



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



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 du marqueur de prolifération (Ki-67)
au niveau des ovaires polykystiques chez la vache**

Présenté par :

HAMADOU Sara et KHEDIM Nour El Houda

Devant le Jury : 18/07/2021

<i>M. Zatra Y.</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>M. Boukenaoui-Ferrouk N.</i>	<i>MCA</i>	<i>ISV, Blida1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M. Ferrouk M.</i>	<i>MCA</i>	<i>ISV, Blida1</i>	<i>Co-Promoteur</i>

Session 2020 / 2021

REMERCIEMENTS

On exprime nos reconnaissances à Mme Boukenaoui-Ferrouk N. Maître de conférences « A » à l'université de Blida -1- qui a accepté d'être notre promotrice et qui a parfaitement dirigée notre travail avec une grande efficacité. Nous la remercions pour sa disponibilité permanente au cours de ces mois. Pour cela, nous lui exprimons toutes nos gratitude.

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

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail,

A mes chers parents

Mon Père. Aujourd'hui plus que jamais, j'apprécie la valeur de tes efforts, la justesse de ton éducation et le caractère précieux de tes conseils. Papa tu resteras pour moi un exemple ; mieux je dirai que tout enfant souhaitera t'avoir comme père. Recevez ici Papa toute ma reconnaissance et tout mon respect.

Ma Mère. J'ai du mal à avoir les mots nécessaires pour parler de toi. Ce travail est le fruit de tes nombreux sacrifices, de tes multiples souffrances pour mon éducation mais aussi un fruit de tes bénédictions. Maman je te dois tout dans cette vie, trouve ici tout l'amour et l'admiration que j'ai pour.

A mon cher frère Je te dédie ce travail en témoignage de mon amour, mon respect et ma reconnaissance. Je te souhaite une vie pleine de bonheur.

A ma chère sœur *En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour toi. Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et succès.*

A tous mes amis et mes collègues sans exception.

A mes encadrateurs et aux membres du jury

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

A toute personne qui a une place dans mon cœur, que je connais, que j'estime et que j'aime. A vous tous,

Merci...

HAMADOU Sara

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes très chers parents pour leur soutien moral et leurs sacrifices le long de ma formation.

A ma mère qui m'a encouragé pendant toutes mes études.

A mon père, qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider, je lui confirme mon profond respect, mes chers frères et sœurs

A tous mes amis et mes collègues sans exception.

A mes encadrateurs et aux membres du jury

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

A toute personne qui a une place dans mon cœur, que je connais, que j'estime et que j'aime.

A vous tous,

Merci...

KHEDIM Nour El Houda

Sommaire

Remercîments.....	i
Dédicace	ii
Résumé.....	iii
Liste des figures	iv
Introduction.....	1

Chapitre I : Données bibliographiques

.....	1
I. Description anatomo-histologique des ovaires	4
I.1. Histologie de l’ovaire	4
I.1.1. Médulla ovarienne.....	4
I.1.2. Cortex ovarien.....	5
I.1.2.1. Follicule primordial.....	5
I.1.2.2. Follicule primaire.....	6
I.1.2.3. Follicule secondaire	6
I.1.2.4. Follicule tertiaire	6
I.1.2.5. Follicule de De Graaf.....	6
I.1.2.6. Corps jaune.....	7
I.1.2.7. Follicules atrétiques	7
II. Evolution des follicules ovariens au cours du cycle œstral	7
III. Changement morphologique des follicules au cours du cycle œstral.....	8
V. Kyste ovarien	10
V.1 Définition	10
V.2. Types du kyste ovarien	10
V.2.1. Kyste folliculaire	10
V.2.2. Kyste lutéal	10
V.3. Conséquences	10
VI. Facteurs affectant l’incidence des pathologies à kyste ovarien.....	11
VII. Symptômes et diagnostic	11

Marqueur de prolifération cellulaire Ki-67

I. Historique.....	13
II. Biologie du marqueur de prolifération Ki-67	13

II.1 Définition.....	13
II.2. Caractéristiques du Ki-67	14
III. Utilisation comme marqueur de prolifération	14
IV. Localisation du Ki-67 dépend du cycle cellulaire	16
V. Relation entre le Ki-67 et la prolifération des cellules	17
VI. Détermination immunohistochimique de Ki-67	18
I. Modèle animal.....	21
II. Protocole expérimentale	21
III. Protocole de la technique d’histologie.....	22
III.1. Fixation	22
III.2. Déshydratation et substitution (éclaircissement).....	22
III.3. Inclusion.....	23
III.4. Confection des blocs de paraffine	24
III.5. Réalisation et étalement des coupes	25
IV. Immunohistochimie pour la mise en évidence le marqueur de prolifération cellulaire (Ki-67)	26
IV.1. Principe	26
IV.2. Protocole d’immunohistochimie	27
IV.3. Validité de la technique d’immunohistochimie.....	33
Chapitre III : Résultats et discussion	
Conclusion.....	42
Références Bibliographiques.....	43

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique d'un ovaire de la vache. (a) vue externe et (b) coupe longitudinale (Budras et al., 2003).....	4
Figure 2 : Représentation schématique de la structure d'un ovaire chez la vache (König et al., 2007).....	5
Figure 3 : Représentation schématique des différentes structures de l'ovaire (Marieb and Hoehn, 2001).	6
Figure 4 : Ovaire en vue externe (a) et en coupe longitudinale (b) au stade metœstrus chez la vache (Aouf and Mahi, 2020).....	8
Figure 5 : Ovaire en vue externe (a) et en coupe longitudinale (b) au stade proœstrus chez la vache (Aouf and Mahi, 2020).....	9
Figure 6 : Ovaire en vue externe (a) et en coupe longitudinale (b) au stade dioœstrus chez la vache (Aouf and Mahi, 2020).	9
Figure 7 : Examen échographique des différents types de kystes ovariens(Mimoune et al., 2021).....	12
Figure 8 : Localisation dépendante du cycle cellulaire de la protéine Ki-67 (Kill, 1996). 16	16
Figure 9 : Localisation dépendante du cycle cellulaire de la protéine Ki-67(El Benna et al., 2015).....	17
Figure 10: Détermination immunohistochimique de Ki-67 à l'aide de l'anticorps Mib-1 dans un échantillon de carcinome du sein à prolifération élevée (A) et faible (B)(Urruticoechea et al., 2005).	19
Figure 11 : Etapes d'analyse d'un appareil génital de la femelle.	21
Figure 12: Batteries de bains d'alcool (a,b,c) de concentrations croissantes(70%-96%-100%) et de xylène (d).	23
Figure 13: Cassette déshydratés immergée dans des différents bains de paraffine chauffée à 56°c (a b c d).	24
Figure 14 : Etapes de confection des blocs de paraffines. a) Remplissage du moule métallique. b) Mise en place de l'ensemble moule-cassette sur un bain de glace.	24
Figure 15 : Reportage des références des cassettes sur les lames d'histologie à l'aide d'un crayon (a,b,c).	25
Figure 16 : Coupe au microtome. (a b) : Le dégrossissage s'effectue avec la surface du bloc de paraffine parallèle au plan de coupe. c : Les blocs de paraffine sont solidement fixés sur le porte échantillon du microtome (permet de faire des coupes de 1 à 5 u m d'épaisseur) par l'intermédiaire de la cassette.	25
Figure 17: Etalement des coupes et récupération des rubans sur des lames silanisées (a b c) : Mettre dans l'eau pour pouvoir se déplier et s'étaler puis déposer à plat sur une lame. d) : Séchage des lames dans l'étuve.	26
Figure 18: Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie.	27
Figure 19: Déparaffinisation et hydratation dans xylène (1 et 2).(a b), puis dans l'alcool décroissant (100%,95%,70%) (c).....	27

Figure 20: Démasquage antigéniques à température 98°C (a,b).	28
Figure 21: Rinçage PBS (x2) pendant 5 min.	28
Figure 22: Blocage des peroxydases endogènes.	28
Figure 23 : L'entourage des échantillons avec la résine hydrophobe. (a,b) : Entouré les coupes par la résine hydrophobe, c : Agitation des lames avec un agitateur.	29
Figure 24: Blocage des sites non spécifiques avec du sérum de cheval.	29
Figure 25: Rinçage PBS (x2).	29
Figure 26: Application d'un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (a,b).	30
Figure 27: Application du complexe Streptavidine-Peroxydase.	30
Figure 28: Le dépôt du chromogène (DAB) sur les différentes coupes (a b) et le contrôle de l'immunomarquage est réalisé sous microscope photonique (c).	31
Figure 29: Rinçage à l'eau distillée.	31
Figure 30: Contre coloration à l'hématoxyline (a,b).	31
Figure 31: Rinçage à l'eau du robinet.	32
Figure 32: Déshydratation des lames dans des bains d'alcool à concentration croissante (alcool 70°, 95°,100°)(a,b), puis dans xylène (c).	32
Figure 33: Montage des lamelles avec une goutte de liquide de montage « Eukitt ».	32
Figure 34: Etapes de la technique d'immunohistochimie.	33
Figure 35: Localisation immunohistochimique de Ki-67 au niveau des cellules thécales d'un follicule secondaire d'un ovaire. polykystique chez la vache 1/50 x4.	37
Figure 36: Localisation immunohistochimique de ki 67 au niveau des cellules de granulosa 1/50 x10.	38
Figure 37: L'immunolocalisation de l'anticorps anti-PCNA dans les follicules sains (a) et kystiques (b). G : Granuleuse ; TI : Thèque interne. Barre d'échelle = 50 µm (Isobe and Yoshimura, 2007).	40
Figure 38: Localisation de Ki-67 par immunohistochimie (Salveti et al., 2009).	40
Figure 39 : Localisation immunohistochimique de l'antigène nucléaire lié au cycle cellulaire (Ki-67) dans le follicule avec plus de 4 couches du granulosa. Une immunoréactivité nucléaire a été observée dans les cellules thécales (T) et granulosa (G). Barre d'échelle : 100 µm(Takayama et al., 1996).	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Synthèse bibliographique sur les étapes de la technique d'immunohistochimie réalisé sur les ovaires.....	1
Tableau 2 : Synthèse bibliographique sur la localisation du marqueur de la prolifération cellulaire (Ki-67) observé par immunohistochimie, au niveau de l'ovaire.....	2

Liste des abréviations

FSH: hormone folliculo-stimulant.

LH: Hormone lutéinisante.

F : Follicule.

CJ : corps jaune.

M : Médulla.

C : Cortex.

CCJ : Cavité du corps jaune.

KF : kyste folliculaire.

KL : kyste lutéal.

P4 : Progestérone.

MKO : maladie ovarienne kystique.

KO: kyste ovarien.

G0:Gape0.

G1:Gape1.

G2:Gape2.

S: Synthèse.

M: Mitose.

KDa: kilo Dalton

ARN: Acide Ribonucléique.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire.

ARNm: Acide Ribonucléique Messenger.

Ki67 : Ki : Kiel "67" : correspondant à la localisation du clone originel sur la plaque 96-puits.

Um : micromètre.

MIB1 : Immunologie Moléculaire Borstel.

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique

FC : centres fibrillaires.

DFC : denses composants fibrillaires.

GC : composants granulaires.

ملخص

الهدف من عملنا هو تقييم التمرکز المناعي لعلامة انتشار (Ki-67) في المبيض الكيسي في الأبقار. تظهر الأعضاء التناسلية التي تم جمعها من المسلخ في الفحص الإجمالي مبيض كيسي يتميز بقطر 29 مم. 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. تكشف نتائج المناعة الأولية عن توطين Ki-67 في خلايا theca للبصيلات الثانوية. سدى المبيض المكون من نسيج ضام لا يظهر أي علامات. في الختام، فإن إظهار Ki-67 بواسطة تقنية الكيمياء المناعية يجعل من الممكن تقييم مؤشر تكاثر الخلايا في الأنسجة النامية. يستخدم تقييم هذا المرقم الحيوي على نطاق واسع في علم الأورام.

الكلمات المفتاحية: تحديد الموقع المناعي، Ki67، الكيمياء النسيجية المناعية، تكيس المبايض، بقرة.

Résumé

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'immunolocalisation d'un marqueur de prolifération (Ki-67) au niveau des ovaires kystiques chez la vache. L'appareil génital récolté au niveau de l'abattoir présente à l'examen macroscopique un ovaire kystique caractérisé par un diamètre de 29 mm. 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 révèlent une localisation du Ki-67 au niveau des cellules de la thèque des follicules secondaires. Le stroma ovarien constitué de tissu conjonctif ne montre aucun de marquage.

En conclusion, la mise en évidence Ki-67 par la technique d'immunohistochimie, permet d'évaluer l'index de prolifération cellulaire dans les tissus en développement. L'évaluation de ce biomarqueur est largement utilisée en oncologie.

Mots clés : Marqueurs de prolifération, Ki-67, Immunohistochimie, ovaires kystiques, vache.

Introduction

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la réalisation de notre projet de fin d'étude en biotechnologie et santé. Il a été réalisé au sein du laboratoire de physiologie animale de l'institut des sciences vétérinaires de Blida 1 sous la direction de docteur Boukenaoui-Ferrouk N. et en codirection avec docteur Ferrouk M.

Au cours de la période périnatale, la fréquence des troubles de santé chez les vaches laitières est la plus élevée, les troubles de la reproduction venant en deuxième position après les maladies métaboliques, mais seront néanmoins un facteur déterminant dans l'élevage (Borowski., ,2006).

Le cycle de la reproduction chez la vache est représenté par une succession de vague folliculaire qui déroule à chaque cycle œstral (Fortune, ,1994). Dans certains cas, les follicules dominants d'une vague continuent à croître et se développe en kystes folliculaires. Ces derniers sont la cause fréquente d'infertilité mais dont la physiologie est encore mal comprise (Vanholder et al., , 2006). Les kystes peuvent persister pendant une période de temps indéterminée allant de quelques semaines à quelques mois. Ces cas pathologiques ont fait l'objet de nombreuses publications concernant ses caractéristiques cliniques et symptomatologiques (Kesler and Garverick, 1982; Hanzen, 1988; Silvia et al., 2002; Peters, 2005; Vanholder et al., , 2006) , sa pathogenèse (Woolums and Peter, 1994), et ses caractéristiques cliniques (Kesler and Garverick, 1982; Hanzen, 1988; Lopez-Diaz and Bosu, 1992; Woolums and Peter, 1994; Silvia et al., 2002), son diagnostic (Fricke, 2002) et son traitement. (Ijaz et al., 1987; Nanda, 1989; Woolums and Peter, 1994; Yaniz et al., 2004; Peters, 2005).

Le kyste ovarien est l'un des principaux facteurs affectant la fertilité dans l'élevage de bovins laitiers en raison de ses répercussions sur les performances de reproduction et l'économie du bétail,

C'est pourquoi, dans cette recherche, nous essayons de rappeler, dans une étude bibliographique, les bases de l'anatomie, de l'histologie des ovaires, puis d'étudier les différents types de kyste ovarien et pathologies liées à ce dernier suite à la détermination et quantification du marqueur de prolifération cellulaire (Ki-67) au niveau des ovaires polykystiques chez la vache et on conclut avec une partie expérimentale qui consiste à décrire le matériel animal et le protocole de la technique d'immunohistochimie à utiliser pour mettre en évidence le marqueur de prolifération cellulaire (Ki-67).

Chapitre I : Données bibliographiques

Ovaires et cycle œstral chez la vache

I. Description anatomo-histologique des ovaires

Les ovaires sont des glandes appariées qui ressemblent à des amandes légèrement aplaties latéralement et sont suspendus à la paroi dorsale de l'abdomen par le péritoine.

La surface de l'ovaire est irrégulière, bosselée par des structures folliculaires et de corps jaunes (CJ) (Fig. 1)(Cuq and Agba, 1975; Reece and Rowe, 2017) .

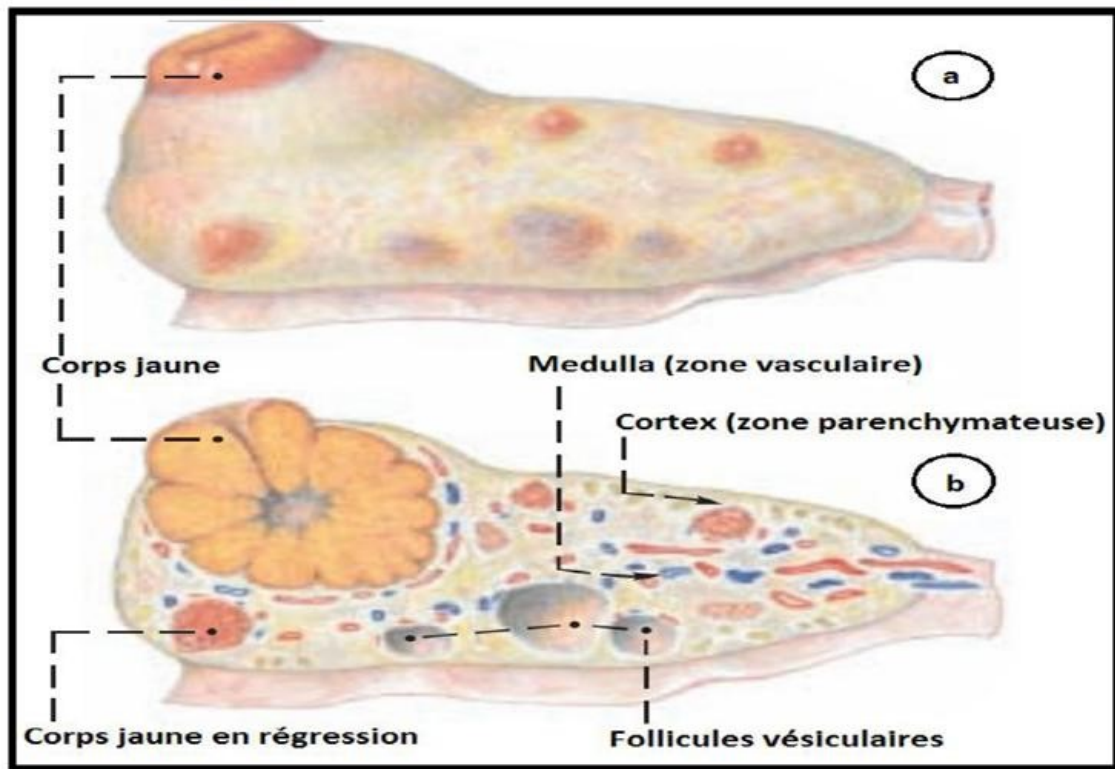


Figure 1: Représentation schématique d'un ovaire de la vache. (a) vue externe et (b) coupe longitudinale (Budras et al., 2003).

I.1. Histologie de l'ovaire

Chez les mammifères en général, l'ovaire est divisé en deux parties la médulla et le cortex ovarien.

I.1.1. Médulla ovarienne

Elle est en position centrale, richement vascularisée par des artères et des veines en lui donnant un aspect spongieux (William and Linda, 2000; Barone, 2001) .

I.1.2. Cortex ovarien

Le cortex ovarien est parsemé par de nombreux follicules aux différents stades de leurs développements (**Fig. 2**). Il est composé d'un stroma dense riche en cellules fusiformes comme des cellules musculaires lisses. Les vaisseaux sont nombreux mais très grêles, de type précapillaire ou capillaire et forment des réseaux denses autour des follicules, surtout lors de la maturation de ceux-ci (William and Linda, 2000; Barone, 2001).

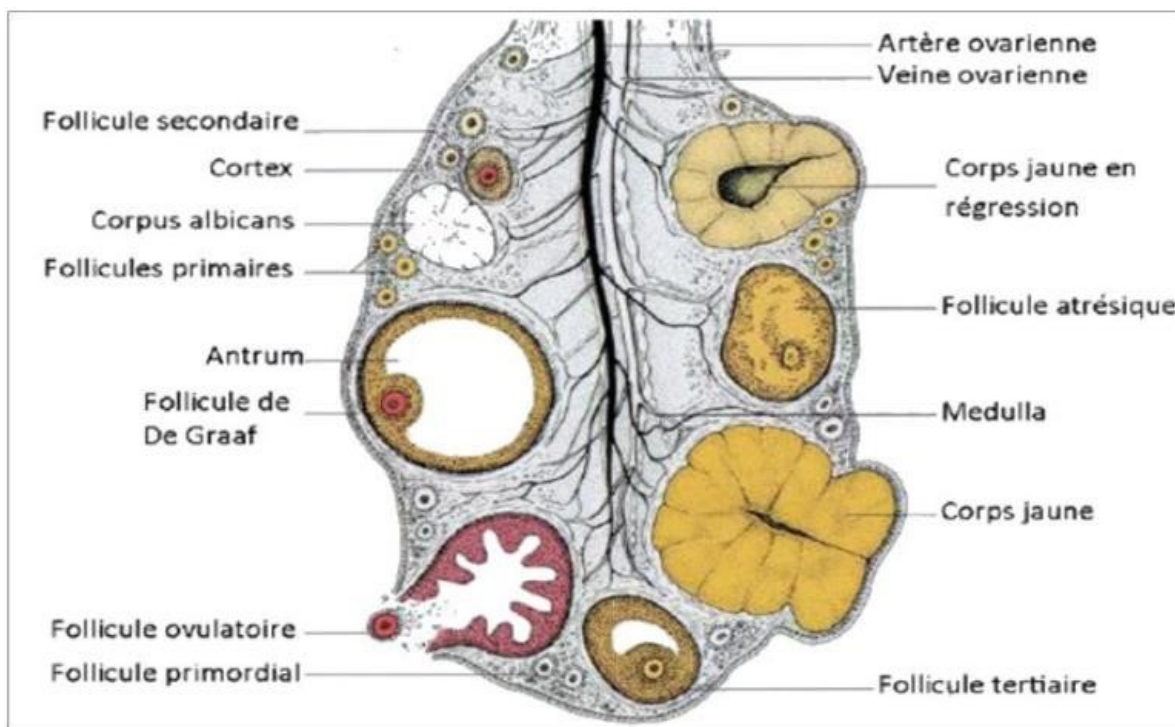


Figure 2 : Représentation schématique de la structure d'un ovaire chez la vache (König et al., 2007).

I.1.2.1. Follicule primordial

Dans l'ovaire, les follicules non développés se présentent sous forme de follicules primordiaux, qui sont constitués d'un ovocyte I entouré par une couche unique de cellules folliculeuses aplaties (**Fig. 3**) (Monniaux, 2010).

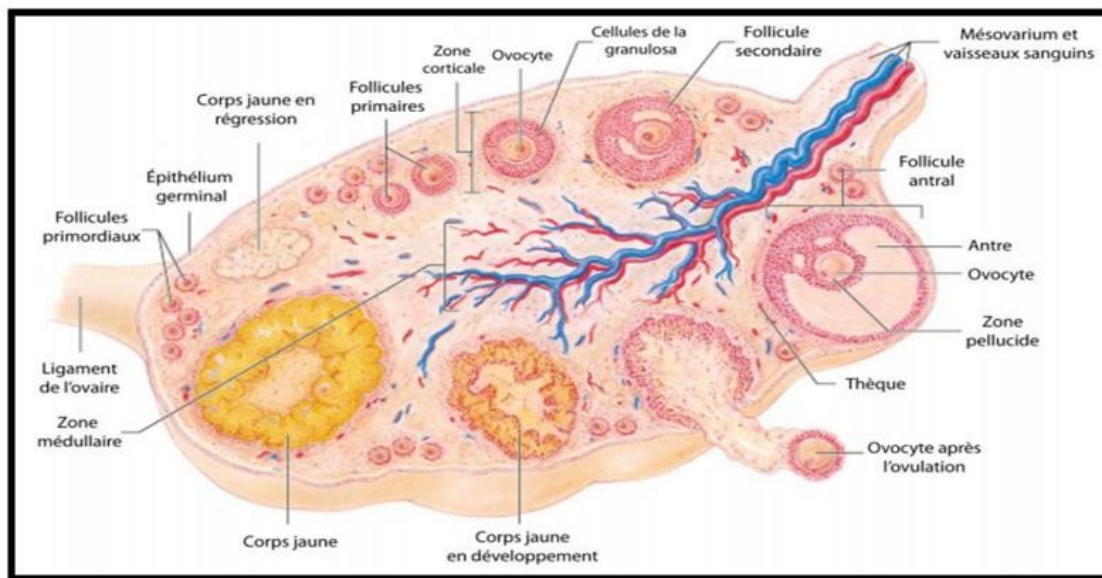


Figure 3 : Représentation schématique des différentes structures de l'ovaire (Marieb and Hoehn, 2001).

I.1.2.2. Follicule primaire

D'un diamètre compris entre 40-60 μ m, il est caractérisé par l'augmentation du volume de l'ovocyte (30 à 40 μ m), la zone pellucide, se formant entre l'ovocyte et les cellules folliculeuses qui l'entourent (**Fig. 3**).

I.1.2.3. Follicule secondaire

Il est de 200 à 300 μ m de diamètre. L'ovocyte ayant atteint un diamètre de 60 μ m, s'entoure d'une zone pellucide bien différenciée (**Fig. 3**).

I.1.2.4. Follicule tertiaire

Dérive du follicule secondaire, par dissociation de l'amas des cellules folliculaires. Il en résulte la formation d'une cavité centrale ou antrum. Sa taille est de 200 à 400 μ m et le diamètre ovocytaire varie entre 100 et 130 μ m (**Fig. 3**) (Monniaux, 2010).

I.1.2.5. Follicule de De Graaf

A ce stade, le follicule mesure 1,5 à 2,5 cm de diamètre et bombe à la surface de l'ovaire. Au moment de l'ovulation, le follicule mature se rompt et l'ovule comportant l'ovocyte II (**Fig. 3**) (Monniaux, 2010).

I.1.2.6. Corps jaune

Le corps jaune est formé à partir du follicule préovulatoire (Messinis et al., 2009) . Après l'ovulation, le follicule rompu s'affaisse, se comble par un caillot sanguin et les trois couches de la paroi folliculaire se réorganisent pour former une glande endocrine temporaire. En dehors de la gestation, le corps jaune dégénère et laisse place à une cicatrice fibreuse blanchâtre du tissu conjonctif, *corpus albicans* non fonctionnel (**Fig. 3**) (Lüllmann-Rauch, 2008; Wheater et al., 2001).

I.1.2.7. Follicules atrétiques

Les follicules atrétiques sont beaucoup plus nombreux que les follicules gamétogènes. Du point de histologique, le follicule atrétique présente de nombreuses caractéristiques, une forme non régulière (déformé), l'aspect des cellules est non reconnaissable (Barone, 2001).

II. Evolution des follicules ovariens au cours du cycle œstral

Chez la vache, les follicules se développent par vagues. On observe ainsi au cours du cycle, deux ou trois vagues de croissance folliculaire successives d'une durée de 7 à 10 jours, au cours desquelles s'effectuent les phases de recrutement, de sélection et de dominance.

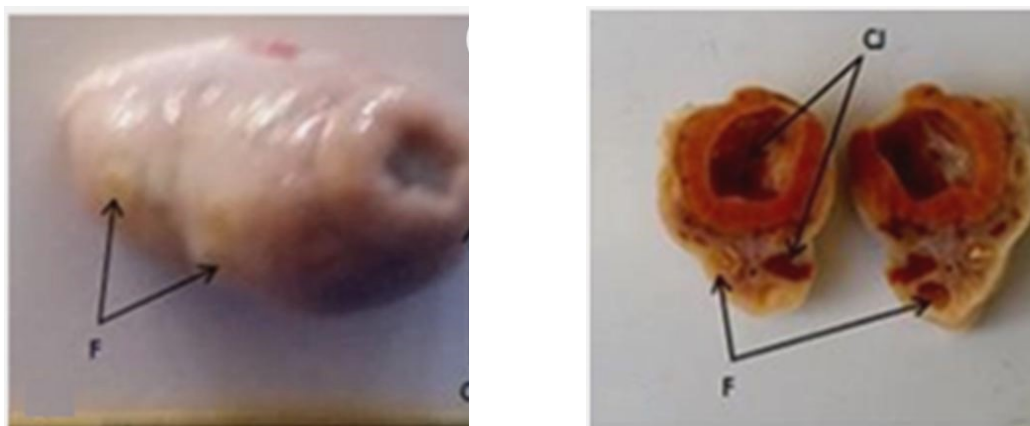
Le recrutement d'une cohorte d'une dizaine de follicules (Edmondson et al., 1986) est concomitant d'une augmentation des concentrations de FSH. Pour chacune de ces vagues, un follicule est sélectionné et augmente de taille plus rapidement que les autres follicules de la cohorte et synthétise et libère dans la circulation sanguine deux hormones, l'androstènedione et l'inhibine qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH, ce qui entraîne l'atrésie des follicules subordonnés., c'est le follicule dominant. Son devenir dépend de la pulsativité de LH. En fin de cycle œstral, lors de la régression du corps jaune, la pulsativité de LH augmente, le follicule dominant évolue vers l'ovulation. En revanche, en présence d'un corps jaune mature, la pulsativité de LH est faible et le follicule dominant est devient atrétique. La vitesse de croissance du follicule dominant est en moyenne de 1,5 à 2,5 mm par jour (Kähn, 1994). Juste avant ovulation, le follicule pré-ovulatoire peut présenter un diamètre compris entre 8 et 20 mm de diamètre qui dépend de la race (Julia and Taveau, 2013).

La production continue de vagues folliculaires pendant tout le cycle œstral implique que les gros follicules de plus de 8 mm sont toujours présents sur les ovaires sauf durant les premiers jours du cycle, et la différence de taille entre le follicule pré-ovulatoire et un follicule dominant n'est pas discernable à l'échographie (Sirois and Fortune, 1988). Par conséquent, on ne peut pas déterminer la phase du cycle, ni le devenir du plus gros follicule à partir d'une seule observation échographique des follicules, il est nécessaire de réaliser un suivi des structures ovariennes (tous les 1 à 3 jours) pour définir plus précisément la phase du cycle ovarien.

III. Changement morphologique des follicules au cours du cycle œstral

En coupe longitudinale, on observe une zone vasculaire centrale (médulla) et une zone parenchymateuse périphérique (Fig.4) qui change morphologique au cours des différents stades du cycle œstral (Fig.5).

- En proœstrus : Corps jaune en régression et formation des follicules (Fig. 5).
- En metœstrus : Corps jaune en régression et un corps jaune en formation (Fig.4)
- En diœstrus : Corps jaune mature (Fig. 6).



F : Follicule, CJ : Corps jaune, M : Médulla, C : Cortex.

Figure 4 : Ovaire en vue externe (a) et en coupe longitudinale (b) au stade metœstrus chez la vache (Aouf and Mahi, 2020).

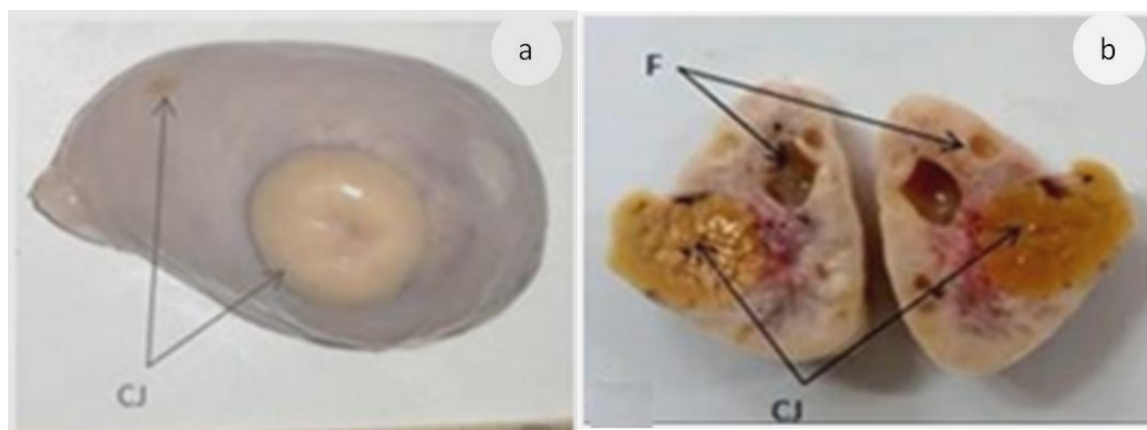
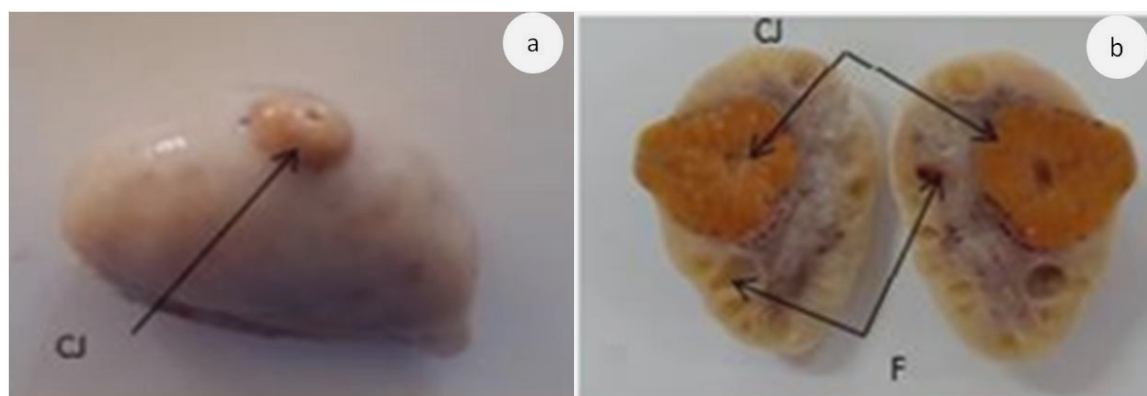


Figure 5 : Ovaire en vue externe (a) et en coupe longitudinale (b) au stade proœstrus chez la vache (Aouf and Mahi, 2020).



: F : Follicule, CJ : corps jaune.

Figure 6 : Ovaire en vue externe (a) et en coupe longitudinale (b) au stade diœstrus chez la vache (Aouf and Mahi, 2020).

Les dimensions de l'ovaire varient en fonction du développement de ses structures fonctionnelles au cours des différents stades du cycle œstral. Il a une forme aplatie, ovoïde en forme d'amande. L'ovaire comporte une zone vasculaire centrale médulla et une zone parenchymateuse périphérique cortex. L'ovaire renferme de manière physiologique plusieurs types d'organites : les follicules d'une part et les corps jaunes d'autre part. Le cycle sexuel s'articule autour de variations morphologiques ovariennes celles-ci se caractérisent par la succession d'une phase folliculaire (croissance brutale, terminale et permissive d'un ou plusieurs follicules) conduisant à l'ovulation, et d'une phase lutéale (croissance, développement et régression du corps jaune (Suh et al., 2002; Ball and Peters, 2008; Akers and Denbow, 2013).

V. Kyste ovarien

V.1 Définition

Le kyste ovarien traduit une évolution anormale de la croissance folliculaire. La plus part des études effectuées sur les kystes ovariens font référence aux caractéristiques données par de nombreux auteurs (Bierschwal et al., 1975; Garverick, 1997; Peter, 1997; Seguin, 1980). Ces derniers définissent le kyste comme une structure lisse plus ou moins dépressible d'un diamètre égal ou supérieur à 20 mm, persistant pendant au moins 10 jours sur l'ovaire en présence possédant ou non un corps jaune.

V.2. Types du kyste ovarien

Selon leurs caractères fonctionnels (production de stéroïdes) ou structurels, les kystes folliculaires ovariens peuvent être classifiés en kyste folliculaire (KF) et en kyste lutéal (KL).

V.2.1. Kyste folliculaire

A l'échographie, il est caractérisé par une cavité anéchogène de diamètre supérieur à 25 mm, entourée par une paroi dont l'épaisseur est inférieure à 3 mm (Kähn, 1994; Hanzen et al., 2000).

V.2.2. Kyste lutéal

Secrète des quantités variables de P4 (Garverick, 1997), en général, il est associé relativement à des concentrations élevées en P4 dans la circulation périphérique tandis que le kyste folliculaire produit peu de P4 et secrète davantage de l'œstradiol (Garverick, 1997; Silvia et al., 2002) à des quantités similaires à celles d'un follicule normal (Odore et al., 1999).

Une autre condition, le corps jaune cavitare, est souvent confondue avec le KL (Garverick, 1997; Vanholder et al., , 2006), qui est un jeune corps jaune qui se produit après l'ovulation avec une cavité centrale de différentes tailles, remplie de liquide. Les KF peuvent être distingués également des KL par palpation rectale ou ultrasonographie (Farin et al., 1990, 1992; Jeffcoate and Ayliffe, 1995).

V.3. Conséquences

Chez les bovins, les effets indésirables de la présence des kystes au niveau de l'ovaire sur la fertilité sont liés à l'augmentation de l'intervalle du vêlage-vêlage de 22 à 64j

(Garverick, 1997; Silvia et al., 2002) et des intervalles vêlage-1^{ère} insémination et vêlage-conception (environ 13 et 33j additionnels, respectivement) (Brito and Palmer, 2004) .

VI. Facteurs affectant l'incidence des pathologies à kyste ovarien

Il existe une prédisposition génétique à la MKO. En plus, la MKO est plus courante chez les vaches dont la production de lait est plus élevée (López-Gatius et al., 2002) .

Une étude récente a rapporté une corrélation entre la production laitière et la MKO (Hooijer et al., 2001).

L'incidence de la MKO augmente avec la parité, surtout après la première lactation, l'incidence dans les vaches de première lactation est de 40% à 80% inférieures à celles de la population générale de vaches.

L'effet saisonnier sur l'incidence de la MKO n'est pas clair. Certaines études ont été incapable de démontrer un effet (Hooijer et al., 2001) tandis que d'autres ont décrit une incidence accrue pendant l'automne-hiver, (Gröhn et al., 1990) l'hiver, (Morrow, 1966) ou été (López-Gatius et al., 2002) .

VII. Symptômes et diagnostic

Le kystique ovarien peut être accompagné d'un état d'œstrus permanent, qui justifies on association avec lanymphomanie (sexualité compulsive) ou au plus tard avec virilisme, mais les signes des anoestrus sont les plus fréquents, les symptômes pouvant être associés à cette pathologie sont variables : absence de tonus des voies génitales, relaxation des ligaments pelviens, élévation de la queue attachement et changement soudain de lait production et développement du mâle caractéristiques (Mimoune et al., 2021).

La palpation transrectale est la méthode la plus fréquemment utilisée, bien qu'elle ne permette pas de différenciation entre KF et KL (Farin et al., 1992) et des études ont montré que un diagnostic précis n'est possible que dans 50% des cas (Douthwaite and Dobson, 2000; Farin et al., 1992). Dans le cas d'un KF, la palpation de l'utérus peut fournir des informations complémentaires comme un état œdémateux de l'utérus qui le rend ferme, ou dans 4% des cas de mucomètre (environ 1 litre). Un utérus flasque peut être palpé avec KL.

L'échographie est la méthode la plus fiable pour diagnostiquer un KO car les structures ovariennes peuvent être visualisées. Il peut facilement distinguer une CCJ d'un KL, sachant que le diamètre maximum de la centrale.

Chapitre I : Données bibliographiques

La présence de follicules >5 mm dans le diamètre est plus fréquemment observé dans KL, qui constitue un complément signe de diagnostic différentiel (Douthwaite and Dobson, 2000). En utilisant ces critères, un diagnostic correct est possible dans environ 85% des cas. Par conséquent, l'échographie l'examen est beaucoup plus précis dans le diagnostic de type OC (Farin et al., 1992; Douthwaite and Dobson, 2000). L'échographie peut être combinée avec une analyse du niveau de circulation de la progéséronémie pour poser un diagnostic précis (jusqu'à 92% pour KF et 82% pour KL) (Douthwaite and Dobson, 2000).

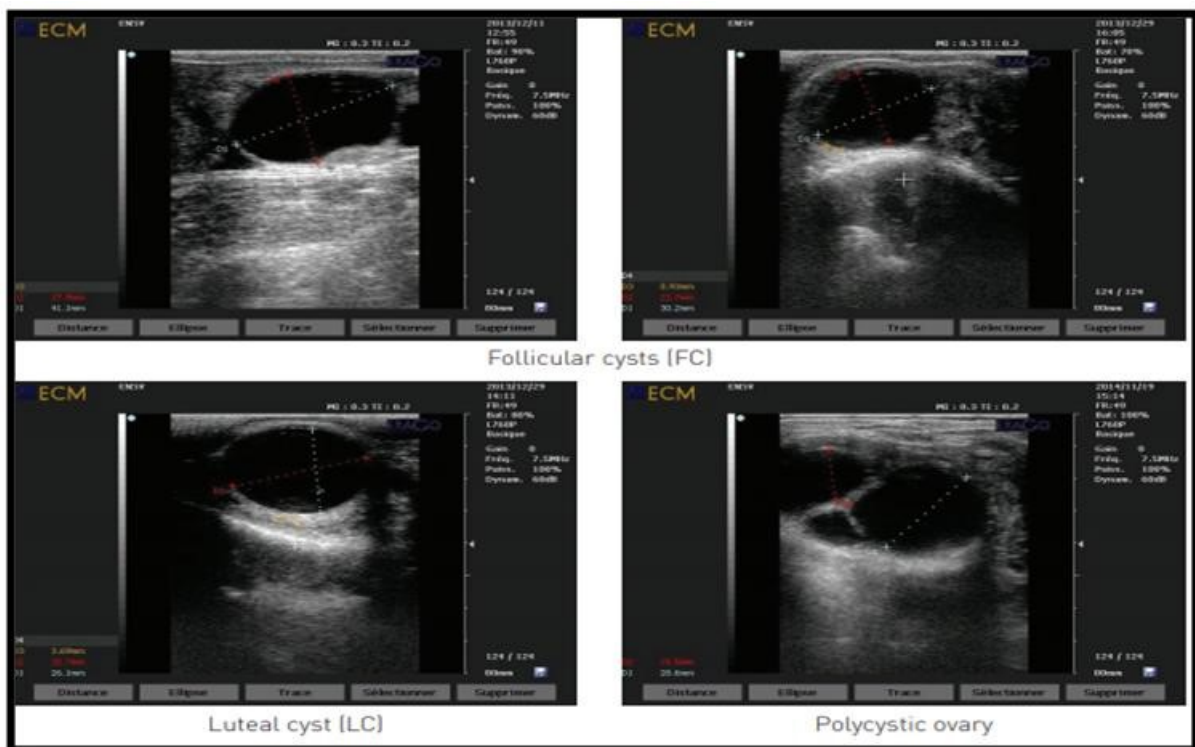


Figure 7 : Examen échographique des différents types de kystes ovariens(Mimoune et al., 2021).

Marqueur de prolifération cellulaire : Ki-67

I. Historique

L'antigène du marqueur de la prolifération Ki-67 a été découvert par (Gerdes et al., 1983) au début des années 80. Au cours de travaux visant à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant des antigènes nucléaires spécifiques de cellules de lymphome hodgkinien, les cellules d'Hodgkin et de Sternberg-Reed, par l'immunisation de souris avec des noyaux de cellules de la lignée de lymphome hodgkinien humain L428. La plupart des anticorps obtenus lors de ces travaux réagissent avec toutes les cellules tumorales; l'un d'entre eux réagit qu'avec les cellules en cycle cellulaire et jamais avec les cellules temporairement ou définitivement hors cycle (Gerdes et al., 1984). La protéine fut ainsi définie originellement par l'anticorps monoclonal prototype Ki-67 ainsi obtenu, dont le nom provient de l'association de "Ki", abréviation issue du nom de la ville où furent réalisés les travaux de Gerdes (Kiel) et du nombre "67", correspondant à la localisation du clone originel sur la plaque 96-puits dans laquelle il a été isolé. Comme l'antigène ne fut pas initialement caractérisé, le nom Ki-67 fut donné pour désigner également la protéine reconnue par cet anticorps.

La caractérisation du profil de marquage obtenu avec l'anticorps monoclonal Ki67, étudié peu après sa découverte, s'est révélée particulièrement intéressante. L'anticorps réagit avec une structure nucléaire présente exclusivement dans les cellules en prolifération. Une analyse détaillée du marquage obtenu au cours du cycle cellulaire a ainsi montré que l'antigène était présent dans le noyau des cellules au cours des phases G1, S, et G2 du cycle cellulaire, ainsi que durant la phase M de mitose. Les cellules quiescentes en phase G0 n'exprimaient pas l'antigène Ki-67 (Gerdes et al., 1984).

II. Biologie du marqueur de prolifération Ki-67

II.1 Définition

Le Ki-67 est un gène codant pour une protéine nucléaire non-histone de 395 kDa (Gerdes et al., 1991). L'expression du Ki-67, variable en fonction des différentes phases du cycle cellulaire, est nulle en G0, faible lors des phases S, G1 et G2 et plus élevée avec un pic en M du cycle cellulaire (Gerdes et al., 1991). (Bridger et al., 1998) ont attribué son rôle prolifératif à sa localisation au niveau de sites extranucléaires au cours de la phase précoce

de G1 alors que (MacCallum and Hall, 2000) suggèrent plutôt un rôle structural du Ki-67 dans le nucléole basé sur sa capacité à interagir avec d'autres protéines et à se lier à l'ARN et l'ADN.

II.2. Caractéristiques du Ki-67

Le gène Ki-67 se trouve sur le bras long du chromosome humain 10 (10q25) (Fonatsch et al., 1991). En 1993, Schluter et al ont publié la séquence complète de l'ADNc codant pour la protéine (Schlüter et al., 1993). L'existence de deux isoformes de la protéine est rapportée. Un isoforme avec une masse moléculaire de 359 kD et un autre isoforme de 320 kD. La caractéristique (Scholzen et al., 1997).

L'aspect cellulaire et l'emplacement de la protéine Ki-67 tout au long du cycle cellulaire ne sont pas homogènes. Au début de G1, on le trouve généralement faiblement colorant les foyers discrets dans tout le caryoplasme (Kill, 1996). Il se condense progressivement à la fin de G1 en granules prénucléolaires plus grands (Starborg et al., 1996); Pendant les phases S et G2, il est principalement associé à la région nucléolaire dans les foyers plus grands comme ainsi qu'avec certaines régions d'hétérochromatine. Lorsque la membrane nucléaire se rompt au cours de la mitose, Ki-67 montre une expression intense associée à la surface des chromosomes condensés dans le cytoplasme. Cette intensité disparaît rapidement en anaphase-télophase.

Malgré toutes ces informations sur la nature, l'emplacement et la séquence de la protéine Ki-67, on sait peu de choses sur sa fonction au-delà du fait qu'elle est une protéine phosphorylée via la sérine et la thréonine (Heidebrecht et al., 1996) avec un rôle critique dans la division cellulaire.

III. Utilisation comme marqueur de prolifération

Pour justifier son utilisation comme marqueur fiable de la prolifération cellulaire, la détection immunohistochimique de l'antigène Ki-67 fut comparée aux autres techniques d'évaluation de l'activité proliférative. Plusieurs études ont ainsi montré une forte corrélation entre l'index de marquage Ki-67 et les index de prolifération, calculés par les techniques d'incorporation de la thymidine tritiée et de BrdU, justifiant l'utilisation de ce marqueur dans la quantification de la prolifération néoplasique (Deshmukh et al., 1990).

Le principe développé par Gerdes (1992) pour détecter l'expression de l'antigène Ki-67 n'était utilisable que sur coupes de tissus congelés, limitant ses possibilités

d'application à la pratique expérimentale. Cependant le développement d'anticorps permettant de reconnaître des épitopes de l'antigène Ki-67 résistants à la fixation et à l'inclusion, dont l'anticorps commercial le plus utilisé MIB1 (pour Molecular Immunology Borstel), a permis d'étendre le domaine d'application de la détection de ce marqueur de prolifération en pratique anatomo-pathologique clinique courante de routine ou pour des études rétrospectives . Ils sont utilisables sur coupes tissulaires de prélèvements inclus en paraffine, nécessitant éventuellement un pré-traitement par la chaleur, en particulier à l'aide des micro-ondes (Key et al., 1993). L'utilisation de ces anticorps, dont le clone MIB1, a fourni l'opportunité de réaliser des études rétrospectives sur du matériel archivé parfois durant plusieurs décennies (Guinebretiere and Sabourin, 1997).

L'antigène Ki-67 a une demi-vie très brève, estimée à environ 20 minutes ; il est ainsi très vite et totalement catabolisé après la fin de la mitose. Cette demi-vie courte tient principalement à sa sensibilité aux protéases, induisant sa dégradation métabolique rapide lorsque les cellules quittent le cycle (Abadie, 2001).

Pour une utilisation de routine en laboratoire de diagnostic, l'antigène Ki-67, détecté à l'aide de l'anticorps MIB1, est ainsi considéré comme le meilleur marqueur de prolifération pour une application sur coupes de prélèvements réalisés selon les techniques conventionnelles (Rose et al., 1994). Du fait de ces propriétés et de la facilité de réalisation des techniques immunohistochimiques, l'antigène Ki-67 occupe une place importante dans l'évaluation pronostique des tumeurs humaines. Son intérêt a été ainsi étudié dans un grand nombre de types tumoraux différents en particuliers, les tumeurs ovariennes (Guinebretiere and Sabourin, 1997).

La valeur de la détection de l'antigène Ki-67 a été confrontée aux différents éléments cliniques et aux paramètres histologiques connus pour chacun des types tumoraux. Il n'existe généralement pas de relation avec les éléments cliniques (âge, localisation, taille de la tumeur etc...) mais en revanche, l'index mitotique, les différents grades histopronostiques et la présence de métastases ont été trouvés fortement liés au Ki67 (Guinebretiere and Sabourin, 1997).

L'index Ki-67 a ainsi été proposé pour entrer dans le calcul de nouveaux indices pronostiques ou de préciser les indices déjà existants d'un nombre considérable de types néoplasiques, tout particulièrement ceux pour lesquels l'évolution biologique spontanée et difficile à prédire par les seuls critères de l'examen histopathologique (Seigneurin and Guillaud, 1991).

IV. Localisation du Ki-67 dépend du cycle cellulaire

Alors que Ki-67 est actif dans toutes les phases du cycle cellulaire, sa distribution cellulaire varie à travers les étapes (**Fig. 8 A**), dans les cellules au stade G1 précoces, Ki-67 est situé à de nombreux foyers dans tout le nucléoplasme, ces foyers correspondent aux centromères (alpha-satellite), télomériques (minisatellite) et blocs hétérochromatiques (satellite III).

Cependant, au cours de la progression de G1 (c'est-à-dire G1) la proportion de Ki-67 localisé dans ces régions hétérochromatiques diminue et la plupart du Ki-67 devient associé à la réforme des nucléoles (Bridger et al., 1998). Cette association avec les nucléoles sont maintenus en S et G2 (Ross and Hall, 1995). Ces organites se forment à la fin de la mitose et constituent le site principal de la biogenèse des ribosomes.

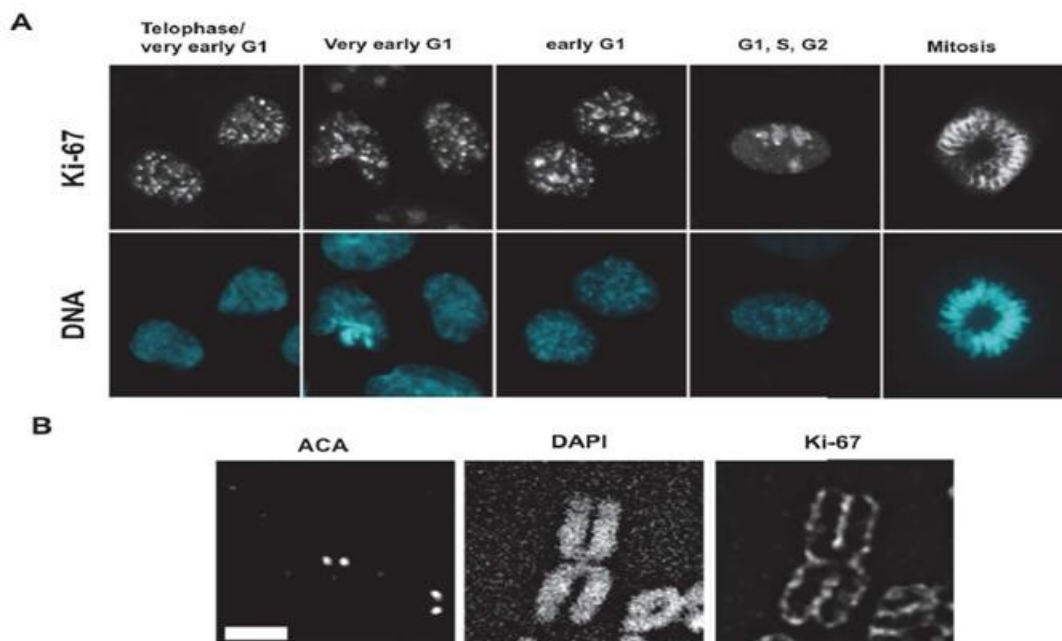


Figure 8 : Localisation dépendante du cycle cellulaire de la protéine Ki-67 (Kill, 1996).

A : Au début du G1, colocalisation du Ki-67 avec les régions télomériques et péricentromériques qui correspondent aux foyers (foyers blancs) révélés par la coloration au Ki-67. Au cours de la progression de la phase G1, cette co-localisation est réduite, à la fin de G1, Ki-67 s'intègre dans les nucléoles et reste (G1, S, G2) jusqu'à l'apparition de la mitose. À la mitose, le Ki-67 recouvre les chromosomes condensés et s'associe à la couche périchromosomique. **B :** Visualisation en microscopie optique de la couche périchromosomique sur RPE chromosomes en métaphase (DAPI) utilisant des anticorps anti-centromère (ACA) et des anticorps Ki-67. Barre d'échelle : 1 µm (B).

Dans le nucléole, trois sous-régions distinctes sont distinguées : centres fibrillaires (CF), composantes fibrillaires denses (CFD) et composantes granulaires (CG). Alors que la plupart des protéines nucléolaires se trouvent dans la région CG où l'assemblage de sous-unités ribosomiques est finalisé ; la transcription des répétitions d'ADNr et traitement / modification des transcriptions pré-ARNr ont lieu respectivement au niveau du CF et du CFD (Boisvert et al., 2007). En effet, l'analyse microscopique a révélé que Ki-67 se localise dans une région particulière du CFD qui est déficiente en nucléoline, et fibrilline, appelée «région déficiente en fibrillarine du CFD » (Kill, 1996; MacCallum and Hall, 2000).

V. Relation entre le Ki-67 et la prolifération des cellules

Les premières études sur le rôle fonctionnel du Ki-67 dans les cellules en prolifération ont supposé que le Ki-67 est nécessaire à la prolifération cellulaire et à la progression du cycle cellulaire.

En effet, il a été rapporté que la synthèse de l'ADN pouvait être inhibée dans les cellules en culture après leur incubation avec des oligodésoxynucléotides complémentaires de l'ARNm de Ki-67 (Schlüter et al., 1993). Dans ce contexte, la micro-injection d'anticorps ciblant Ki-67 dans les noyaux de cellules Swiss-3T3 a réduit le taux de division cellulaire (Starborg et al., 1996). Dans les cellules en prolifération, il existe une importante synthèse protéique due aux changements dans le taux de biogenèse des ribosomes. Par ailleurs, certains rapports ont suggéré une implication potentielle du Ki-67 dans la synthèse de l'ARNr en réponse à des signaux mitogènes, et ont émis l'hypothèse que le Ki-67 pourrait agir comme un «intensificateur» de la biogenèse des ribosomes, soutenant ainsi la prolifération.

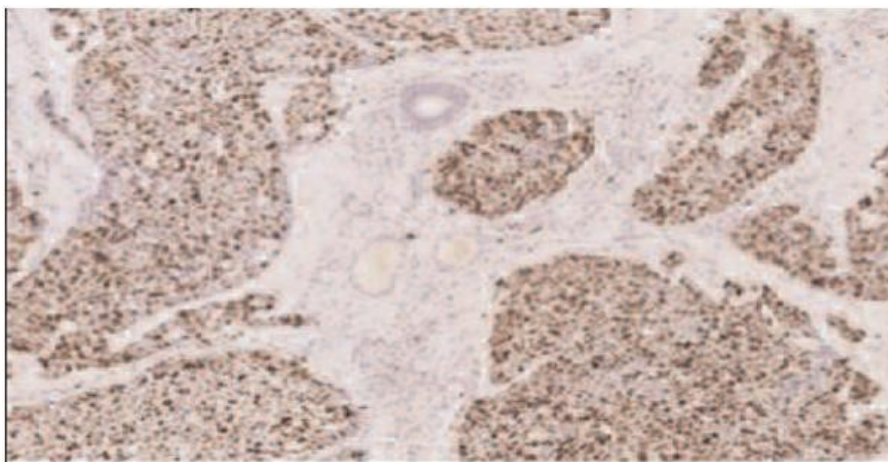


Figure 9 : Localisation dépendante du cycle cellulaire de la protéine Ki-67 (El Benna et al., 2015).

Ces observations suggèrent que Ki-67 pourrait être nécessaire pour la prolifération cellulaire. Cependant, des limites techniques de telles approches n'ont pas utilisés les approches de perte de fonction (c'est-à-dire de mutation nulle) pour aborder le rôle du Ki-67 dans la prolifération cellulaire. Plus important encore, il a été montré que Ki-67 est exprimé dans les noyaux embryonnaires lors des premières mitoses au cours du développement embryonnaire de la souris (Winking et al., 2004).

VI. Détermination immunohistochimique de Ki-67

Le niveau d'expression cellulaire du Ki-67 est détectable par des méthodes d'immunofluorescence et d'immunohistochimie (**Fig.10**). Cette dernière étant la plus utilisée en routine. En routine, le Ki-67 est recherché sur coupes paraffinées avec l'anticorps MIB-1 et son taux calculé en évaluant le pourcentage du marquage nucléaire de 1000 cellules tumorales, soit 100 cellules/10 grands champs, avec un seuil de positivité supérieur à 5%. Les difficultés des techniques du Ki-67 sont représentées par la nécessité d'avoir une surface de 2 mm² correspondant à 10 grands champs pour estimer l'index mitotique. Cet examen devient plus difficile à interprété lorsqu'il s'agit d'un prélèvement biopsique (El Benna et al., 2015).

En 1992, Cattoretti et al. ont rapporté un meilleur succès dans le marquage du Ki-67 dans des échantillons inclus en paraffine après le développement des nouveaux anticorps, MIB-1 et MIB-3. Ces anticorps semblent produire des résultats équivalents à l'anticorps Ki-67 original ciblant le même épitope, comme démontré par des bandes identiques dans la technique d'immunoblots (Key et al., 1993).

L'immunolocalisation par l'utilisation du MIB-1 et MIB -3 au niveau des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine est largement améliorée pour la visualisation des antigènes et surtout par l'utilisation d'un desmasquage antigénique par le micro-onde (Shi et al., 1991). Bien que plusieurs anticorps soient maintenant disponibles dans le commerce pour visualiser Ki-67 dans les tissus frais et inclus en paraffine, MIB-1 est le plus largement utilisé dans les études récentes (**Fig.10**). Expression du Ki-67 est généralement estimé comme le pourcentage de cellules tumorales positivement marquées par l'anticorps, le marquage nucléaire étant le critère de positivité le plus courant. Actuellement, il y a peu de données sur la variabilité des résultats obtenus par différents laboratoires.

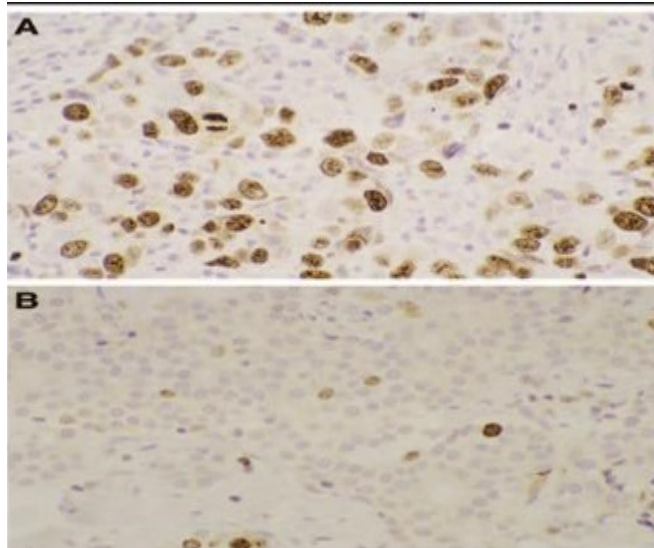


Figure 10: Détermination immunohistochimique de Ki-67 à l'aide de l'anticorps Mib-1 dans un échantillon de carcinome du sein à prolifération élevée (A) et faible (B)(Urruticoechea et al., 2005).

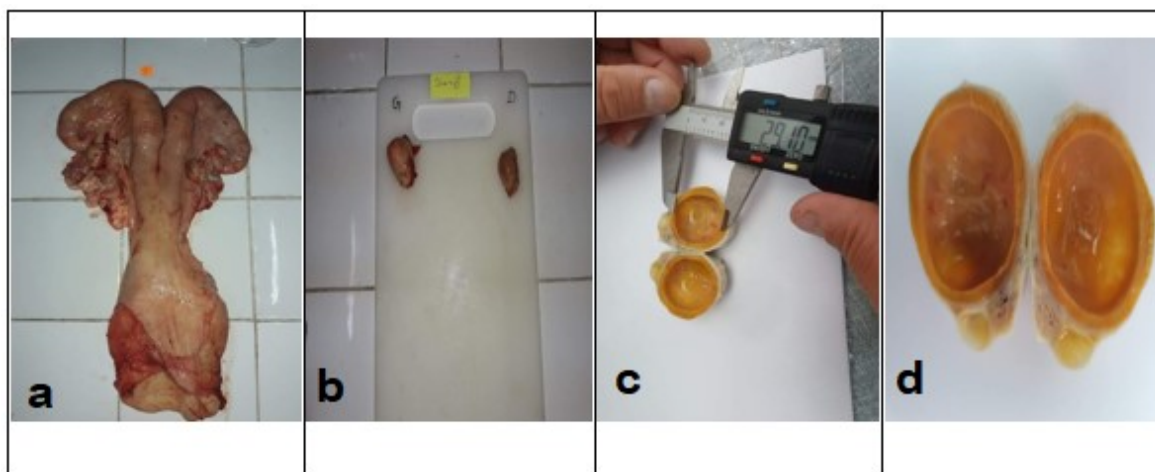
Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Modèle animal

Notre travail a porté sur les ovaires d'une vache adulte récolté au niveau de l'abattoir d'El Harrach. La vache a fait l'objet d'un examen général avant son abattage pour évaluer son état de santé. Les échantillons obtenus proviennent des vaches de la race Prim'holstein, âgées en moyenne de 5 ans déterminé par la dentition. Après abattage, les prélèvements sont placés dans des sacs en plastique et transportés au laboratoire de physiologie animale de l'institut des sciences vétérinaires (Blida).

II. Protocol expérimentale

Une fois au laboratoire, un examen macroscopique de l'appareil génital a été réalisé afin de déterminer le stade du cycle œstral de l'animal en identifiant les différentes structures apparentes (follicules ovariens, corps jaune, kystes ovariens) à la surface des ovaires localisés du côté droit et gauche de l'animal (**Fig. 11**).



a : appareil génital femelle chez la vache. b : ovaires droite et gauche d'une vache
c, d : Mesure la longueur et la largeur d'un ovaire de vache.

Figure 11 : Etapes d'analyse d'un appareil génital de la femelle.

Après identification des ovaires, une coupe longitudinale est réalisée le long du grand axe de l'ovaire à l'aide d'une lame de bistouri.

III. Protocole de la technique d'histologie

III.1. Fixation

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

Les ovaires prélevés sont placés dans une cassette d'histologie portant les références de l'animal, puis immergés dans le formol du commerce dilué à 10 % par une solution tampon (PBS) pendant plus de 24h.

III.2. Déshydratation et substitution (éclaircissement)

Après 24 h de fixation, les prélèvements sont déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. On procède à une double substitution car la paraffine n'est pas miscible dans l'alcool ; pour cela on remplace, selon les étapes :

- L'eau par de l'alcool c'est l'étape de la déshydratation,
- L'alcool par le xylène c'est l'étape de la substitution.

Les étapes de la déshydratation et de la substitution consistent à faire passer les cassettes renfermant les prélèvements dans des bains alcools à concentration croissante (de 70° à 100°) puis dans un solvant organique, le xylène. La durée dans chaque bain est la suivante :

- Alcool 70° : 1h.
- Alcool 90° : 1h.
- Alcool 96° : 1h. (2 bains)
- Alcool 100° : 1h. (2 bains)
- Xylène : 1h. (2 bains)
- Xylène : 1h30.

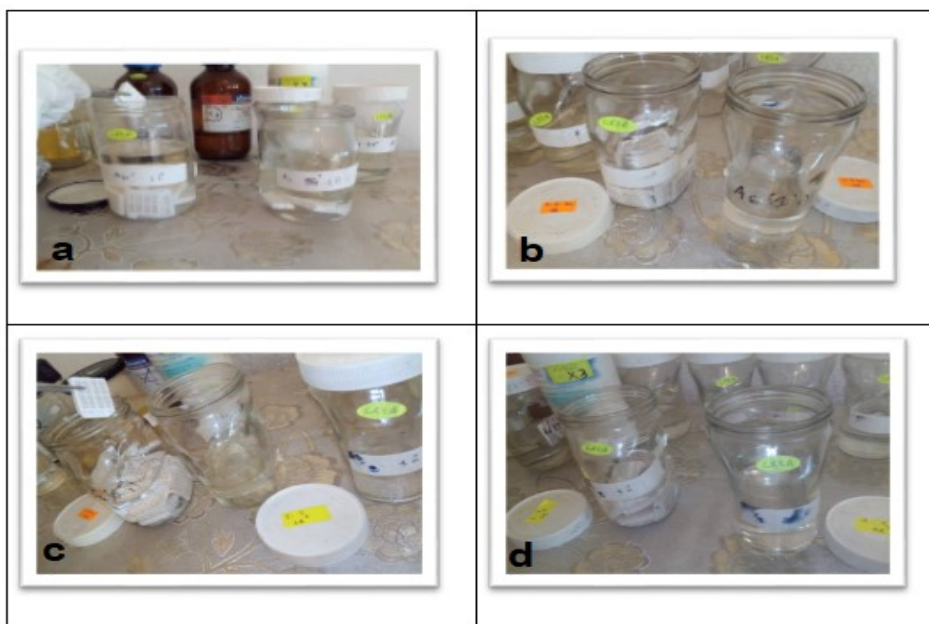


Figure 12: Batteries de bains d'alcool (a,b,c) de concentrations croissantes (70%-96%-100%) et de xylène (d).

III.3. Inclusion

Les prélèvements déshydratés sont immergés dans différents bains de paraffine chauffée dans une étuve à 56°, cette température correspond juste son point de fusion. La durée dans chaque bain de paraffine (**Fig. 13**) est la suivante :

Bain de paraffine	1 ^{er} Bain	2 ^{ème} Bain	3 ^{ème} Bain
Durée (h)	1	1	1

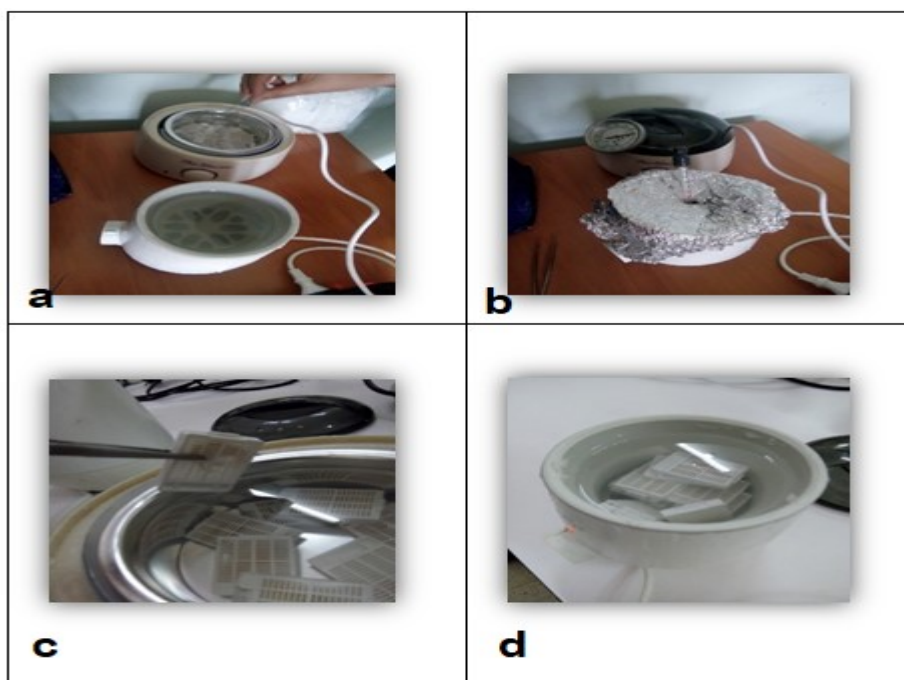


Figure 13: Cassette déshydratés immergée dans des différents bains de paraffine chauffée à 56°C (a, b, c, d).

III.4. Confection des blocs de paraffine

La confection des blocs de paraffine (**Fig. 14**) consiste à :

- Mettre et à centrer le prélèvement au fond du moule métallique,
- Couler la paraffine liquide dans le moule métallique contenant le prélèvement,
- Déposer ensuite la cassette correspondante au prélèvement sur le moule métallique. Le bloc, ainsi constitué, est refroidi rapidement sur une plaque réfrigérée pendant environ 15 minutes. Après refroidissement et solidification de la paraffine, le bloc de prélèvement est séparé du moule métallique.



Figure 14 : Etapes de confection des blocs de paraffines. a) Remplissage du moule métallique. b) Mise en place de l'ensemble moule-cassette sur un bain de glace.

III.5. Réalisation et étalement des coupes

III.5.1. Réalisation des coupes

Les coupes tissulaires d'une épaisseur de 5 μm ont été effectuées à l'aide d'un microtome.

Avant de commencer les coupes, on a reporté les références des cassettes sur les lames d'histologie à l'aide d'un crayon (**Fig.15**).



Figure 15 : Reportage des références des cassettes sur les lames d'histologie à l'aide d'un crayon (a,b,c).

Le but de cette étape est d'obtenir de fines coupes de 5 à 7 μm d'épaisseur, à partir du bloc de paraffine contenant la pièce histologique, et de les mettre sur un support en verre. Pour la réalisation de ces coupes, nous avons utilisé un microtome de type « Leica ». Le passage régulier de la pièce à couper devant le rasoir du microtome nous permet d'avoir un ruban sur lequel nos coupes y figurent :



Figure 16 : Coupe au microtome. (a b) : Le dégrossissage s'effectue avec la surface du bloc de paraffine parallèle au plan de coupe. c : Les blocs de paraffine sont solidement fixés sur le porte échantillon du microtome (permet de faire des coupes de 1 à 5 μm d'épaisseur) par l'intermédiaire de la cassette.

III.5.2. Etalement des coupes

- Afin de ne pas laisser de plis, les coupes sélectionnées sont déposées dans un bain-marie (42°C) et sont récupérées sur des lames silanisées de type « Superfrost plus » pour être utilisé en immunohistochimie. Ces lames permettent une adhésion sur le verre,

grâce à laquelle les coupes de tissus sont d'abord attirées, puis fermement attachées à la surface de la lame par des liaisons chimiques.

- Enfin, les lames sont séchées à l'étuve (35°C) pendant 2 heures pour être utilisées en immunohistochimie (**Fig17.d**).

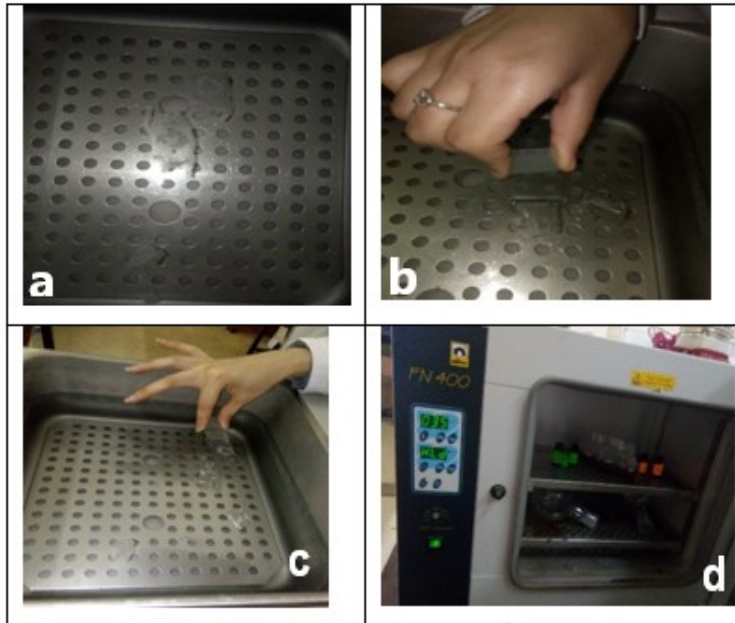


Figure 17: Etalement des coupes et récupération des rubans sur des lames silanisées (a,b,c) : Mettre dans l'eau pour pouvoir se déplier et s'étaler puis déposer à plat sur une lame. d) : Séchage des lames dans l'étuve.

IV. Immunohistochimie pour la mise en évidence le marqueur de prolifération cellulaire (Ki-67)

IV.1. Principe

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.18**).

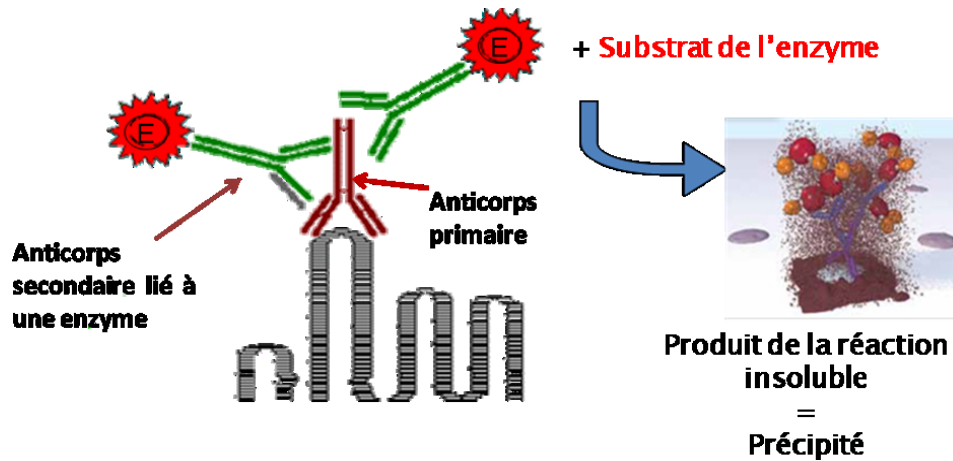


Figure 18: Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie.

IV.2. Protocole d'immunohistochimie

Le protocole d'immunohistochimie est divisé en deux étapes :

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

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

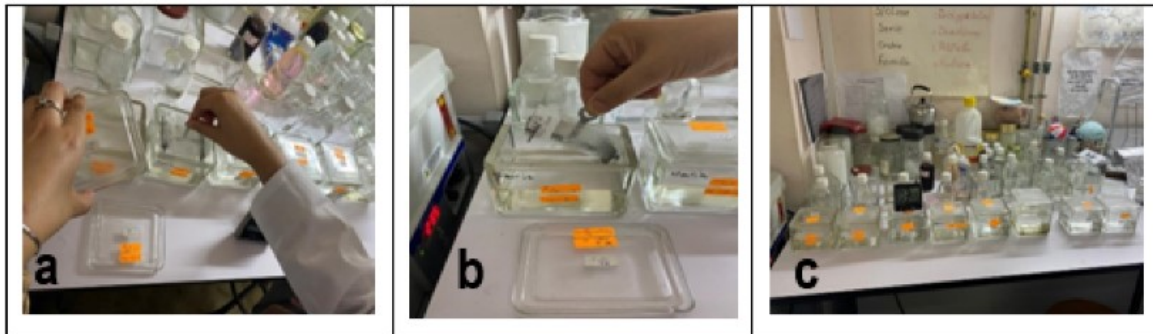


Figure 19: Déparaffinisation et hydratation dans xylène (1 et 2). (a,b), puis dans l'alcool décroissant (100%,95%,70%) (c).

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

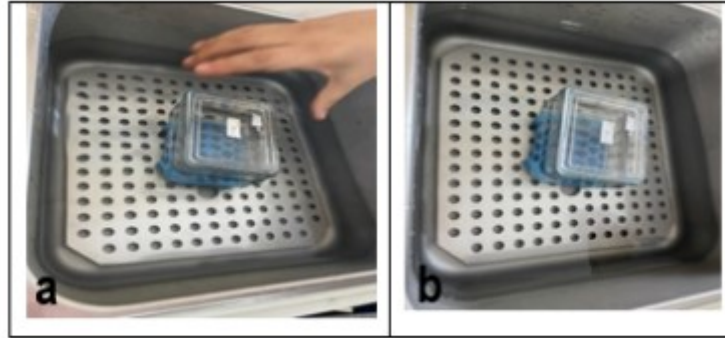
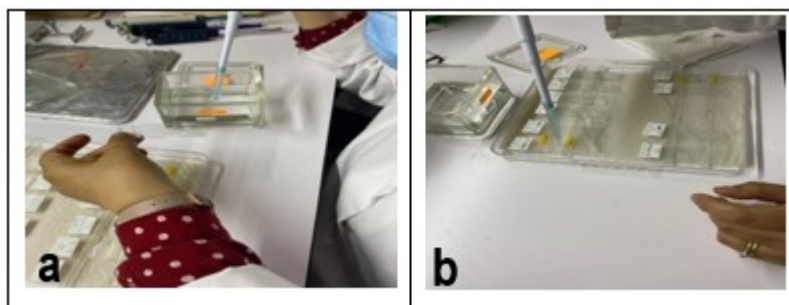


Figure 20: Démassage antigéniques à température 98°C (a,b).

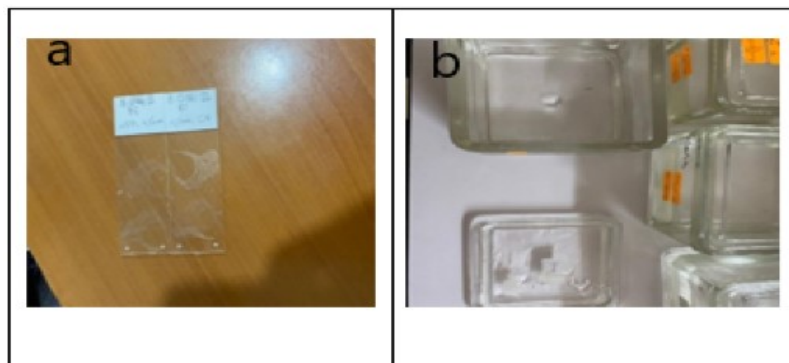
- Rinçage PBS (x2) pendant 5min.



a : Dépôt les lames dans une chambre humide. b : Rinçage.

Figure 21: Rinçage PBS (x2) pendant 5 min.

- Blocage des peroxydases endogènes par un mélange PBS+H₂O₂ à 3% pendant 5min.



a : Blocage des peroxydases endogènes par un mélange PBS+H₂O₂. b : Solution PBS+H₂O₂

Figure 22: Blocage des peroxydases endogènes.

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



Figure 23 : L'entourage des échantillons avec la résine hydrophobe. (a,b) : Entouré les coupes par la résine hydrophobe, c : Agitation des lames avec un agitateur.

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



a b : Blocage des sites non spécifiques avec le sérum de cheval. c : Dépôt les lames dans une chambre humide.

Figure 24: Blocage des sites non spécifiques avec du sérum de cheval.

- Incubation des coupes pendant une nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti- (Ki67) monoclonal (sc. -23900, Santa Cruz), produit chez la souris diluée au 1/50, 1/200
- Sur certaines coupes, l'anticorps primaire est remplacé par le sérum de cheval ; ces coupes sont utilisées comme des contrôles négatifs.
- Rinçage PBS (x2). Pendant 5min.

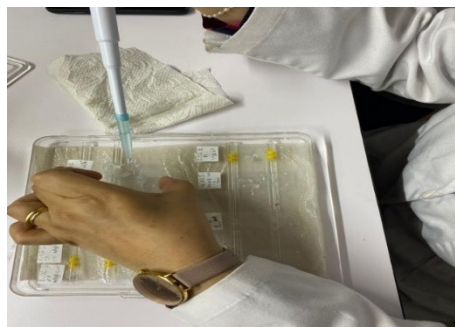


Figure 25: Rinçage PBS (x2).

- Application d'un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (réactif bleu du kit Vectastain), produit chez le cheval, pendant 30 min à température ambiante.

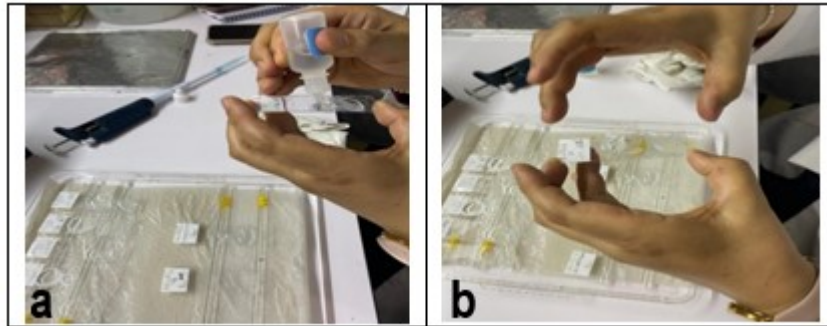


Figure 26: Application d'un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (a,b).

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



Figure 27: Application du complexe Streptavidine-Peroxydase.

- Rinçage PBS (x2).
- Le chromogène utilisé (DAB) est déposé sur les différentes coupes et le contrôle de l'immun marquage est réalisé sous microscope photonique.

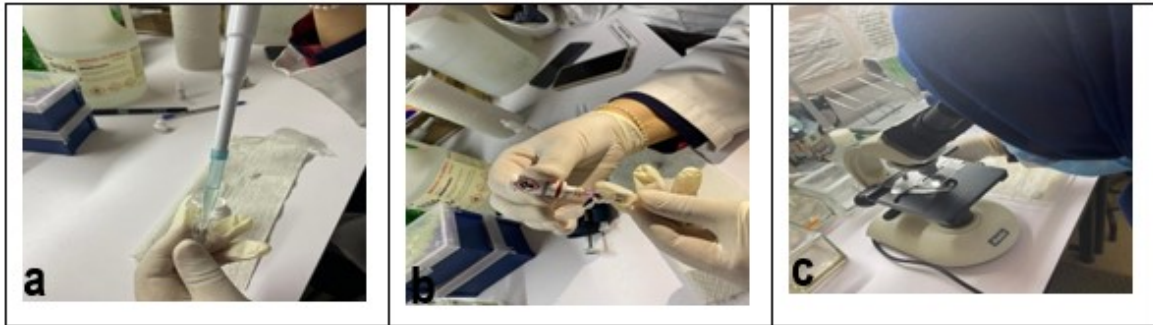


Figure 28: Le dépôt du chromogène (DAB) sur les différentes coupes (a,b) et le contrôle de l'immunomarquage est réalisé sous microscope photonique (c).

- Rinçage à l'eau distillée.

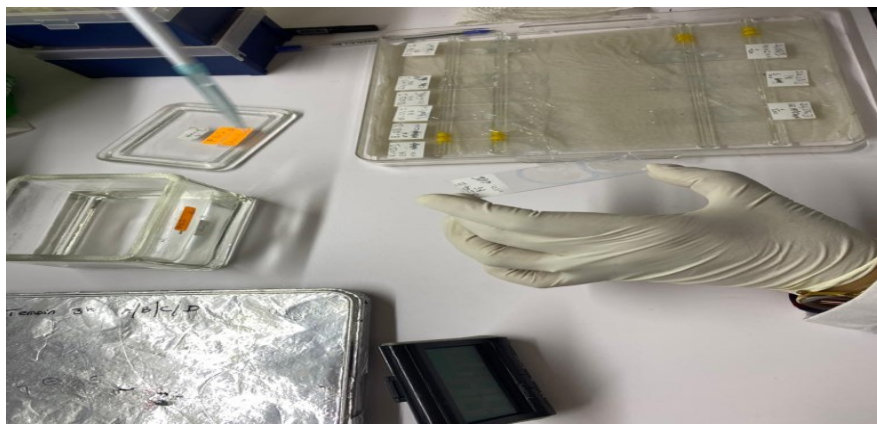


Figure 29: Rinçage à l'eau distillée.

- Contre coloration à l'hématoxyline.

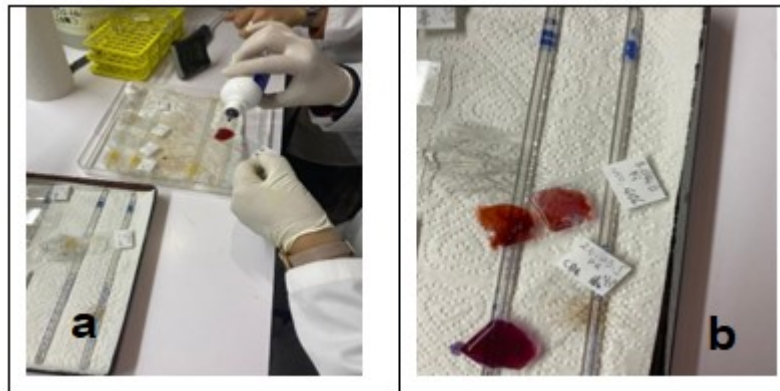


Figure 30: Contre coloration à l'hématoxyline (a,b).

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



Figure 31: Rinçage à l'eau du robinet.

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

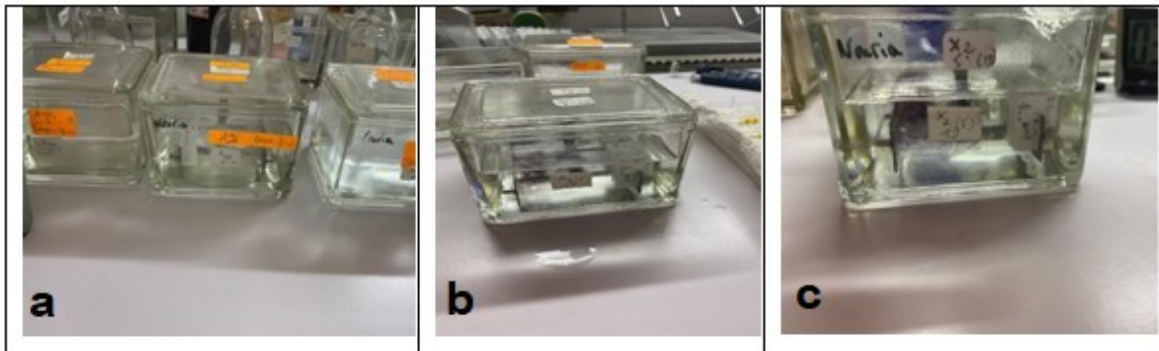
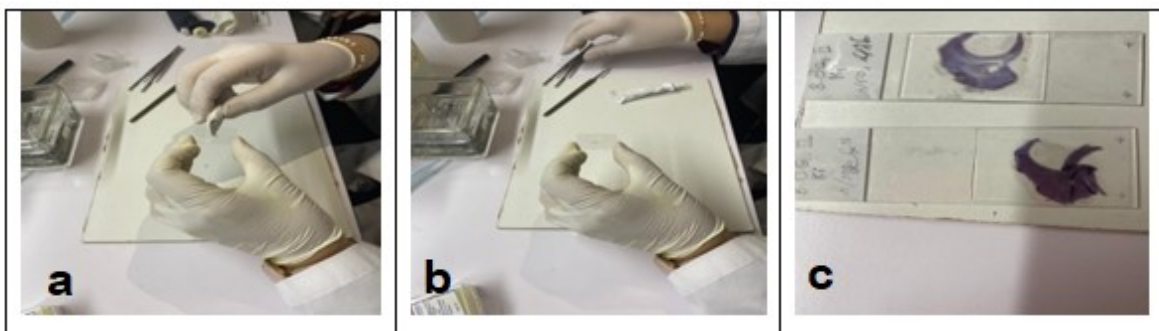


Figure 32: Déshydratation des lames dans des bains d'alcool à concentration croissante (alcool 70°, 95°, 100°) (a,b), puis dans xylène (c).

- 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.



a,b : Montage des lamelles. c : Lames prêtes à l'observation.

Figure 33: Montage des lamelles avec une goutte de liquide de montage « Eukitt ».

IV.3. Validité de la technique d'immunohistochimie

L'anticorps utilisé est validé par :

Les contrôles négatifs insérés au cours du protocole d'immunohistochimie pour confirmer l'immunomarquage observé sur les prélèvements (Fig.34).

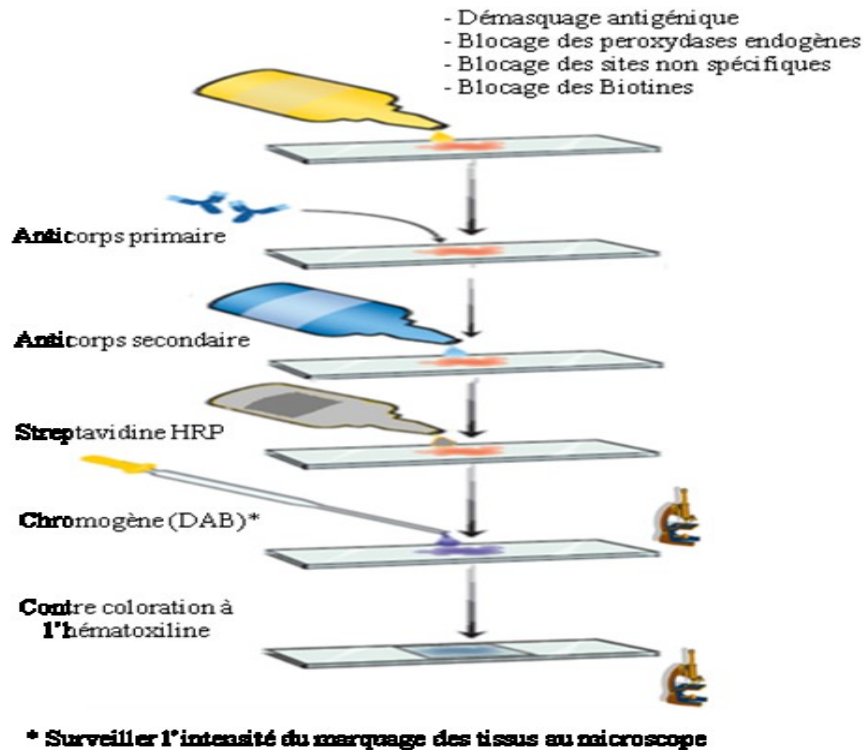


Figure 34: Etapes de la technique d'immunohistochimie.

Chapitre III

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

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

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.

Afin de déterminer les étapes à réaliser pour mettre en évidence l'immunomarquage du marqueur de prolifération de type Ki-67, une synthèse de 10 articles scientifiques utilisant cette technique d'immunohistochimie sur des prélèvements d'ovaire a été réalisée (**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-Ki-67.

Chapitre III : Résultats et discussion

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

Références	Démasquage antigénique - Type de tampon, - Mode (chaleur ou enzyme) - Durée	Blocage les peroxydases endogènes par H₂O₂ - Concentration - Durée	Ac primaire Ki-67 - Nature (mono ou polyclonale) - Dilution - Durée	Blocage site non spécifique - Type de solution - Durée
Takayama et al. (1996)	- Citrate de sodium 9mM, pH= 6, - Micro-onde.	3%, pendant 30 min.	Monoclonal Immunotech (MIB-1) Durée : 18 h à 4 °C. Dilution : 1/40.	0,01 M PBS
Maliqueo et al. (2003)	- Citrate de sodium 10 mM (pH=6) - Bain marie à 95 °C, 20 min.	3%, pendant 5 min.	Monoclonal, pendant la nuit, 4 °C, 1/200.	2% de PBS-BSA pendant 1 h.
Bravalle et al. (2006)	Micro-ondes.	1%.	Polyclonal (Dako). Durée : 18 h à 4°C.	10% de PBS-BSA.
Komarowska et al. (2006)	- Citrate de sodium (0,01 M, pH 6,0). - Bain marie à 98,5 °C, 40 min.	3%, pendant 10 minutes.	DAKO	
Vital-Reyes et al. (2006)	Citrate de sodium 0,01 M (pH= 6), Micro-ondes à 90°C, pendant 5minutes.	à 3%, pendant 10 minutes	Monoclonal , clone MIB-1, (Biogenex, Durée : 10 min Dilution 1:20 .	PBS 1%, pendant 1 h
Salveti et al. (2009)	- Citrate 0,01 M (pH 6,0). - Micro-ondes	1% .	MIB-5. Dako (Denmark). Durée : 18 h à 4°C Dilution : 1/60.	Bloqué avec 10% de sérum de chèvre normal.
Connolly et al. (2014)	- Citrate de sodium (0,01 M, pH= 6).	- 3% pendant 10 min.	Nuit à 4 ° C	BSA 5%
Lombardi et al. (2014)	- Citrate de sodium (pH 6,0) - Bain marie : 95 ° C, 20 min.	- 3%, pendant 5 min.	MIB-5, Dako, Royaume-Uni).	- 2% PBS-BSA - 1 heure.
BohîlTea et al. (2017)	Micro-ondes.	- 3%, pendant 20 min.	Eb-1 (DAKO, 1 h. à T° ambiante Dilution : 1/ 100	-
Lombardi et al. (2020)	- Citrate de sodium (pH=6, 10 mM), - Bain marie à 95 °C, 20 min.	- 3%, pendant 5 min à T° ambiante.	Monoclonal (MIB-5, Dako). Durée nuit à 4°C Dilution : 1/ 100.	2% de PBS-BSA Durée : 1 h.

Chapitre III : Résultats et discussion

Les résultats préliminaires obtenus avec une dilution de l'anticorps primaire anti-Ki-67 à 1/50 montrent un marquage brun au niveau de quelques structures ovariennes (**Figs.35**). Le marquage est observé, au faible (**Fig. 36**) et au fort grossissement (Fig. 36), au niveau des cellules de la thèque d'un follicule secondaire. Le stroma ovarien constitué de tissu conjonctif ne montre aucun de marquage (**Figs. 35-36**).

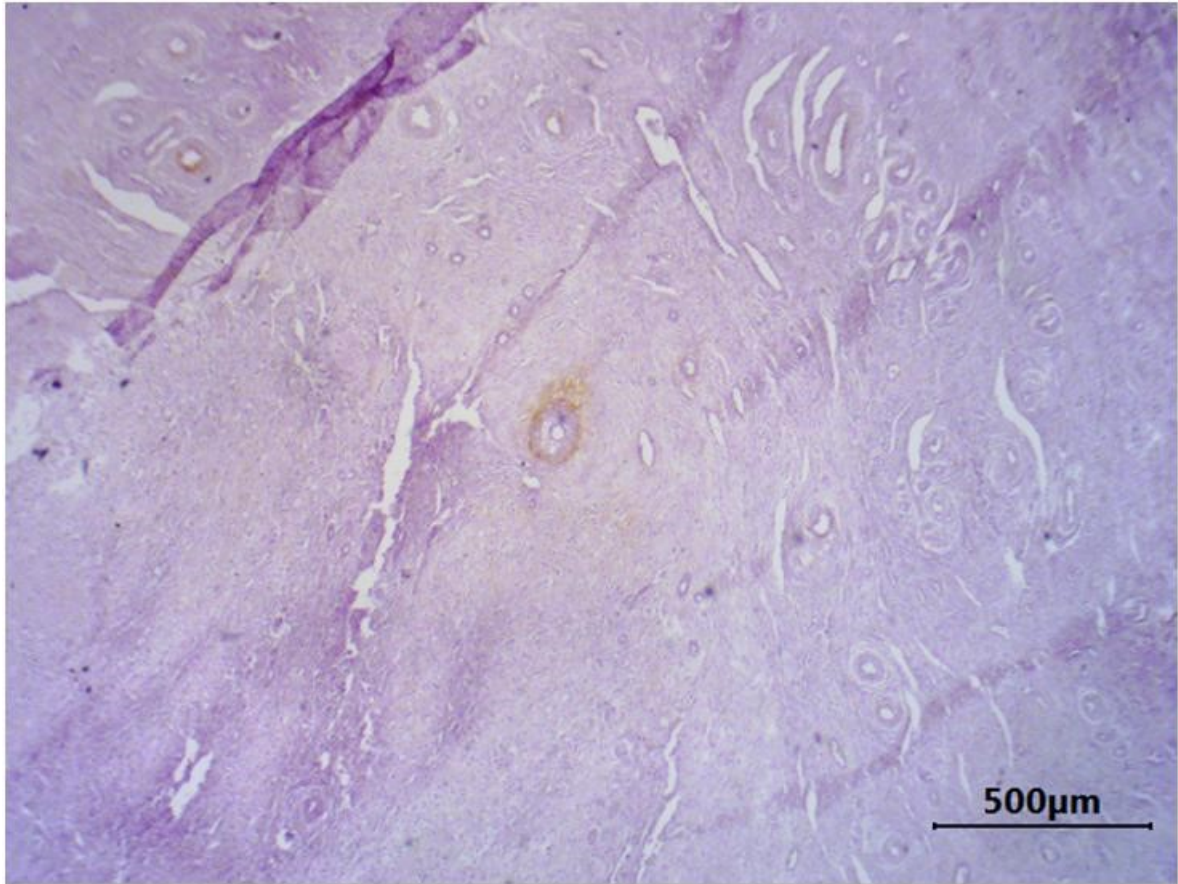


Figure 35: Localisation immunohistochimique de Ki-67 au niveau des cellules thécales d'un follicule secondaire d'un ovaire. Polykystique chez la vache 1/50 x4.

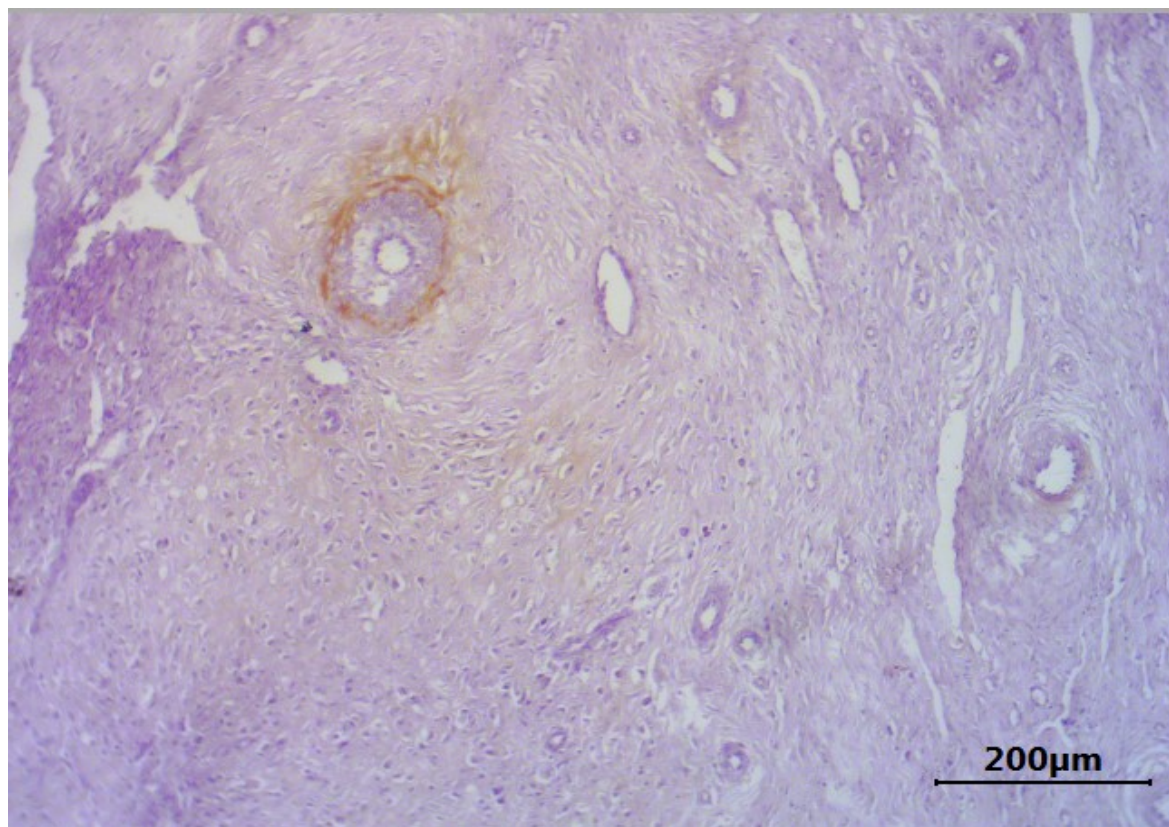


Figure 36: Localisation immunohistochimique de ki 67 au niveau des cellules de granulosa 1/50 x10.

Nos résultats préliminaires sont comparables à celle rapporté chez l'être humain par Maliqueo et al. (2003), Et chez le rat par Lombardi et al. (2014). Par contre, certains auteurs ont observé le marquage au Ki-67 au niveau des cellules de la thèque et aussi au niveau des cellules de la granulosa chez les différentes espèces étudiées (Takayama et al., 1996; Komarowska et al., 2006; Vital-Reyes et al., 2006; Lombardi et al., 2020). Le marquage de ce marqueur de prolifération a été observé uniquement au niveau des cellules de la granulosa chez le rat (Baravalle et al., 2006; Salvetti et al., 2009) et niveau des cellules du stroma ovarien chez l'humain (Connolly et al., 2014).

Par rapport aux résultats des données bibliographiques (**Tab.2**), la localisation de l'immunomarquage du marqueur de prolifération (Ki-67) diffère d'une étude à une autre et varie en fonction de l'espèce et au sein d'une même espèce, les localisations sont contradictoires (**Tab.2**).

Tableau 2 : Synthèse bibliographique sur la localisation du marqueur de la prolifération cellulaire (Ki-67) observé par immunohistochimie, au niveau de l’ovaire.

Références	Espèce	Localisation au niveau de l’ovaire
Takayama et al. (1996)	Humain	- Cellules de granulosa - Cellules de la thèque interne
Maliqueo et al. (2003)	Humain	- Cellules de la thèque interne
Bravalle et al. (2006)	Rat	- Cellules de granulosa
Komarowska et al. (2006)	Humain	- Cellules de granulosa - Cellules de la thèque
Vital-Reyes et al. (2006)	Humain	- Cellules de la granulosa - Cellules de la thèque internes
Salvetti et al. (2009)	Rat	- Cellules de la granulosa
Connolly et al. (2014)	Humain	- Stroma ovarien
Lombardi et al. (2014)	Rat	- Cellule de la thèque interne
Bohîltea et al. (2017)	Humain	- Cellules tumorales ovarienne
Lombardi et al. (2020)	Humain	- Cellules de la granulosa - Cellules de la thèque

En utilisant, un autre marqueur de prolifération, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Isobe et Yoshimura (2007) ont rapporté chez la vache un taux de prolifération cellulaire dans la couche de granulosa des follicules kystiques nettement plus faible dans la région basale que celui des follicules atrétiques. Dans la thèque interne, la fréquence des cellules PCNA-positives dans les follicules atrétiques aux stades précoces est plus élevée que celle dans les follicules kystiques. Ces résultats suggèrent que dans le follicule sain, l'activité proliférative des cellules de la granulosa est plus élevée dans la région basale que dans la région apicale, et que l'activité de prolifération cellulaire dans la granulosa et la thèque interne peut diminuer en association avec l'induction d'un kyste folliculaire.

En 2007, ces auteurs (Isobe and Yoshimura) ont rapporté au niveau des kystes folliculaires de la vache, une prolifération intense dans la zone basale de la granulosa des follicules tertiaires sains et une diminution de marqueur de la prolifération dans les follicules atrétiques et kystiques (**Fig. 37**). Ces résultats sont cohérents avec ceux trouvés dans les follicules kystiques induits chez les bovins par l'ACTH (Ortega et al., 2007) et chez le rat par le valérate d'œstradiol Baravalle et al (2007).

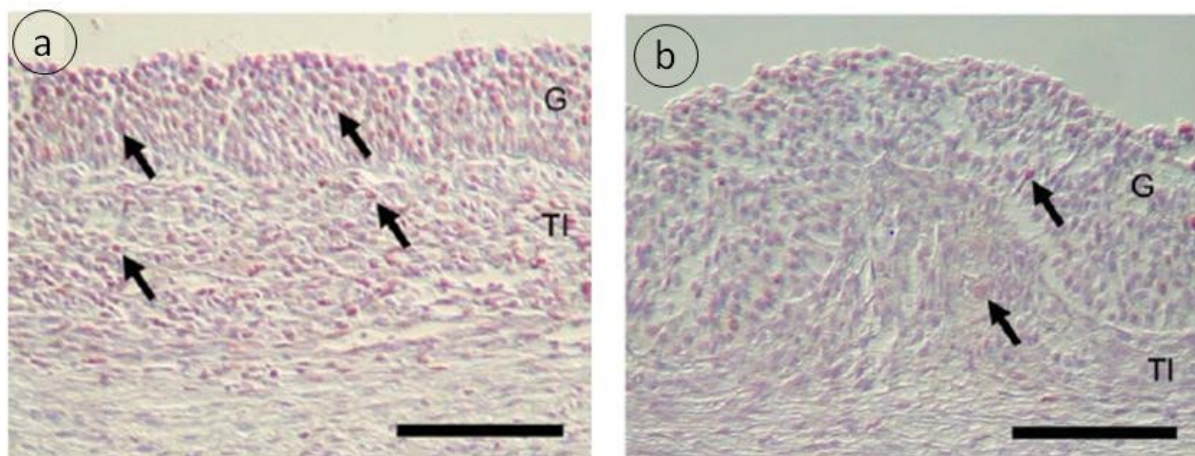
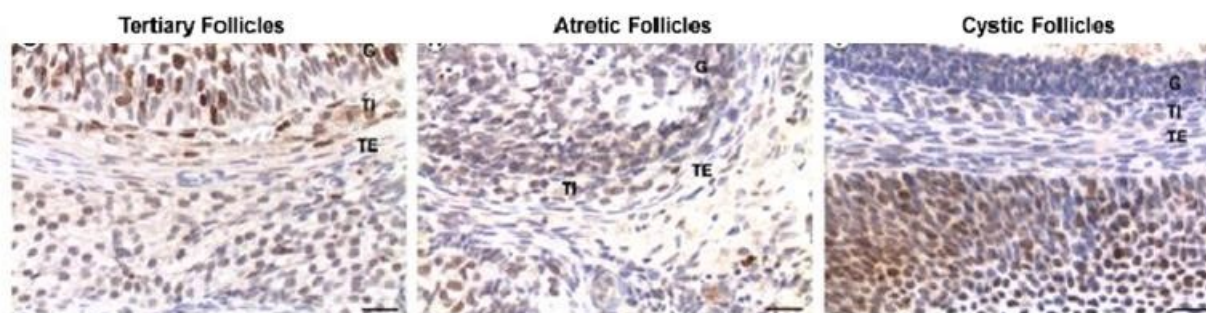


Figure 37: L'immunolocalisation de l'anticorps anti-PCNA dans les follicules sains (a) et kystiques (b). G : Granuleuse ; TI : Thèque interne. Barre d'échelle = 50 μ m (Isobe and Yoshimura, 2007).

L'évaluation du marqueur de prolifération au niveau de l'ovaire sain et ovaire kystique a été étudié chez le rat par Salvetti et al (2009). Ces auteurs ont rapporté que l'intensité du Ki-67 est plus élevée dans les cellules de la granulosa des follicules sains du groupe témoin que dans les follicules sains et kystiques du groupe expérimenté exposé à une lumière continue. Dans les cellules thécales, la prolifération était plus faible dans les kystes que dans les follicules tertiaires. Les follicules atériques de toutes les catégories présentaient de rares indices de prolifération avec Ki-67. En déduit que les cellules des kystes folliculaires sont fonctionnelles par le fait qu'elles produisent des hormones et répondent aux stimuli externe comme la lumière.



G: Granulosa, TI: Thèque interne, TE: Thèque externe. Barre d'échelle = 20 μ m

Figure 38: Localisation de Ki-67 par immunohistochimie (Salvetti et al., 2009).

La prolifération cellulaire dans la granulosa est régulée par la FSH, les œstrogènes, l'insuline ainsi que certains facteurs de croissance (Hirshfield, 1985; Duleba et al., 1997).

Chapitre III : Résultats et discussion

Dans une autre étude, Takayama et al., (1996) ont rapporté chez l'être humain que l'expression de Ki-67 est observée dans les cellules de la granulosa et de la thèque des follicules (**Fig. 39**).

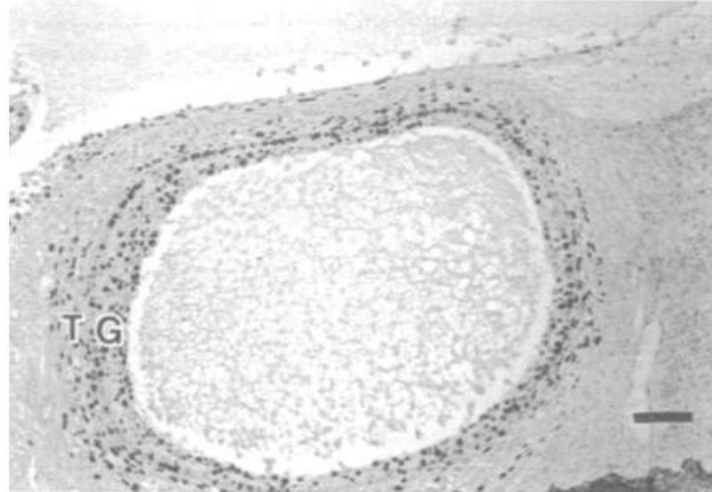


Figure 39 : Localisation immunohistochimique de l'antigène nucléaire lié au cycle cellulaire (Ki-67) dans le follicule avec plus de 4 couches du granulosa. Une immunoréactivité nucléaire a été observée dans les cellules thécales (T) et granulosa (G).
Barre d'échelle : 100 μ m(Takayama et al., 1996).

Les travaux de Vital et al. (2006) Montrent que dans les phases actives du cycle cellulaire, une expression non significative du Ki-67 dans les follicules primordiaux, les follicules en croissance et dans l'épithélium de surface ovarien.

Au niveau ovarien, ces résultats montrent que les cellules de la granulosa et de la thèque interne du follicule kystique présentent une faible activité proliférative et une faible fréquence d'apoptose; cela implique que le follicule kystique se développe lentement et maintient ensuite un état statique sans dégénérescence, ce qui conduit à une persistance à long terme du follicule.

Conclusion

La protéine Ki-67 est associée à la prolifération cellulaire. Son expression et sa localisation varient au cours du cycle cellulaire. En médecine, la présence de Ki-67 au niveau tissulaire peut être à la fois physiologique et physiopathologique.

L'expression de Ki-67 est classiquement détectée par immunohistochimie afin d'évaluer la prolifération cellulaire dans les tissus, et est rapportée sous forme d'un index Ki-67.

L'évaluation de la prolifération cellulaire par un biomarqueur est largement répandue et utilisée en oncologie.

Références Bibliographiques

- Abadie, J., 2001. Les marqueurs de prolifération en oncologie vétérinaire: applications à l'étude pronostique du mastocytome cutané canin. In, City.
- Akers, R.M., Denbow, D.M., 2013. Anatomy and physiology of domestic animals. John Wiley & Sons.
- Aouf, R., Mahi, N., 2020. Les Kystes ovariens chez les bovins dans la région d'Alger In, Biologie des populations et des organismes Université Blida 1, Faculté des sciences de la nature et de la vie City, p. 88.
- Ball, P.J., Peters, A.R., 2008. Reproduction in cattle. John Wiley & Sons.
- Baravalle, C., Salvetti, N.R., Mira, G., Lorente, J., Ortega, H.H., The role of ACTH in the pathogenesis of Polycystic Ovarian Syndrome in the rat: hormonal profiles and ovarian morphology 2007.
- Baravalle, C., Salvetti, N.R., Mira, G.A., Pezzone, N., Ortega, H.H., Microscopic characterization of follicular structures in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in the rat. Archives of medical research 2006. 37, 830-839.
- Barone, R., 2001. Anatomie comparée des mammifères domestiques.
- 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 1975. 41, 1660-1665.
- Bohîltea, R.E., Bacalbaşa, N., Ţurcan, N., Cirstoiu, M.M., Terzea, D.C., Simion, G., Munteanu, O., Berceanu, C., Brătilă, E., Bilateral serous surface papillary borderline ovarian tumor in 19-year-old patient. Ultrasound, immunohistochemical and therapeutic particularities of reproductive age. Rom J Morphol Embryol 2017. 58, 989-995.
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., Lamond, A.I., The multifunctional nucleolus. Nature reviews Molecular cell biology 2007. 8, 574-585.
- Borowski, O., 2006. Troubles de la reproduction lors du peripartum chez la vache laitière. In. Thèse, City.
- Bridger, J.M., Kill, I.R., Lichter, P., Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. Chromosome Research 1998. 6, 13-24.
- Brito, L., Palmer, C., Cystic ovarian disease in cattle. Large Animal Rounds 2004. 4.
- Budras, K.-D., Habel, R.E., Wunsche, A., Buda, S., 2003. Bovine Anatomy: An Illustrated Text. Schlütersche.
- Connolly, F., Rae, M.T., Butler, M., Klibanov, A.L., Sboros, V., McNeilly, A.S., Duncan, W.C., The local effects of ovarian diathermy in an ovine model of polycystic ovary syndrome. PLoS One 2014. 9, e111280.
- Cuq, P., Agba, K., Les organes génitaux de la femelle Zébu. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux 1975. 28, 331-403.
- Deshmukh, P., Ramsey, L., Garewal, H.S., Ki-67 labeling index is a more reliable measure of solid tumor proliferative activity than tritiated thymidine labeling. American journal of clinical pathology 1990. 94, 192-195.
- 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 2000. 147, 355-359.

- Duleba, A.J., Spaczynski, R.Z., Olive, D.L., Behrman, H.R., Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biology of reproduction* 1997. 56, 891-897.
- Edmondson, A., Fissore, R., Pashen, R., Bondurant, R., The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. I. Normal and pathological ovarian structures. *Animal Reproduction Science* 1986. 12, 157-165.
- El Benna, H., Zribi, A., Laabidi, S., Haddaoui, A., Mlika, M., Skhiri, H., Afrit, M., Rahal, K., Boussem, H., Ki-67: rôle dans le diagnostic, le pronostic et le suivi après traitement des cancers du sein Ki-67: role in diagnosis, prognosis and follow-up after treatment of breast cancers. *LA TUNISIE MEDICALE* 2015. 93.
- Farin, P., Youngquist, R., Parfet, J., Garverick, H., Diagnosis of luteal and follicular ovarian cysts in dairy cows by sector scan ultrasonography. *Theriogenology* 1990. 34, 633-642.
- 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* 1992. 200, 1085-1089.
- Fonatsch, C., Duchrow, M., Rieder, H., Schlüter, C., Gerdes, J., Assignment of the human Ki-67 gene (MKI67) to 10q25-qter. *Genomics (San Diego, Calif.)* 1991. 11, 476-477.
- Fortune, Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of reproduction*, 1994. 50, 225-232.
- Fricke, P., Scanning the future—Ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2002. 85, 1918-1926.
- Garverick, H.A., Ovarian follicular cysts in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 1997. 80, 995-1004.
- Gerdes, J., Becker, M., Key, G., Cattoretti, G., Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *The Journal of Pathology* 1992. 168, 85-86.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.-H., Schwab, U., Stein, H., Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The journal of immunology* 1984. 133, 1710-1715.
- Gerdes, J., Li, L., Schlueter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Gerlach, C., Stahmer, I., Kloth, S., Brandt, E., Flad, H.-D., Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *The American journal of pathology* 1991. 138, 867.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H., Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer* 1983. 31, 13-20.
- Gröhn, Y., Erb, H.N., McCulloch, C.E., Saloniemi, H.S., Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. *Preventive Veterinary Medicine* 1990. 8, 25-39.
- Guinebretiere, J.-M., Sabourin, J.-C., 1997. Ki-67, marqueur de prolifération. In: *Annales de pathologie (Paris)*, pp. 25-30.
- Hanzen, C., Aspects épidémiologiques, cliniques, pathogéniques, hormonaux, histologiques et thérapeutiques du kyste ovarien dans l'espèce bovine. *Spectrum* 1988. 6, 1-15.

- Hanzen, C., Lourtie, O., Derkenne, F., Drion, P., 2000. Mise au point relative à la croissance folliculaire chez la vache. 1. Aspects morphologiques et cinétiques. In: Annales de Médecine Vétérinaire, pp. 223-235.
- Heidebrecht, H., Buck, F., Haas, K., Wacker, H., Parwaresch, R., Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. Cell proliferation 1996. 29, 413-425.
- Hirshfield, A.N., Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal, and mature rats. Biology of reproduction 1985. 32, 979-987.
- 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.
- Ijaz, A., Fahning, M., Zemjanis, R., Treatment and control of cystic ovarian disease in dairy cattle: A review. British Veterinary Journal 1987. 143, 226-237.
- Isobe, N., Yoshimura, Y., Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. Journal of Reproduction and Development 2007. 53, 1119-1124.
- Jeffcoate, I., Ayliffe, T., An ultrasonographic study of bovine cystic ovarian disease and its treatment. The Veterinary Record 1995. 136, 406-410.
- Julia, J., Taveau, J., 2013. Physiologie et pathologie de la reproduction de la vache: élaboration de ressources pédagogiques en ligne à partir d'images échographiques de l'appareil génital. In, City.
- Kähn, W., 1994. Atlas de diagnostics échographiques: examen gynécologique et reproduction: équin, bovin, ovin, caprin, porcin, chien, chat. Maloine.
- Kesler, D., Garverick, H., Ovarian cysts in dairy cattle: a review. Journal of animal science 1982. 55, 1147-1159.
- Kesler, D., Garverick, H., Ovarian cysts in dairy cattle: a review. Journal of animal science, 1982. 55, 1147-1159.
- Key, G., Becker, M., Baron, B., Duchrow, M., Schlüter, C., Flad, H., Gerdes, J., New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 1993. 68, 629-636.
- Kill, I.R., Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. Journal of cell science 1996. 109, 1253-1263.
- Komarowska, H., Waśko, R., Iwanik, K., Majewski, P., Rafińska, L., Warenik-Szymankiewicz, A., Sowiński, J., Ghrelin ovarian cell expression in patients with polycystic ovary syndrome: an immunohistochemical evaluation. Hormone and metabolic research 2006. 38, 783-788.
- König, H.E., Hans-Georg, H.-G., Bragulla, H., 2007. Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas. Schattauer Verlag.
- Lombardi, L.A., Mattos, L.S., Simões, R.S., Florencio-Silva, R., Simões, M.d.J., Franco, P.C., Carbonell, A.A.F., Sasso, G.R.d.S., Baracat, E.C., Soares-Jr, J.M., Histomorphometric and immunohistochemical changes in interstitial cells and ovarian follicles of rats with polycystic ovaries treated with clomiphene citrate. Gynecological Endocrinology 2020. 1-4.

- Lombardi, L.A., Simões, R.S., Maganhin, C.C., Baracat, M.C.P., Silva-Sasso, G.R., Florencio-Silva, R., Soares Jr, J.M., Baracat, E.C., Immunohistochemical evaluation of proliferation, apoptosis and steroidogenic enzymes in the ovary of rats with polycystic ovary. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2014. 60, 349-356.
- Lopez-Diaz, M., Bosu, W., A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology* 1992. 37, 1163-1183.
- 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.
- Lüllmann-Rauch, R., 2008. Histologie. De Boeck Supérieur.
- MacCallum, D.E., Hall, P.A., The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *The Journal of Pathology* 2000. 191, 286-298.
- Maliqueo, M., Clementi, M., Gabler, F., Johnson, M.C., Palomino, A., Sir-Petermann, T., Vega, M., Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 2003. 80, 812-819.
- Marieb, E., Hoehn, K., 2001. The respiratory system. Human anatomy and physiology. In. San Francisco: Benjamin Cummings, City.
- Messinis, I., Messini, C., Dafopoulos, K., Luteal-phase endocrinology. *Reproductive biomedicine online* 2009. 19, 15-29.
- Mimoune, N., Azzouz, M.Y., Khelef, D., Kaidi, R., Ovarian cysts in cattle: a review. *Veterinarska stanica* 2021. 52, 0-0.
- Monniaux, D., Le follicule primordial: esquisse d'un portrait. *Gynécologie obstétrique & fertilité* 2010. 38, 528-531.
- Morrow, D., Postpartum ovarian activity and uterine involution in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1966. 149, 1596-1609.
- Nanda, A., Treatment of cystic ovarian disease in cattle-An update. *Vet Bull* 1989. 59, 537-556.
- Odore, R., Re, G., Badino, P., Donn, A., Vigo, D., Biolatti, B., Girardi, C., MODIFICATIONS OF RECEPTOR CONCENTRATIONS FOR ADRENALINE, STEROID HORMONES, PROSTAGLANDIN F2 α AND GONADOTROPINS IN HYPOPHYSIS AND OVARY OF DAIRY COWS WITH OVARIAN CYSTS. *Pharmacological research* 1999. 39, 297-304.
- Ortega, H., Stangaferro, M., Salvetti, N., Arcangelo, D., Palomar, M., Estudio del balance proliferación/apoptosis en estructuras foliculares de bovinos con enfermedad quística ovárica inducida experimentalmente. *Medicina* 2007. 67, 185.
- Peter, T., Infertility due to abnormalities of the ovaries. *Current therapy in large animal theriogenology* 1997. 349-354.
- Peters, A., Veterinary clinical application of GnRH—questions of efficacy. *Animal Reproduction Science* 2005. 88, 155-167.
- Reece, W.O., Rowe, E.W., 2017. Functional anatomy and physiology of domestic animals. John Wiley & Sons.
- Rose, D., Maddox, P., Brown, D., Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *Journal of clinical pathology* 1994. 47, 1010-1014.

- Ross, W., Hall, P., Ki67: from antibody to molecule to understanding? *Clinical molecular pathology* 1995. 48, M113.
- Salvetti, N.R., Panzani, C.G., Gimeno, E.J., Neme, L.G., Alfaro, N.S., Ortega, H.H., An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2009. 7, 68-68.
- Schlüter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M., Key, G., Flad, H.-D., Gerdes, J., The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *The Journal of cell biology* 1993. 123, 513-522.
- Scholzen, T., Dimmler, C., Wohlenberg, C., Flad, H., Gerdes, J., 1997. Novel splice forms of the Ki-67 mRNA. In: *EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, pp. 113-113.
- Seguin, B., Ovarian cysts in dairy cattle. *Current therapy in Theriogenology* 1980.
- Seigneurin, D., Guillaud, P., L'antigène Ki-67, marqueur du cycle cellulaire et de la prolifération tumorale. *Pathologie et biologie* 1991. 39, 1020-1028.
- Shi, S.-R., Key, M.E., Kalra, K.L., Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1991. 39, 741-748.
- 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.
- Sirois, J., Fortune, J., Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonograph. *Biology of reproduction* 1988. 39, 308-317.
- Starborg, M., Gell, K., Brundell, E., Hoog, C., The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *Journal of cell science* 1996. 109, 143-153.
- Suh, C.S., Sonntag, B., Erickson, G.F., The ovarian life cycle: a contemporary view. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2002. 3, 5.
- Takayama, K., Fukaya, T., Sasano, H., Funayama, Y., Suzuki, T., Takaya, R., Wada, Y., Yajima, A., Endocrinology: Iminunohistochemical study of steroidogenesis and cell proliferation in polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction* 1996. 11, 1387-1392.
- Urruticoechea, A., Smith, I.E., Dowsett, M., Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *Journal of clinical oncology* 2005. 23, 7212-7220.
- Vanholder, T., Opsomer, G., De Kruif, A., Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reproduction Nutrition Development*, 2006. 46, 105-119.
- Vital-Reyes, V., Rodríguez-Burford, C., Chhieng, D.C., Alvarado-Cabrero, I., Reyes-Fuentes, A., Grizzle, W.E., Ovarian expression of markers associated with proliferation or apoptosis in women with diminished ovarian reserve. *Fertility and sterility* 2006. 86, 176-185.
- Wheeler, P.R., Young, B., Heath, J.W., 2001. *Histologie fonctionnelle*. De Boeck Supérieur.

- William, J.B., Linda, M.B., 2000. Color atlas of veterinary histology. In. Lippincott Williams & Wilkins, City.
- Winking, H., Gerdes, J., Traut, W., Expression of the proliferation marker Ki-67 during early mouse development. Cytogenetic and genome research 2004. 105, 251-256.
- Woolums, A.R., Peter, A.T., Cystic ovarian condition in cattle. 1. Folliculogenesis and ovulation. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 1994. 16, 935-&.
- Yaniz, J., Murugavel, K., López-Gatius, F., Recent developments in oestrous synchronization of postpartum dairy cows with and without ovarian disorders. Reproduction in Domestic Animals 2004. 39, 86-93.