouvant être détecté au cours de la plupart des stades de la reproduction y compris la période prépubère chez les génisses, pendant les cycles œstraux, la gestation (sauf 30 derniers jours), et même pendant la période d'œstrus du post-partum (Perry, 2004).

Un cycle ne comporte habituellement que deux ou trois vagues (avec des extrêmes de un à quatre) et le follicule ovulatoire est issu de la dernière vague (Driancourt, 1991). Si la croissance folliculaire comporte trois vagues, elles débutent en général au 2^{ème}, 9^{ème} et 16^{ème} jour du cycle, et s'il y a deux vagues, elles apparaissent au 2^{ème} et 11^{ème} jour du cycle (Ginther *et al.*, 1989).

Le développement folliculaire est caractérisé par l'émergence d'une cohorte de follicule composée généralement de 5 à 20 follicules de diamètre ≥ 5 mm et est corrélée à une augmentation transitoire des concentrations de FSH (Forde *et al.*, 2011) (Figures 5 et 6).

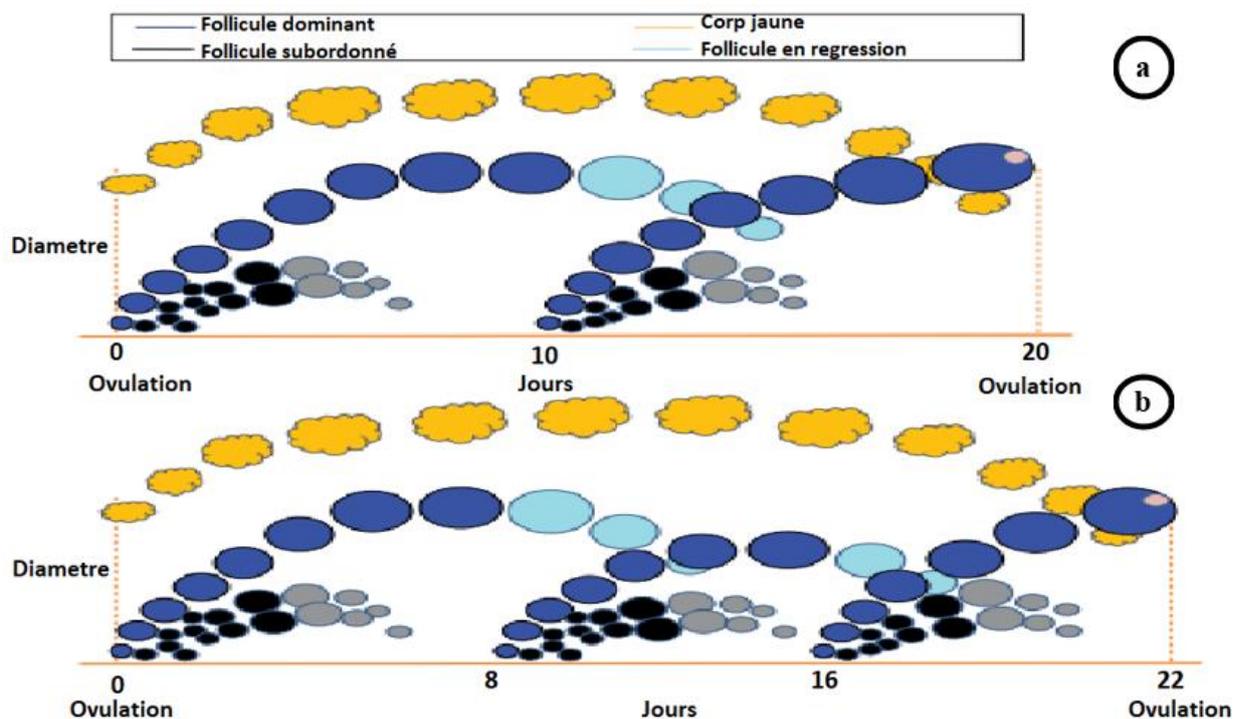


Figure 5 : Dynamique folliculaire des cycle œstraux à 2 vagues (a) et à 3 vagues (b) chez les bovins (Singh et Adams, 2014)

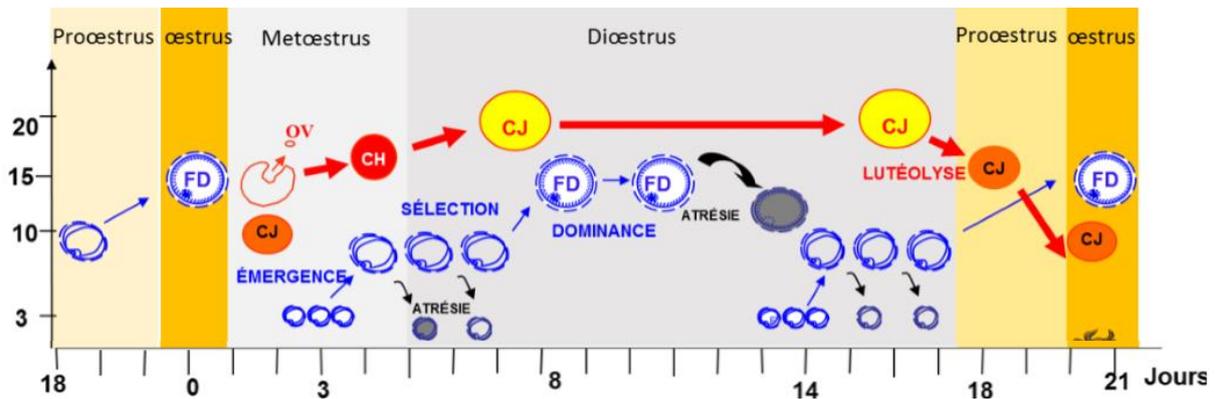


Figure 6 : Événements cellulaires ovariens du cycle œstral de la vache (Gayrard, 2007)

Chaque vague de croissance implique le recrutement, la sélection et la domination suivie soit par atrésie, ou ovulation du follicule dominant (Forde *et al.*, 2011).

➤ **Recrutement**

Le recrutement d'une cohorte de follicules, d'environ 3 mm de diamètre, est stimulé sur chaque ovaire par une élévation transitoire de la FSH (Moorey *et al.*, 2019), qui agit sur ces follicules en augmentant leurs aptitudes à aromatiser les androgènes en E2. Le recrutement d'un grand nombre de follicules constitue en quelque sorte la garantie qu'au moins un follicule se trouve dans les conditions optimales de développement et de sensibilité à l'action de FSH (Fortune, 1994).

➤ **Sélection**

La sélection folliculaire est le processus par lequel un seul follicule de la cohorte recrutée est sélectionné pour continuer à croître et à devenir dominant, tandis que les autres follicules de la cohorte subissent une atrésie. La diminution des concentrations de la FSH au moment de la sélection sont importantes pour la sélection d'un seul follicule dominant (Moorey *et al.*, 2019). En effet, le développement du groupe de follicules recrutés s'accompagne d'une augmentation de la production d'œstradiol, mais également d'inhibine. Ces deux hormones exercent un rétrocontrôle négatif sur la production hypophysaire de FSH qui diminue, dès que la concentration en FSH circulante devient inférieure à celle induisant le recrutement, les follicules recrutés entrent en atrésie à l'exception du (ou des) seul follicule sélectionné (Drion *et al.*, 1996a). Le mécanisme de ce choix est basé sur la dépendance de la FSH à la LH du follicule sélectionné (Moorey *et al.*, 2019).

➤ Dominance

La phase de dominance se produit lorsqu'un follicule est sélectionné, il continue de croître et inhibe l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire (Moorey et al., 2019). En absence de P4, le follicule dominant devient ovulatoire et ovule à la fin de l'œstrus. En présence de la P4, le follicule dominant s'atrophie (Perry, 2004). Quel que soit le devenir du follicule dominant, l'atrophie ou l'ovulation entraîne une augmentation transitoire des concentrations circulantes de FSH et l'initiation d'une nouvelle vague folliculaire (Adams et al., 1992).

➤ Ovulation

L'ovulation survient 20-26h après le début de l'œstrus (chaleur) (Fatet et al., 2011) et correspond à la rupture du follicule libérant ainsi l'ovule (Parish, 2016). Cette dernière fait suite à un pic préovulatoire de LH induit par une augmentation de la sécrétion de GnRH (Fatet et al., 2011) (Figure 7).

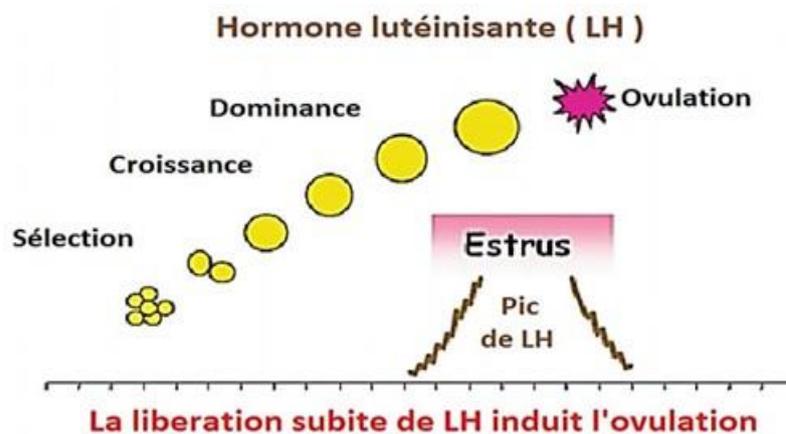


Figure 7 : Mécanisme d'ovulation (Parish, 2016)

➤ Atrésie

Encore appelée involution folliculaire, l'atrophie constitue le devenir de la majorité des follicules présents dans l'ovaire des mammifères. Elle joue indirectement un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation (Hanzen et al., 2000). Elle est contrôlée par la mise en évidence de l'apoptose (corps apoptotiques) dans les cellules de la granulosa (Hughes et Gorospe, 1991). Elle peut se produire à n'importe quel moment de la folliculogénèse (Drion et al., 1996a).

III.1.2. Phase lutéale

La phase lutéale débute juste après l'ovulation aboutissant à la formation d'un corps jaune (CJ) et se termine par la lutéolyse de ce dernier. L'hormone sécrétée par le CJ est la P4 (Moorey et al., 2019). Durant cette phase, la croissance folliculaire se poursuit sous forme de vague mais l'ovulation est inhibée par la P4. Elle regroupe la phase de metœstrus (où P4 commence à augmenter) et de diœstrus (où P4 est élevée) du cycle œstral (Fatet et al., 2011).

III.1.2.1. Corps jaune

La mise en place d'un CJ fonctionnel dans les jours qui suivent l'ovulation implique d'importants remaniements morphologiques des structures du follicule ayant ovulé. L'activité autocrine et paracrine des facteurs de croissance, impliqués dans les proliférations locales (activité monogénique) et les remodelages tissulaires, sont impliqués dans la transformation des cellules folliculaires (cellules de la granulosa et cellules de la thèque interne) en cellules lutéales (Epsey, 1992).

III.1.2.2. Lutéolyse

A la fin de la phase lutéale, 16 à 18 jours après ovulation, la prostaglandine F2 sécrétée par l'utérus induit la régression du CJ et la diminution de la sécrétion de P4. La diminution des concentrations plasmatiques de P4 supprime progressivement l'inhibition de la sécrétion des hormones gonadotropes et une nouvelle phase folliculaire commence (Fatet et al., 2011) (Figure 8).

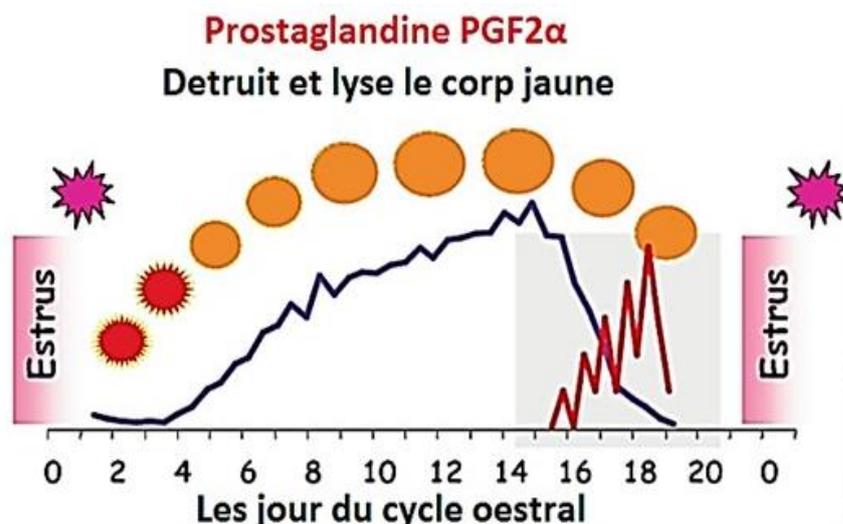


Figure 8: Mécanisme de lutéolyse (Parish, 2016)

III. 2. Cycle œstral

Le cycle œstral est le schéma cyclique de l'activité ovarienne qui facilite le passage des femelles d'une période non-réceptivité reproductrice à la réceptivité permettant finalement l'accouplement. L'apparition des cycles œstraux se produit à la puberté. La durée normale d'un cycle œstral chez les bovins est de 18 à 24 jours (Forde et *al.*, 2011). Il représente toutes les modifications physiologiques des ovaires et des voies génitales conduisant à l'expression de l'œstrus, l'ovulation et la préparation des organes génitaux voies de copulation, fécondation et implantation d'embryons (Fatet et *al.*, 2011). Le cycle œstral comprend 4 phases : proœstrus, œstrus, metœstrus et dioœstrus (Schnobrich, 2018) (Figure 9).

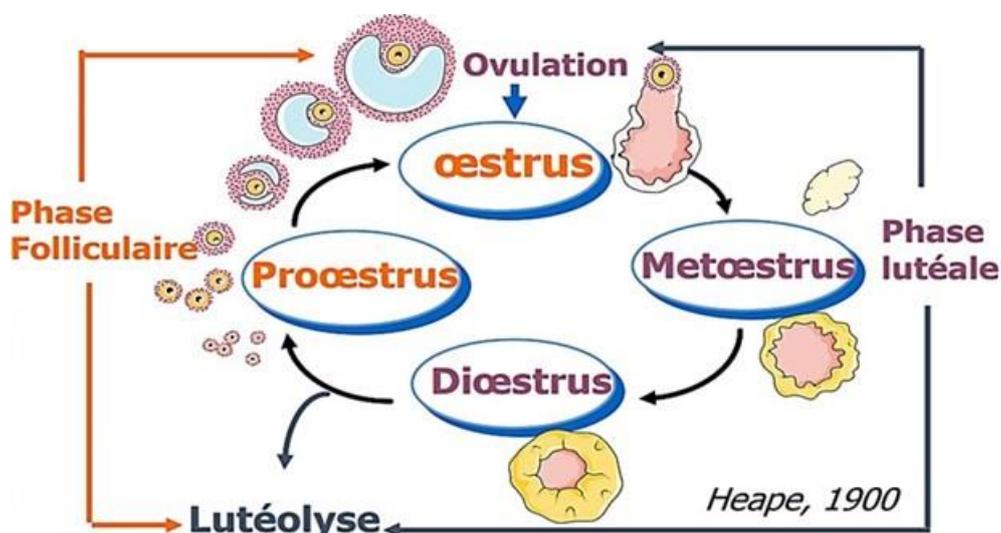


Figure 9 : Représentation schématique des différentes phases du cycle œstral chez la vache (Gayrard, 2007)

III.2.1. Proœstrus

C'est la période qui précède l'œstrus (J0) située entre le 18^{ème} et le 20^{ème} jour du cycle œstral (Ball et Peters, 2004). Elle caractérisée par la régression du corps jaune suivi d'une chute du taux de la progestérone et par l'émergence d'un nouveau follicule dominant (Wattiaux, 2006).

III.2.2. Œstrus

L'œstrus, par convention, correspond à Jour 0 du cycle (Ball et Peters, 2004). L'œstrus ou chaleur est la période d'acceptation du mâle et de la saillie. C'est la période de maturité folliculaire au niveau de l'ovaire, suivie de l'ovulation. Il dure de 6 à 30 heures, L'ovulation a lieu 6 à 14 h après la fin de l'œstrus (Stevenson, 2007). Les signes de l'œstrus sont représentés par : excitation, vocalisation, léchage, abaissement du dos, œdème et congestion de la vulve

avec un écoulement d'une glaire vaginale. Le signe principal est l'acceptation du chevauchement (ou accouplement) avec immobilisation de la femelle (Baêge et *al.*, 2002; Sveberg et *al.*, 2015).

III.2.3. Metœstrus

Le metoestrus dure 1 à 4 jour et débute juste après ovulation (Ball et Peters, 2004). Il se caractérise par la formation du CJ à partir du follicule ayant ovulé (Forde et *al.*, 2011).

III.2.4. Diœstrus

Le diœstrus, période entre le 5^{ème} et le 18^{ème} jour du cycle œstral (Ball et Peters, 2004), correspond à la maturation morphologique et physiologique du CJ se traduisant par une augmentation de la sécrétion de P4 (Schnobrich, 2018).

IV. Régulation hormonale du cycle œstral

Le cycle œstral est sous le contrôle des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique. Sous stimulation de la GnRH, la LH et FSH sont libérées. Ces dernières atteignent les gonades par la circulation sanguine et agissent dans l'ovaire pour stimuler la croissance, la maturation et l'ovulation du follicule préovulatoire mais aussi la synthèse de hormones stéroïdes gonadiques (Amstalden et Williams, 2014) (Figure 9 et 10) :

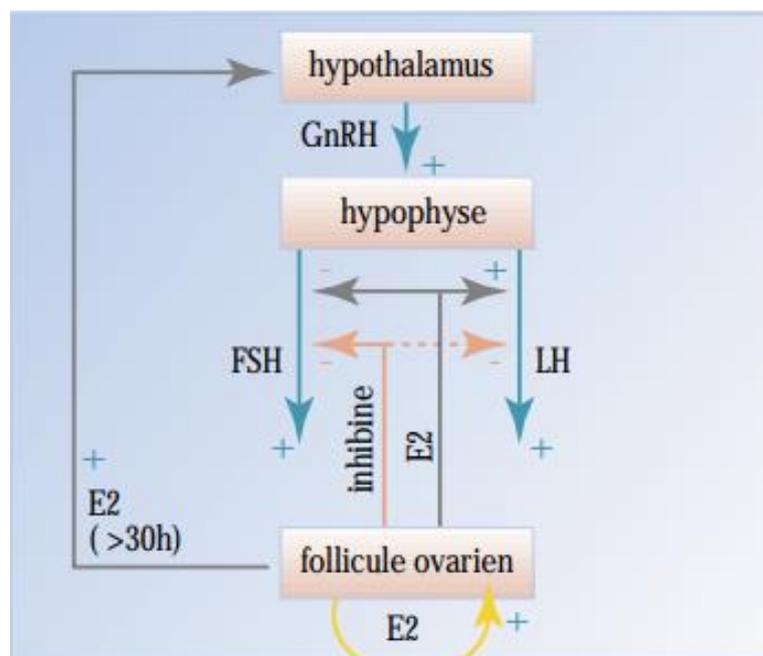


Figure 10: Représentation schématique des interrelations de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique (Drion et *al.*, 1996b)

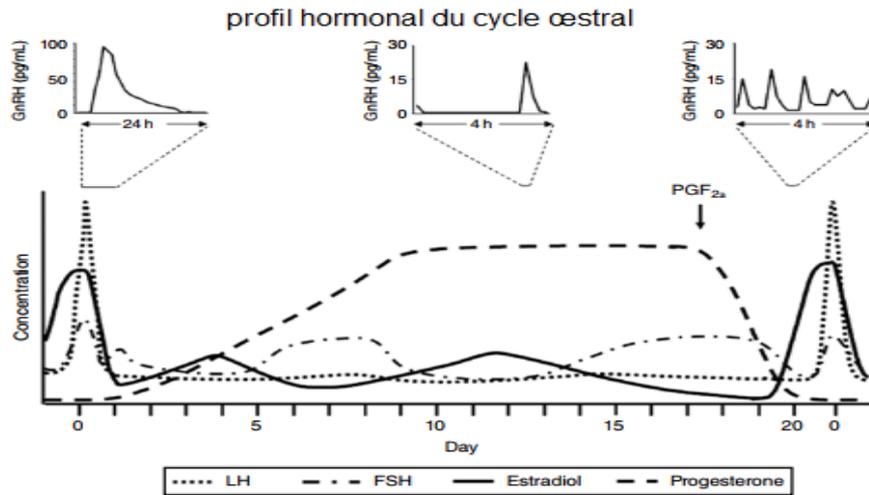


Figure 11 : Modifications relatives des concentrations circulantes LH, FSH, E2 et P4 pendant le cycle œstral chez la vache (Amstalden et Williams, 2014)

IV.1. Phase folliculaire

Au cours de cette phase des augmentations transitoires des concentrations de FSH entraînent une augmentation de l'activité enzymatique de l'aromatase (P450arom; Cytochrome P19), dans les cellules de la granulosa du follicule, qui convertit les androgènes en œstrogènes (Hillier, 1994), d'autre part l'augmentation des concentrations d'estradiol simultanément avec l'inhibine exercent une rétroaction négative sur l'adénohypophyse pour réduire les concentrations de FSH (Thibault et Levasseur, 2001), cette grande concentration d'estradiol induit une poussée de GnRH dans l'hypothalamus qui conduit à la sécrétion de LH provoquant à son tour l'ovulation qui a lieu 10–14 h après œstrus (Sunderland et *al.*, 1994).

IV.2. Phase lutéale

Suivant l'ovulation, les cellules folliculaires subissent une transformation fonctionnelle deviennent des cellules lutéales, qui synthétisent et libèrent la P4 (Rache et *al.*, 1980), cette dernière a un rôle crucial sur la croissance et différenciation des structures ovariennes, elle présente ses effets sur les tissus cibles en se liant à un récepteur appelé récepteurs de la P4 (Akbalik et *al.*, 2011) pendant cette phase les concentrations de LH en circulation sont faibles (Thibault et Levasseur, 2001).

Chez la vache non gestante, (Claire et Swann, 1982) le corps jaune commence à régresser après environ jour 17 – (la lutéolyse). Ceci est provoqué par l'influence de la prostaglandine utérine F2 α (PGF2 α).

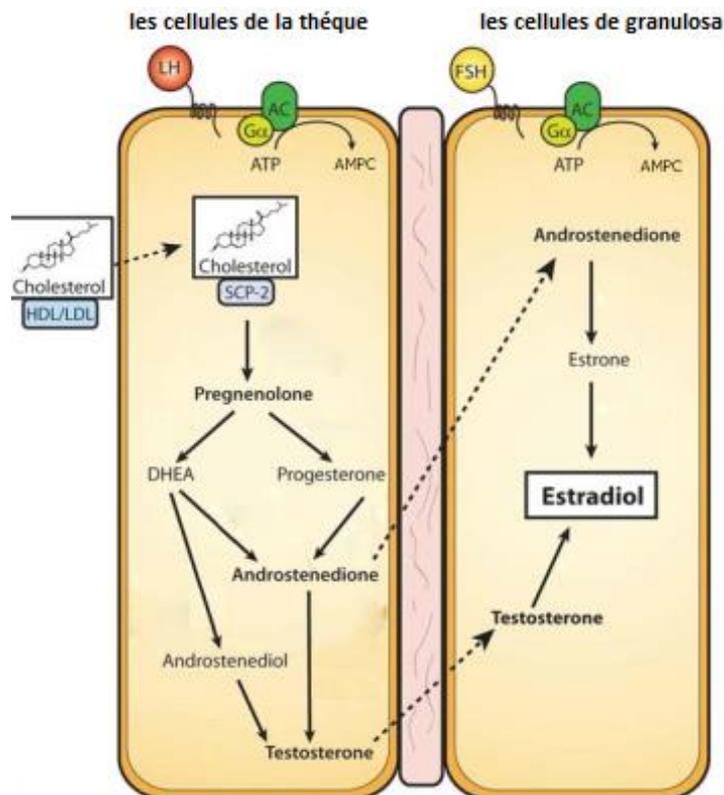
Chapitre II :
Œstrogènes et les récepteurs
aux œstrogènes

I. Œstrogènes

Les œstrogène (E2) sont principalement synthétisés et sécrétés par les cellules de la granulosa (Shibaya et *al.*, 2007). Il existe trois principales formes physiologiques d'œstrogènes : estrone (E1), estradiol (E2 ou 17 β estradiol) et estriol (E3). Les E2 sont le produit majeur de tout le processus de biosynthèse des œstrogènes (Cui *et al.*, 2013), ils sont synthétisés et sécrétés par le follicule de dominant sous la stimulation des hormones gonadotropiques hypophysaires (au cours des derniers jours cycle œstral (Spicer et Echternkamp, 1986).

I.1. Biosynthèse

La stéroïdogénèse folliculaire aboutissant à la synthèse des E2 se déroule dans deux types de cellules : cellules de granulosa et cellules de la thèque. Elle commence dans la thèque, la liaison de la LH à ses récepteurs membranaires spécifiques entraîne la conversion du cholestérol en testostérone grâce à une série de réactions catalytiques (Drion et *al.*, 1996a) (Figure 12). La testostérone, une fois produite se diffuse par la suite dans les cellules de la granulosa où elle est converti en E2 par l'aromatase (Dorrington et *al.*, 1975).



DHEA : Déhydroépiandrostérone ; HDL : High Density Lipoproteins ; LDL : Low Density Lipoproteins ; AC : adénylate cyclase ; ATP : Adénosine-TriphosPhate ; AMPC : Adénosine monophosphate cyclique ; SCP2 : sterol carrier protein 2 ; G α : G-Protein α subunit ; FSH : Follicle Stimulating Hormone ; LH : Luteinizing Hormone

Figure 12: Schéma de biosynthèse des œstrogènes (Lapointe et Boerboom, 2011)

I.2. Rôles des œstrogènes

Les E2 sont impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire dans les organes reproducteurs. En revanche, ils peuvent agir en synergie avec la P4 pour induire des changements de sensibilité à la LH pour inhiber la croissance du follicule dominant préexistant et initier une nouvelle vague de croissance folliculaire (Paris *et al.*, 2006). De plus le feedback positif des E2 consiste à déclencher le pic de LH conduisant à l'ovulation (Roelofs *et al.*, 2010). En outre, les E2 jouent un rôle particulier dans le feedback négatif de la sécrétion de la FSH ; qui induit la régression de follicules de 4 à 8 mm de diamètre (subordonnés) sensibles à l'action de la FSH (Bo *et al.*, 1995), ce qui conduit à la croissance d'une nouvelle cohorte de follicules 3 à 5 jours après suppression du follicule dominant (Burke *et al.*, 1999). Les E2 sont considérés comme des régulateurs paracrine / autocrine du fonctionnement du CJ au cours de la phase lutéale (Shibaya *et al.*, 2007). Ils provoquent aussi la réponse comportementale d'œstrus chez la vache (Parish, 2016).

II. Récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires dont la fonction, médiée par E2, est l'activation de la transcription de gènes impliqués notamment dans la croissance, la différenciation cellulaire et les fonctions reproductrices. (Tsai et O'Malley, 1994). Il existe deux sous-types de ces récepteurs, les RE α et RE β (Shibaya *et al.*, 2007).

II.1. Domaines de récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs stéroïdiens RE composés de six domaines (A-F) responsable des fonctions spécifiques (Figure 13). Le domaine A/B contribue à l'activité transcriptionnelle par activation de AF1 (Fonction d'activation 1). Le domaine C favorise la liaison à l'ADN dans les gènes cibles, la dimérisation du récepteur et la transactivation du récepteur. Il est constitué de deux doigt de zinc représenté par un ion Zn⁺⁺ lié à quatre cystéines, la P-Box (une région du premier doigt de zinc sa fonction est la reconnaissance de la séquence et la liaison à l'élément de réponse aux E2), la D-Box (une région deuxième doigt de zinc, la D-box, sont impliqués dans la discrimination de l'emplacement précis au niveau de l'ADN) (Figure 14). Le domaine D est la région charnière qui permet les changements conformationnels lors de l'activation du récepteur, il facilite la liaison aux protéines de choc thermique, la localisation nucléaire et la stabilisation de la liaison à l'ADN. Le domaine E contient le site de liaison de l'hormone et favorise la transactivation AF-2 et AF-2a (Peters et Khan, 1999). La fonction du domaine F

n'est pas encore claire, mais il est probablement impliqué dans l'activation transcriptionnelle (Pavao et Traish, 2001).

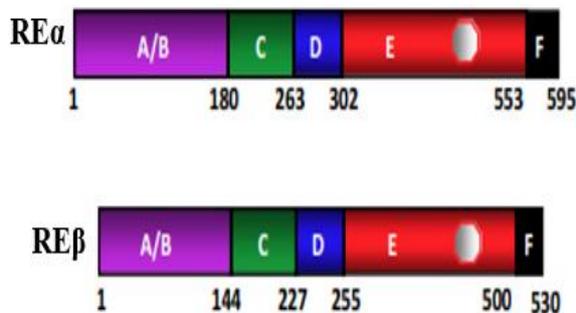


Figure 13: Représentation schématique des récepteurs aux œstrogènes α et β (Yaşar et *al.*, 2017)

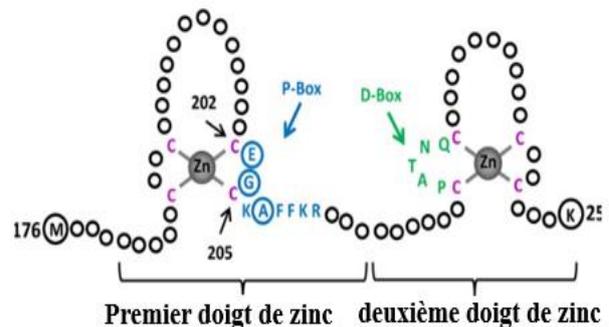


Figure 14: Représentation schématique du domaine C : domaine de liaison à l'ADN des récepteurs aux œstrogènes (Yaşar et *al.*, 2017)

II.2. Rôle des récepteurs

II.2.1. Récepteurs aux œstrogènes α

Les RE α ont des rôles dans le maintien de la fonction du CJ. En effet l'expression de ces derniers est plus élevée au début et au milieu de la phase lutéale (Salfen et *al.*, 1999).

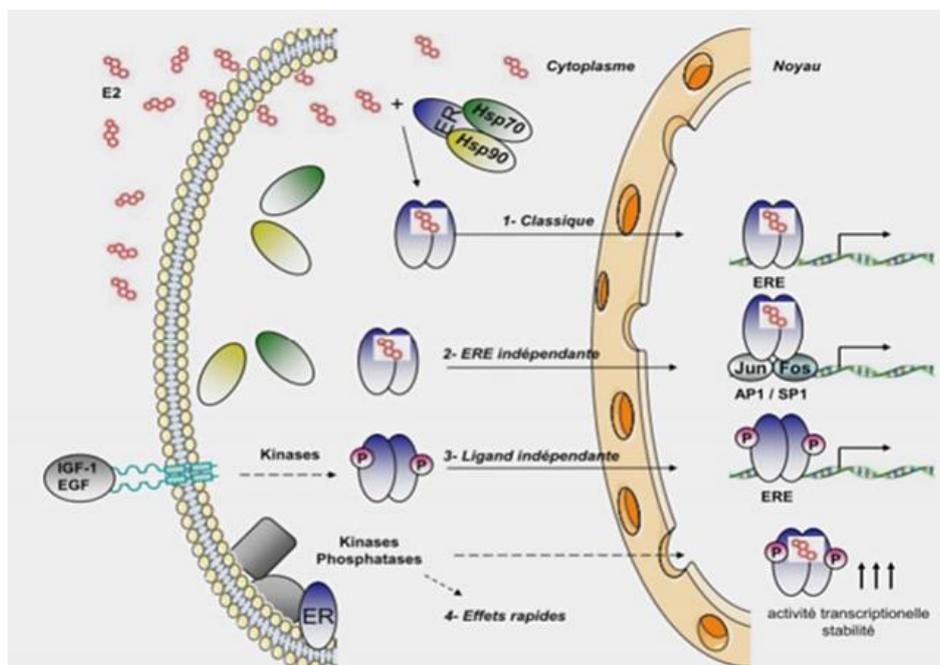
II.2.2. Récepteurs aux œstrogènes β

Les E2 agissent comme un facteur lutéolytique via RE β au stade lutéal pour entraîner la régression du CJ. En effet, la liaison E2-RE β est plus élevée au stade lutéal par rapport aux autres stades du cycle œstral. En outre, les RE β s'expriment dans les cellules folliculaires primordiales, primaires et secondaires cela indique que les E2 jouent un rôle dans les premiers stades de la croissance folliculaire via RE β (Berisha et *al.*, 2002).

II.3. Mécanisme d'action de récepteurs aux œstrogènes

La régulation transcriptionnelle de gènes cibles spécifiques de ER α est initiée par différents mécanismes reconnus :

- **Voix classique (ligand-dépendante)** : Après la liaison de l'hormone sur son récepteur, le complexe subit des changements conformationnels, les RE α et RE β sont activés et ils peuvent se lier efficacement à une séquence d'ADN particulière qui est situé dans la région des gènes sensibles à l'hormone (Enmark et Gustafsson, 1999).
- **Voix alternative (ERE-indépendante)** : Ce mécanisme fait intervenir une liaison directe à l'ADN, via des interactions du RE avec d'autres facteurs de transcription tels que Sp1 ou AP-1 liés sur des séquences d'ADN qui leur sont spécifiques et module ainsi la transcription de gènes cibles (Teyssier *et al.*, 2001).
- **Voix de ligand-indépendante** : D'autres voies de signalisation peuvent moduler l'activité du RE via des cascades de phosphorylations via l'activation des kinases par des facteurs de croissance IGF-1 (Lannigan, 2003).
- **Voix membranaire non génomique (MISS)** : Les effets rapides des œstrogènes initiés à la membrane par RE α en présence d'E2 incluent la stimulation de l'activité adénylate cyclase ainsi que la production d'AMPc ou activation des voies MAPK (Mitogen-activated protein kinases) pour la phosphorylation des protéines exerçant une action cytoplasmique rapide (Aronica et Katzenellenbogen, 1993).



E2: Oestrogène; ERE: Estrogen receptor element; AP1: Activator protein 1; SP1: Specificity protein 1; HSP: Heat shock proteins; IGF-1: Insulin-like growth factor-1

Figure 15: Modèle simplifié de mécanisme d'action des œstrogènes (modifiée) (Arnal *et al.*, 2017)



Partie
expérimentale

Matériel et méthodes

I. Matériel animal

Notre travail devait porter sur des ovaires (Figures 16 et 17) de vaches adultes récoltés au niveau des abattoirs.

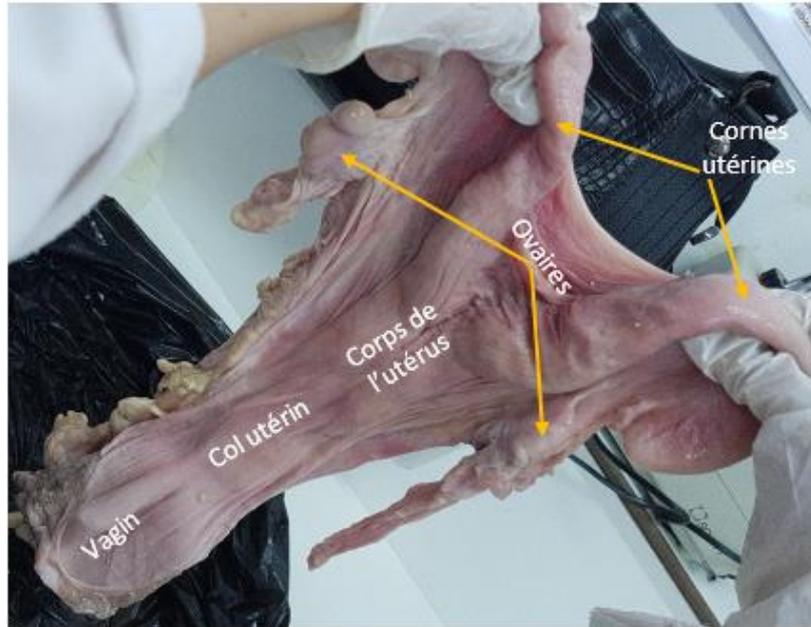


Figure 16: Appareil génital de la vache (Photo personnelle)

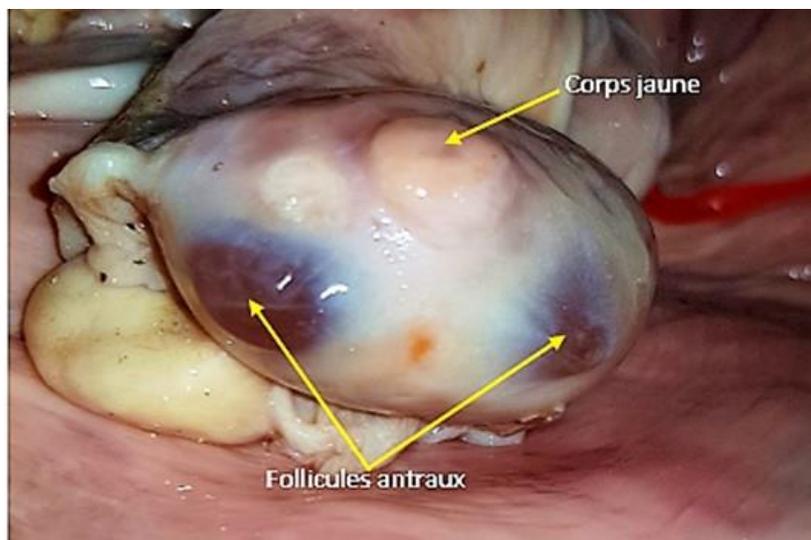


Figure 17: Ovaire de vache (Photo personnelle)

Au laboratoire, après orientation et examen macroscopique, les différents ovaires devraient être classés selon les différents stades de cycle œstral : Œstrus, métœstrus, diœstrus et proœstrus à partir des critères établis par (Ireland et *al.*, 1980) (Tableau 2).

Tableau 2: Classification des corps jaunes au cours du cycle œstral des vaches (Ireland et *al.*, 1980)

Caractéristiques	Stade de cycle œstral			
	Fin de l'œstrus	Metœstrus	Diœstrus	Proœstrus
Externes	- CJ rouge, récemment ovulé. - Point de rupture non couvert par l'épithélium.	-L'apex du CJ est rouge ou brun. -Le Point de rupture est couvert.	- CJ bronze ou orange	- CJ jaune clair 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	- CJ orange	-CJ orange vers jaune
Diamètre (cm)	0,5-1,5	1,6-2	1,6-2	<1
Vascularisation externe du CJ	Non visible	Généralement limité à la périphérie	Semblable au metœstrus mais elles couvriront l'apex du CJ tard dans cette étape	Non visible
Follicules > 10 mm de diamètre	Absent	Présent mais pas visible	Peut être absent ou présent	Présent

II. Méthodes utilisées

La technique utilisée est l'immunohistochimie indirecte, définie comme une méthode associant l'histologie et l'immunologie pour visualiser *in situ* un antigène à l'aide d'un anticorps spécifique.

II.1. Technique d'immunohistochimie

Les étapes de la technique immunohistochimie pour visualiser les récepteurs d'œstrogènes sont les suivantes (Boukenaoui-Ferrouk et *al.*, 2017) :

- Première étape : Préparation des prélèvements par la technique d'histologie.
- Deuxième étape : Technique d'immunohistochimie proprement dite.

II.1.1. Protocole de la technique d'histologie

II.1.1.1. Fixation

Les ovaires prélevés placés immédiatement dans des cassettes d'histologie portant les références de l'animal (identifier les échantillons) (Figure 18) puis immergés dans le formol du commerce tamponné dilué à 10 % pendant plus de 24h. La fixation a pour but la conservation des structures tissulaires du prélèvement dans un état aussi proche que possible du vivant.

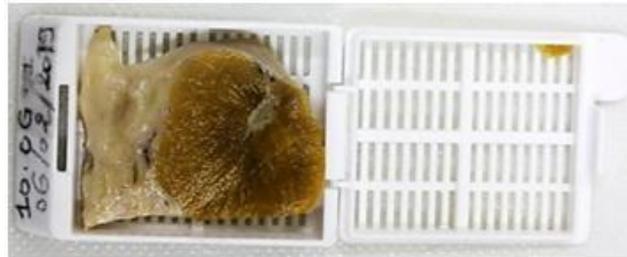


Figure 18: Prélèvement ovarien dans une cassette d'histologie

II.1.1.2. Inclusion

- **Déshydratation et substitution (éclaircissement)**

Comme la paraffine est hydrophobe, non miscible dans les alcools, les prélèvements doivent être d'abord entièrement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Alors, on procède à une double substitution, selon les étapes suivantes où on remplace :

- ✓ L'eau par de l'alcool (pour la déshydratation)
- ✓ L'alcool par le xylène (la paraffine soit miscible dans le prélèvement et pour éclaircissement).

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

Bain d'alcool	96°	96°	96°	96°	96°	100°	100°
Temps (min.)	30	30	30	30	30	60	60

Bain de xylène	1 ^{er} Bain	2 ^{ème} Bain	3 ^{ème} Bain
Temps (h)	1	1	1

Les prélèvements déshydratés sont alors immergés dans différents bains de paraffine chauffée à 56°C dans une étuve (pour garder la paraffine liquide), 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
Temps (min.)	30	30	60

II.1.1.3. Confection des blocs de paraffine

La confection des blocs de paraffine (Figures 19, 20, 21) 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, pour faciliter le démoulage.

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



Figure 19: Mise en place centrée du prélèvement ovarien dans le moule métallique

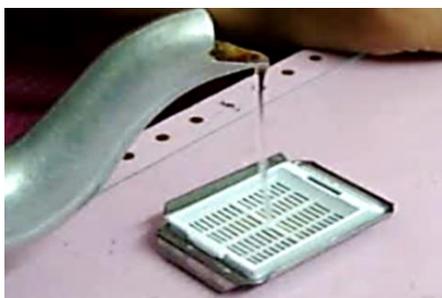


Figure 20 : Remplissage du moule métallique par la paraffine liquide



Figure 21 : Mise en place de l'ensemble moule- cassette sur un bain de glace

II.1.1.4. Réalisation et étalement des coupes

- **Réalisation des coupes**

Les coupes tissulaires d'une épaisseur de 5 μm ont été effectuées à l'aide d'un microtome (Figure 22). Avant de réaliser les coupes, on a reporté les références des cassettes sur les lames de verre d'histologie à l'aide d'un crayon.

- **Etalement des coupes**

- Afin de ne pas laisser de plis, les coupes sélectionnées sont déposées dans un bain-marie (42°C) (Figure 23) et sont récupérées sur des lames silanisées de type « Super Frost plus » pour être utilisé 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.



Figure 22: Microtome



Figure 23 : Bain marie

II.1.2. Protocole de la technique d'immunohistochimie

II.1.2.1. Principe

Mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction cellulaire, à l'aide d'une réaction antigène – anticorps, le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré (Figure 24) (Genton, 2006).

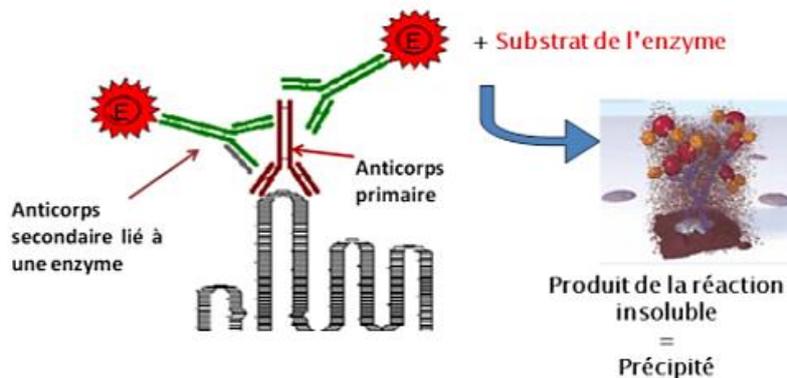


Figure 24 : Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie

II.1.2.2. Protocole d'immunohistochimie

- Avant de commencer l'immunohistochimie indirecte, les coupes sont déparaffinées et hydratées.
- Les différentes étapes de l'immunomarquage indirecte (Figure 23) sont les suivantes :
 - Les coupes **déparaffinées** et **hydratées** sont rincées au **PBS**, ensuite l'excès de PBS est enlevé par égouttage des lames sur du papier absorbant.
 - Le **démasquage des sites antigéniques** avec une solution tampon citratée (PH=6) par la chaleur en utilisant la cocotte-minute.
 - Le **blocage des peroxydases endogènes** par incubation des lames dans le mélange PBS+H₂O₂ à 3% pendant 5min.
 - Rincer au PBS
 - Entourer les coupes avec une résine hydrophobe (Dako-pen) et les placer dans une chambre humide sur un agitateur va et vient.
 - Le **blocage des sites non spécifiques** (sites réactifs auxquels les anticorps primaires ou secondaires peuvent se lier autrement) par incubation des lames dans le sérum de cheval (Réactif jaune du kit VECTASTAIN) à température ambiante, pendant 10 min.
 - Le **blocage des biotines endogènes** par le kit de blocage (Avidin/Biotin Blocking KIT) à température ambiante.
 - Rincer au PBS.

- Incubation des coupes pendant une nuit à 4°C avec un **anticorps primaire anti-récepteurs aux œstrogènes β** monoclonal (B-1: sc-390243 : sc – 816, Santa Cruz), produit chez la souris, 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.
- Rincer au PBS, 2x5 min.
- Application d'un **anticorps secondaire anti-souris biotinylé** (réactif bleu du kit Vectastain), produit chez le cheval, pendant 30 min à température ambiante.
- Rincer au PBS : 2x5 min.
- Appliquer le **complexe Streptavidine-Peroxydase** pendant 30 min. à température ambiante (Réactifs gris du kit VECTASTAIN).
- Rincer au PBS : 2x5 min.
- Le **substrat-chromogène** utilisé est **DAB** (3,3'-**D**iaminobenzidine). Il est déposé sur les différentes coupes et l'apparition du marquage est contrôlée sous le microscope photonique.
- Rincer à l'eau distillée.
- **Contre colorer** à l'hématoxyline pendant 10 secondes.
- **Rincer** à l'eau du robinet (c'est le pH alcalin de l'eau du robinet qui fait bleuir l'hématoxyline).
- La **déshydratation** consiste à faire passer les lames dans des bains d'alcool à concentration croissante (70°, 96°, 100°) pendant 3 minutes par bain.
 - L'**éclaircissement** consiste 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.
 - Le **montage** entre lame et lamelle de la coupe histologique réalisé en utilisant le liquide de montage « Eukitt » (Figure 25) :

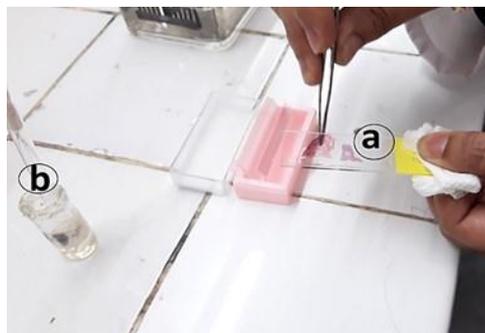


Figure 25 : Montage de la coupe histologique (a) ; liquide de montage « Eukitt » (b)

➤ Après séchage des lames à l'air libre, ces dernières sont observées au microscope photonique et des photos sont prises à l'aide d'un appareil photo de marque Sony (Figure 26).



Figure 26 : Microscope photonique

II.2. Contrôle de la validité de la technique d'immunohistochimie

Des contrôles négatifs insérés pour garantir la spécificité de l'anticorps anti-récepteurs aux estrogènes utilisé dans notre travail. Les lames du même prélèvement sont insérées au cours de la manipulation, vont subir les mêmes étapes sauf au moment de l'incubation on remplace l'anticorps anti-œstrogène est remplacé par le sérum de cheval (non immun) ou par le PBS.

Résultats et discussion

**« Analyse des articles
scientifiques »**

L'objectif de notre travail est d'étudier, au niveau de l'ovaire, la localisation et l'évaluation des RE β et RE α au cours des différents stades du cycle œstral chez la vache. Pour cela, un certain nombre d'articles bibliographiques sont utilisés pour essayer de déterminer les résultats attendus sur les échantillons qui devraient être récoltés en dehors de la situation actuelle du covid-19.

La description des résultats attendus dans notre travail et leurs discussions seraient réalisées sur la base d'un certain nombre d'articles bibliographiques ayant travaillé sur le sujet (Tableau 3).

Tableau 3: Synthèse des articles scientifiques

N° d'article	Références	Espèce (Race)	Types de cellules	Technique utilisée
1	(Rosenfeld et al., 1999)	Bovine	Granulosa/ thèque interne et externe	Immunohistochimie
2	(Akbalik et al., 2011)	Bovine	Thèque interne et externe /Stroma	Immunohistochimie
3	(Ian et al., 2013)	Bovine (Bos Taurus indicus)	Corps jaune	Immunohistochimie
4	(Van den Broeck et al., 2002)	Bovine	Thèque interne des follicules II	Immunohistochimie
5	(Berisha et al., 2002)	Bovine	Thèque interne et externe/ granulosa/ CJ /Stroma	Reverse transcription polymérase chain reaction (RT-PCR)
6	(Amrozi et al., 2004)	Bovine (Vache noire japonaise)	Thèque interne et externe et la granulosa murale et antrale du follicule dominant	Immunohistochimie
7	(D'Haeseleer et al., 2006)	Bovine	Thèque interne et externe/ granulosa/ CJ /Stroma	Immunohistochimie
8	(Shibaya et al., 2007)	Bovine	Corps jaune	Immunotransfert (Western blot)
9	(Pelletier et al., 2000)	Rat	Granulosa/ Thèque	Immunohistochimie/ Hybridation in situ

L'ensemble des articles ont démontré une expression cellulaire spécifique des RE dans les ovaires en fonction du type de follicules (primordial, primaire, secondaire et tertiaire), du type de cellules folliculaires (cellules de granulosa, cellules de la thèque interne, cellules de la

thèque externe), les cellules lutéales et les cellules du stroma et en fonction du stade du cycle œstral (proœstrus, diœstrus, metoœstrus et œstrus).

La présence des RE au niveau des cellules de l'ovaire suggère un rôle physiologique pour les E2 produits localement et/ou circulant (Van den Broeck et *al.*, 2002). En effet, l'action des E2 est médiée par les RE α et RE β qui sont passés à un état transcriptionnel actif après liaison au ligand (Shibaya et *al.*, 2007).

I. Stade du cycle et type de follicule

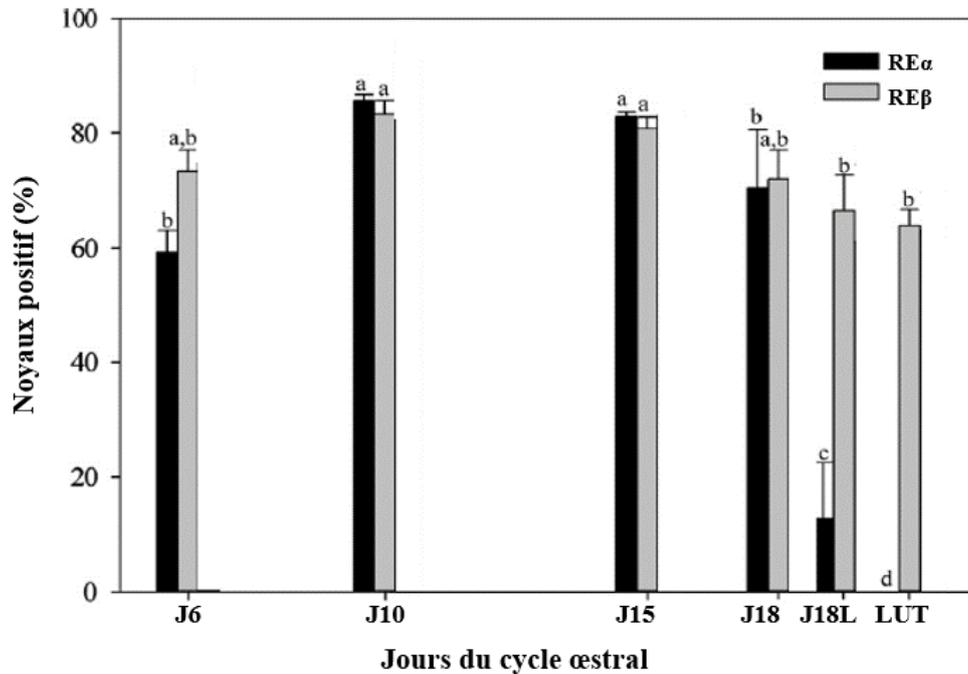
La localisation des RE varie en fonction d'un certain nombre de facteurs : stades du cycle, type du follicule et localisation tissulaire.

I.1. Stade du cycle œstral

Après synchronisation des chaleurs et détermination du jour d'ovulation par échographie des bovins de race Nelore (*Bos taurus indicus*), l'étude immunohistochimique réalisée par Ian et *al.* (2013) met en évidence le taux d'expression des ARNm des RE α et RE β . Les résultats montrent que l'évolution de l'intensité de l'immunomarquage est très similaire pour les deux RE. Le nombre de noyaux positifs au début de la phase du diœstrus est élevé, atteint le nombre maximal au milieu de diœstrus, puis il diminue à la fin du diœstrus (Figure 27). La différence entre les RE est apparue après la lutéolyse, c'est-à-dire après une progestéronémie en dessous de 1 ng/ml. A ce stade, les RE β ont chuté de manière significative alors que les RE α ont disparu ; ce qui peut indiquer l'importance des RE α sur la viabilité des cellules du corps jaune.

Une étude similaire sur les ovaires et le sang prélevés sur des vaches au moment de l'abattage dont le stade du cycle œstral a été déterminé sur la base de l'aspect morphologique des follicules ovariens et des corps jaunes, de la présence de la glaire cervicale utérine et la progestéronémie. D'haeseleer et *al.* (2006) ont rapporté que dans les cellules du stroma ovarien, les RE α présentent des niveaux les plus élevés à l'œstrus, diminuent au metoœstrus et au début du diœstrus, augmentent à la fin du diœstrus et diminuaient à nouveau pendant le proœstrus. Pour les cellules des follicules au cours des premiers stades du développement, l'expression des ARNm de RE β est observée tout au long du cycle œstral avec des scores plus élevés pendant le metoœstrus.

Sur la base de ces résultats, Van den Broeck et *al.* (2002) confirment l'existence d'une variation de l'expression de RE α et RE β en fonction des stades du cycle.



RE α : Récepteurs aux œstrogènes α **RE β** : Récepteurs aux œstrogènes β

Figure 27: Pourcentage de noyaux positifs pour les récepteurs aux œstrogènes aux jours 6, 10, 15, 18, jour 18 après lutéolyse (D18L) et après lutéolyse (LUT) dans le corps jaune des vaches Nelore (Ian et *al.*, 2013). Les barres de la même couleur avec des lettres différentes sont significativement différentes.

I.2. Type de follicule

Dans l'étude de d'Haeseleer et *al.* (2006) :

Les RE β ont été observés dans les cellules folliculaire primordiales, primaires et secondaires par contre les RE α n'ont pas été détecté cela indique que les E2 jouent un rôle dans la croissance folliculaire sur les premiers stades via les RE β (Figure 28e).

Le follicule tertiaire vital présente un marquage de RE α faible à modéré dans la granulosa, des scores plus élevés dans la thèque interne et des scores encore plus élevés dans la thèque externe cela indique l'importante de RE α dans la croissance folliculaire des derniers stades du cycle (Figure 28g).

L'interaction des deux RE dans les follicules tertiaires vitaux est nécessaire pour le stade tardif de croissance folliculaire à la suite de l'expression des RE α et RE β dans la même cellule.

Le follicule tertiaire présente un taux d'expression des ARNm de RE β faible à modéré et il augmente dans le cas de l'atrésie folliculaire, ainsi le RE β est suffisant pour médier les effets protecteurs des E2 contre l'atrésie des follicules tertiaires (Figure 28h).

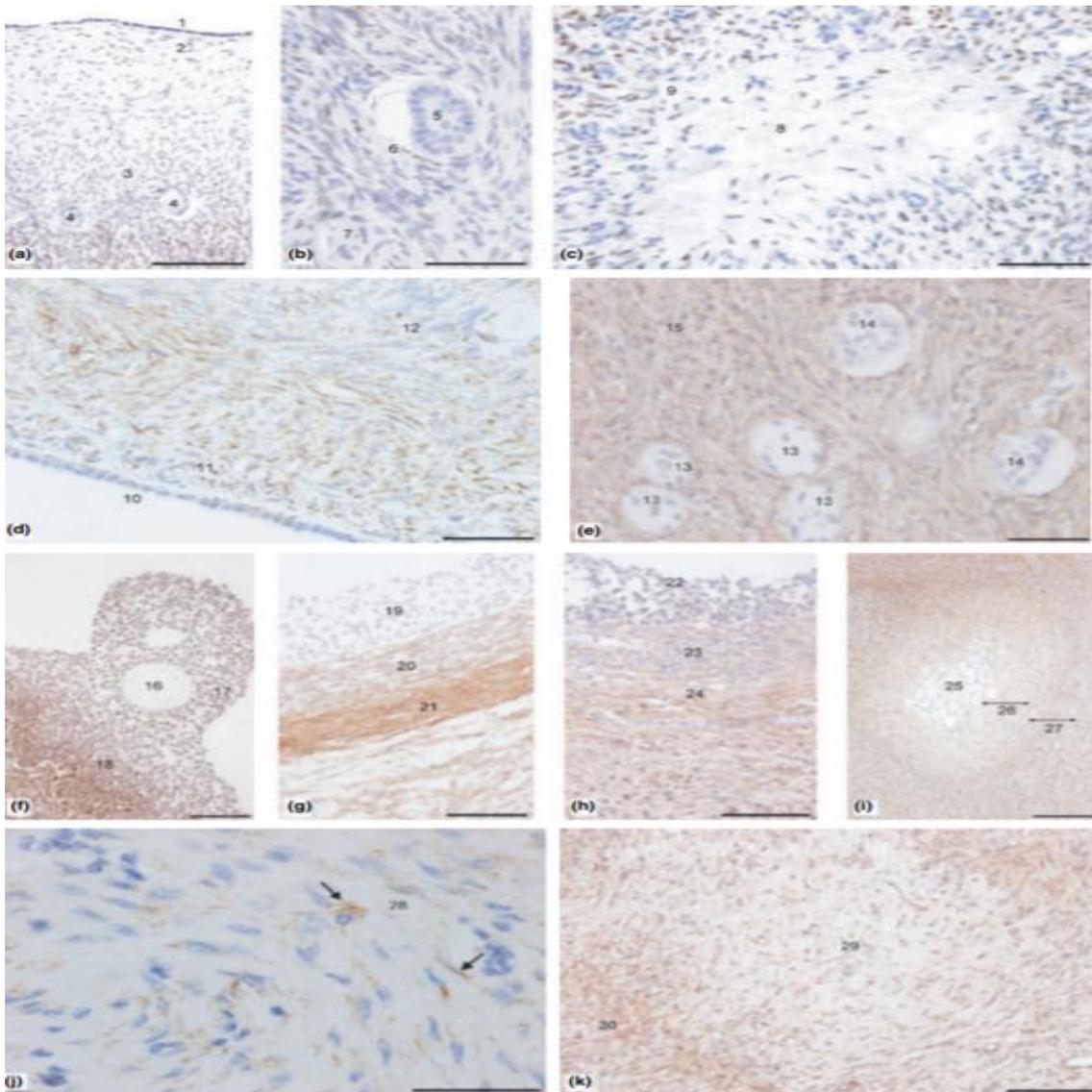


Figure 28 : Micrographies de différents types de cellules ovariennes bovines à différents stades du cycle œstral montrant l'expression de l'ARNm RE α et RE β (D'Haeseleer et *al.*, 2006).

(a) Région externe du cortex ovarien pendant l'œstrus avec RE α faible dans l'épithélium de surface (1) (bar= 100 μ m), plus élevés dans le stroma (3) et absent dans la tunique albuginée (2) ni dans les follicules primaires (4). (b) Follicule secondaire pendant le proœstrus avec RE α absent dans la granulosa (5), faible dans la thèque (6) et élevé dans le stroma superficiel (7) (bar= 100 μ m). (c) Vue d'ensemble d'un corps blanc pendant l'œstrus avec un RE α faible dans les cellules du stroma interne (8) et élevé dans les cellules capsulaires du stroma (9) (bar= 50 μ m). (d) Détail de la région externe du cortex ovarien bovin au début du diœstrus avec ARNm de RE β modéré l'épithélium de surface (10), plus élevés dans la tunique albuginée (11) et modérés dans le stroma (12) (bar= 100 μ m). (e) Follicules primaires (13) et secondaires (14) à l'œstrus avec ARNm RE β modéré dans les cellules folliculaires et élevé dans le stroma superficiel (15) (bar= 50 μ m). (f) Follicule tertiaire vital à proœstrus avec un ARNm RE β élevé dans les cellules de la granulosa (18) et cellules du corps blanc (17). L'ovocyte (16) est entouré par la zona pellucide (bar= 100 μ m). (g) Follicule tertiaire vital au début du diœstrus avec ARNm RE α faible à modéré dans la couche de granulosa (19), scores plus élevés dans la thèque interne (20) et scores encore plus élevés dans la thèque externe (21) (bar= 100 μ m). (h) Follicule tertiaire atrétique kystique au métœstrus avec ARNm RE β faible à modéré dans la granulosa (22) et élevés dans la thèque interne (23) et thèque externe (24) (bar= 100 μ m). (i) Vue d'ensemble d'un follicule tertiaire atrétique à œstrus avec un ARNm RE β faible dans les cellules des couches de thèque interne effondrées (25), et élevés dans les cellules de la lame basale épaisse (26) et dans la thèque externe (27) (bar= 200 μ m). (j) corps jaune au début du diœstrus avec des ARNm de RE β faible à modéré dans les cellules lutéine (28) (bar= 200 μ m). (k) Vue d'ensemble d'un corps blanc à l'œstrus avec un ARNm RE β faible à modéré dans les cellules du stroma interne (29) et ARNm RE β élevé dans les cellules du stroma profond (30) (bar= 100 μ m).

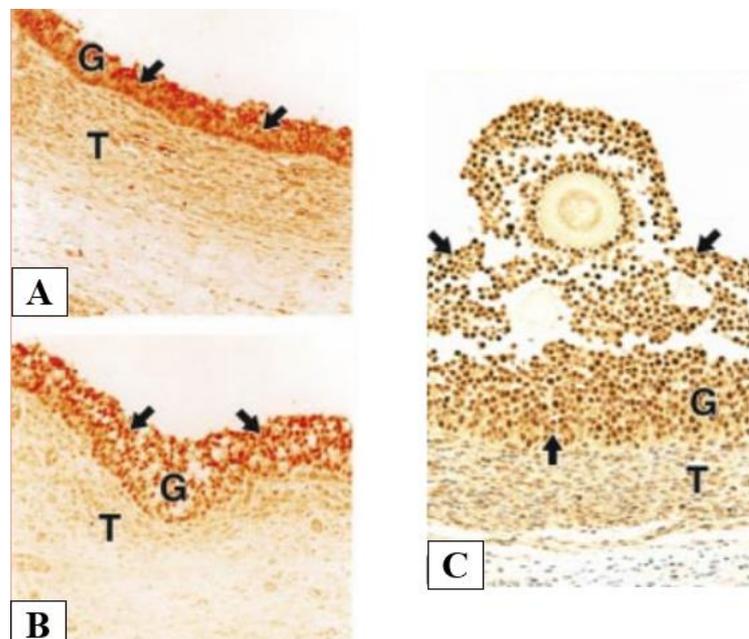
II. Localisation tissulaire

La localisation tissulaire ovarienne des deux types de RE diffère dans la thèque interne et externe, la granulosa, le CJ et le stroma ovarien, suggère que chaque type de récepteur a une fonction spécifique (D'Haeseleer et *al.*, 2006).

II.1. Cellules folliculaires

II.1.1. Cellules de la thèque interne et externe

Rosenfeld et *al.* (1999) ont observé, par immunohistochimie, un faible marquage des protéines des RE β au niveau de la thèque interne et la thèque externe des follicules antraux chez les bovins. En effet, il peut y avoir une légère expression des protéines RE β , qui peut être due à la faible concentration d'ARNm RE β dans ces cellules (Figure 29).

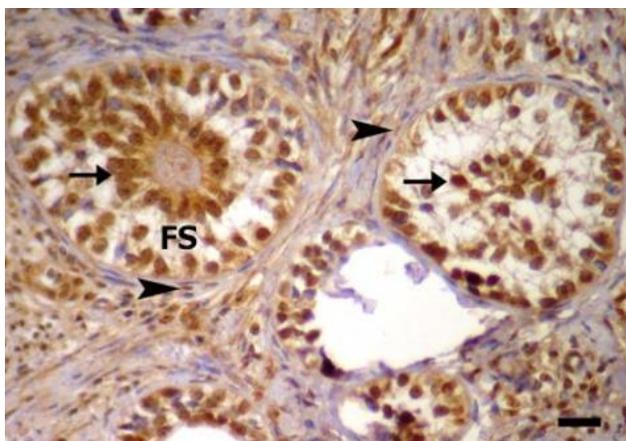


➡ : Noyaux des cellules de granulosa ; G : cellules de granulosa ; T : Cellules de la thèque ;
A : Follicule antral petit ; B : Follicule antral moyen ; C : Follicule antral grand

Figure 29 : Coloration immunohistochimique pour la protéine RE β dans les follicules ovariens bovins. G : $\times 200$ (Rosenfeld et *al.*, 1999)

En outre, les résultats de Akbalik et *al.* (2011) et Van den Broeck et *al.* (2002) ont rapporté qu'une immunoréaction des RE α a lieu dans certaines cellules de la thèque du follicules secondaires et tertiaire pendant la phase folliculaire et lutéale. Ces résultats montrent que les E2 ont un effet indirect sur le développement folliculaire via les RE α en raison de l'expression élevée des RE α dans les cellules de la thèque (Figure 30) (Akbalik et *al.*, 2011).

Les travaux de Amrozi et *al.* (2004) sur 9 vaches de la race « Japanese Black » bovine divisé en 3 groupes selon les jours du cycle: G1 (jour 7), G2 (jour 10) et G3 (jour 18), ont rapporté que l'expression des RE α la plus élevée a été détectée dans les cellules de la thèque interne et de la thèque externe du follicule dominant. Également, ils ont montré que l'intensité du marquage au niveau des cellules de la thèque interne du follicule dominant bovin est identique aux différents jours analysés à savoir au 7^{ème}, 10^{ème} et 18^{ème} jour du cycle œstral, ce qui démontre que l'expression de RE α est pratiquement la même pendant tout le cycle (Figure 31).



FS : Follicule secondaire ; ➡ : Cellules de la granulosa ; ▶ : thèque folliculaire

Figure 30 : Localisation immunohistochimique des RE α dans follicule secondaire l'ovaire bovin.

Barre d'échelle = 25 μ m (Akbalik et *al.*, 2011)

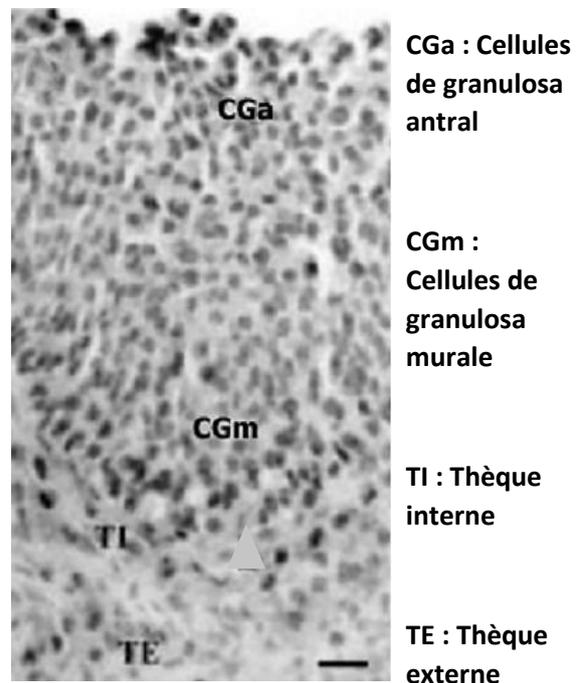


Figure 31 : Photomicrographies représentatives de l'expression des RE α dans le follicule dominant.

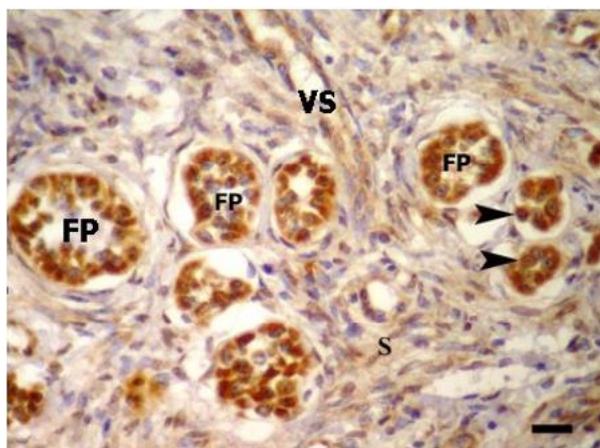
Barre d'échelle = 10 μ m (Amrozi et *al.*, 2004)

II.1.2. Cellules de la granulosa

Les travaux de Rosenfeld et *al.* (1999) basés sur l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie, plus Berisha et *al.* (2002) en utilisant la technique RT-PCR ont montré que les ARNm et la protéine des RE β sont présents dans les cellules de la granulosa des follicules antraux à divers stades de croissance folliculaire chez les bovins (Figure 29)

(Rosenfeld et *al.*, 1999) . Ces résultats suggèrent que les RE β ont un rôle dans la croissance et la maturation folliculaires.

Par ailleurs, les résultats de Akbalik et *al.* (2011) chez les bovins ont montré que l'immunoréactivité nucléaire RE α sont observé dans les cellules de la granulosa du follicule primaire, secondaire, tertiaire et préovulatoire pendant les phases folliculaire et lutéale (Figure 30 et 32). Ces résultats suggèrent que les RE α jouent un rôle important dans la croissance folliculaire ovarienne, le développement et l'ovulation.



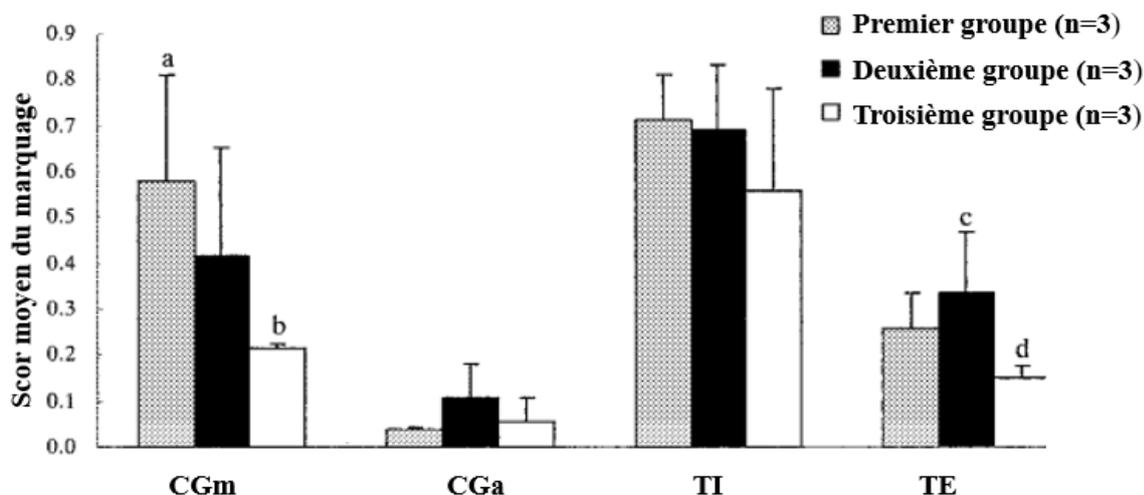
FP : Follicule primaire ; VS : Vaisseau sanguin ; S : Stroma ovarien

► : Cellules de la granulosa

Figure 32: Localisation immunohistochimique de RE α dans le follicule primaire de l'ovaire bovin. Barre d'échelle =25 μ m (Akbalik et *al.*, 2011)

Les résultats de Amrozi et *al.* (2004) ont montré que la distribution des RE α est détectée dans les cellules de granulosa murale exprimant une forte intensité de coloration alors que les cellules de granulosa antrale présentent une intensité de coloration variable (Figure 31).

Une comparaison réalisée par Amrozi et *al.* (2004) sur la distribution des récepteurs alpha des œstrogènes (RE α) dans le follicule dominant (FD) aux trois stades du cycle œstral chez les vaches noires japonaises a été évalué par immunohistochimie. Les résultats dans le premier (stade du jour 7) et le deuxième (jour 10) groupe ont montré que l'expression dans la thèque interne (TI) du (FD) est plus élevée par rapport à celle des cellules de la granulosa murale (CGm), des cellules de la granulosa antrale (CGa) et de la thèque externe (TE). Par ailleurs, l'expression RE α dans le troisième groupe (jour 18) est inférieure à celle du premier groupe en CGm, et il était également inférieur à celui du deuxième groupe en TE (Figure 33).



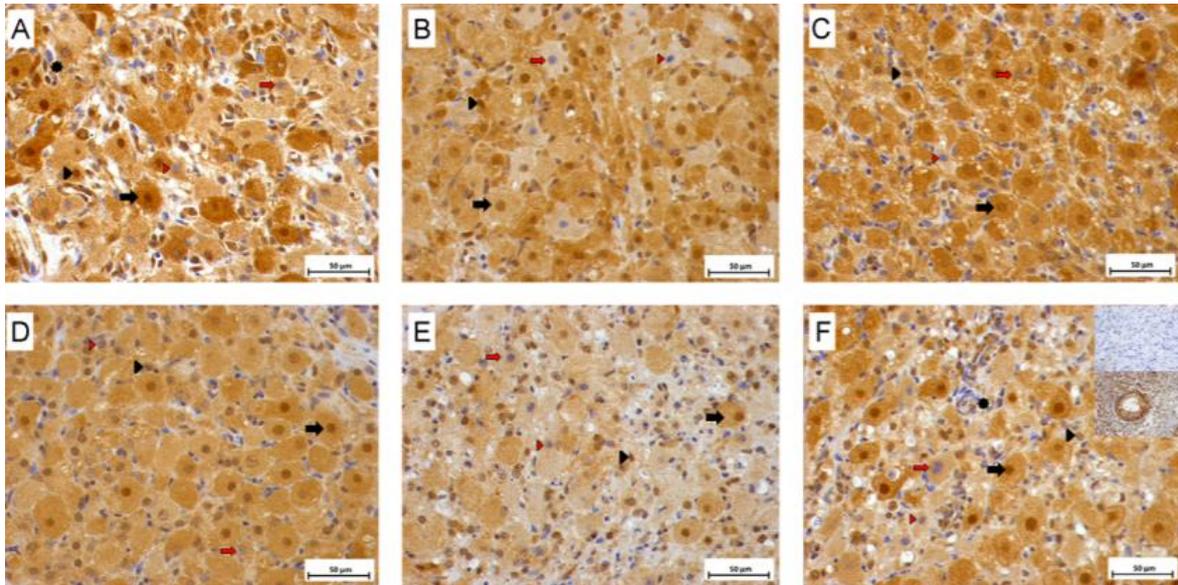
CGm= cellules de granulosa murales, CGa = cellules granulosa antrale, TI = cellules de thèque interne, TE = cellule de thèque externe. Premier groupe = stade du jour 7 (Emergence du (FD) dans la première vague folliculaire) ; Deuxième groupe = Jour 10 (régression précoce du FD) ; Troisième groupe = Jour 18 (FD préovulatoire)

Figure 33: Intensités moyennes de coloration pour RE α dans les cellules folliculaires du follicule dominant chez les bovins (Amrozi et *al.*, 2004).

II.2. Cellules lutéales

Les recherches menées par Shibaya et *al.* (2007), en utilisant la technique du Western blot, ont démontré que les protéines RE α et RE β sont exprimées au cours de la phase lutéale ainsi l'expression des RE α est plus élevée au début des stades lutéaux et mi lutéaux qu'aux autres stades et il était plus bas au stade lutéal régressé, d'où les RE α ont des rôles dans le maintien de la fonction du corps jaune. D'autre part la liaison totale des E2 aux RE β est élevée aux stades lutéaux et mi lutéaux mais aussi il est plus élevé à la phase de régression du CJ. Les RE β peuvent agir comme des facteurs lutéolytique au niveau du CJ bovin (Figure 34 et 35) (Ian et *al.*, 2013).

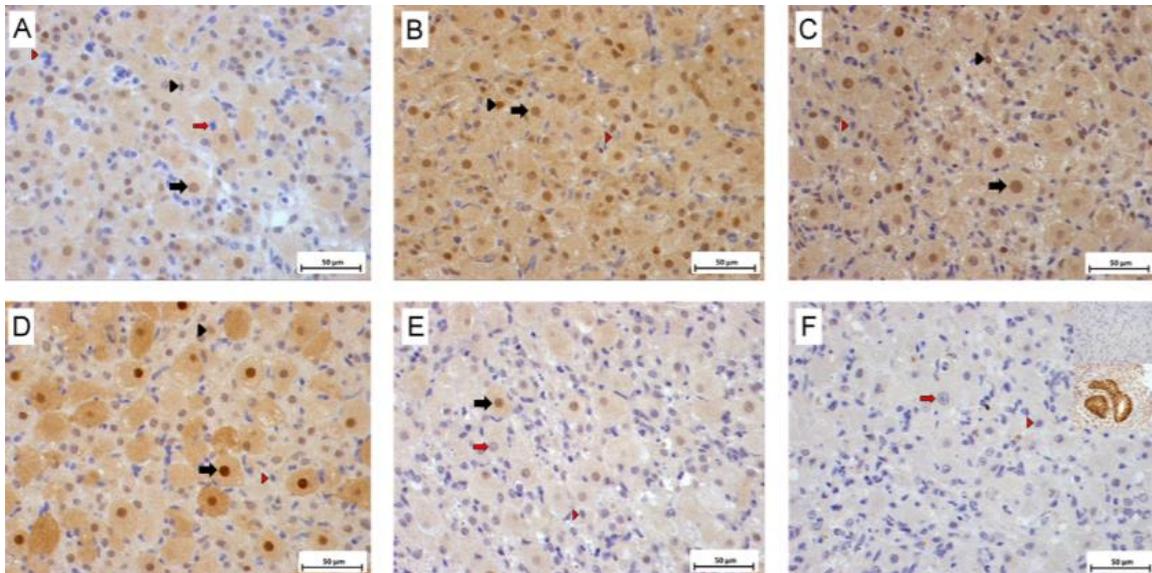
De plus, les résultats de Ian et *al.* (2013) ont montré l'importance de RE α dans le maintien et la viabilité des cellules du CJ (Figure 35) et dans la régulation positive des deux types de RE dans la sécrétion de la P4.



Signal positif : ➔ : Noyaux des grandes cellules lutéales ; ▶ : Noyaux des petites cellules lutéales
Signal négatif : ➔ : Noyaux des grandes cellules lutéales ; ▶ : Noyaux des petites cellules lutéales

Figure 34 : Immunolocalisation de RE β dans le corps jaune bovin tout au long du cycle œstral.

Jour 6 (A), jour 10 (B), jour 15 (C), jour 18 (D), jour 18 après lutéolyse (E), Après lutéolyse (F), contrôle négatif et positif, en médaillon (F). (Signal positif : Couleur brune / Signal négatif : couleur bleue). Immunohistochimie, DAB, contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer, grossissement G 400. Barre d'échelle = 50 μ m (Ian et al., 2013)



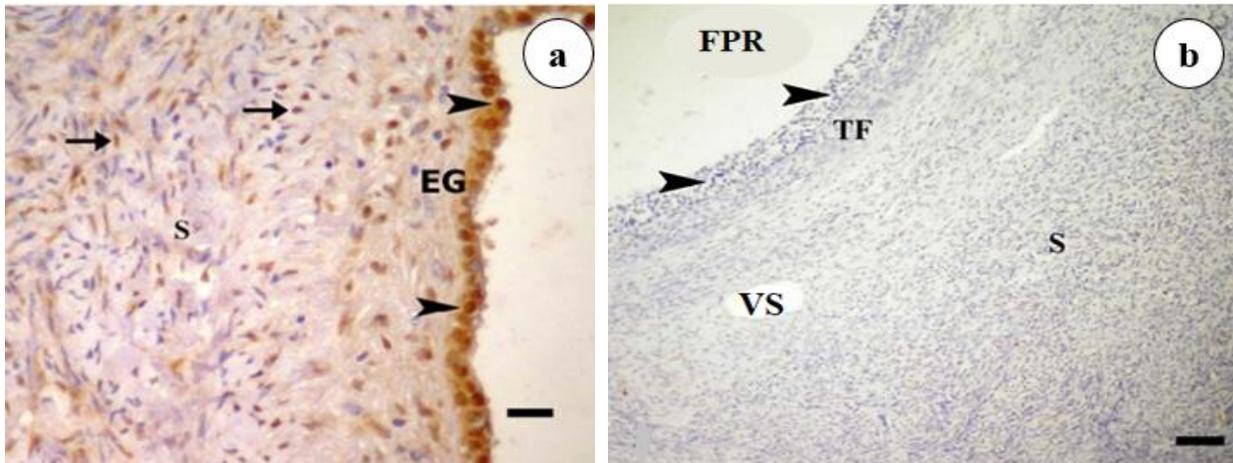
Signal positif : ➔ : Noyaux des grandes cellules lutéales ; ▶ : Noyaux des petites cellules lutéales
Signal négatif : ➔ : Noyaux des grandes cellules lutéales ; ▶ : Noyaux des petites cellules lutéales

Figure 35 : Immunolocalisation de RE α dans le corps jaune bovin tout au long du cycle œstral.

Jour 6 (A), jour 10 (B), jour 15 (C), jour 18 (D), jour 18 après lutéolyse (E), Après lutéolyse (F), contrôle négatif et positif, en médaillon (F). (Signal positif : Couleur brune / Signal négatif : couleur bleue). Immunohistochimie, DAB, contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer ; grossissement G x 400. Barre d'échelle =50 μ m (Ian et al., 2013)

II.3. Cellules du stroma ovarien

Selon Akbalik et *al.* (2011), l'immunoréactivité de RE α est élevée dans les cellules de stroma superficielles, des ovaires de vache, en contact direct avec les follicules et dans les cellules du stroma profond, et une expression plus élevée dans l'épithélium germinale. Ces auteurs suggèrent que, les RE α pendant la phase lutéale, interviennent dans les interactions stroma-épithélium (Figure 36).



S : Stroma ovarien ; EG : Epithélium germinale ; \blacktriangleright : Cellules du stroma ovarien ; \blacktriangleright : Cellules de l'épithélium germinale ; TF : Thèque folliculaire ; VS : vaisseau sanguin

Figure 36 : Localisation immunohistochimique des RE α dans le stroma ovarien (A) et contrôle négatif dans l'ovaire bovin dans lequel un sérum non-immun est utilisé à la place de anticorps primaire (B) Barre d'échelle =50 μ m (Akbalik et *al.*, 2011)

Enfin, les travaux de Pelletier et *al.* (2000) ont montré que, pour un déroulement normal de la fonction de reproduction de l'ovaire la présence des deux sous-types de RE est nécessaire. De plus Rosenfeld et *al.* (1999) ont rajouté que seuls les ovaires de rat et de bovin ont une expression de la protéine RE β dans les cellules de la granulosa des follicules antraux (Pelletier et *al.*, 2000; Rosenfeld et *al.*, 1999).

Conclusion

Ce présent travail montre qu'au niveau ovarien (cortex et médulla) chez les bovins, les deux sous-types de récepteurs aux œstrogènes (RE α et RE β) révélés marqué par la technique d'immunohistochimie, présentent une expression variable en fonction des phases du cycle, du type folliculaire et du type de cellule.

L'expression du marquage des récepteurs aux œstrogènes a été détectée dans les cellules de la thèque et les cellules de granulosa des follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaire sains et atreétique, le follicule préovulatoire, ainsi que dans le stroma ovarien et dans les cellules lutéales du corps jaune.

Références bibliographies

- Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H., Ginther, O.J., 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Reproduction and fertility* 94, 177-188.
- Akbalik, M., Sagsoz, H., Guney saruhan, B., 2011. Localization of Estrogen Receptor Alpha and Progesterone Receptor B in the Bovine Ovary During the Follicular and Luteal Phase of the Sexual Cycle. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 17, 795-802.
- Amrozi, K., Kamimura, S., Ando, T., Hamana, K., 2004. Distribution of Estrogen Receptor Alpha in the Dominant Follicles and Corpus Luteum at the Three Stages of Estrous Cycle in Japanese Black Cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 66, 1183-1188.
- Amstalden, M., Williams, G.M., 2014. Neuroendocrine Control of Estrus and Ovulation. In, *Bovine Reproduction*. John Wiley & Son, pp. 204-215.
- Arnal, J.F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J., 2017. Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiological Reviews* 97, 1045-1087.
- Aronica, S.M., Katzenellenbogen, B.S., 1993. Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol* 7, 743-752.
- Baêge, R., Gustafsson, H., Larsson, B., Forsberg, M., Rodriguez, M.H., 2002. Repeat breeding in dairy heifers: Follicular dynamics and characteristics of the oestrus cycle in relation to sexual hormonal patterns. *Theriogenology* 57, 2257-2269.
- Ball, P.J.H., Peters, A.R., 2004. *Anatomy*. In, *Reproduction in Cattle*. Third Edition Blackwell Publishing, Oxford pp. 13-27.
- Baulieu, E., 1975. Some aspects of the mechanism of action of steroid hormones. *Molecular and Cellular Biochemistry* 7, 157-174.
- Berisha, B., Pfaffl, M.W., Schams, D., 2002. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. *Endocrine* 17, 207-214
- Bo, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J., 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 31-40.
- Bonnes, G., Desclauze, J., Drogoul, C., Gadoud, R., Jussiau, R., Le Loc'h, A., Montméas e, L., Robin, G., 1988. *Reproduction des mammifères d'élevage*. In. Collection INRAP, p. 239.
- Boukenaoui-Ferrouk, N., Moudilou, E., Amirat, Z., Exbrayat, J., Khammar, F., 2017. Morphometric study and immunolocalization of androgen receptors in epididymis during postnatal development in d'Man lamb reared under arid environment in Algeria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 23, 683-689.
- Burke, C.R., Boland, M.P., Macmillan, K.L., 1999. Ovarian responses to progesterone and oestradiol benzoate administered intravaginally during dioestrus in cattle. *Animal Reproduction Science* 55, 23-33.
- Claire, W.D., Swann, R.W., 1982. Is oxytocin an ovarian hormone? *Nature* 297, 225-227.
- Cui, J., Shen, Y., Li, R., 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 19, 197-209.
- D'Haeseleer, M., Cornillie, P., Simoens, P., van den Broeck, W., 2006. Localization of oestrogen receptors within various bovine ovarian cell types at different stages of the oestrous cycle. *Anat Histol Embryol* 35, 334-342.

- Dorrington, J.H., Moon, Y.S., Armstrong, D.T., 1975. Estradiol-17beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 97, 1328-1331.
- Driancourt, M.A., 1991. Follicular Dynamics in Sheep And Cattle. *Theriogenology* 35, 55-79.
- Drion, P., Beckers, J.F., Ectors, F., Hanzen, C., Houtain, J.Y., Lonergan, P., 1996a. Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogénèse et atresie. numéro spécial :Reproduction des ruminants.Point Vétérinaire 28, 37-47
- Drion, P., Beckers, J.F., Ectors, F., Hanzen, C., Houtain, J.Y., Lonergan, P., 1996b. Régulation de la croissance folliculaire et lutéale: 2. Ovulation, corps jaune et lutéolyse. Numéro spécial : Reproduction des ruminants .Point Vétérinaire 28, 49-65.
- Enmark, E., Gustafsson, J.Å., 1999. Oestrogen receptors – an overview. *Journal of Internal Medicine* 246, 133-138.
- Epsey, L.L., 1992. A review of factors that could influence membrane potentials of ovarian follicular cells during mammalian ovulation. *Acta endocrinologica* 126, 1-31.
- Erickson, B.H., 1966. Development and radio response of the prenatal bovine ovary. *J.Reprod.Fert* 10, 97-105.
- Fatet, A., Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., 2011. Reproductive cycle of goats. *Anim Reprod Sci* 124, 211-219.
- Forde, N., Beltmana, M.E., Lonergana, P., Diskinc, M., Rochea, J.F., Crowe, M.A., 2011. Estrous cycles in Bos taurus cattle. *Animal Reproduction Science* 124, 163–169.
- Fortune, J.E., 1994. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biology of Reproduction* 50, 225-232.
- Gayraud, V., 2007. Physiologie de la reproduction des mammifères. Ecole Nationale Vétérinaire ,Toulouse, 198p.
- Genton, C.Y., 2006. L'immunohistochimie: Son principe, ses applications et ses limites. *Clinics in Mother and Child Health* 3.
- Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L., 1989. Composition and Characteristics of Follicular Waves during the Bovine Estrous Cycle *Animal Reproduction Science* 20, 187-200.
- Gourreau, J.M., Bendali, F., 2008. Maladies des Bovins. In. France Agricole, paris, p. 458.
- Gronemeyer, H., Laudet, V., 1995. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2, 1173-1308.
- Hanzen, C., Lourtie, O., Drion, P.V., , 2000. Follicular development in cows Morphological and cinetic aspects Article publié dans les Annales de Médecine Vétérinaire 144, 223-235.
- Heard, D.J., Norby, P.L., Holloway, J., Vissing, H., 2000. Human ERR γ , a Third Member of the Estrogen Receptor-Related Receptor (ERR) Subfamily of Orphan Nuclear Receptors: Tissue-Specific Isoforms Are Expressed during Development and in the Adult. *Molecular Endocrinology* 14, 382-392.
- Hillier, S.G., 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reproduction* 9, 188-191.
- Hughes, F.M., Gorospe, W.C., 1991. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 129, 2415-2422.
- Hulshof, S.C.J., Figuereido, J.R., Beckers, J.F., Bevers, M.M., Ven den hurk, R., 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet.Quartely* 16, 78-80.
- Ian, M., Rodrigues, M., Fujihara, C., Filho, W., Oba, E., Amorim, R., Ferreira, J.C.P., 2013. Localization patterns of steroid and luteinizing hormone receptors in the corpus

- luteum of Nelore (*Bos taurus indicus*) cows throughout the estrous cycle. *Livestock Science* 155, 442–453.
- Ireland, J.J., Murphee, R.L., Coulson, P.B., 1980. Accuracy of Predicting Stages of Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum. *Journal of Dairy Science* 63, 155-160.
 - Laborgne, M.C., Tanguy, J.M., Foisseau, J.M., Selin, I., Vergonzanne, G., Wimmer, E., 2014. L'anatomie des appareils reproducteurs. In: Editions, E. (Ed.), *Reproduction des animaux d'élevage*, pp. 11-35.
 - Lannigan, D.A., 2003. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68, 1-9.
 - Lapointe, E., Boerboom, D., 2011. WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 3, 276-285.
 - Lorke, D., Süsens, U., Borgmeyer, U., Hermans-Borgmeyer, I., 2000. Differential expression of the estrogen receptor-related receptor gamma in the mouse brain. *Brain research. Molecular brain research* 77, 277-280.
 - Lussier, J., Matton, P., Dufour, J.J., 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J.Reprod.Fert* 81, 301-307.
 - Monniaux, D., Caraty, A., Clement, F., Dalbies-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gerard, N., Mermillod, P., Monget, P., Uzbekova, S., 2009. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *INRAE Productions Animales* 22, 59-76.
 - Monniaux, D., Chupin, D., Saumande, J., 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19, 55-64.
 - Moorey, S.E., Read, C.C., Perry, G.A., Mclean, M.K., Ciernia, L.A., Ketchum, J.N., Smith, M.F., Patterson, D.J., 2019. Physiology of the estrus cycle. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies In Beef Cattle*, 10-31.
 - Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J., Scanlan, T.S., 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277, 1508-1510.
 - Palermo, R., 2007. Actions différentielles de la FSH et de la LH pendant la folliculogénèse. *Reproductive BioMedicine* 15 326-337
 - Paris, A., André, F., Antignac, J., Le Bizec, B., Bonneau, M., Briant, C., Caraty, A., Chilliard, Y., Cognie, Y., Combarous, Y., Cravedi, J., Fabre-Nys, C., Fernandez-Suarez, A., Fostier, A., Humblot, P., Laudet, V., Leboeuf, B., Louveau, I., Malpoux, B., Zalko, D., 2006. Hormones et promoteurs de croissance en productions animales : de la physiologie à l'évaluation du risque. *INRAE Productions Animales* 19, 151-240.
 - Parish, J.A., 2016. The estrous cycle of cattle. *Revue Sciences animales et laitières*
 - Pavao, M., Traish, A.M., 2001. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor α and β . *Steroids* 66, 1-16.
 - Pelletier, G., Labrie, C., Labrie, F., 2000. Localization of oestrogen receptor a, oestrogen receptor b and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology* 165, 359-370.
 - Perry, G., 2004. The bovine estrous cycle. *South Dakota State University-Cooperative Extension Service-USDA*, 100.
 - Peters, G.A., Khan, S.A., 1999. Estrogen Receptor Domains E and F: Role in Dimerization and Interaction with Coactivator RIP-140. *Molecular Endocrinology* 13, 286-296.
 - Rache, C.H., Owens, R.E., Fleeger, J.L., Newton, H.J., Harms, P.G., 1980. Pattern of Plasma Luteinizing Hormone in the Cyclic Cow: Dependence upon the Period of the Cycle. *Endocrinology* 107, 498-503.
 - Reece, W.O., 2004. Female reproduction . In: Troy, B.D. (Ed.), *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 403 -441.

- Rich, T.D., Turman, E.J., 1980. Reproductive Tract Anatomy and Physiology of the Cow. Beef Cattle Handbook, 1-7.
- Roelofs, J., Lopez-Gatiuis, F., Hunter, R.H., Van Eerdenburg, F.J., Hanzen, C., 2010. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology* 74, 327-344.
- Rosenfeld, C.S., Yuan, X., Manikkam, M., Calder, M.D., Garverick, H.A., Lubahn, D.B., 1999. Cloning, Sequencing, and Localization of Bovine Estrogen Receptor- β within the Ovarian Follicle. *Biology of Reproduction* 60, 691-697.
- Russe, I., 1983. Oogenesis in Cattle and Sheep. *Bibl Anat* 24, 77-92.
- Salfen, B.E., Cresswell, J.R., Xu, Z.Z., Bao, B., Garverick, H.A., 1999. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 115, 15-21
- Schnobrich, M.R., 2018. Disorders of the Reproductive Tract. In: Reed, S.M., Bayly, W.M., Sellon, D.C. (Eds.), *Equine internal Medicine (Fourth Edition)*. W.B. Saunders, pp. 1217-1364.
- Shibaya, M., Matsuda, A., Hojo, T., Acosta, T.J., Okuda, k., 2007. Expressions of estrogen receptors in the bovine corpus luteum: Cyclique changes and effect of prostaglandin F2 α and cytokines *Journal of reproduction and development* 53, 1059–1068.
- Singh, J., Adams, G.P., 2014. Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. In: Hopper, R.M. (Ed.), *Bovine Reproduction*. John Wiley & Sons., pp. 219-244.
- Spicer, L.J., Echternkamp, S.E., 1986. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle. *J. Anim. Sci* 62, 428--451.
- Stevenson, J.S., 2007. Clinical Reproductive Physiology of the Cow. In, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition)*. Saunders, Elsevier pp. 258-270.
- Sunderland, S., Crowe, M., Boland, M., Roche, J., Ireland, J., 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 101, 547-555.
- Sveberg, G., Rogers, G.W., Cooper, J., Refsdal, A.O., Erhard, H.W., Kommisrud, E., Buckley, F., Waldmann, A., Ropstad, E., 2015. Comparison of Holstein-Friesian and Norwegian Red dairy cattle for estrus length and estrus signs. *Journal of Dairy Science* 98, 2450-2461.
- Teyssier, C., Belguise, K., Galtier, F., Chalbos, D., 2001. Characterization of the Physical Interaction between Estrogen Receptor and JUN Proteins. *The Journal of biological chemistry* 276, 36361-36369.
- Thibault, c., Levasseur, M.C., 2001. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, Vol. 928p. Ellips, INRA, paris
- Tsai, M.J., O'Malley, B.W., 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual review of biochemistry* 63, 451-486.
- Van den Broeck, W., Coryn, M., Simoens, P., Lauwers, H., 2002. Cell-specific Distribution of Oestrogen Receptor-alpha in the Bovine Ovary. *Reproduction in domestic animals* , *Zuchthygiene* 37, 291-293.
- Wandji, S.A., Fortier, M.A., Siurard, M.A., 1992. Differential response to gonadotropins and prostaglandins E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development. *Biol.Reprod* 46, 1034-1041.
- Wattiaux, M., 2006. *Detection des chaleurs, saillie Naturelle et insemination artificielle*. Institut Babcock, 1-4.
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S., Güpür, G., Muyan, M., 2017. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology* 16, 4-20.

