



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



## *Mémoire*

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

## *Option*

*Biotechnologie et Pathologie Moléculaire*

## *Thème*

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

*Présenté par*

*Ahmedi Zakia et Tahi Abir*

*Devant le Jury :*

<i>Zerouti K.</i>	<i>MCA</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Présidente</i>
<i>Rahim I.</i>	<i>MCB</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Ferrouk M.</i>	<i>MCA</i>	<i>ISV, USDB</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Boukenaoui Ferrouk N.</i>	<i>MCA</i>	<i>ISV, USDB</i>	<i>Co-Promotrice</i>

*Session 2020 / 2021*



## Remerciements

*Tout d'abord nous tenons à remercier (Allah) le clément et  
Le miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage  
De mener à bien ce modeste travail.*

***A notre promoteur et Co-promotrice Docteur FERROUK ET Docteur BOUKENAOUI***

*Nous étions très comblés par l'honneur que vous nous avez fait en nous  
Confiant ce travail. Toute notre reconnaissance également pour votre  
Disponibilité, votre patience, vos suggestions, vos encouragements et de  
Vos précieux conseils dans la réalisation de ce travail. Votre compétence,  
Votre modestie et votre humanisme ont suscité en nous une grande  
Admiration et un profond respect. Veuillez croire à l'expression de ma  
Profonde reconnaissance et de mon grand respect.*

***A notre jury Docteur ZEROUTI.K et Docteur RAHIM***

*Nous vous remercions pour le très grand honneur que vous nous faites en  
Acceptant de juger notre mémoire. Vous avez en permanence  
Suscité notre admiration, nous sommes toujours impressionnés par la  
Richesse et l'éclectisme de votre enseignement. Votre compétence n'a rien  
D'égal que votre modestie, Vos qualités professionnelles et humaines nous  
Servent d'exemple. Veuillez trouver ici, docteur, l'expression de nos  
Sincères remerciements et toute la reconnaissance que nous vous  
Témoignons.*

*Enfin on remercie également toutes les personnes qui ont de près ou de loin apporté aide et  
encouragement.*



## **Dédicace :**

*Au Bon Dieu qui nous a donné foi, santé et le courage de mener ce travail :*

*Je dédie ce modeste travail :*

### **A MA TRÈS CHÈRE MÈRE**

*A la plus douce et la plus merveilleuse de toutes les mamans.*

*Aucun hommage ne saura transmettre à sa juste valeur l'amour,*

*Le respect que je porte pour vous.*

*Vous n'avez pas cessé de me soutenir et de m'encourager, votre amour,*

*Votre générosité exemplaire et votre présence ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*Je prie Dieu, le tout puissant, vous protéger du mal, vous procurer santé,*

*Bonheur et longue vie afin que je puisse un jour vous rendre ne serait-ce*

*Qu'un peu de ce que vous avez fait pour moi.*

### **A MON TRÈS CHER PÈRE**

*Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, ma considération et l'amour*

*Éternel que je vous porte pour les sacrifices que vous avez*

*Consenti pour mon éducation et mon bien être.*

*Vous m'avez appris le sens du travail, de l'honnêteté et de la responsabilité.*

*Vos prières ont été pour moi un grand soutien tout au long de mes études.*

*Je souhaite que cette thèse vous apporte la joie de voir aboutir vos espoirs*

*Et j'espère ne jamais vous décevoir.*

*Que Dieu, tout puissant, vous garde et vous procure santé, bonheur et*

*Longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.*

**A MES TRES CHERES SŒURS KARIMA, AMINA, SOUAD, MALIKA ET Mes**

**ADORABLES FRERES MAHIEDDINE, HOCINE, FETAH.**

*Vous savez que l'affection et l'amour fraternel que je vous porte sont sans limite.*

*Puissions-nous rester unis dans la*

*Tendresse et fidèles à l'éducation que nous avons reçue. J'implore Dieu*

*Qu'il vous apporte bonheur et vous aide à réaliser tous vos vœux.*

**A mes neveux, mes nièces, mes beaux-frères, MOUSSA, AHMED, KADER, HAMZA.**

*A mon binôme ZAKIA pour sa patience tout au long de notre travail*

*Ainsi qu'à tous mes amis sans citer leurs prénoms pour ne pas vexer personne si je l'oublie.*

**ABIR**



**Dédicace :**

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents (nacer et malika) qui sont la source éternelle de mon bonheur, et qui n'ont à donner la volonté, le courage, et la patience d'aller loin. Que dieu les gardes pour moi.

A mon cher frère mon bras droit : yanis.

A mes très chères amies et binôme : abir qui a travaillé durement pour réaliser cette mémoire.

**ZAKIA**

# Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Listes des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction.....	1
1 Anatomie de l'appareil génital femelle bovine .....	2
1.1 Anatomie de l'ovaire de la vache .....	2
1.2 Morphologie.....	3
1.3 Fonctions principales des ovaires.....	3
2 Histologies de l'ovaire .....	3
2.1 Zone vasculaire ou médulla .....	3
2.2 Zone parenchymateuse ou cortex .....	3
2.3 Structures ovariennes .....	4
3 Physiologie de l'ovaire.....	5
3.1 Cycle œstral.....	6
3.1.1 Pro-œstrus .....	6
3.1.2 Œstrus .....	6
3.1.3 Metoestrus .....	6
3.1.4 Dioestrus :.....	6
4 Récepteur de la progestérone .....	7
4.1 Définition .....	7
4.2 Structure du récepteur .....	7
4.3 Localisation des récepteurs de la progestérone .....	8
4.4 Mécanisme d'action de la progestérone sur la fonction ovarienne .....	8
4.5 Effets de la progestérone .....	9
5 Ovaires kystiques .....	10
5.1 Définition .....	10
5.2 Classification des kystes ovariens .....	10
5.2.1 Kystes folliculaires .....	10
5.2.2 Kyste lutéal.....	11
5.3 Etiologie des kystes ovariens .....	11

5.4	Diagnostic des kystes ovariens.....	12
5.5	Méthodes de diagnostic.....	12
5.5.1	Paraclinique et biologique.....	13
5.5.2	Diagnostic différentielle.....	13
5.5.3	Prise en charge médicale.....	14
1.	Lieu et durée d'étude.....	15
2.	Matériel et méthodes.....	15
2.2.	Matériel utilisé.....	16
2.2.1	Matériel de prélèvement, de fixation et de conditionnement des ovaires.....	16
2.2.2.	Matériel pour l'étude histologique des ovaires.....	16
2.2.3.	Matériel pour l'étude immunohistochimie.....	16
2.3.	Méthodes.....	17
2.3.1.	Protocole de la technique histologie.....	17
2.3.2.	Etapes de la technique d'histologie.....	17
2.4.	Protocole de la technique immunohistochimie.....	21
3.	Conclusion.....	31
4.	Recommandation.....	32
5.	Références bibliographiques.....	33

## Liste des figures

Figure 1 : Tractus génital de la vache, vue latérale présentant sa position à l'intérieur des cavités pelvienne et abdominale (Budras et al., 2003).....	2
Figure 2: Appareil génital femelle chez la vache (Barone, 1990).....	3
Figure 3 : Coupe histologique d'un ovaire normal (H&E, × 20) (Orsi et al., 2014).....	4
Figure 4 : Schéma de l'évolution d'un follicule primordial en follicule de De Graaf en passant par les stades intermédiaires de follicule primaire. secondaire.et tertiaire (Vaissaire, 1977).....	5
Figure 5: Etapes du cycle œstral chez la vache (Wattiaux 2006).....	6
Figure 6 :Structure du récepteur de la progestérone (Kastner et al., 1990).....	7
Figure 7 : Mécanisme d'action de la progestérone (Grimm et al., 2016).....	9
Figure 8 : Image échographique d'un kyste folliculaire (Hanzen et al., 2007). Zone hyperéchogène délimité avec deux lignes rouges .....	11
Figure 9 : Image échographique d'un kyste folliculaire lutéinisé. Le tissu lutéal est délimité par les deux lignes jaunes (Hanzen et al., 2007).....	11
Figure 10 : Facteurs de risque du kyste ovarien et leurs mécanismes d'effet chez la vache (Hanzen et al., 2008).....	12
Figure 11: Appareil génital de la vache avec un ovaire kystique.....	15
Figure 12 : Photos des ovaires à gauche kystique et à droite non kystique. (a) vue externe et (b) en coupe longitudinale. ....	16
Figure 13 : Batterie de déshydratation. ....	18
Figure 14 : Ovaire dans le formol dilué à 10%. ....	18
Figure 15 : Etapes de confection des blocs de paraffine. ....	19
Figure 16 : Coupe au microtome.....	20
Figure 17 : Etapes de récupération de la coupe sur une lame silanisée.....	20
Figure 18 : Etapes de déparaffinage et la réhydratation des lames. ....	21
Figure 19 : Solution de démasquage au bain-marie. ....	22
Figure 20 : Rinçage des lames au PBS.....	22
Figure 21 : Blocage des peroxydases endogènes (a) et rinçage au PBS (b).....	22
Figure 22 : Application de la résine hydrophobe (a) et chambre humide sur un agitateur (b).....	22
Figure 23 : Blocage des sites non spécifiques avec du sérum de cheval (a) et rinçage au PBS(b). ....	23
Figure 24 : Application d'un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (a) et rinçage au PBS. ....	23
Figure 25 : Application du complexe Streptavidine-Peroxydase (a) et rinçages au PBS (b) .....	24
Figure 26 : Application du DAB sur les coupes (a) puis rinçage par PBS (b) et coloration des lames (c) rinçage par eau distillée (d). ....	24
Figure 27 : Contre coloration par l'hématoxyline.....	24

Figure 28 : Rinçage par l'eau de robinet.....	25
Figure 29 : Batterie de déshydratation (a) et éclaircissement (b).....	25
Figure 30 : Montage des lames par eukitt sur des lamelles (a ; b ; c) et observation par microscope photonique (d). .....	25
Figure 31 : Immunolocalisation des récepteurs à la progestérone avec une dilution au 1/50 de l'anticorps anti-récepteurs à la progestérone au niveau de l'ovaire kystique de la vache.....	27
Figure 32 : Immunolocalisation des récepteurs à la progestérone avec une dilution au 1/200 de l'anticorps anti-récepteurs à la progestérone au niveau de l'ovaire kystique de la vache.....	28
Figure 33 : Immunolocalisation des récepteurs de la progestérone au niveau des follicules tertiaires normaux (a) et follicules tertiaires des ovaires kystiques (b). Barre d'échelle : 25 µm (Salvetti et al, 2007). .....	29
Figure 34 : Immunoexpression du récepteur à la progestérone chez les animaux cyclés et chez les animaux ayant un kyste ovarien induit par ACTH. Barre d'échelle : 20µm.....	30

## Liste des tableaux

Tableau 1: Synthèse bibliographique sur les étapes de la technique d'immunohistochimie....26

Tableau 2 : Synthèse bibliographique sur la localisation des récepteurs de la progestérone. ...28

## Liste des abréviations

**IHC** : Immunohistochimie.

**KO** : kyste ovarien.

**KF** : kyste folliculaire.

**KL** : kyste lutéal.

**PBS** : Tampon phosphate salin.

**RP** : Récepteur de progestérone.

**DLA** : domaine de liaison à l'ADN.

**DLH** : domaine de liaison à l'hormone.

**AF** : domaine d'activation transcriptionnelle.

**DD** : domaine de dimérisation.

## Résumé

L'objectif de ce travail est de déterminer par la technique d'immunohistochimie la location de l'expression des récepteurs de la progestérone au niveau de l'ovaire kystique chez la vache. L'ovaire kystique a été prélevé de l'appareil génital récolté de niveau de l'abattoir d'el Harrach. Après mesure du diamètre du follicule kystique, l'ovaire est sectionné longitudinalement puis fixé pour une étude immunohistochimique. Des tests ont été réalisés pour déterminer les étapes de la technique d'immunohistochimie pour déterminer la concentration optimale de l'anticorps anti-progestérone pour mettre en évidence le marqueur aux récepteurs de la progestérone (RP). Les résultats préliminaires obtenus montrent que l'immunomarquage des RP est observé au niveau des follicules primaires et secondaires et aussi au niveau du tissu conjonctif du stroma ovarien, avec une dilution de l'anticorps anti-RP au 1/50. En conclusion, la progestérone via son RP joue un rôle important dans la régulation de la fonction de reproduction chez la vache, alors que le déséquilibre de cette hormone induit un dysfonctionnement de l'ovaire.

**Mots clés :** Récepteurs de la progestérone, ovaire kystique, vache, immunohistochimie.

## **Summary**

The objective of this work is to determine by the technique of immunohistochemistry the location of the expression of progesterone receptors in the cystic ovary in cows. The cystic ovary was removed from the genitalia harvested from the slaughterhouse level of El Harrach. After measuring the diameter of the cystic follicle, the ovary is sectioned longitudinally and then fixed for an immunohistochemical study. Tests were performed to determine the steps of the immunohistochemistry technique to determine the optimal concentration of anti-progesterone antibodies to demonstrate the marker at the progesterone receptors (PR). The preliminary results obtained show that the immunostaining of PR is observed at the level of the primary and secondary follicles and also at the level of the connective tissue of the ovarian stroma, with a dilution of the anti-PR antibody to 1/50. In conclusion, progesterone via its PR plays an important role in the regulation of reproductive function in cows, while the imbalance of this hormone induces ovarian dysfunction.

**Keywords:** Progesterone receptors, cystic ovary, cow, immunohistochemistry.

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو تحديد موقع التعبير عن مستقبلات البروجسترون في المبيض الكيسي في الأبقار عن طريق تقنية الكيمياء الهيستولوجية المناعية. تمت إزالة المبيض الكيسي من الأعضاء التناسلية المأخوذة من مسلخ الحراش. بعد قياس قطر الجريب الكيسي ، يُقطع المبيض طولياً ثم يُنَبَّت لإجراء دراسة كيميائية مناعية. تم إجراء اختبارات لتحديد خطوات تقنية الكيمياء الهيستولوجية المناعية لتحديد التركيز الأمثل للأجسام المضادة للبروجسترون لإثبات الواسم في لوحظ على مستوى RP تظهر النتائج الأولية التي تم الحصول عليها أن التلقيح المناعي لـ (RP) مستقبلات البروجسترون إلى 1/50 . RP البصيلات الأولية والثانوية وأيضاً على مستوى النسيج الضام لسدى المبيض ، مع تخفيف الجسم المضاد لـ دوراً مهماً في تنظيم الوظيفة الإنجابية في الأبقار ، بينما يؤدي عدم توازن هذا RP في الختام ، يلعب البروجسترون عبر الهرمون إلى حدوث خلل وظيفي في المبيض.

الكلمات المفتاحية: مستقبلات البروجسترون ، مبيض كيسي ، بقرة ، كيمياء مناعية.

## Introduction

Les kystes ovariens (KO) sont la cause principale de l'infertilité chez les bovins. La dynamique folliculaire altérée et la différenciation cellulaire observées dans les KO et peuvent être médiées par une perturbation de l'expression des récepteurs stéroïdiens et de leurs cofacteurs transcriptionnels associés (Salvetti et al., 2012).

Chez la vache, chaque vague de croissance folliculaire terminale est caractérisée par l'émergence d'un groupe de follicules de 3 à 5 mm de diamètre, suivie de la sélection d'un follicule qui devient dominant puis régresse par atresie ou ovule (Fortune, 1994). Dans certains cas, les follicules dominants continuent leur croissance et se transforment en kystes folliculaires qui sont une cause courante d'infertilité, mais dont la physiologie est encore mal connue (Vanholder et al., 2006).

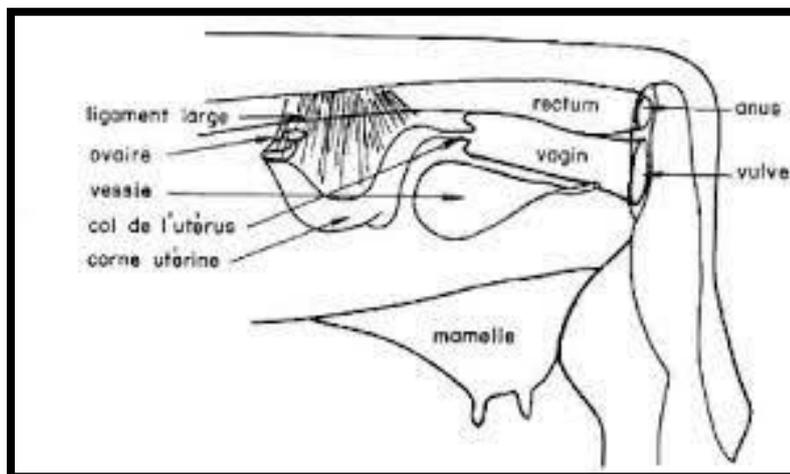
Chez les vaches ayant un kyste ovarien, un ou plusieurs follicules se développent sur l'ovaire et atteignent des dimensions excessives sans libérer leur ovule. Le kyste ovarien persiste pendant une période indéterminée allant de quelques semaines à quelques mois (Fortune, 1994). Cette affection a fait l'objet de nombreuses enquêtes épidémiologiques par des vétérinaires praticiens et les éleveurs dans le monde ( Kesler and Garverick, 1982).

L'objectif de notre travail est de déterminer l'immunolocalisation des récepteurs à la progestérone au niveau des ovaires kystiques chez la vache. Le travail est réparti en deux parties. La première partie est une étude bibliographique pour rappeler l'anatomie et l'histologie de l'appareil génitale femelle bovine, les bases physiologiques du cycle oestral de la vache en particulier la régulation de la progestérone ; et enfin un aperçu les ovaires kystiques chez la vache. Dans la deuxième partie, on a la partie expérimentale la description du matériel et méthodes utilisées, ainsi que les résultats qui sont discutés à la lumière des données bibliographiques et on termine par une discussion.

Chapitre I  
Données  
bibliographiques

# 1 Anatomie de l'appareil génital femelle bovine

L'appareil génital femelle bovine est un siège de la fécondation. Il assure la gestation et la parturition et la lactation. , il assure aussi d'autres fonctions tels que : la production des gamètes femelles, les ovules par le processus de l'ovogénèse, l'expulsion du fœtus à maturité et la nutrition du nouveau-né (Budras et al., 2003). Ces fonctions sont toutes sous le contrôle de mécanismes hormonaux et nerveux. Cet appareil est constitué par des ovaires, un vagin, utérus, l'oviducte et la vulve (**Fig. 1**).



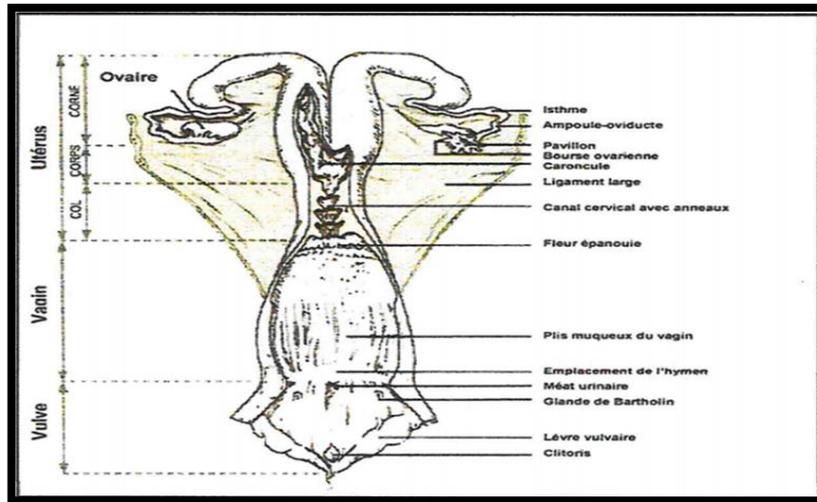
**Figure 1 :** Tractus génital de la vache, vue latérale présentant sa position à l'intérieur des cavités pelvienne et abdominale (Budras et al., 2003).

## 1.1 Anatomie de l'ovaire de la vache

### 1.2 Morphologie

L'ovaire de la vache est un organe lobulé, aplatis et plus petits. L'ovaire d'une vache il est de volume d'une noix, en forme d'une amande de 4 cm de longueur sur 2,5 cm de largeur et de 1,5 cm d'épaisseur, bosselés et dépourvus d'échancrure. Ils sont suspendus au bord antérieur du ligament large et situés en avant du bord antérieur du pubis, et chez les sujets jeunes à l'entrée de la cavité pelvienne, le long du corps de la matrice ou à la base de la corne (Orsi et al., 2014) (**Fig. 2**).

Il est à noter que les ovaires de tous les mammifères ont une structure de base identique, leur apparence globale varie considérablement selon les espèces dans le déroulement du cycle Ovarien et la période du cycle où l'ovaire est examiné.



**Figure 2:** Appareil génital femelle chez la vache (Barone, 1990).

### 1.3 Fonctions principales des ovaires

- ✓ Produit un ovule mur tous les 21 jours lorsque la vache a un cycle œstral normal.
- ✓ Sécréter des hormones qui jouent un rôle important dans le contrôle de la maturation des ovules dans l'ovaire de déclenchement des chaleurs, et de la préparation du système reproducteurs en cas de gestion (Cuq and Agba, 1975).

## 2 Histologies de l'ovaire

L'ovaire est la glande génitale de la femelle. C'est un organe pair, appendu à la région lombaire et pourvu d'une double fonction : gamétogénèse, assurant l'ovogenèse, et endocrine, commandant (sous le contrôle de l'hypophyse) toute l'activité génitale par la sécrétion des hormones œstrogènes et progestative (Barone, 1990).

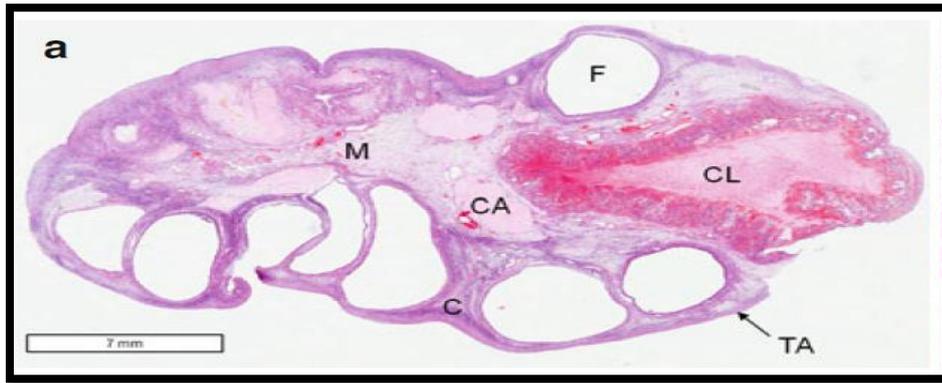
On trouve dans l'ovaire :

### 2.1 Zone vasculaire ou médulla

Elle est centrale dans la plupart des espèces, est richement vascularisée en divisions flexueuses des artères et veines ovariennes qui lui donnent un aspect spongieux (Barone, 1990).

### 2.2 Zone parenchymateuse ou cortex

Composé d'un stroma dense riche en cellules fusiformes comme des cellules musculaires lisses mais dépourvues de striation. Les vaisseaux sont nombreux mais très grêles, de type précapillaire ou capillaire enforment des réseaux denses autour des follicules, surtout lors de la maturation de ceux-ci (Barone, 1990) (**Fig. 3**).



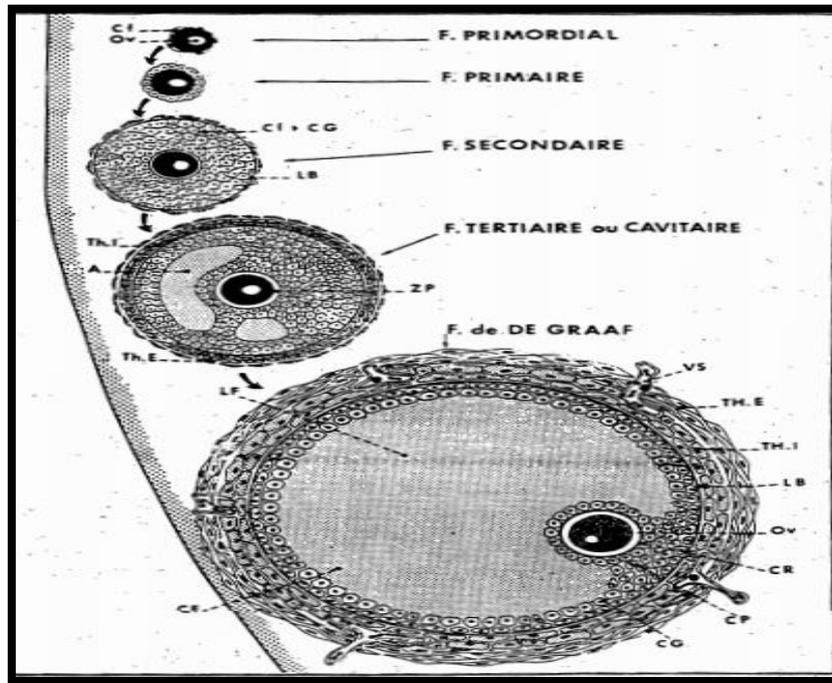
TA : la tunique albuginée, M : Médulla, C : le cortex , F : follicules.

**Figure 3 :** Coupe histologique d'un ovaire normal (H&E,  $\times 20$ ) (Orsi et al., 2014).

- L'ovaire est encapsulé par une couche de tissu conjonctif fibreux, la tunique albuginée.
- Stroma ovarien se compose de cellules fusiformes spécialisées et d'une plus petite quantité de tissu conjonctif ordinaire.
- Médulla contient les principaux vaisseaux de l'ovaire, tandis que la zone périphérique (le cortex) contient des follicules à différents stades de développement, Après l'ovulation, le follicule rompu s'effondre pour former le corps jaune sécrétant de la progestérone (Orsi et al., 2014).

### 2.3 Structures ovariennes

Suivant leur évolution, on peut diviser les follicules quiescents ou follicules primordiaux ; Follicules évolutifs ou gamétogénèses ; Follicules primaires, follicule secondaire et follicule tertiaire, follicule de de Graaf puis le corps jaune (**Fig. 4**) (Cuq and Agba, 1975).



A : Antrum ; Cf : Cellules folliculeuses ; CF : Cavité folliculaire ; CG : Cellule de la granulosa, CP : Cumulus proliger ; CR : Couronne radiée ; LB : Lame basale, OV : Ovocyte ; TH. E : Thèque externe ; TH.1 : Thèque interne ; VS : Vaisseau sanguin ; ZP : Zone pellucide.

**Figure 4 :** Schéma de l'évolution d'un follicule primordial en follicule de De Graaf en passant par les stades intermédiaires de follicule primaire. secondaire. et tertiaire (Vaissaire, 1977)

### 3 Physiologie de l'ovaire

L'appareil génital femelle présente au cours et pendant toute la période d'activité génitale, des modifications morphologiques et physiologiques. Ces modifications sont cycle œstral, la gestation et l'involution utérine. Les femelles à cycle œstral normal examinées entre le 6ème et le 18ème jour du diœstrus présentent souvent un ovaire beaucoup plus développé que l'autre. Cet ovaire est porteur du corps jaune périodique (Derivaux and Ectors, 1980).

#### 3.1 Cycle œstral

Commencent au moment de la puberté, la vache étant une espèce polyoestrienne dont la durée du cycle est de 20 à 21 jours en moyenne, mais varie selon les individus, elle est comprise entre 17 et 25 jours (Youngquist and Threlfall, 2007). Les modifications hormonales durant le cycle permettent de distinguer 2 périodes :

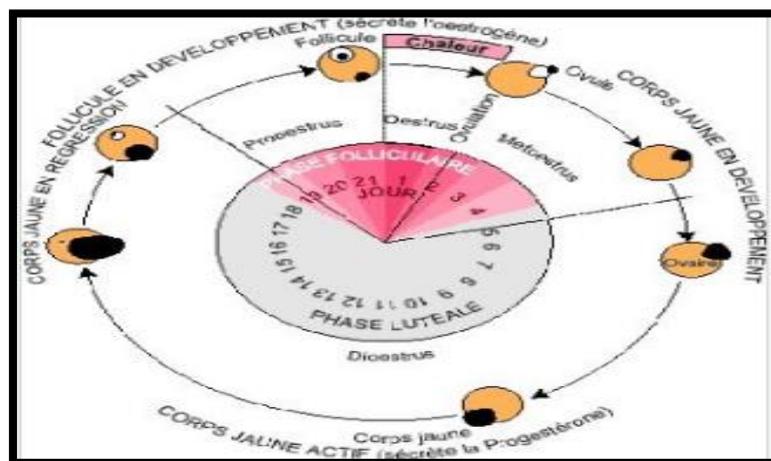
- Phase folliculaire, oestrogénique correspond à la maturation des follicules de Graaf (De Coster et al., 1979).
- Phase lutéinique, lutéal, progestéronique qui s'étend au cours de l'activité des corps jaunes cycliques. Le cycle œstral est divisé en 4 phases (**Fig. 5**) (Ferney and Séré, 1973).

**3.1.1 Pro-œstrus :** C'est la période de transition entre la fin d'un cycle et le début du cycle suivant. Cette phase dure de **1 à 3** jours. Elle est caractérisée par la dégénérescence du corps jaune du cycle précédent et par la maturation finale du follicule qui débute le nouveau cycle.

**3.1.2 Œstrus (j0) :** Ou période de chaleurs qui dure de 6 à 30 heures et peut être marqué par des changements comportementaux pendant cette phase. Le follicule continue sa croissance et se prépare à ovuler.

**3.1.3 Metoestrus (j1 à j 3) :** Correspond à la formation et au développement du corps jaune qui commence à sécréter de la progestérone.

**3.1.4 Dioestrus : (j4 à j18) :** C'est la période de fonctionnement du corps jeune se termine lorsque la lutéolyse débute.



**Figure 5:** Etapes du cycle œstral chez la vache (Wattiaux 2006).

L'ovaire chez la vache sécrète deux hormones stéroïdiennes : les œstrogènes par les follicules, et la progestérone (RP) par le corps jaune, et les cellules de la granulosa qui permet le maintien de la gestation.

## 4 Récepteur de la progestérone

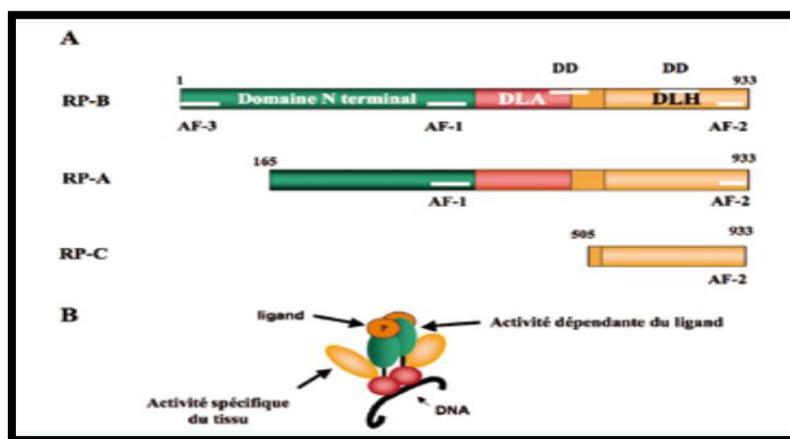
### 4.1 Définition

Les récepteurs de la progestérone est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de régulation de l'expression des gènes. Ces récepteurs régulés par des ligands activés par la RP (Larsen et al., 1998).

### 4.2 Structure du récepteur

Les récepteurs de la progestérone (RP) sont au nombre de 3 (RP-A, RP-B net RP-C), et qui diffèrent en taille et en poids moléculaire. C'est isoformes proviennent du même gène situé en 11q22.

Leur structure est divisée en domaine d'activité dont deux à trois domaines de régulation transcriptionnelle, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand. Ils ont, entre eux, des homologies de séquence plus ou moins importantes en fonction du domaine considéré. Une fois activé par la liaison de la progestérone, le RP va se fixer sur l'ADN au niveau de régions spécifiques (élément de réponse à la progestérone : ERP). Son activité de régulation de la transcription portée par l'extrémité NH2 terminale des RP-A et RP-B (AF1) est constitutive et se déclenche dès que le RP est fixé sur l'ADN. Celle portée par leur extrémité COOH (AF2) dépend du ligand et nécessite aussi la liaison d'autres protéines appelées cofacteurs. On les appelle coactivateurs en cas d'activation de la transcription et co-inhibiteurs en cas d'inhibition de la transcription. L'isoforme A est plus courte que l'isoforme B et ne possède pas de troisième domaine d'activité transcriptionnelle (AF3). La présence de cette activité AF3 dans l'isoforme B du RP permet à celui-ci de fixer un certain nombre de coactivateurs que ne reconnaît pas la forme A et d'avoir des fonctions biologiques différentes.



A-structure primaire des trois isoformes du récepteur de la progestérone. B-récepteur dimérisé et lié à l'ADN, DLA : domaine de liaison à l'ADN ; DLH : domaine de liaison à l'hormone ; AF : domaine d'activation transcriptionnelle ; DD : domaine de dimérisation

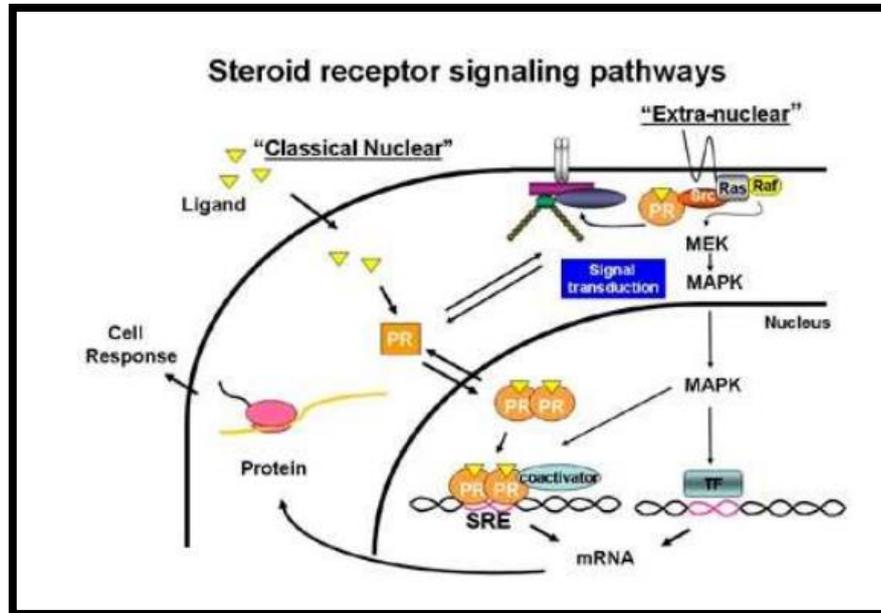
**Figure 6** :Structure du récepteur de la progestérone (Kastner et al., 1990).

### **4.3 Localisation des récepteurs de la progestérone**

Les récepteurs de la progestérone se trouvent à la surface des membranes des cellules lorsqu'il n'est pas fixé à la progestérone. RP est localisé dans divers compartiments des organes reproducteurs de la femelle bovine. Il est localisé dans l'ovaire, l'oviducte et l'utérus bovin, pendant les phases folliculaire et lutéale du cycle œstral. Dans l'ovaire, RP a été détecté dans l'épithélium germinale de surface, les cellules de la granulosa, les cellules de la thèque et dans la vésicule germinale des ovocytes à tous les stades de la folliculogénèse. Dans le corps jaune, l'expression de RP était influencée par le stade du cycle œstral. Dans les oviductes et dans les cornes de l'utérus, RP était immunolocalisé dans l'épithélium luminal, dans les cellules de la couche musculaire et dans les cellules endothéliales. Dans l'utérus, RP était intensément localisé également dans l'endomètre glandulaire. Cependant, dans les oviductes et dans les cornes utérines, la localisation de RP était indépendante du stade du cycle œstral et de l'évaluation de l'organe homolatéral ou controlatéral (Luciano et al., 2011).

### **4.4 Mécanisme d'action de la progestérone sur la fonction ovarienne**

La forme inactive du récepteur de la progestérone est présente dans le cytosol et liée à la protéine de choc thermique (HSP) (Cheung and Smith, 2000). Une fois que l'hormone s'est liée au récepteur, ces protéines se dissocient et les RP se déplacent vers le noyau cellulaire. Ici, il se dimérise et se connecte à la région promotrice du gène exprimé. La dernière étape de l'activation des RP est la connexion des éléments supplémentaires du récepteur, appelés co-régulateurs et modulent l'action du récepteur. Ce groupe de protéines interagit avec le complexe récepteur sans se lier à l'ADN de la séquence du gène cible (Glass and Rosenfeld, 2000). Les co-régulateurs sont divisés en deux groupes de protéines : les co-activateurs (protéines qui améliorent la transcription des gènes cibles) et les corépresseurs (protéines qui inhibent la transcription de tels gènes) (Xu et al., 1999). Les co-activateurs ont une activité interne d'histone acétyltransférase. En acétylant les protéines histones, la HAT relâche la chromatine, ce qui entraîne une expression accrue de divers gènes (Tyler and Kadonaga, 1999). En revanche, les corépresseurs interagissent avec les histones désacétylases, qui réassocient les protéines histones, augmentant ainsi la condensation de la chromatine et inhibant la transcription des gènes cibles (**Fig. 7**) (Pascual et al., 1997).



**Figure 7 :** Mécanisme d'action de la progestérone (Grimm et al., 2016).

#### 4.5 Effets de la progestérone

Seule elle est peu active, ses effets n'apparaissent que s'il y a eu auparavant imprégnation oestrogénique. Elle empêche les chaleurs et facilite un comportement approprié à la gestation. Elle diminue la tonicité des cornes utérines et stimule le développement des glandes utérines, induit leur sécrétion et rend l'endomètre réceptif à l'implantation du zygote. Elle développe les acini mammaires. Elle possède également un effet analgésique pour ses dérivés et un effet hyperthermisant. Ceci explique que chez 70% des femelles, on observe une chute thermique d'un degré Celsius environ suite à la diminution de la progestéronémie pré-partum (Bercovici, 1983).

## **5 Ovaires kystiques**

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 publications (Hanzen et al., 2007).

### **5.1 Définition**

Les kystes ovariens chez les bovins sont généralement définis comme des structures folliculaires, d'au moins 25 mm de diamètre, qui persistent pendant au moins 10 jours en l'absence de corps jaune (Roberts, 1986).

Diverses appellations générales (dégénérescence kystique ovarienne, follicule kystique, de structure (kyste folliculaire, kyste folliculaire lutéinisé) ou symptomatologiques (nymphomanie, virilisme) lui ont été consacrées (Bierschwal, 1966; Kesler and Garverick, 1982).

Le kyste ovarien, l'ovaire kystique, la dégénérescence ovarienne kystique et « les vaches kystiques » sont d'autres expressions pour désigner la même pathologie (Roberts, 1971).

### **5.2 Classification des kystes ovariens**

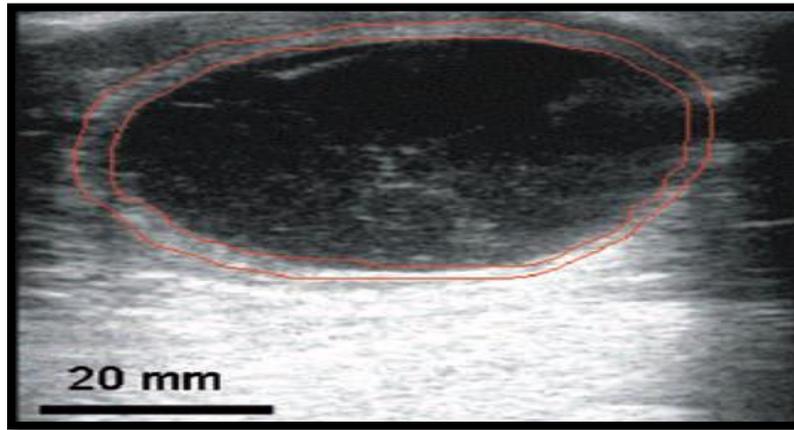
En distingue deux types kystes ovariens chez l'espèce bovine. En effet, le kyste folliculaire constitué une paroi non lutéinisée tandis que le kyste dit lutéal qui est une forme avancée de kyste folliculaire après lutéinisation de sa paroi (Bierschwal et al., 1975).

#### **5.2.1 Kystes folliculaires**

L'examen échographique démontre que le kyste folliculaire (KF) présente les mêmes caractéristiques échographiques que le follicule et ne peut donc s'en différencier que par l'évaluation de son diamètre. Il se caractérise par un diamètre supérieur selon les auteurs à 17, 20, voire 24 mm, et une paroi dont l'épaisseur est habituellement inférieure à 2, voire 3 (Ribadu et al., 1994).

Ils sont plus fréquents que les kystes lutéaux. La concentration de P4 dans le plasma est généralement faible chez les vaches présentant des kystes folliculaires et plus élevée chez les vaches présentant des kystes lutéaux en raison de la lutéinisation partielle des kystes (Kesler et al 1980).

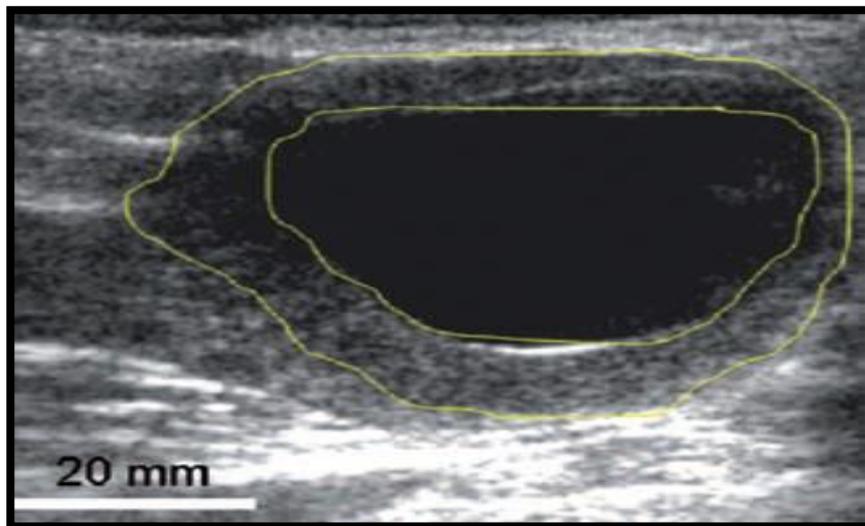
A l'examen échographique, les kystes folliculaires sont anéchogènes. Comme dans le cas des follicules, une zone hyperéchogène peut être observée à la partie distale du kyste (**Fig. 8**) (Hanzen et al., 2007).



**Figure 8** : Image échographique d'un kyste folliculaire (Hanzen et al., 2007). Zone hyperéchogène délimité avec deux lignes rouges

### 5.2.2 Kyste lutéal

Le kyste lutéal (KL) possède à sa périphérie du tissu lutéal, d'une épaisseur de quelques millimètres, de forme plus ou moins régulière entourant une cavité centrale anéchogène et ayant un diamètre égal ou supérieur à 20, voire 25 mm (**Fig. 9**) ( Farin et al., 1992).



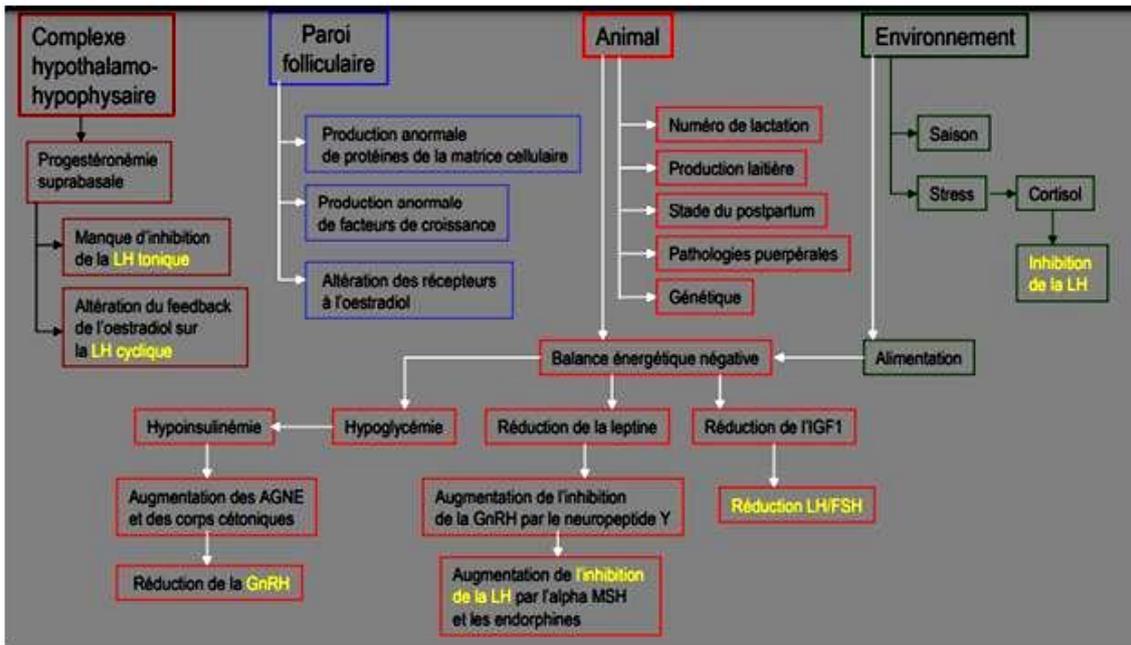
**Figure 9** : Image échographique d'un kyste folliculaire lutéinisé. Le tissu lutéal est délimité par les deux lignes jaunes (Hanzen et al., 2007).

### 5.3 Etiologie des kystes ovariens

De nombreux facteurs, tels que le stress, la gestion nutritionnelle et les maladies infectieuses, peuvent conduire à la KO (Salvetti et al., 2012).

Comprendre l'étiopathogénie du kyste ovarien implique de prendre en considération les altérations hormonales du complexe hypothalamus-hypophysaire et le dysfonctionnement de

la paroi folliculaire mais également divers facteurs responsables propres à l'animal (âge, production laitière, génétique, pathologies du post-partum...) et à son environnement (nutrition, saison, stress...), ces facteurs étant susceptibles d'agir en amont du complexe hypothalamo-hypophysaire et/ou en aval de ce complexe c'est-à-dire directement au niveau ovarien (Fig. 10) (Hanzen et al., 2008).



**Figure 10 :** Facteurs de risque du kyste ovarien et leurs mécanismes d'effet chez la vache (Hanzen et al., 2008).

## 5.4 Diagnostic des kystes ovariens

Selon sa nature et son degré de persistance, le KO entraîne des modifications comportementales de l'animal (Day, 1991).

Les vaches atteintes de la KO peuvent présenter des signes fréquents, irréguliers, prolongés ou continus d'œstrus " nymphomanie " (Wiltbank et al., 2002) ou au virilisme (Al-Dahash and David, 1977).

Dans les cas chroniques, on peut observer un relâchement des ligaments pelviens, l'élévation de l'attache de la queue (Uribe et al., 1995).

Compte tenu de leur faible degré d'exactitude, ces méthodes de diagnostic revêtent un caractère complémentaire à la palpation rectale, à l'échographie et au dosage hormonal (Bierschwal, 1966).

## **5.5 Méthodes de diagnostic**

Les principales techniques établissant le diagnostic des kystes sont la palpation et l'échographie transrectale et le dosage du taux de PR sanguin. La palpation et l'échographie permettent d'abord d'établir un diagnostic de kyste, puis l'échographie et le dosage de progestérone visent à déterminer la nature de celui-ci KF ou KL (Hanzen et al., 2007).

### **5.5.1 Paraclinique et biologique**

#### **5.5.1.1 Palpation transrectale des ovaires**

La palpation transrectale est la méthode la plus couramment utilisée par les vétérinaires praticiens pour le diagnostic des kystes ovariens. À la palpation manuelle, le KF a une paroi mince. Il est fluctuant et se rompt aisément pendant la palpation. Le KL présente une paroi plus épaisse. Il est cependant admis qu'il n'est pas possible de faire par palpation manuelle, un diagnostic différentiel entre un KF et un KL (Douthwaite and Dobson, 2000; Farin et al., 1992). 50 à 85% des kystes folliculaires et 15 à 50 % des kystes lutéaux sont dépistés par palpation transrectale (Douthwaite and Dobson, 2000). Il est cependant pratiquement impossible de différencier la nature du kyste par palpation transrectale. De plus, par palpation transrectale, 10 % des diagnostics sont faussement positifs (Farin et al., 1992) .

#### **5.5.1.2 Examen échographique**

L'échographie est un examen essentiel pour déterminer la nature des KO chez la vache laitière. Elle permet d'instaurer un traitement selon le type de KO (Sylvie, 2010).

L'échographie avait une sensibilité de 95 %, une spécificité de 100 % et une valeur prédictive positive de 100 % (Ribadu et al., 1994).

L'utilisation de l'échographie était plus précise pour diagnostiquer les KF que les KL, et combinée avec les concentrations plasmatiques de PR a donné l'évaluation la plus précise du type de kyste (Douthwaite and Dobson, 2000).

#### **5.5.1.3 Dosages hormonaux**

La détection d'un kyste est complétée par le dosage de la PR aboutissant à la mise en place de différents diagnostics de type de kyste (Carroll et al., 1990). En cas de KF , le taux de progestérone sanguin est faible à normal (0,1 à 2 ng/ml) ; lors de KL, la progestéronémie est normale à élever, dans une fourchette de 1 à 10 ng/ml (Hanzen et al., 2007).

La progestéronémie serait proportionnelle à l'épaisseur de la paroi du kyste ovarien en l'absence de corps jaune sur les deux ovaires (Douthwaite and Dobson, 2000).

### **5.5.2 Diagnostic différentielle**

Le diagnostic du KO et surtout le diagnostic différentiel entre un KF et un KL implique nécessairement le recours à l'échographie pour identifier correctement le diamètre et l'épaisseur du kyste ovarien (Hanzen et al., 2007).

### **5.5.3 Prise en charge médicale**

Les kystes ovariens sont une cause fréquente d'infécondité chez la vache, notamment en élevage laitier. S'ils sont encore présents au-delà de 50 jours post-partum, ils doivent être traités car ils mettent en jeu la fécondité de la femelle (Sylvie, 2010).

La décision de traiter le KF ou le KL implique de tenir compte de plusieurs facteurs. L'efficacité du traitement dépend de la précocité du diagnostic. Cela justifie le recours à une politique d'examen régulier des animaux infertiles ou qui ne manifestent pas des chaleurs au cours des 50 à 60 jours suivant le Vêlage (López-Gatius et al., 2002).

# Chapitre II

## Matériel et Méthodes

## Objectif

Le but de notre travail est d'évaluer l'immunlocalisation des récepteurs des progestérones au niveau des ovaires kystiques récolté à l'abattoir.

### 1. Lieu et durée d'étude

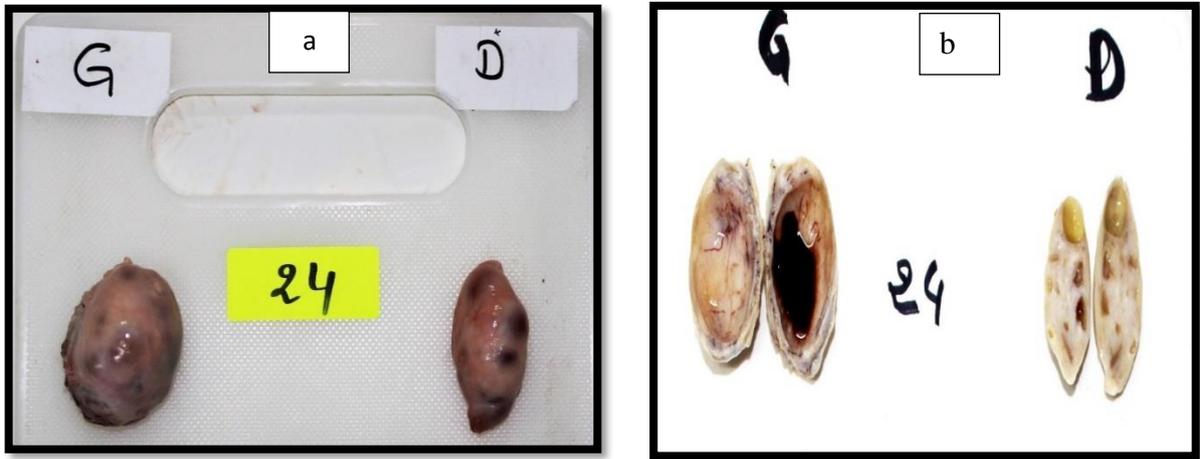
L'étude a été réalisée pendant une période de trois semaines du mois de juin 2021. Cette expérience a été déroulée dans un laboratoire de physiologie de l'institut des sciences vétérinaires (Université du Blida 1).

### 2. Matériel et méthodes

**2.1.Modèle animal :** un appareil génital d'une vache âgée de 5 ans est récolté au niveau de l'abattoir d'el Harrach. L'examen macroscopique révèle la présence d'un ovaire kystique du côté gauche de l'animal. La mesure du diamètre du kyste a été faite à l'aide d'un pied à coulisse.



**Figure 11:** Appareil génital de la vache avec un ovaire kystique.



**Figure 12 :** Photos des ovaires à gauche kystique et à droite non kystique. (a) vue externe et (b) en coupe longitudinale.

## 2.2. Matériel utilisé

Le travail comporte partie fiche des renseignements : elle comporte plusieurs informations à savoir :

Les informations sur l'animal vivant : L'âge, sexe, date de prélèvement.

Les informations sur l'anomalie : kyste ovarien de l'appareil génital.

Le matériel utilisé pour la technique.

### 2.2.1 Matériel de prélèvement, de fixation et de conditionnement des ovaires

- Une trousse avec un scalpel, des ciseaux et une pince.
- Le formol.
- Ethanol à 70°, 95°, 100°.
- Des flacons de conditionnement.

### 2.2.2. Matériel pour l'étude histologique des ovaires

- La paraffine.
- Un microtome.
- Des lames porte-objets.
- Une plaque chauffante.
- Une étuve.
- Des solutions d'alcool à 70°, 95°, 100°.

### 2.2.3. Matériel pour l'étude immunohistochimie

- Une solution tampon citrate (pH=6).
- PBS (tampon phosphate salin).

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (eau oxygénée).
- Résine hydrophobe (Dako-pen).
- Anticorps primaire.
- Kit vectastain comportant : Sérum de cheval ; anticorps secondaire ; Peroxydase de raifort (HRP).
- 3,3'-diaminobenzidine (DAB).
- Eau distillée.
- Hématoxyline.
- Bains d'alcools à 70°, 95°, 100°.
- Liquide de montage (EUKITT).
- Les lames silanisée « superfrost plus ».
- Microscope photonique.

### **2.3. Méthodes**

La technique utilisée est l'immunohistochimie.

Principe de la technique :

C'est la visualisation d'un antigène à l'aide d'un anticorps spécifique (méthode indirecte : méthode ABC).

Elle se fait en deux étapes :

- Première étape : la technique d'histologie.
- Deuxième étape : la technique d'immunohistochimie proprement dite.

#### **2.3.1. Protocole de la technique histologie**

La technique d'histologie est une technique qui permet d'étudier la structure, la morphologie des cellules et l'organisation des tissus.

#### **2.3.2. Etapes de la technique d'histologie**

Avant de réaliser la technique, on a fait une dissection d'un kyste ovarienne et un fragment est placé immédiatement dans des cassettes d'histologie.

##### **2.3.2.1. Fixation**

L'ovaire est immergé dans le formol du commerce tamponné dilué à 10 % pendant plus de 24h (**Fig. 13**).

Le but de cette fixation c'est pour garder l'organe à un état aussi proche que possible de l'état vivant. Donc, de préserver l'état structural du tissu.

Cette étape de fixation doit être effectuée le plus rapidement possible à fin d'éviter l'autolyse tissulaire due à l'éclatement des lysosomes et à la destruction tissulaire par les microorganismes.

### **2.3.2.2. Déshydratation et éclaircissement**

Après la fixation de l'ovaire, les prélèvements sont immergés dans des bains d'alcools à concentration croissante allant de 70°-95°-100° (**Fig. 14**). Ils sont par la suite passés dans des bains de xylène et de paraffine pour subir éclaircissement.



**Figure 14 :** Ovaire dans le formol dilué à 10%.



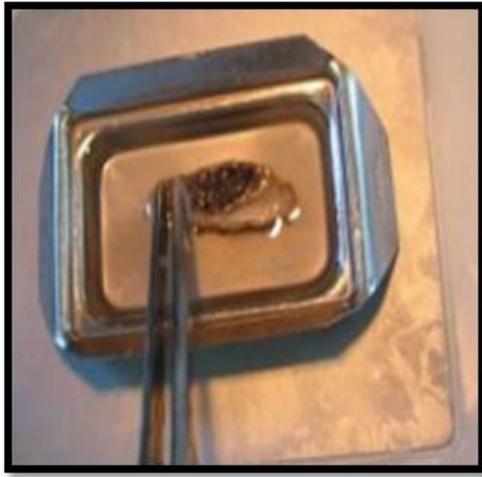
**Figure 13 :** Batterie de déshydratation.

### **2.3.2.3. Imprégnation à la paraffine**

Les ovaires récupérés du dernier bain de xylène sont immergés dans deux bains de la paraffine solubilisée à 60°.

### **2.3.2.4. Confection des blocs de paraffine**

Les prélèvements imprégnés sont coulés dans un moule contenant de la paraffine fondue, par la suite une autre quantité de paraffine est rajoutée à travers les grilles de la cassette. Après refroidissement, un bloc de paraffine dur est obtenu (**Fig. 15**).



Immobilisation du tissu sur une plaque réfrigérée.



une quantité de paraffine est ajoutée au-dessus de la cassette.



Démoulage du bloc de paraffine



Bloc de paraffine renferme l'ovaire

**Figure 15 :** Etapes de confection des blocs de paraffine.

### **2.3.2.5. Coupe au microtome et étalement des coupes de paraffine**

Après la confection des blocs, les prélèvements sont coupés au microtome (**Fig. 16**) avec une épaisseur de coupe de 5  $\mu\text{m}$ . pour obtenir un ruban.

Le ruban est déposé délicatement dans un bain- marie réglé à 42°C pour déplier la paraffine, les coupes sont récupérées sur des lames silanisées de type « Superfrost plus » pour être utilisé en immunohistochimie (**Fig. 17**). 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. Et enfin, les lames sont séchées à l'étuve (60°C) pendant 2 heures pour l'immunohistochimie.



**Figure 16 :** Coupe au microtome



Ruban dans le bain-marie



Récupération de la coupe avec la lame porte objet

**Figure 17 :** Etapes de récupération de la coupe sur une lame silanisée.

Les lames confectionnées sont séchées par la suite dans une étuve à 60°C pendant 2 heures.

Ces lames blanches sont utilisées par la suite pour la 2<sup>ème</sup> étape de la technique d'immunohistochimie proprement dite.

### **2.3.6. Etapes de la technique d'immunohistochimie**

#### **2.3.6.1. Déparaffinage et hydratation**

Les lames blanches sont déparaffinées complètement dans deux bains de xylène puis hydratées graduellement dans des bains d'alcool à concentration décroissantes (100° ; 95° ; 70°), le dernier bain est l'eau distillée (**Fig. 18**).



Coupes des ovaires kystiques droits pour évaluer les récepteurs de progestérone.



Porte lame.



Les lames sont placées dans l'étuve pendant 24h à 37° afin d'éliminer l'excès de la paraffine.



Les bains pour déparaffinage



Premier bain pour déparaffinage pendant 10 min



Deuxième bain de déparaffinage pendant 10 min



Le bain d'alcool à 96° pendant 5min.



Le bain d'alcool à 70° pendant 1min



l'eau courante

**Figure 18 :** Etapes de déparaffinage et la réhydratation des lames.

## 2.4. Protocole de la technique immunohistochimie

Après l'hydratation de la coupe, on va rincer avec PBS. L'excès de PBS est enlevé par égouttage des lames sur du papier absorbant. Les différentes étapes sont les suivantes :

- Démasquage des sites antigéniques avec une solution tampon citratée (pH = 6) au bain marie pendant 40 min à 97°C (**Fig. 19**).

- Rinçage PBS (x2) (**Fig. 20**).



**Figure 19** : Solution de démasquage au bain-marie.

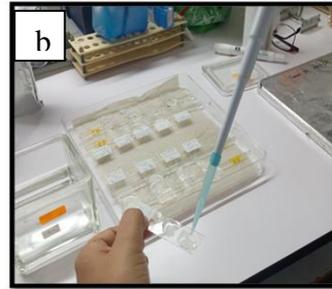


**Figure 20** : Rinçage des lames au PBS

- Blocage des peroxydases endogènes par un mélange PBS+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3% pendant 5min. Puis rinçage PBS (x2) (**Fig. 21**).



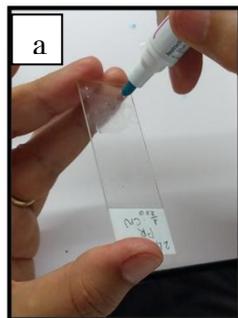
Bac de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3%



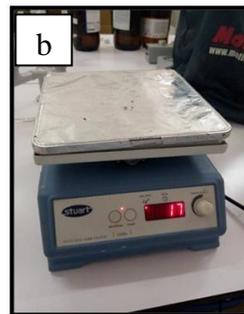
Rinçage de l'échantillon au PBS deux fois

**Figure 21** : Blocage des peroxydases endogènes (a) et rinçage au PBS (b).

- Les coupes sont entourées avec une résine hydrophobe (Dako-pen) et placées dans une chambre humide sur un agitateur va et vient (**Fig. 22**).



Coupes entourées par résine hydrophobe.

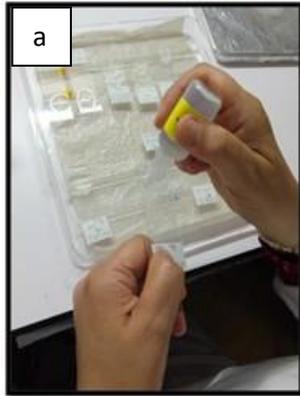


Chambre humide sur un agitateur va et vient.

**Figure 22** : Application de la résine hydrophobe (a) et chambre humide sur un agitateur (b)

- Blocage des sites non spécifiques avec du sérum de cheval (réactif jaune du kit Vectastain).

- Incubation des coupes pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-récepteurs aux progestérones monoclonal (PR (AB-52) : sc-810) produit chez la souris, dilué au 1/50 et 1/ 200.
- Sur certaines coupes, l'anticorps primaire est remplacé par le sérum de cheval ; ces coupes sont utilisées comme des contrôles négatifs (**Fig. 23**).
- Rinçage PBS (x2).



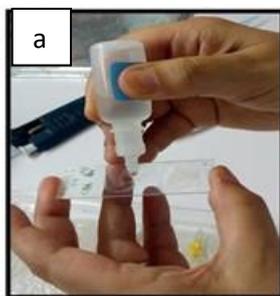
On ajoute le sérum de cheval



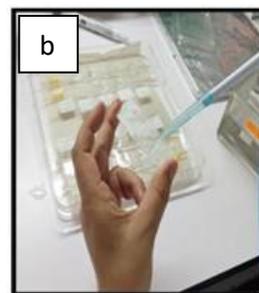
Rinçage au PBS deux fois

**Figure 23 :** Blocage des sites non spécifiques avec du sérum de cheval (a) et rinçage au PBS(b).

- Application d'un anticorps secondaire anti-souris biotinylé (réactif bleu du kit Vectastain), produit chez le cheval, pendant 30 min à température ambiante (**Fig. 24**).
- Rinçage PBS (x2).



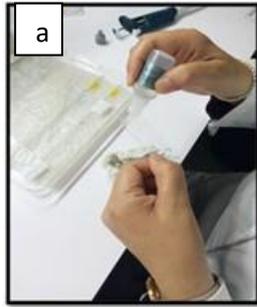
On ajoute l'anticorps  
Secondaire biotinylé  
Pendant 30 min



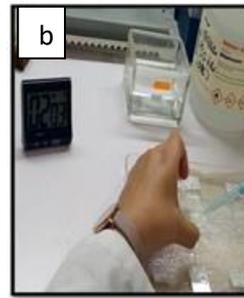
Rinçage au PBS deux fois

**Figure 24 :** Application d'un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (a) et rinçage au PBS.

- Application du complexe Streptavidine-Peroxydase (Réactifs gris du kit Vectastain) pendant 30 min à température ambiante (**Fig. 25**).
- Rinçage PBS (x2).



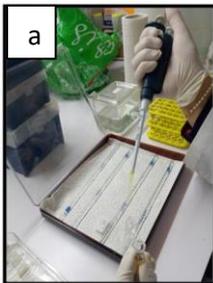
On ajoute vectastain  
Elite ABC reagent.



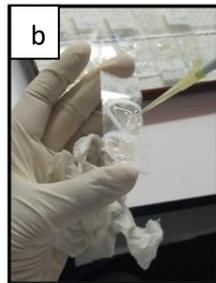
Rinçage au PBS deux fois.

**Figure 25 :** Application du complexe Streptavidine-Peroxydase (a) et rinçages au PBS (b) .

- Le chromogène utilisé (DAB) est déposé sur les différentes coupes et le contrôle de l'immunomarquage est réalisé sous microscope photonique (**Fig. 26**).
- Rinçage à l'eau distillée.



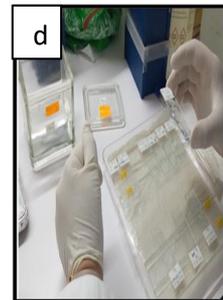
Ajouter du DAB sur  
différentes coupes.



Rinçage des lames  
par PBS



On observe une  
coloration marronne  
apparaître sur les  
coupes



Rinçage par eau  
distillée.

**Figure 26 :** Application du DAB sur les coupes (a) puis rinçage par PBS (b) et coloration des lames (c) rinçage par eau distillée (d).

- Contre coloration à l'hématoxyline (**Fig. 27**).



Coloration des lames  
par hématoxyline

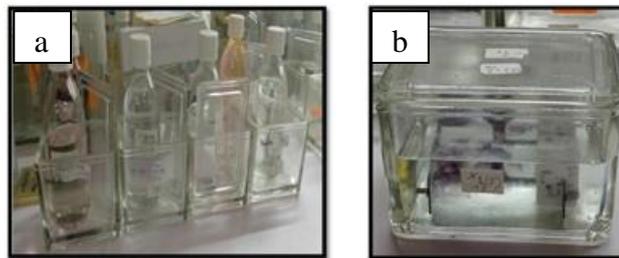
**Figure 27 :** Contre coloration par l'hématoxyline.

- Rinçage à l'eau du robinet (c'est le pH alcalin de l'eau du robinet qui fait bleuir l'hématoxyline) (**Fig. 28**).



**Figure 28** : Rinçage par l'eau de robinet.

- Déshydratation des lames dans des bains d'alcool à concentration croissante (70, 96 et 100°) et éclaircit dans le xylène (**Fig.29**).



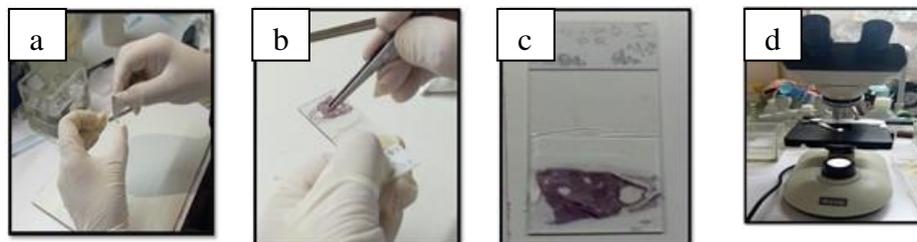
Les bains d'alcool  
: 70°-96°-100°

Eclaircissement des  
coupes dans le  
xylène

**Figure 29** : Batterie de déshydratation (a) et éclaircissement (b).

- Montage des lamelles avec une goutte de liquide de montage « Eukitt ».

Les lames montées sont séchées à l'air libre puis observées au microscope photonique (**Fig. 30**).



EUKITT

Microscope  
photonique

**Figure 30** : Montage des lames par eukitt sur des lamelles (a ; b ; c) et observation par microscope photonique (d).

# Chapitre III

## Résultats et discussion

Pour déterminer les étapes à réaliser pour mettre en évidence l'immunomarquage des récepteurs à la progestérone, une synthèse a été réalisée à partir de 05 articles scientifiques utilisant cette technique d'immunohistochimie sur des prélèvements d'ovaire (**Tab. 1**). 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-RP.

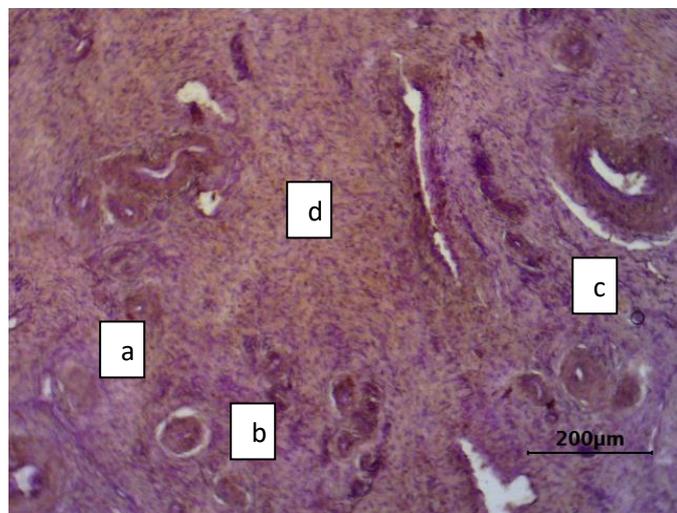
**Tableau 1:** Synthèse bibliographique sur les étapes de la technique d'immunohistochimie

Références	Démasquage des sites antigéniques	Blocage des peroxydases endogènes par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Anticorps primaires (Ac) anti-RP	Blocage des sites non spécifiques
Vermeirsh et al. (2001)	- Citrate de sodium (pH=6) -Micro-onde	-	- monoclonal de souris	Solution de sérum de chèvre normal pour 30 min
Teilmann et al. (2006)	- Tampon citrate (pH=6) contient 5% de PBS et 1% BSA - 15 min	-	- monoclonal de lapin (1:300). - monoclonal de souris (1:300).	- Sérum de chèvre - 30 min
Luciano et al. (2011)	-	- 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans éthanol - pendant 30 min	polyclonal de lapin anti-PGRMC1 dilué dans 1% de PBS et 0,3% de BSA	-0,3% sérum normal de lapin -30 min
Abed-Elkareem (2017)	- Tampon citrate de sodium à 10Mm (pH=6) -bain-marie - 20 min	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - pendant 10min.	Monoclonal de lapin	
Duarte-Méndez et al (2018)	- Solution de tris 0,1M	-	Monoclonal de souris (alpha RP-22)	-

Les différentes étapes diffèrent d'un auteur à un autre (**Tab. 1**), 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.

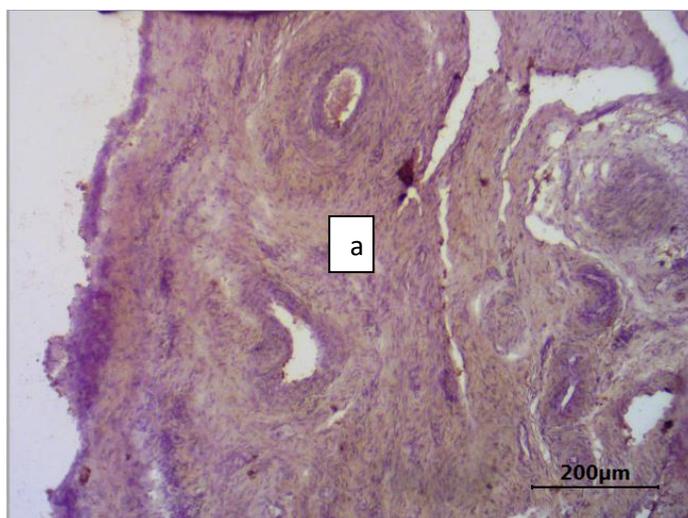
Nos résultats préliminaires révèlent la présence de l'immunomarquage des RP au niveau des follicules primaires et des follicules secondaires et aussi au niveau du tissu conjonctif du stroma ovarien, avec une dilution de l'anticorps anti-RP au 1/50 (**Fig. 31**).



a : Follicule primordiale ; b : Follicule secondaire ; c : Follicule tertiaire ; d : Stroma ovarien.

**Figure 31** : Immunolocalisation des récepteurs à la progestérone avec une dilution au 1/50 de l'anticorps anti-récepteurs à la progestérone au niveau de l'ovaire kystique de la vache. Barre d'échelle : 200µm ; grossissement x10.

Par contre avec une dilution au 1/200, les résultats du test de dilution de l'anti-RP ne montrent aucun immunomarquage des RP au niveau des follicules ovariens alors que le stroma ovarien est marqué (Fig. 32).



a : Stroma ovarien.

**Figure 32** : Immunolocalisation des récepteurs à la progestérone avec une dilution au 1/200 de l'anticorps anti-récepteurs à la progestérone au niveau de l'ovaire kystique de la vache. Barre d'échelle 200 µm ; grossissement x10.

Les résultats préliminaires obtenus sont discutés par rapport aux données bibliographiques existantes (**Tab. 2**).

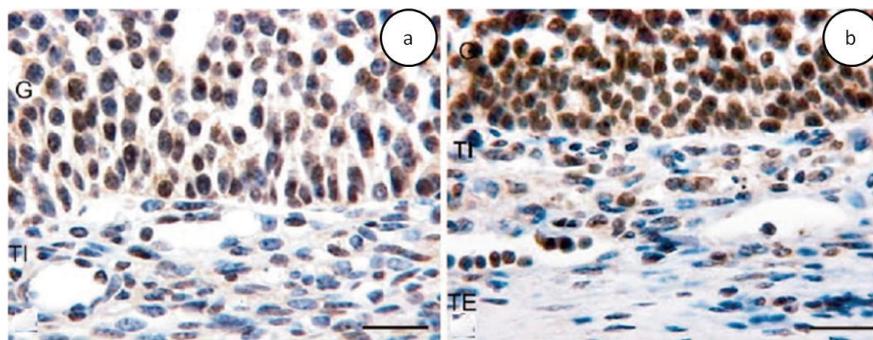
Par comparaison aux résultats des autres auteurs (Tab. 2), nos résultats sont comparables aux travaux rapportés par Salvetti et al (2007 et 2012) chez la même espèce. L'immunomarquage des RP est observé au niveau de l'ensemble des follicules des ovaires kystiques.

**Tableau 2** : Synthèse bibliographique sur la localisation des récepteurs de la progestérone.

Références	Espèces	Localisation des récepteurs de la progestérone au niveau de l'ovaire
Résultats personnelles	Vache	-Follicule -secondaire et tertiaire
Vermeirsh et al. (2001)	Chienne	- Différents groupes de cellules ovariennes canines. - Follicules tertiaire canine - Corps jaune.
Teilmann et al. (2006)	Humain et Souris	- Cellule de follicule et de la granulosa - Cellules du follicule et du cumulus granulosa. - Cytoplasme et membrane plasmique.

Salvetti et al (2012)	Vache	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Noyau et le cytoplasme des cellules de la granulosa.</li> <li>- Intensité maximale de marquage dans le cytoplasme des follicules tertiaires.</li> <li>- Intensité plus faible dans les cellules des thèques est inférieure par rapport aux cellules des granulosa.</li> </ul>
Abed-Elkareem (2017)	Lapine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellules épithéliales de la surface de l'ovaire.</li> <li>- Cellules du stroma et du granulosa.</li> <li>- Cellules de la thèque interne des follicules pré-ovulatoires.</li> <li>- Cellules endothéliales des vaisseaux sanguins médullaires.</li> <li>- Granulosa des follicules en croissance</li> <li>- Cellules de la granulosa et de la thèque interne du follicule de Graaf mature.</li> <li>- Cellules de la thèque interne en prolifération.</li> <li>- Follicule antral atrétique.</li> </ul>

Chez la vache, Salvetti et al, (2007) ont rapporté que le RP est observé dans le noyau des différents types des cellules ovariennes à savoir les cellules de la granulosa, de deux thèque interne et externe des follicules secondaires, tertiaires, atrétiques et les follicules kystiques. Un immunomarquage diffus dans le cytoplasme des cellules de la granulosa des ovaires normaux et kystiques. L'expression des RP est faible dans les cellules de la granulosa des follicules atrétiques des ovaires kystiques et ovaires normaux que dans les follicules tertiaires des ovaires normaux (**Fig. 33**)

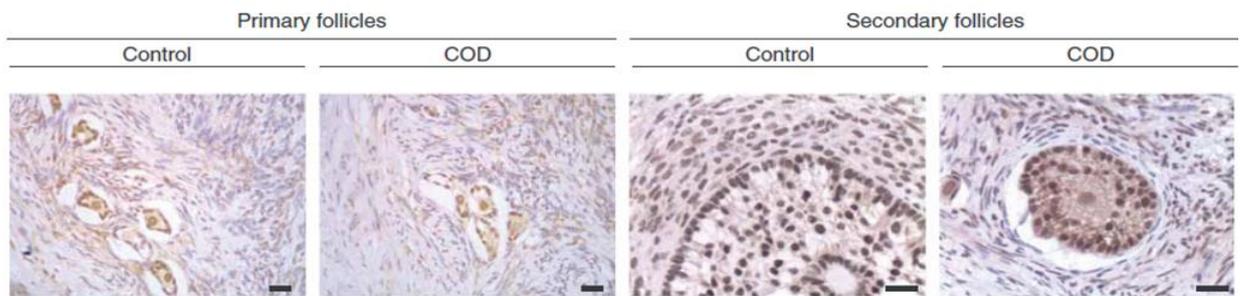


G : granulosa ; TI : Thèque inter ; TE : Thèque externe.

**Figure 33** : Immunolocalisation des récepteurs de la progestérone au niveau des follicules tertiaires normaux (a) et follicules tertiaires des ovaires kystiques (b). Barre d'échelle : 25 µm (Salvetti et al, 2007).

Les mêmes auteurs (Salvetti et al, 2012) et chez la même espèce, la vache, ont rapporté la détection des RP dans l'épithélium germinale, les cellules de la granulosa, les cellules thèque et l'ovocyte à tous les stades de la folliculogénèse chez les vaches contrôles et chez les vaches avec kystes ovarien induit par une injection d'ACTH (**Fig. 34**). RP sont observés à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules de la granulosa. L'intensité maximale de marquage est observée dans le cytoplasme des follicules tertiaires. L'expression des RP est plus faible dans la couche cellulaire de la granulosa des follicules kystiques du

follicule tertiaire. Le niveau de l'immunocoloration dans les cellules des thèques est inférieur à cela des cellules des granulosa (**Fig. 34**).



**Figure 34** : Immunoexpression du récepteur à la progestérone chez les animaux cyclés et chez les animaux ayant un kyste ovarien induit par ACTH. Barre d'échelle : 20µm

(Salveti et al, 2012).

La progestérone agit localement pour réguler la prolifération et développement de la granulosa lutéinisée et des cellules thécales (Sassano and Suzuki, 1997). Chez les primates, il y a des variations dans l'expression de RP dans les corps jaunes et l'intensité la plus élevée est rapportée au milieu de la phase lutéale (Misao et al. , 1998).

### **3. Conclusion**

L'ovaire kystique constitue l'un des principaux facteurs majeurs affectant la fertilité des vaches laitières en raison de leurs effets défavorables sur performances la reproduction engendrant des pertes économiques à l'élevage. De nombreux facteurs peuvent intervenir dans la formation des kystes en particulier le déséquilibre hormonal. L'immunolocalisation des récepteurs de la progestérone sont observés au niveau des follicules primaires et secondaires et aussi au niveau du tissu conjonctif du stroma ovarien.

#### **4. Recommandation**

Ce travail mérite d'être complété par d'autres testes pour mettre en evidence la concentration optimale de l'anti-corps.

## 5. Références bibliographiques

1. Abd-Elkareem, M., Cell-specific immuno-localization of progesterone receptor alpha in the rabbit ovary during pregnancy and after parturition. *Anim Reprod Sci* 180, 2017. 100-120.
2. Al-Dahash, S., David, J., The incidence of ovarian activity, pregnancy and bovine genital abnormalities shown by an abattoir survey. *The Veterinary record* 101, 1977. 296-299.
3. Andersen, A.C., Simpson, M.E., The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). 1973.
4. Barone, R., Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4, Splanchnologie II Appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Vigot, Paris, 1990.
5. 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, 1986. Vol. 4.
6. Bercovici, J.-P., La réceptivité aux stéroïdes sexuels: Aspects physiopathologiques, 1983. Vol. 4.
7. Bierschwal, C., A clinical study of cystic conditions of the bovine ovary. *J Am Vet Med Assoc* 149, 1966. 1591-1595.
8. Bierschwal, C., Garverick, H., Martin, C., Youngquist, R., Cantley, T., Brown, M., Clinical response of dairy cows with ovarian cysts to GnRH. *Journal of Animal Science* 41, 1975. 1660-1665.
9. Brock, B.J., Waterman, M.R., "Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species." *Biochemistry* 38(5): 1598-1606., 1999.
10. Budras, Klaus-Dieter, Habel, E., R., Bovine anatomy : an illustrated text. Schlütersche, Hannover, Germany, 2003.
11. Cairolì, F., Vigo, D., Battocchio, M., Faustini, M., Veronesi, M., Maffeo, G., 17 $\beta$ -Estradiol, Progesterone and Testosterone Concentrations in Cystic Fluids and Response to GnRH Treatment after Emptying of Ovarian Cysts in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 2002. 294-298.

12. Carroll, D., Pierson, R., Hauser, E., Grummer, R., Combs, D., Variability of ovarian structures and plasma progesterone profiles in dairy cows with ovarian cysts. *Theriogenology* 34, 1990. 349-370.
13. Cheung J., D.F., S., Molecular chaperone interactions with steroid receptors: An update. *Mol. Endocrinol.* 2000;14:939–946.
14. Cruz, C., Corbellini, L., Driemeier, D., Simple procedure for emptying long-term ovarian cysts in cattle. *The Veterinary record* 155, 2004. 599-601.
15. Cuq, P., Agba, K., Les organes génitaux de la femelle Zébu. In, *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, Vol. 28, City, 1975,pp. 331-403.
16. Day, N., The diagnosis, differentiation and pathogenesis of COD. *Veterinary Medical*, 1991. 86, 753-760.
17. Derivaux, Ectors, F., *Physiopathologie de la gestation et obstétrique vétérinaire .Point Vétérinaire*,Maison Alfort, 1980.
18. Douthwaite, R., Dobson, H., Comparison of different methods of diagnosis of cystic ovarian disease in cattle and an assessment of its treatment with a progesterone-releasing intravaginal device. *Veterinary Record* 147, 2000. 355-359.
19. Duarte-Méndez, M., Quintero-Silva, J., Ramírez-Pinilla, M.P., Immunohistochemical localization of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and progesterone receptors in the ovary and placenta during gestation of the placentotrophic lizard *Mabuya* sp (Squamata: Scincidae). *General and comparative endocrinology* 261, 2018. 136-147.
20. Farin, P., Youngquist, R., Parfet, J., Garverick, H., Diagnosis of luteal and follicular ovarian cysts by palpation per rectum and linear-array ultrasonography in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200, 1992. 1085-1089.
21. Ferney, J., Séré, A., La synchronisation de l'oestrus chez les ruminants. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 26, 1973. 61a-69a.
22. Fortune, J., Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* 50, 1994. 225-232.
23. Gervaise, A., Fernandez, H., Le drilling ovarien dans le traitement des ovaires polykystiques. *Gynécologie obstétrique & fertilité* 33, 2005. 713-717.
24. Glass, C.K., Rosenfeld, M.G.The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.*Genes & development*,2000,14,121-141.
25. Grimm, S.L., Hartig, S.M., Edwards, D.P., Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol* 428, 2016. 3831-3849.

26. Hanzen, C., Bascon, F., Theron, L., Lopéz-Gatius, F., Les kystes ovariens dans l'espèce bovine. 2. Rappels physiologiques et étio-pathogénie. In: Annales de Médecine Vétérinaire, 2008, pp. 17-34.
27. Hanzen, C., Bascon, F., Theron, L., Lopez Gatius, F., Les kystes ovariens dans l'espèce bovine. 1. Définitions, symptômes et diagnostic. In: Annales de Médecine Vétérinaire, 2007, pp. 247-256.
28. Heyman, Y., Moment de la transplantation et succes de la gestation chez les mammiferes. *Reproduction Nutrition Développement* 28, 1988. 1773-1780.
29. Hild-Petito, S., Stouffer, R.L., Brenner, R.M., Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 123, 1988. 2896-2905.
30. Kesler, D.J., Garverick, H.A., Ovarian Cysts in Dairy Cattle: a Review. *Journal of Animal Science* 55, 1982. 1147-1159.
31. Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal*, 1990, 9, 1603-1614.
32. Landschulz, K.T., R. K. Pathak, A. Rigotti, M.K., Hobbs, H.H., "Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat." *J Clin Invest* 98(4): 984-995., 1996.
33. Larsen, P., Davies, T., Hay, L., The thyroid gland. *Williams textbook of endocrinology* (Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds), 1998.
34. 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* 58, 2002. 1623-1632.
35. Luciano, A.M., Corbani, D., Lodde, V., Tessaro, I., Franciosi, F., Peluso, J.J., Modina, S., Expression of progesterone receptor membrane component-1 in bovine reproductive system during estrous cycle. *Eur J Histochem* 55, 2011. e27.
36. Misao, R., Nakanishi, Y., Iwagaki, S., Fujimoto, J., Tamaya, T., Expression of progesterone receptor isoforms in corpora lutea of human subjects: correlation with serum oestrogen and progesterone concentrations. *Molecular human reproduction* 4, 1998. 1045-1052.
37. Niswender, G., Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80, 2000. 1-29.

38. Nuttinck, F., Mermillod, P., Massip, A., Dessy, F., Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology* 39, 1993. 811-821.
39. Orsi, N., Baskind, N., Cummings, M., Anatomy, Development, Histology, and Normal Function of the Ovary. *Pathology of the Ovary, Fallopian Tube and Peritoneum, Essentials of Diagnostic Gynecological Pathology.*, 2014.
40. Pascual, M.A., Hereter, L., Tresserra, F., Carreras, O., Ubeda, A., Dexeus, S. Transvaginal sonographic appearance of functional ovarian cysts. 1997.12.
41. Rekawiecki, R., Dobrzyn, K., Kotwica, J., Kowalik, M.K., Progesterone Receptor Coregulators as Factors Supporting the Function of the Corpus Luteum in Cows. *Genes* 11, 2020. 923.
42. Revelli, A., Paahioni, D., Cassoni, P., Bussolati, G., Massobrio, M., In situ hybridization study of messenger RNA for estrogen receptor and immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human ovary. *Gynecological Endocrinology* 10, 1996. 177-186.
43. Ribadu, A.Y., Ward, W.R., Dobson, H., Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *The Veterinary record* 135, 1994. 452-457.
44. Roberts, S.J., *Veterinary obstetrics and genital diseases.* Edwards Brothers. Inc., Ann Arbor, Michigan, 1971. 308-313.
45. Roberts, S.J., *Veterinary obstetrics and genital diseases.* *Theriogenology*, 1986.
46. Salvetti, N.R., Alfaro, N.S., Velázquez, M.M.L., Amweg, A.N., Matiller, V., Díaz, P.U., Ortega, H.H., Alteration in localization of steroid hormone receptors and coregulatory proteins in follicles from cows with induced ovarian follicular cysts. *reproduction* 144, 2012. 723-735.
47. Salvetti, N.R., Acosta, J.C., Gimeno, E.J., Müller, L.A., Mazzini, R.A., Taboada, A.F., Ortega, H.H. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Vet Pathol*, 2007, 44, 373-378.
48. Sanders, M.M., MIDGLEY JR, R.A., Cyclic nucleotides can induce luteinizing hormone receptor in cultured granulosa cells. In, *Endocrinology*, Vol. 112, City, 1983, pp. 1382-1388.
49. Sylvie, C.-M., Intérêt de l'échographie des kystes ovariens. *Le Point Vétérinaire*, 2010. 49.

50. Teilmann, S.C., Clement, C.A., Thorup, J., Byskov, A.G., Christensen, S.T., Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. *Journal of Endocrinology* 191, 2006. 525-535.
51. Tyler, J.K., Kadonaga, J.T., The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell* 99, 1999. 443-446.
52. Uribe, H., Kennedy, B., Martin, S., Kelton, D., Genetic parameters for common health disorders of holstein cows. *Journal of dairy science* 78, 1995. 421-430.
53. Vaissaire, J.P., 1977. Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Paris : Masson S.A., 1977 : 466 p.
54. Vanholder, T., Opsomer, G., De Kruif, A., Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reproduction nutrition development* 46, 2006. 105-119.
55. Vermeirsch, H., Simoens, P., Coryn, M., Van den Broeck, W., Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE* 122, 2001. 73-83.
56. Wattiaux, M, Chapitre I, système de reproduction du bétail laitier, guide technique laitier, reproduction et sélection génétique. In, Vol. 49, , université de Wisconsin à madison, institue de Babcock pour la recherche et le développement international, 2006. p. pp. 348-356.
57. Webb, R., Lamming, G., Haynes, N., Foxcroft, G., Plasma progesterone and gonadotrophin concentrations and ovarian activity in post-partum dairy cows. *Reproduction* 59, 1980. 133-143.
58. Wiltbank, M., Gümen, A., Sartori, R., Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57, 2002. 21-52.
59. Xu L, Glass C.K, Rosenfeld M.G, Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999;9:140–147.
60. Youngquist, R., Braun, J., WF, Management of infertility in the cow. *Journal of the American Veterinary Medical Association (USA)*, 1986.