

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUP



361THV-2

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB, BLIDA

FACULTÉ DES SCIENCES AGRO-VÉTÉRINAIRES ET BIOLOGIQUES

DÉPARTEMENT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de docteur vétérinaire

Thème :

**Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes
au niveau testiculaire chez les agneaux
de race D'Man au cours de la croissance**

Présenté par :

Ouahchia Camélia

et

Righi Assia

Soutenu publiquement le : 15/07/2010

Devant le jury :

Président de jury : Adel D. M.A.A, USDB.

Examinatrice : Boumahdi Z. M.A.A, USDB.

Examineur : Kaddour A. M.A.B, USDB.

Promotrice ; Boukenaoui N. M.A.A, USDB.

Promotion 2009-2010

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB, BLIDA
FACULTÉ DES SCIENCES AGRO-VÉTÉRINAIRES ET BIOLOGIQUES
DÉPARTEMENT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES**



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de docteur vétérinaire

Thème :

**Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes
au niveau testiculaire chez les agneaux
de race D'Man au cours de la croissance**

Présenté par :

Ouahchia Camélia et Righi Assia

Soutenu publiquement le : 15/07/2010

Devant le jury :

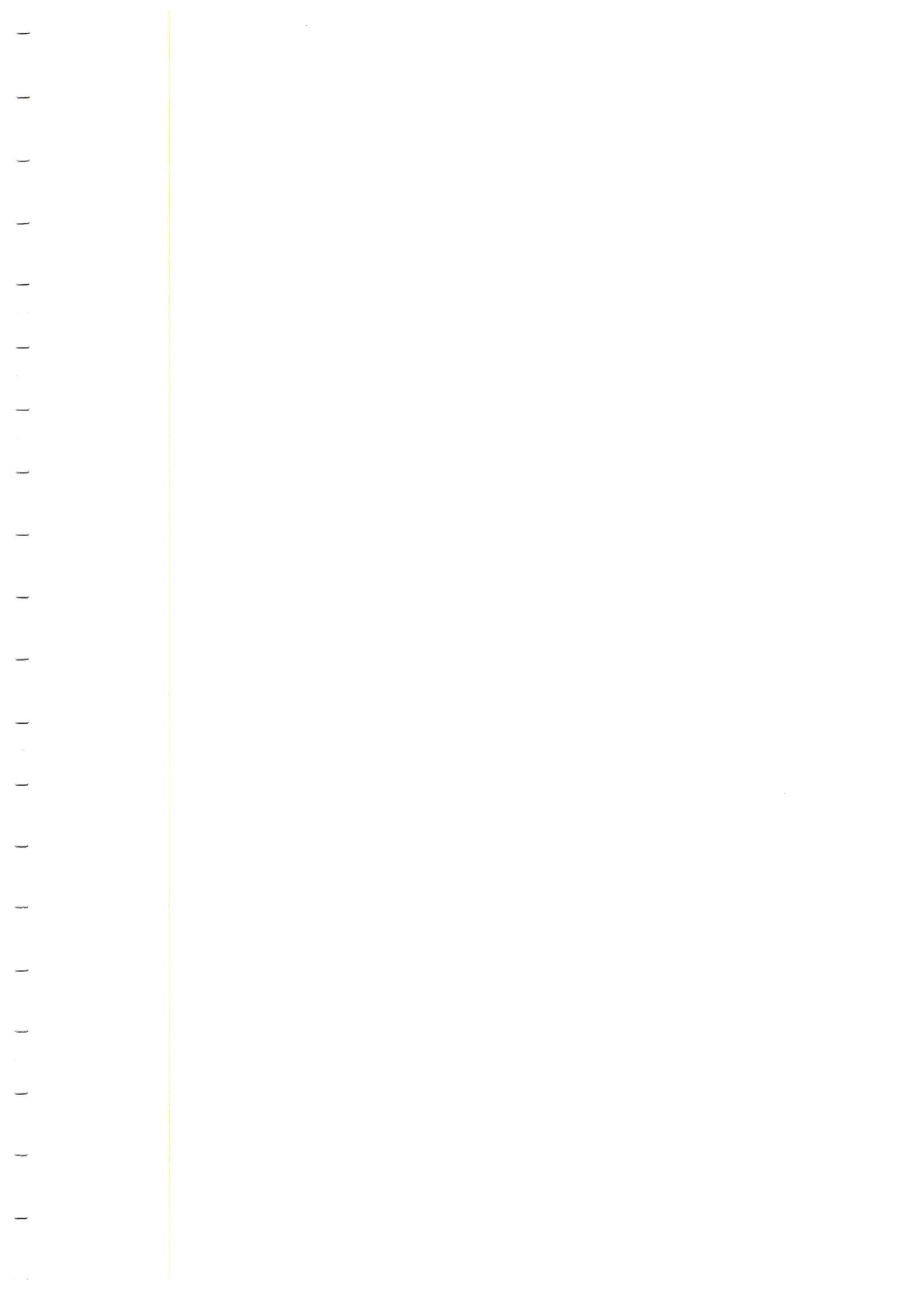
Président de jury : Adel D. M.A.A, USDB.

Examinatrice : Boumahdi Z. M.A.A, USDB.

Examineur : Kaddour A. M.A.B, USDB.

Promotrice : Boukenaoui N. M.A.A, USDB.

Promotion 2009-2010



Remerciements

Nous remercions tout d'abord, ALLAH.

Nous ne saurions assez remercier notre promotrice Madame Bouknaoui, pour nous avoir encadrées, guidées et pour sa disponibilité de tous les instants.

Nous remercions le Dr. Adel pour avoir accepté de présider notre jury.

Nous tenons aussi à remercier madame Boumahdi et le Dr. Kaddour pour avoir accepté d'évaluer notre travail.

Un immense merci à nos parents pour nous avoir donnés l'opportunité de parvenir au bout de ce long chemin universitaire.

Nous remercions tout le personnel du Laboratoire de Recherches sur les Zones Arides (LRZA), écophysiologie et endocrinologie animale (USTHB, Alger).

Nous remercions tout le personnel de la station expérimentale d'El-Meniaa.

Nous remercions également tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont participé à la réalisation de ce modeste travail.

Nous remercions le Dr. Ferrouk pour son aide et ses encouragements.

Nous tenons aussi à remercier tout les enseignants ainsi que tout le personnel administratif du Département des Sciences Vétérinaires de Blida.

Enfin merci à tous les petits  qui nous ont tant donné ...

Dédicaces

A ma mère qui m'a portée dans son ventre pendant neuf mois, qui m'a amenée dans cette vie et m'a offert tant d'affection, d'amour et de soutien.

A mon père, qui m'as appris que la vie est un combat qui vaut la peine d'être vécu.

Grâce à dieu puis à vous qu'aujourd'hui, je vais cueillir le fruit de mes efforts. « Que dieu vous garde pour nous »

A mon frère Mohamed Tahar que dieu te protège

A mes très chères sœurs Afrahi et Maria.

A mon cher grand père pour son soutien.

A tous les membres de ma famille qui m'ont tant encouragée et soutenue tout au long de mon cursus scolaire et universitaire, particulièrement ; Madani, Brahim et mes tantes: Amel, Saliha, Fatna, Fouzia, Fatiha, Amel, Salima, Zhour

Aux familles Righi et Benkouar

A celle qui a partagé avec moi le bonheur et le malheur loin de ma famille ma chère amie Sonia.

A tata Malika et tonton Ali pour m'avoir considérée comme un membre de leur famille.

A Mémé Houria la plus merveilleuse des grand-mères, pour son inquiétude, sa tendresse et ses prières.

A ma bienaimée Célia «minoucha »

A ma promotrice madame Boukenaoui qui a fortement enrichi ma formation. J'ai beaucoup appris à son contact et je voudrais lui témoigner toute ma reconnaissance pour ses commentaires, son aide et son soutien.

A mon ange gardien Mohamed, sans son soutien et sa présence je n'aurais jamais pu continuer.

A mes copines Saida, Sousi, Zohra, KouKou, Farida, Naima, Tounssia, Assia.

Aux docteurs : Benlambarek Maamar, Khadidja, Souhila : pour tout ce que vous m'avez appris.

A tout mes amis(e) et collègues.

A tous ceux qui me sont chers et A ceux qui ont cru en moi

Je dédie ce modeste travail :

Assia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

- ♥ *Ma très chère mère, pour sa tendresse, sa douceur, sa sagesse, son soutien, pour m'avoir encouragée sans relâche dans mes études et particulièrement dans cette dernière aventure* ♥

- ♥ *Mon cher père, pour avoir toujours été présent pour moi, pour m'avoir appris à donner le meilleur de moi-même et à ne jamais baisser les bras devant les difficultés* ♥

- ♥ *Mon amour de sœur, mon petit diable adoré, pour avoir supporté mon sale caractère, pour m'avoir toujours soutenue et encouragée* ♥

- ♥ *Ma grand-mère, ma merveilleuse mémé qui se fait toujours du souci pour moi* ♥

- ♥ *Mon défunt grand-père, ma source d'inspiration, qui m'a inculqué l'amour du savoir et des études* ♥

- ♥ *Mon regretté oncle Ali* ♥

- ♥ *Mes oncles : Moussa, Ben aicha, Sid Ahmed et Tewfik, ainsi que leurs épouses : Amel, Mouna et Tata Nadia* ♥

- ♥ *Mes cousins et cousines : Khalil, Maher, Malik, Dalia, Ahlem et Yasmine* ♥

- ♥ *Ma grand-mère et mon défunt grand-père paternel* ♥

- ♥ *Mon unique tante Zohra et sa petite famille* ♥

♥ *Mon cousin Mourad* ♥

♥ *Mon binôme : ma sœur de cœur Assia, pour avoir supporté toutes mes crises de nerfs, pour toutes nos aventures et mésaventures qui nous ont bien fait comprendre, que ce qui nous ne tue pas nous rend plus fortes, maintenant nous sommes prêtes à tout affronter dans la vie* ♥

♥ *Ma deuxième famille : Tata Fouzia, Tonton Kouider, Afrah, Maria et Taher, pour votre hospitalité et votre gentillesse* ♥

♥ *Ma promotrice Madame Boukènaoui-Ferrouk N., pour m'avoir écoutée, conseillée et encadrée, pour sa pondération, son intérêt permanent et son extrême gentillesse.*

Je souhaite à d'autres la chance que j'ai eu d'être encadrée par elle ! ♥

♥ *Mon frère de cœur Ahmed* ♥

♥ *Mes amis(e)s : Yasmine, Farida, Assia (T), Nadja, Sarah, Chalabia, Imène, Amel, Mohamed et mon cher Sammy* ♥

♥ *Que tous ceux que j'ai oubliés de citer m'excusent !* ♥

😊😊 *Camélia* 😊😊

SOMMAIRE

RESUMES	I-II-III
LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX	IV -V
LISTE DES ABREVIATIONS	VI
INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Rappels anatomiques et histologiques sur l'appareil génital du bélier	2
I.1. Anatomie de l'appareil génital.....	2
I.1.1 Les testicules.....	2
I.1.2. Les canaux excréteurs.....	3
I.1.3. Le pénis.....	3
I.1.4. Les glandes annexes.....	3
I.2. Histologie du testicule et spermatogénèses.....	4
I.2.1 Histologie du testicule.....	4
I.2.2. Spermatogenèse.....	6
Chapitre II : Rappel sur la fonction endocrine du testicule	9
II.1. Régulation hypothalamo-hypophyso-testiculaire.....	9
II.2. Androgènes testiculaires.....	10
II.2.1. Biosynthèse des androgènes.....	11
II.2.2. Sécrétion et transport des androgènes.....	13
II.2.3. Métabolisme des androgènes	13
II.2.4. Récepteurs des androgènes	13
II.2.5. Rôle des androgènes dans la fonction de reproduction.....	14
Chapitre III : Généralités sur l'immunohistochimie	15
III.1 Principe de l'immunohistochimie.....	15
III.2. Rappels des constituants de l'immunoreaction.....	15
III.3. Etapes de préparation des tissus pour l'étude immunohistochimie.....	17
III.3.1. Fixation.....	17
III.3.2. Déshydratation.....	18
III.3.3. Inclusion en paraffine.....	19
III.3.4. Confection des blocs de paraffine.....	19
III.3.5. Coupe au microtome.....	19
III.3.6. Déparaffinage et hydratation	19
III.4. Etapes d'immunohistochimie (ou immunoreaction ou IHC) proprement dite.....	20
III.4.1. Démasquage antigénique.....	20
III.4.2. Blocage des sites non spécifiques.....	23
III.4.3. Anticorps primaire.....	23
III.4.4. Révélation de l'immunoréaction.....	25
III.4.5. Contre coloration.....	30
III.4.6. Déshydratation.....	30
III.4.7. Montage des lames.....	30
III.4.8. Observation au microscope photonique.....	31
III.4.9. Les paramètres à maîtriser.....	31

PARTIE EXPERIMENTALE	
MATERIEL ET METHODES	33
1. Matériel animal.....	33
1.1. Description de la race D’Man.....	33
1.2. Protocole expérimentale.....	33
1.3. Le protocole utilisé pour la mise en évidence des récepteurs des androgènes :	
Immunohistochimie.....	34
RESULTATS	43
DISCUSSION	51
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	53
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54

RÉSUMÉS

RÉSUMÉ

L'objectif de notre travail est de mettre en évidence la localisation des récepteurs aux androgènes (RA) au niveau des testicules par la technique d'immunohistochimie. Des prélèvements testiculaires ont été réalisés sur des agneaux âgés de 2 à 5 mois pour l'étude immunohistochimique.

Les résultats obtenus par l'étude immunohistochimique révèlent :

- Dans le compartiment interstitiel, la présence des RA au niveau des noyaux de quelques cellules de Leydig.
- Dans le compartiment tubulaire, une localisation des RA au niveau des noyaux :
 - Des cellules de Sertoli.
 - Des cellules de la lignée germinales.
 - Des cellules myoïdes pérیتubulaires.

Au cours du développement du testicule des agneaux âgés de 2 mois et jusqu'à l'âge de 5 mois les RA sont détectés par immunohistochimie uniquement dans le noyau des cellules testiculaires (cellules de Leydig, cellules de Sertoli, cellules germinales et les cellules myoïdes pérیتubulaires).

Mots clés : Immunohistochimie, récepteurs aux androgènes, testicule, agneau, D'Man.

* *
*

ABSTRACT

The goal of our work is to localize androgen receptors (AR) at level of testes by immunohistochemistry technique. Testicular samples have been made on lambs aged from 2 to 5 months old for the immunohistochemical study.

The results obtained by immunohistochemical study reveal:

- In the interstitial compartment, the presence of AR at level of nucleus of some Leydig cell.
- In the tubular compartment, a localization of AR at level of nucleus of:
 - Sertoli cells.
 - Germ cells of the lineage.
 - Pertubular myoïdes cells.

On the development of the testicle of lambs aged from 2 months up to 5 months old, AR are detected by immunohistochemistry only in nucleus of testicular cells (Leydig cells, Sertoli cells, germ cells and pertubular myoïdes cells).

Keywords: Immunohistochemistry, androgen receptors, testicle, lamb, D'Man.

* *
*

ملخص

الهدف من عملنا إظهار مواقع مستقبلات الأندروجينات على مستوى الخصيتين بتقنية الإيمونوهيستوشيمي.

أخذت عينات من خصيتي أحمال يتراوح سنهم من 2 إلى 5 أشهر للدراسة الإيمونوهيستوكيميائية.

النتائج التي تم الحصول عليها بتقنية الإيمونوهيستوشيمي تكشف:

- في النسيج البيني، على تواجد مستقبلات الأندروجينات على مستوى أنوية بعض خلايا ليدغ.

- في الأنابيب المنوية، على تمركز مستقبلات الأندروجينات على مستوى أنوية:

- خلايا سرتولي.

- خلايا السلالة المنوية.

- خلايا الميويد المحيطة بالأنبوب المنوي.

خلال تطور خصية الأحمال من 2 إلى 5 أشهر لوحظ تواجد مستقبلات الأندروجينات باستعمال

الإيمونوهيستوشيمي فقط على مستوى أنوية خلايا الخصيتين (خلايا ليدغ ، خلايا سرتولي ، خلايا السلالة المنوية

و الخلايا الميويد المحيطة بالأنبوب المنوي).

الكلمات الرئيسية: إيمونوهيستوشيمي، مستقبلات الأندروجينات، خصية ، حمل، البادمان.

* *

*

**LISTE DES FIGURES
ET
DES TABLEAUX**

Liste des figures

N° Figure	Titre	Page
1	: Anatomie de l'appareil génital du bélier.....	2
2	: Représentation schématique de l'anatomie du testicule.....	3
3	: Représentation schématique de l'anatomie du système reproducteur mâle, indiquant la situation des différents organes et glandes.....	4
4	: Coupe transversale d'un tube séminifère.....	5
5	: Représentation schématique de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle au cours de la spermatogénèse.....	7
6	: Représentation schématique de la spermiogénèse.....	8
7	: Représentation schématique de la structure d'un spermatozoïde.....	8
8	: Mécanismes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et régulation de la fonction testiculaire.....	9
9	: Régulation de la stéroïdogenèse au niveau de la cellule de Leydig.....	11
10	: Biosynthèse de la testostérone au niveau des cellules de Leydig.....	12
11	: Schéma du principe de la réaction d'immunohistochimie.....	15
12	: Schéma de la structure d'un anticorps.....	16
13	: Batterie de déparaffinage et d'hydratation.....	20
14	: Représentation schématique des Anticorps polyclonaux et monoclonaux.....	23
15	: Représentation schématique d'une immunoréaction directe.....	25
16	: Système Peroxydase Anti Peroxydase (PAP).....	25
17	: Système APAAP.....	26
18	: Schéma de la Streptavidine (Avidine), Biotine, Peroxydase.....	27
19	: Avidine Peroxydase.....	27
20	: Anticorps secondaire biotinylé.....	27
21	: Système Biotine –Avidine-Peroxydase.....	27
22	: Système ABC.....	28
23	: Batterie de déshydratation.....	30
24	: Montage lame – lamelle.....	31
25	: Agneau de race D'Man.....	33
26	: Etapes du prélèvement des testicules.....	34
27	: Prélèvement dans une cassette portant les références de l'animal.....	35
28	: Cassettes immergées dans le fixateur.....	35
29	: Moules métalliques.....	36
30	: Immobilisation du prélèvement.....	36
31	: Bloc de paraffine.....	36
32	: Coupe au microtome type Leica.....	36
33	: Etalement du ruban de coupe sur un plateau.....	36
34	: Coupe flottante dans le bain- marie.....	37
35	: Récupérer la coupe.....	37
36	: Boîte (A) et lames (B) de type « Superfrost plus ».....	37
37	: Batterie de déparaffinage.....	38
38	: Rinçage au PBS.....	38
39	: Flacon contenant le PBS.....	39
40	: Solution de démasquage.....	39
41	: Cocotte minute « SEB ».....	39
42	: Cocotte minute sous pression.....	39
43	: Chambre humide sur un agitateur.....	39
44	: Kit VECTASTAIN (A) et les réactifs(B) du kit VECTASTAIN.....	40

45	: Kit de blocage des biotines endogènes et produits.....	40
46	: Liquide de montage « Eukitt ».....	41
47	: Lame prête à être observée.....	41
48	: Microscope photonique.....	42
49	: Histologie des coupes transversales des testicules des agneaux âgés de 2 mois. Coloration Azan	44
50	: Histologie des coupes transversales des testicules des agneaux âgés de 4 mois Coloration Azan modifiée.....	44
51	: Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes au niveau des coupes transversales de testicules des agneaux de race D'Man, âgés de 2 mois.....	46
52	: Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes au niveau des coupes transversales de testicules des agneaux de race D'Man, âgés de 3 mois.....	47
53	: Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes au niveau des coupes transversales de testicules des agneaux de race D'Man, âgés de 4 mois.....	48
54	: Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes au niveau des coupes transversales de testicules des agneaux de race D'Man, âgés de 5 mois.....	49
55	: Coupe transversale des testicules d'agneau âgé de 2 mois : Contrôle négatif.....	50

Liste des tableaux

N° Tableau	Titre	Page
I	: Avantages et inconvénients des différentes méthodes de démasquage par la chaleur.....	22
II	: Les différents traceurs fluorescents	28
III	: Les différents traceurs enzymatiques	29

* *

*

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviations

ABC	:	Avidine Biotine Complex
ABP	:	Androgen Binding Protein
Ac	:	Anticorps
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
AEC	:	3-Amino, 9-Ethyl Carbazole
AFA	:	Alcool-Formol Acétique
Ag	:	Antigène
APAAP	:	Alcaline Phosphatase Anti Phosphatase
ARN	:	Acide Ribonucléique
BCIP	:	Bromo-Chloro-Inodolyl-Phosphate
°C	:	Degré Celsius
DAB	:	Diaminobenzadine
DHT	:	5 α -Dihydrotestostérone
EDTA	:	Ethylene Diamine Tetracétique Acide
FSH	:	Follicle Stimulating Hormone
GnRH	:	Gonadotropin Releasing Hormon
H₂O₂	:	Peroxyde d'hydrogène
3β-HSD	:	3-beta-Hydroxy Stéroïde Déshydrogénase
17β-HSD	:	17-beta-Hydroxy Stéroïde Déshydrogénase
IHC	:	Immunohistochimie
LH	:	Luteinizing Hormone
Min.	:	Minutes
NBT	:	Nitro Blue Tetrazolium
PAP	:	Peroxydase Anti Peroxydase
PBS	:	Phosphate Buffered saline
RA	:	Récepteur aux Androgènes
T°	:	Température
SHBG	:	Sex Hormone Binding Globulin

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La localisation des récepteurs aux androgènes, au niveau testiculaire, est un sujet de controverse depuis de nombreuses années. Initialement sur la base d'étude de liaison avec des molécules marquées, les résultats semblaient en faveur de l'hypothèse que les récepteurs aux androgènes pourraient se trouver à la fois dans les cellules somatiques du testicule et les cellules de la ligné germinale. Cependant, Fritz (1978) avait annoncé l'hypothèse que les récepteurs aux androgènes (RA) se trouvaient uniquement au niveau des cellules somatiques du testicule (cellules de Leydig, cellules de Sertoli et cellules myoïdes périvitubulaires). Par la suite, la production d'anticorps contre les récepteurs des androgènes et leurs utilisation pour les études d'immunolocalisation, par plusieurs laboratoires, ont conduit à espérer que cette controverse allait se trouver définitivement éclaircie (Sar *et al.*, 1990 ; Bremner *et al.*, 1994). Malheureusement, des résultats contradictoires obtenus par différents chercheurs (Sar *et al.*, 1990 ; Bremner *et al.*, 1994 ; Suarez-Quian *et al.*, 1997 ; Regadera *et al.*, 2001) ont contribué à faire renaître le débat sur la localisation des récepteurs aux androgènes au niveau testiculaire.

En médecine, les androgènes et les RA sont connues avoir des rôles dans la reproduction chez le mâle. L'inactivation de l'expression des gènes de RA contribuent dans le dysfonctionnement de la spermatogenèse (Walters *et al.*, 2010).. Les différentes mutations dans les gènes des récepteurs aux androgènes entraînent des syndromes d'insensibilité aux androgènes (Giwerzman *et Svensson*, 2008).

L'objectif de notre travail est de déterminer la localisation des récepteurs aux androgènes, au niveau des testicules des agneaux de race D'Man âgés de 2 à 5 mois par la technique d'immunohistochimie. Après un bref rappel anatomo-physiologique de l'appareil génital du bélier, nous avons exposé les différentes étapes de la technique d'immunohistochimie. Suivie du matériel et méthode utilisé dans ce travail. Les résultats sont discutés en fonctions de quelques données de la bibliographie.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Recherches sur les Zones Arides (LRZA), écophysiologie et endocrinologie animale (USTHB, Alger).

* *
*

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

RAPPELS ANATOMIQUES ET HISTOLOGIQUES DE L'APPAREIL GÉNITAL DU BÉLIER

I. Rappels anatomiques et histologiques de l'appareil génital du bélier

I.1. Anatomie de l'appareil génital

L'appareil reproducteur mâle se compose des testicules, des conduits excréteurs (*Rete testis*, canaux efférents, épидидymes, canaux déférents, et urètre), du pénis et des glandes annexes (vésicules séminales, prostate et glandes bulbo-urétrales) (Figure 1) (L'Hôte, 2009).

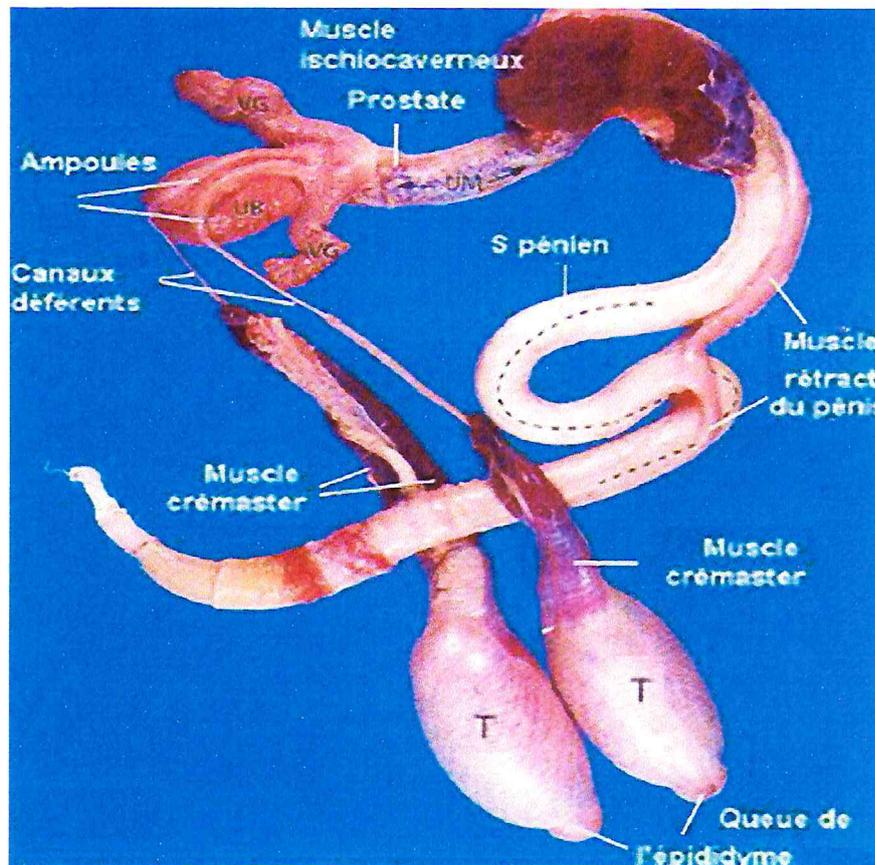


Figure 1 : Anatomie de l'appareil génital du bélier (Bister, 2007)

I.1.1 Les testicules

Les testicules sont des organes pairs doués d'une double fonction exocrine (production des spermatozoïdes) et endocrine (production des androgènes), de forme ovoïde, ils sont localisées dans le scrotum, de part et d'autre du pénis. Les testicules sont formés d'un enchevêtrement de tubes séminifères, entouré d'une capsule conjonctive, l'albuginée. Les tubes séminifères sont le siège de la spermatogenèse ; entre les tubes séminifères se trouve le tissu interstitiel endocrinien et la vascularisation testiculaire (L'Hôte, 2009).

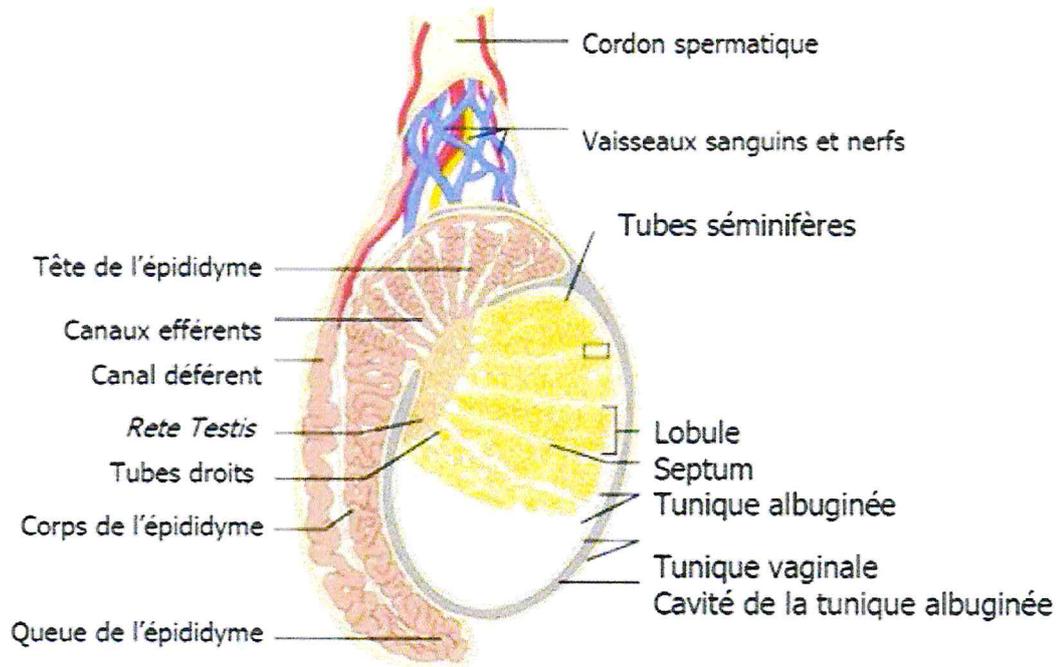


Figure 2 : Représentation schématique de l'anatomie du testicule (Gayrard, 2007)

I.1.2. Les canaux excréteurs

Dans le testicule, les tubes séminifères se rejoignent pour former un labyrinthe lacunaire, appelé *Rete testis*. De celui-ci émergent cinq canaux efférents qui se fondent en un unique canal : le canal épидидymaire. L'épididyme est formé de cet unique canal replié sur lui-même et empaqueté dans une tunique conjonctive. Il comporte trois parties identifiables sous la loupe : la tête, le corps et la queue (L'Hôte, 2009). La queue se prolonge par le canal déférent qui s'élargit en une ampoule qui s'abouche à l'urètre (Hanzen, 2009). L'urètre parcourt le pénis jusqu'à l'appendice vermiforme (Baril et *al.*, 1993).

I.1.3. Le pénis

Il comprend anatomiquement trois parties : la racine, le corps et l'extrémité libre. Le pénis présente au repos une inflexion sigmoïde appelé aussi S pénien. Lors de l'érection, cette inflexion s'efface, ce qui permet au pénis de s'allonger au moment du coït (Hanzen, 2009).

I.1.4. Les glandes annexes

- Les vésicules séminales : S'étalent latéralement dans le bassin de chaque côté de l'attache de la vessie, elles sont lobulées et compactes (Baril et *al.*, 1993).

Leur fonction principale est de produire le liquide séminal accompagnant les spermatozoïdes lors de l'éjaculation (L'Hôte, 2009).

- La prostate : Comprend deux parties ; le corps de la prostate et l'autre partie est disséminée autour de l'urètre et s'étend jusqu'aux glandes bulbo-urétrales.

- Les glandes bulbo-urétrales : Encore appelées glandes de Cowper (ou glandes de Méry) de petite taille (de la taille d'une noisette), sont situées dans la région caudale de l'urètre (Hanzen, 2009).

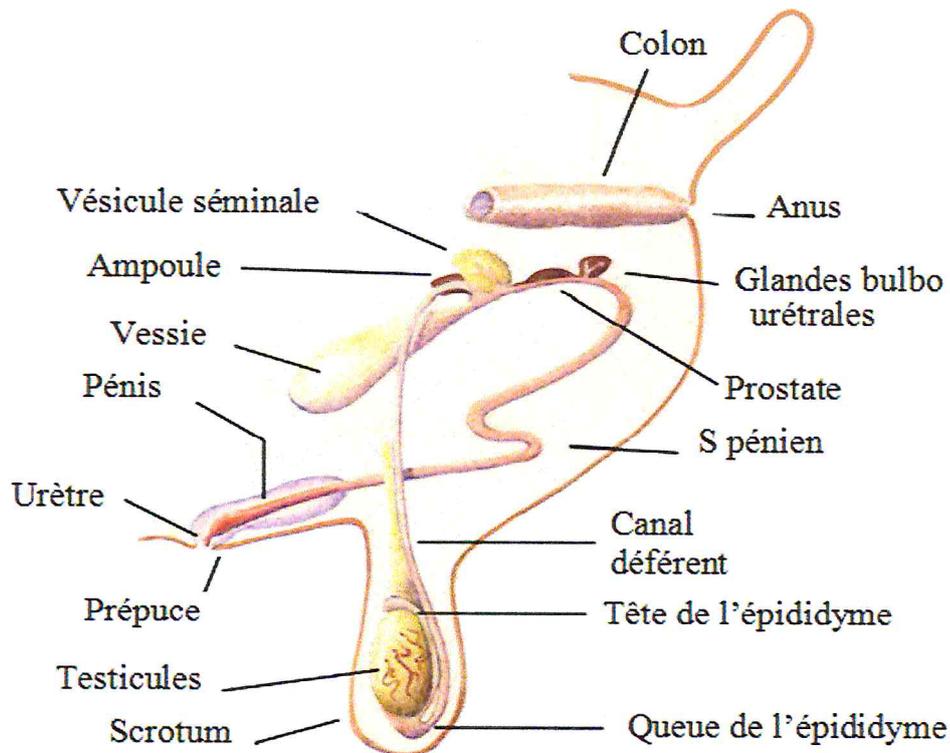


Figure 3 : Représentation schématique de l'anatomie du système reproducteur mâle, indiquant la situation des différents organes et glandes (Girma, 2008)

I.2. Histologie du testicule et spermatogénèse

I.2.1 Histologie du testicule

Le testicule est sectorisé en deux grands compartiments distincts sur le plan structurel. Ces compartiments sont physiologiquement séparés par des barrières cellulaires:

- Les tubes séminifères, où prend place la spermatogénèse accomplissant une fonction exocrine

- L'espace interstitiel, dans lequel on retrouve notamment les cellules de Leydig à fonction endocrine (Synthèse et sécrétion des androgènes) organisées en îlots à proximité de capillaires sanguins entre les tubes séminifères (Hanzen, 2009 ; L'Hôte 2009).

- Les tubes séminifères (Figure 4) contiennent des cellules germinales à différents stades de leur développement ainsi que des cellules somatiques, les cellules de Sertoli (Dadoune et Démolin, 1991). Cette association de cellules germinales et de cellules de Sertoli forme l'épithélium séminifère.

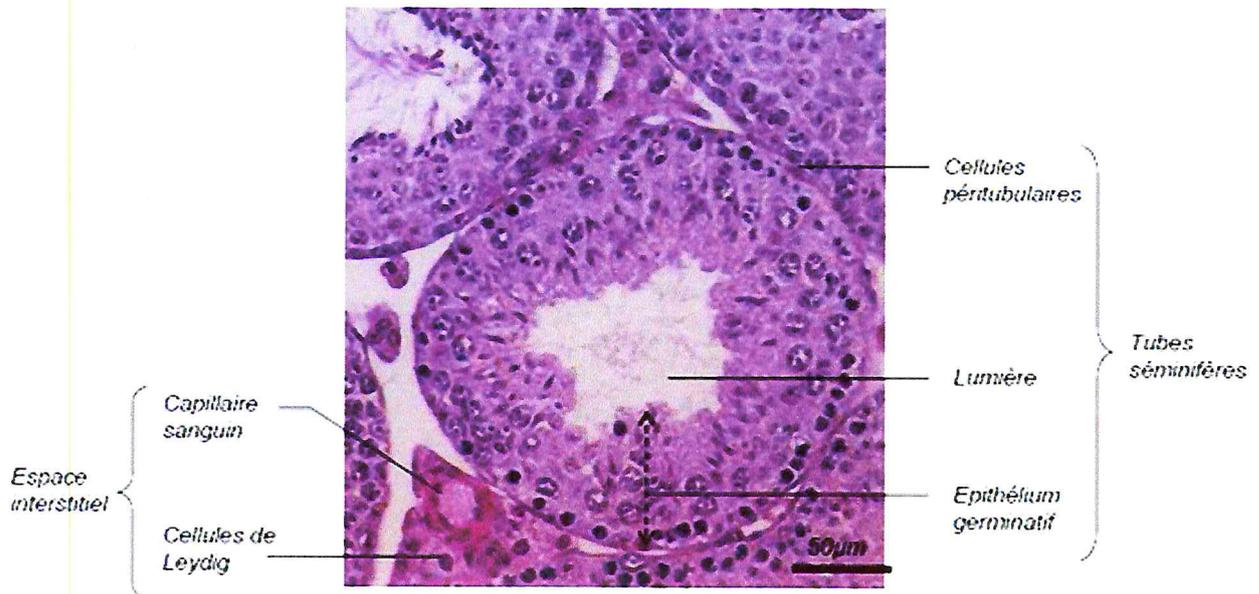


Figure 4 : Coupe transversale d'un tube séminifère (L'Hôte, 2009)

- Les cellules germinales sont hautement organisées dans l'épithélium séminifère elles forment une série d'associations cellulaires ou cycles spermatogénétique de l'épithélium séminifère de telle manière qu'un même cycle donné occupe la totalité d'une section transversale d'un tube séminifère. Les cellules les moins différenciées sont situées du côté basal du tube séminifère (vers la lame basale) et les cellules les plus matures sont situées du côté apical du tube séminifère (vers la lumière) (Vernet, 2006). L'épithélium séminifère repose sur la lame basale du tube séminifère. Cette lame basale est constituée de tissus conjonctifs et d'une fine couche de cellules appelées cellules myoïdes péritubulaires (Maekawa et al., 1996). Ces cellules sont des cellules contractiles qui participent à la propulsion et à l'évacuation des spermatozoïdes qui ne sont pas mobiles dans le testicule. Les cellules germinales sont dépendantes des cellules de Sertoli (Vernet, 2006).

- La cellule de Sertoli a une forme pyramidale et repose sur la lame basale du tube séminifère (Russell et Griswold, 1993). Elle constitue un véritable squelette pour les cellules germinales. Ses faces latérales sont en contact étroit avec environ cinq autres cellules de Sertoli et avec trente à cinquante cellules germinales (Weber et *al.*, 1983 ; L'Hôte, 2009). La forme et le volume de la cellule de Sertoli varient au cours du cycle de l'épithélium séminifère de manière à optimiser l'adhérence des cellules germinales avec lesquelles elle est en contact. Le noyau de la cellule de Sertoli est situé du côté basal du tube séminifère (Russell et Griswold, 1993) ; ce noyau a une forme irrégulière, avec une invagination bien marquée. De plus, son nucléole est très volumineux. Ces caractéristiques permettent de distinguer le noyau de la cellule de Sertoli des noyaux des cellules germinales qui sont arrondis (Vernet, 2006).

En plus de la fonction de maintien de l'architecture de l'épithélium séminifère, la cellule de Sertoli assure d'autres fonctions : Elle sépare, tout d'abord, l'intérieur du tube séminifère de la circulation sanguine, fournissant ainsi un environnement adéquat pour la méiose et la spermiogénèse. Elle contrôle également, à l'intérieur du tube séminifère, la production ou l'élimination de facteurs de croissance, de nutriments et d'autres produits chimiques (Vernet, 2006).

I.2.2. Spermatogenèse

La durée totale de la spermatogénèse est une constante pour une espèce donnée. Chez le bélier sa durée est de 46 à 49 jours (Baril et *al.*, 1993). C'est le processus par lequel les cellules germinales se différencient pour former les spermatozoïdes. La spermatogénèse se déroule à l'intérieur des tubes séminifères (Vernet, 2006). Elle se divise en trois phases : la phase proliférative, la phase méiotique et la phase de maturation appelée la spermiogénèse (Bellve et *al.*, 1977 ; Jégou, 1995). A chacune de ces phases sont associés des types cellulaires particuliers de cellules germinales (Figure 5) (L'Hôte, 2009).

- **Phase proliférative** : Cette phase concerne les spermatogonies, population de cellules souches diploïdes au contact avec la lame basale du tube. Ces cellules se divisent par mitose, afin de conserver un stock de cellules souches tout au long de la vie. Les processus de gestion de cette population sont très complexes et font intervenir de nombreuses cellules intermédiaires, en partant de la spermatogonie de type A, cellule stock, à la spermatogonie de type B, qui entrera en méiose (Figure 5) (L'Hôte, 2009).

- **Phase méiotique** : une partie des spermatogonies A quitte le pool des spermatogonies en prolifération pour entrer en méiose, on les nomme spermatogonies B. La spermatogonie B subit une dernière division de mitose qui donne naissance à deux spermatocytes I qui entrent en prophase de méiose I. La première division de méiose (dite réductionnelle) pendant laquelle la recombinaison entre chromosomes homologues prend place, sépare les chromosomes homologues, et donne naissance aux spermatocytes de type II, la première génération de cellules haploïdes. Chacun des spermatocytes II subit alors une division dite équationnelle qui sépare les chromatides sœurs de chaque chromosome donnant naissance à deux spermatides (Figure 5) (L'Hôte, 2009).

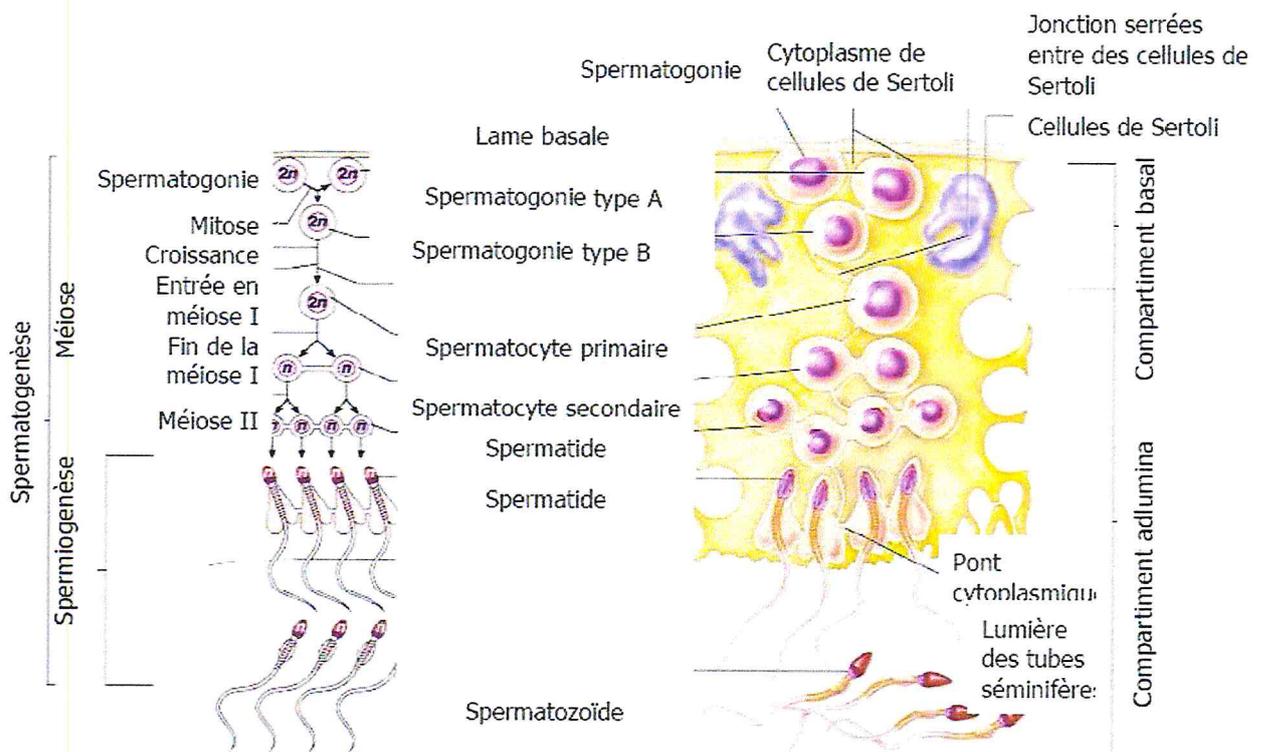


Figure 5 : Représentation schématique de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle au cours de la spermatogénèse (Gayrard, 2007)

- **Spermiogénèse** : Une réorganisation cytoplasmique majeure et un remodelage chromatinien complexe se déroulent pendant la spermiogénèse au niveau des cellules haploïdes que sont les spermatides rondes et allongées ce qui permet alors la formation des spermatozoïdes (Vernet, 2006). Les spermatozoïdes sont des cellules flagellées, à chromatine

compacte et inactive, et ne possédant quasiment plus de cytoplasme (Figure 6) (L'Hôte, 2009).

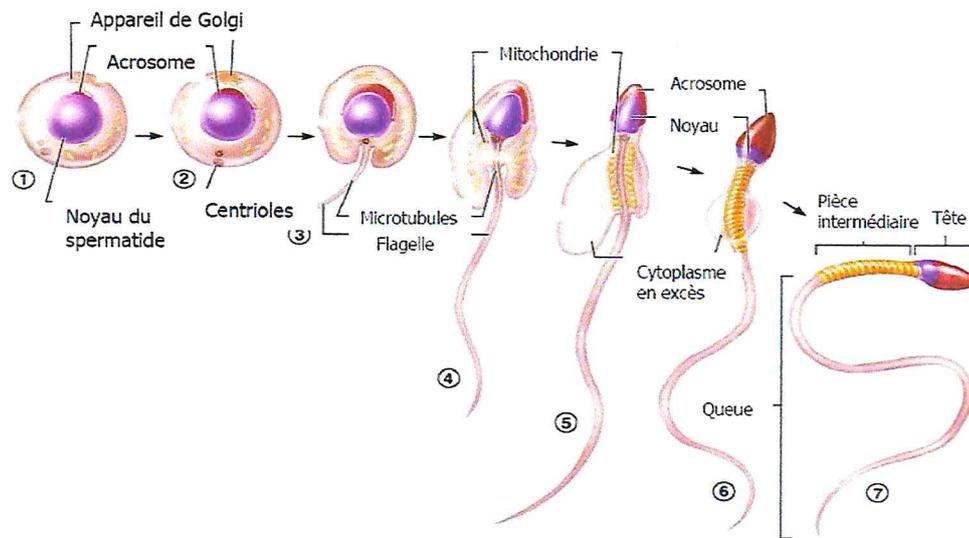


Figure 6 : Représentation schématique de la spermiogénèse (Gayrard, 2007)

- ***Spermatozoïde*** : Le spermatozoïde se compose essentiellement d'une tête, d'un col et d'un flagelle et ce dernier se subdivisant en trois parties: les pièces intermédiaires, principales et terminales (Figure 7) (Hanzen, 2009).

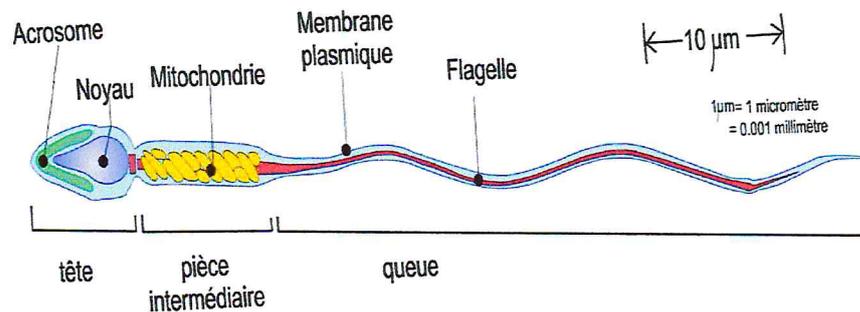


Figure 7 : Représentation schématique de la structure d'un spermatozoïde (Lajili, 2008)

Le spermatozoïde a un rôle très important dans la reproduction, au moment de la fécondation du gamète femelle.

* *
*

CHAPITRE II :

RAPPEL SUR LA FONCTION ENDOCRINE DU TESTICULE

II. Rappel sur la fonction endocrine du testicule

II.1. Régulation hypothalamo-hypophysio-testiculaire

La double fonction du testicule est régulée par des interactions endocriniennes entre l'hypothalamus, l'hypophyse et la gonade où se trouve les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig (Dohle et *al.*, 2003) . Ce système endocrinien est désigné sous le nom « axe hypothalamo-hypophysio-gonadique ». Il englobe une série de mécanismes de stimulations et d'inhibitions (Figure 8). Ces mécanismes sont impliqués dans le contrôle de la quantité de testostérone qui va se lier à son récepteur spécifique dans la cellule de Sertoli (récepteur des androgènes). Cette liaison est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse. Elle permet notamment le déclenchement et l'entretien de la spermatogenèse et inhibe l'apoptose des cellules germinales (Vernet, 2006).

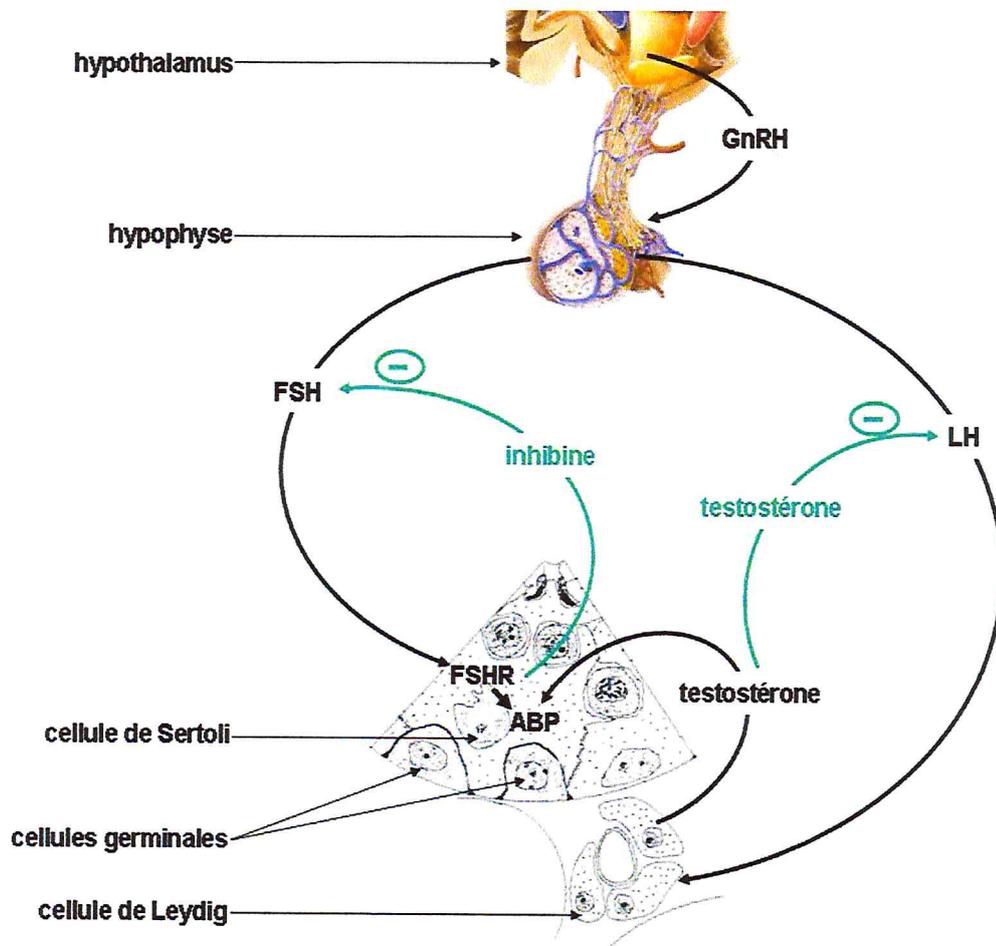


Figure 8 : Mécanismes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique et régulation de la fonction testiculaire (Vernet, 2006)

L'hormone hypophysaire LH (Luteinizing Hormon) stimule la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig. Entre ces deux hormones existent un phénomène de feedback négatif. La FSH (Follicle Stimulating Hormon) stimule la synthèse, par les cellules de Sertoli, de l'ABP (Androgen Binding Protein), de l'inhibine et de l'activine. L'ABP lie les androgènes d'origine Leydigienne et assure leurs transports jusqu'aux récepteurs des cellules de Sertoli et des cellules germinales. Par ailleurs, la FSH contrôle indirectement la spermatogenèse. L'inhibine, par une rétroaction négative, inhibe la sécrétion de FSH, à l'inverse de l'activine qui stimule sa sécrétion (Hanzen, 2009).

Les régulations de FSH et de LH sont aussi dépendantes de la gonadolibérine appelée GnRH (Gonadaotropin Releasing Hormon) qui est libérée par l'hypothalamus de façon pulsatile (Dohle *et al.*, 2003).

II.2. Androgènes testiculaires

Groupe d'hormones stéroïdiennes, dites hormones sexuelles mâles ; produites essentiellement par les testicules, dont la principale hormone est la testostérone (Tostain *et al.*, 2004 ; Gayrard, 2007). Parmi les androgènes testiculaires, seuls la testostérone et la DHT ont des effets sur le système reproducteur.

- **Testostérone** : est le principal androgène circulant. Elle est produite, à 95%, par les cellules de Leydig ; le reste étant produit par les glandes surrénales en faibles quantités et par le cerveau en quantités infinitésimales (Tostain *et al.*, 2004).

- **5 α -dihydrotestostérone (DHT)** : est un métabolite de la testostérone ; qui est en fait un androgène plus puissant en ce sens qu'il se lie plus fortement aux récepteurs des androgènes (Nussey et Whitehead, 2001).

II.2.1. Biosynthèse des androgènes

La biosynthèse des androgènes nécessite l'intervention d'un certain nombre d'enzymes agissant en cascade à partir d'un précurseur commun à tous les stéroïdes, le cholestérol (Saez, 1994).

La stéroïdogénèse commence par le transport du cholestérol du cytoplasme, dans la mitochondrie par une protéine de transfert, STAR (Steroïdogenic Acute Regulatory protein) qui est l'étape limitante de la stéroïdogénèse (Stocco, 2002).

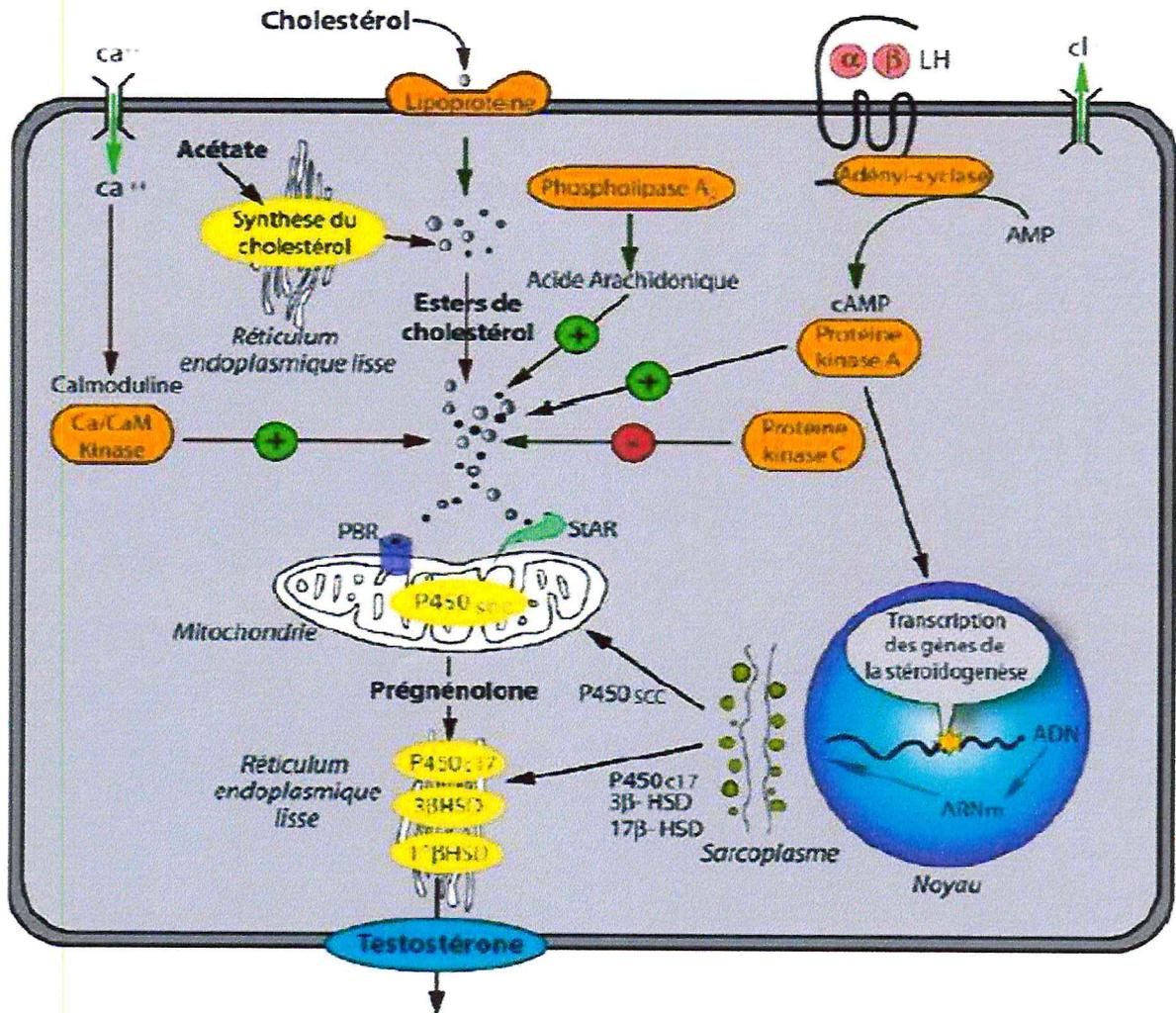


Figure 9 : Régulation de la stéroïdogénèse au niveau de la cellule de Leydig (Tostain et *al.*, 2004)

Dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique lisse, le cholestérol est transformé en une série de métabolites par différentes enzymes du groupe des cytochromes P450 avant d'aboutir à la testostérone (Figures 9 et 10).

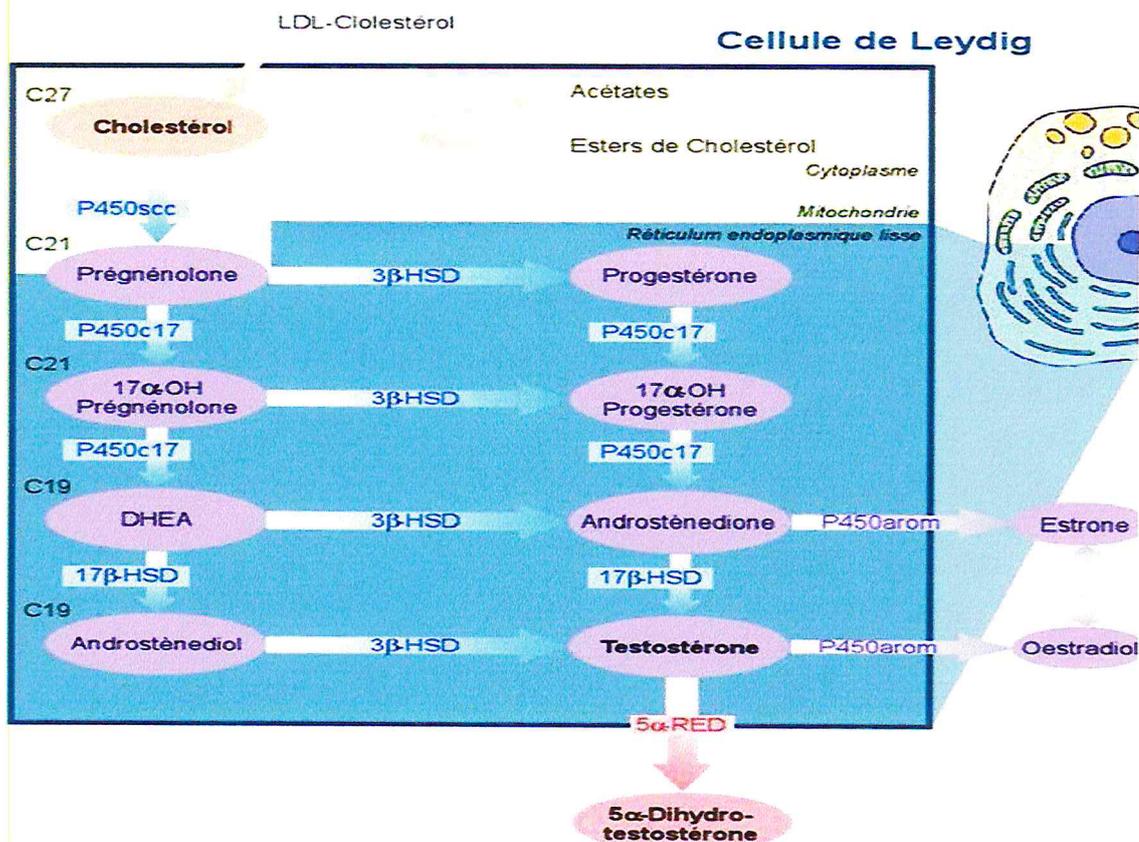


Figure 10 : Biosynthèse de la testostérone au niveau des cellules de Leydig
(Tostain et *al.*, 2004)

La première étape de la biosynthèse des androgènes est une étape clé, permettant la conversion du cholestérol en prégnénolone. Cette étape est assurée par le cytochrome P450scc situé dans la membrane interne de la mitochondrie. La prégnénolone est ensuite transportée dans le réticulum endoplasmique lisse où elle est convertie en progestérone par la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β-HSD). Le cytochrome P450c17 va ensuite transformé successivement la progestérone en 17 β-OH-progestérone puis en androstènedione. Enfin, l'androstènedione est convertie en testostérone par la 17 β-hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β-HSD). Il existe deux voies d'obtention de la testostérone, la voie Δ5 et la voie Δ4. Le passage des stéroïdes de la voie Δ5 à la voie Δ4 est catalysé par la 3 β-HSD (Tostain et *al.*, 2004 ; Gayrard, 2007).

II.2.2. Sécrétion et transport des androgènes

La testostérone se diffuse librement à travers les membranes plasmiques des cellules de Leydig et dans le sang veineux. Dans le plasma, la testostérone circule sous trois formes : 1/ 2 % sous forme libre (c'est la seule forme utilisable directement par les tissus) ; 2/ 45-75 % sont liés à la protéine de transport des stéroïdes sexuels dont la SHBG (Sex Hormon Binding Globulin) et 3/ 30 à 55 % sous forme liée à l'albumine (Tostain et *al.*, 2004). La testostérone liée à la SHBG, contrairement à la fraction liée à l'albumine, se dissocie difficilement et n'est pas disponible pour l'utilisation tissulaire. La testostérone bio-disponible représente la somme de la testostérone libre et de la testostérone liée à l'albumine, soit 40 à 50% de la testostérone totale. Les protéines de liaison servent de réserve de stéroïdes qui, autrement, seraient rapidement métabolisées par le foie (Reveiller, 2008).

II.2.3. Métabolisme des androgènes

La testostérone peut agir directement sur le récepteur aux androgènes (RA) ou indirectement via son rôle de pro-hormone, par sa transformation en métabolites actifs qui augmentent et diversifient ses effets biologiques (Tostain et *al.*, 2004). Tout d'abord, elle peut-être transformée en DHT sous l'action de la 5 α -réductase de type 1 et 2. La DHT a cinq fois plus d'affinité pour le RA que la testostérone, donc son action est potentialisée. D'autre part, la testostérone peut-être métabolisée par l'aromatase en un œstrogène puissant, l'œstradiol, principalement dans la graisse, et en quantité plus faible dans le testicule (15%), la peau, les reins, les os et le cerveau. Enfin, les voies du catabolisme de la testostérone existent principalement dans le foie, mais aussi dans la peau et la prostate pour aboutir à son élimination dans les urines ou par la peau. Les voies métaboliques qui participent à la dégradation de la testostérone sont très actives puisque la demi-vie de la testostérone est de 12 minutes ; ce qui implique une synthèse permanente par le testicule (Reveiller, 2008).

II.2.4. Récepteurs des androgènes

Le récepteur des androgènes est une protéine intracellulaire qui fait partie de la grande famille des facteurs de transcription à médiation hormonale. Le récepteur androgénique facilite les actions biologiques des androgènes physiologiques tels que la testostérone et la 5 α -dihydrotestostérone. Le complexe androgène-récepteur régule les réponses du développement dans les organes sexuels annexes en modulant la transcription génétique spécifique de la synthèse des RA (Nussey et Whitehead, 2001 ; Gayrard, 2007).

II.2.5. Rôle des androgènes dans la fonction de reproduction

Les androgènes jouent un rôle essentiel dans l'apparition et le développement des caractères sexuels secondaires du mâle et aussi dans l'apparition et le maintien de la spermatogenèse.

Au cours du développement, le testicule fœtal a un rôle dans la morphogénèse et exerce un contrôle sur la différenciation des organes génitaux. Le développement des canaux de Wolff et la régression des voies génitales femelles dérivées des canaux de Müller sont induits par les androgènes (Gayrard, 2007).

Par conséquent, tout déséquilibre détermine une perturbation de la différenciation des voies génitales externes, en particulier dans le cas d'une hyperandrogénémie (Gayrard, 2007).

Au cours de la puberté, la production des androgènes, de LH et de FSH augmente et les cordons sexuels se creusent, formant les tubes séminifères. Les cellules germinales commencent à se différencier en spermatozoïdes. Pendant toute la vie adulte, les androgènes et la FSH coopèrent et agissent sur les cellules de Sertoli dans les testicules pour soutenir la production continue de spermatozoïdes (Nussey et Whitehead, 2001).

* *
*

CHAPITRE III :

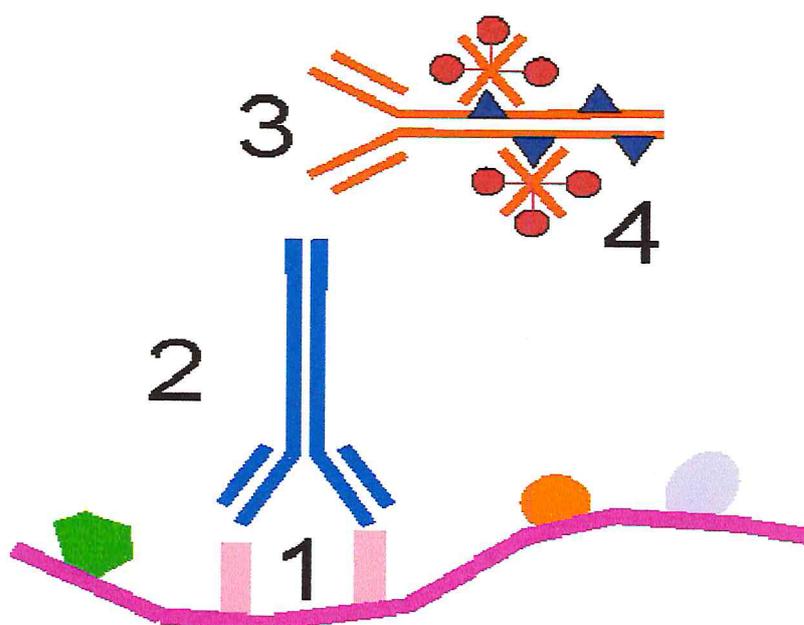
GÉNÉRALITÉS SUR L'IMMUNOHISTOCHEMIE

III. Généralités sur l'immunohistochimie

III.1 Principe de l'immunohistochimie

L'immunohistochimie a pour but de révéler *in situ*, sur préparations tissulaires ou cellulaires, des antigènes (Ag) par l'intermédiaire d'anticorps (Ac) spécifiquement dirigés contre ces antigènes.

L'Ac peut être conjugué à : 1/ une substance fluorescente, 2/ une enzyme (ex : peroxydase) et 3/ des particules métalliques (ex: ferritine), dont le but de mettre en évidence (visualiser) un Ag, à l'aide d'une réaction Ag-Ac ; permettant ainsi de préciser sa topographie qui peut être soit : extracellulaire, membranaire ou intracytoplasmique (Figure 11) (Garaud et Roussel, 2007).



1 – Antigène ; 2 - Anticorps primaire ; 3 - Anticorps secondaire ; 4 - Système révélateur

Figure 11: Schéma du principe de la réaction d'immunohistochimie (Heron, 2009)

III.2. Rappels des constituants de l'immunoréaction

- **Antigène**

L'antigène est toute substance susceptible d'induire une réponse immunitaire spécifique. Cet antigène comprend plusieurs déterminants antigéniques ou épitopes, dont la configuration est complémentaire du site anticorps des immunoglobulines qui leur correspondent. Un antigène est dit immunogène s'il est capable d'induire la formation d'anticorps (Gaulard et *al.*, 2008).

- **Anticorps**

Les anticorps (ou immunoglobulines) sont des glycoprotéines présentes dans le sérum et les liquides interstitiels des mammifères. Ils sont produits quand le système immunitaire de l'hôte est au contact d'antigènes immunogènes et se lie de façon spécifique à l'antigène qui a induit leur production. Ils sont synthétisés et excrétés par les plasmocytes (Gaulard et *al.*, 2008).

- **Structure d'un anticorps** : Tous les anticorps sont formés de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes légères (L) et deux chaînes lourdes (H). Les chaînes lourdes peuvent être de cinq, déterminant cinq classes d'immunoglobulines (Ig) : IgG, IgA, IgM, IgD et les IgE (Figure 12) (Garaud et Roussel, 2007).

En immunohistochimie, ce sont les Ac de classe IgG, puis IgM qui sont les plus utilisés (Garaud et Roussel, 2007).

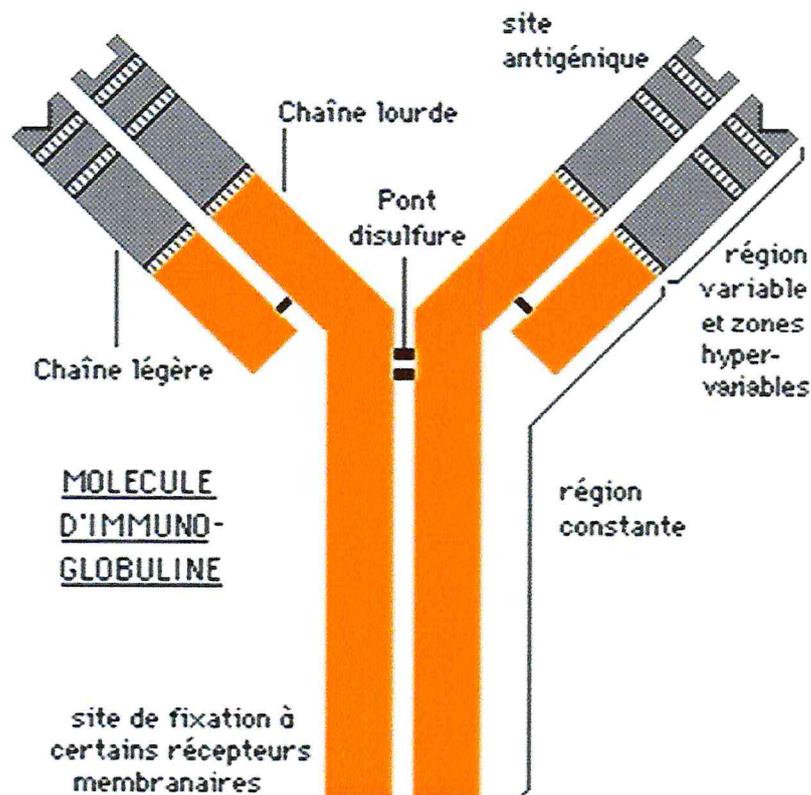


Figure 12: Schéma de la structure d'un anticorps (Prisot, 2004)

Au niveau d'une molécule Ig, on distingue des régions variables et des régions constantes. C'est l'extrémité des régions variables qui interagit avec l'antigène (Figure 12) (Gaulard et *al.*, 2008).

- **Liaison antigène- anticorps**

- La liaison antigène- anticorps est réversible
- l'avidité d'un Ac pour un Ag est fonction du nombre d'épitopes reconnus par l'anticorps
- Spécificité : Les sites anticorps dirigés contre les déterminants d'un antigène ne sont pas complémentaires de ceux portés par un autre antigène.
- Il peut se produire des réactions croisées car l'antigène peut posséder un ou plusieurs épitopes en commun avec un autre antigène, certain anticorps dirigés contre le premier antigène réagiront alors avec le deuxième antigène.

Les anticorps utiles en immunohistochimie sont des anticorps de forte avidité et de spécificité étroite (Gaulard et *al.*, 2008).

III.3. Etapes de préparation des tissus pour l'étude immunohistochimique

III.3.1. Fixation

Définition : C'est la conservation des structures par adjonction d'une substance chimique qui réagit avec le tissu et qui permet une conservation suffisante de celles-ci pour permettre une étude morphologique observée en microscope photonique, ou ultrastructurale observée en microscope électronique (Garaud et Roussel, 2007).

But : La fixation a pour but de figer les structures et immobiliser *in situ* les antigènes, afin que les structures ne soient pas endommagées, stabilise et préserve l'aspect structural ou ultrastructural des échantillons (Garaud et Roussel, 2007).

Il n'existe pas de fixateur universel car certains épitopes sont résistants à certains fixateurs, d'autres pas (en biologie moléculaire, on utilise l'AFA (Alcool-Formol Acétique) car il préserve l'ADN (Garaud et Roussel, 2007).

- **Principaux fixateurs :**

- **Formol :** Tamponné à 10%. C'est une molécule de petite taille donc diffusion facile dans les tissus. En théorie, 1 h pour un culot de cellules, 5 à 12h pour une petite biopsie, 24 h pour une pièce macroscopique.

Le formol est un fixateur réticulant, il entraîne la formation de liaison avec et entre les protéines ce qui les rend insolubles ; il bloque les sites antigéniques et les masque et gêne la diffusion des réactifs (Garaud et Roussel, 2007).

- **Bouin** : C'est un fixateur réticulant comme le formol. Il fixe plus rapidement les tissus que le formol, ainsi la durée de la fixation doit être moins longue que celle préconisée pour le formol. Ce fixateur n'est pas utilisé en Biologie Moléculaire car l'acide picrique fragmente les acides nucléiques (Garaud et Roussel, 2007).

- **Alcool-Formol Acétique (AFA)** : c'est un mélange de plusieurs fixateurs (alcool, formol et acide acétique). L'AFA est un fixateur réticulant et précipitant très rapidement. Il conserve très bien les acides nucléiques mais la morphologie des tissus est altérée (rétraction des tissus) (Garaud et Roussel, 2007).

Remarque sur la durée de fixation :

- Si la durée de fixation n'est pas suffisante, on est dans le cas d'une **sous fixation**, ainsi il n'y a pas de conservation des épitopes. C'est un phénomène irréversible.

- Si, par contre, la durée de fixation est très longue, on est dans le cas d'une **sur fixation**. En effet, les épitopes sont fortement masqués. C'est un phénomène réversible.

III.3.2. Déshydratation

La déshydratation est élimination de l'eau des échantillons fixés, par passage dans des bains d'alcool de concentration croissante puis dans un solvant organique (toluène, benzène, xylène) liquide intermédiaire miscible dans la paraffine (André et *al.*, 2008). Plusieurs solvants peuvent être utilisés dans cette étape dont les plus utilisés sont les alcools.

- **Alcools et cétones** : Leurs action principale est de déshydrater les tissus. Ensuite, ils permettent la pénétration des milieux d'inclusion non miscibles à l'eau (comme la paraffine par exemple) (André et *al.*, 2008).

Remarque : Les molécules non fixées seront extraites dans les solvants de déshydratation ; ce qui peut être, un inconvénient (disparition d'antigènes) ou un avantage (le tissu devient plus perméable) selon ce que l'on veut mettre en évidence.

L'éthanol est le fixateur et l'agent de déshydratation le plus courant. L'acétone et le méthanol sont moins souvent employés, mais ils donnent aussi d'excellents résultats (Garaud et Roussel, 2007).

III.3.3. Inclusion en paraffine

- **Définition** : C'est l'imprégnation d'un tissu par un milieu capable de durcir et de donner un bloc à partir duquel on peut effectuer des coupes au microtome (André et *al.*, 2008).

- **Principe** : Les tissus sont hydratés; ils ne peuvent donc pas être imprégnés directement par la paraffine. On doit avoir recours à une déshydratation par des alcools de plus en plus purs. Puis les prélèvements sont passés dans un solvant organique (toluène, xylène ou benzène) miscible avec la paraffine. Enfin, les prélèvements sont imprégnés dans la paraffine liquide à chaud (Gaulard et *al.*, 2008).

III.3.4. Confection des blocs de paraffine

Les tissus imprégnés sont placés au fond d'un moule métallique au quels on ajoute de la paraffine liquide à 60°C. Puis l'ensemble est déposé sur une plaque réfrigérée qui va permettre la solidification du bloc (Garaud et Roussel, 2007).

Remarque : Cette dernière étape de la confection des blocs de paraffine est fondamentale pour l'orientation du prélèvement au centre du moule.

III.3.5. Coupe au microtome

- **Définition** : C'est la réalisation de coupes fines du tissu à l'aide d'un microtome (3 à 7 μm d'épaisseur) (Garaud et Roussel, 2007).

- **Étalement des coupes**

Les coupes en paraffine sont étalées sur des lames silanées (Exemple : lames Superfrost plus) après avoir déposé de l'eau distillée chaude sur une platine chauffante pour faire disparaître les plis. Par la suite, les coupes étalées sont séchées à l'étuve avant d'être déparaffinées. On peut les stocker telle quelles pendant longtemps dans une boîte de rangement à température ambiante (Gaulard et *al.*, 2008).

III.3.6. Déparaffinage et hydratation

Les lames étalées et séchées doivent être déparaffinées puis hydratées pour permettre l'immunoreaction des antigènes avec leurs anticorps respectif au sein d'un tissu (Figure 13).

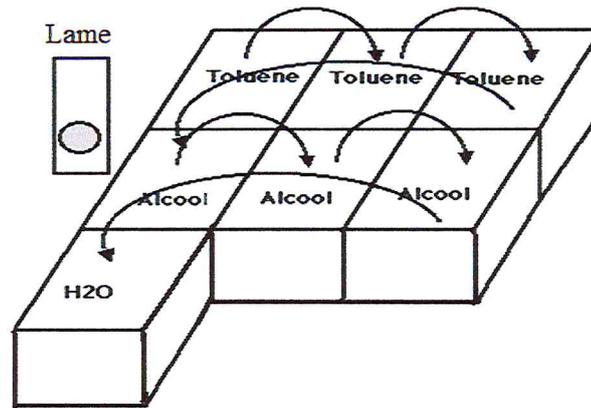


Figure 13 : Batterie de déparaffinage et d'hydratation (Schéma personnel)

III.4. Etapes d'immunohistochimie (ou immunoréaction ou IHC) proprement dite

- Les étapes de la technique d'immunohistochimie sont les suivantes :

III.4.1. Démasquage antigénique

Le démasquage antigénique permet l'accès des anticorps à l'antigène masqué et se fait de deux manières en fonction de la localisation de l'antigène (Garaud et Roussel, 2007).

- **Démasquage enzymatique** par utilisation
 - Surtout des protéinases (incubation 5 à 10 min. ; à T° ambiante)
 - Aussi des trypsines, pronases et pepsines.

L'efficacité du démasquage enzymatique est variable selon la localisation de l'antigène ; car il peut fragmenter les épitopes ou fragmenter le réseau protéique (Garaud et Roussel, 2007).

- **Démasquage par la chaleur**

Il est simple et fiable par augmentation de l'intensité du marquage et réduction du bruit de fond, il existe 3 méthodes :

a/ Démasquage au micro-onde : les étapes de cette méthodes sont :

- Les lames réhydratées sont immergées dans la solution de démasquage à T° ambiante et le bac est passé au micro-onde.
- 2 à 4 passage de 5 min.; selon la puissance du micro-onde.
- Toujours le même nombre de lames (compléter avec des lames blanches si nécessaire).

- Toujours le même nombre de bacs.
- Compléter le niveau entre deux passages avec de l'eau distillée chaude si évaporation; avec tampon chaud.
- Refroidissement sur paillasse pendant 20 min. (important car pendant ce temps la réaction se poursuit.
- Rinçage à l'eau distillée et les lames peuvent rester ainsi plusieurs heures.
- Refroidissement sur la paillasse pendant 20 min. (Garaud et Roussel, 2007).

b/ Démasquage à la cocotte minute : se déroule comme suit :

- Cocotte remplie au 2/3 de solution de démasquage ou remplie d'eau, la solution de démasquage étant dans un bac (moins de décollement).
- Lames sont ensuite immergées dans la solution bouillante.
- Une fois la cocotte sous pression (entre 2 à 10 min.), on laisse refroidir le bac contenant les lames, pendant 20 min., sur la paillasse.
- Rinçage des lames avec de l'eau distillée (Garaud et Roussel, 2007).

Remarque : Il faut que ce soit toujours la même personne qui démasque, sinon les résultats ne seront pas reproductibles.

c/ Démasquage au bain marie : les étapes sont les suivantes :

- Solution de démasquage préchauffée à 98°C.
- Lames immergées dans la solution chaude pendant 20 à 40 min.
- Refroidissement sur la paillasse pendant 20 min.
- Rinçage avec de l'eau distillée (Garaud et Roussel, 2007).

Remarques :

- Les avantages et inconvénients de chaque méthode du démasquage antigénique par la chaleur sont présentés dans le tableau I.
- Effet secondaire du démasquage par la chaleur est la réactivation des biotines endogènes.

On peut bloquer les biotines endogènes, si nécessaire, avec un bloquant des biotines, ou avec un système de visualisation n'utilisant pas l'avidine – biotine (Garaud et Roussel, 2007).

Tableau I : Avantages et inconvénients des différentes méthodes de démasquage par la chaleur

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Micro-onde Homogène (100°C)	Rapide (2 à 3x5 min.)	Non reproductible Décollement
Cocotte minute (120°C)	Rapide (5 min.) T° homogène	Reproductible Décollement
Bain marie (95-97°C)	Homogène	Reproductible Plus long (20 à 40 min.)

d/ Facteurs influençant la qualité du démasquage par la chaleur

Les principaux facteurs influençant la qualité du démasquage sont :

❖ La durée du démasquage est fonction de :

- La température : Plus la température est élevée, plus le démasquage est rapide.
- La durée de fixation : S'il y'a sur fixation, la durée de démasquage est augmentée.
- La nature du fixateur utilisé.

Il faut calibrer la technique de démasquage sur un cas sur fixé pour éviter les fausses négativités éventuelles (Garaud et Roussel, 2007).

❖ pH de la solution

- Pour la plupart des Ac, le pH de la solution influence peu la qualité des résultats.
- Dans la majorité des cas, un tampon citrate à pH = 6 est utilisé.

Mais certains Ac nécessitent un pH de 9,9 comme par exemple les récepteurs des androgènes (Garaud et Roussel, 2007).

❖ Nature de la solution tampon préconisée

- Tampon Citrate (1,01 M; pH = 6)
- Tampon EDTA (Ethylène Diamine Tetracétique Acide) (0,01 M; pH = 8)
- Tampon Tris EDTA (pH = 9,9)

III.4.2. Blocage des sites non spécifiques

Le blocage des sites non spécifiques est leur saturation avec des produits de nature protéique comme la BSA (Bovin Serum Albumin), l'ovalbumine ou le sérum non immun avec une dilution variant entre 0,1-10 % (Garaud et Roussel, 2007).

Pour un maximum d'efficacité, le sérum non immun doit être de même espèce que l'anticorps secondaire. En effet, les protéines (en particulier les immunoglobulines du sérum non immun) se fixent de manière non spécifique sur le tissu, en empêchant l'anticorps primaire de s'y fixer. L'anticorps secondaire ne peut se fixer sur les immunoglobulines du sérum non immun de même espèce que l'espèce de l'anticorps primaire (Garaud et Roussel, 2007).

III.4.3. Anticorps primaire

L'immunohistochimie nécessite des anticorps primaires de type polyclonaux ou monoclonaux spécifiques à la mise en évidence d'un Ag (Figure 14) (Garaud et Roussel, 2007).

- **Anticorps polyclonaux**

Ceux-ci sont fabriqués en injectant l'antigène le plus purifié possible à un animal (lapin, chèvre, mouton, cochon,...) et en recueillant ensuite le sérum riche en anticorps. Il s'agit en fait d'un antisérum, comportant un mélange d'anticorps reconnaissant diverses parties (épitopes) de la molécule d'antigène (Figure 14), mais aussi les impuretés de la préparation antigénique. On peut cependant augmenter leur spécificité en se débarrassant des molécules d'anticorps indésirables (dirigés contre les impuretés) (Gaulard et *al.*, 2008).

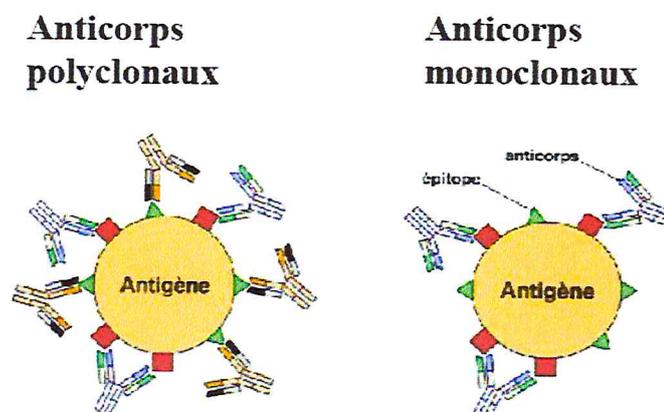


Figure 14 : Représentation schématique des anticorps polyclonaux et monoclonaux (Tosi et *al.*, 2007)

- **Avantages**

- Plusieurs Ac contre un seul Ag
- Plus « sensible »
- Fixation moins critique
- Mise en œuvre rapide (Anonyme).

- **Inconvénients**

- Spécificité moindre : reconnaît différents déterminants d'un même Ag
- Affinité et spécificité variables suivant le lot des anticorps vendu dans le commerce (Anonyme).

- **Anticorps monoclonaux**

Etant le produit d'un seul clone de lymphocytes B, les anticorps monoclonaux consistent en une population de molécules d'anticorps toutes identiques dirigées contre un seul épitope (spécificité élevée) (Figure 14). Leur production découle de la technique des hybridomes. Ils sont habituellement fabriqués chez la souris (Gaulard et *al.*, 2008).

- **Avantages**

- Mono spécifique (un épitope)
- Affinité homogène
- Production possible d'anticorps contre n'importe quelle protéine de la cellule, même si elle n'est pas purifiée (on peut sélectionner le clone produisant un anticorps donné).
- Production régulière, sans variabilité, en grandes quantités (immortalité du clone) (Anonyme).

- **Inconvénients**

- Réalisation plus difficile.
- Plus grande sensibilité à la qualité de la fixation.
- Problème de la conservation des anticorps (Anonyme)

III.4.4. Révélation de l'immunoréaction

Il existe deux méthodes : méthodes directe et méthodes indirecte.

A) Méthodes directe

L'Ac primaire est directement couplé au système révélateur (Figure15) (Garaud et Roussel, 2007).

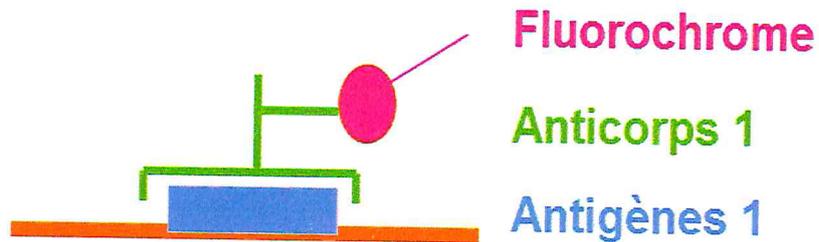


Figure 15 : Représentation schématique d'une immunoréaction directe (Schéma personnel)

B) Méthodes indirecte

La fixation de l'Ac primaire sur l'Ag est révélée grâce à l'incubation d'un Ac secondaire couplé au système révélateur (Garaud et Roussel, 2007).

Il existe 3 systèmes :

○ Système Peroxydase Anti Peroxydase (PAP)

Cette méthode utilise 3 réactifs :

- Ac primaire
- Ac secondaire
- Un complexe PAP (Figure16)

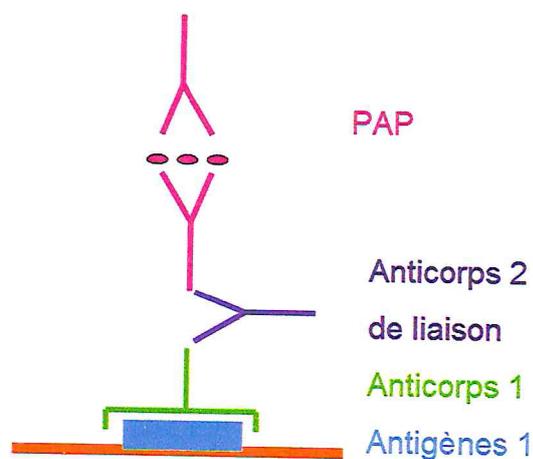


Figure 16 : Système Peroxydase Anti Peroxydase (PAP) (Schéma personnel)

L'Ac primaire et le complexe PAP sont issus de la même espèce pour pouvoir être pontés par le même anticorps de liaison.

- **Système Alcaline Phosphatase Anti Phosphatase (APAAP)**

Même principe que PAP mais la différence repose sur : Ac primaire est monoclonal ce qui permet la détection d'Ag (Figure 17).

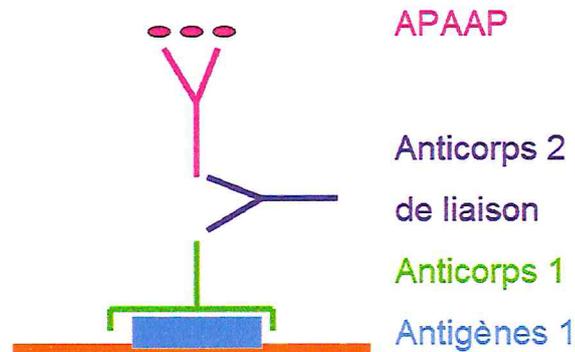


Figure 17: Système APAAP (Schéma personnel)

L'Ac primaire et le complexe APAAP sont issus de la même espèce pour pouvoir être pontés par le même anticorps de liaison.

- **Les systèmes faisant appel au couple Streptavidine / Biotine (ou Avidine / Biotine)**

Ces systèmes sont : Le système Biotine - Avidine - Peroxydase et le système Avidine Biotine Complex (ABC). Ils reposent sur le fait que, la streptavidine et/ou l'avidine reconnaissent la biotine avec une affinité.

La **biotine** (vitamine B8 ou H) est une petite molécule facile à se fixer sur une protéine.

La **streptavidine** (protéine isolée d'un saccharomyce) et l'**avidine** (glycoprotéine isolée des œufs) sont les plus souvent utilisées. Elles présentent 4 sites de liaison à la biotine ; elles peuvent donc être utilisées comme pièce intermédiaire servant à lier des protéines biotinylées (Figures 18 et 21) (Coons et *al.*, 2006).

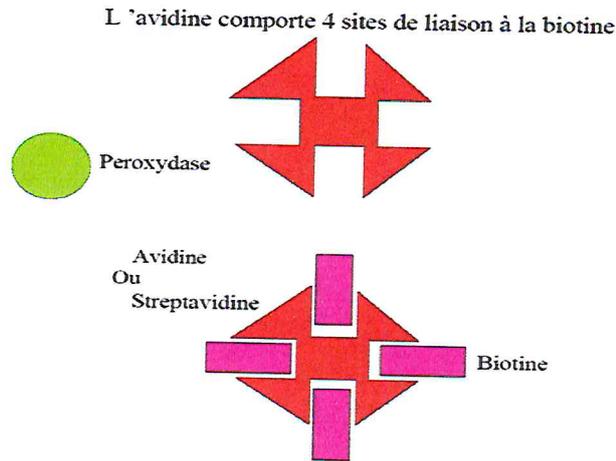


Figure 18 : Schéma de la Streptavidine (Avidine), Biotine, Peroxydase (Coons et *al.*, 2006)

- La **peroxydase** peut être directement liée à l'avidine (Figure 19).
- L'Ac secondaire est biotinylé. On ajoute ensuite une streptavidine couplée à un traceur.
- Il est possible de biotinyler les protéines sans leur faire perdre leur activité (Figure 20).

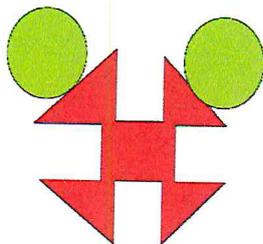


Figure 19 : Avidine Peroxydase (Coons et *al.*, 2006)

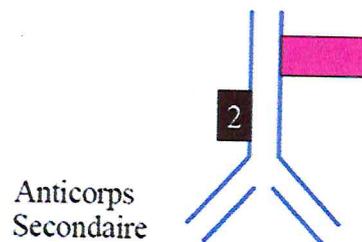


Figure 20 : Anticorps secondaire biotinylé (Coons et *al.*, 2006)

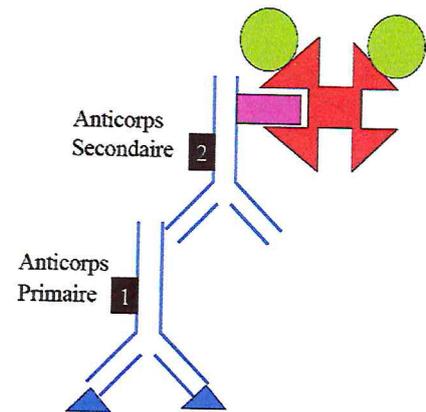


Figure 21 : Système Biotine - Avidine-Peroxydase (Coons et *al.*, 2006)

- La peroxydase peut être elle-même biotinylée et forme avec l'avidine, un complexe comportant de nombreuses molécules d'enzyme qui peuvent se lier à un Ac secondaire biotinylé. Ce complexe constitue le système ABC (Figure 22) (Coons et *al.*, 2006).

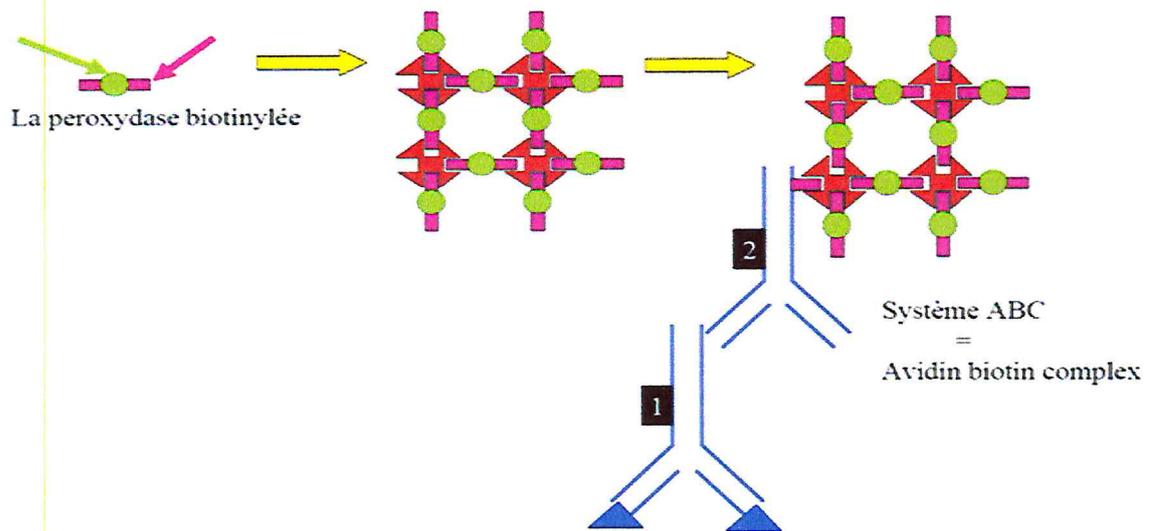


Figure 22 : Système Avidine Biotine Complexe (ABC) (Coons et *al.*, 2006 modifié)

○ **Avantages**

- La liaison biotine – streptavidine est irréversible (covalente).
- Amplification considérable possible.
- Intérêt de la streptavidine : point isoélectrique neutre (Garaud et Roussel, 2007).

○ **Inconvénients**

- Bruit de fond.
- Biotines endogènes.
- L'avidine est chargée positivement. On observe quelque fois un marquage de molécules chargées négativement (Garaud et Roussel, 2007).

• **Les différents types de traceurs**

- Les traceurs utilisés dans la technique d'immunohistochimie sont de deux types :

○ **Traceurs fluorescents** sont résumés dans le tableau II :

Tableau II : Les différents traceurs fluorescents

Fluorochromes	Couleur
Fluorescéine	Verte
Rhodamine	Rouge

❖ **Avantages** : Sensibilité supérieure des fluorochromes.

❖ **Inconvénients**

- Nécessite un équipement particulier (microscope à fluorescence).
- Problème de « fading » ou photoblanchiment c'est-à-dire que sous forte illumination, la molécule de fluorescence est détruite. Donc, le fluorochrome perd de son activité au cours du temps et doit être stocké à l'abri de la lumière à 4°C (Garaud et Roussel, 2007).

○ **Traceurs enzymatiques** :

Les traceurs enzymatiques sont résumés dans le tableau III.

Tableau III : Les différents traceurs enzymatiques (Gaulard et *al.*, 2008)

Enzyme	Chromogène	Couleur	Remarques
Peroxydase	DAB	Marron	Permanent (insoluble en milieu organique) et augmentation de la durée du marquage.
	AEC	Rouge	Non permanent (si déshydratation, il y a solubilisation du traceur).
Phosphatase alcaline	NBT ou BCIP	Marron	Permanent
	Fast Red	Rouge	Non permanent

DAB : Diaminobenzadine ; AEC : 3-Amino, 9- Ethyl Carbazole ; NBT : Nitro – Bleu – Tetrazolium ; BCIP : Bromo –Chloro –Inodolyl- Phosphate

○ **Avantages**

- Visualisation aisée, microscopie optique.
- Grande sensibilité.
- Différentes couleurs et contres colorations.
- Stables si déshydratées.
- Double marquage avec vision simultanée (Garaud et Roussel, 2007).

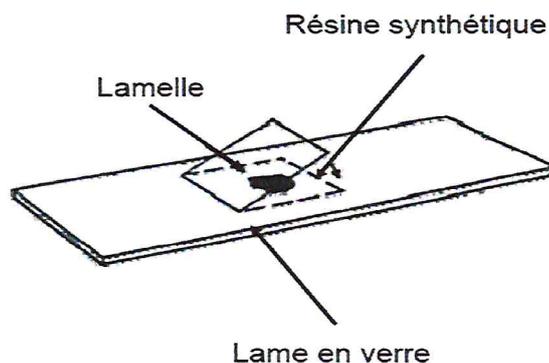


Figure 24 : Montage lame – lamelle (Mark, 2006)

A la fin de la technique d'immunohistochimie on dispose d'une « Préparation microscopique » (appelée « lame ») prête à être observée au microscope photonique (Mark, 2006)

III.4.8. Observation au microscope photonique

L'observation de la lame préparée se fait à l'aide d'un microscope photonique ou d'un microscope à fluorescence.

Remarques :

Les résultats dépendent de plusieurs étapes en amont à commencer par la fixation, en particulier sa durée et le type de fixateur.

D'autres facteurs sont capitaux, notamment la dilution de l'anticorps et le mode de démasquage antigénique.

Il est indispensable de s'assurer, par des témoins positifs et négatifs pour la fiabilité des résultats d'immunoréaction. La coloration est stable et peut être analysée à tout moment, même plusieurs années après (études rétrospectives possibles) lorsque qu'on utilise le chromogène qui est la DAB. De même, le bloc de paraffine archivé peut être recoupé et donne la possibilité de réactions complémentaires ultérieures (Heron, 2009).

III.4.9. Les paramètres à métriser

De nombreux paramètres sont pris en considération dans la technique d'immunohistochimie, à savoir :

❖ Type de tissus

- Tissus riches en biotines endogènes.
- Tissus riches en peroxydases endogènes.
- Tissus riches en phosphatases endogènes.
- Tissus fortement irrigués ⇒ Ig circulants.

❖ Conservation de l'antigène (au moment de la fixation)

- Conservation des lames
- Fixation adaptée à l'échantillon : temps et type de fixateur.
- Démasquage approprié : pH = 6 ou pH = 9,9.

❖ Anticorps primaire

- Monoclonale ou polyclonale.
- Espèce hôte.
- Isotype de l'anticorps.
- Dilution recommandée.
- Démasquage recommandé.

❖ Système de révélation

- Spécificité de l'anticorps secondaire.
- Enzymes utilisées.
- Chromogène.
- Sensibilité (Garaud et Roussel, 2007 ; Gaulard et *al.*, 2008).

Remarques très importantes à retenir

- Importance des témoins négatifs : il faut toujours ajouter des lames contenant un témoin négatif.
- Utiliser un anticorps secondaire anti-espèce de l'anticorps primaire.
- Ne jamais laissé sécher l'échantillon : Travailler toujours en chambre humide.
- Remettre les anticorps au réfrigérateur (4°C) immédiatement après utilisation.

* *

*

PARTIE
EXPERIMENTALE

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

1. Matériel animal

1.1. Description de la race D'Man

C'est une race qui a pris de l'importance ces dernières années en raison de sa prolificité élevée, de sa très grande précocité et de sa faculté à donner naissance à plusieurs agneaux. La brebis peut avoir jusqu'à cinq agneaux en une seule portée. Cette race très rustique qui supporte très bien les conditions sahariennes est répandue dans le Sahara du Sud Ouest Algérien. On la trouve à Béchar, Saoura, Gourara, Touat et El-Meniaa (Chellig, 1992).

Elle est caractérisée par :

- Une laine : grossière couvrant le haut du corps et la queue, et ne couvrant ni la poitrine, ni le ventre, ni les pattes.
- Une couleur: Noire ou brun foncé
- Des cornes: Petites, fines, ou n'existant pas
- Des oreilles: Grandes et pendantes
- Un profil : Convexe
- Une queue : Fine, longue à extrémité blanche
- Une Taille : Petite, conformation défectueuse (Figure 25) (Chellig, 1992).

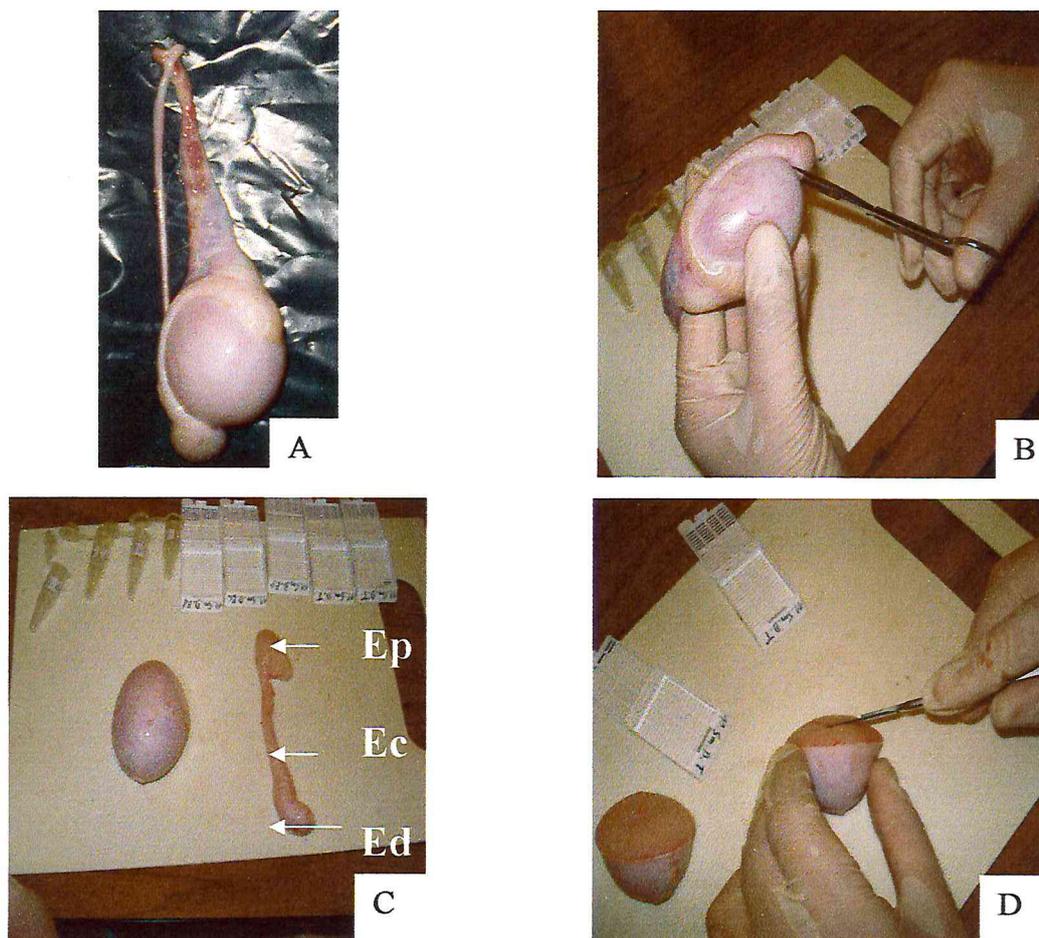


Figure 25 : Agneau de race D'Man (Photo personnelle)

1.2. Protocole expérimentale

Notre travail a porté sur des agneaux de race D'Man élevés en bergerie de la station expérimentale d'El-Meniaa (30° 34' N., 02° 52' E.), âgés de 2 à 5 mois, 3 agneaux ont été utilisés pour chaque âge.

Les testicules ont été prélevés après l'abattage des agneaux (Figure 26). Un fragment du testicule est prélevé comme le montre la figure 26 pour être utilisé dans notre étude immunohistochimique pour la localisation des récepteurs aux androgènes au cours de la croissance.



A : Testicule avec l'épididyme entier ; B : Méthode de séparation du testicule de l'épididyme ; C : Différentes parties de l'épididyme (Ep : épididyme proximal ; Ec : corps de l'épididyme ; Ed : épididyme distal) ; D : Prélèvement d'un fragment du testicule

Figure 26 : Etapes du prélèvement des testicules (Photos personnelles)

1.3. Le protocole utilisé pour la mise en évidence des récepteurs des androgènes :

Immunohistochimie

Notre travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Recherches sur les Zones Arides (LRA), écophysiologie et endocrinologie animale (USTHB, Alger).

Le protocole d'immunohistochimie est divisé en deux étapes :

- **Première étape** : Préparation des prélèvements par la technique d'histologie

- Les tissus prélevés sont immédiatement placés dans des cassettes en plastique portant les références de l'animal (Figure 27).
- Les cassettes sont immergées dans le **fixateur** (Formol du commerce dilué à 10 %) pendant plus de 24h (Figure 28).



Figure 27 : Prélèvement dans une cassette portant les références de l'animal (Photo personnelle)



Figure 28 : Cassettes immergées dans le fixateur (Photo personnelle)

- En suite, Les prélèvements fixés sont **déshydratés et éclaircit** comme suit :
 - Alcool 70° : 30 min.
 - Alcool 96° : 45 min.
 - Alcool 96° : 1h
 - Alcool 100° : 1h
 - Alcool 100° : 1h 30 min.
 - Toluène : 30 min.
 - Toluène : 45 min.
- Les prélèvements déshydratés sont **imprégnés** dans les différents bains de paraffine :
 - Paraffine : 15 min.
 - Paraffine : 30 min.
 - Paraffine : 1h
 - Paraffine : 1h30 min.
- Par la suite, les prélèvements testiculaires sont **includ en paraffine** pour **confectionner des blocs de paraffine**, dont les différentes étapes sont les suivantes :
 - Mettre le prélèvement au fond du moule métallique (choisir le moule selon la taille du prélèvement (Figure 29)).
 - Couler la paraffine liquide à chaud (56°C).
 - Immobiliser le prélèvement au milieu du moule (Figure 30).

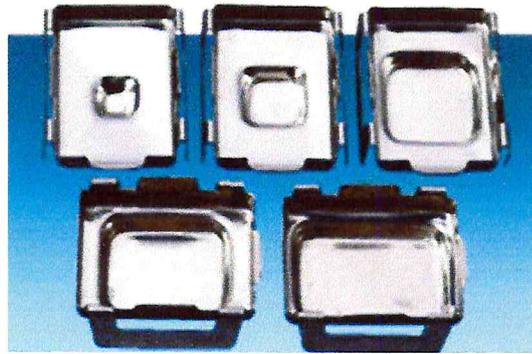


Figure 29 : Moules métalliques (Photo personnelle)

○ Laisser refroidir jusqu'à durcissement et obtention d'un bloc de paraffine (Figure 31).

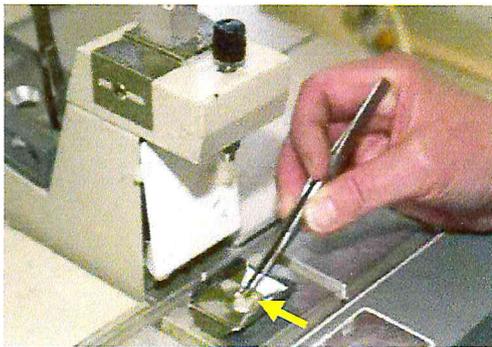


Figure 30 : Immobilisation du prélèvement au fond du moule métallique (Photo personnelle)

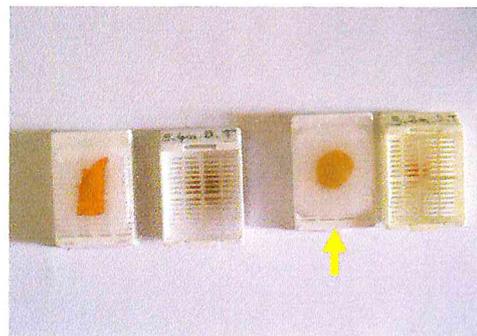


Figure 31 : Blocs de paraffine (Photo personnelle)

• Après la confection des blocs, les prélèvements sont **coupés** au microtome avec une épaisseur de coupe de 5 μm (Figure 32).

• Le ruban obtenu est déposé sur un plateau ; puis à l'aide d'un scalpel, on sélectionne les meilleures coupes (Figure 33).



Figure 32 : Coupe au microtome type Leica (Photo personnelle)



Figure 33: Etalement du ruban de coupe sur un plateau (Photo personnelle)

- Afin de ne pas laisser de plis, les coupes sélectionnées sont déposées dans un bain-marie (42°C) (Figure 34).

- Ensuite, les coupes sont récupérées sur une lame silanée de type « Superfrost plus » (Figures 35 et 36).

- Enfin, les lames sont séchées à l'étuve (50°C) pendant 1 heure.

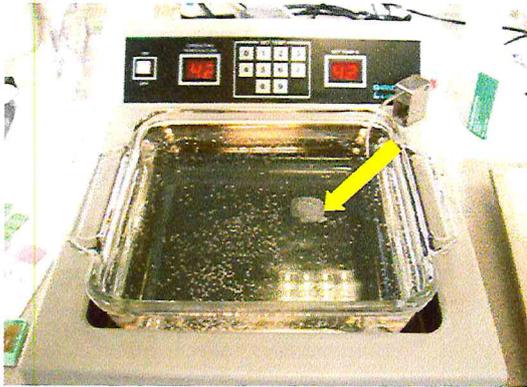


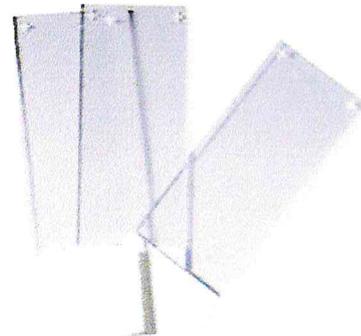
Figure 34 : Coupe flottante dans le bain-marie (Photo personnelle)



Figure 35 : Récupération de la coupe à l'aide d'une lame (Photo personnelle)



A



B

Figure 36 : Boîte (A) et lames (B) de type « Superfrost plus » (Photos personnelles)

Remarque : On utilise des lames spéciales pour l'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.

- **Deuxième étape :** Avant de commencer l'immunoréaction indirecte, on a fait :

- Un déparaffinage et une hydratation (Figure 37) des prélèvements comme suit :
 - Cyclohexane I : 10 min.
 - Cyclohexane II : 10 min.
 - Ethanol à 95° : 5 min.
 - Ethanol à 70° : 1 min.

- Eau courante : passage jusqu'à disparition du trouble.

Les différentes étapes de l'immunomarquage indirect sont les suivantes :

- Les coupes déparaffinées et hydratées sont rincées au PBS (Figure 38 et 39)
- L'excès de PBS est enlevé par égouttage des lames sur du papier absorbant
- Les étapes du démasquage des sites antigéniques sont les suivantes :
 - Agiter la solution de démasquage (Figure 40) (tampon citrate, pH = 6) et prélever 15 ml et les diluer dans 1,6 litre d'eau distillée.
 - Mettre le mélange dans la cocotte-minute (Figure 41) et mettre à bouillir sur plaque chauffante.
 - Mettre les lames dans un portoir métallique. Immerger les lames dans la solution de démasquage bouillante et fermer la cocotte-minute.
 - Une fois la cocotte-minute sous pression (Figure 42), laisser les lames 1 min. (ne surtout pas ouvrir la cocotte minute tout de suite) puis passer la cocotte-minute sous l'eau froide jusqu'à ce que la pression descende.
 - Ouvrir la cocotte-minute et laisser refroidir pendant 30 min.
 - Récupérer le portoir avec une pince en bois.
 - Rincer les lames au PBS pendant 5 min.
- Après le démasquage, incuber les lames dans le mélange PBS+H₂O₂ à 3% pendant 5 min.
- Rincer au PBS
- Entourer les coupes avec une résine hydrophobe (Dako-pen) et les placers dans une chambre humide sur un agitateur va et vient (Figure 43).



Figure 37 : Batterie de déparaffinage (Photo personnelle)



Figure 38 : Bacs de rinçage au PBS (Photo personnelle)

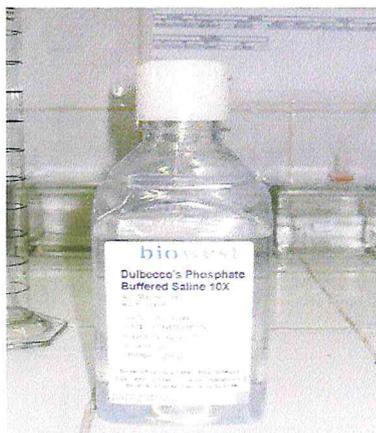


Figure 39 : Solution de PBS (Photo personnelle)



Figure 40 : Solution de démasquage (Photo personnelle)

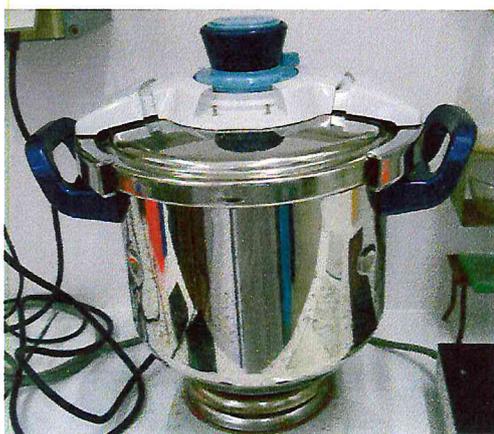


Figure 41 : Cocotte minute « SEB » (Photo personnelle)



Figure 42 : Cocotte minute sous pression (Flèche jaune) (Photo personnelle)



Figure 43 : Chambre humide sur un agitateur va et vient (Photo personnelle)

- Incuber les lames dans du sérum de cheval (Réactif jaune du kit VECTASTAIN) (Figure 44) à température ambiante, pendant 10 min.

- Les biotines endogènes sont bloquées par le kit de blocage (Avidin/Biotin Blocking KIT) (Figure 45) : incuber les coupes avec la solution Avidine D pendant 15 min. Rincer brièvement avec le PBS ; incuber pendant 15 min. avec une solution Biotine (Figure 39).

- Rincer au PBS.

- L'anticorps primaire anti-récepteurs aux androgènes de type polyclonale, produit chez le lapin, est dilué au 1/200 (AR N-20 : sc – 816, Santa Cruz) ; puis appliqué pendant une nuit à 4°C.

- Rincer au PBS, 2x5 min. L'anticorps secondaire biotinyllé, produit chez le cheval, est appliqué (Réactif bleu du kit VECTASTAIN) (Figure 44) 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) (Figure 44).

- Rincer au PBS : 2x5 min.



Figure 44 : Kit VECTASTAIN (A) et les réactifs (B) du kit VECTASTAIN (Photos personnelles)

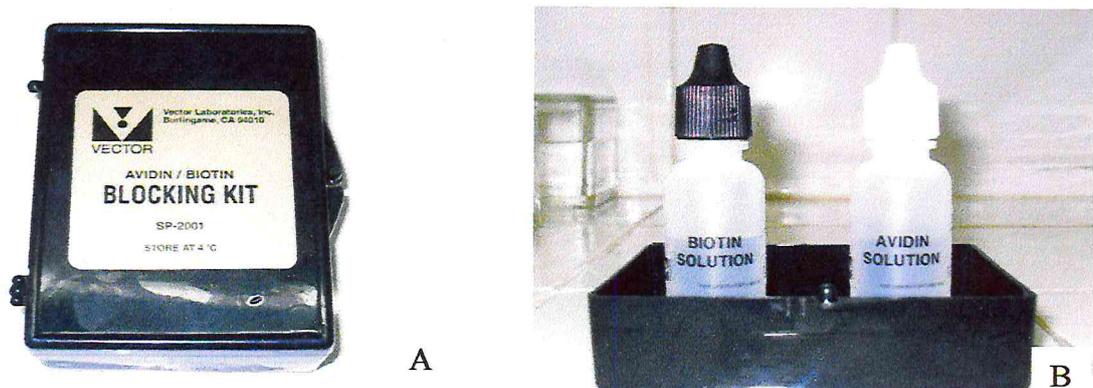


Figure 45 : Kit de blocage des biotines endogènes(A) et produits (B) du kit (Photos personnelles)

- Le chromogène utilisé est la DAB. Il est déposé sur les différentes coupes. 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).

- Déshydrater les lames comme suit :

- Ethanol à 70° : 2 min.
- Ethanol à 95° : 5 min.
- Ethanol à 100° : 5 à 10 min.
- Butanol : 5 min.
- Cyclohexane : 10 min.

- Déposer une goutte de liquide de montage « Eukitt » sur la lamelle (Figure 46).

Puis, appliquer la lamelle sur la lame en évitant la formation des bulles d'air. Enfin, la lame montée est prête à être observée (Figure 47).



Figure 46 : Liquide de montage « Eukitt » (Photo personnelle)

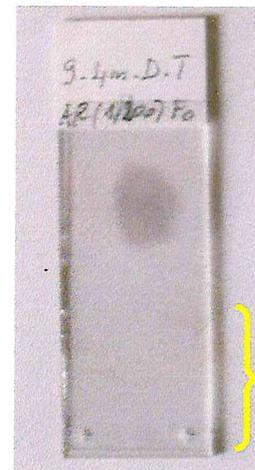


Figure 47 : Lame prête à être observée (Photo personnelle)

- Les lames montées sont séchées à l'air libre, puis observées au microscope photonique (Figure 48).



Figure 48 : Microscope photonique

- **Validité de la technique d'immunohistochimie**

Au cours de notre technique, des contrôles négatifs sont insérés pour confirmer l'immunomarquage observé. Les coupes qui servent de contrôles négatifs ont subi les mêmes étapes que notre prélèvement sauf que l'anticorps primaire anti-récepteurs aux androgènes est remplacé par le PBS.

* *
*

RÉSULTATS

Les résultats d'immunohistochimie des récepteurs aux androgènes vont servir d'une part à la localisation des RA au niveau testiculaire et d'autre part à la détermination de l'âge à la puberté des agneaux de race D'Man, âgés de 2 à 5 mois.

1. Structure histologique des testicules au cours de la croissance

Avant de décrire la structure histologique des testicules au cours de la croissance, on explique l'observation histologique de chaque type de cellules observé dans le testicule (Figures 49 et 50).

- Les **gonocytes** apparaissent comme de volumineuses cellules localisées en position centrale dans les tubes séminifères. Leur noyau, en position centrale, contient de l'hétérochromatine et un ou deux nucléoles.
- Les **cellules de Sertoli** occupent un grand volume au niveau des tubes séminifères. Ces cellules sont localisées à la périphérie des tubes séminifères. Ces derniers sont délimités par une lame basale. Leur noyau ovoïde est caractérisé par une hétérochromatine, contenant un ou deux nucléoles.
- Les **cellules myoïdes pérیتubulaires** ont une forme allongée, semblable aux fibres musculaires lisses.
- Le **tissu interstitiel** est observé entre les tubes séminifères ; il est constitué par des cellules somatiques, de type **cellules de Leydig**, qui apparaissent comme de larges cellules rondes groupées autour des vaisseaux sanguins. Les cellules de Leydig ont un noyau en position centrale et renferment une hétérochromatine.

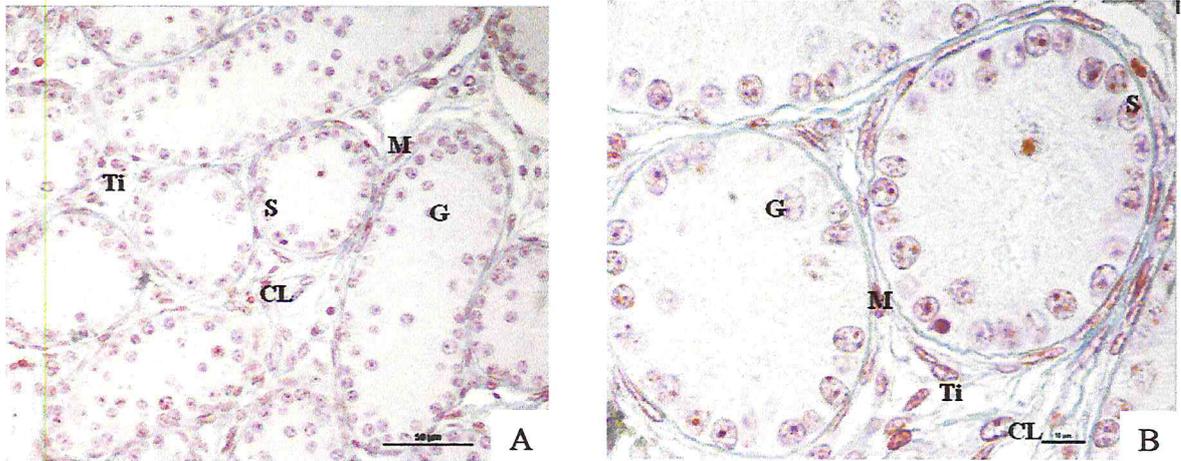
Les coupes transversales des testicules des agneaux de race D'Man montrent l'évolution des structures histologiques des testicules au cours de l'âge (Figures 49 et 50).

- A l'âge de 2 mois, les tubes séminifères, se présentent à l'observation microscopique comme des tubes pleins sans présence de la lumière centrale (Figure 51). Les gonocytes peu nombreux, localisés au centre des tubules, sont les seules cellules germinales observées. La partie périphérique des tubes séminifères est occupée par les cellules de Sertoli (Figure 49).

A cet âge, l'espace intertubulaire est occupé par un tissu interstitiel très abondant. L'ensemble des structures observées, est délimité par un tissu conjonctif formant l'albuginée.

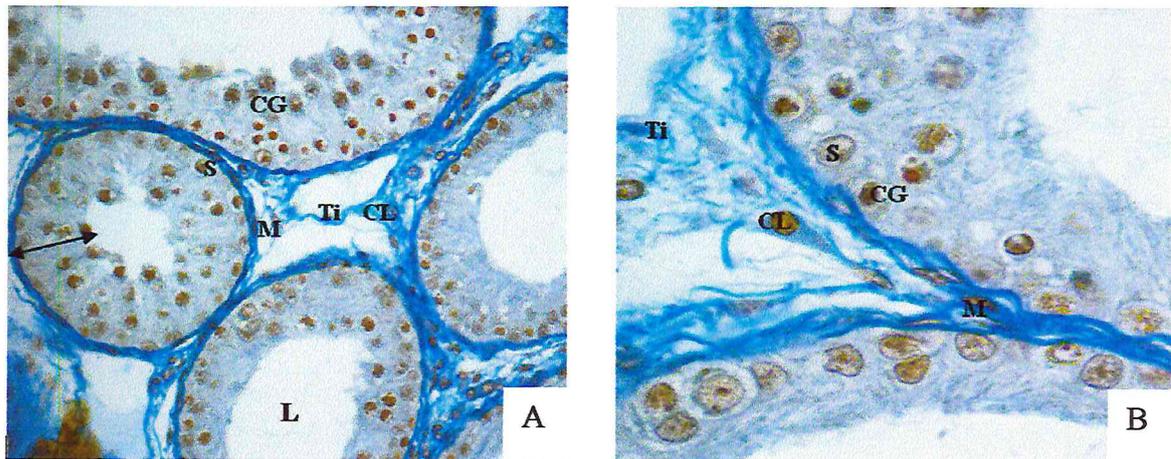
• A partir de l'âge 3 mois et jusqu'à 5 mois, une distincte lumière centrale est observée au centre des tubes séminifères. Les cellules spermatogénétiques ont migrées vers la périphérie des tubes séminifères. Ces derniers sont délimités par une lame basale (Figure 50).

Les cellules du tissu interstitiel, de type cellules myoïdes périlitubulaires, délimitent extérieurement la lame basale. Le tissu interstitiel occupant l'espace intertubulaire est peu abondant (Figure 50).



Ti : Tissu interstitiel ; CL : cellule de Leydig ; M : cellule périlitubulaires myoïdes ; S : Sertoli ; G : cellule germinale.

Figure 49 : Histologie des coupes transversales des testicules des agneaux âgés de 2 mois. Coloration Azan (A : x 400 ; B : x 1000)



Ti : Tissu interstitiel ; CL : cellule de Leydig ; M : cellule périlitubulaires myoïdes ; S : Sertoli ; L : Lumière ; CG : cellule germinale ; ↔ : Epithélium séminifère.

Figure 50 : Histologie des coupes transversales des testicules des agneaux âgés de 4 mois. Coloration Azan modifiée (A : x 400 ; B : x 1000).

2. Analyse de l'immunomarquage des récepteurs aux androgènes au niveau des testicules

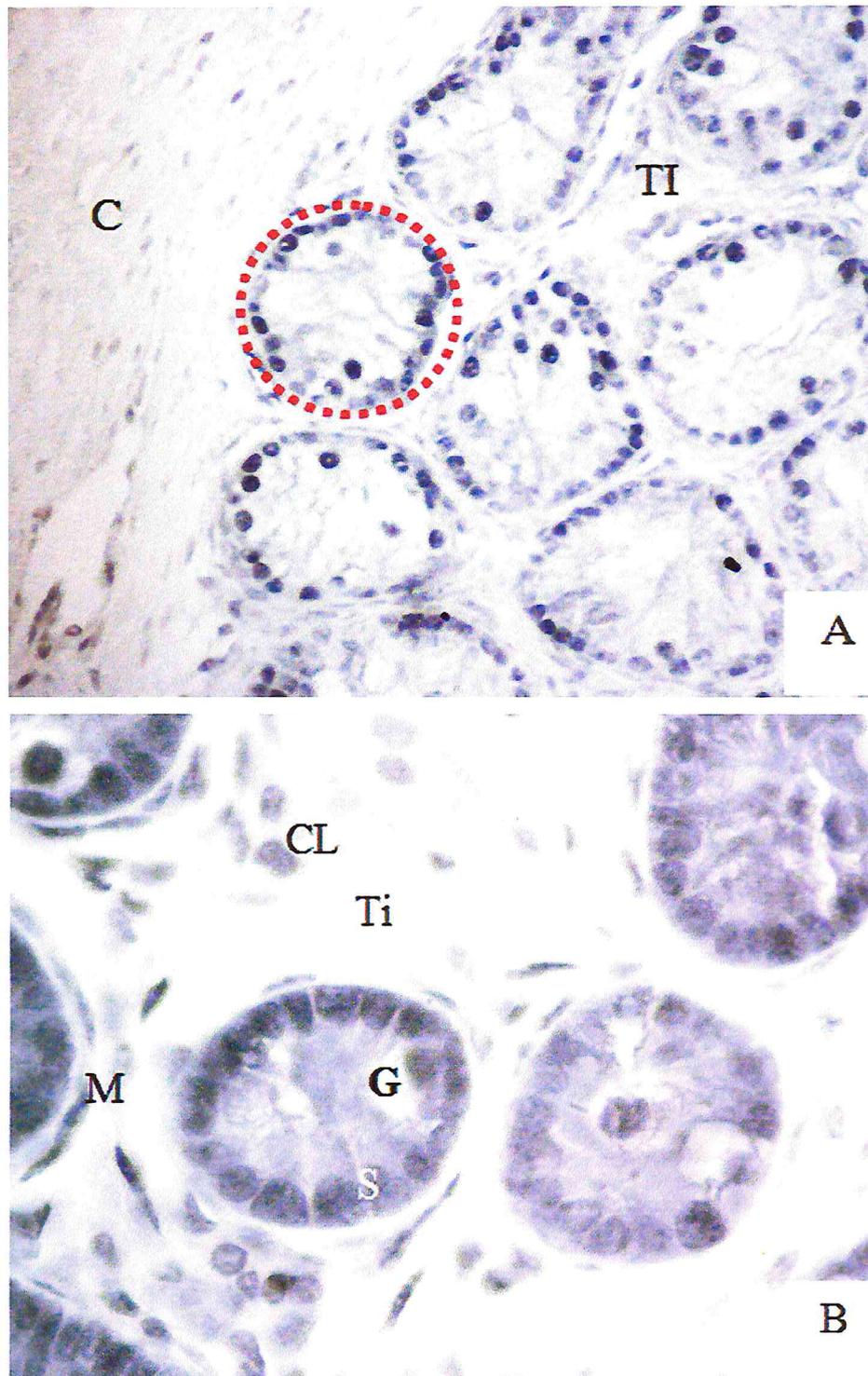
Après l'immunomarquage des récepteurs aux androgènes, l'observation au microscope photonique des coupes de testicule des agneaux de race D'Man, montre une réaction positive entre les récepteurs aux androgènes et l'anticorps anti-récepteurs aux androgènes utilisé dans notre travail.

Ce marquage est observé à la fois dans le compartiment interstitiel et dans l'épithélium séminifère (Figures 51, 52, 53 et 54).

- Dans le **compartiment interstitiel** : le marquage spécifique des RA se trouve au niveau de quelques cellules de Leydig dont l'intensité de marquage varie d'une cellule à l'autre et même entre deux cellules adjacentes.
- Dans le **compartiment tubulaire**, la localisation des RA est observée aux niveaux des noyaux :
 - Des cellules de Sertoli,
 - Des cellules de la lignée germinale,
 - Des cellules myoïdes péritubulaires.

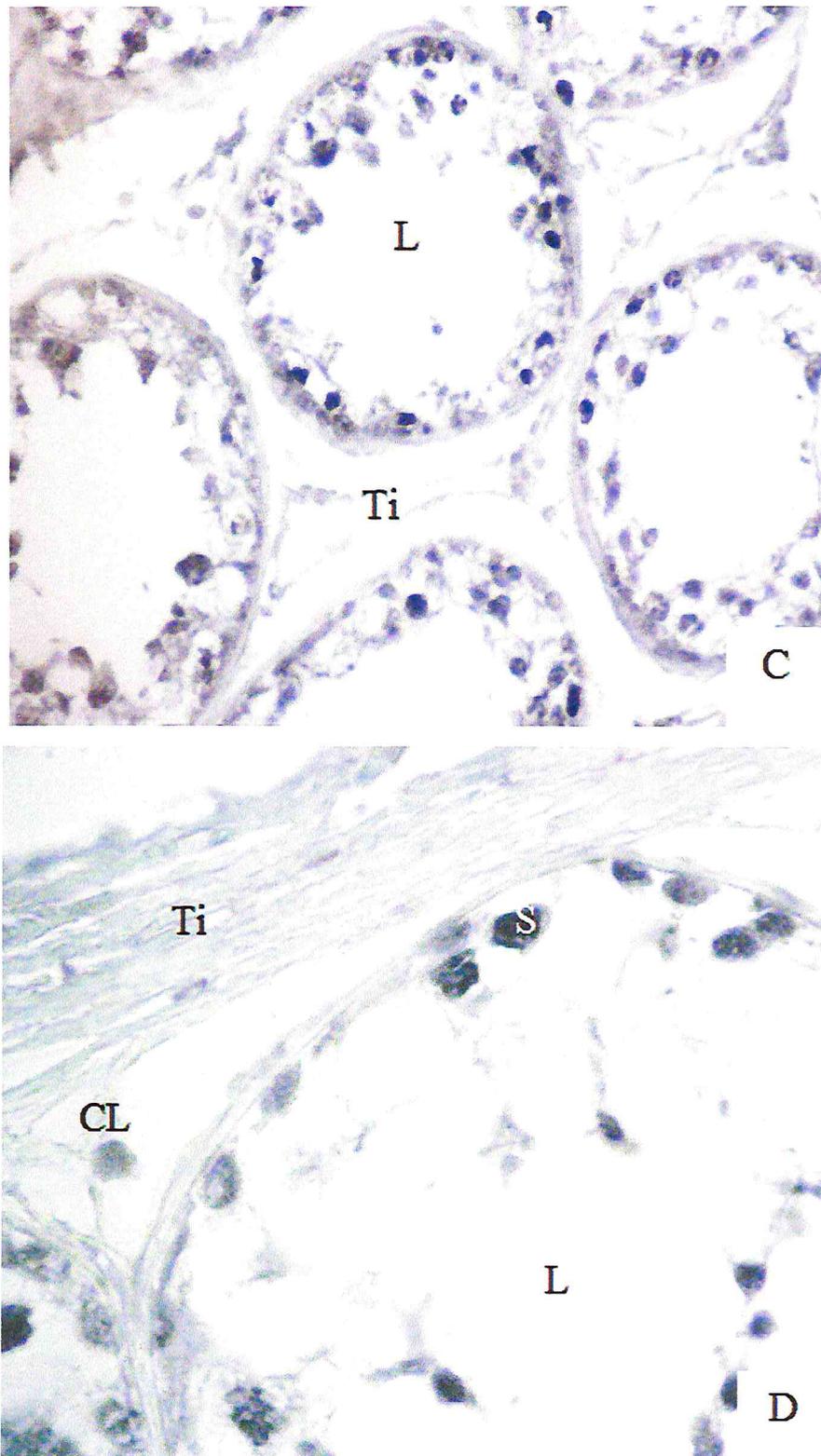
Au cours de la technique d'immunomarquage des coupes de testicule, des contrôles négatifs ont été utilisés pour connaître si l'anticorps primaire se lie de façon spécifique sur son antigène. L'observation microscopique des lames utilisées comme contrôle négatif ne montre aucun marquage au niveau des cellules des deux compartiments testiculaires interstitiel et tubulaire (Figure 55).

Nos résultats sont validés par la présence de ce contrôle négatif ; car d'après Suarez-Quian et *al.* (1997), la validité des résultats d'une étude immunohistochimique repose essentiellement sur la qualité des contrôles effectués comprenant à la fois des contrôles positifs et négatifs.



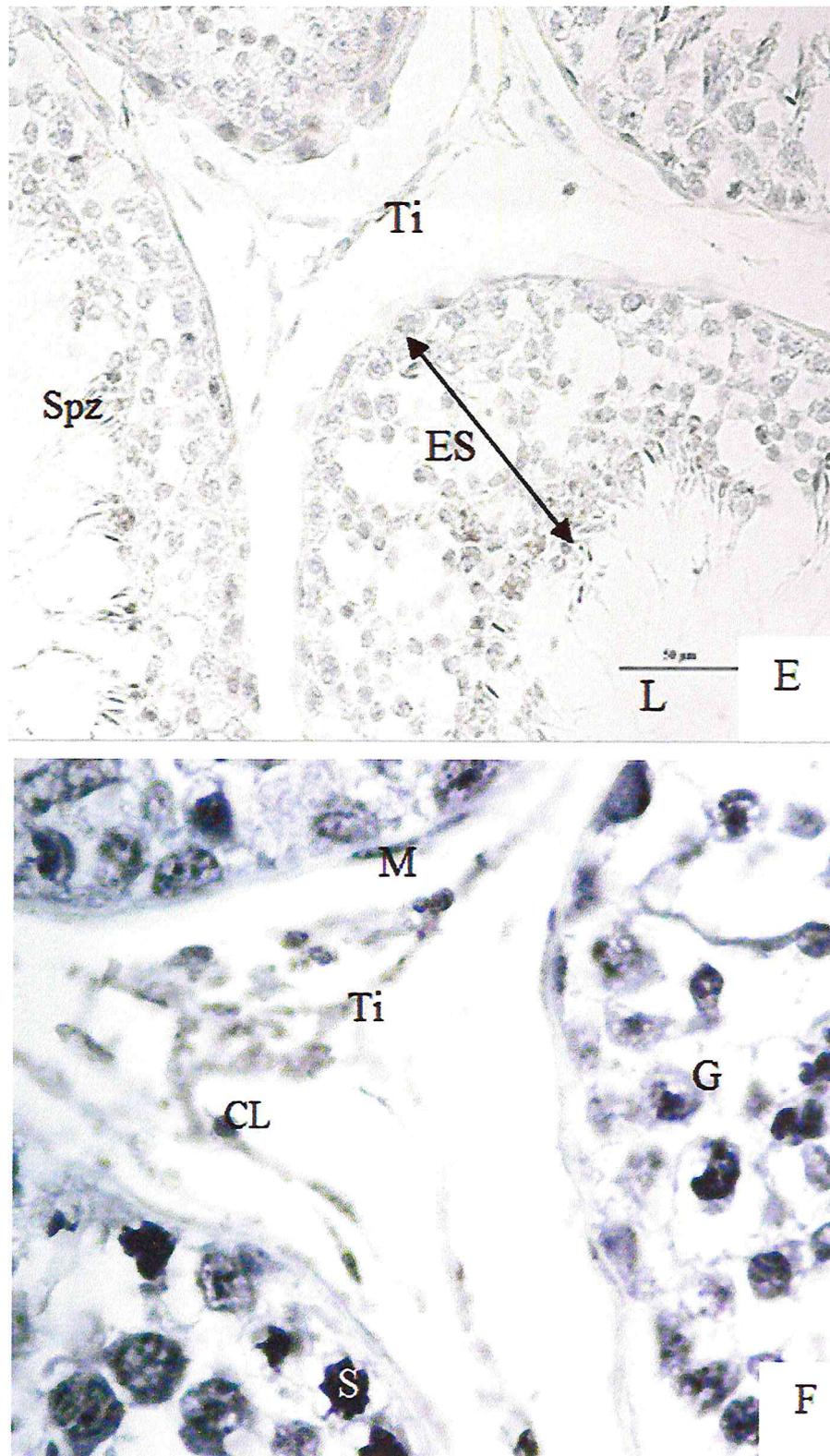
Ti : Tissu interstitiel ; CL : cellule de Leydig ; M : cellule périlitubulaires myoïdes ; C : capsule conjonctif ; S : Sertoli ; G : cellule germinale ; : Tube séminifère ; (A : x 400 ; B : x 1000)

Figure 51 : Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes au niveau des coupes transversales de testicules des agneaux de race D'Man, âgés de 2 mois.



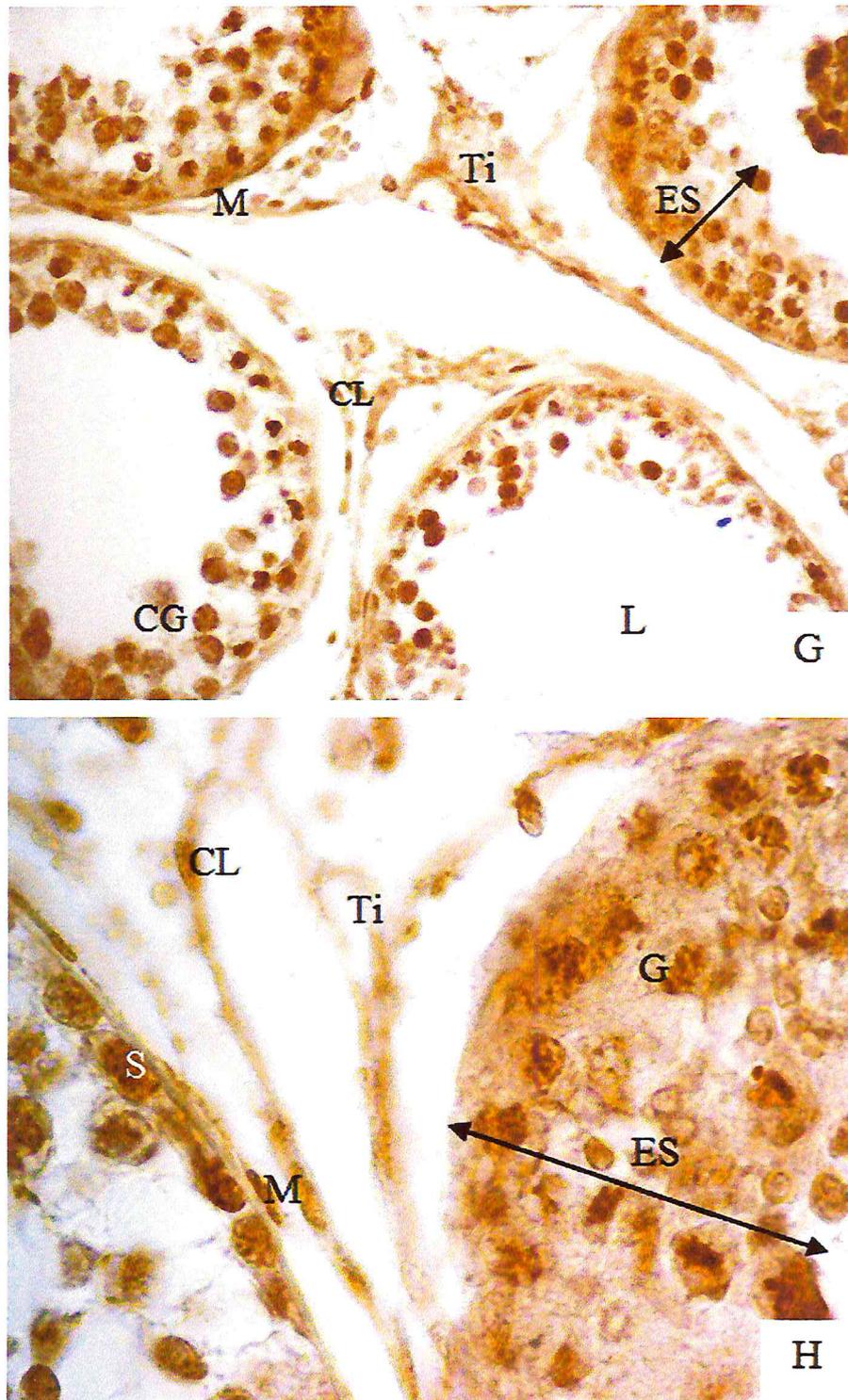
Ti : Tissu interstitiel ; CL : cellule de Leydig ; S : Sertoli ; L : Lumière ; G : cellule germinale
(C : x 400 ; D : x 1000)

Figure 52 : Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes au niveau des coupes transversales de testicules des agneaux de race D'Man, âgés de 3 mois.



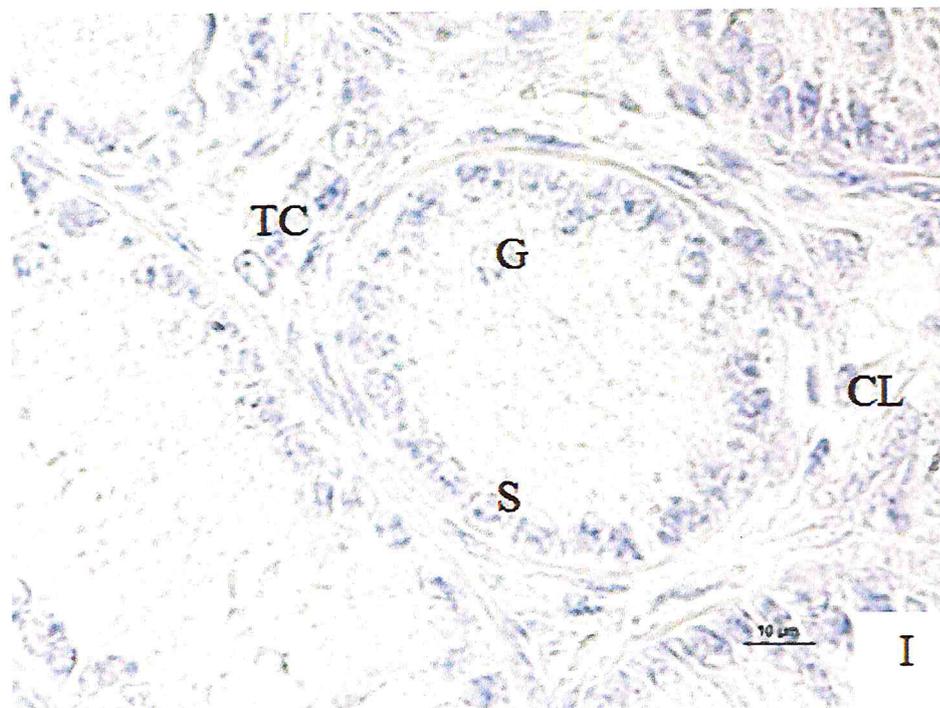
Ti : Tissu interstitiel ; CL : cellule de Leydig ; M : cellule péritubulaires myoïdes ; S : Sertoli ; G : cellule germinale ; ES : Epithélium séminifère ; Spz : Spermatozoïde (E : x 400 ; F : x 1000)

Figure 53 : Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes au niveau des coupes transversales de testicules des agneaux de race D'Man, âgés de 4 mois.



Ti : Tissu interstitiel ; CL : cellule de Leydig ; M : cellule péritubulaires myoïdes ; S : Sertoli ; G : cellule germinale (G : x 400 ; H: x 1000)

Figure 54 : Immunolocalisation des récepteurs aux androgènes au niveau des coupes transversales de testicules des agneaux de race D'Man, âgés de 5 mois



Ti : Tissu interstitiel ; CL : cellule de Leydig ; M : cellule périrubulaires myoïdes ; S : Sertoli ; G : cellule germinale (I : x 1000)

Figure 55 : Coupe transversale des testicules d'agneau âgé de 2 mois : Contrôle négatif (x 1000)

L'ensemble des résultats obtenus révèle que les récepteurs aux androgènes détectés par immunohistochimie sont localisés uniquement dans le noyau des cellules testiculaires (cellules de Leydig, cellules de Sertoli, cellules germinales et les cellules myoïdes périrubulaires) au cours du développement du testicule des agneaux âgés de 2 à 5 mois (Figures 51, 52, 53 et 54).

* *
*

DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de notre travail sont discutés par rapport à quelques données rapportées par d'autres auteurs chez d'autres espèces.

La description des structures histologique observé chez l'agneau à savoir les cellules germinale et les cellules somatiques décrites dans notre travail, est identique à celle rapporté par Courot (1962; 1971) et Herrera – Alarcon (2007) chez la même espèce.

A l'âge de 2 mois, les tubes séminifères pleins (sans lumière centrale) témoignent que les agneaux sont impubères car les cellules de la lignée germinale sont indifférenciées. Ce même résultat est rapporté chez les autres mammifères (Attal et Courot, 1963 ; Hauchereau de Reviers, 1963 ; Joffre, 1977 ; Hauchereau de Reviers et Perreau., 1997), en particulier chez les ovins (Courot, 1962; 1971 et Herrera – Alarcon, 2007).

A partir de l'âge de 3 mois, l'apparition de la lumière au centre des tubes séminifères témoigne que les agneaux utilisés au cours de notre expérimentation sont pubères. Un résultat similaire a été obtenu chez la même espèce vivant dans le même biotope (Boukenaoui, 2001). Russel et *al.* (1989) expliquent que l'apparition de la lumière est une conséquence d'une sécrétion élevée et d'une accumulation de liquide tubulaire produit par les cellules de Sertoli. La présence de cette lumière dans les tubes séminifères témoigne que le processus de développement et de différenciation de l'épithélium séminifère est fonctionnel et la formation du système jonctionnelles, de type tight junctons, entre les cellules de Sertoli adjacente est mise en place (Russel et *al.*, 1989).

Nos résultats d'immunomarquage des prélèvements testiculaires des agneaux de race D'Man ont montré différentes localisations de ces récepteurs dans le compartiment interstitiel et dans le compartiment tubulaire. En effet, Zhou et *al.* (2002) a rapporté l'existence d'une variation considérable dans la localisation des récepteurs aux stéroïdes au niveau du tractus génital male au sein d'une même espèce et entre différentes espèces étudiées.

L'immunolocalisation des RA, observée au cours de notre travail, a été mise en évidence au niveau des deux compartiments du testicule chez les agneaux.

- Dans le compartiment interstitiel, l'immunomarquage montre que les noyaux des cellules de Leydig sont positifs. Un résultat comparable a été rapporté chez la souris (Suarez-Quian et *al.*, 1997 ; Zhou et *al.*, 2002), le rat (Sar et *al.*, 1990 ; Suarez-Quian et *al.*, 1997 ; Pelletier et *al.*, 2000), le porc (Ramesh et *al.*, 2007), les primates (Pelletier et *al.*, 2000) et l'homme (Sar et *al.*, 1990 ; Regadera et *al.*, 2001 Berensztien et *al.*, 2006). Les cellules de Leydig sont les cellules cibles de l'action des androgènes au niveau du testicule. En effet, Shan et *al.* (1997) rapportent que les androgènes exercent un effet inhibiteur partiel sur la stéroïdogénèse de ces cellules. Comme elles synthétisent et secrètent les androgènes (en

particulier la testostérone) et contiennent des RA ; il peut être suggéré que, dans ce type de cellules, les androgènes exercent une action intracrine ou paracrine par la présence de ces récepteurs (Pelletier et *al.*, 2000).

- Dans le compartiment tubulaire : L'immunoréactivité des RA est trouvée dans les noyaux des cellules somatiques (cellules de Sertoli et les cellules myoïdes périvitubulaires) et dans les noyaux des cellules germinales (Gonocytes, spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes) aux niveaux des coupes transversales des testicules des agneaux au cours de la croissance (2 à 5 mois). Des résultats similaires ont été rapportés par de nombreux auteurs (Sar et *al.*, 1990 ; Suarez-Quian et *al.*, 1997 ; Pelletier, 2000 ; Pelletier et *al.*, 2000 ; Regadera et *al.*, 2001 ; Zhou et *al.*, 2002 ; Berensztien et *al.*, 2006 ; Ramesh et *al.*, 2007) chez les différentes espèces étudiées à l'exception du marquage observé au niveau des cellules de la lignée germinale. En effet, Suarez-Quian et *al.* (1997), Berensztien et *al.* (2006) et Ramesh et *al.* (2007), ont rapporté des résultats similaires concernant la présence de marquage au niveau des cellules de la lignée germinale. Par contre, Sar et *al.* (1990) ; Pelletier (2000) ; Pelletier et *al.* (2000) ; Regadera et *al.* (2001) et Zhou et *al.* (2002), n'ont pas observé de marquage au niveau des ces cellules germinales.

La présence de RA dans les cellules somatiques des testicules est en accord d'une part avec certaines études fonctionnelles (régulations physiologiques) (Hansson et *al.*, 1975) et des résultats de localisation immunohistochimique et d'autre part avec l'hypothèse de localisation testiculaire annoncé par Fritz (1978).

En médecine, les androgènes et les RA sont connus pour avoir des rôles dans la reproduction chez le mâle. L'inactivation de l'expression des gènes de RA contribue dans le dysfonctionnement de la spermatogenèse se traduisant par une interruption de la méiose des cellules germinales, et par la production insuffisante de cellules spermatiques matures ; Ce dysfonctionnement serait un des facteurs responsable de la stérilité chez le mâle (Walters et *al.*, 2010). Par conséquent, les différentes mutations des gènes des récepteurs aux androgènes sont responsables des syndromes d'insensibilité aux androgènes (Giwerzman et Svensson, 2008).

* *
*

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De l'ensemble des résultats, nous retiendrons que, chez les agneaux de race D'Man élevés à El-Meniaa (30°34' N, 02°52' E) âgés de 2 à 5 mois, l'étude immunohistochimique a révélé un marquage :

- Dans le compartiment interstitiel : le marquage spécifique des RA se trouve au niveau de quelques cellules de Leydig dont l'intensité des marquages varie d'une cellule à l'autre et même lorsqu'il s'agit de deux cellules voisines (adjacentes).
- Dans le compartiment tubulaire, la localisation des RA est observée aux niveaux des noyaux : des cellules de Sertoli, des cellules de la lignée germinale, des cellules myoïdes périvitubulaires.

Ce travail préliminaire doit être complété par :

- Une étude biométrique (poids corporel, poids des testicules).
- Une étude morphométrique (détermination du diamètre des tubes séminifères).
- Une étude quantitative (détermination du nombre de cellules de testiculaire).
- Un Western Blot pour valider l'anticorps utilisé dans l'immunomarquage des RA.

* *

*

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- 1) **André J.M., Catala M., Morère J.J., Escudier E., Katsanis G., Poirier J., 2008** - Histologie : les tissus. Université de Paris-VI, Histologie-Embryologie, Faculté de médecine (Pierre et Marie Curie), 199p.
- 2) **Anonyme** - Immunohistochimie. (<http://www.sante.univ-nantes.fr/.../ED%20analyse%20immunohistochimie.pdf>).
- 3) **Attal J. et Courot M., 1963** - Développement testiculaire et établissement de la spermatogenèse chez le taureau. Station de Recherches de Physiologie animale, Centre national de Recherches zootechniques. Jouy-en-Josas. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys, 3(3), 219-241.
- 4) **Baril G., Chemineau P., Cognie Y., Guérin Y., Leboeuf B., Orgeur P. et Vallet J.C., 1993** - Manuel de formation pour insémination artificielle chez les ovins et caprins. Etudes FAO reproduction et santé animale 83, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, 183p.
- 5) **Bellve A.R., Cavicchia J.C., Millette C.F., O'Brien D.A., Bhatnagar Y.M., and Dym M., 1977** - Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. J. Cell. Biol., 74, 68-85.
- 6) **Berensztein E.B., Baquedano M.S., Gonzalez C.R., Saraco N.I., Rodriguez J., Ponzio R., Rivarola M.A. and Belgorosky A., 2006** - Expression of aromatase, estrogen receptor alpha and beta, androgen receptor, and cytochrome P-450sc in the human early prepubertal testis. *Pediatr. Res.*, 60 (6), 740-744.
- 7) **Bister J.L., 2007** - La reproduction du mouton : Le système reproducteur de bélier. FUNDP CRO, Laboratoire de Physiologie animale.
- 8) **Boukenaoui N., 2001** - Evolution des fonctions corticosurrénalienne et gonadique, au cours de l'acquisition de la puberté, chez les agneaux de race D'Man. Thèse de Magister, 144p.
- 9) **Bremner W.J., Millar M.R., Sharpe R.M. and Saunders P.T.K., 1994** - Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology*, 135, 1227-1234.
- 10) **Chellig R., 1992** - Les races ovines algériennes. Edition OPU, 76p.
- 11) **Coons A.H., Creech H.J., Jones R. and Berliner E., 2006** - The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.*, 76p.

- 12) **Courot M., 1962** - Développement du testicule chez l'agneau. Etablissement de la spermatogenèse. Station de Recherches de Physiologie animale, Centre national de Recherches zootechniques. Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise). Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 2(1), 25-41.
- 13) **Courot M., 1971** - Etablissement de la spermatogenèse chez l'agneau (*ovis aries*), Etude experimental de son contrôle gonadotrope ; importance de la ligné sertoliennes. Thèse de doctorat en Es- Sciences Naturelles, 218p.
- 14) **Dadoune J.P. and Démolin A., 1991** - Structure et fonction du testicule. Dans : La reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition Ellipses, 221-250p.
- 15) **De Rooij D.G., 2001** - Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. Reproduction, 121, 347-354.
- 16) **Dohle G.R., Smit M. and Weber R.F., 2003** - Androgens and male fertility. World J. Urol., 21, 341-345.
- 17) **Dym M., 1994** - Spermatogonial stem cells of the testis. Proc. Natl. Acad Sci, U.S.A., 91, 11287-11289.
- 18) **Fritz I., 1978** - Sites of action of androgens and follicle stimulating hormone on cells of the somniferous tubules. In: Biochemical Actions of Hormones. Litwack Edit., Academic Press, New York, 249-281.
- 19) **Garaud J.C. et Roussel G., 2007**- Immunohistochimie en microscopie photonique et électronique : Théorie et Pratique. 295p.
- 20) **Gaulard Ph., Wechsler J., Voisin M.C., Martin-Garcia N. et Boullard M.L., 2008** - Techniques immunohistologiques : Aspect théorique et pratiques. Pathologie, Hôpital Henri Mondor-Creteil, p 1-14.
- 21) **Gayrard V., 2007**- Physiologie de la reproduction des mammifères. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 198p.
- 22) **Girma A., 2008** - Chapter 5: Reproduction in sheep and goat. Sheep and goat production, Handbook for Ethiopia, p.59-79.
- 23) **Giwereman Y.L., Svensson J., 2008** - Androgen insensitivity syndrome. Tidsskr Nor Laegeforen, 128 (5), 581-585.
- 24) **Hanzen Ch., 2009** - Rappels anatomo-physiologiques relatifs à la reproduction du taureau. Anatomo-physio-histologie du tractus génital du taureau, 8p.
- 25) **Heron J.F., 2009** - L'immunohistochimie. (http://www.oncoprof.net/enerale2000/g04_Diagnostic/Histologie/Techniquetexte/dg_ap_tech06.html).

- 26) **Herrera-Alarcon J., Villagomez-Amezcuca E., Gonzalez-Padilla E., Jimenez-Serveriano H., 2007** - Stereological study of postnatal testicular development in Blackbelly sheep. *Theriogenology*, 68, 582-591.
- 27) **Hochereau de Reviers M.T., 1963** - Constance des fréquences relatives des stades du cycle de l'épithélium séminifère chez le taureau et chez le rat *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 3(2), 93-102.
- 28) **Hochereau de Reviers M.T. et Perreau C., 1997** - Evolution des cellules somatiques et germinales au cours de l'établissement de la spermatogenèse chez le porcelet Large White. *Evolution J. Rech. Porcine en France*, 29, 99-102.
- 29) **Jégou B., 1995** - La cellule de Sertoli : actualisation du concept de cellule nourricière. *Médecine / Sciences*, 11, 519-527.
- 30) **Joffre J.M., 1977** - La capsule testiculaire du renard roux (*Vulpes vulpes L.*) : relation avec l'activité testiculaire pendant la période prépubère et au cours du cycle saisonnier. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 17(5A), 695-712.
- 31) **Lajili M., 2008** - Physiologie de la reproduction (chez l'homme). Diaporama. Lycée Farhat Hached – M'Saken, 27p.
- 32) **L'Hôte D., 2009** - Exploitation d'un modèle de souris interspécifiques, recombinantes et congéniques pour la cartographie de QTL de la fertilité mâle et pour l'étude de la régulation génique testiculaire dans le contexte d'un génome mosaïque. Thèse de doctorat, 151p.
- 33) **Mark M., 2006** - Technique histologique. Institut d'Embryologie de Strasbourg. Faculté de Médecine et Hôpital Universitaire de Strasbourg. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 28p.
- 34) **Maekawa M., Kamimura K. and Nagano T., 1996** - Peritubular myoïd cells in the testis : their structure and function. *Archive Histo. Cyto.*, 59, 1-13.
- 35) **Nussey S.S. and Whitehead S.A., 2001** - An Integrated Approach (Endocrinologie : une approche intégrée). *Arch. Endocrinology*, publié par BIOS Scientific Publishers, Ltd; Oxford, UK.
- 36) **Pelletier G., 2000** - Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol. Histopathol.*, 15 (4), 1261-1270.
- 37) **Pelletier G., Labrie C. and Labrie F., 2000** - Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.*, 165 (2), 359-370.

- 38) **Prisot J.C., 2004-** Les processus immunitaires mis en jeu. (http://www.lucieberger.org/svt/SVT%20en%20T%20S/WEB_TS/7_Immuno/ProcImm.html) .
- 39) **Ramesh R., Pearl C.A., At-Taras E., Roser J.F. and Berger T., 2007 -** Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis : effect of reducing testicular estrogen synthesis. *Anim. Reprod. Sci.*, 102 (3-4), 286-299.
- 40) **Regadera J., Martínez-García F., González-Peramato P., Serrano A., Nistal M. and Suárez-Quian C., 2001 -** Androgen receptor expression in sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86 (1), 413-421.
- 41) **Reveiller M., 2008 -** Etude du ligand TRAIL et ses récepteurs dans la prostate normale et pathologique reliée au statut hormonal. Thèse de doctorat, 269p.
- 42) **Russell L.D. and Griswold M.D., 1993 -** The Sertoli cell. Cache River Press.
- 43) **Saez J.M., 1994 -** Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrinology Rev.*, 15, 574-626.
- 44) **Sar M., Luban D.B., French F.S. and Wilson E.M., 1990 -** Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*, 127, 3180-3186.
- 45) **Shan L.X, Bardin C.W and Hardy M.P., 1997 -** Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology*, 138 (3), 1259-1266.
- 46) **Singh J., O'Neill C. and Handelsman D.J., 1995 -** Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology*, 136, 5311-5321.
- 47) **Suarez-Quian C.A., Oke B.O., Vornberger W. et Gerard H., 1997 -** Localisation du récepteur des androgènes dans le testicule. *Andrologie*, 7 (3), 293-304.
- 48) **Stocco D.M., 2002 -** Clinical disorders associated with abnormal cholesterol transport: mutations in the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 191, 19-25.
- 49) **Tosi A.C., Robin L., Iafrati J. et Nadjar A., 2007 -** Neuroanatomie Fonctionnelle. Méthodes en neuroanatomie : L'immunohistochimie. UFR Sciences Biologiques Bordeaux 1, UFR Sciences de la vie Bordeaux 2.
- 50) **Tostain J., Rossi D. and Martin P. M., 2004 -** Physiology of androgens in adult men. *Prog Urol*, 14, 639-660.
- 51) **Vernet N., 2006-** Analyse du rôle de l'acide rétinolique et de ses récepteurs au cours de la spermatogenèse. Thèse de doctorat, 221p.

- 52) **Walters K.A., Simanainen U., Handelsman D.J., 2010** – Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Human Reproduction Update Advance*. Oxford University Press, 23(12), 4218-4230.
- 53) **Weber J.E., Russell L.D., Wong V. and Peterson R.N., 1983** - Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell : II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ-cell relationships. *Am. J. Anat.*, 167, 163-179.
- 54) **Zhou Q., Nie R., Prins G.S., Saunders P.T., Katzenellenbogen B.S, Hess R.A., 2002** - Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J. Androl.*, 23 (6), 870-881.

* *

 *