



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



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies

Mémoire

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

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

**Evaluation de l'immunolocalisation des récepteurs aux œstrogènes au
niveau des ovaires kystiques chez la vache**

Présenté par : Bouaicha Abdelkader et Djelaoui Chafika

Devant le Jury :

<i>M. Mekhlouf.</i>	<i>MCB</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Présidente</i>
<i>M. Benazouz F.</i>	<i>MAA</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Boukenaoui-Ferrouk N.</i>	<i>MCA</i>	<i>ISV, Blida1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Ferrouk M.</i>	<i>MCA</i>	<i>ISV, Blida1</i>	<i>Co-Promoteur</i>

Année universitaire 2020 / 2021

Remercîments

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le tout puissant, de nous avoir aidés et de nous avoir donné la foi et la force pour achever ce modeste travail.

Nous tenons beaucoup à remercier notre promoteur, Docteur Ferrouk M. et la co-promotrice, Docteur Boukenaoui N. qui nous ont fait l'honneur d'accepter de nous encadrer pour réaliser notre travail, et pour l'encouragement qu'ils nous ont donné ainsi que leur disponibilité, soutien, conseils et accompagnement sans relâche durant notre travail. Leur expérience nous a énormément appris à parfaire notre esprit d'analyse et de recherche.

Nos remerciements vont à Docteur M. Mekhlouf. A pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury ainsi qu'au Docteur M. Benazouz F. à avoir accepté d'examiner notre travail.

Un grand merci est adressé à tous nos enseignants, nous tenons à leur exprimer notre reconnaissance pour tout ce qu'ils nous ont donné comme savoir et savoir-faire. A toutes les personnes qui nous ont aidés de près et de loin pour la réalisation de ce travail.

Sommaire :

Remercîment

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abr eviations

R esum e (arabe, fran ais, anglais)

Introduction.....	1
Chapitre I : Données bibliographiques	1
I. Rappels morphologie, histologie et physiologie de l'ovaire	2
I.1 Morphologie de l'ovaire	2
I.2 Histologie de l'ovaire.....	3
I.3 Physiologie de l'ovaire	4
I.3.1 Folliculog�nese.....	4
I.3.2 Ovulation.....	4
I.4 Œstrogènes.....	4
I.4.1 Biosynthèse des œstrogènes	5
I.4.2 Récepteurs des œstrogènes.....	6
I.4.3 Mécanisme d'action des œstrogènes	8
I.4.4 Rôles des œstrogènes	9
I.5 Régulation ovarienne	10
I.5.1 Régulation de la croissance folliculaire	11
I.6 Dysfonctionnement des ovaires	12
II. Ovaires polykystiques	13
II.1 Définition.....	13
II.2 Fréquence des kystes ovariens	13
III. Physiopathologie	13
III.1 Dysfonctionnement hormonal.....	14
III.1.1 Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	14
III.1.1.1 Concentration en GnRH	14
III.1.1.2 Concentration en LH	14
III.1.1.3 Concentration en FSH	14
III.1.2 Perturbation au niveau ovarien	14
III.1.2.1 Concentration en œstradiol.....	14
III.1.2.2 Concentration en progestérone.....	15
III.1.3 Perturbation de l'axe corticotrope	15
III.2 Dysfonctionnement de la paroi folliculaire.....	15

IV.	Causes et facteurs de risque.....	15
IV.1	Facteurs propres à l'animal.....	15
IV.2	Facteurs prédisposants extrinsèques	16
	Chapitre II : Matériel et méthodes	2
I.	Modèle animal.....	17
II.	Technique d'histologie.....	18
III.	Technique d'immunohistochimie pour la mise en évidence des récepteurs aux œstrogènes	20
III.1	Principe	20
III.2	Protocole d'immunohistochimie.....	21
	Chapitre III : Résultats et discussion	17
	Conclusion	30
	Références bibliographiques	41

Liste des figures

Figure 1: schéma de l'appareil génital de la vache	2
Figure 2: Représentation schématique d'une coupe transversale d'un ovaire.....	3
Figure 3: Voie de biosynthèse des œstrogènes	5
Figure 4: Principales voies de régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique	6
Figure 5: Organisation structurale des récepteurs d'œstrogènes.	6
Figure 6: Représentation schématique de la structure des domaines des récepteurs nucléaires.....	7
Figure 7: Structures comparées des récepteurs des œstrogènes	7
Figure 8 : Mécanisme d'action et voies de signalisation des œstrogènes	8
Figure 9: Mécanismes cellulaires de l'action des œstrogènes..	9
Figure 10: Contrôle de la production des œstrogènes au cours du cycle ovarien par l'axe hypothalamo-hypophysaire	10
Figure 11: Chronologie du développement folliculaire.....	11
Figure 12: Rôles relatifs des gonadotrophines et des facteurs de croissance au cours du développement folliculaire	11
Figure 13: Appareil génital de la vache.....	17
Figure 14: Vue externe des ovaires (a) et coupe longitudinale (b) des ovaires de la vache à l'état frais.	17
Figure 15: Fragment d'ovaire placé dans une cassette d'histologie.	18
Figure 16: Étapes de confection du bloc de paraffine.	19
Figure 17: Coupe au microtome.	19
Figure 18: Récupération des coupes sur des lames silanisées de type superfrost plus.....	20
Figure 19: Séchage des lames dans l'étuve.....	20
Figure 20: Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie.....	21
Figure 21: Bains de déparaffinage et réhydratation.....	21
Figure 22: Bains de PBS pour le rinçage des lames.	22
Figure 23: Démasquage au bain-marie.....	22
Figure 24: Blocage des peroxydases endogènes.....	23
Figure 25: Résine hydrophobe.....	23
Figure 26: Entourer les coupes par la résine hydrophobe.....	23
Figure 27: Chambre humide sur un agitateur va et vient.	23
Figure 28: Sérum de cheval (a) et application du sérum de cheval sur les coupes (b).....	24
Figure 29: Étapes de dilution de l'anticorps primaire anti-récepteurs aux œstrogènes.....	25
Figure 30: Anticorps secondaire anti-lapin biotinylé(a) et son application (b) sur les lames.	25
Figure 31: Complexe streptavidine-peroxydase (a) et son application (b) sur les lames.	26
Figure 32: Chromogène diaminobenzidine (DAB) maintenu à 4°C.....	26
Figure 33: Étapes de préparation du mélange substrat (a) - chromogène DAB (b).	27
Figure 34: Application du chromogène diaminobenzidine sur les coupes.....	27
Figure 35: Rinçage à l'eau distillée.....	27
Figure 36: Hématoxyline (a) et son application (b) sur les coupes.	28
Figure 37: Bain de déshydratation et éclaircissement.	28
Figure 38: Lames montées.....	29
Figure 39: Observation au microscope photonique à l'aide d'une caméra reliée à l'ordinateur.....	29

Figure 40:Observation au microscope optique de la coloration immunohistochimique de la protéine ERα présente dans les follicules ovariens ; dilution de l'anticorps 1 /50 grossissement×4 scale barre 500 μm.	33
Figure 41:Observation au microscope optique de la coloration immunohistochimique de la protéine ERα présente dans les follicules ovariens; contrôle négative grossissement ×4 , scale barre 500 μm.	34
Figure 42:Coloration immunohistochimique avec l'anticorps ERα dans la paroi folliculaire d'un kyste provenant d'un ovaire kystique bovin.....	36
Figure 43:Immunomarquage d'ERβ dans la paroi d'un follicule tertiaire d'un ovaire bovin normale Les couches de cellules de granulosa montrent une coloration nucléaire granulaire intense dans un pourcentage élevé de cellules. Une réaction granulaire et intense peut également être observée dans les cellules de la thèque. Méthode Streptavidin-Biotin, contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer.	36
Figure 44:La coloration immunohistochimique de la protéine ERβ présente dans les follicules ovariens bovins révèle qu'elle est présente dans les noyaux des petites cellules de la granulosa (flèche) des petits (1-5 mm ; A), moyens (6-9 mm ; C) et grands (9 mm ; E) follicules antraux.	38

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fréquence des kystes mis en évidence par palpation transrectale lors d'examen systématique de suivi de reproduction.

Tableau 2 : Synthèse bibliographique sur les étapes de la technique d'immunohistochimie réalisé sur les ovaires.

Tableau 3 : Synthèse bibliographique des résultats d'immunolocalisation des récepteurs aux œstrogènes au niveau des ovaires kystiques chez quelques espèces.

Liste des abréviations

ACTH : Adénocorticotrophine

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ATP : Adénosine triphosphate

CREB : C-AMP response element-binding protein

DBD : DNA binding domain

DHEA : Déhydroépiandrostérone

E1 : Œstrone

E2 : 17 β - œstradiol

E3 : Œstriol

E4 : Œstérol

ER : Estrogen receptor

ERE : Estrogen response elements

FSH : Follicle stimulating hormone

GnRH : Gonadotropin-releasing hormone

GRER : G protein-coupled estrogen receptor

HHG : Hypothalamo-hypophyso-gonadique

LDL : Low density lipoprotein

LH : Luteizing hormone

PR : progesterone receptor

ملخص

الهدف من عملنا هو تحديد موقع المناعة لمستقبلات هرمون الاستروجين في المبيض الكيسي في الأبقار. تظهر الأعضاء التناسلية التي يتم حصادها من المسلخ في الفحص الإجمالي مبيض به كيس. في القسم، يحتوي الجريب الكيسي على سائل مصفر وله جدار سميك ذو طبيعة أصفرية. يتم تثبيت عينة من المبيض الكيسي في الفورمالين المخزن لإجراء دراسة كيميائية مناعية. تظهر النتائج الأولية للتلوين المناعي أن عددًا كبيرًا من خلايا الداخلية تُظهر تفاعلًا مناعيًا شديدًا، في حين تُظهر الخلايا الحبيبية تفاعلًا مناعيًا منتشرًا معتدلًا أو ضعيفًا على مستوى المبيض الكيسي، وفي التحكم السلبي لم يلاحظ أي تلطيخ. عينة المبيض الكيسي.

في الختام، يلعب هرمون الاستروجين عبر مستقبلاته دورًا مهمًا في تنظيم الوظيفة الإنجابية في الأبقار، بينما يؤدي عدم التوازن الهرموني إلى حدوث خلل وظيفي في المبيض مع اضطرابات الخصوبة.

الكلمات المفتاحية: مستقبلات الأستروجين، الكيمياء النسيجية المناعية، المناعة، المبايض الكيسية، البقرة

Résumé

L'objectif de notre travail est de déterminer l'immunolocalisation des récepteurs aux œstrogènes au niveau des ovaires kystiques chez la vache. L'appareil génital récolté au niveau de l'abattoir présente à l'examen macroscopique un ovaire avec un kyste. A la section, le follicule kystique contient un liquide de couleur jaunâtre et présente une paroi épaisse de nature lutéale. Un prélèvement de l'ovaire kystique est fixé dans du formol tamponné pour une étude immunohistochimique. Les résultats préliminaires d'immunomarquage montrent un nombre élevé de cellules de la thèque interne présente une immunoréaction intense, alors que les cellules de la granulosa présentent une immunoréaction diffuse modérée ou faible au niveau de l'ovaire kystique, et dans le contrôle négatif aucun marquage n'a été observé au niveau du prélèvement de l'ovaire kystique.

En conclusion, les œstrogènes via leurs récepteurs jouent un rôle important dans la régulation de la fonction de reproduction chez la vache, alors que le déséquilibre hormonal induit un dysfonctionnement de l'ovaire avec des troubles de fertilité.

Mots clés : Récepteurs aux œstrogènes, immunohistochimie, immunoréaction, ovaires kystiques, vache.

Abstract

The objective of our work is to determine the immunolocalization of estrogen receptors in cystic ovaries in cows. The genital tract harvested at the slaughterhouse level shows on macroscopic examination an ovary with a cyst. On sectioning, the cystic follicle contains a yellowish fluid and has a thick luteal wall. A sample of the cystic ovary is fixed in buffered formalin for immunohistochemical study. Preliminary immunostaining results show a high number of cells from the internal theca show intense immunoreaction, while cells from the granulosa show moderate to weak diffuse immunoreaction in the cystic ovary, and in the negative control no staining was observed in the cystic ovary specimen.

In conclusion, estrogens via their receptors play an important role in the regulation of reproductive function in the cow, whereas hormonal imbalance induces ovarian dysfunction with fertility disorders.

Key words: Estrogen receptors, immunohistochemistry, immunoreaction, cystic ovaries, cow.

Introduction

Introduction

Le kyste ovarien constitue l'une des principales affections de la reproduction bovine. Ses conséquences négatives sur les performances de reproduction et l'économie de l'élevage ont fait l'objet de plusieurs travaux (Bartlett et al., 1986; Fourichon et al., 2000).

L'étiopathogénie de la maladie kystique des ovaires chez les bovins laitiers est un processus complexe qui implique des dysfonctionnements de la folliculogénèse et de l'ovulation, et de nombreux facteurs tels que le stress, la gestion nutritionnelle et les maladies infectieuses peuvent coexister (Silvia et al., 2002).

Les stéroïdes jouent un rôle clé dans la croissance, la différenciation et la fonction de reproduction chez la femelle (Brosens et al., 2004). Les œstrogènes en particulier, produits par les follicules ovariens sont impliqués dans la régulation de la croissance folliculaire (Rosenfeld et al., 2001).

L'objectif de notre travail est d'étudier l'évaluation de l'immunolocalisation des récepteurs aux œstrogènes au niveau des ovaires kystiques chez la vache.

Notre travail comprend deux parties :

- Une partie bibliographique réservée à l'étude de la morphologie, histologie et physiologie de l'ovaire chez la vache dans la première partie et les ovaires kystiques dans la deuxième partie.
- Une partie expérimentale qui consiste à évaluer les récepteurs aux œstrogènes au niveau des ovaires kystiques chez la vache par technique d'immunohistochimie.

Chapitre I : Données bibliographiques

I. Rappels morphologie, histologie et physiologie de l'ovaire

I.1 Morphologie de l'ovaire

L'ovaire est la glande génitale de la femelle. C'est un organe pair, suspendu dans la région lombaire (**Fig. 1**), de couleur en général blanc rosâtre, de consistance ferme et peu élastique. Il a une double fonction, une gamétogenèse assurant l'ovogenèse et une fonction endocrine contrôlant toute l'activité génitale par la sécrétion des hormones œstrogènes et progestatives (Francony, 2011).

Le poids est difficile à estimer, car sur un même individu, il varie de façon considérable en fonction de l'âge et de l'état physiologique. En général, l'ovaire droit est plus lourd que l'ovaire gauche (Hanzen et al., 2008). En période de maturité sexuelle, le poids varie au cours de chaque cycle œstral en fonction du développement ou de la régression des structures ovariennes (follicules et corps jaune) (Francony, 2011).

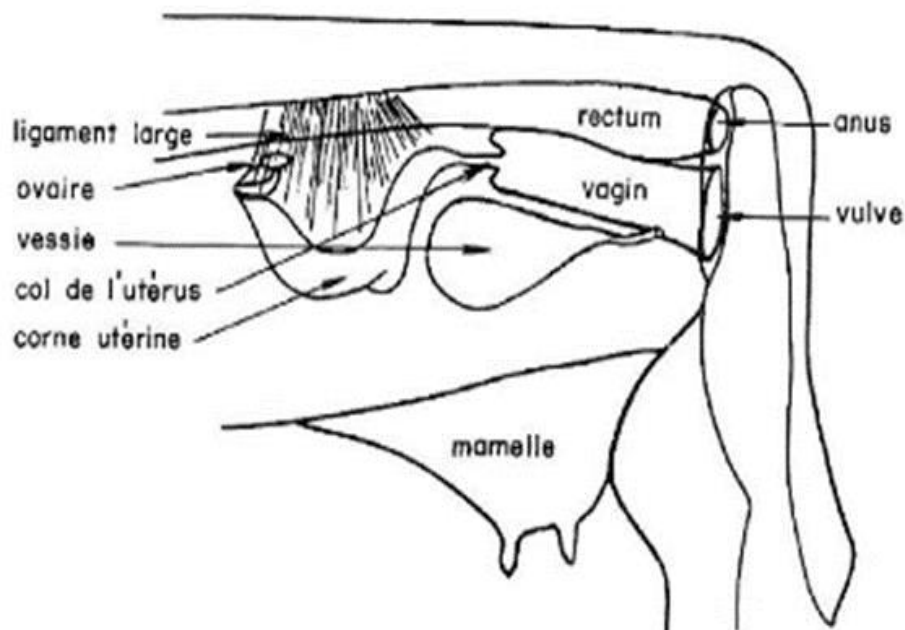


Figure 1:schéma de l'appareil génital de la vache (Francony, 2011).

I.2 Histologie de l'ovaire

L'ovaire est tapissé par un épithélium cubique simple. Il comprend une zone corticale et une zone médullaire (**Fig. 2**) (Barillier, 2007).

La zone corticale comporte une couche de tissu conjonctif dense sous-épithéliale, l'albuginée qui donne sa teinte blanchâtre à l'ovaire à l'état frais ; sous l'albuginée, les follicules ovariens sont dispersés dans le stroma constitué de tissu conjonctif. Dans ce dernier, on observe des follicules à différents stades de développement et des follicules en dégénérescence (Barillier, 2007).

La zone médullaire est formée de tissu conjonctif fibreux contenant des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs (Barillier, 2007).

La zone périphérique de la médullaire est formée d'un tissu conjonctif plus lâche (Barillier, 2007).

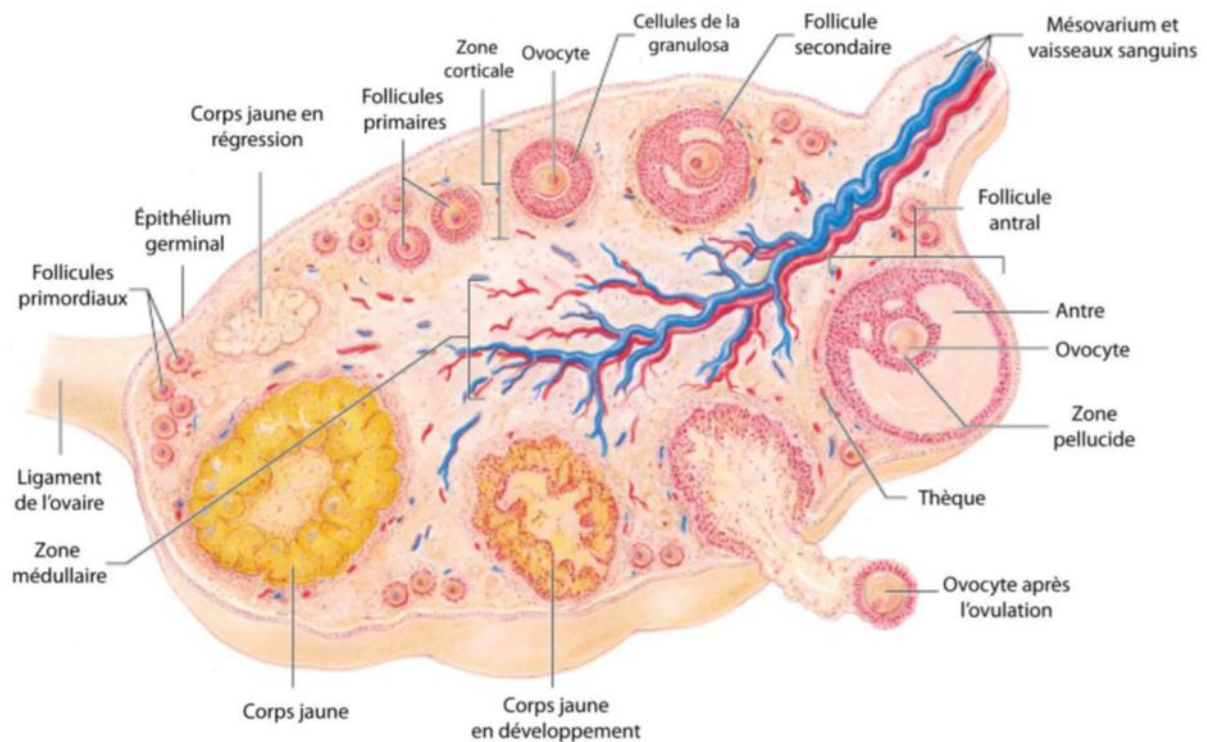


Figure 2: Représentation schématique d'une coupe transversale d'un ovaire (Barillier, 2007)

I.3 Physiologie de l'ovaire

I.3.1 Folliculogénèse

La folliculogénèse se déroule de manière simultanée avec l'oogenèse (Monniaux et al., 1993).

La folliculogénèse correspond à la succession de différentes étapes du développement d'un follicule : de sa sortie de la réserve ovarienne à sa rupture lors de l'ovulation ou de son atresie. Chaque jour, des follicules entrent en phase de croissance en évoluant en follicule primaire, secondaire, tertiaire ou cavitaire (Fernandes, 2019).

La croissance d'un follicule se déroule en trois étapes. Une première étape représente la croissance folliculaire basale où un grand nombre de follicules primordiaux atteignent la phase pré-antrale. Lors de la deuxième étape, une partie des follicules atteignent le stade pré-ovulatoire par formation de l'antrum (ou cavité antrale). Et enfin la troisième étape, représentant la croissance folliculaire terminale qui débute lorsque les follicules pré-ovulatoires deviennent sensibles à l'action des hormones gonadotropes. Cette dernière phase aboutit à l'ovulation (Fernandes, 2019).

I.3.2 Ovulation

A l'approche de chaleurs, les décharges pulsatiles de la LH et de la FSH vont être de plus en plus rapprochées et intenses : le taux de FSH va augmenter de façon progressive alors que celui de la LH va augmenter brutalement. La pulsatilité de la LH devient alors à ce moment très intense, correspondant au pic de LH (Descôteaux, 2009) entraînant ainsi une ovulation (Leborgne and Tanguy, 2014). Chez la vache, elle a lieu environ 24h après le pic de LH.

L'ovulation est sous le contrôle hormonal de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien. La décharge de LH est induite par une augmentation des œstrogènes circulants.

I.4 Œstrogènes

Les œstrogènes, hormones sexuelles femelles. Basée sur un noyau œstrone, leur structure chimique est constituée de quatre cycles hydrocarbonés à 18 atomes de carbone. Ils appartiennent à la famille des hormones stéroïdiennes. Quatre formes d'œstrogènes endogènes ont été identifiées : l'œstrone (E1), le 17 β -œstradiol (E2), œstrogène endogène le plus puissant, l'oestriol (E3), « produit de dégradation » et l'oestétrol (E4) (Engel, 1957)

I.4.1 Biosynthèse des œstrogènes

La stéroïdogénèse a lieu à partir du cholestérol. Elle peut se dérouler dans les glandes surrénales (production des corticostéroïdes) et dans les gonades (production des stéroïdes sexuels) (Chalmey, 2013).

Le substrat principal de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes est le cholestérol alimentaire, en particulier le cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDL) (**Fig. 3**) (Carr et al., 1982).

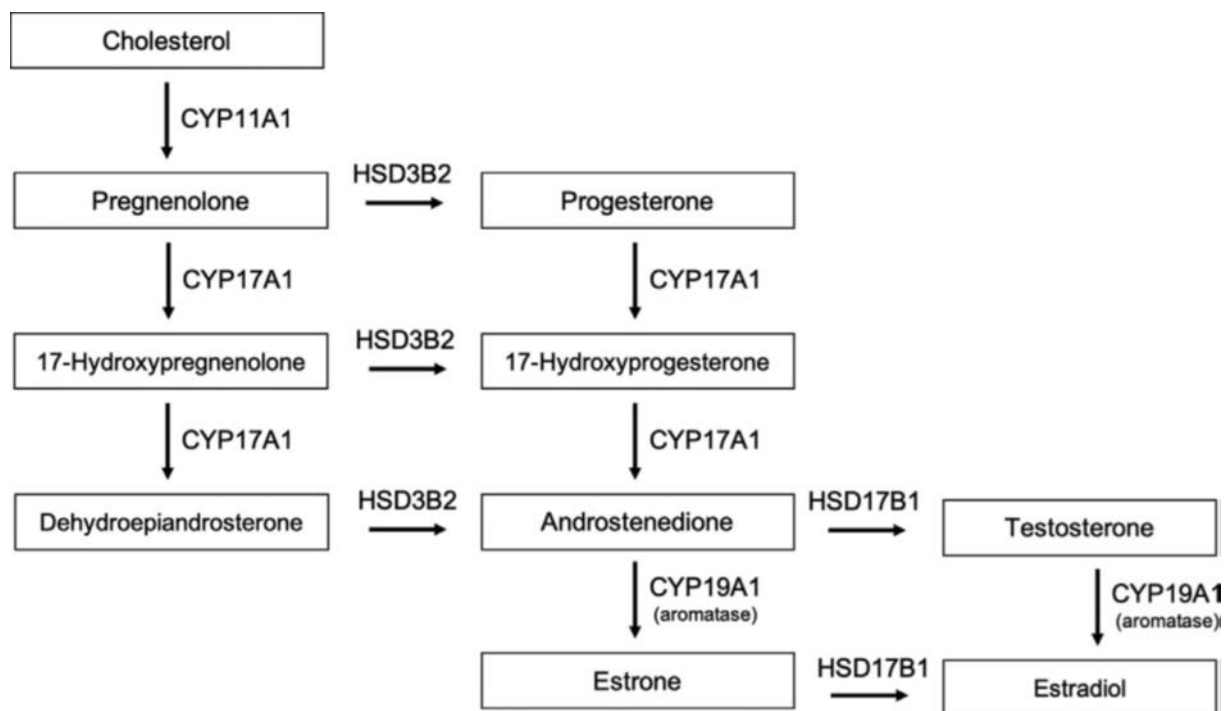


Figure 3: Voie de biosynthèse des œstrogènes

(Fuentes and Silveyra, 2019)

La régulation de la biosynthèse des stéroïdes hormonaux suit un axe physiologique appelé « axe hypothalamo-hypophyso-gonadique ». L'hypothalamus sécrète sous forme de pulse la gonadolibérine ou *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH). Elle est véhiculée jusqu'à l'hypophyse où elle stimule la sécrétion de FSH et de LH. Ces dernières, activent la gamétogénèse accompagnée de sécrétion des hormones stéroïdiennes à savoir l'œstradiol (E2), la progestérone (P4) et la testostérone (T). Les hormones stéroïdiennes agissent au niveau hypophysaire en régulant l'expression des gènes codant pour les récepteurs et en particulier les récepteurs aux œstrogènes (RE) (**Fig. 4**) (Le Grand, 2009).

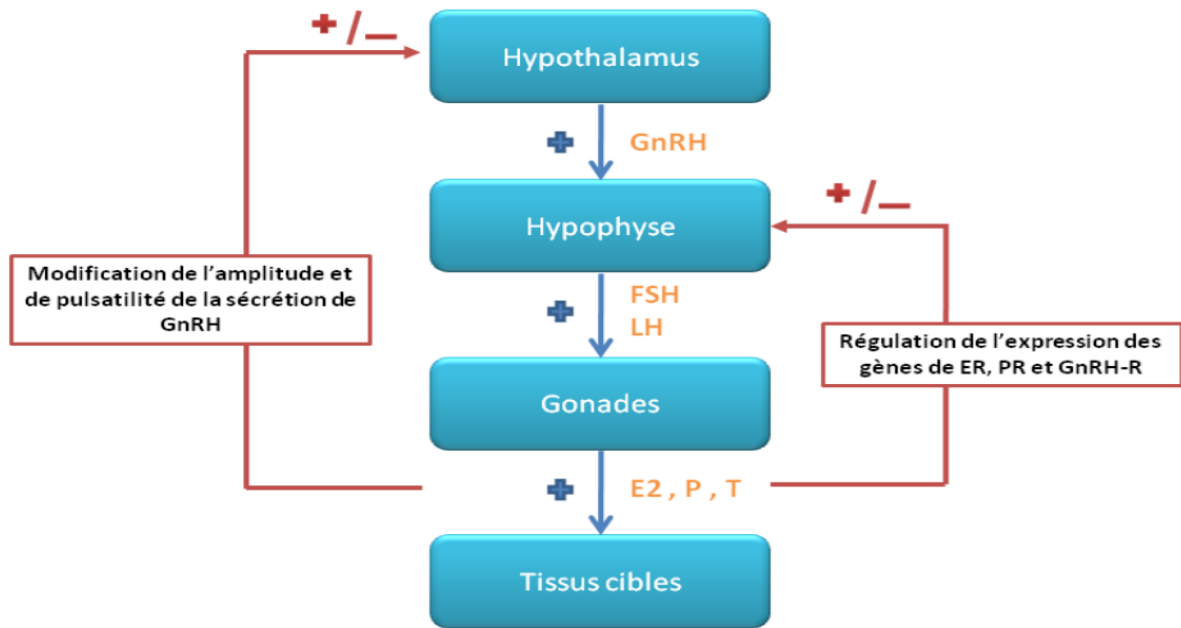


Figure 4: Principales voies de régulation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. Les flèches bleues (avec +) correspondent à un rétrocontrôle positif alors que les flèches rouges (avec +/-) indiquent que les hormones stéroïdiennes sont capables d'exercer un rétrocontrôle positif ou négatif sur la sécrétion des hormones hypothalamo-hypophysaires. Les hormones sécrétées par les différents organes de cet axe sont notées en orange (Le Grand, 2009).

I.4.2 Récepteurs des œstrogènes

Le récepteur aux œstrogènes est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires dont la fonction, médiée par l'œstradiol, est l'activation de la transcription de gènes impliqués notamment dans la croissance, la différenciation cellulaire et les fonctions reproductrices. Il existe trois formes de récepteurs aux œstrogènes : ER α , ER β et ER γ (Fig. 5). Les isotypes α et β sont retrouvés chez toutes les espèces (Hawkins et al., 2000).

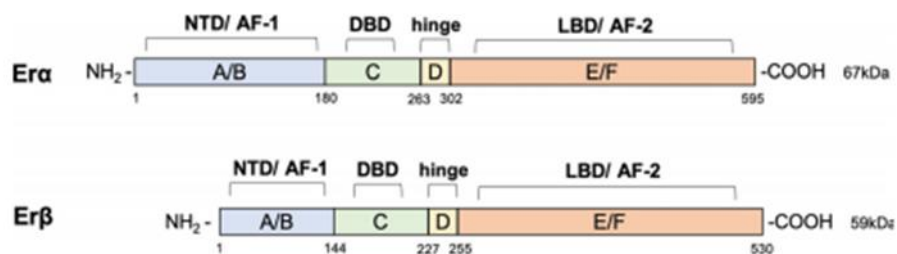


Figure 5: Organisation structurale des récepteurs d'œstrogènes. Les domaines structuraux du récepteur d'œstrogène (ER α) (595 aa) et ER β (530 aa) sont étiquetés A-F. Les deux récepteurs possèdent six domaines structuraux et fonctionnels différents : Domaine N-terminal (NTD, domaines A/B, AF-1), le domaine de liaison à l'ADN (DBD, domaine C), la charnière (domaine D), la région C-terminale contenant le domaine de liaison au ligand (LSA). contenant le domaine de liaison au ligand (LBD, domaine E/F, AF-2) (Fuentes and Silveyra, 2019).

Les RE α et RE β peuvent être détectés dans un large éventail de tissus. L'isotype RE α est principalement exprimé dans les organes génitaux femelles (utérus, ovaires au niveau des cellules de la thèque, glande mammaire). L'isotype RE β du RE est retrouvé principalement dans le colon, les cellules épithéliales de la prostate, les testicules, ovaires au niveau des cellules de la granulosa (Dahlman-Wright et al., 2006). RE β est la forme prédominante dans l'ovaire, tant chez l'animal immature que chez l'adulte. Il est très exprimé par les cellules de la granulosa des follicules en croissance (Byers et al., 1997).

Les récepteur RE α et RE β agissant comme des facteurs de transcription ligand-dépendant, ces protéines comportent quatre domaines structurellement distincts et fonctionnels (Figs. 6 et 7) (Weihua et al., 2003).

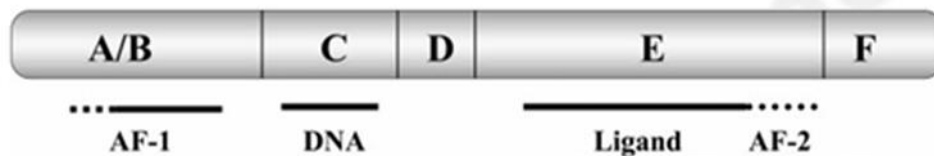


Figure 6: Représentation schématique de la structure des domaines des récepteurs nucléaires

Le domaine A/B à l'extrémité NH2 contient le site AF-1 où d'autres facteurs de transcription interagissent. Le domaine C/D contient la structure à deux doigts de zinc qui se lie à l'ADN qui se lie à l'ADN et le domaine C/F contient la poche de liaison du la poche de fixation du ligand ainsi que le domaine AF-2 qui contact direct avec les peptides coactivateurs (Nilsson et al., 2001).

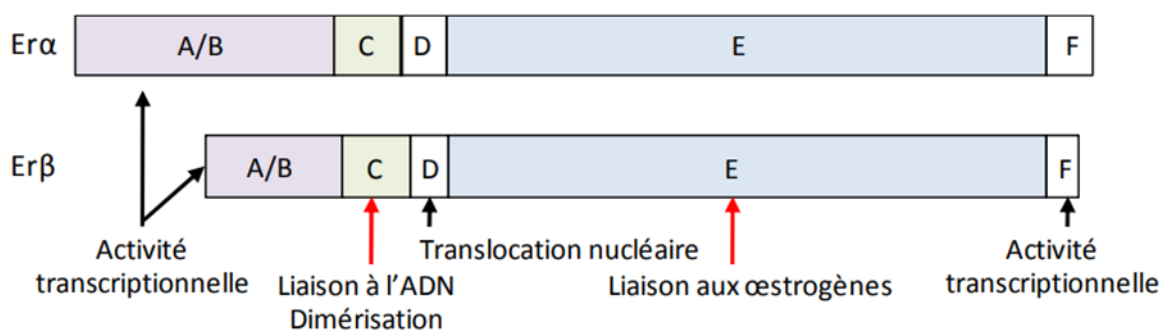


Figure 7: Structures comparées des récepteurs des œstrogènes

(Chalmey, 2013)

I.4.3 Mécanisme d'action des œstrogènes

En tant qu'hormone stéroïde, l'œstrogène peut traverser la membrane plasmique et interagir avec les RE α et RE β intracellulaires pour exercer des effets directs en se liant à des séquences d'ADN. Alternativement, les œstrogènes peuvent activer des cascades de signalisation intracellulaires via une interaction avec *G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1* (GPER1) et/ou les RE α et RE β (**Fig. 8**) (Fuentes and Silveyra, 2019).

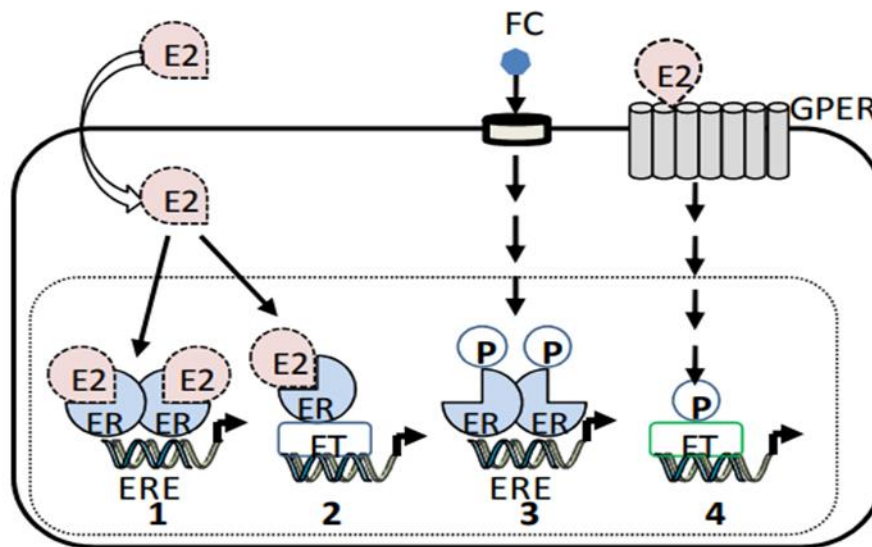


Figure 8 : Mécanisme d'action et voies de signalisation des œstrogènes 1 : Voie génomique classique. Les œstrogènes, liposolubles, pénètrent dans la cellule de façon passive. Ils se lient aux récepteurs. Après dimérisation, le complexe se lie à son tour aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) localisés dans le promoteur du gène cible. 2 : Voie indépendante des ERE. Le complexe 17 β -œstradiol (E2) – récepteur interagit avec des Facteurs de Transcription (FT) qui se fixent sur le promoteur du gène cible. 3 : Voie indépendante du ligand. Sans E2, les ER sont phosphorylés (P) par une cascade de réactions déclenchée par des Facteurs de Croissance (FC) et vont se fixer sur les ERE. 4 : E2 active le récepteur membranaire *G Protein-Coupled Estrogen Receptor* (GPER) et déclenche une cascade de phosphorylations interférant avec des voies de signalisation cellulaires (voie non génomique) ou régulant l'expression génique via l'activation de FT (Bjornstrom and Sjoberg, 2005).

La liaison entre l'hormone et l'ER provoque un changement de conformation dans le domaine de liaison du ligand (LBD), ce qui permet à l'œstrogène d'entrer en action (**Fig. 9**) (Carroll and Brown, 2006).

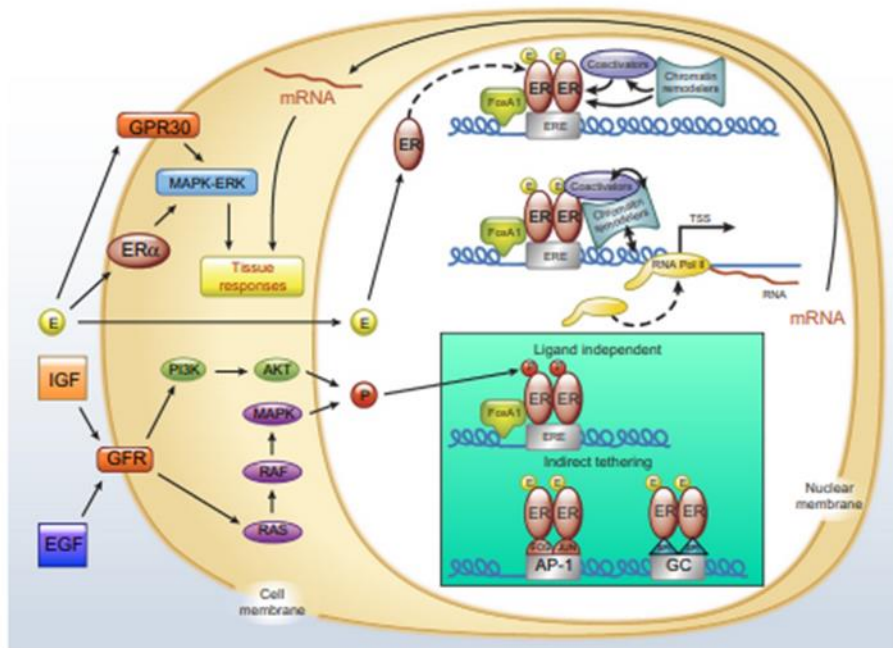


Figure 9: Mécanisme cellulaires de l'action des œstrogènes. Modèle d'action des récepteurs nucléaires et non nucléaires des œstrogènes (RE). Le complexe œstrogène (cercles E) et ER se lie directement aux éléments régulateurs de l'ADN (élément sensible aux œstrogènes (ERE) en recrutant des facteurs supplémentaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle. L'ER peut également se lier indirectement, par un mécanisme d'ancrage, à AP1- ou Sp1-. À des sites de liaison AP1 ou Sp1 (GC) pour réguler la transcription. Les facteurs de croissance (IGF et EGF) peuvent phosphoryler le RE par l'intermédiaire des récepteurs membranaires des facteurs de croissance (GFR). (GFR) pour réguler l'expression des gènes en l'absence de ligand (action nucléaire). Les œstrogènes se lient également et activent l'ER α membranaire ou le GPR30, induisant la voie de signalisation intracellulaire (action non nucléaire) qui est rapide (Fuentes and Silveyra, 2019).

I.4.4 Rôles des œstrogènes

Les œstrogènes fonctionnent comme des hormones systémiques. Elles sont libérées dans la circulation sanguine pour atteindre leurs tissus cibles, tissus exprimant les RE (Couse and Korach, 1999).

Les œstrogènes sont impliqués dans la régulation de la sécrétion des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (HHG), y compris leur propre sécrétion, et contrôlent également les cycles ovarien et utérin. Ils sont aussi responsables de l'apparition des caractères sexuels secondaires féminins aux alentours de la puberté (Williams et al., 2012).

Les œstrogènes affectent la sécrétion des hormones hypophysaires FSH et LH, qui elle-même régulent la sécrétion de stéroïdes, la gamétogenèse et l'ovulation (**Fig. 10**) (Nilsson et al., 2001).

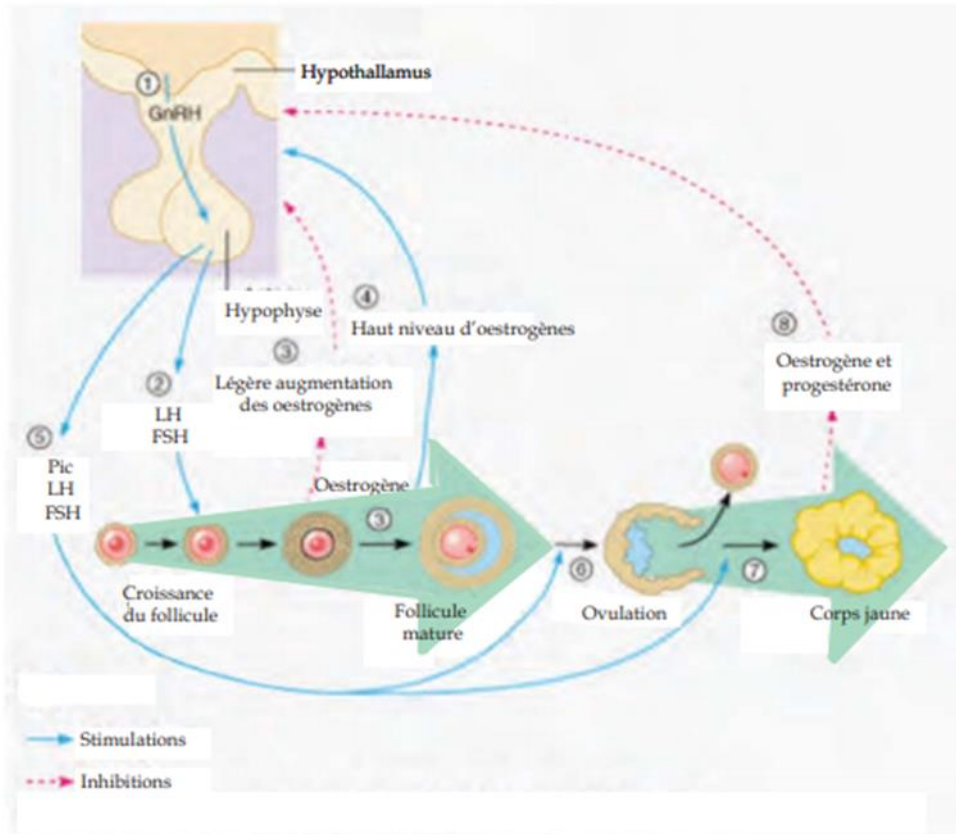


Figure 10: Contrôle de la production des œstrogènes au cours du cycle ovarien par l'axe hypothalamo-hypophysaire

(Dupont, 2012).

I.5 Régulation ovarienne

La vache est une espèce à cycle sexuel de type continu ; les chaleurs peuvent apparaître chez les femelles non gestantes pendant toute l'année. La production des gamètes femelles est la résultante de trois événements : l'ovogenèse, la folliculogénèse, et l'ovulation, suivie par la formation du corps jaune (**Fig. 11**) (Bonnes et al., 1988).

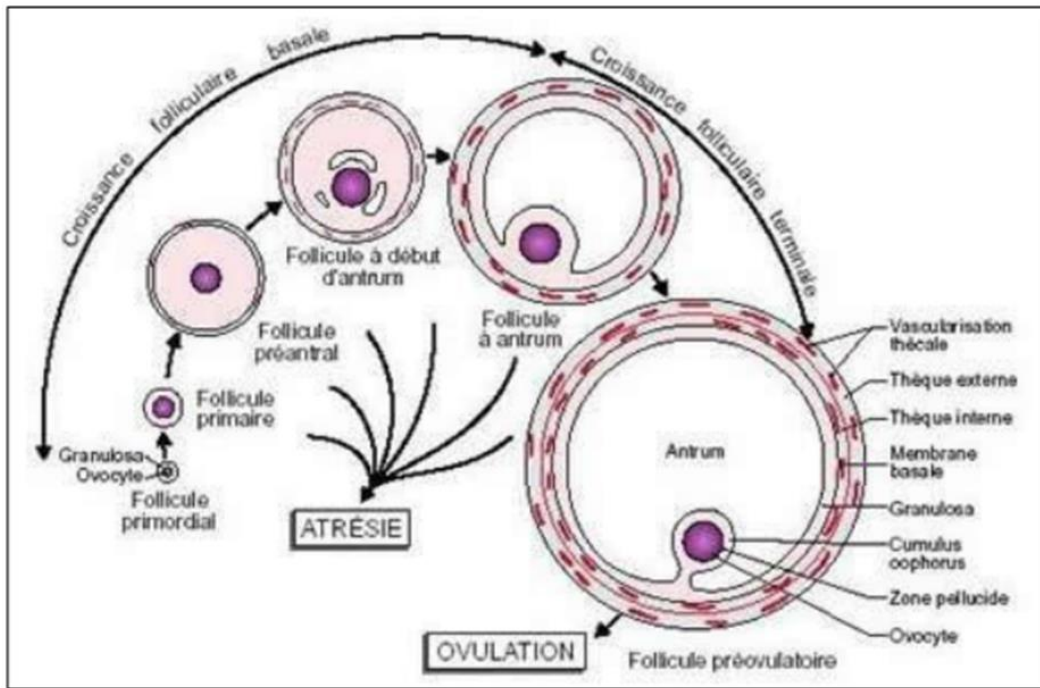


Figure 11:Chronologie du développement folliculaire (Monniaux et al., 1993)

I.5.1 Régulation de la croissance folliculaire

La FSH et la LH deviennent indispensables au développement des follicules dès le début de la maturation, grâce à une action synergique séquentielle, mais aussi parfois simultanée (Fig. 12) (Webb et al., 2004).

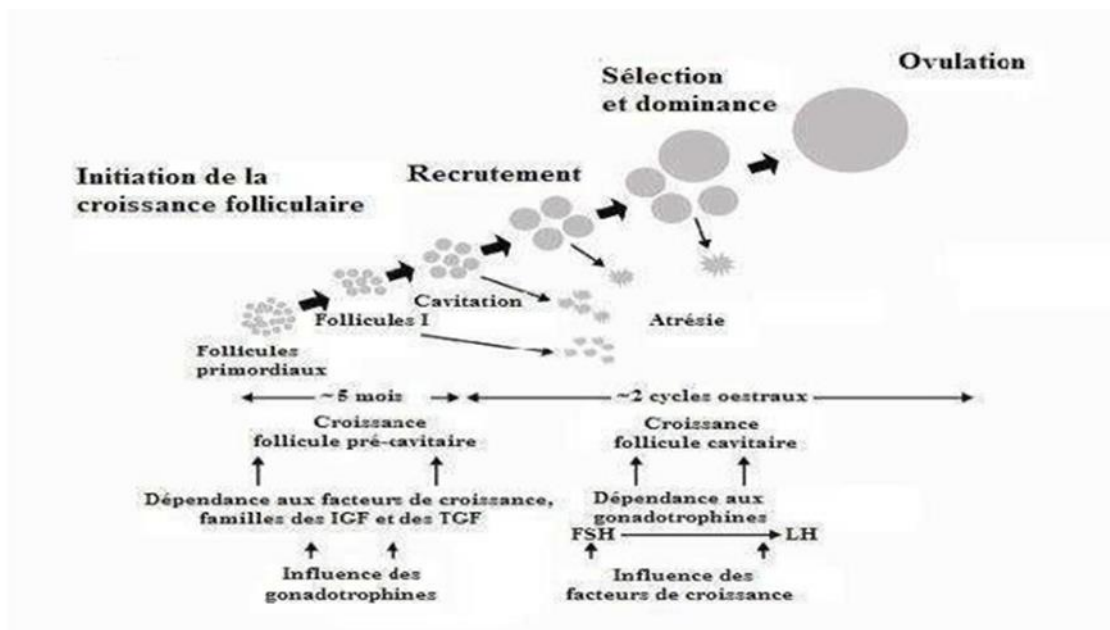


Figure 12:Rôles relatifs des gonadotrophines et des facteurs de croissance au cours du développement folliculaire (Webb et al., 2004).

I.6 Dysfonctionnement des ovaires

Les anomalies le plus couramment observées sont : une inactivité ovarienne, un corps jaune persistant, un kyste lutéal ou un kyste folliculaire. Les trois premières impliquent une absence de chaleurs aussi appelée anœstrus alors que la dernière peut également s'accompagner de cycles normaux (Fernandes, 2019).

Les lésions moins fréquentes sont les tumeurs, les malformations et les adhérences ovariennes : tumeur de la granulosa ovarienne, l'hydrosalpinx et les adhérences de la bourse ovarique, hypoplasie ovarienne (Fernandes, 2019).

II. Ovaires polykystiques

II.1 Définition

Le kyste ovarien est une structure liquidienne lisse plus ou moins dépressible dont le diamètre de la cavité est supérieur ou égal à 20 voire 25 mm, persistant pendant au moins 10 jours sur l'ovaire en présence ou non d'un corps jaune (Bierschwal et al., 1975).

Certains auteurs intègrent dans leur définition, la notion de nombre, définissent le kyste comme une structure unique de diamètre supérieur à 20 mm ou comme des structures multiples de diamètre supérieur à 15 mm persistant pendant au moins 7 jours en présence d'une faible concentration en progestérone (Calder et al., 1999).

Bartolome et al. (2005) définissent comme « kystes ovariens » une vache présentant plusieurs follicules de diamètre compris entre 18 et 20 mm en l'absence de corps jaune et de tonicité utérine.

II.2 Fréquence des kystes ovariens

Elle est en moyenne de 9,5% vs 2,9% respectivement dans les troupeaux bovins laitiers et allaitants (Hanzen et al., 2008).

III. Physiopathologie

Le kyste ovarien traduit une évolution anormale de la croissance folliculaire et peut être dû à plusieurs facteurs :

- Dysfonctionnement hormonal
- Dysfonctionnement de la paroi folliculaire
- L'animal : âge, production laitière, génétique, affections du post-partum,
- Environnement : nutrition, saison, stress.

Les caractéristiques propres de l'animal ainsi que les interactions environnementales peuvent agir en amont du complexe hypothalamo-hypophysaire et/ou au niveau ovarien (Droui and Dornier, 2013).

III.1 Dysfonctionnement hormonal

Une perturbation des mécanismes endocriniens de l'ovulation, notamment une modification de la régulation hypothalamo-hypophysaire, semble être l'origine la plus fréquente de la formation de kystes folliculaires (Wiltbank et al., 2002).

III.1.1 Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire

III.1.1.1 Concentration en GnRH

Une diminution de GnRH due à une réponse altérée du rétrocontrôle de l'œstradiol (Cook et al., 1990; Garverick, 1997).

III.1.1.2 Concentration en LH

En présence d'un kyste folliculaire, la concentration de LH est constante et élevée.

L'augmentation de la concentration basale en LH induit une croissance importante du follicule et pas d'ovulation (Hamilton et al., 1995).

III.1.1.3 Concentration en FSH

Aucune différence n'a été mise en évidence concernant la concentration de FSH et le nombre de récepteurs folliculaires à FSH lors de la croissance folliculaire entre les vaches ayant ou non de kyste folliculaire (Cook et al., 1990).

III.1.2 Perturbation au niveau ovarien

III.1.2.1 Concentration en œstradiol

L'oestrogénémie des vaches kystiques est variable selon les études. Selon (Cook et al., 1990), aucune différence de concentration en œstradiol n'est observée entre les vaches kystiques et les vaches saines. Cependant, pour d'autres auteurs, la concentration en œstradiols des vaches kystiques sont plus élevées que celle des vaches sans kyste (Garverick, 1997).

La sécrétion d'œstradiol n'est pas inhibée par les concentrations élevées de LH des vaches kystiques en raison d'une altération du rétrocontrôle négatif (Hamilton et al., 1995).

En effet, une étude a montré la formation de kystes après une immuno-neutralisation de l'œstradiol, dans le but de mimer un taux d'œstradiol faible (Kaneko et al., 2002).

III.1.2.2 Concentration en progestérone

Le devenir du follicule dominant, chez les animaux ayant un kyste folliculaire en cours d'atrésie, dépend des valeurs de la progestéronémie moyenne des 07 jours précédents même en présence d'une quantité d'œstradiol adéquate, les follicules dominants ne peuvent pas ovuler et deviennent à leur tour kystique (Gümen and Wiltbank, 2005).

III.1.3 Perturbation de l'axe corticotrope

Au cours du stress, la perturbation de l'axe corticotrope reproduit expérimentalement par une injection d'ACTH provoque une augmentation de la concentration de cortisol, cette augmentation induit une diminution de la sécrétion d'œstradiol et une élévation de la progestéronémie. Ainsi, les concentrations en LH et en FSH sont diminuées par rétrocontrôle négatif, le pic pré-ovulatoire de LH n'est pas observé et un kyste se forme (Nanda et al., 1990).

III.2 Dysfonctionnement de la paroi folliculaire

Différentes études concernant la quantification des récepteurs aux hormones LH et FSH sur les cellules de la granulosa des parois des kystes présentent des résultats contradictoires. Des travaux ont montré que la paroi du kyste folliculaire persistant possède quatre fois moins de récepteurs à FSH et à LH (Brown et al., 1982).

IV. Causes et facteurs de risque

IV.1 Facteurs propres à l'animal

Nombre de lactation : une augmentation de la fréquence des kystes avec nombre de lactation (López-Gatius et al., 2002).

Niveau de production laitière : L'augmentation de la production laitière s'accompagne pour la majorité des auteurs d'une augmentation du risque de kystes ovariens (López-Gatius et al, 2002)

Génétique : Il existe une prédisposition génétique au sein d'une race donnée (Kirk et al., 1982).

IV.2 Facteurs prédisposants extrinsèques

Stress (Dobson and Smith, 2000).

Saison : 70% des diagnostics de kystes ont lieu en hiver (Watson and Cliff, 1997).

Alimentation : la relation entre alimentation et kyste ovarien reste encore mal définie. L'effet de l'alimentation sur l'apparition des kystes ovariens est contesté (Francony, 2011).

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Modèle animal

Notre expérimentation a porté sur matrice de vache âgée de plus de 5 ans, récoltée au niveau de l'abattoir d'El Harrach. Le prélèvement placé immédiatement dans une glacière après abattage de l'animal. Par la suite, le prélèvement est transporté jusqu'au laboratoire de physiologie animale de l'institut des sciences vétérinaires de l'université de Blida 1.

Au laboratoire, après orientation du prélèvement (**Fig. 13**), l'ovaire du côté gauche présente un volumineux kyste ovarien (**Fig. 14**). Ce dernier, son diamètre mesuré à l'aide d'un pied à coulisse est de plus de 25 mm.

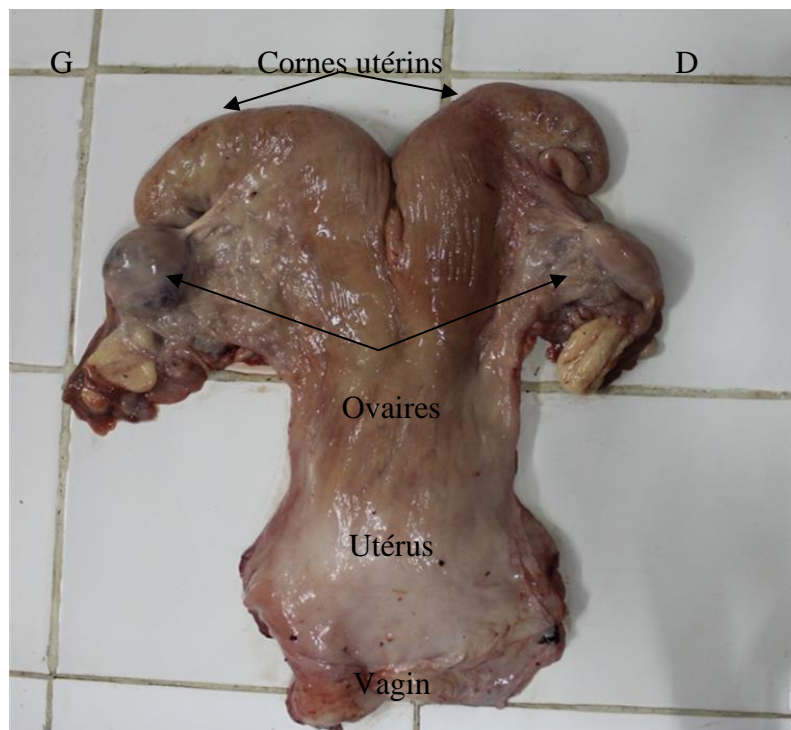


Figure 13:Appareil génital de la vache.

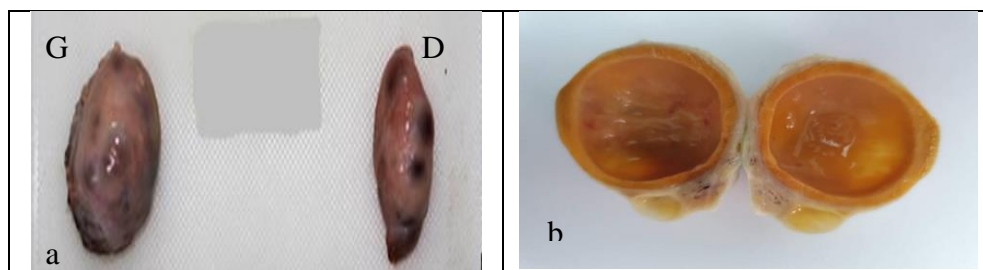


Figure 14:Vue externe des ovaires (a) et coupe longitudinale (b) des ovaires de la vache à l'état frais.

II. Technique d'histologie

Chaque ovaire est coupé longitudinalement (**Fig. 14b**) puis fixé dans le formol tamponné au PBS (phosphate buffer saline) à 10%. Cette étape a pour but de fixer les structures tissulaires *in situ* les plus proches du vivant.

Les étapes de la technique d'histologie consistent :

Fixation : un fragment de l'ovaire d'une épaisseur de 3 mm est mis dans une cassette en plastique d'histologie portant la référence de l'animal et de l'organe (**Fig. 15**). Cette cassette est immergée de nouveau dans le fixateur.

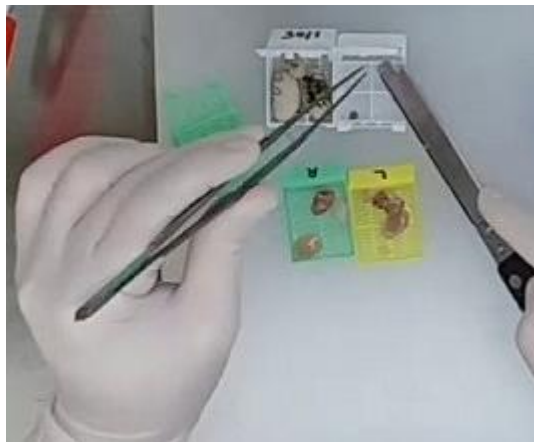


Figure 15: Fragment d'ovaire placé dans une cassette d'histologie.

Déshydratation, éclaircissement et imprégnation : Le prélèvement est ensuite déshydraté dans des bains d'alcool à concentration croissante de 70°, 96° (x) et de 100° (x3) avec une durée respective de 30 min, 1h (x2) et de 1h (x3). Par la suite, le prélèvement est éclairci dans 3 bains de xylène avec une durée d'une heure par bain et puis imprégné dans le premier bain de paraffine pendant 30mn , puis durant 60mn dans un deuxième bain et enfin pendant toute la nuit dans le troisième bain . Cette imprégnation est réalisée dans une étuve à 60°C, correspondant au point de fusion de la paraffine.

Confection des blocs : les étapes de la confection du bloc de paraffine sont représentées dans la figure 16.

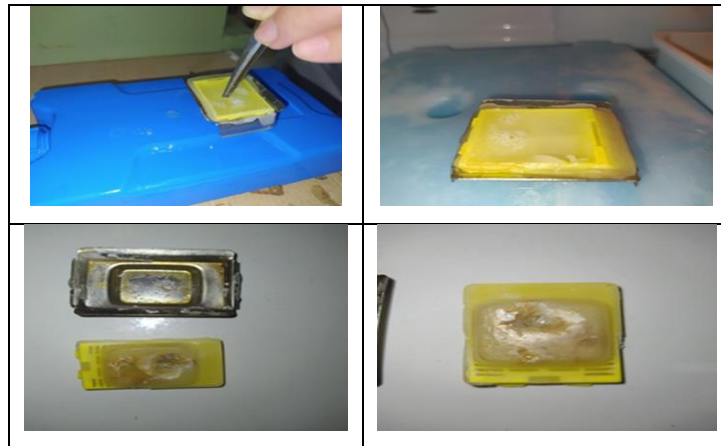


Figure 16:Etapes de confection du bloc de paraffine.

Coupe au microtome : le prélèvement est coupé au microtome avec une épaisseur de coupe de 5 μm (**Fig. 17**).



Figure 17:Coupe au microtome.

Etallement des coupes de paraffine : Afin d'éviter la formation de plis, les coupes sélectionnées sont déposées dans un bain-marie à température de 42°C et sont récupérées sur des lames silanisées de type « Superfrost plus » pour être utilisé en immunohistochimie (**Fig. 18**). 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.

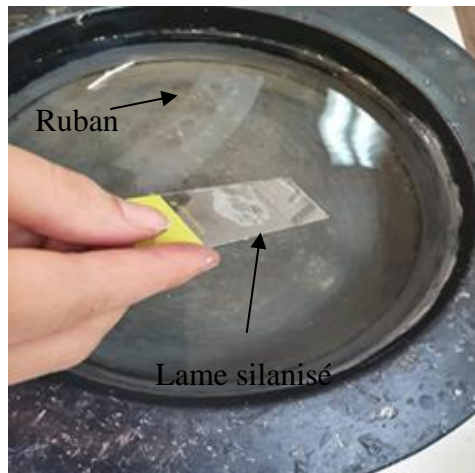


Figure 18: Récupération des coupes sur des lames silanisées de type superfrost plus.

- Enfin, les lames sont séchées à l'étuve à 60°C (**Fig. 19**).



Figure 19: Séchage des lames dans l'étuve.

III. Technique d'immunohistochimie pour la mise en évidence des récepteurs aux œstrogènes

III.1 Principe

L'immunohistochimie (IHC) est une méthode qui permet une localisation des protéines à l'aide d'anticorps marqués au sein des cellules d'une coupe de tissu dans des sections de tissu. Un système de détection, composé d'une enzyme et de son substrat, permet de visualiser l'association protéines – anticorps par production d'un chromogène.

L'immunohistochimie est une méthode associant l'histologie et l'immunologie pour visualiser in situ un antigène à l'aide d'un anticorps marqué (**Fig. 20**).

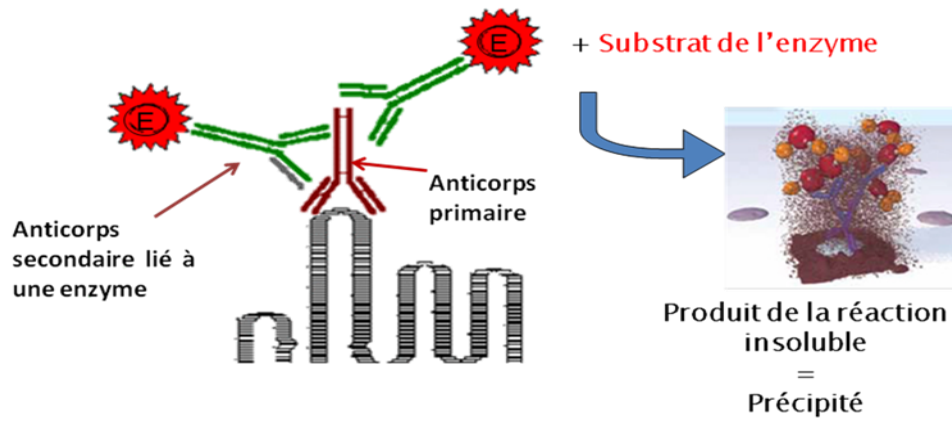


Figure 20: Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie.

III.2 Protocole d'immunohistochimie

Le protocole d'immunohistochimie est divisé en deux étapes :

Première étape : la préparation du prélèvement par la technique d'histologie précédemment décrite.

Deuxième étape : Technique d'immunohistochimie proprement dite

Avant de commencer l'immunoréaction indirecte ;

- Les coupes sont déparaffinées dans deux bains de xylène pendant 10 min pour chaque bains et réhydratées dans des bains d'alcool à concentration décroissante 100° (5min), 95° (3min), 70° (3min) (**Fig. 21**).



Figure 21: Bains de déparaffinage et réhydratation.

- Par la suite les lames sont rincées au PBS (**Fig. 22**). L'excès de PBS est enlevé par égouttage des lames sur du papier absorbant.



Figure 22: Bains de PBS pour le rinçage des lames.

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

- **Démasquage des sites antigéniques** avec une solution tampon citratée (pH = 6) au bain marie pendant 40 min à 97°C (**Fig. 23**).

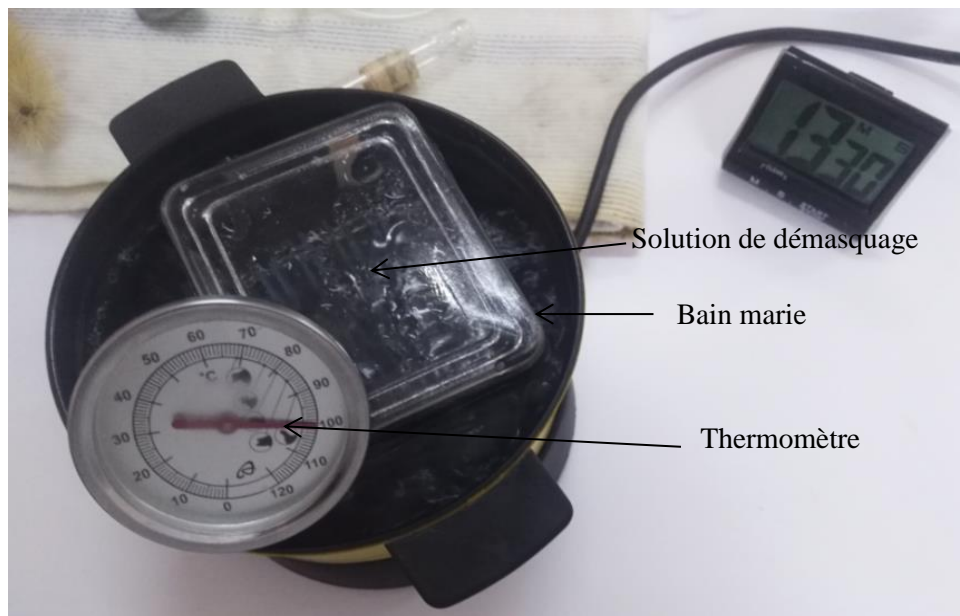


Figure 23: Démasquage au bain-marie.

- Rinçage PBS (x2) pendant 5 min.

• **Blocage des peroxydases endogènes** par un le peroxyde d'hydrogène à 3% dilué dans le PBS pendant 5min (**Fig. 24**).



Figure 24: Blocage des peroxydases endogènes.

• Rinçage PBS (x2) pendant 5 min.

• Les coupes sont entourées avec une résine hydrophobe (Dako-pen) (**Figs. 25 et 26**) et placées dans une chambre humide sur un agitateur va et vient (**Fig. 27**).



Figure 25: Résine hydrophobe.

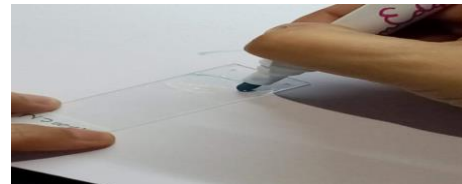


Figure 26: Entouré les coupes par la résine hydrophobe.



Figure 27: Chambre humide sur un agitateur va et vient.

• **Blocage des sites non spécifiques** avec du sérum de cheval (réactif jaune du kit Vectastain) pendant 30min (**Fig. 28**).

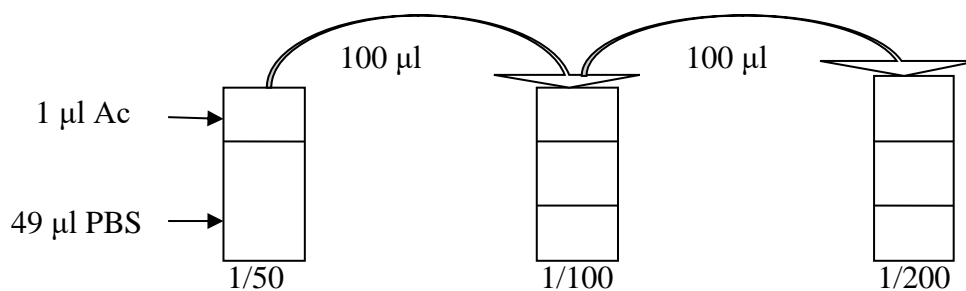


Figure 28: Sérum du cheval (a) et application du sérum de cheval sur les coupes (b).

• Incubation des coupes pendant une nuit à 4°C avec un **anticorps (AC) primaire anti-récepteurs aux œstrogène** polyclonal (ER α (HC-20) : sc-543, Santa Cruz), produit chez le lapin, dilué de moitié de 1/50 à 1/200 pour déterminer la concentration optimale.

Les étapes de la dilution de moitié de l'anticorps (**Fig. 29**) sont réalisées comme suit :

A partir de la dilution au 1/50 (1 μ l Ac + 49 μ l PBS \longrightarrow 50 μ l).



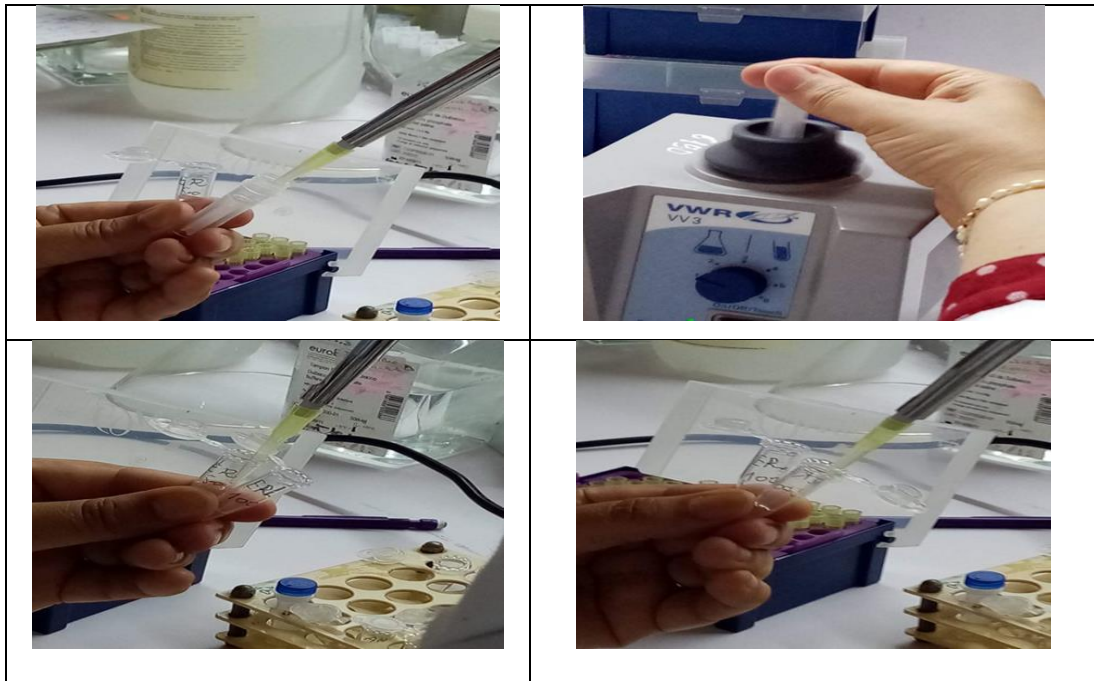


Figure 29: Etapes de dilution de l'anticorps primaires anti-récepteurs aux œstrogènes.

- Sur certaines coupes, l'anticorps primaire est remplacé par le sérum de cheval ; ces coupes sont utilisées comme des contrôles négatifs.
- Rinçage PBS (x2) pendant 5 min.
- Application d'un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (réactif bleu du kit Vectastain), produit chez le cheval, pendant 30 min à température ambiante (Fig. 30).

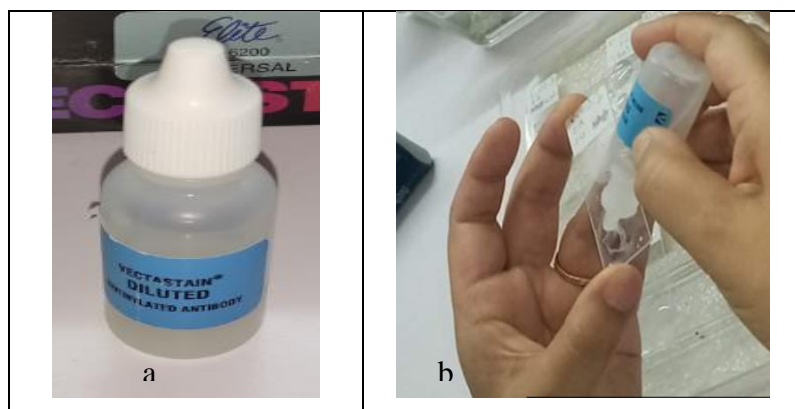


Figure 30: Anticorps secondaire anti-lapin biotinylé(a) et son application (b) sur les lames.

- Rinçage PBS (x2) pendant 5 min.

- Application du complexe streptavidine-peroxydase (réactifs gris du kit vectastain) pendant 30 min à température ambiante (Fig. 31).

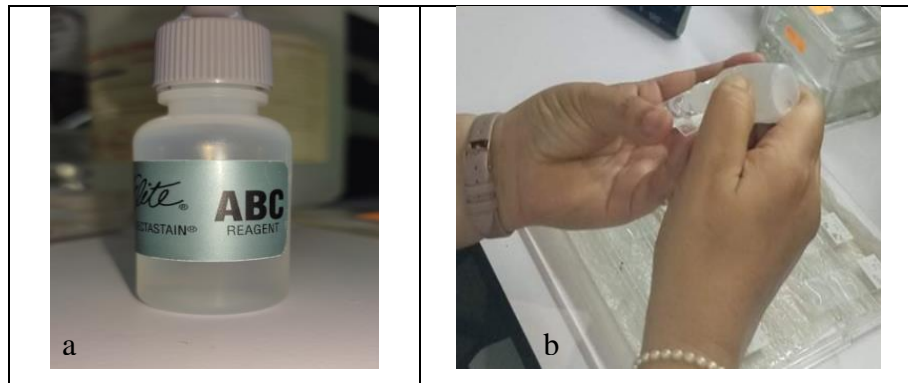


Figure 31: Complexe streptavidine-peroxydase (a) et son application (b) sur les lames.

- Rinçage PBS (x2) pendant 5 min.
- Pour la visualisation de la réaction anticorps- antigène, on utilise un chromogène de type 2, 3 diaminobinzidine (DAB) (Fig. 32).



Figure 32: Chromogène diaminobinzidine (DAB) maintenu à 4°C.

- Pour la préparation de DAB, on mélange une goutte de DAB chromogène avec 1 ml de DAB substrat (**Fig. 33**).

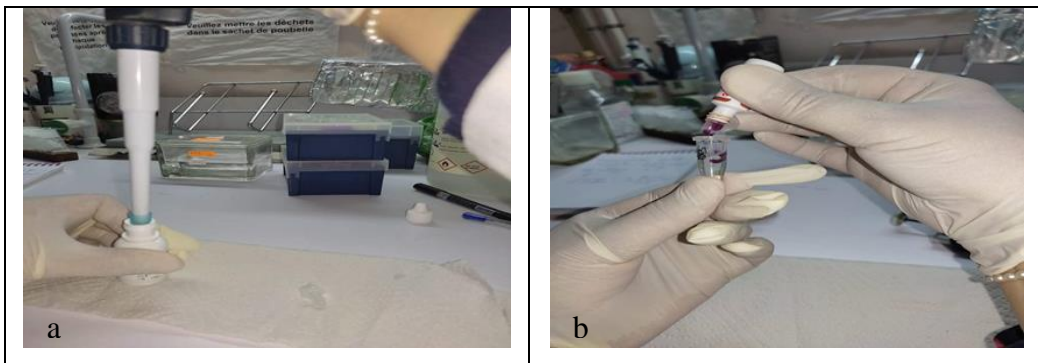


Figure 33:Etapes de préparation du mélange substrat (a) - chromogène DAB (b).

- Puis un volume de 50 μ l du mélange est déposé sur les différentes coupes (**Fig. 34**) et le contrôle de l'immunomarquage est réalisé sous microscope photonique.

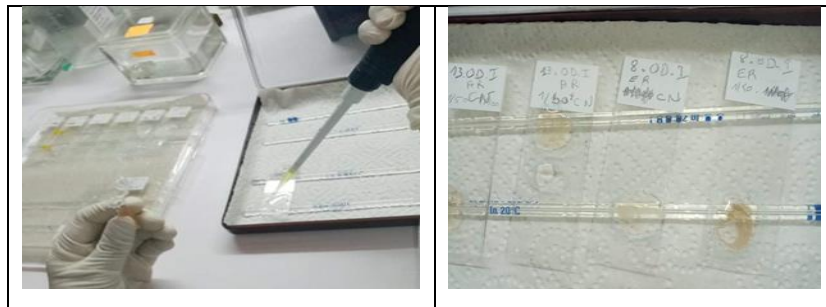


Figure 34:Application du chromogène diaminobinzidine sur les coupes.

- Rinçage à l'eau distillée (**Fig. 35**).

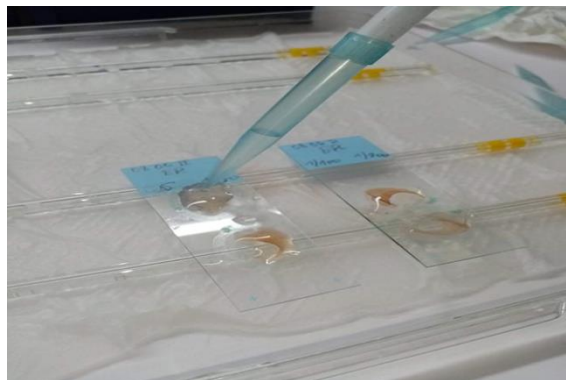


Figure 35:Rinçage à l'eau distillée.

- Contre coloration à l'hématoxyline (**Fig. 36**).



Figure 36: Hématoxyline (a) et son application (b) sur les coupes.

- Rinçage à l'eau du robinet (c'est le pH alcalin de l'eau du robinet qui fait bleuir l'hématoxyline).
- Déshydratation des lames dans des bains d'alcool à concentration croissante (70, 96 et 100°) et éclaircit dans le xylène (**Fig. 37**).



Figure 37: Bain de déshydratation et éclaircissement.

- Montage des lamelles avec une goutte de liquide de montage « Eukitt » (**Fig. 38**).



Figure 38:Lames montées.

- Les lames montées sont séchées à l'air puis observées au microscope photonique à l'aide d'une caméra relié à l'ordinateur (**Fig. 39**).

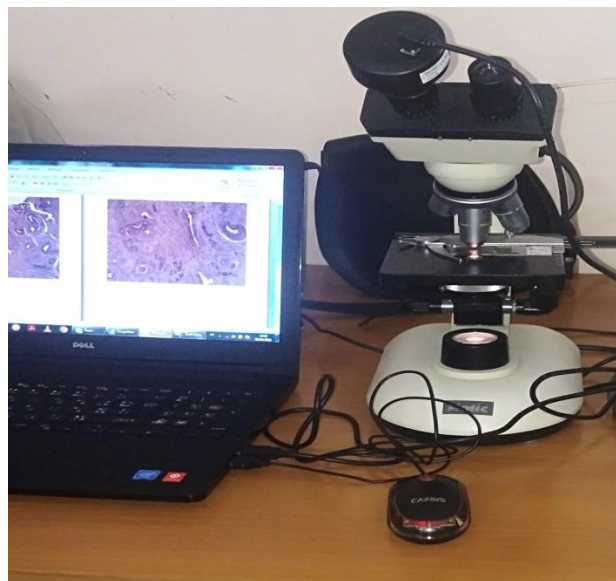


Figure 39:Observation au microscope photonique à l'aide d'une caméra relié à l'ordinateur.

Chapitre III : Résultats et discussion

Résultats et discussion

Les résultats préliminaires obtenus sont discutés par rapport aux données bibliographiques existantes.

Pour déterminer les étapes à réaliser pour mettre en évidence l'immunomarquage des récepteurs aux œstrogènes, une synthèse de quelques articles scientifiques utilisant cette technique d'immunohistochimie sur des prélèvements d'ovaire a été réalisée (Tableau 2). Pour nos tests, nous avons retenu qu'il faut effectuer :

Un démasquage à la chaleur.

Un blocage des peroxydases endogènes.

Un blocage des sites non spécifiques.

La détermination de la dilution de l'anticorps primaire anti-récepteurs aux œstrogènes.

Tableau 2 : Synthèse bibliographique sur les étapes de la technique d'immunohistochimie réalisé sur les ovaires.

Références	<u>Démasquage antigénique</u>	<u>Blocage les peroxydase s endogènes</u>	<u>Ac primaire (AcI)</u>	<u>Blocage site non spécifique</u>
Suzuki et al.(1994)	- acide citrique 2 mM et citrate trisodique dihydraté 9 mM, pH 6,0) -four à micro-ondes -pendant 15 minutes	- méthanol à 100% avec H2O2 à 0,3% -pendant 30 min	-ER monoclonal, ER1D5) - dilution 1/1 - pendant 18 h à 4°C	- 1% de sérum normal de lapin ou de chèvre. -pendant 40 min à température ambiante.
Słomczyńska and Woźniak. (2001)	- un tampon de citrate 0,01 M pH 6.0 -four à micro-ondes -pendant 35 min.	- H2O2 à 0,3 % dans du PBS -pendant 30 minutes	- ERa (Dako) ou ERb (Affinity Bioreagents) - dilution 1 :100. - pendant une nuit à 48C	- 3% de sérum de cheval normal (pour ERα) ou 3 % de sérum de chèvre normal (pour ERβ) - pendant 30 minutes

Gregory et al.(2002)	- tampon citrate 10mM -micro-ondes -pendant 12 minutes	- H2O2 0,3 % dans de l'éthanol absolu. -pendant 30 minutes	-ER α (Novocastra, New Castle upon Tyne, UK) - dilué en série pour obtenir une sensibilité et une spécificité	- sérum de chèvre normal à 4 % -pendant 30 min à température ambiante
Maliqueo et al.(2003)	- tampon citrate de sodium de 10 mM (pH 6,0) à 95 °C -pendant 20 minutes	- H2O2 à 3 % -pendant 5 minutes.	- ER α (monoclonal ; 1/200), ER β (polyclonal ; 1/400) - incubé pendant une nuit à 4°C	- 2% de PBS-BSA -pendant 1 heure.
Quezada et al.(2006)	- ER α , (tampon de citrate de sodium 10 mM (pH 6,0) à 95°C) ER β (tampon de glycine 0,05 M, EDTA 0,01% (pH 3,15). - pendant 20 minutes	- H2O2 à 3 % - pendant 5 minutes	- ER α (monoclonal ; 1/200), ER β (polyclonal ; 1/400) - incubé pendant une nuit à 4°C	- PBS-BSA à 4 % - pendant 1 heure
Vang et al.(2006)	- ER α Autocuiseur micro-ondes, tampon citrate 10mM (pH 6,0) (pendant 8min) -ER β Solution de récupération d'antigène CC1 (prédiluée ; pH 8,0), autoclaveuse, (pendant 30 min)	- H2O2 à 3% et 3,3 diaminobenzidine - pendant 10 min à 37 C	- ER α , 1/500 et ER β , prédilué -pendant 30min	

Villavicencio et al .(2006)	<ul style="list-style-type: none"> - ERα, (tampon citrate de sodium 10 mM, pH 6,0), et Erβ (tampon glycine 0,05 M, EDTA 0,01 % (pH 3,5) à 95°C - pendant 20 minutes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Erα (H₂O₂ à 3% - pendant 5 min - Erβ (H₂O₂ à 3% dans du méthanol) -pendant 30 min 	<ul style="list-style-type: none"> - Erα monoclonal de souris ; et Erβ polyclonaux (lapin) - ERα (1 :200), ERβ (1 :200) - incubé pendant une nuit à 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> -PBS-BSA à 4 % -pendant 1 heure
Knapczyk et al.(2008)	<ul style="list-style-type: none"> - tampon d'acide citrique 0,01 M (pH 6,0) -four à micro-ondes -Pendant 3 × 4 min, dans un 	<ul style="list-style-type: none"> - H₂O₂, 0,3 % dans du TBS (solution saline tamponnée aux tris, pH 7,4) 	<ul style="list-style-type: none"> - ER monoclonal de souris - dilution 1:100 - pendant la nuit à 4°C. 	<ul style="list-style-type: none"> - sérum de cheval normal à 5%
Burges et al.(2010)	<ul style="list-style-type: none"> - acide citrate 0,1 M et du citrate de sodium 0,1M (pH 6,0) -pendant 10 min 	<ul style="list-style-type: none"> - H₂O₂, 3% dans du methanol -pendant 20 min. 	<ul style="list-style-type: none"> -ERα (clone 1D5, IgG1 de souris), ERβ (clone PPG5/10, IgG2a de souris) - dilution 1 :150 pour Erα et 1:50 pour Erβ - pendant 60 min 	<ul style="list-style-type: none"> - 10 ml de PBS avec 150 ul de sérum de cheval. -pendant 20 min à température ambiante.
Wang et al. (2011)	<ul style="list-style-type: none"> - tampon citrate de sodium 0,01 mol/l (pH 6,0) -micro-ondes (988C) - pendant 20 minutes. 	<ul style="list-style-type: none"> - H₂O₂, 0,3% dans du méthanol - pendant 20 minutes à température ambiante. 	<ul style="list-style-type: none"> - ERα (monoclonal de souris, sc-8002), ERβ (monoclonal de souris, sc-6820) - dilution 1 :100 dans du sérum de chèvre normal à 3% - pendant une nuit 	<ul style="list-style-type: none"> -albumine de sérum de chèvre fraîche à 10% - pendant 30 minutes dans une chambre humide.

Pour cela, plusieurs tests sont indispensables pour déterminer la durée, le type de réactif à utiliser pour chaque étape et de réaliser un test de dilution de l'anticorps primaire afin de déterminer la concentration optimale.

En raison de la disponibilité insuffisante en réactifs spécifiques à la technique d'immunohistochimie utilisée (Anticorps secondaire, chromogène et DAB), un fragment de l'ovaire kystique a fait l'objet de notre travail d'initiation à la recherche scientifique.

Les résultats préliminaires obtenus avec une dilution de l'anticorps primaire anti-récepteurs aux œstrogènes à une dilution de 1/50, montrent un nombre élevé de cellules de la thèque interne présente une immunoréaction intense (**Fig. 40**), alors que les cellules de la granulosa présentent une immunoréaction diffuse modérée ou faible (**Fig. 41**) au niveau de l'ovaire kystique.

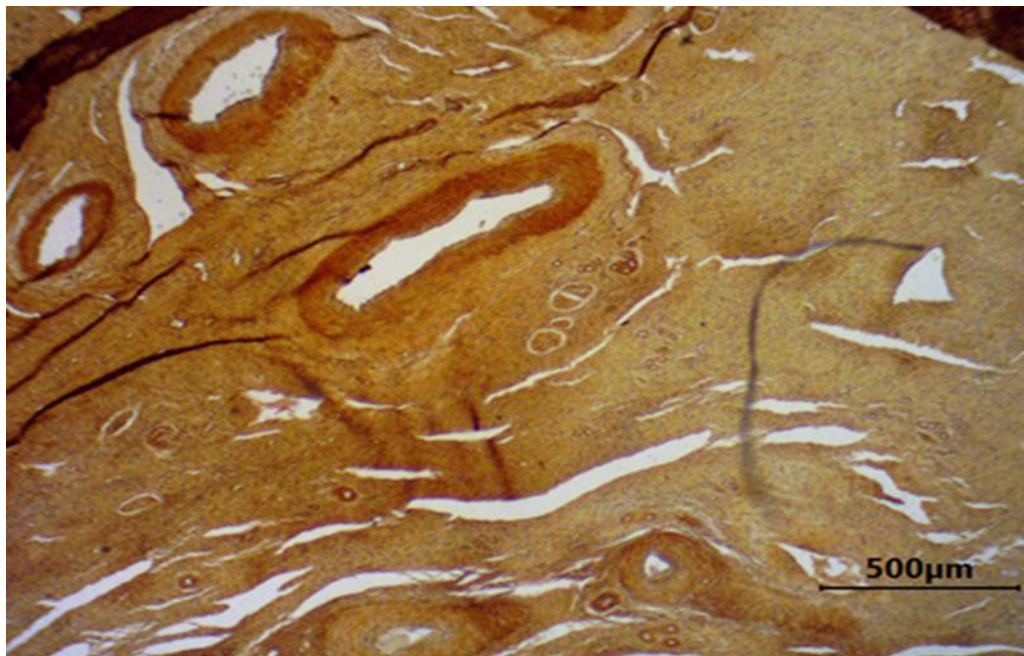


Figure 40: Observation au microscope optique de la coloration immunohistochimique de la protéine ERα présente dans les follicules ovariens ; dilution de l'anticorps 1 /50 grossissement×4 scale barre 500 µm.

Dans le contrôle négatif, aucun marquage n'a été observé au niveau du prélèvement de l'ovaire kystique (**Fig. 41**).

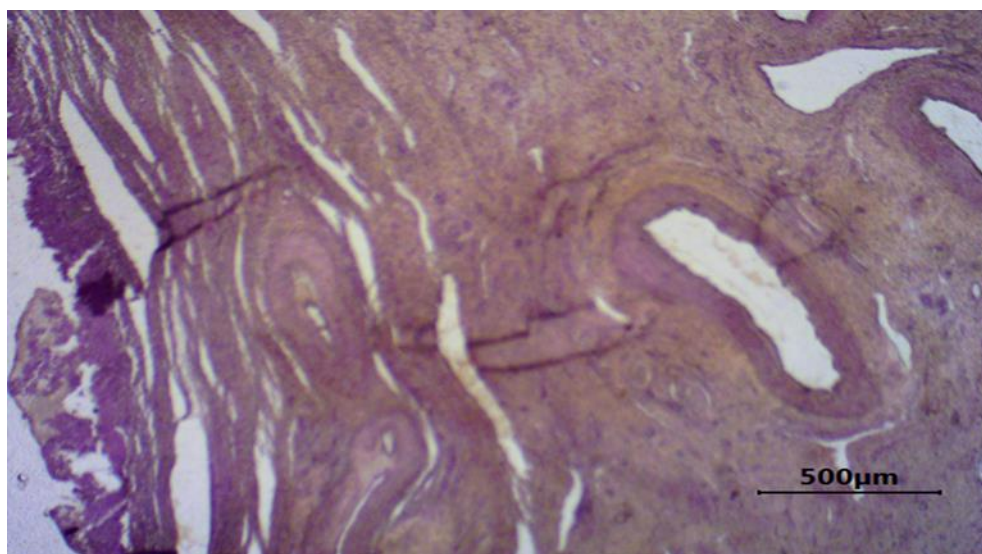


Figure 41: Observation au microscope optique de la coloration immunohistochimique de la protéine ERα présente dans les follicules ovariens ; contrôle négative grossissement $\times 4$, scale barre 500 μm .

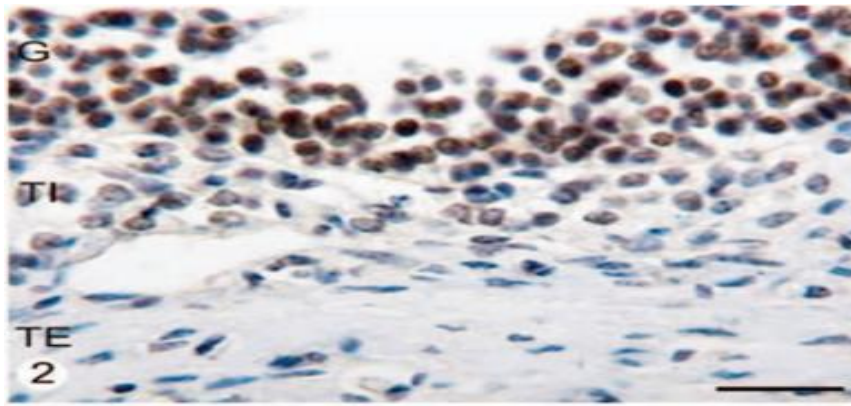
Les résultats préliminaires obtenus sont discutés par rapport aux données bibliographiques existantes qui sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Synthèse bibliographique des résultats d'immunolocalisation des récepteurs aux œstrogènes au niveau des ovaires kystiques chez quelques espèces

Références	Localisation des récepteurs aux œstrogènes (cas pathologique)	Espèce
Suzuki et al.(1994)	- Dans les cellules de la granulosa uniquement (ovaire normal).	Humain
Rosenfeld et al.(1999)	- Dans les cellules de la granulosa des follicules antraux (petits, moyens et grands), la corona radiata, le cumulus oophorus, les cellules de granulosa murales, les cellules de la thèque interne et externe, et peu ou pas présente dans les cellules du stroma ovarien (ovaires kystique).	Bovin
Słomczyńska and Woźniak.(2001)	- Dans le grand follicule préovulatoire et dans les premiers corps jaunes (ovaire normal).	Porc
Gregory et al.(2002)	- Une expression accrue d'ER pendant le cycle menstruel dans l'endomètre (endomètre normal et anormal).	Humain

Maliqueo et al.(2003)	- Dans le noyau des cellules épithéliales et stromales (ovaire polykystique).	Humain
Quezada et al.(2006)	- dans le noyau des cellules épithéliales et stromales (ovaire polykystique).	Humain
Vang et al.(2006)	- dans le stroma ovarien normal qui a servi de contrôle positif interne (tumeurs mucineuses primaires et métastatiques de l'ovaire).	Humain
Villavicencio et al.(2006)	- Er α est localisé dans le noyau des cellules endométriales. - Er β est localisé dans le cytoplasme des cellules épithéliales (ovaire polykystique).	Humain
Salveti et al.(2007a)	- ER α était exprimé dans les noyaux cellulaires et le cytoplasme des couches de la granulosa, de la thèque interne et de la thèque externe de toutes les catégories folliculaires étudiées. - ER β a été détectée dans les noyaux de la granulosa, de la thèque interne et de la thèque externe de tous les follicules étudiés (ovaire normal et kystique).	Bovin
Knapczyk et al.(2008)	- localisée dans les cellules de la granulosa des follicules ovariens et les cellules thécales (ovaire sain).	Porc
Burges et al.(2010)	- localisé dans le tissu endométrial humain cancérigène de l'ovaire (carcinomes de l'ovaire).	Humain
Wang et al.(2011)	- exprimés dans le noyau des cellules épithéliales glandulaires de l'endomètre, avec un faible degré d'expression dans le cytoplasme (ovaire polykystique).	Humain

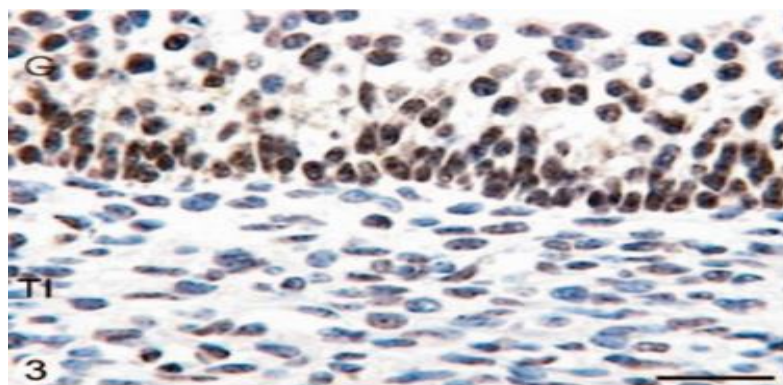
Pour faire une comparaison entre nos résultats et les résultats des autres auteurs, Salvetti et al. (2007b) ; Ils ont trouvé qu'un nombre élevé de cellules de la granulosa présente une immunoréaction granulaire intense avec cet anticorps, alors que certaines cellules de la thèque interne présentent une immunoréaction diffuse modérée ou faible (**Fig. 42, 43**).



G = granulosa ; TI = thèque interne ; TE = thèque externe. Barre = 25 μ m

Figure 42:Coloration immunohistochimique avec l'anticorps ER α dans la paroi folliculaire d'un kyste provenant d'un ovaire kystique bovin.

(Salveti et al., 2007b).



G = granulosa ; TI = thèque interne ; Barre = 25 μ m.

Figure 43:Immunomarquage d'ER β dans la paroi d'un follicule tertiaire d'un ovaire bovin normale Les couches de cellules de granulosa montrent une coloration nucléaire granulaire intense dans un pourcentage élevé de cellules. Une réaction granulaire et intense peut également être observée dans les cellules de la thèque. Méthode Streptavidin-Biotin, contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer.

(Salveti et al., 2007b).

RE α était exprimé dans les noyaux cellulaires et cytoplasme de la granulosa, de la thèque interne et de la thèque externe de toutes les catégories folliculaires (Salveti et al., 2007b).

RE α était largement dispersé dans la thèque interne et présentait une intensité de coloration modérée avec distribution homogène dans le noyau cellulaire. L'immunomarquage était faible dans la thèque externe. Il existe différences dans l'expression entre les animaux normaux et les animaux avec des ovaires kystiques. Les kystes folliculaires présentaient une

expression significativement plus élevée de cette protéine dans les noyaux des follicules secondaires, tertiaires et atreétiques (**Fig. 42**) (Salvetti et al., 2007b).

RE β a été détectée dans les noyaux de la granulosa, de la thèque interne et de la thèque externe de tous les follicules étudiés, bien que l'intensité d'RE β dans la couche des cellules de la granulosa était plus forte dans les follicules tertiaires que dans les follicules secondaires et atreétiques chez les sujets normaux (**Fig. 43**) (Salvetti et al., 2007b).

La diminution des niveaux RE β dans les follicules des animaux avec ovaires kystiques pourrait être due à des taux circulants élevés d'hormone lutéinisante qui sont généralement présents chez ces animaux. Il est connu que les gonadotrophines et les œstrogènes régulent négativement l'expression dans la granulosa de cette isoforme du RE. Les deux RE présentent une tendance à réguler à la hausse avec l'augmentation des niveaux d'œstrogènes dans le liquide folliculaire, et cette régulation à la hausse est corrélée à une régulation à la hausse des récepteurs d'hormones lutéinisantes et folliculostimulantes (Berisha et al., 2002).

La modification de la concentration de différents types de récepteurs dans les cellules de la granulosa et des théques des follicules d'animaux avec kystes ovarien pourrait altérer le RE α /RE β ratio, provoquant des modifications de l'action ou des effets de l'œstrogène sur ses cellules cibles (Rosenfeld et al., 2001b; Van den Broeck et al., 2002).

Ensuite, les effets de l'œstradiol pourraient être une altération de l'équilibre prolifération/apoptose, une altération de l'expression des récepteurs des gonadotrophines, ou une perturbation de l'action enzymatique et du métabolisme (Isobe and Yoshimura, 2000; Calder et al., 2001).

En général, ER α n'a pas été observée dans les cellules des follicules primordiaux, primaires et secondaires, alors qu'une expression très faible a été observée dans les cellules des follicules tertiaires sains et atreétiques. En revanche, ER α l'expression était évidente dans les cellules du corps jaune. L'expression d'ER α était élevée dans les cellules thécales des follicules secondaires, intermédiaire dans les cellules de la thèque externe des follicules tertiaires et faibles dans les cellules de la thèque interne des follicules tertiaires. Les cellules de la thèque interne et externe des follicules tertiaires atreétiques ont montré une expression faible à intermédiaire d'ER α , comparable à l'expression dans les cellules thécales des corps jaune (Vandenbroeck et al., 2002).

Les niveaux d'ER α étaient les plus élevés dans les cellules du stroma superficiel, plus faibles dans les cellules du stroma profond, et des valeurs encore plus faibles ont été trouvées

dans les cellules de la tunique albuginée. L'expression d'ER α dans les cellules de l'épithélium de surface a atteint le même niveau que dans les cellules du stroma profond (Vandenbroeck et al., 2002).

Rosenfeld et al.,(1999), trouvent que la localisation immunohistochimique des RE β dans l'ovaire bovin a permis de détecter la protéine ER β dans les cellules de la granulosa des follicules antraux petits (**Fig. 44A**), moyens (**Fig. 44C**) et grands (**Fig. 44E**). Une coloration positive pour ER β était présente dans les cellules de granulosa murales (**Fig. 44E**). Une légère coloration était présente dans les cellules de la thèque interne et externe, et peu ou pas de coloration était présente dans les cellules du stroma ovarien.

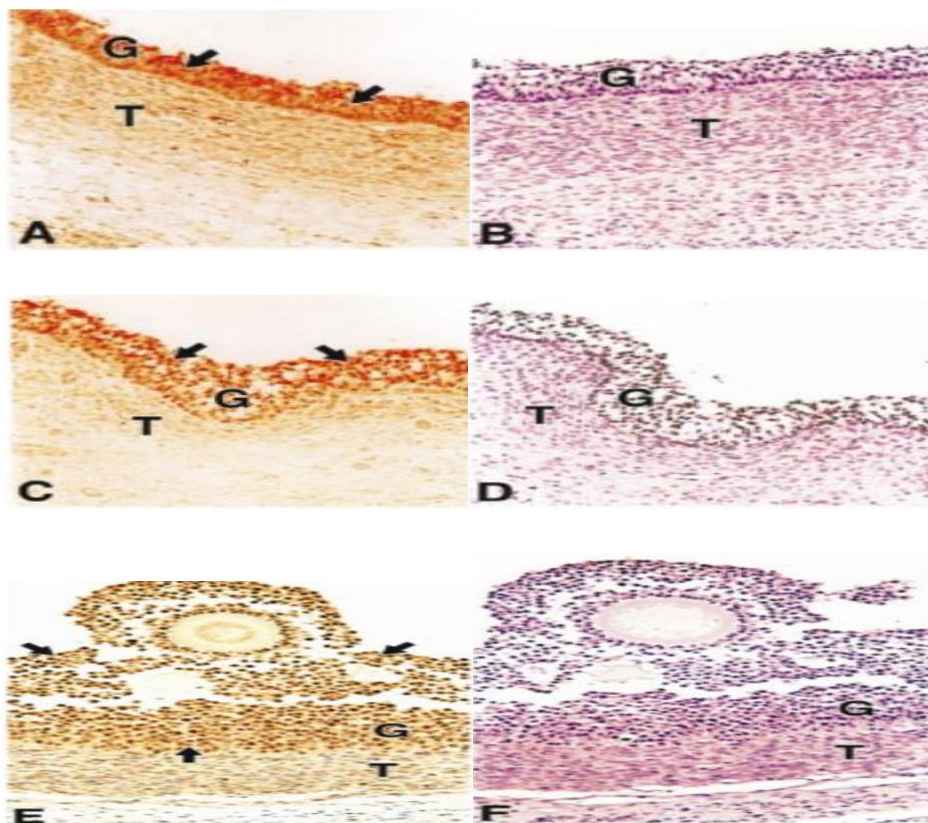


Figure 44: La coloration immunohistochimique de la protéine ER β présente dans les follicules ovariens bovins révèle qu'elle est présente dans les noyaux des petites cellules de la granulosa (flèche) des petits (1-5 mm ; A), moyens (6-9 mm ; C) et grands (9 mm ; E) follicules antraux.

Une légère coloration était présente dans les couches internes et externes de la thèque

Peu ou pas de coloration était présente dans les cellules stromales ovariennes. Dans les coupes sériées de petits (B), moyens (D), et grands (F) follicules antraux incubés avec l'anticorps anti-

Er β préabsorbé avec le peptide ER β , aucune coloration des cellules de la granulosa n'était présente après incubation avec du DAB. Toutes les sections sauf A et C ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline pour mieux visualiser la morphologie. (G, cellules de la granulosa; T, cellules de la thèque. $\times 200$).

Dans les conditions physiologiques de la croissance folliculaire, les récepteurs ER α sont en nombre croissant dans la thèque interne mais pas au sein de la granulosa. De plus, le nombre de récepteurs ER β diminue dans la granulosa (Alfaro et al., 2012). Les gonadotrophines et l'œstradiol inhibent l'expression des récepteurs ER α . Ainsi, le ratio ER α /ER β est régulé par la teneur en œstradiol. Une altération de ce ratio peut engendrer une perturbation de la folliculogénèse et la formation d'un kyste folliculaire (Salvetti et al., 2007a).

Une étude a montré qu'au sein d'un kyste folliculaire, toutes les couches cellulaires présentent une augmentation du nombre de récepteurs ER α . Concernant les récepteurs ER β , il a été observé que leur nombre dans la granulosa des follicules subordonnés était inférieur à celui observé dans les follicules tertiaires présents chez une vache sans kyste. De plus, au sein du kyste folliculaire, la thèque présente moins de récepteurs ER β . Il existe donc une diminution du ratio ER α /ER β au sein des structures kystiques engendrant un déséquilibre de la balance apoptose/prolifération cellulaire, ainsi que des variations d'expression de récepteurs aux gonadotropines et des perturbations métaboliques et enzymatiques (Alfaro et al., 2012; Salvetti et al., 2007a).

Conclusion

Conclusion

Le dysfonctionnement de l'ovaire est un des facteurs responsable de l'apparition des kystes ovariens ayant une incidence sur la fertilité chez la vache. De nombreux facteurs peuvent intervenir dans la formation des kystes en particulier le déséquilibre hormonal induit par une augmentation importante en œstrogènes. Ces derniers via leurs récepteurs jouent un rôle important dans la régulation du développement folliculaire au cours du cycle œstral chez la vache. L'immunolocalisation des récepteurs aux œstrogènes au niveau des cellules de la thèque interne des follicules ovariens montrent que les œstrogènes sont indispensables au développement folliculaire.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

Alfaro, N.S., Salvetti, N.R., Velazquez, M.M., Stangaferro, M.L., Rey, F., Ortega, H.H. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Research in veterinary science*, 2012, 92, 478-485.

Barillier, H. Female infertility Current treatment in France La stérilité féminine Prise en charge actuelle en France. In, *Sciences pharmaceutiques*, 2007, Vol. Université de Caen, City, p. 213.

Bartlett, P.C., Ngategize, P.K., Kaneene, J.B., Kirk, J.H., Anderson, S.M., Mather, E.C. Cystic follicular disease in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and economic impact. *Preventive Veterinary Medicine*, 1986, 4, 15-33.

Bartolome, J.A., Archbald, L.F., Morresey, P., Hernandez, J., Tran, T., Kelbert, D., Long, K., Risco, C.A., Thatcher, W.W. Comparison of synchronization of ovulation and induction of estrus as therapeutic strategies for bovine ovarian cysts in the dairy cow. *Theriogenology*, 2000, 53, 815-825.

Bartolome, J.A., Thatcher, W.W., Melendez, P., Risco, C.A., Archbald, L.F. Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 2005, 227, 1409-1414.

Belfiore, C.J., Hawkins, D.E., Wiltbank, M.C., Niswender, G.D. Regulation of cytochrome P450_{sc} synthesis and activity in the ovine corpus luteum. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994, 51, 283-290.

Bierschwal, C.J., Garverick, H.A., Martin, C.E., Youngquist, R.S., Cantley, T.C., Brown, M.D. Clinical response of dairy cows with ovarian cysts to GnRH. *J Anim Sci*, 1975, 41, 1660-1665.

Bjornstrom, L., Sjoberg, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology*, 2005, 19, 833-842.

Bogovich, K., Richards, J. Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles evidence that luteinizing hormone regulates thecal 17 α -hydroxylase and C17-2 α -Lyase activities. *Endocrinology*, 1982, 111, 1201-1208.

Bonnes, G., Desclaude, J., Drogoul, C., Gadoud, R., Jussiau, R., Le Loc'h, A., Montmeas, L., Robin, G. *reproduction des mammifères d'élevage*. Editions Foucher, 1988.

Borsberry, S., Dobson, H. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *The Veterinary Record*, 1989, 124, 217-219.

Bramley, T., Menzies, G., Rae, M., Scobie, G. Non-genomic steroid receptors in the bovine ovary. *Domestic animal endocrinology*, 2002, 23, 3-12.

Brosens, J.J., Tullet, J., Varshochi, R., Lam, E.W.-F. Steroid receptor action. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2004, 18, 265-283.

Brown, E., Elmore, R., Garverick, H., Kesler, D. Gonadotropin releasing hormone treatment of dairy cows with ovarian cysts: II. Histology of ovarian cyst walls. *Theriogenology*, 1982, 17, 689-696.

Byers, M., Kuiper, G.G., Gustafsson, J.-A.k., Park-Sarge, O.-K. Estrogen receptor- β mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Molecular endocrinology*, 1997, 11, 172-182.

Calder, M.D., Salfen, B.E., Bao, B., Youngquist, R.S., Garverick, H.A. Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth. *Journal of animal science*, 1999, 77, 3037-3042.

Carr, B.R., MacDonald, P.C., Simpson, E.R. The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. *Fertil Steril*, 1982, 38, 303-311.

Carroll, J.S., Brown, M. Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Molecular endocrinology*, 2006, 20, 1707-1714.

Cartmill, J., El-Zarkouny, S., Hensley, B., Lamb, G., Stevenson, J. Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84, 1051-1059.

Chalmey, C., (2013). Exposition néonatale aux œstrogènes : effets sur leur métabolisme, le développement ovarien et la fonction de reproduction chez la ratte. Thèse de doctorat, Université Rennes 1, France.p.293.

Clement, P.B. Histology of the ovary. *Am J Surg Pathol*, 1987, 11, 277-303.

Cook, D.L., Smith, C.A., Parfet, J.R., Youngquist, R.S., Brown, E.M., Garverick, H.A. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. *J Reprod Fertil*, 1990, 90, 37-46.

Couse, J.F., Korach, K.S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, 1999, 20, 358-417.

Cutolo, M., Capellino, S., Sulli, A., Serioli, B., Secchi, M.E., Villaggio, B., Straub, R.H. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 043.

Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S.A., Jordan, V.C., Katzenellenbogen, J.A., Korach, K.S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M.G., Gustafsson, J.-Å. International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological reviews*, 2006, 58, 773-781.

Day, N. The diagnosis, differentiation, and pathogenesis of cystic ovarian disease. *Veterinary Medicine*, 1991, 86, 753-760.

Descôteaux, L., 2009. Guide pratique d'échographie pour la reproduction des ruminants. Éditions Med'com.

Dobson, H., Smith, R. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal reproduction science*, 2000, 60, 743-752.

Drion, P., Hanzen, C., Houtain, J., Beckers, J.-F. Connaissances actualisées des régulations de la croissance folliculaire chez les bovins: Folliculogénèse, Cyclicité, Anoestrus 1998.

Droui, X., Dornier, P., (2013). Les kystes folliculaires chez la vache laitière: évaluation échographique de l'efficacité d'un traitement par les progestagènes et relation avec l'inflammation génitale. Thèse de doctorat en vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, France. p. 219.

Drummond, A.E., Britt, K.L., Dyson, M., Jones, M.E., Kerr, J.B., O'Donnell, L., Simpson, E.R., Findlay, J.K. Ovarian steroid receptors and their role in ovarian function. *Molecular and cellular endocrinology*, 2002, 191, 27-33.

Dupont, V., (2012). Signalisation par les récepteurs des œstrogènes: mécanismes de reconnaissance de l'ADN et nouvelles approches pharmacologiques d'inhibition. Thèse de doctorat en biochimie, Université de Montréal, France. p.332.

Engel, L., L. The biosynthesis of estrogens. *Cancer*, 1957, 10, 711-715.

Ennuyer, M. Les vagues folliculaires chez la vache. Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction-Point Vet, 2000, 31, 377-383.

Erickso, G.F., Hsueh, A., Quigley, M., Rebar, R., Yen, S. Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1979, 49, 514-519.

Evans, A., Canty, M. Physiology of follicle development in cattle. *MEDECIN VETERINAIRE DU QUEBEC.*, 2004, 34, 61-61.

Falck, B. Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1959, 47, 1-101.

Fernandes, K., (2019). Réalisation d'un guide pratique pédagogique portant sur le diagnostic par échographie des structures ovariennes et utérines en espèce bovine. Thèse de doctorat en vétérinaire, Université Claude-Bernard - Lyon I, France. p. 136.

Fieni, F., Tainturier, D., Bruyas, J., Battu, I. Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache. *Bull. Group. Tech. Vét*, 1995, 512, 35-49.

Findlay, J.K. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biology of reproduction*, 1993, 48, 15-23.

Fortune, J., Vincent, S. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biology of reproduction*, 1983, 28, 1078-1089.

Fourichon, C., Seegers, H., Malher, X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*, 2000, 53, 1729-1759.

Francony, S.M., (2011). Comparaison de l'intérêt diagnostique des différentes techniques d'examen de l'ovaire de la vache. Thèse pour le doctorat vétérinaire, École national vétérinaire d'Alfort City, France. p. 135.

Fuentes, N., Silveyra, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 2019, 116, 135-170.

Gagnon-Duval, L. (2015). Une approche moléculaire pour mieux comprendre l'infertilité chez la vache laitière. Thèse de doctorat en vétérinaire, Université de Montréal City, France. p. 89.

Garverick, H.A. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80, 995-1004.

Gümen, A., Wiltbank, M.C. Follicular cysts occur after a normal estradiol-induced GnRH/LH surge if the corpus hemorrhagicum is removed. *Reproduction*, 2005, 129, 737-745.

Haddj-Mhammed, S. (2016). Evaluation des performances de reproduction et de production laitière du bovin laitier moderne dans la région de GHARDAÏA. Master en agronomie, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. p. 119.

- Hamilton, S.A., Garverick, H.A., Keisler, D.H., Xu, Z.Z., Loos, K., Youngquist, R.S., Salfen, B.E. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod*, 1995, 53, 890-898.
- Hanzen, C., (1994). Etude des facteurs de risque de l'infertilité et des pathologies puerpérales et du postpartum chez la vache laitière et chez la vache viandeuse. Thèse de doctorat en vétérinaire. Université de Liège, Belgique. p. 174.
- Hanzen, C., Bascon, F., Theron, L., Lopez-Gatius, F. Les kystes ovariens dans l'espèce bovine. 2. Rappels physiologiques et étio-pathogénie. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 2008, 152, 17-34.
- Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A., Thomas, P. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97, 10751-10756.
- Hooijer, G., Lubbers, R., Ducro, B., Van Arendonk, J., Kaal-Lansbergen, L., Van Der Lende, T. Genetic parameters for cystic ovarian disease in Dutch Black and White dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84, 286-291.
- Hooijer, G., van Oijen, M., Frankena, K., Noordhuizen, J. Milk production parameters in early lactation: potential risk factors of cystic ovarian disease in Dutch dairy cows. *Livestock Production Science*, 2003, 81, 25-33.
- Huszenicza, G., HARAszri, J., Molnar, L., SoL, L., Fekete, S., Ekes, K., Yaro, A. Some Metabolic Characteristics of Dairy Cows. *J. Vet. Med. A*, 1988, 35, 506-515.
- Kaneko, H., Noguchi, J., Kikuchi, K., Todoroki, J., Hasegawa, Y. Alterations in peripheral concentrations of inhibin A in cattle studied using a time-resolved immunofluorometric assay: relationship with estradiol and follicle-stimulating hormone in various reproductive conditions. *Biol Reprod*, 2002, 67, 38-45.
- Kesler, D.J., Garverick, H.A. Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J Anim Sci*, 1982, 55, 1147-1159.
- Kirk, J.H., Huffman, E., Lane, M. Bovine cystic ovarian disease: hereditary relationships and case study. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1982, 181, 474-476.
- Le Grand, A., (2009). Etude comparative de récepteurs aux œstrogènes : Aspects moléculaire et cellulaire de la réponse aux œstrogènes et anti-œstrogènes impliqués dans les causes et thérapies du cancer du sein. thèse de doctorat. Université de Bretagne Sud. p. 315.
- López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J., Fenech, M., López-Béjar, M. Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 2002, 58, 1623-1632.
- Lowe, D.A., Baltgalvis, K.A., Greising, S.M. Mechanisms behind estrogen's beneficial effect on muscle strength in females. *Exerc Sport Sci Rev*, 2010, 38, 61-67.
- Lubbers, R., Hooijer, G., Ducro, B., Van Arendonk, J., Kaal-Lansbergen, L., Van Der Lende, T. Genetic parameters for cystic ovarian disease in Dutch Black and White dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84, 286-291.
- Melendez, P., Bartolome, J., Archbald, L., Donovan, A. The association between lameness, ovarian cysts and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 2003, 59, 927-937.

Mialot, J., Constant, F., Chastant-Maillard, S., Ponter, A., Grimard, B. La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins: nouveautés et applications-Journées Européennes de la Société Française de Buiatrie. Paris, Novembre, 2001, 163-168.

Miller, W.L., Strauss III, J.F. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, Starproceedings of Xth International Congress on Hormonal Steroids, Quebec, Canada. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 1999, 69, 131-141.

Mimoune, N., Azzouz, M.Y., Khelef, D., Kaidi, R. Ovarian cysts in cattle: a review. Veterinarska stanica, 2021, 52, 0-0.

Mohammed, H., White, M., Guard, C., Smith, M., Mechor, G., Booker, C., Warnick, L., Dascanio, J., Kenney, D. A case-control study of the association between blood selenium and cystic ovaries in lactating dairy cattle. Journal of dairy science, 1991, 74, 2180-2185.

Monniaux, D., Mariana, J.C., Rabahi, F., Monget, P., Mermillod, P., Baril, G., Pisselet, C., Chupin, D., POULIN, N., Brebion, P., Bosc, M., Nicolle, A., Fontaine, J., Durand, P. Control of terminal follicular development and maturation in domestic mammals. Contraception Fertilité Sexualité, 1993, 21, 403-407.

Morrow, D., Roberts, S., McEntee, K. A review of postpartum ovarian activity and involution of the uterus and cervix in cattle. The Cornell Veterinarian, 1969, 59, 134-154.

Nanda, A.S., Dobson, H., Ward, W.R. Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce a luteinising hormone surge in dairy cows. Res Vet Sci, 1990, 49, 25-28.

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J.A. Mechanisms of estrogen action. Physiol Rev, 2001, 81, 1535-1565.

O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., Hansen, U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. Mol Endocrinol, 2004, 18, 1859-1875.

Opsomer, G., Coryn, M.D., Hubert de Kruif, A. An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. Reproduction in Domestic Animals, 1998, 33, 193-204.

Peter, A.T., Bosu, W., DeDecker, R. Suppression of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers after intrauterine infusions of Escherichia coli endotoxin. American Journal of Veterinary Research, 1989, 50, 368-373.

Picton, H., Tsonis, C., McNeilly, A. FSH causes a time-dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. Journal of endocrinology, 1990, 126, 297-307.

Rathbone, M.J., Kinder, J.E., Fike, K., Kojima, F., Clopton, D., Ogle, C.R., Bunt, C.R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 50, 277-320.

Riggs, B.L., Khosla, S., Melton, L.J., 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev, 2002, 23, 279-302.

Rosenfeld, C.S., Wagner, J.S., Roberts, R.M., Lubahn, D.B. Intraovarian actions of oestrogen. Reproduction (Cambridge, England), 2001, 122, 215-226.

- Rosenfeld, C.S., Yuan, X., Manikkam, M., Calder, M.D., Garverick, H.A., Lubahn, D.B. Cloning, sequencing, and localization of bovine estrogen receptor- β within the ovarian follicle. *Biology of reproduction*, 1999, 60, 691-697.
- Salvetti, N.R., Acosta, J., Gimeno, E.J., Müller, L., Mazzini, R., Taboada, A., Ortega, H.H. Estrogen receptors α and β and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Veterinary Pathology*, 2007, 44, 373-378.
- Saumande, J., Humblot, P. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. *Animal reproduction science*, 2005, 85, 171-182.
- Shoham, Z., Schachter, M. Estrogen biosynthesis--regulation, action, remote effects, and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril*, 1996, 65, 687-701.
- Silvia, W., Hatler, T., Nugent, A., Da Fonseca, L.L. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domestic animal endocrinology*, 2002, 23, 167-177.
- Simpson, E.R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W.C., Robertson, K., Britt, K., Speed, C., Jones, M. Aromatase--a brief overview. *Annu Rev Physiol*, 2002, 64, 93-127.
- Thibault, C., Levasseur, M.-C., 1991. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. INRA Editions, Ellipses.
- Todoroki, J., Kaneko, H. Formation of follicular cysts in cattle and therapeutic effects of controlled internal drug release. *J Reprod Dev*, 2006, 52, 1-11.
- Todoroki, J., Noguchi, J., Kikuchi, K., Ohnuma, K., Ozawa, M., Kaneko, H. Plasma concentrations of inhibin A in cattle with follicular cysts: relationships with turnover of follicular waves and plasma levels of gonadotropins and steroid hormones. *Domest Anim Endocrinol*, 2004, 27, 333-344.
- Watson, C., Cliff, A. A survey of cystic ovarian disease in practice. *The Bovine Practitioner*, 1997, 15-18.
- Webb, R., Garnsworthy, P., Gong, J.-G., Armstrong, D. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, 2004, 82, E63-E74.
- Weihua, Z., Andersson, S., Cheng, G., Simpson, E.R., Warner, M., Gustafsson, J.A. Update on estrogen signaling. *FEBS Letters*, 2003, 546, 17-24.
- Williams, K.C., Renthal, N.E., Gerard, R.D., Mendelson, C.R. The microRNA (miR)-199a/214 cluster mediates opposing effects of progesterone and estrogen on uterine contractility during pregnancy and labor. *Mol Endocrinol*, 2012, 26, 1857-1867.
- Wiltbank, J., Tyler, W., Casida, L., Fosgate, O., Sprain, D. A study of atretic large follicles in six sire-groups of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 1953, 36, 1077-1082.
- Wiltbank, M.C., Gümen, A., Sartori, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, 2002, 57, 21-52.