



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



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

*Mémoire*

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

*Option*

*Biotechnologie et Pathologie Moléculaire*

*Thème*

## Évaluation immunohistochimique de l'apoptose ovarienne au cours du cycle œstral chez la vache

*Présenté par*

Boualbani Nour Elhouda et Kachouane Amel

*Devant le Jury :*

<i>M. Benazouz F.</i>	<i>MAA</i>	<i>SNV, USDBlida1</i>	<i>Présidente</i>
<i>M. Zatra Y.</i>	<i>MCB</i>	<i>SNV, USDBlida1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M. Boukenaoui-Ferrouk N.</i>	<i>MCA</i>	<i>ISV, USDBlida1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M. Ferrouk M.</i>	<i>MCB</i>	<i>ISV, USDBlida1</i>	<i>Co-Promoteur</i>

*Session 2019 / 2020*

## Dédicace

*C'est avec beaucoup d'orgueil que j'ai dédié ce travail à mes parents, car ils sont orgueilleux à et m'encourager de terminer mes études.*

*Je dédie aussi ce travail, avec beaucoup de joie et d'estime à mes frères surtout Boualem, Yazid, Sid Ahmed, Toufik et Abdelhak et ma petite sœur Warda.*

*Je dédie aussi ce travail à tous mes amis et mes camarades, car ils sont m'encourager à terminer mes études.*

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à*

*Mes chers parents **Abdel halim & Hakima** qui sont la source de mon bonheur et qui sont là pour me soutenir à tout moment.*

*Aussi à mes frères et sœurs : **Sid Ahmed, Hadjer, Mourad, Yasmine, et Hakim.***

*A mes belles-sœurs : **Bedra & Sabrina.***

*A mes nièces : **Malak, sérine, Hadil, et Hadjer.***

*A mes neveux : **Abdellah, Rida, wassim, moussa, Ibrahim et Youcef.***

*A ma seule chère cousine : **Amina Lazli.***

*A mes spéciaux amis : **Imene. M, Ryma. J, Ahlem. A, et Tarek. B.***

*A la source de mon espoir, ma patience : **Osama. A***

***A tous ce qui m'aiment et me respectent.***

## Remerciements

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

Nous tenons beaucoup à remercier notre inoubliable promotrice **Docteur Boukenaoui-Ferrouk N.** qui nous ont fait l'honneur de nous encadré pour réaliser notre travail et pour l'encouragement qui nous ont donnée, ainsi que leur disponibilité, soutien, conseil accompagnement, sans relâche durant notre travail, leur expérience nous a énormément appris à parfaire notre esprit d'analyse et de recherche.

Nous tenons beaucoup à remercier aussi notre Co-promoteur **Docteur Ferrouk M.** pour avoir codirigé notre travail, ces précieux conseils et pour tout le temps qu'il nous consacré.

Nos remerciements s'adressent à **Docteur Benazouz F. Maitre-assistant** qui nous ont fait l'honneur de nous présider le jury.

Nos remerciements s'adressent à **Docteur Zatra Y.** Maitre de conférences B qui nous ont fait l'honneur d'accepté d'examiner notre travail.

Un grand merci est adressé à tous nos enseignants, nous tenons à exprimer notre reconnaissance pour tous ce qu'ils nous ont donnée comme savoir et savoir-faire.

A tous les personnes qui ont aidé de près et de loin pour la réalisation de ce travail.

## Table des matières

<b>Dédicace</b> .....	ii
<b>Remerciements</b> .....	iv
<b>Table des matières</b> .....	v
<b>Liste des figures</b> .....	vii
<b>Liste de tableaux</b> .....	ix
<b>Liste des abréviations</b> .....	x
<b>Résumé</b> .....	xi
Introduction .....	1
Partie bibliographique.....	2
<b>Chapitre I : Ovaire et cycle œstral chez la vache</b> .....	<b>3</b>
I.1. Anatomie de l'appareil génitale .....	4
I.2. Ovaire .....	5
I.3. Cycle œstral .....	5
I.3.1. Folliculogenèse.....	6
I.3.2. Notion de vagues de croissance folliculaire .....	8
I.3.3. Différentes phases du cycle oestral .....	9
I.3.3.1. Phase folliculaire .....	9
I.3.3.2. Phase lutéale .....	10
I.3.4. Régulation physiologique du cycle oestral.....	11
<b>Chapitre II : Physiologie de l'apoptose et altérations ovariennes intra-folliculaires</b> .....	<b>14</b>
II.1. Mort cellulaire .....	15
II.1.1. Apoptose .....	16
II.1.1.1. Aspect morphologique de cellules apoptotiques.....	16
II.1.1.2. Mécanismes moléculaires de l'apoptose .....	17
II.1.1.3. Caspases .....	17
II.1.2. Autophagie .....	19
II.1.2.1. Macro-autophagie.....	19
II.1.2.2. Micro-autophagie.....	20
II.1.2.3. Système d'autophagie médiée par un chaperon .....	21
II.1.3. Nécrose .....	21
II.2. Physiopathologie de l'apoptose .....	22

<b>Chapitre III : Méthodes d'exploration de l'apoptose</b> .....	27
III.1. Méthode d'immunohistochimie .....	28
III.2. Méthode de TUNEL .....	29
III.3. Méthode d'hybridation <i>in situ</i> .....	30
III.4. Cryométrie en flux.....	30
<b>Partie expérimentale</b> .....	31
<b>Matériel et méthodes</b> .....	32
I. Animal.....	33
II. Méthodes utilisées.....	34
II.1. Protocole de la technique d'histologie .....	34
II.2. Technique de l'immunohistochimie.....	36
Résultats et discussion .....	40
<b>Conclusion</b> .....	55
<b>Références bibliographiques</b> .....	57
<b>Annexes</b> .....	62

## Liste des figures

<b>Fig. 1 :</b> Localisation de l'appareil reproducteur chez la vache .....	4
<b>Fig. 2 :</b> Représentation schématique de l'appareil reproducteur de la vache.....	4
<b>Fig. 3 :</b> Représentation schématique d'un ovaire de vache .....	5
<b>Fig. 4 :</b> Événements ovariens et concentrations plasmatiques d'hormones de la reproduction.....	6
<b>Fig. 5 :</b> Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire .....	7
<b>Fig. 6 :</b> Vagues folliculaires et le développement du corps jaune au cours de cycle œstral bovin.....	9
<b>Fig. 7:</b> Interrelations entre l'hypothalamus, hypophyse, ovaire et utéro .....	12
<b>Fig. 8 :</b> Schéma représentatif les types de mort cellulaire .....	15
<b>Fig. 9 :</b> Diagramme pour illustrer les caractéristiques morphologiques de l'apoptose .....	16
<b>Fig. 10 :</b> Classification des caspases apoptotiques.....	17
<b>Fig.11 :</b> Voies de signalisation apoptotique .....	18
<b>Fig. 12:</b> Représentation schématique de la voie autophagique.....	20
<b>Fig.13 :</b> Représentation schématique de la formation des autophagosomes. ....	20
<b>Fig. 14 :</b> Représentation schématique de la voie autophagique.....	21
<b>Fig. 15 :</b> Représentation schématique de la voie autophagique, système d'autophagie médiée par un chaperon .....	21
<b>Fig. 16 :</b> Représentation schématique de caractéristiques morphologiques de la nécrose .....	22
<b>Fig. 17 :</b> Représentation schématique des changements morphologiques caractéristiques de l'atréisie des follicules à antrum .....	24
<b>Fig. 18 :</b> Modèle schématique de la croissance des cellules de la granulosa. ....	25
<b>Fig. 19 :</b> Représentation schématique du principe de technique de l'immunohistochimie.....	28
<b>Fig. 20 :</b> Illustration schématique du méthode de TUNEL .....	29
<b>Fig. 21 :</b> Prélèvement ovarien dans une cassette d'histologie.....	34
<b>Fig. 22 :</b> Mise en place centrée du prélèvement ovarien dans le moule métallique.....	35
<b>Fig. 23 :</b> Remplissage du moule métallique .....	35
<b>Fig. 24 :</b> Mise en place de l'ensemble moule- cassette sur un bain de glace .....	35
<b>Fig. 25 :</b> Microtome (a) et bain marie (b).....	36
<b>Fig. 26 :</b> Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie .....	36
<b>Fig. 27 :</b> Validité de la technique d'immunohistochimie.....	38
<b>Fig. 28 :</b> Batterie de déshydratation et d'éclaircissement .....	39
<b>Fig. 29 :</b> Montage de la coupe histologique (a) ; liquide de montage « Eukitt» (b).....	39
<b>Fig. 30 :</b> Observation au microscope photonique .....	40
<b>Fig. 31 :</b> Détection de l'apoptose (flèches) à l'aide du test TUNEL .....	42
<b>Fig. 32 :</b> Expression de Fas, ligand Fas, ARNm et protéine Bcl-2, Bax et caspase-3 dans des ovaires de rat entiers tout au long du cycle œstral .....	44
<b>Fig.33 :</b> Localisation immunohistochimique de diverses protéines impliquées dans l'apoptose dans les follicules pré-antraux de rats cyclistes. ....	44
<b>Fig.34 :</b> Localisation immunohistochimique de diverses protéines impliquées dans l'apoptose dans les follicules antraux de rats cyclistes.....	46

<b>Fig. 35</b> : Localisation immunohistochimique de diverses protéines impliquées dans l'apoptose dans les cellules épithéliales de surface ovarienne (OSE) de rats cyclistes.....	47
<b>Fig. 36</b> : Apoptose dans les cellules de la granulosa bovine .....	48
<b>Fig. 37</b> : Images de phagocytose homologue observée dans des GC en culture .....	48
<b>Fig. 38</b> : La coloration à l'huile rouge (ORO : oil red O) des CG contrastait avec l'hématoxyline .....	49
<b>Fig. 39</b> : (a) Phagocytose observée dans les cultures de CG colorées avec H et E.....	49
<b>Fig. 40</b> : Immunolocalisation de Fas et CD45 dans la paroi du follicule bovin isolé des follicules préovulatoires .....	50
<b>Fig. 41</b> : Détection de la fragmentation de l'ADN dans les cellules lutéales bovines par microscopie à fluorescence .....	51
<b>Fig. 42</b> : Apoptose induite par la prostaglandine F2 dans le corps jaune bovin .....	52
<b>Fig. 43</b> : Coupes représentatives des corps jaunes de coloration immunohistochimique pour Bax....	52
<b>Fig. 44</b> : Détection de la protéine Bcl2 anti-apoptotique dans l'ovaire humain adolescent.....	53
<b>Fig. 45</b> : Immunocoloration pour les deux protéines Fas / FasL dans l'ovaire adolescent humain .....	53
<b>Fig. 46</b> : Immunodétection pour caspase-3 et TUNEL dosé dans l'ovaire humain .....	54

## Liste de tableaux

<b>Tab.1</b> : principales caractéristiques des follicules ovariens chez les bovins .....	8
<b>Tab.2</b> : les principales caractéristiques de quatre phases de cycle oestral .....	11
<b>Tab.3</b> : Hormones impliquées dans le cycle oestral.....	11
<b>Tab.4</b> : classification des corps jaunes au cours de cycle oestral des vaches .....	33
<b>Tab.5</b> : Localisation et l'évaluation de l'intensité de marquage de diverses protéines apoptotiques dans l'ovaire de rat.....	45
<b>Tab.6</b> : Tableau comparatif des résultats des articles synthétisés .....	54

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique.

**ARNm** : Acide Ribonucléique Messenger.

**Atg** : Autophagy related, lié à l'autophagie

**BGC-1** : Bovien granulosa cells line( Lignée de cellules de granulosa bovine).

**CG** : Cellules de la Granulosa.

**CPBG** : Primary Culture of Bovine Granulosa cells (culture primaire de cellules de la granulosa bovine).

**E2** : Estradiol.

**FSH** : Follicle Stimulating Hormone( hormone folliculo-stimulant).

**GnRH** : Gonadotrophin-Releasing Hormone (hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires).

**HIS** : hybridation In Situ.

**Hsc70** : Heat Shock 70(protéine de choc thermique).

**IHC** : ImmunoHistoChimie.

**LC3-PE** : Light Chain3-phosphatidyl Ethanolamine (phosphatidylethanolamine à chaîne légère3).

**LH** : Luteinizing Hormone (hormone lutéinisante).

**OO** : Oocyte (Ovocyte).

**ORO** : Oil Red O( huile rouge O).

**OSE** : Ovary Surface Epithlium ( épithélium de surface ovarien).

**P4** : Progestérone.

**PARP-1** : Polymérase 1.

**PI** : Propidium Iodide( Iodure de prépodium).

**TUNEL** : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling( Marquage d'extrémité de Nick End du dUTP de la désoxynucléotidyltransférase terminale) .

**VIH** : Human Immunodeficiency Virus( virus de l'immunodéficience humaine).

## Résumé

L'objectif de notre travail est d'étudier, la localisation et l'évaluation de marqueurs de l'apoptose au niveau de l'ovaire au cours du cycle œstral chez la vache par la technique d'immunohistochimie. Un certain nombre d'articles bibliographiques sont utilisés pour essayer de déterminer les résultats attendus sur les échantillons d'ovaires qui devraient être récoltés au niveau des abattoirs en dehors de la situation actuelle du covid-19. L'analyse des résultats des différents travaux réalisés par des chercheurs montre que l'apoptose a été localisée dans tous les types de cellules ovariennes à divers stades du cycle œstral, en utilisant la détection de la caspase-3 active et l'intensité de l'immunomarquage des protéines Fas, Bax et caspase-3 étaient les plus élevés au diœstrus et plus faible au metoœstrus. Par contre, l'intensité de l'immunomarquage du FasL et de la protéine Bcl-2 est plus faible au diœstrus et augmente au metoœstrus. En conclusion, dans toutes les structures ovariennes examinées, des variations dans l'intensité de marquage des cellules apoptotiques ont été observées aux différents stades du cycle œstral, indiquant l'influence de l'apoptose au cours du cycle oestral.

**Mots clés :** Apoptose, immunohistochimie, vache, ovaire, cycle oestral.

## Abstract

The objective of our work was to study the localization and the evaluation of markers of apoptosis in the ovary during the estrus cycle in cows by the technique of immunohistochemistry. A number of bibliographic articles are used to try to determine the expected results on ovarian samples that should be collected at slaughterhouse level outside of the current covid-19 situation. Analysis of the results of the various works carried out by researchers shows that apoptosis has been localized in all types of ovarian cells at various stages of the estrus cycle, using the detection of active caspase-3 and the intensity of I. Immunostaining of Fas, Bax, and caspase-3 proteins were highest at diestrus and lowest at metoestrus. On the other hand, the intensity of immunostaining of FasL and Bcl-2 protein is lower at diestrus and increases at metoestrus. In conclusion, in all the ovarian structures examined, variations in the intensity of labeling of the apoptotic cells were observed at different stages of the estrus cycle, indicating the influence of apoptosis during the estrous cycle. The Fas protein was detected in the granulosa and theca cells of preovulatory follicles before and after the LH surge. Immunohistochemical analysis of Bax revealed increased labeling in the perinuclear region of luteal cells during apoptosis induced by a luteolytic agent. In conclusion, in all the ovarian structures examined, variations in the intensity of labeling of the apoptotic cells were observed at different stages of the estrus cycle, indicating the influence of apoptosis during the estrous cycle. The Fas protein was detected in the granulosa and theca cells of preovulatory follicles before and after the LH surge. Immunohistochemical analysis of Bax revealed increased labeling in the perinuclear region of luteal cells during apoptosis induced by a luteolytic agent. In conclusion, in all the ovarian structures examined, variations in the intensity of labeling of the apoptotic cells were observed at different stages of the estrus cycle, indicating the influence of apoptosis during the estrous cycle.

**Keywords :** Apoptosis, immunohistochemistry, cow, ovary, estrous cycle.

## ملخص

الهدف من عملنا هو دراسة وتوطين وتقييم علامات موت الخلايا المبرمج في المبيض أثناء دورة الشبق في الأبقار من خلال تقنية الكيمياء الهستولوجية المناعية. يتم استخدام عدد من المقالات الببليوغرافية لمحاولة تحديد النتائج المتوقعة على عينات المبيض التي يجب جمعها من المسالخ خارج حالة كوفيد-19 الحالية. يوضح تحليل نتائج الأعمال المختلفة التي قام بها الباحثون أن موت الخلايا المبرمج قد تم تحديده في جميع أنواع خلايا المبيض في مراحل مختلفة من الدورة الشبقية ، وذلك باستخدام الكشف عن الكاس باس النشط -3 وشدة تواجد لبروتينات Fas و Bax و caspase-3 أعلى في dioestrus وأقل في metoestrus. في المقابل، فإن شدة تواجد بروتين FasL و Bcl-2 أقل في dioestrus وتزداد في metoestrus. في الختام ، في جميع هياكل المبيض التي تم فحصها ، لوحظت اختلافات في شدة وسم الخلايا المبرمج في مراحل مختلفة من دورة الشبق ، مما يشير إلى تأثير موت الخلايا المبرمج أثناء الدورة الشبقية.

**الكلمات المفتاحية :** موت الخلايا المبرمج ، الكيمياء النسيجية المناعية ، البقرة ، المبيض ، الدورة الشبقية.

## Introduction

Dans les conditions normales, une bonne compréhension du cycle œstral chez les bovins peut aider les éleveurs à relever les problèmes de la reproduction que ce soit tant chez les génisses que chez les vaches. Cette compréhension est également essentielle lors de l'utilisation des hormones pour contrôler et synchroniser les cycles œstraux chez les bovins.

Le cycle œstral est complexe et régulé par plusieurs hormones et organes dont certains favorisent l'ovulation et d'autres induisent l'atrésie folliculaire. En effet l'atrésie est un mécanisme complexe contrôlé par trois mécanismes, apoptose, nécrose et autophagie (Drion *et al.*, 1996). L'apoptose joue un rôle actif et important dans les fonctions physiologiques de l'ovaire (D'Haeseleer *et al.*, 2006). Ce mécanisme pour être contrôlé par les protéines de la famille bcl-2 et des caspases (Okuda *et al.*, 2004).

Une caractéristique très importante de l'atrésie est la sensibilité des ovocytes et des cellules de la granulosa (CG) à l'apoptose, qui change au cours de la folliculogénèse. Dans les follicules pré-antraux uniquement, elle est initialement observée dans l'ovocyte. A l'inverse, dans les follicules antraux, ce sont les CG qui sont dégradées en premier. Le complexe cumulus-ovocyte reste souvent sain et intact jusqu'aux derniers stades de l'atrésie. Ceci est expliqué par le fait que la croissance des ovocytes se produit principalement avant la mise en place de l'antrum (Picton, 2001) et la plus grande expansion du nombre de CG se produit au début de la formation de l'antrum (Mcgee and Hsueh, 2000). En ce qui concerne les cellules de la thèque interne (Tajima *et al.*, 2002), chez les bovins, les cellules apoptotiques ont été initialement détectées aux premiers stades de l'atrésie lorsque ces cellules apoptotiques étaient visibles dans les couches médianes de la granulosa (Nakayama *et al.*, 2000). Le rôle des cellules de la thèque est de réguler le devenir des CG tout au long du processus de maturation folliculaire en sécrétant des facteurs qui suppriment l'apoptose (Tajima *et al.*, 2002). L'objectif de notre travail est d'évaluer la caspase-3 active par immunohistochimie au cours des différentes phases du cycle oestral chez la vache.

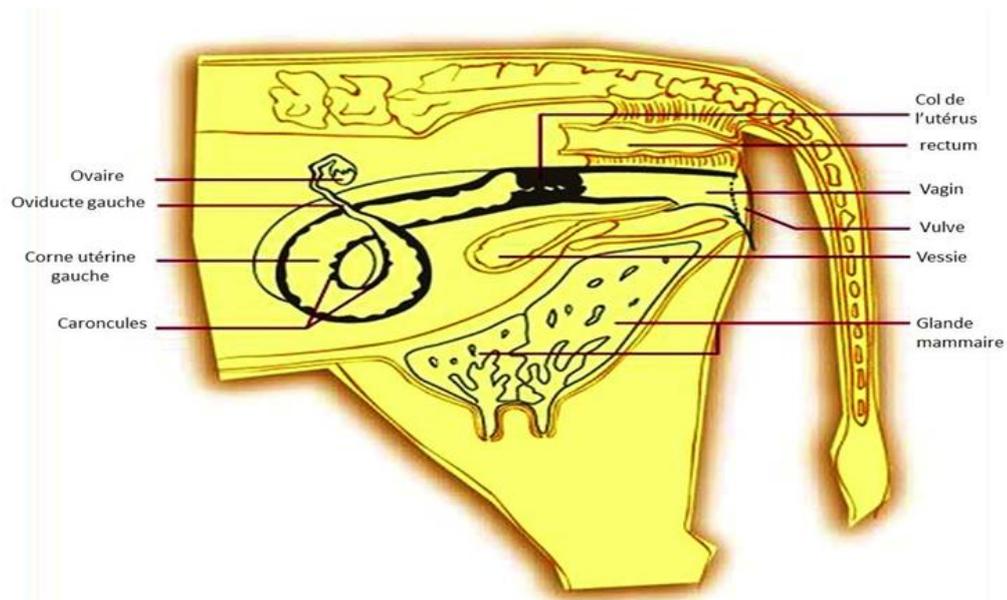
Après une description d'une synthèse bibliographique sur l'anatomie et la physiologie de l'ovaire, la description du cycle oestral et les mécanismes régulateurs de la mise en place de l'apoptose et leurs dysfonctionnements, nous décrirons le matériel animal et le protocole de la technique d'immunohistochimie utilisé pour mettre en évidence la caspase-3 active; nos résultats, attendus sans la situation actuelle du Covid-19, seront discutés à la lumière des données bibliographiques.

# **Partie bibliographique**

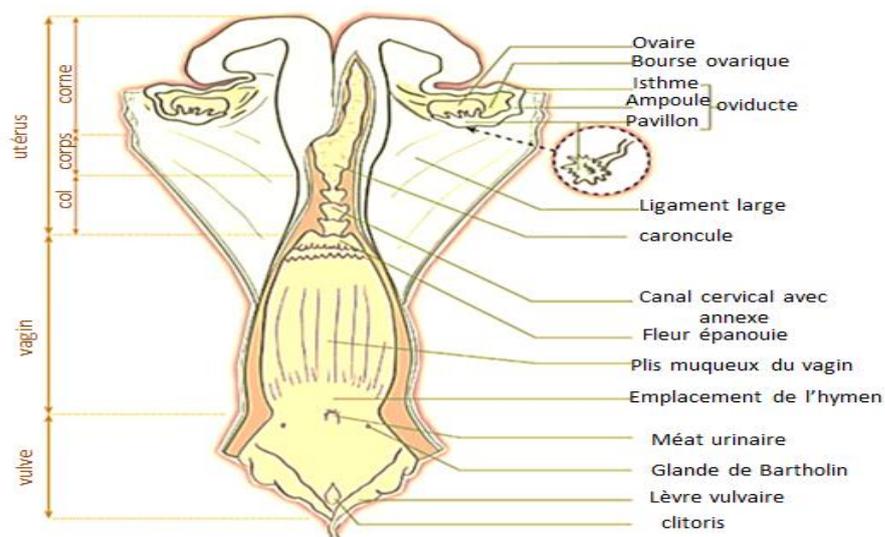
**Chapitre I :**  
**Ovaire et cycle œstral chez la**  
**vache**

### I.1. Anatomie de l'appareil génitale

L'appareil reproducteur de la femelle a un rôle non seulement d'élaboration des gamètes femelles et leur acheminement mais aussi c'est le lieu de rencontre du sperme. Si la fécondation a lieu, le développement de l'œuf se poursuit pour donner un nouveau-né. Il comprend deux ovaires et des voies génitales comme rapportées par les figures 1 et 2 (Leborgne *et al.*, 2014).



**Fig. 1 :** Localisation de l'appareil reproducteur chez la vache (Leborgne *et al.*, 2014)

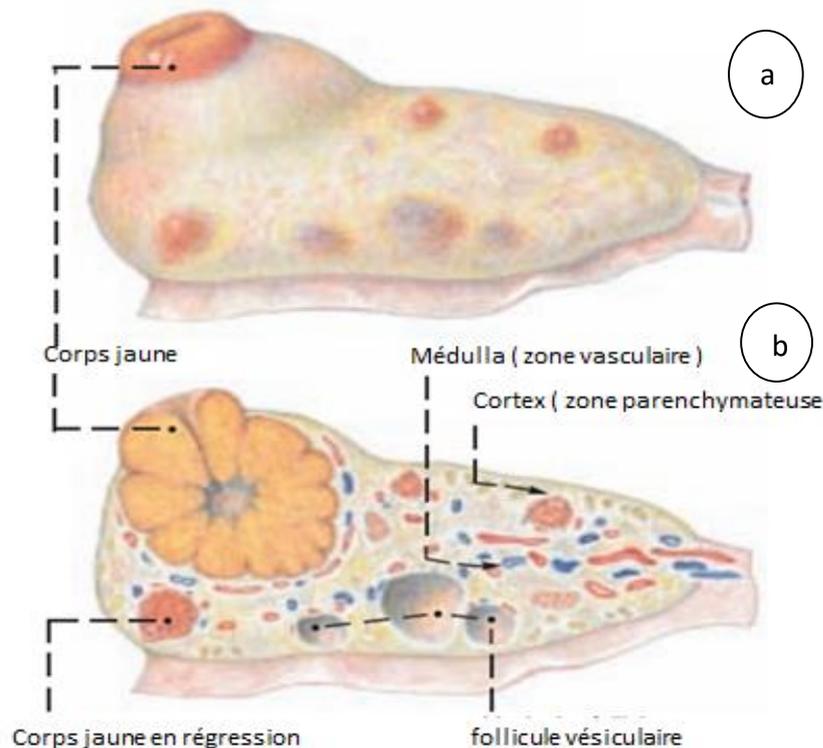


**Fig. 2 :** Représentation schématique de l'appareil reproducteur de la vache (Leborgne *et al.*, 2014)

## I.2. Ovaire

L'ovaire est le principal organe de l'appareil reproducteur. Il a un rôle à la fois endocrinien par la production des hormones libérées dans la circulation sanguine et un rôle cytologique par les ovules libérées pendant l'ovulation (Frandsen *et al.*, 2013a). Du point de vue anatomique, l'ovaire présente une forme ovalaire à circulaire, de surface bosselée par des follicules antraux et parfois sur le côté gauche ou droit il y a un corps jaune (Figure 3) (Leborgne *et al.*, 2014). En coupe longitudinale, il est composé de deux zones :

- une zone centrale, appelée médullaire (zone vasculaire), formée de tissu conjonctif, de vaisseaux lymphatiques et sanguins et de nerfs.
- une zone périphérique, appelée cortex (zone parenchymateuse), composée de nombreux follicules aux différents stades folliculaire (Linford and Nabors, 2014).

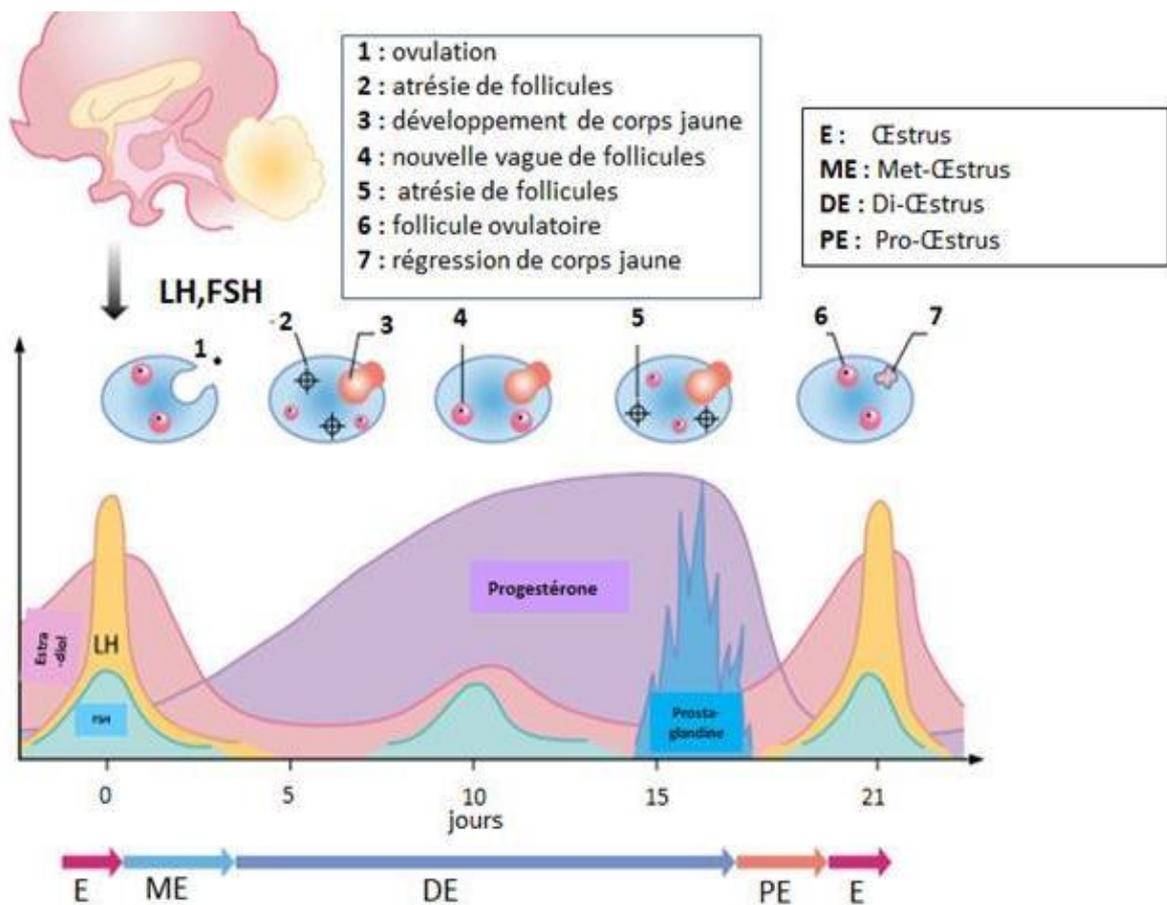


**Fig. 3 :** Représentation schématique d'un ovaire de vache (Liebich and Budras, 2010), vue externe (a) et coupe longitudinale (b)

## I.3. Cycle œstral

Le cycle œstral représente le schéma cyclique de l'activité ovarienne qui permet aux femelles de passer d'une période de non-réceptivité à une réceptivité reproductive permettant finalement l'accouplement et l'établissement ultérieur de la gestation.

Le début des cycles œstraux survient au moment de la puberté. La durée normale d'un cycle œstral chez les bovins est de 18 à 24 jours. Le cycle œstral est divisé en plusieurs phases en fonction des changements de comportement ou des changements structurels des organes génitaux internes et externes. Le proœstrus et l'œstrus correspondent à la phase folliculaire ovarienne et sont dominés par les œstrogènes. Le metœstrus et le diœstrus correspondent à la phase lutéale et la progestérone est la principale hormone stéroïdienne (Frandsen *et al.*, 2013b) (Figure 4).

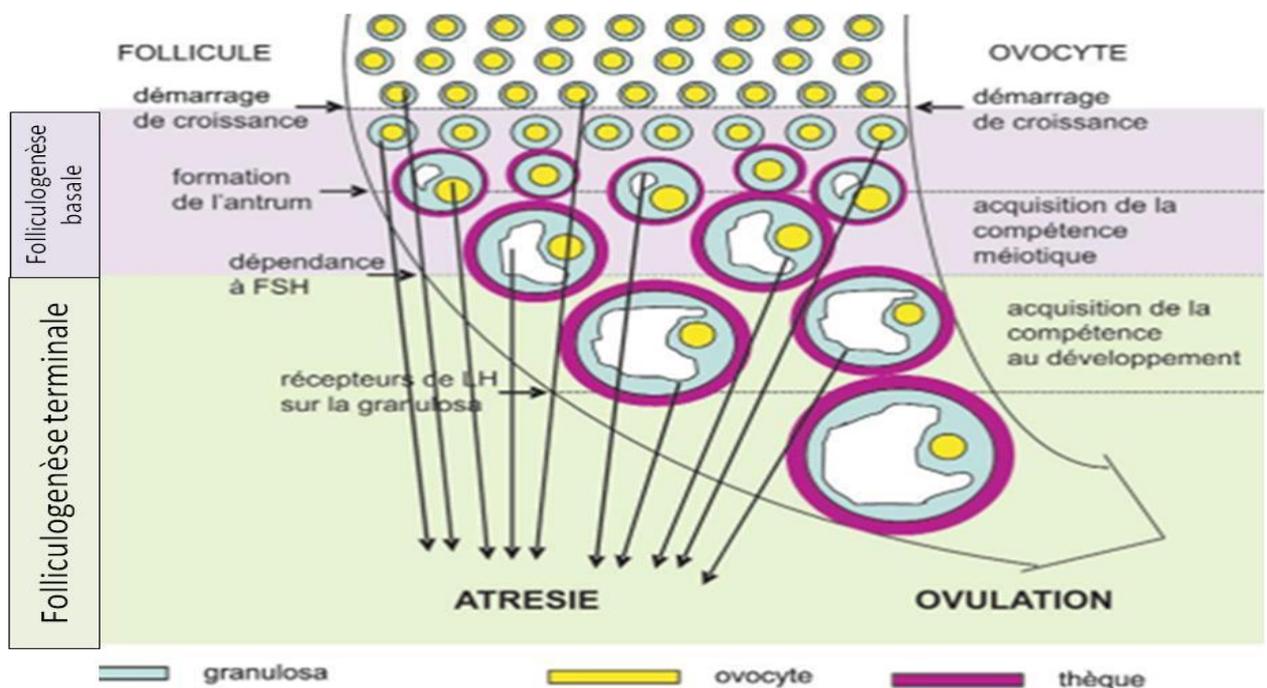


**Fig . 4 :** Événements ovariens et concentrations plasmatiques d'hormones de la reproduction au cours du cycle œstral chez la vache (Hyttel *et al.*, 2009)

### I.3.1. Folliculogénèse

A niveau de chaque ovaire, des follicules primordiaux entrent en phase de croissance chaque jour. Ils deviennent des follicules primaires, secondaires puis tertiaires (ou cavitaires ou antraux) (Figure 5) (Leborgne *et al.*, 2014).

La croissance folliculaire est divisée en deux phases successives :



**Fig. 5 :** Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire (Monniaux *et al.*, 2009)

### I.3.1.1. Folliculogenèse basale

La folliculogenèse basale est dite non gonado-dépendante car elle se déroule en absence de FSH. Au cours de cette phase, il y a l'acquisition la capacité méiotique de l'ovocyte (Monniaux *et al.*, 2009).

### I.3.1.2. Folliculogenèse terminale

Elle est dite gonado-dépendante, elle nécessite la présence de l'hormone stimulateur folliculaire (FSH). Au cours de cette phase, le follicule préovulatoire acquit les stades terminaux de la maturation folliculaire, après l'apparition des récepteurs de l'hormone lutéinisante (LH) sur les cellules de la granulosa et il devient apte à ovuler. Elle est contrôlée par des nombreux facteurs endocriniens (facteurs de croissance, matrice extracellulaire, protéases, stéroïdes) agissant en synergie avec les gonadotropines pour réguler son déroulement (Monniaux *et al.*, 2009).

Au cours de chaque stade, un type de follicule acquit des caractéristiques qui sont présentés dans le tableau 1.

**Tab. 1** principales caractéristiques des follicules ovariens chez les bovins (Drion *et al.*, 1996)

Stades folliculaire	Nombre de cellules folliculaire	Structures en formation	Diamètre folliculaire (µm)	Diamètre ovocytaire (µm)
<b>Primordial</b>	-Quelques cellules aplaties	Membrane basale	30-50	20-35
<b>Primaire</b>	- Une couche de cellules cuboïdales	Membrane de Salvjanski	40-60	30-40
<b>Secondaire</b>	-Plusieurs couches de cellules	- Zone pellucide - Thèques interne et externe	200-300	60
<b>Tertiaire</b>	- Couche multiples de cellules	- Cumulus oophorus	-	100-130

### **I.3.2. Notion de vagues de croissance folliculaire**

Le développement folliculaire terminal se déroule se forme de vagues folliculaires, composée d'une vague de croissance suivi par une vague de sélection d'un ou deux follicules appelés dominants et de leur évolutions vers l'ovulation ou de leur régression dans les conditions endocriniennes défavorables (Figure 6) (Monniaux *et al.*, 2009).

#### **I.3.2.1. Recrutement**

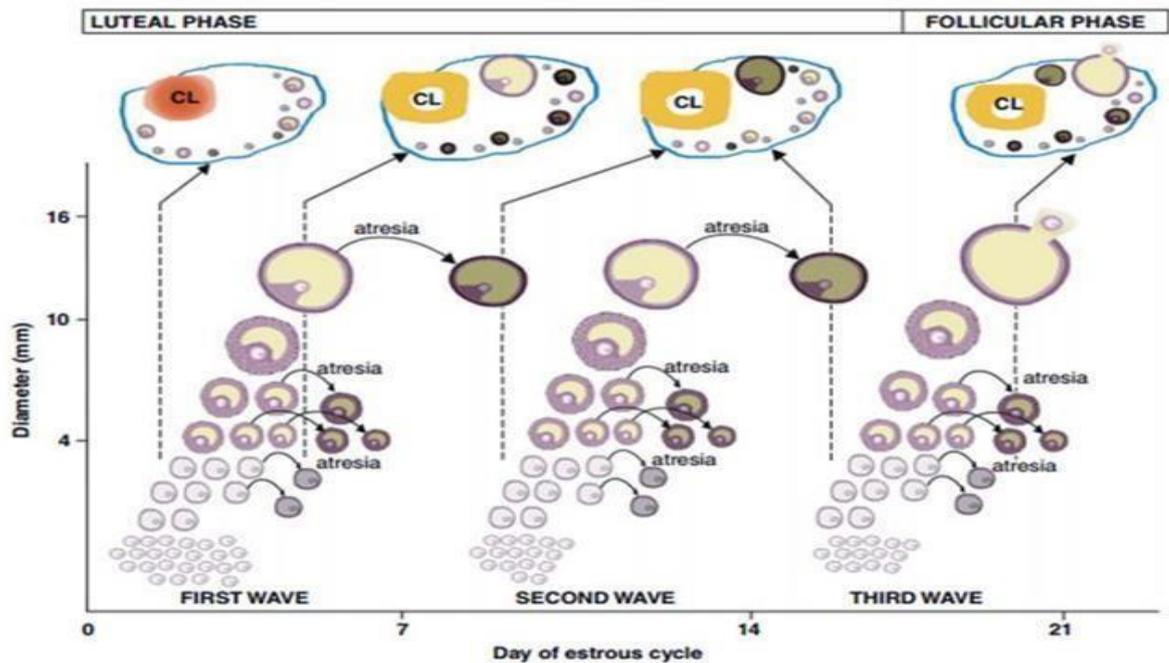
Le terme recrutement s'applique aux follicules gonado-dépendants, formant alors une cohorte qui comprend plusieurs follicules d'une même taille et sensibilité différentes aux gonadotrophines (Driancourt *et al.*, 2001).

#### **I.3.2.2. Sélection**

C'est le moment où le nombre de follicules en croissance s'ajuste au nombre de follicules qui vont ovuler (Driancourt and Cognié, 1997) . Elle coïncide avec l'apparition des récepteurs de LH sur la granulosa, une réduction importante de IGFs contenue dans le liquide folliculaire et une production élevée de l'inhibine (Driancourt *et al.*, 2001).

#### **I.3.2.3. Dominance**

Pendant cette période de dominance, elle se déroule la croissance et la maturation finale de follicules préovulatoires, En parallèle, les autres follicules de la cohorte subissent de l'atrésie et en même temps se produit le blocage du recrutement de nouveaux follicules (Driancourt *et al.*, 2001).



**Fig. 6 :** Vagues folliculaires et le développement du corps jaune au cours de cycle œstral bovin (Paul *et al.*, 2010)

#### **I.3.2.4. Atrésie folliculaire**

C'est la régression folliculaire jusqu'à sa disparition complète dans le stroma ovarien (Driancourt and Cognié, 1997).

#### **I.3.3. Différentes phases du cycle oestral**

##### **I.3.3.1. Phase folliculaire**

C'est une phase est composée de trois successives périodes : l'intervalle luteolyse-début de l'œstrus, début de l'œstrus-pic LH et pic LH-ovulation (Driancourt *et al.*, 2014). Ces dernières sont résumées comme suit :

##### **I.3.3.1.1. Proœstrus**

Le proœstrus correspond à la période juste avant l'œstrus (Ball and Peters, 2004). C'est la phase où le follicule ovarien augmente de taille et commence à sécréter des œstrogènes sous l'influence de FSH et de la LH (Figure 4) Chez les espèces polyœstriennes,

le proœstrus commence généralement dans un ou deux jours après la régression du corps jaune de cycle œstral précédent. Cette phase est caractérisée par l'apparition du mucus au niveau de la vulve (Frandsen *et al.*, 2013b).

#### **I.3.3.1.2. Œstrus**

L'œstrus est la période de réceptivité sexuelle, correspond à J0 du cycle oestral (jour 0) (Ball and Peters, 2004). Elle est initiée par l'élévation des œstrogènes libérés par les follicules matures juste avant l'ovulation. L'ovulation se produit dans un jour ou deux après le début de l'œstrus (Frandsen *et al.*, 2013b).

#### **I.3.3.2. Phase lutéale**

A cette phase lutéale on donne les termes de régression lutéale ou luteolyse (Driancourt *et al.*, 2014) désignant la période comprise entre l'ovulation et le recrutement d'un nouveau follicule prêt à ovuler (Barret, 2011). Cette phase comprend le metoœstrus et le diœstrus.

##### **I.3.3.2.1. Metoœstrus**

Le metoœstrus est la période post ovulatoire caractérisée par le développement maximal du corps jaune et une valeur la plus élevée de la progestéronémie (Ball and Peters, 2004). Les modifications anatomiques de certaines parties de l'appareil génital sont observés au niveau de l'utérus dont le muscle utérin est à son maximum et les organes génitaux externes reviennent à leur état avant l'œstrus (Frandsen *et al.*, 2013b).

##### **I.3.3.2.2. Diœstrus**

Les animaux polyœstriennes ont une courte période d'inactivité avant la phase proœstrus du cycle, appelée le diœstrus (Frandsen *et al.*, 2013b). Au cours de cette période, le corpus luteum est actif et est présent du 5 à 18 jours du cycle oestral (Ball and Peters, 2004).

Les principales caractéristiques de ses phases sont présentées dans le tableau 2.

**Tab. 2 :** les principales caractéristiques de quatre phases de cycle oestral (Hyttel *et al.*, 2009)

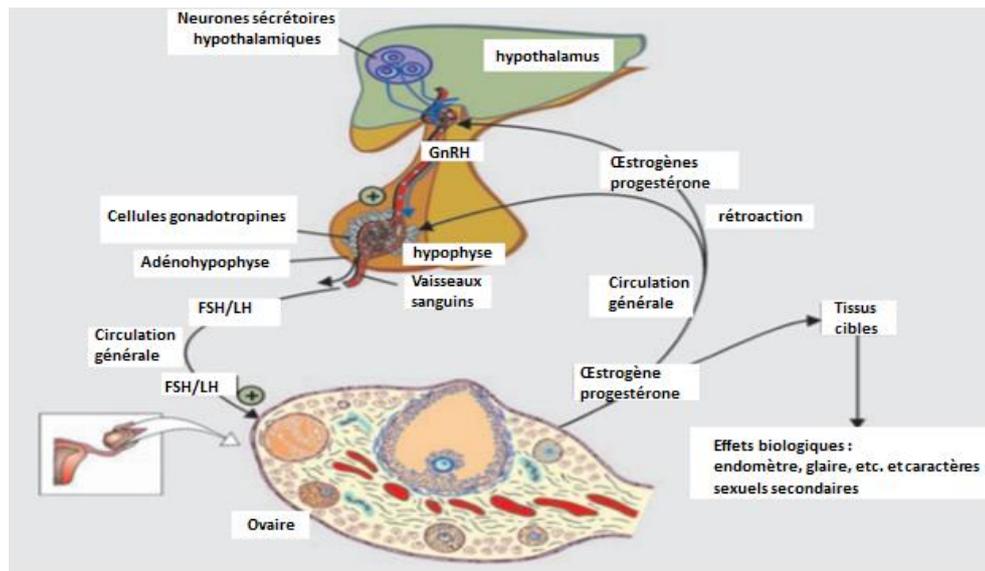
Phases	Caractéristiques
<b>Proœstrus</b>	- La phase précédant immédiatement l'œstrus. - Les principales hormones produites dans l'ovaire sont les œstrogènes
<b>Œstrus</b>	- Période d'acceptation du mâle, dans des conditions naturelles. - Apparition de l'ovulation chez toutes les espèces domestiques. - Les principales hormones produites, en réponse à la FSH et LH, sont les E2.
<b>Metœstrus</b>	- La phase succédant à l'œstrus lorsque le mâle n'est plus accepté. - Période de formation du corps jaune. - La principale hormone produite dans l'ovaire est la progestérone.
<b>Dicœstrus</b>	- Période du corps jaune mature et fonctionnel. - La principale hormone produite dans l'ovaire est la progestérone.

#### I.3.4. Régulation physiologique du cycle oestral

Différentes hormones régulent le cycle œstral: la gonado-hormone de libération de la gonadotropine (GnRH), qui est sécrétée par hypothalamus, stimule la sécrétion des deux stimulateurs folliculaires hormone (FSH) et l'hormone lutéinisante (Santos *et al.*, 2013), progestérone (P4), œstradiol (E2) dans les ovaires; et la prostaglandine F2 $\alpha$  (PGF) dans l'utérus (Leung and Cheng, 2003) (Tableau 3 et Figure 7).

**Tab.3 :** Hormones impliquées dans le cycle oestral (Hyttel *et al.*, 2009)

Hormones	Origines	Fonctions
<b>GnRH</b>	Hypothalamus	Stimule la libération de FSH et de LH par l'antéhypophyse.
<b>FSH</b>	Antéhypophyse	Stimule le développement des follicules ovariens
<b>LH</b>	Antéhypophyse	Induit l'ovulation et soutient la formation et le maintien du corps jaune
<b>Œstrogènes</b>	Follicule ovarien	Stimule la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus
<b>Progestérone</b>	Corps jaune	Prépare l'endomètre à la gestation ; maintient la gestation et inhibe la libération de GnRH par l'hypothalamus
<b>Prostaglandines</b>	Utérus	Induit la régression du corps jaune



**Fig. 7:** Interrelations entre l'hypothalamus, hypophyse, ovaire et utérus(Driancourt et al., 1991)

**Le jour zéro (J0) de l'œstrus** est induit par l'augmentation de E2. Ces concentrations atteignent un seuil 10 à 18 h avant le début de l'œstrus déclenchant ainsi une augmentation préovulatoire GnRH. C'est le mécanisme endocrinien principal qui régule par conséquent l'augmentation de FSH et LH au cours de cycle œstral chez la vache.

**Au début de cycle oestral**, c'est-à-dire pendant la phase folliculaire, la concentration de FSH augmente progressivement en stimulant la croissance des follicules primordiaux dans l'ovaire. Egalement, la concentration de LH augmente durant cette phase.

D'autre part, le follicule en développement va sécréter E2 dans la circulation sanguine. Durant cette phase, il y a une corrélation positive entre la concentration d'E2 et le développement des follicules. Par ailleurs, E2 vont agir sur le développement du mucus utérin d'une part, et agissent par un rétro-contrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse entraînant ainsi l'inhibition de la sécrétion de FSH et LH qui sont à l'origine de leur sécrétion.

**Au milieu de cycle**, la taille de follicule est à son maximum et sécrète plus de E2 avec une valeur seuil qui va provoquer un rétro-contrôle positif au niveau de l'antéhypophyse. Cette dernière provoque la sécrétion de FSH et sur tout de LH devient très importante, on l'appelle "pic de LH" ce pic est indispensable pour l'ovulation.

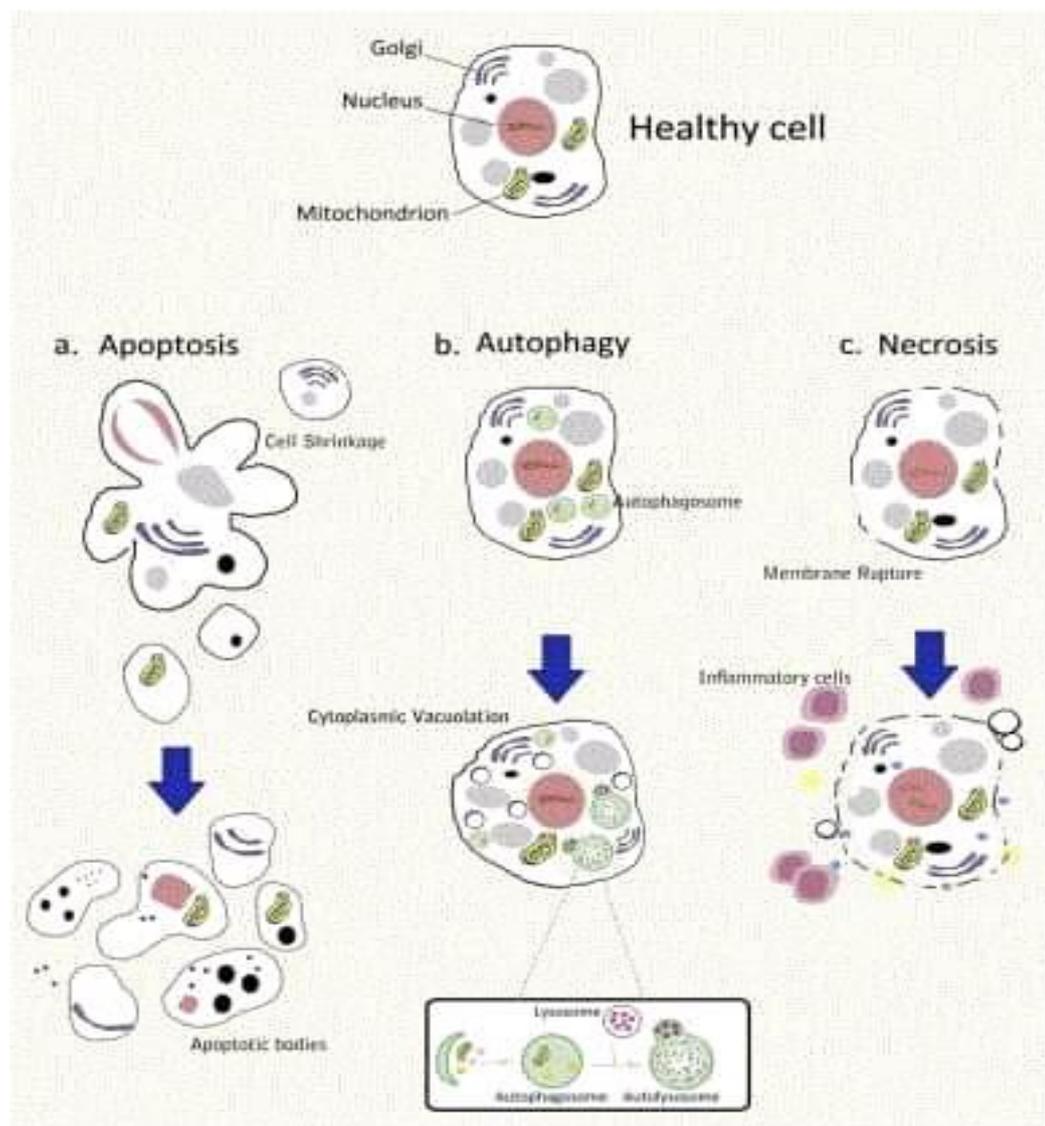
**A l'ovulation,** le follicule ne secrète plus de E2 et la concentration de E2 diminue. Puis, après ovulation, E2 agissent par rétro-contrôle négatif sur l'hypothalamus et alors sur la sécrétion des gonadotrophines ce qui conduit la diminution dans les concentrations de FSH et LH au niveau ovarien.

**A la fin de cycle,** l'ovule non fécondé sera transporté vers le bas (l'utérus) par une combinaison d'action et de contractions musculaires de l'oviducte (Ball and Peters, 2004).

**Chapitre II :**  
**Physiologie de l'apoptose et**  
**altérations ovariennes**  
**intra-folliculaires**

## II.1. Mort cellulaire

Le mécanisme par lequel les organismes éliminent les cellules non utilisables, est le processus de la mort cellulaire. Il utilise plusieurs voies qui impliquent des événements moléculaires complexes. Diverses études (Escobar *et al.*, 2015) montrent que ce phénomène de mort cellulaire se produit morphologiquement au moins par trois programmes distincts qui ont été appelés mort cellulaire par apoptose, par autophagique et par nécrose (Shen *et al.*, 2011) (Figure 8).

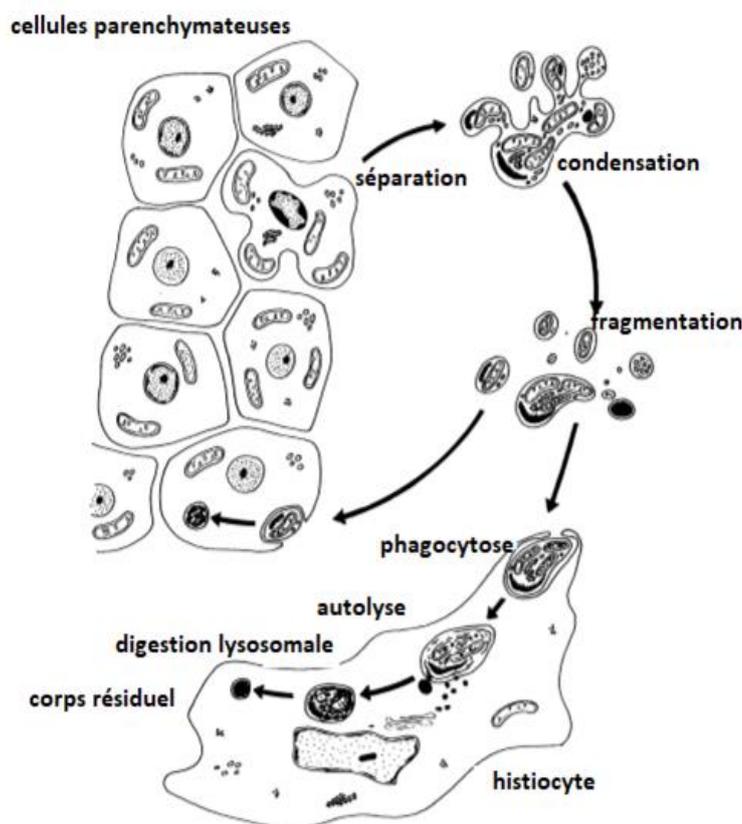


**Fig. 8 :** Schéma représentatif les types de mort cellulaire, (a) apoptose, (b) autophagie, (c) nécrose (Carella *et al.*, 2015)

## II.1.1. Apoptose

### II.1.1.1. Aspect morphologique de cellules apoptotiques

En microscopie photonique, la cellule apparaît comme une masse ronde ou ovale, avec un cytoplasme sombre et des fragments dense violets de la chromatine nucléaire (Elmore, 2007a) . Les étapes de l'évolution de l'apoptose sont les suivantes : au début du processus on a un rétrécissement de la cellule et du noyau, une condensation de la chromatine nucléaire en masses bien délimitées qui deviennent marginales contre les membranes nucléaires. Plus tard, le noyau progressivement se condense et se décompose (caryorrhexie). Par la suite, la cellule se détache du tissu environnant, mais les fines structures comprenant des membranes et des mitochondries sont toujours bien conservées à l'intérieur des corps apoptotiques. Ces derniers sont phagocytés rapidement par les cellules spécialisées, les macrophages et les cellules parenchymateuses (Figure 9) (Saraste and Pulkki, 1999).



**Fig. 9** : Diagramme pour illustrer les caractéristiques morphologiques de l'apoptose (Kerr *et al.*, 1972)

### II.1.1.2. Mécanismes moléculaires de l'apoptose

L'apoptose est déclenchée par l'activation des protéases suite à la stimulation de récepteurs de mort ou au relâchement de cytochrome C de la mitochondrie. Les cellules ont cependant la possibilité de survivre dans des conditions de stress en utilisant une série de mécanismes permettant de bloquer ou de freiner l'activation des protéases (Widmann, 2005).

### II.1.1.3. Caspases

Les caspases sont des protéases spécifiques de l'acide aspartique ; leur fonction est de cliver les substrats cellulaires vitaux après l'acide aspartique. Aujourd'hui, quatorze caspases partagent certaines caractéristiques entre eux, tel que la séquence d'acides aminés et la structure moléculaire avec des fonctions biologiques différents. Les caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10 sont impliquées dans la mort cellulaire par l'apoptose. Elles sont trouvées sous forme inactive dans le cytoplasme (sous forme des précurseurs ou zymogènes) ; leur fixation à des sites spécifiques de la molécule induit leur clivage. Les caspases apoptotiques sont divisées en deux groupes : les caspases initiatrices et les caspases d'exécution, qui au moment de l'apoptose ils induisent les changements morphologiques au niveau de la cellule (Figure 10) (Vázquez-Nin *et al.*, 2011a).

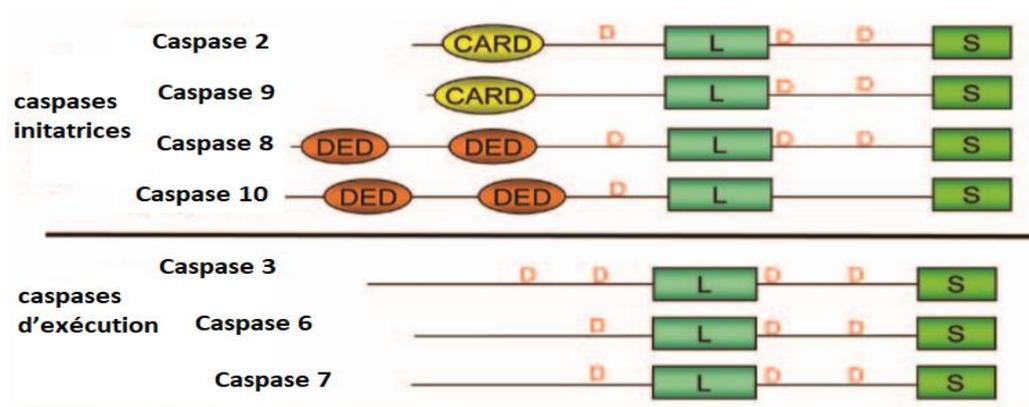
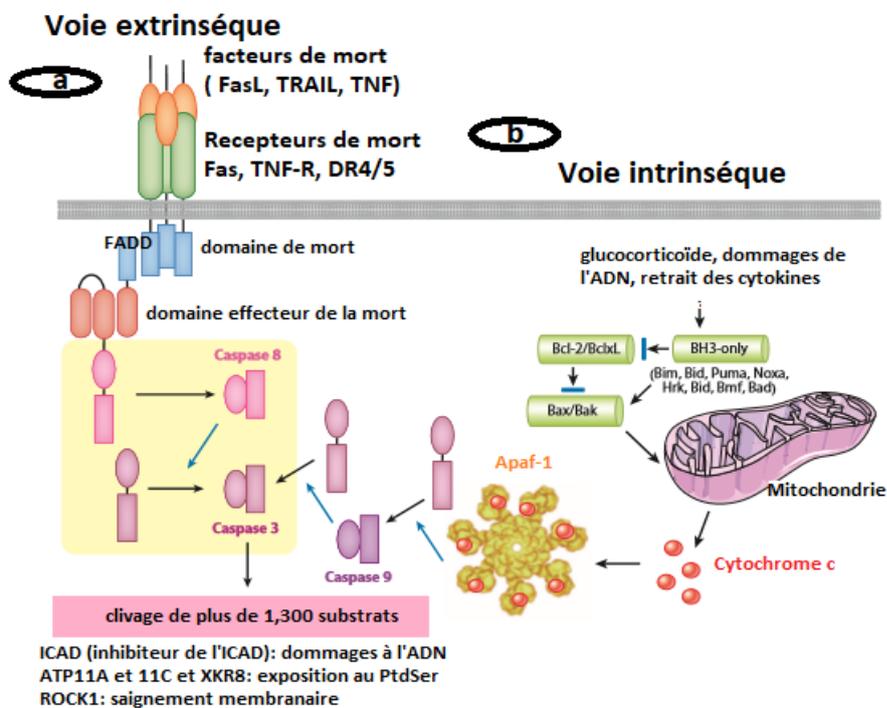


Fig. 10 : Classification des caspases apoptotiques (Jin and El-Deiry, 2005)

#### II.1.1.3.1. Voies d'activation des caspases

Deux voies d'activation des caspases dans le processus de l'apoptose ont été bien décrites : la voie extrinsèque est initiée par l'activation des récepteurs de mort présents à la

surface de la cellule et la voie intrinsèque (la voie mitochondriale) (Widmann, 2005) (Figure 11).



**Fig.11** : Voies de signalisation apoptotique. (a) voie extrinsèque, (b) voie intrinsèque (Nagata, 2018)

### II.1.1.3.1.1. Voie extrinsèque

Les récepteurs de la membrane plasmique déclenchant la signalisation de l'apoptose externe appartiennent à la superfamille de récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF, Tumor necrosis factor) qui comprend, Fas (Apo-1 ou CD95), TNF-R1 (Tumor necrosis factor receptor), récepteur de mort-3 (DR-3 ou TRAMP-protéine médiatrice de l'apoptose liée au récepteur TNF (ou Apo-3)). Le récepteur de mort le mieux étudié est Fas. La liaison du ligand FasL, conduit à la trimérisation de récepteur et au recrutement de protéines adaptatrices spécifiques. Le récepteur interagit au niveau de son domaine de mort (Death Domain) « DD » avec la protéine adaptatrice (Fas-Associated protein with Death Domain) « FADD » formant un complexe de signalisation induit par le récepteur (death-inducing signaling complex) « DISC ». FADD contient un domaine effecteur de mort DED et cela, recrute la procaspase-8 contenant du « DED » (death effector domain) dans le DISC. La procaspase-8 sera activée protéolytiquement en caspase-8. Cette dernière, elle va activer les enzymes effectrices des caspases en clivant en aval le procaspase-3 (Figure 11) (Vermeulen *et al.*, 2005).

#### **II.1.1.3.1.2. Voie intrinsèque**

Elle est médiée par les mitochondries de l'induction de l'apoptose, impliquant principalement la libération des protéines activant les caspases dans le cytosol (Riedl and Shi, 2004). Dans cette voie, les protéines de la famille Bcl-2 comme Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (pro-apoptotiques) favorisent la perméabilité de la membrane externe mitochondriale et la libération de facteurs apoptogènes, comme le cytochrome-c et les facteurs induisant l'apoptose (AIF, Apoptosis-inducing factor) dans le cytosol.

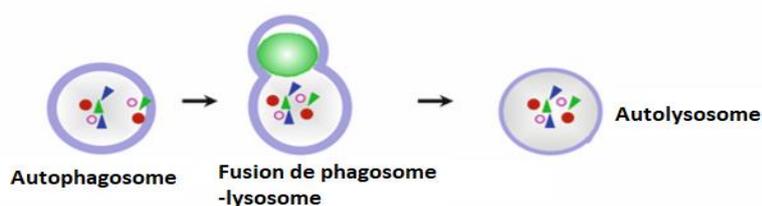
Le cytochrome-c est libéré de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie provoquant une oligomérisation du facteur-1 (Apaf-1, Apoptotic peptidase activating factor 1), activant la protéase apoptotique, entraînant la formation d'apoptosome. La formation de ce dernier est un processus qui nécessite la présence l'ATP (adénosine triphosphate). Enfin, l'apoptosome active à son tour les caspases exécutrices qui initient l'activité protéolytique (Figure 11) (Vázquez-Nin *et al.*, 2011a).

#### **II.1.2. Autophagie**

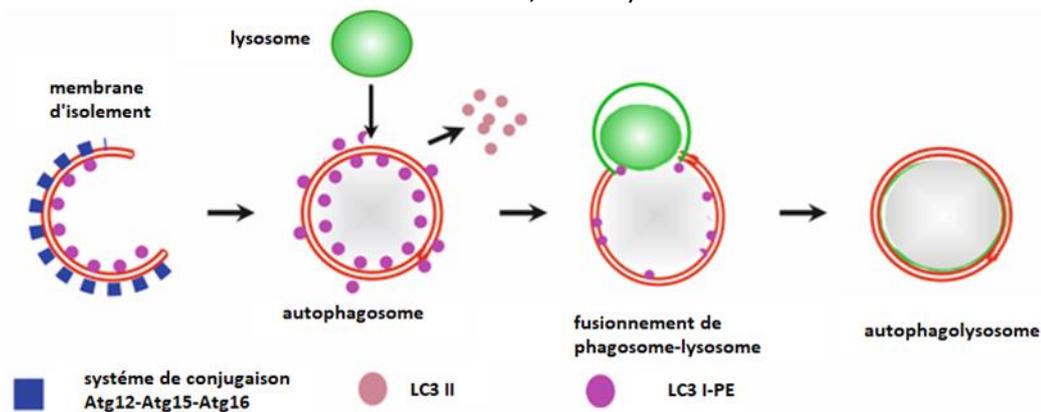
C'est une voie cellulaire hautement régulée pour la dégradation des protéines. C'est la seule voie connue pour éliminer les organites cytoplasmiques endommagés et les macromolécules dégradées (comme les protéines, le glycogène, les lipides et les nucléotides) par voie lysosomale (Grasso *et al.*, 2015). L'autophagie est indispensable pour le recyclage des constituants cellulaires qui vont être réutilisés par la cellule elle-même (Figure 8). C'est pour cette raison, le mécanisme d'autophagie est considéré comme un système protecteur des organismes. La mort cellulaire par autophagie s'accompagne d'une vacuolisation cytoplasmique et d'une activation des enzymes lysosomales. Ce programme de mort cellulaire est caractérisé par l'absence de réponse inflammatoire tissulaire (Vázquez-Nin *et al.*, 2011b).

##### **II.1.2.1. Macro-autophagie**

A l'étape initiale de la macro-autophagie, une structure membranaire dite (membrane d'isolement) est formée ; cette dernière se développe pour former une vésicule à double membrane contenant diverses protéines cytosoliques, ainsi des organites cytosoliques dans la lumière des autophagosomes. Ces autophagosomes fusionnent ensuite avec des endosomes avant de fusionner avec des lysosomes, puis avec des endosomes ou des lysosomes pour devenir des autophagosomes (Figures 12 et 13) (Vázquez-Nin *et al.*, 2011b).



**Fig. 12:** Représentation schématique de la voie autophagique : Macro-autophagie (Vázquez-Nin *et al.*, 2011b)



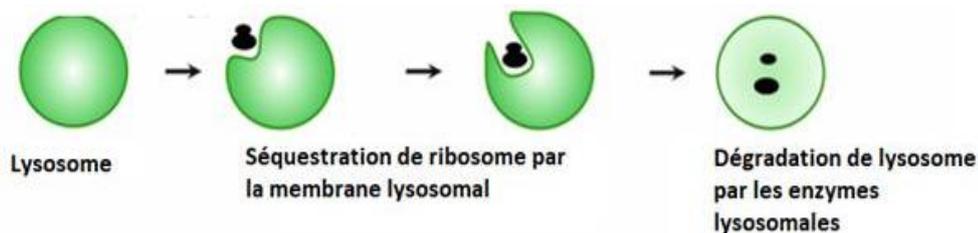
**Fig.13 :** Représentation schématique de la formation des autophagosomes.

Le système de conjugaison (Autophagy –related) Atg12 – Atg15 s'associe de manière non covalente à Atg16. La formation d'autophagosomes nécessite en outre la participation du système de conjugaison (light chain3-phosphatidyl ethanolamine) LC3-PE. La forme( light chain3 II) LC3-II est libérée dans le cytosol (Vázquez-Nin *et al.*, 2011b).

### II.1.2.2. Micro-autophagie

Dans cette voie, les portions cytoplasmiques comme le glycogène et les ribosomes sont séquestrés par une invagination de la membrane de lysosome par enroulement d'une évagination en forme de lambeau et/ou une cloison de membrane lysosomale. Ce processus est lié à des vésicules intra-lysosomales liées à la membrane, dans

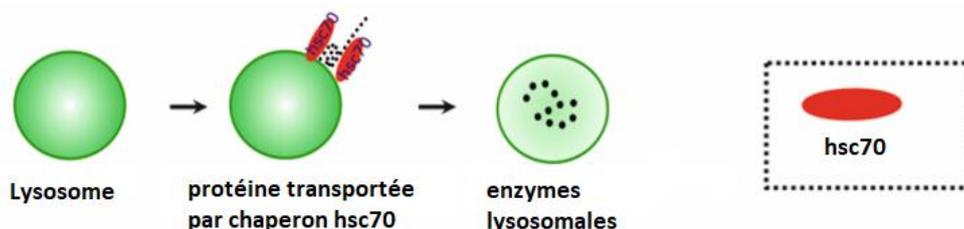
lequel le contenu est dégradé par des hydrolases lysosomales régie par des facteurs environnementaux (Figure 14) (Vázquez-Nin *et al.*, 2011b).



**Fig. 14 :** Représentation schématique de la voie autophagique, micro-autophagie (Vázquez-Nin *et al.*, 2011b)

### II.1.2.3. Système d'autophagie médiée par un chaperon

Il est activé par des agents provoquant du stress, tel que la famine, l'exposition aux toxines et stress oxydatif. Le mécanisme de cette voie initie par le transport des protéines à travers la membrane lysosomale vers la lumière lysosomale après avoir interagi avec le chaperon hsc70 (protéine de choc thermique) (Figure 15). Le complexe substrat-chaperon se lie à un récepteur de la membrane lysosomique. Puis, il permet le passage de substrat à travers la membrane assisté par un chaperon trouvant dans la lumière du lysosome (Vázquez-Nin *et al.*, 2011b).

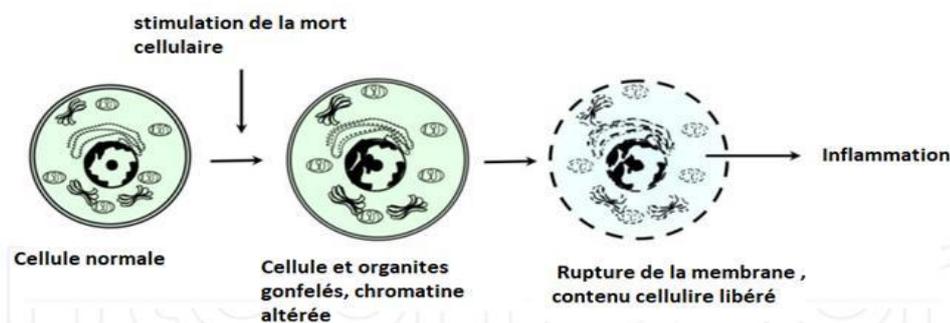


**Fig. 15 :** Représentation schématique de la voie autophagique, système d'autophagie médiée par un chaperon (Vázquez-Nin *et al.*, 2011b)

### II.1.3. Nécrose

La mort cellulaire causée par la nécrose est un évènement non programmé qui se produit sous l'épuisement total de l'ATP (Escobar *et al.*, 2015). Contrairement à l'apoptose, la nécrose est considérée comme une forme passive de mort cellulaire. Elle est déclenchée principalement par des «accidents» cellulaires (Edinger and Thompson, 2004) qui résultent de stimuli externes tel que le stress chimique, la chaleur, le choc thermique, le choc osmotique et le stress mécanique (Escobar *et al.*, 2015).

La nécrose est caractérisée morphologiquement par la vacuolisation du cytoplasme, la dégradation de la membrane plasmique et l'induction de l'inflammation autour de la cellule mourante, attribuable à la libération du contenu cellulaire et des molécules pro-inflammatoires (Figures 8 et 16) (Edinger and Thompson, 2004). Cette dernière, peut avoir une signification adaptative évidente dans certaines conditions pathologiques (Escobar *et al.*, 2015).



**Fig. 16** : Représentation schématique de caractéristiques morphologiques de la nécrose (Escobar *et al.*, 2015)

## II.2. Physiopathologie de l'apoptose

**Dans les conditions normales**, l'apoptose physiologique aide à maintenir l'homéostasie cellulaire dans l'organisme. Le nombre de cellules peut augmenter ou diminuer selon le type d'altération du processus apoptotique qui peut être due soit à une apoptose insuffisante ou soit à une apoptose excessive. Par conséquent, l'apoptose doit être étroitement régulée car trop peu ou trop de mort cellulaire peut conduire à des pathologies comme des maladies auto-immunes, des maladies neurodégénératives ou des cancers (Elmore, 2007b). Normalement l'apoptose élimine les cellules indésirables ou infectées mais lorsque ce processus est perturbé des pathologies peuvent survenir (Vermeulen *et al.*, 2005).

Actuellement, un grand nombre de composés synthétiques ou naturels se sont révélés efficaces contre certaines maladies grâce à l'induction de l'apoptose dans leurs cellules cibles (Axay *et al.*, 2017).

**Dans les conditions pathologiques**, il est apparu clairement aujourd'hui que la cancérologie a largement bénéficié de l'apport de la compréhension de mécanismes de l'apoptose cellulaire. Le blocage des programmes de la mort cellulaire participe aussi bien à la génération de tumeurs qu'à leur dissémination métastatique ou à leur résistance aux agents pharmacologiques (Mercié and Belloc, 2000).

Les maladies associées à un dérèglement des processus apoptotiques sont nombreuses. Il peut y avoir deux cas :

- **activation de l'apoptose** : comme dans la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaque, la maladie de Parkinson, l'infection par VIH et le diabète.
- **inhibition de l'apoptose** : comme dans les maladies astrocytaires, les lymphomes et les mélanomes (Mercié and Belloc, 2000).

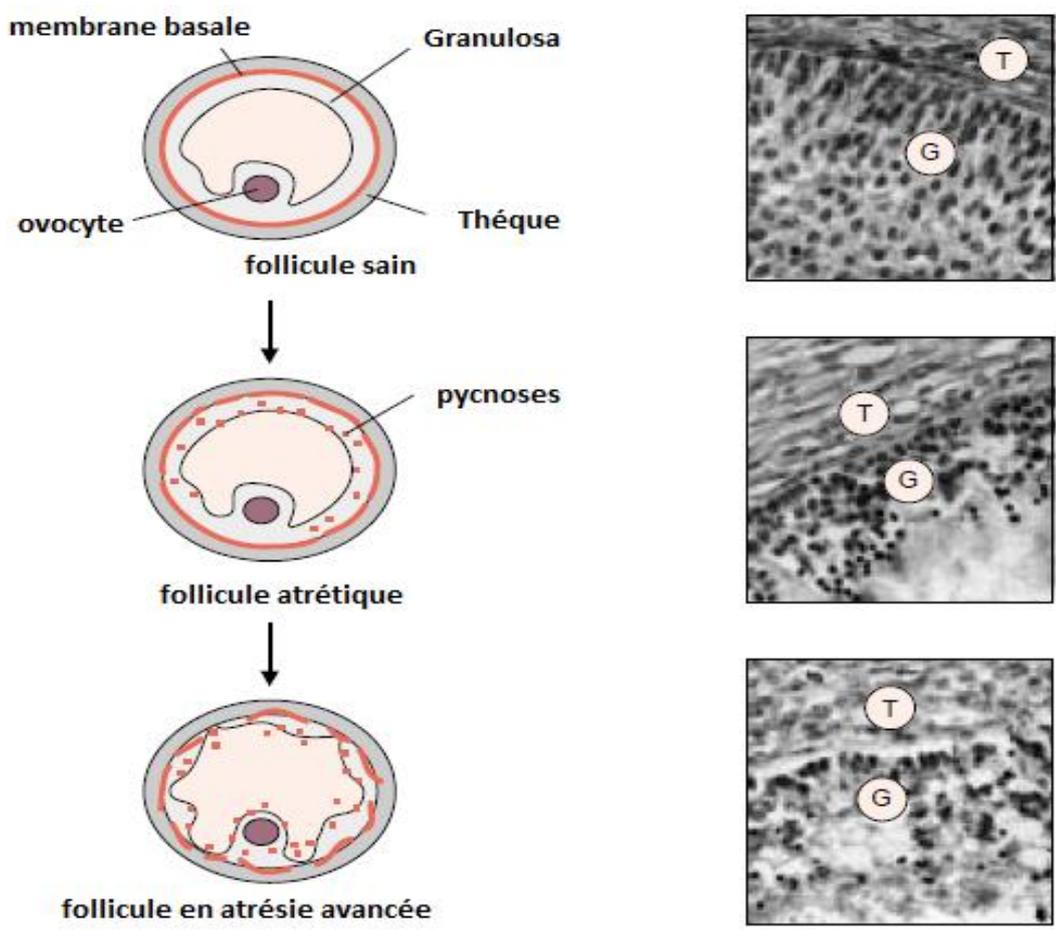
### II.1. Physiopathologie de l'atrésie folliculaire ovarienne

L'ovaire des mammifères est un organe extrêmement dynamique où les follicules, en excès ou défectueux, sont rapidement et efficacement éliminés du façon continue tout au long de la vie reproductive (Lefevre, 2011) . La grande majorité des follicules (plus que 99% de tous les follicules) n'atteignent pas le stade pré ovulatoire, mais subissent plutôt le processus dégénératif appelé atrésie folliculaire (Yu *et al.*, 2004) . L'atrésie implique l'apoptose des ovocytes, des cellules de la granulosa et des cellules de la thèque. Le développement folliculaire dépend de la présence de facteurs de survie qui favorisent la croissance des follicules et protègent également les cellules de l'apoptose Ceux-ci incluent des facteurs produits dans l'ovaire comme l'œstradiol, la progestérone, les facteurs de croissance analogue à l'insuline IGF -1 ( insulin-like growth factor-1 ) ainsi que les gonadotropines (Belotti *et al.*, 2017) seule une petite proportion de follicules échappe à la mort cellulaire programmée et arrivent à l'ovulation (Kiess and Gallaher, 1998) .

Cette forme d'atrésie est caractérisée en particulier par l'arrêt de la prolifération et la mort par apoptose des cellules de la granulosa, la fragmentation de la membrane basale qui sépare les cellules de la granulosa des cellules de la thèque interne, la perte des jonctions perméables entre les cellules de la granulosa et la réduction de la vascularisation thécale (Figure 17).

Dans les follicules en croissance terminale, l'atrésie s'accompagne également de la perte de l'expression et de l'activité de l'enzyme P450 aromatasase et de la sensibilité aux gonadotrophines FSH et LH des cellules de la granulosa, conduisant à la chute du rapport œstrogènes/androgènes dans le liquide folliculaire (Monniaux *et al.*, 1999) .

Au début de l'atrésie folliculaire, les caractéristiques morphologiques apparaissent dans les cellules de la granulosa situées dans la surface interne de la couche de la granulosa et non dans les autres cellules folliculaires (cumulus oophorus, ovocyte, intra ou extra thèques), indiquant ainsi un rôle initiateur de la cellule de la granulosa dans l'atrésie folliculaire. De nombreuses stimulations apoptotiques induisent les voies de signalisation intracellulaires, qui se traduisent par des caractéristiques communes de l'apoptose, c'est-à-dire l'activation de la caspase-3 (casp3) et la fragmentation ultérieure de l'ADN internucléosomique (Matsuda *et al.*, 2012).

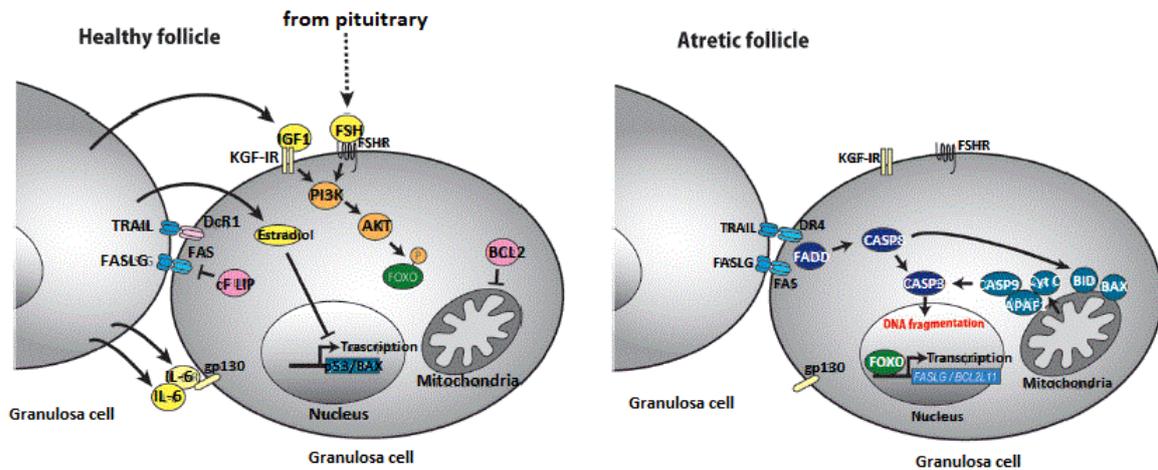


G : granulosa, T : thèque

**Fig. 17 :** Représentation schématique des changements morphologiques caractéristiques de l'atrésie des follicules à antrum et état histologique de la paroi de follicules à différents stades d'atrésie chez la vache (Monniaux *et al.*, 1999)

Des études ont rapporté de nombreuses molécules de signalisation apoptotiques à l'œuvre dans les cellules de la granulosa et ont révélé qu'elles s'affectent les unes les autres au cours de la progression de l'apoptose comme les hormones/facteurs de

croissance/cytokines, un système de récepteur ligand de la mort et lymphome/leucémie à cellules B2 membres de la famille (Bcl-2) (Figure 18) (Matsuda *et al.*, 2012).



**Fig. 18** : Modèle schématique de la croissance des cellules de la granulosa. (a) : cellules de la granulosa dans un follicule sain, (b) : cellules de la granulosa dans un follicule atreétique (Matsuda *et al.*, 2012)

Les seules cellules des follicules qui déterminent leur devenir soit vers la croissance ou soit vers l'atrésie sont les cellules de la granulosa. De nombreuses les molécules sécrétées par les follicules, les signaux apoptotiques de la surface cellulaire et les molécules de signalisation intracellulaires sont elles-mêmes responsables de son devenir. Par conséquent, ces substances interagissent de manière complexes les uns avec les autres dans les follicules et au également au niveau des ovaires. Ainsi, l'équilibre entre ces facteurs devrait déterminer le devenir des follicules (Matsuda *et al.*, 2012).

La connaissance de l'anatomie et de la physiologie ovarienne est un prérequis essentiel pour comprendre la pathologie fonctionnelle de l'ovaire (Bazot *et al.*, 2016) . Les contrôles de qualité au moment de l'insémination artificielle (IA) ou la fécondation *in vitro* (FIV) c'est pour éliminer les ovocytes contenant des anomalies méiotiques d'appariements ou de recombinaisons chromosomiques (Monniaux, 2002).

Un dysfonctionnement de l'apoptose folliculaire, au bénéfice de l'expression des gènes proapoptotique, pourrait entraîner des pathologie ovariennes (Vasseur *et al.*, 1999) au niveau d'un ou plusieurs follicules ou du stroma ovarien. Les pathologies folliculaires rencontrées peuvent être monofolliculaire provoquant l'apparition des kystes folliculaires simples ou hémorragiques. Elles sont aussi fréquemment plurifolliculaire pouvant être à l'origine de dystrophies ovariennes macropolykystiques ou micropolykystiques alors

associées à des perturbations métaboliques ou endocriniennes (Bazot *et al.*, 2016). Des facteurs synthétisés et sécrétés par les cellules de la granulosa, l'ovocyte ou retrouvé dans le liquide folliculaire ont un impact direct sur l'apoptose des cellules de la granulosa. Les facteurs de croissance GDF-9 (Growth Differentiation Factor-9), exprimé au niveau de l'ovocyte, contrôle la transition des follicules du stade préantral vers le stade antrale. Ils jouent un rôle important dans la croissance folliculaire et la maturation de l'ovocyte chez plusieurs espèces de mammifères. La diminution des GDF-9 induit l'activation de caspase-3, provoquant l'apoptose des cellules de la granulosa ; cet effet peut être atténué par l'apport de GDF-9 exogène. Donc, les GDF-9 sont anti-apoptotique dans les follicules prénataux et de ce fait ils protègent les cellules de la granulosa d'entrer en apoptose en activant la voie PI3-kinase (Lefevre, 2011). La connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires qui contrôlent la survie ovocytaire permet de proposer des traitement pour préserver cette réserve et l'identification récente des gènes impliqués dans l'insuffisance ovarienne prématurée devrait permettre d'ouvrir rapidement de nouvelles perspectives (Monniaux, 2002).

# **Chapitre III :**

# **Méthodes d'exploration de**

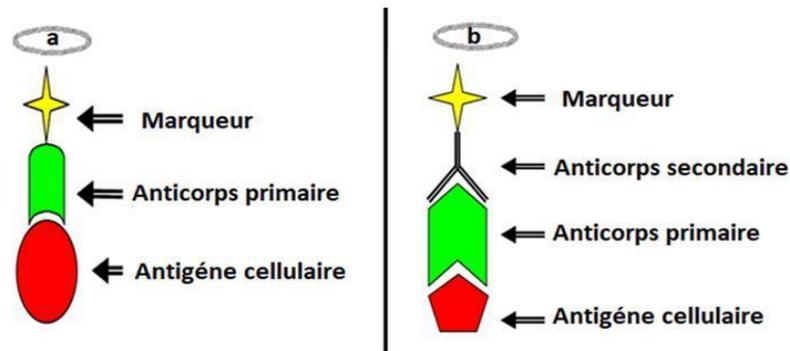
# **l'apoptose**

L'apoptose est un sujet d'intérêt dans de nombreux laboratoires de recherche biologique, des méthodes actuelles d'évaluation de l'apoptose dans les cellules cultivées généralement nécessitent une fixation cellulaire, une lyse cellulaire ou élimination immédiate des cellules testées(Hanson and Finkelstein, 2019) :

### III.1. Méthode d'immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est couramment utilisée pour montrer la présence de cellules apoptotiques *in situ* (Newbold *et al.*, 2014) . La détection par IHC des protéines liées à l'apoptose est réalisée sur des coupes déparaffinées de 5 mm d'épaisseur (Bressenot *et al.*, 2009). Ces derniers sont incubés avec un anticorps spécifique. Le site de liaison de l'anticorps est visualisé sous un microscope photonique ou à fluorescence par un marqueur tel qu'un colorant fluorescent, une enzyme, un élément radioactif (or colloïdal), qui est directement lié à l'anticorps primaire ou à un anticorps secondaire approprié (Figure 19) (Duraiyan *et al.*, 2012) .

Les marqueurs immunohistochimique de l'apoptose sont la cytokératine-18 clivée (c-CK18), la caspase-3 clivée (c-cas-3), la lamine clivée A (c-lam-A), histone phosphorylée H2AX (H2AX), poly (ADP ribose) polymérase clivée(c-PARP) et la translocation du facteur induisant l'apoptose (AIF) (Holubec *et al.*, 2005) .

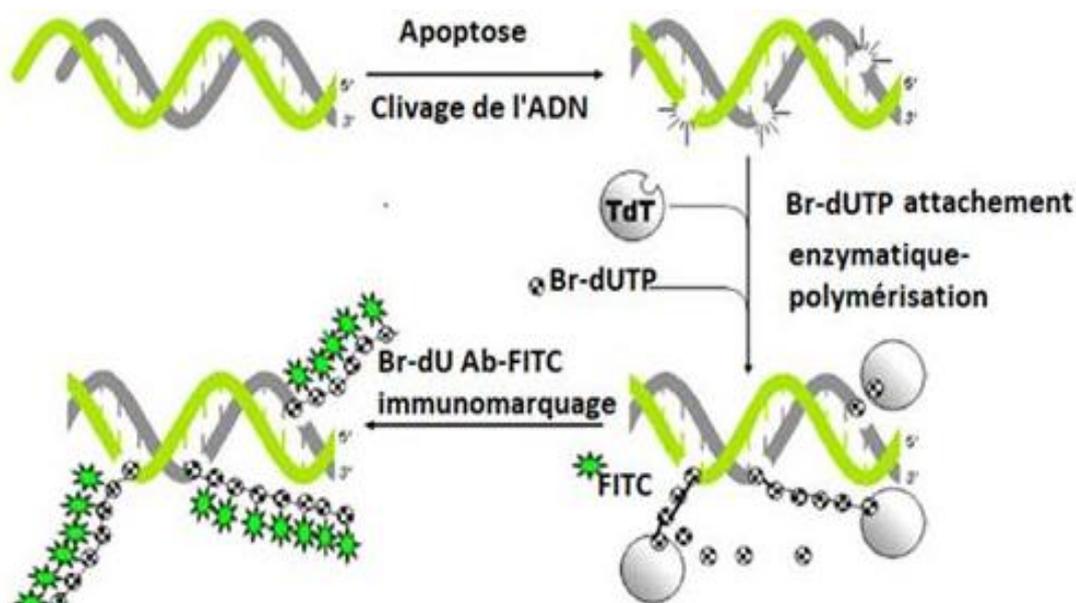


**Fig. 19** : Représentation schématique du principe de technique de l'immunohistochimie.

(a) : Méthode directe : L'anticorps spécifique, marqué par un « révélateur chromogène » se fixe sur l'antigène durant l'incubation ; (b) : Méthode indirecte : Sur l'anticorps(Genton, 2006)

### III.2. Méthode de TUNEL

Le marquage terminal d'UTP Nick-end (TUNEL) (terminale désoxynucléotidyl transférase d'UTP nick end marquage) de l'ADN fragmenté permet aux chercheurs d'identifier la Fragmentation de l'ADN au niveau unicellulaire (Crowley et al., 2016) . Le rôle clé dans la méthode TUNEL est porté par une endonuclease, en particulier le désoxynucléotidyl terminal transférase (TdT), catalysant l'attachement d'un analogue des désoxynucléotides (dUTP) au groupement OH de la terminaison libre des ruptures de brin d'ADN. Le protocole consiste à cultiver et récolter les cellules, fixer et perméabiliser les cellules pour permettre la pénétration des réactifs de réaction TUNEL dans le noyau, liaison des dUTP marqués sur les fragments -OH d'ADN fragmenté à l'aide de TdT et visualisation de la dUTP (Figure 20). Selon l'étiquette, la visualisation peut être fluorescent (le plus souvent) ou enzymatique (Majtnerová and Rousar, 2018).



**Fig. 20** : Illustration schématique du méthode de TUNEL

un brin d'ADN rompt le marquage avec Br-dUTP en utilisant la désoxynucléotidyl transférase terminale exogène (TdT), (FITC) réactif largement utilisé dans les études sur la prolifération cellulaire pour détecter Br-dU incorporé lors de la réplication de l'ADN (Darzynkiewicz *et al.*, 2008)

### **III.3. Méthode d'hybridation *in situ***

L'utilisation de l'hybridation *in situ* (ISH) avec des sondes poly (A) marquées à la disoxigénine pour détecter des cellules apoptotiques dans des coupes de tissus (Hilton et al., 1997). Cette méthode a été comparée à l'évaluation morphologique conventionnelle dans tous les tissus dans lesquels il y avait des signes d'apoptose. L'ISH marque préférentiellement les noyaux rétrécis mais toujours intacts avec émargination de la chromatine correspondant à un stade précoce de l'apoptose. Après dénaturation de l'ADN, poly (A) sont hybridé aux noyaux des cellules des tissus ischémiques. HIS avec sondes oligonucléotidiques poly (A) offre une alternative simple originaire d'ISEL pour la détection des cellules aux premiers stades de l'apoptose (Hilton *et al.*, 1997).

### **III.4. Cryométrie en flux**

Ce test a été largement utilisé pour l'évaluation de l'apoptose chez différents modèles expérimentaux. Il est basé sur le principe d'utilisation d'un fluorochromes, tel que l'iodure de propidium (PI) capable de se lier et le marquage de l'ADN permet d'obtenir une évaluation rapide et précise de l'ADN cellulaire contenu par analyses cryométrique en flux et identification ultérieure des cellules hypodiploïdes. Le protocole original a amélioré la capacité pour une mesure rapide et quantitative de l'apoptose cellulaire (Riccardi and Nicoletti, 2006) .

# **Partie expérimentale**

# **Matériel et méthodes**

## I. Animal

Notre travail a porté sur l'ovaire de vaches adultes récoltées au niveau des abattoirs. Chaque animal a fait l'objet d'un examen général avant abattage pour relever les principales caractéristiques : la race et l'âge (déterminé par la dentition ou par les cornes). Après abattage, les prélèvements sont transportés au laboratoire. Au laboratoire, après orientation et examen macroscopique, les appareils génitaux sont classés selon les critères de détermination des différents stades de cycle œstral rapporté par Ireland Ireland et al. (1980) : Œstrus, metœstrus, dioœstrus et proœstrus (Tableau 4).

Tab. 4 : classification des corps jaunes au cours de cycle oestral des vaches(Ireland *et al.*, 1980)

Caractéristiques du corps jaune	Stades de cycle œstral			
	Fin de l'œstrus	Metœstrus	Dioœstrus	Proœstrus
<b>Externes</b>	- CJ rouge - récemment ovulé et le point de rupture non couvert par l'épithélium	- Le point de rupture est couvert par l'épithélium, - Apex de CJ rouge ou brun	CJ bronze ou orange	CJ jaune claire vers blanc
<b>Internes</b>	- CJ rouge, de temps en temps rempli de sang, - Cellules lâchement organisées	CJ rouge ou brun à l'apex seulement, le reste est orange	CJ orange	CJ orange vers jaune
<b>Diamètre (cm)</b>	0,5-1,5	1,6-2	1,6-2	<1
<b>Vascularisation externe du CJ</b>	Non visible	Généralement limité à la périphérie	Mêmes que dans le metoœstrus mais lui couvriront l'apex du CJ tard dans cette étape	Non visible
<b>Follicules de diamètre supérieur à 10mm</b>	Absent	Présent	Peut être absent	Présent

## II. Méthodes utilisées

L'étude pratique a été réalisée au niveau de laboratoire de recherche de la fac central à Alger.

### II.1. Protocole de la technique d'histologie (Martoja and Martoja-Pierson, 1967)

#### II.1.1. Fixation

Les ovaires prélevés sont fixés, pendant plus de 24h, dans du formol du commerce tamponné au PBS dilué à 10 %. Puis coupés longitudinalement et placés dans des cassettes d'histologie portant les références de l'animal (Figure 21). Cette fixation a pour but la conservation des structures tissulaires du prélèvement dans un état aussi proche que possible du vivant.



Fig. 21 : Prélèvement ovarien dans une cassette d'histologie

#### II.1.2. Déshydratation et substitution (éclaircissement)

Les prélèvements doivent être entièrement 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, soit l'eau par de l'alcool (on parle de déshydratation) ou soit l'alcool par le xylène (on parle de substitution).

- Cette étape consiste à faire passer les cassettes renfermant les prélèvements dans des bains alcools à concentration croissante (allant de 70° à 100°) puis dans un solvant organique, le xylène. La durée dans chaque bain est la suivante : Alcool 96° : 30 min. (x4) ; Alcool 100° : 1h. (x2) ; Xylène : 1h. (x3).

#### II.1.3. Inclusion

Les prélèvements déshydratés sont immergés dans différents bains de paraffine chauffée à 56° dans une étuve, une température dépassant juste son point de fusion. La durée dans chaque bain de paraffine est la suivante : Premier et deuxième bain de paraffine : 30min. et le troisième bain de paraffine : 1h.

#### II.1.4. Confection des blocs de paraffine

La confection des blocs de paraffine (Figures 22, 23, 24) a consisté 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.



**Fig. 22 :** Mise en place centrée du prélèvement ovarien dans le moule métallique



**Fig. 23 :** Remplissage du moule métallique



**Fig. 24 :** Mise en place de l'ensemble moule-cassette sur un bain de glace

#### II.1.5. Réalisation et étalement des coupes

##### II.1.5.1. Réalisation des coupes

Les coupes tissulaires d'une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$  ont été effectuées à l'aide d'un microtome (Figure 25). Avant de commencer les coupes, on a reporté les références des cassettes sur les lames d'histologie à l'aide d'un crayon.



**Fig. 25 :** Microtome (a) et bain marie (b)

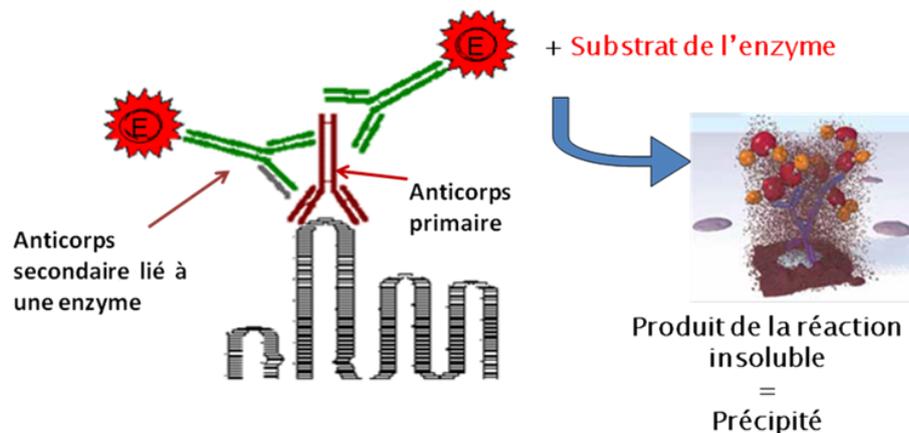
### II.1.5.2. Etalement des coupes

- 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 « Super Frost Plus » pour être utilisées en immunohistochimie. Ces lames permettent une adhésion sur le verre, grâce à laquelle les coupes de tissus sont d'abord attirées, puis fermement attachées à la surface de la lame par des liaisons chimiques.
- Enfin, les lames sont séchées à l'étuve (60°C) pendant 2 heures pour être utilisées en immunohistochimie.

## II.2. Technique de l'immunohistochimie

### II.2.1. Principe

L'immunohistochimie est une méthode associant l'histologie et l'immunologie pour visualiser *in situ* un antigène au niveau des ovaires à l'aide d'un anticorps marqué (Figure 26).



**Fig. 26 :** Représentation schématique du principe de la technique d'immunohistochimie

## II.2.2. Protocole d'immunohistochimie

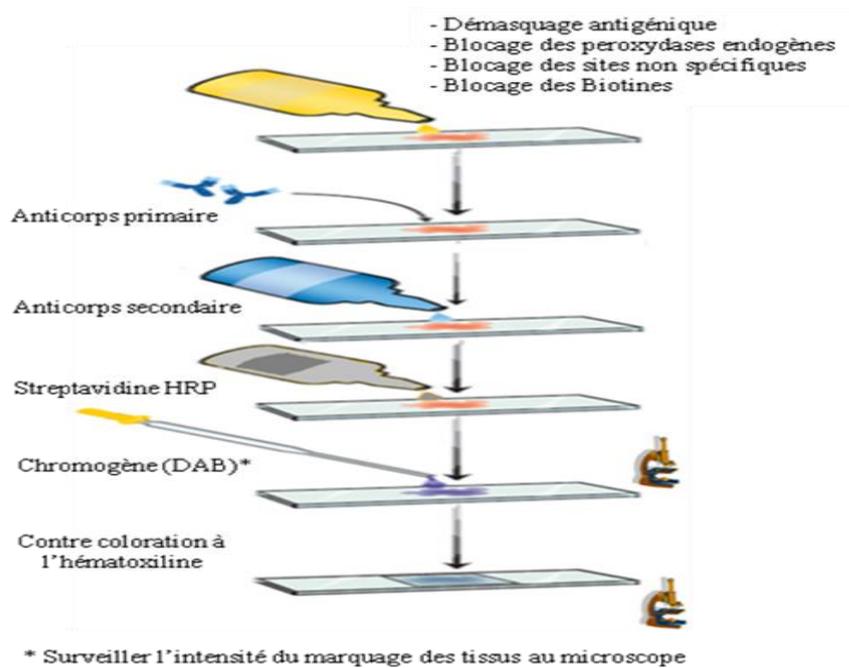
Le protocole prévu pour mettre l'Immunolocalisation de la caspase-3 active est celui de Kassouri-Maouche et al. (2019). Il est divisé en deux étapes :

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

**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 sont les suivantes (Figure 27):

- Perméabilisation des coupes avec le mélange saponine (Fischer Scientific UK) et protéinase K (Eurobio) (0,2 mg/ml), à température ambiante.
- Blocage des peroxydases endogènes par un mélange PBS (0,1 M ; pH = 7,2) et peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3% à température ambiante.
- Rinçage PBS (x2).
- Les coupes sont entourées avec une résine hydrophobe (Dako-pen) et placées dans une chambre humide sur un agitateur va et vient.
- Blocage des sites non spécifiques avec du sérum de cheval (réactif jaune du kit Vectastain).
- Incubation des coupes pendant une heure avec un anticorps primaire anti-caspase-3 active monoclonal (ab32042, Abcam, Cambridge, UK), produit chez le lapin, dilué au 1/100. Sur certaines coupes, l'anticorps primaire est remplacé par le sérum de cheval ; ces coupes sont utilisées comme des contrôles négatifs.
- Rinçage PBS (x2).
- Application d'un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé (réactif bleu du kit Vectastain), produit chez le cheval, pendant 1h à température ambiante.
- Rinçage PBS (x2).
- Application du complexe Streptavidine-Peroxydase (Réactifs gris du kit Vectastain) pendant 1h à température ambiante.
- Rinçage PBS (x2).
- Le chromogène utilisé, le 3 ;3'-diaminobenzidine-tétra-hydrochloride (DAB) est déposé sur les différentes coupes et le contrôle de l'immunomarquage est réalisé sous microscope photonique.

- Rinçage à l'eau distillée.
- Contre coloration à l'hématoxyline.
- Rinçage à l'eau du robinet (c'est le pH alcalin de l'eau du robinet qui fait bleuir l'hématoxyline).
- Déshydratation des lames dans des bains d'alcool à concentration croissante (70, 96 et 100°) et éclaircit dans le xylène.
- 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. 27** : Validité de la technique d'immunohistochimie

L'anticorps utilisé est validé par des contrôles négatifs insérés au cours du protocole d'immunohistochimie pour confirmer l'immunomarquage observé sur les prélèvements.

### II.2.3. Montage des lames

Avant de réaliser le montage des lames, une déshydratation et un éclaircissement des lames a été réalisé (Figure 28).



**Fig. 28** : Batterie de déshydratation et d'éclaircissement

#### **II.2.4. Déshydratation**

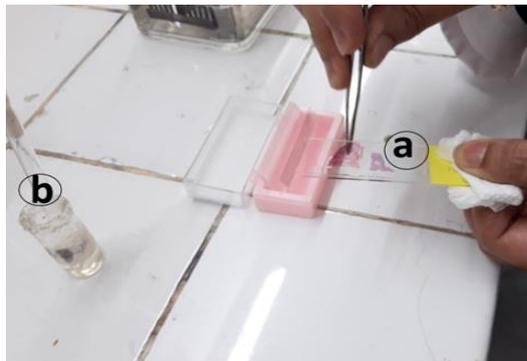
La déshydratation a consisté à faire passer les lames dans des bains d'alcool à concentration croissante (70°, 96°, 100°) pendant 3 minutes par bain.

#### **II.2.5. Eclaircissement**

L'éclaircissement a consisté à faire passer les lames dans deux bains de xylène ; le premier bain d'une durée de quelques secondes et le second bain d'une durée de 10 minutes.

#### **II.2.6. Montage des lames proprement dit**

Le montage entre lame et lamelle de la coupe histologique a été réalisé en utilisant le liquide de montage « Eukitt » (Figure 29).



**Fig. 29** : Montage de la coupe histologique (a) ; liquide de montage « Eukitt » (b)

#### **II.2.7. Observation au microscope photonique**

Après séchage des lames à l'air libre, ces dernières ont été observées au microscope photonique et des photos ont été prises à l'aide d'un appareil photo de marque Sony.

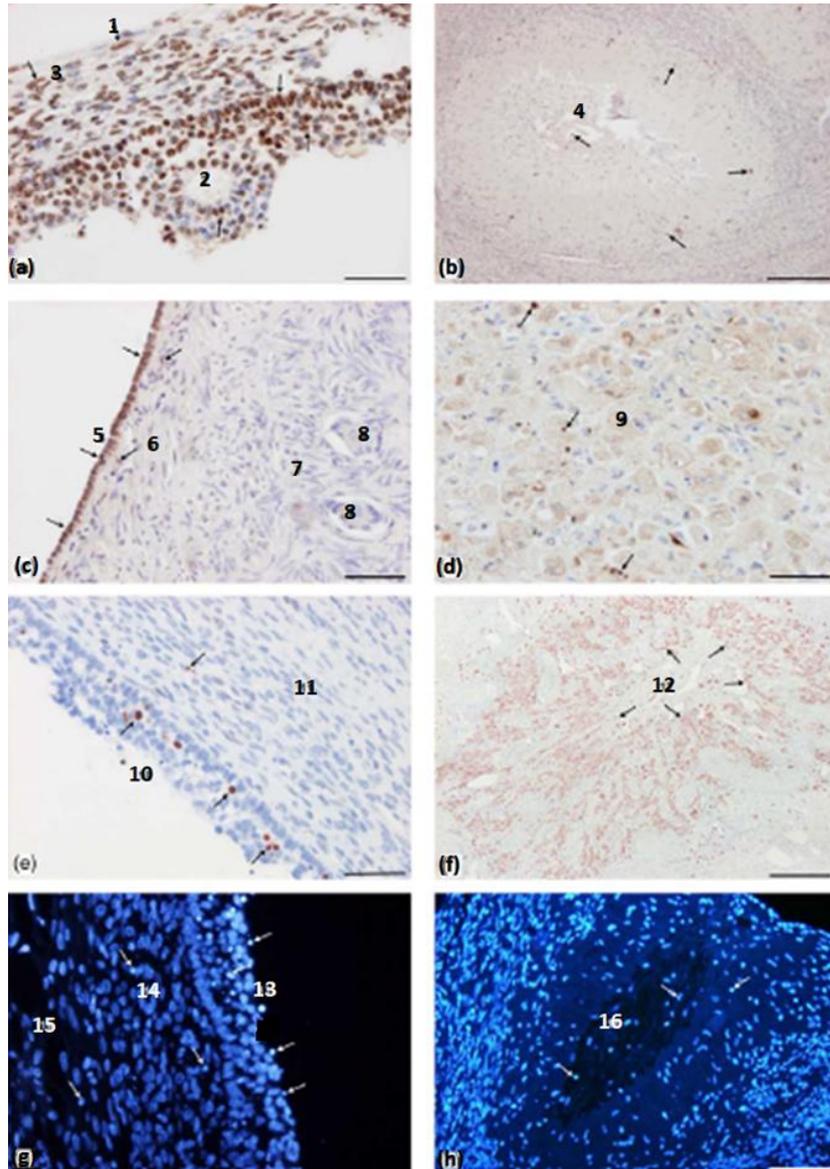


**Fig. 30** : Observation au microscope photonique

# **Résultats et discussion**

L'objectif de notre travail est d'étudier, au niveau de l'ovaire, la localisation et l'évaluation de l'apoptose ainsi que les mécanismes régulateurs intervenant dans la mise en place de ce phénomène qui peut être physiologique ou pathologique. L'évaluation du pourcentage des noyaux apoptotiques nous permet d'indiquer le stade de l'apoptose. Au stade précoce des follicules atreétiques, l'apoptose se produit uniquement dans les cellules de la granulosa, tandis qu'au stade tardif des follicules atreétiques, l'apoptose se produit dans les cellules de la thèque interne. Pour cela, un certain nombre d'articles bibliographiques sont utilisés pour essayer de déterminer les résultats attendus sur les échantillons qui devraient être récoltés en dehors de la situation actuelle du covid-19.

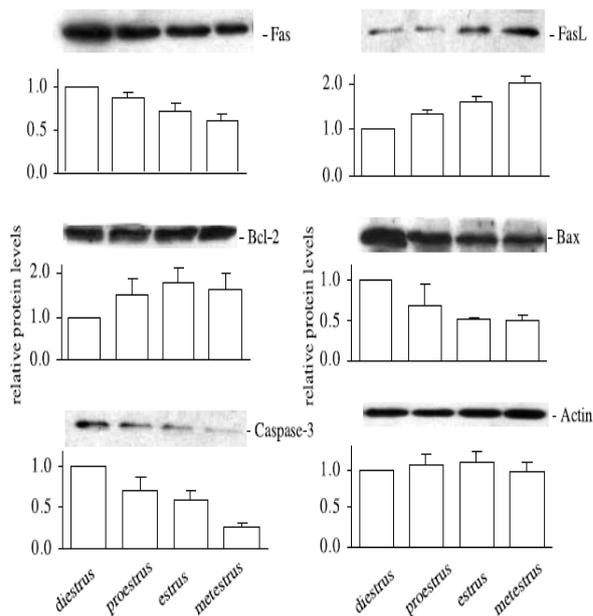
La description des résultats attendus dans notre travail et leurs discussions seraient comparables aux données des travaux réalisés chez la même espèce (vache) par **D'Haeseleer et al. (2006)**. Ces auteurs rapportent que l'apoptose a été localisée dans tous les types de cellules ovariennes à divers stades du cycle œstral, en utilisant la détection de la caspase-3 active. Très peu de cellules apoptotiques ont été trouvées dans les follicules sains (follicules primordiaux, primaires, secondaires et tertiaires). Par contre, l'apoptose dans les follicules tertiaires atreétiques était beaucoup plus fréquente, et des scores apoptotiques élevés ont été enregistrés lors de l'utilisation de la technique TUNEL et des scores inférieurs avec le test de la caspase-3. Dans les corps jaunes, les grandes et petites cellules lutéales avaient des scores intermédiaires à élevés en utilisant la caspase-3 active et des scores intermédiaires à faibles en utilisant le test TUNEL. En déduit que dans toutes les structures ovariennes examinées, des variations des scores apoptotiques ont été observées aux différents stades du cycle oestral (Figure 31), suggérant une influence dépendant du cycle sur l'apoptose .



**Fig. 31** : Détection de l'apoptose (flèches) à l'aide du test TUNEL

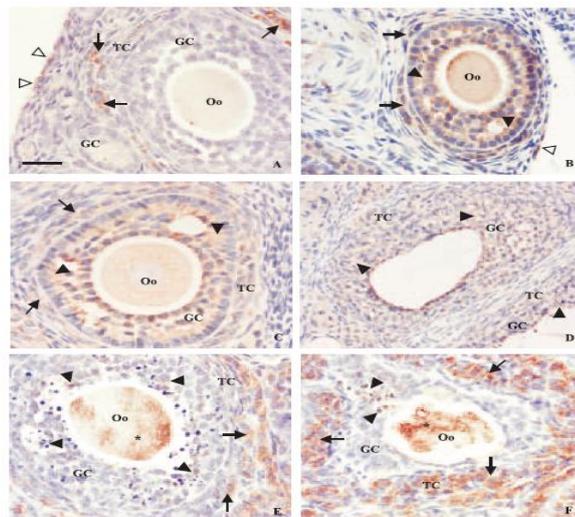
(a – d), détection immunohistochimique de la caspase-3 (e– f) et coloration DAPI (g – h) dans les différents types de cellules ovariennes bovines. (a) Follicule tertiaire kystique au début du dioestrus avec de nombreuses cellules positives TUNEL dans la couche de granulosa (1), les cellules du cumulus oophorus (2) et la couche de thèque interne (3). Barre = 50 mm. (b) Vue d'ensemble d'un follicule tertiaire atrétique oblitératif à l'oestrus montrant des cellules positives TUNEL dans les couches thécales effondrées (4). Barre = 100 mm. (c) cellules positives TUNEL dans l'épithélium de surface (5) et la tunique albuginée (6) au début du dioestrus; le stroma superficiel (7) et les follicules primaires (8) sont négatifs. Barre = 50 mm. (d) Positivité TUNEL dans les cellules lutéine du corps jaune (9) à l'oestrus. Barre = 50 mm. (e) Follicule tertiaire kystique à l'oestrus avec de nombreuses cellules positives à la caspase-3 dans la couche de granulosa (10) et des nombres inférieurs dans les couches thèques (11). Barre = 50 mm. (f) Vue d'ensemble d'un corps jaune pendant le prooestrus avec un nombre élevé de cellules de lutéine positives à la caspase-3 (12). Barre = 500 mm. (g) Follicule atrétique kystique pendant le prooestrus avec un nombre élevé de cellules apoptotiques dans la granulosa (13), des niveaux modérés dans la thèque interne (14) et de faibles niveaux dans la thèque externe (15). Coloration DAPI, barre = 50 mm. (h) Vue d'ensemble d'un follicule tertiaire atrétique oblitérant pendant le prooestrus avec des cellules apoptotiques (flèches) dans les couches thécales effondrées (16). Coloration DAPI, barre = 100 mm (D'Haeseleer *et al.*, 2006)

Le même travail a été réalisé chez la ratte par **Slot et al. (2006)** en utilisant les mêmes marqueurs de l'apoptose ovarienne (Fas, FasL, Bcl-2, Bax and caspase-3 mRNA). Les résultats obtenus sont présentés par les figures 32 -35 et le tableau 5. Ils montrent que l'intensité de l'immunomarquage des protéines Fas, Bax et caspase-3 étaient les plus élevés au dioestrus et ont diminué par la suite vers le metoestrus. Par contre, FasL et de protéine Bcl-2 étaient les plus bas au dioestrus et augmentaient vers le metoestrus. L'immunohistochimie a révélé que la coloration de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 était plus prononcée dans les follicules pré-antraux sains que dans les follicules atrétiques. En revanche, les protéines pro-apoptotiques Fas, Fas ligand, Bax et la caspase-3 active étaient plus principalement présentes dans les follicules atrétiques. Dans l'épithélium de surface ovarien (ESO), l'immunocoloration Fas, procaspase-3 et Bcl-2 est apparue indépendante de la phase du cycle œstral. La coloration du ligand Fas et du Bax a été détectée en particulier pendant le proœstrus dans les cellules ESO entourant les follicules ovulatoires, tandis que la caspase-3 active n'a été observée que dans les cellules ESO au site postovulatoire pendant l'œstrus. La proportion de cellules lutéales qui se sont colorées positivement pour Fas, Bax et caspase-3 a augmenté avec l'âge du corps jaune, tandis que l'immunocoloration du ligand Fas et de Bcl-2 était la plus forte dans les corps jaunes nouvellement formés et a diminué par la suite. En conclusion, les composants de la voie de signalisation Fas ont été exprimés de manière différentielle tout au long du cycle œstral dans une variété de types de cellules ovariennes, ce qui peut correspondre à des mécanismes de survie hormonodépendants.



**Fig. 32 :** Expression de Fas, ligand Fas, ARNm et protéine Bcl-2, Bax et caspase-3 dans des ovaires de rat entiers tout au long du cycle œstral déterminé par Western blot

Les graphiques représentent un histogramme d'analyse densitométrique des immunoblots pour chaque protéine. Les niveaux de protéines relatifs sont exprimés en tant que rapport de densité moyen S.E.M., par rapport à la valeur diestrus sur le même transfert, qui ont été quantifiés par analyse de l'intensité de densité. La coloration par immunoblot de protéine d'actine a servi de contrôle positif (chargement) (Slot *et al.*, 2006)



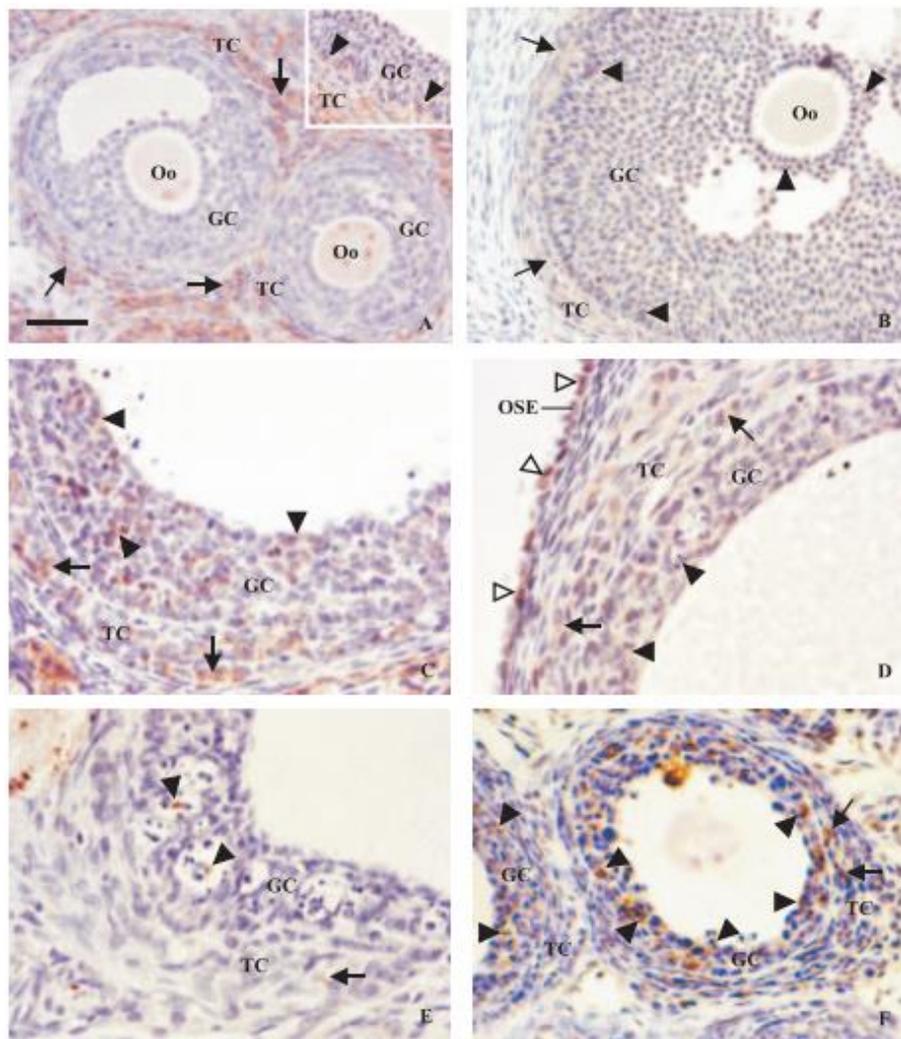
**Fig.33 :** Localisation immunohistochimique de diverses protéines impliquées dans l'apoptose dans les follicules pré-antraux de rats cyclistes.

Une coloration positive est représentée par une coloration brune du cytoplasme des cellules (A – C) Follicules pré-antraux sains; L'immunocoloration Fas (A) a été trouvée dans les cellules de la thèque mais pas dans les cellules de la granulosa, tandis que la procaspase-3 (B) et la Bcl-2 (C) ont été observées dans les cellules de la granulosa et de la thèque. (D-F) Dans les follicules pré-antraux atreétiques; moins de cellules immunopositives Bcl-2 ont été observées (D), tandis que l'immunocoloration des ligands Bax (E) et Fas (F) était maintenant également présente dans certaines cellules de la granulosa des follicules atreétiques modérément (E) et sévèrement (F). Les expériences de marquage immunohistochimique ont été répétées au moins six fois avec des résultats similaires. Cellules thèques (TC; flèches), cellules de la granulosa (GC; pointes de flèches), ovocytes (Oo), OSE (pointes de flèches ouvertes). Barre = 20 m (A – C, E, F) ou 40 m (D) (Slot *et al.*, 2006)

**Tab. 5 :** Localisation et l'évaluation de l'intensité de marquage de diverses protéines apoptotiques dans l'ovaire de rat (Slot *et al.*, 2006)

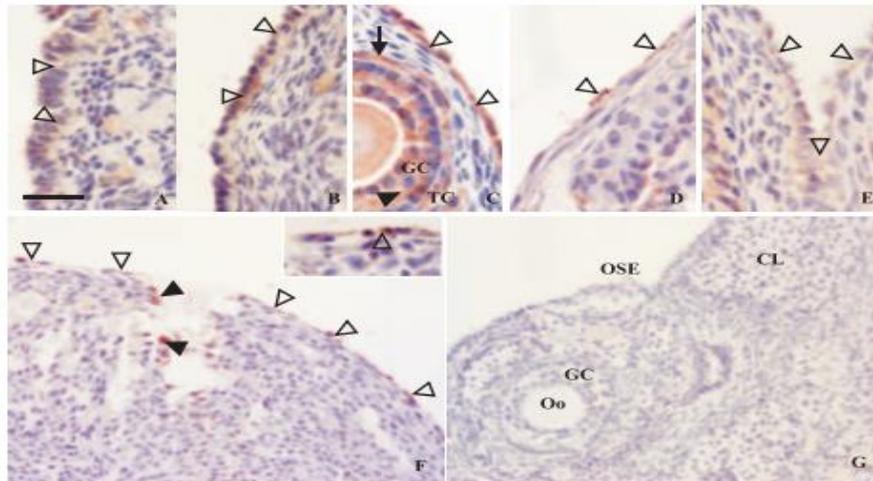
Intensité de la coloration immunohistochimique: absente (-), faible (- / +), modérée (+), élevée (++)

	<u>Fas</u>	<u>Fas ligand</u>	<u>Bcl-2</u>	<u>Bax</u>	<u>Pro-caspase-3</u>	<u>Active caspase-3</u>
<b>Preantral follicles</b>						
Healthy granulosa	-	-	+	- / +	++	-
Health theca	- / +	+	+	+	++	-
Atretic granulosa	- / +	- / +	- / +	- / +	++	+
Atretic theca	++	++	- / +	++	++	- / +
<b>Antral follicles</b>						
Healthy granulosa	- / +	-	+	- / +	++	-
Health theca	+	+	+	+	++	-
Atretic granulosa	+	- / +	- / +	- / +	++	+
Atretic theca	++	++	- / +	++	++	- / +
<b>OSE</b>						
Surface	+	- / +	+	- / +	++	-
At postovulatory site	+	+	+	+	+	+
<b>Corpora lutea</b>						
1st and 2nd generation	+	++	+	- / +	+	- / +
3rd and later generations	++	- / +	- / +	++	++	++



**Fig.34** : Localisation immunohistochimique de diverses protéines impliquées dans l'apoptose dans les follicules antraux de rats cyclistes

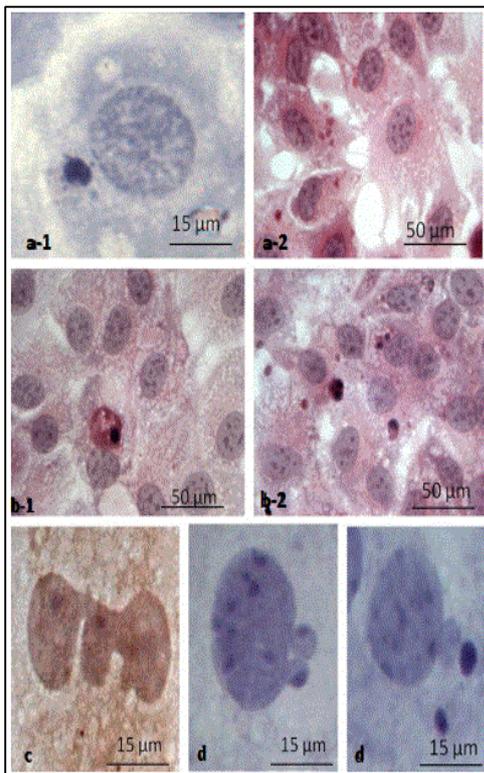
Une coloration positive est représentée par une coloration brune du cytoplasme des cellules. (A – B) Follicules antraux sains; L'immunocoloration du ligand Fas (A) a été observée uniquement dans les cellules thécales, bien qu'à proœstrus, un certain ligand Fas ait été observé dans les cellules de la granulosa murale des follicules préovulatoires proches de la membrane basale (insert), alors que Bcl-2 (B) était présent dans les deux granulosa. et les cellules thèques. (C – F) Follicules pré-antraux atrétiques; L'immunocoloration Fas (C) et procaspase-3 (D) est présente à la fois dans les cellules de la granulosa et de la thèque; la coloration pour la caspase-3 active (E) et le marquage TUNEL (F) est souvent observée dans la granulosa avec des noyaux condensés ainsi que dans certaines cellules thèques apoptotiques. Les expériences de marquage immunohistochimique ont été répétées au moins six fois avec des résultats similaires. Cellules thèques (TC; flèches), cellules de la granulosa (GC; pointes de flèches), ovocytes (Oo), OSE (pointes de flèches ouvertes). Barre = 20 m (C-E) ou 40 m (A, B, F)(Slot et al., 2006)



**Fig. 35 :** Localisation immunohistochimique de diverses protéines impliquées dans l'apoptose dans les cellules épithéliales de surface ovarienne (OSE) de rats cyclistes. Une coloration positive est représentée par une coloration brune du cytoplasme des cellules. (A-E) Sur la surface ovarienne; Les cellules OSE plates à colonnes montrent une immunocoloration positive claire pour Fas (A), Fas ligand (B), Bcl-2 (C) et procaspase-3 (E), tandis que l'immunoréactivité pour Bax (D) était principalement limitée à OSE cellules au site postovulatoire pendant l'œstrus. (F) Au moment de l'œstrus, au site postovulatoire, certaines cellules OSE étaient désormais également immunopositives pour la caspase-3 active (voir également l'encart). (G) Coupe ovarienne témoin incubée avec du sérum de lapin normal au lieu de l'anticorps primaire. Les expériences de marquage immunohistochimique ont été répétées au moins six fois avec des résultats similaires. Cellules thèques (TC; flèches), cellules de la granulosa (GC; pointes de flèches), ovocytes (Oo), OSE (pointes de flèches ouvertes), corps jaunes (CL). Barre = 10 m (A-E et insert de F), 40 m (F) ou 100 m (G) (Slot *et al.*, 2006)

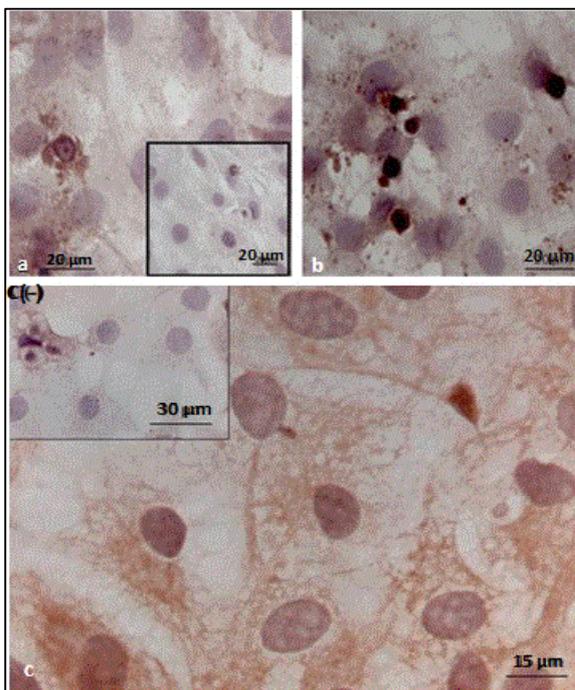
Les paramètres intervenant dans la régulation des mécanismes apoptotiques sont expliqués par les résultats de certains travaux utilisant toujours l'ovaire de la vache.

Les résultats rapportés par **Carou *et al.* (2015)** décrivent en détail les aspects morphologiques de l'apoptose induite *in vitro* par un analogue de la GnRH dans 2 types de cellules de la granulosa (CG) bovine, CPGB (Primary culture of bovine granulosa cells) et BGC-1 (Bovine granulosa Cell line), par l'utilisation de la coloration à l'hématoxyline, par la méthode TUNEL et par immunocytochimie (ICC). Ces résultats démontrent que l'agoniste de la GnRH exerce diverses actions sur les CG au cours de la croissance folliculaire. L'un régule à la baisse (down regulation) la prolifération des CG dans les follicules immatures ainsi que la stéroïdogénèse dans les follicules matures, et l'autre régule à la hausse (up regulation) l'apoptose des CG indépendamment des stades de la croissance folliculaire. Deux principaux types d'images d'apoptose sont observées, le type A et le type B. La différence entre les images d'apoptose est la taille du corps apoptotique (CA) (Figures 36-39) dont l'induction est significative dans les cellules BGC-1 par rapport à CPBG.



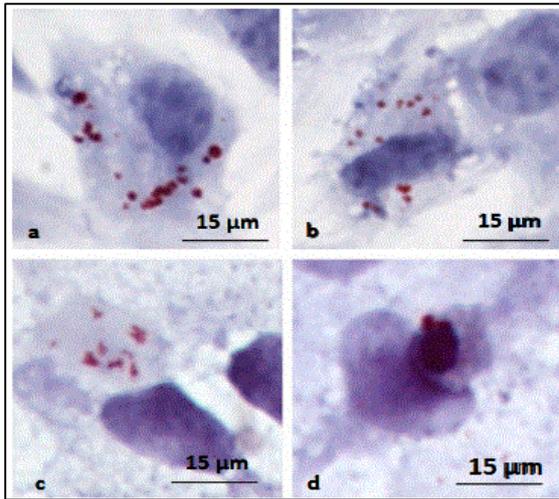
**Fig. 36** : Apoptose dans les cellules de la granulosa bovine

(a-1) Cellule BGC-1 en prophase avec un volumineux (CA) phagocyté (hématoxyline). Apoptose dans les cellules de la granulosa bovine. (a-1) Cellule BGC-1 en prophase avec un volumineux (CA) phagocyté (hématoxyline). (a-2 et b-2) Apoptose de type B dans les cellules CPGB montrant de plus petites portions de cellules apoptotiques (avec ou sans matière nucléaire) compactée pour former divers CA qui sont phagocytés par les cellules voisines (hématoxyline-éosine : H&E). (b-1) Apoptose de type A en culture CPGB avec la cellule entière compactée formant un seul CA (H&E). (c) Ségrégation chromosomique aberrante dans une cellule CPGB (ICC pour récepteur GnRH). (d) nucléophagie dans les cellules CPGB (hématoxyline) (Carou *et al.*, 2015)

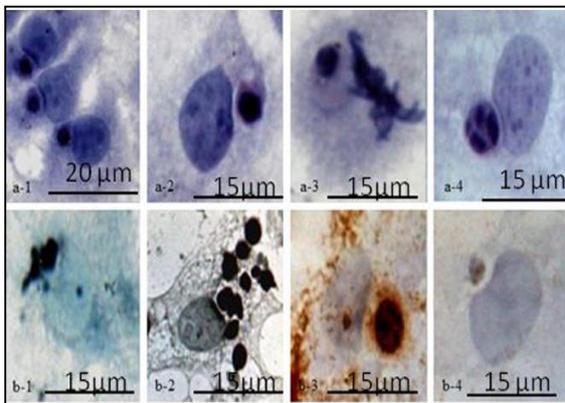


**Fig. 37** : Images de phagocytose homologue observée dans des GC en culture

(a) ICC pour la caspase-3 active. (b) ICC pour Bax (quadrant inférieur droit, contrôle négatif). (c) ICC pour GnRHr (Récepteur de GnRH). Image représentative montrant l'expression de GnRHr dans toutes les cellules sur CPGB (Carou *et al.*, 2015)

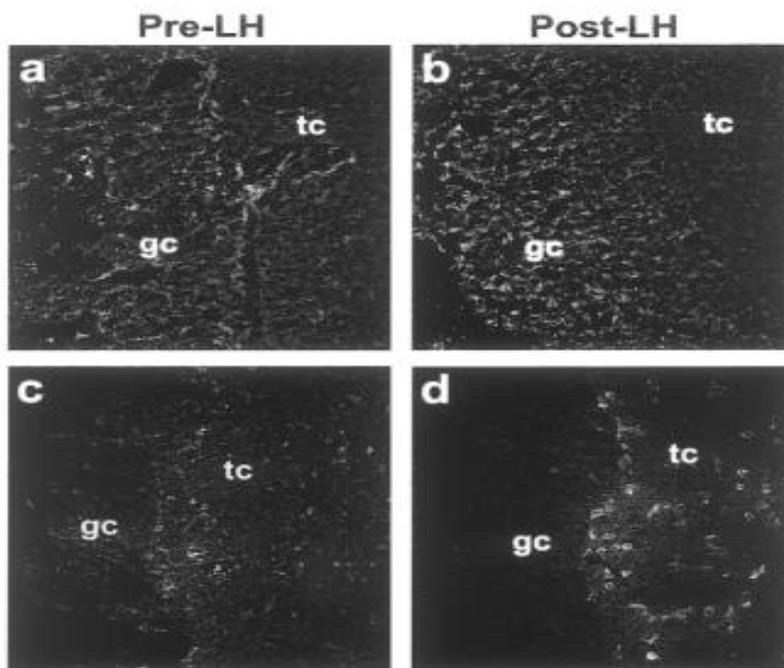


**Fig. 38 :** La coloration à l'huile rouge (ORO : oil red O) des CG contrastait avec l'hématoxyline montrant des gouttelettes de lipides cytoplasmiques comme produits de dégradation des CA engloutis après traitement des cultures avec 100 nM LA pendant 48 h : (a et b) CPGB, (c et d) BGC-1 (Carou *et al.*, 2015)



**Fig. 39 :** (a) Phagocytose observée dans les cultures de CG colorées avec H et E (a-3) CG en métaphase avec une CA phagocytée. (b) phagocytose homologue observée dans les cultures de CG colorées par le test TUNEL (b-1 et b-2) avec une contre coloration au vert de méthyle; (b-3 et b-4) contre coloration à l'hématoxyline (Carou *et al.*, 2015)

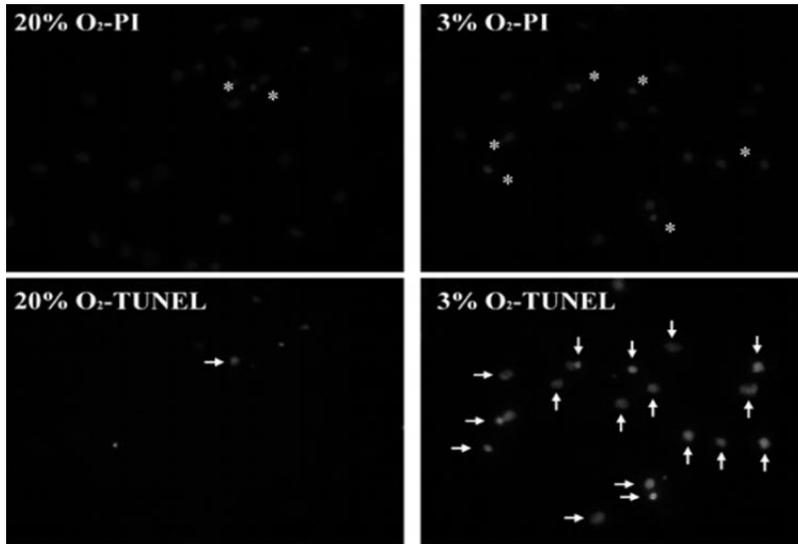
Après avoir donné les résultats de l'effet de la GnRH au niveau de l'ovaire au cours de l'apoptose des CG. Les travaux de **Porter *et al.* (2001)** sont réalisés afin de déterminer si l'exposition au pic de LH modifie la sensibilité des cellules folliculaires bovines à l'apoptose. Pour cela, des CG et de la thèque ont été isolées à partir des follicules préovulatoires bovins avant et 14 h après l'injection de GnRH pour induire un pic de LH. Les marqueurs de l'apoptose, Fas et CD45, sont mis en évidence par IHC ; sachant que l'antigène Fas est un récepteur membranaire qui induit l'apoptose lorsqu'il est lié par un ligand Fas (FasL). Les résultats montrent que la protéine Fas a été détectée dans les CG et de la thèque des follicules préovulatoires avant et après le pic de LH. L'immunomarquage de Fas était plus intense dans CG que cellules thécales (Figure 40). Les cellules de la thèque étaient sensibles à l'apoptose médiée par Fas avant et après le pic de LH. La résistance à l'apoptose des CG des follicules préovulatoires après le pic de LH peut être importante pour une ovulation et une lutéinisation normale.



**Fig. 40** : Immunolocalisation de Fas et CD45 dans la paroi du follicule bovin isolé des follicules préovulatoires avant (Pré-LH) ou 14 h après (Post-LH) d'injection de GnRH

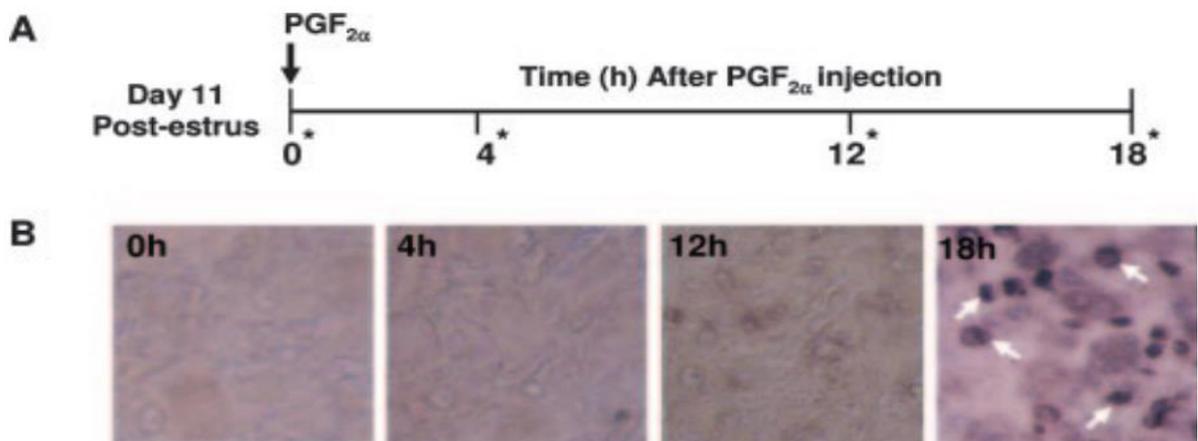
La couche de cellules de la granulosa (gc) apparaît à gauche et est séparée de la couche de cellules thécales (tc) par une membrane basale. (a-b) : immunoréactivité pour Fas ; (c-d) : immunoréactivité pour CD45 (Porter *et al.*, 2001)

La composition du milieu intérieur joue un rôle vital pour toutes les cellules de l'organisme, en particulier, la teneur en oxygène. Les perturbations de l'environnement peuvent modifier le fonctionnement des cellules. Ainsi, les travaux de **Nishimura et al. (2008)** sur des ovaires de buffles sains et non gravides et sur les ovaires de vaches Holstein ayant pour but d'examiner si une faible teneur en oxygène induit l'apoptose des cellules lutéales par une culture de ces cellules en atmosphère et en hypoxie par la méthode TUNEL et le test de cytotoxicité par PCR. Les résultats de la méthode TUNEL montrent que la fragmentation de l'ADN est produite dans la plupart des cellules cultivées sous état hypoxique pendant 48 h (Figure 41). L'analyse PCR en temps réel a montré que l'hypoxie n'avait pas un effet significatif sur les expressions de l'ARNm Bcl2 et BAX, mais les expressions de l'ARNm de la caspase 3 est plus élevée à 24 et 48 h de culture en hypoxie. Ces résultats indiquent que l'hypoxie induit la mort de la cellule lutéale par l'augmentation de l'expression de la caspase 3. De plus, comme l'hypoxie inhibe la production de P4 au niveau les cultures des cellules lutéales bovines, nous suggérons qu'une carence en oxygène causée par une diminution de l'apport sanguin est nécessaire pour la progression de la luteolyse fonctionnelle et structurelle chez les bovins.



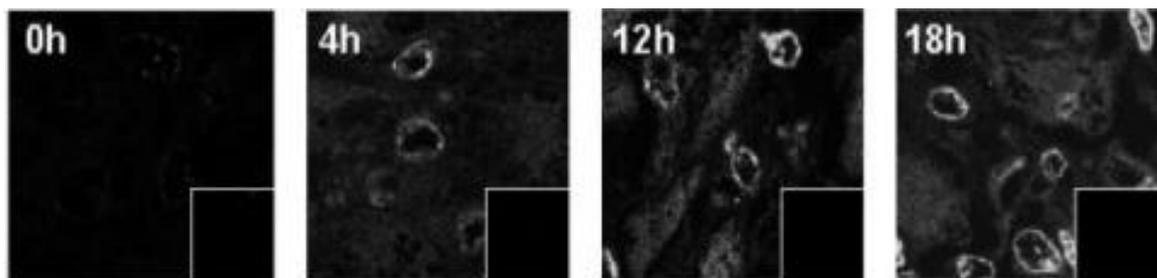
**Fig. 41** : Détection de la fragmentation de l'ADN dans les cellules lutéales bovines par microscopie à fluorescence (Nishimura et al., 2008)

Pour mieux comprendre les effets des prostaglandines (PGF 2 $\alpha$ ), hormones utilisés dans la synchronisation des chaleurs. **Yadav et al. (2005)** ont menées des travaux pour caractériser les changements dans la signalisation apoptotique aboutissant à l'apoptose des cellules lutéales du corps jaune au cours de la lutéolyse. A 4, 12 et 18 h après l'injection de PGF2 $\alpha$ , les ovaires sont collectés et les corps jaunes sont prélevés. L'apoptose est mise en évidence par IHC et RT-PCR. Les résultats d'analyse montrent une augmentation de cellules apoptotiques 18 h après injection des PGF 2 $\alpha$  (Figure 42). Analyse immunohistochimique de Bax a révélé une augmentation de l'apparence ponctuée des cellules lutéales (en la région périnucléaire) pendant l'apoptose induite par PGF 2 $\alpha$ , un paramètre qui confirme la localisation accrue de protéines aux mitochondries (Figure 43). Cette étude fournit des preuves pour la régulation de l'expression de Bax par PGF 2 $\alpha$  dans le corps jaune .



**Fig. 42** : Apoptose induite par la prostaglandine F2 dans le corps jaune bovin

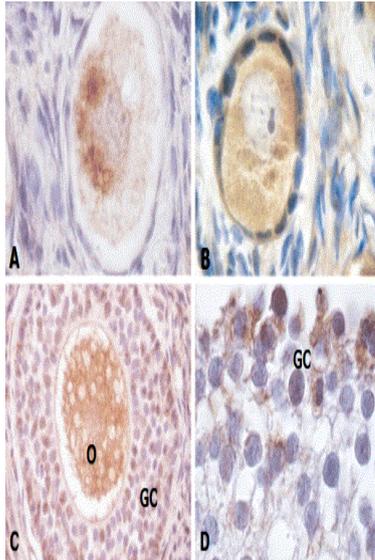
(A), représentation schématique de la procédure expérimentale pour le traitement PGF2 et la collecte du corps jaune chez les vaches buffles (*B. bubalis*). L'astérisque indique le moment de la collecte du corps jaune. (B), corps jaune collectés sur les vaches buffles à différents moments après le traitement PGF2 ont été traités pour une analyse d'apoptose in situ en utilisant un kit de détection de mort cellulaire in situ (Roche Diagnostics). Les flèches indiquent les noyaux apoptotiques. Grossissement : x100 (Yadav *et al.*, 2005)



**Fig. 43** : Coupes représentatives des corps jaunes de coloration immunohistochimique pour Bax

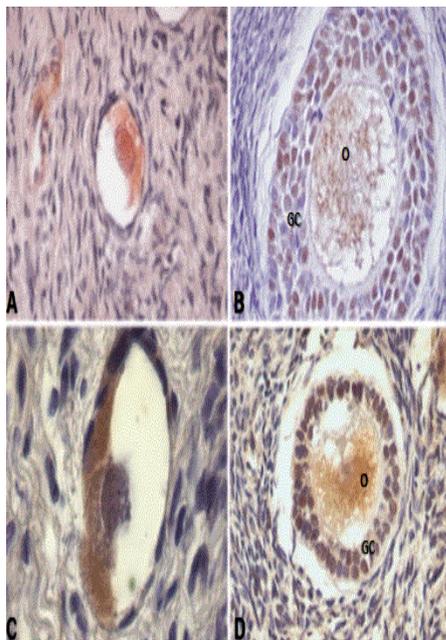
Des coupes de corps jaunes du tissu lutéal collectées avant et à différents moments après le traitement par PGF2 ont été réhydratées et incubées avec un anticorps Bax. Les coupes ont été montées dans du glycérol et visualisées sous un microscope confocal à 100 (Zoom 1,5). L'encart montre l'immunocoloration observée avec des IgG de lapin (contrôle négatif) (Yadav *et al.*, 2005)

Les résultats rapportés par **Albamonte *et al* (2019)** sur des biopsies ovariennes des adolescentes ayant reçu ou non une chimiothérapie pré-chirurgicale montrent un immunomarquage des follicules ovariens de l'expression de la anti-apoptotique Bcl2 (Figure 44) les protéines de la voie extrinsèque Fas/ FasL (Figure 45). Egalement, l'expression de ces dernières et la pro-caspase-3 été détecté dans les CG (Figure 46), ceci peut être dû à la possible d'augmentation de l'activité des cellules souches ovariennes en réponse à la chimiothérapie et/ou le cancer extragonadal (Albamonte *et al.*, 2019).



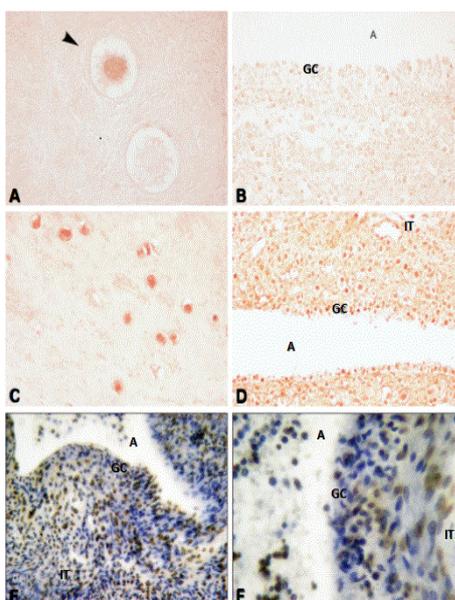
**Fig. 44** : Détection de la protéine Bcl2 anti-apoptotique dans l'ovaire humain adolescent

(A) follicule primordial et (B) Follicule primordial/primaire Bcl2 positif. Bcl-2 était distribué de manière hétérogène dans une localisation para-nucléaire dans le cytoplasme de l'ovocyte (têtes de flèche) (1000X). (C) Follicules secondaires présentent Bcl-2 dans les CG et dans la cellule germinale proprement dite (200X). (D) Follicule antral (vue partielle), Bcl-2 est détectable dans les CG (1000X)(Albamonte *et al.*, 2019)



**Fig. 45** : Immunocoloration pour les deux protéines Fas / FasL dans l'ovaire adolescent humain

(a) Follicule primaire (400X) et (b) Follicule secondaire (400X) étaient positifs pour la protéine Fas. Dans le dernier, il était détectable dans les cellules des ovocytes et GC. (c) Follicule primordial positif pour le FasL dans un ovocyte cytoplasme (1000X). (d) Follicule secondaire positif pour le FasL dans les cellules d'ovocytes et de GC (400X). O: ovocyte; GC: cellules de la granulosa (Albamonte *et al.*, 2019)



**Fig. 46 :** Immunodétection pour caspase-3 et TUNEL dosé dans l'ovaire humain

(A) Follicules primordiaux positifs (tête de flèche) et négatifs pour la pro-caspase-3 (400X). (B) Vue partielle d'un follicule antrale atrétique négatif pour la pro-caspase 3 (200X). C Vue panoramique de l'ovaire cortex montrant l'abondance de follicules primordiaux positifs pour la protéine caspase-3 clivée (100X). (D) un follicule atrétique antrale était positif pour la caspase-3 clivée dans la granulosa et les cellules thécales (200X). (E) Des cellules apoptotiques ont été détectées dans la granulosa et les cellules thécales des follicules antraux (400X). (F) Vue partielle d'un follicule antrale atrétique avec des cellules de granulosa TUNEL positives (1000X). A: antrum; GC: cellules de la granulosa, IT: thèque interne (Albamonte *et al.*, 2019)

**Tab. 6 :** Tableau comparatif des résultats des articles synthétisés

Espèce	Méthodes	Localisation de l'apoptose					Références
		GC	GT	CL	ESO	Oo	
Bovine	TUNEL	+	+	+	+	-	D'Haeseleer et al. (2006)
	IHC	+	+	+	-	-	
	DAPI	+	+	-	-	-	
	IHC	+	+	-	-	-	Porter et al. (2001)
	IHC	+	-	-	-	-	Carou et al. (2015)
	TUNEL	-	-	+	-	-	Nishimura et al.(2008)
	IHC	-	-	+	-	-	Yadav et al. (2005)
Humain	TUNEL	+	+	-	-	-	Albamonte et al, (2019)
	IHC	+	-	-	-	-	
Rat	IHC	+	+	+	+	-	Slot et al. (2006)

( + ) : présent , ( - ) : absent

# Conclusion

L'immunolocalisation des facteurs régulateurs de l'apoptose (Fas, FasL, caspase-3, Bcl2, Bax) dans l'ovaire chez certains mammifères a montré le marquage des différentes parties structures ovariennes en fonction du stade du cycle œstral : œstrus, metoestrus, dioestrus et proœstrus.

L'ensemble des résultats obtenus de différents travaux montre que les marqueurs apoptotiques (Fas, Bax, caspase-3, Bcl-2) sont retrouvés dans les différents types de cellules ovariennes au cours des différents stades du cycle œstral. L'intensité de l'immunomarquage varie également en fonction du type de follicules et avec le stade du cycle.

Le phénomène d'apoptose affecte l'ensemble des structures cellulaire ovariennes aux différents stades du cycle œstral chez les bovins.

La connaissance de l'anatomie et de la physiologie ovarienne, ainsi le mécanisme d'action des facteurs régulateurs de l'apoptose au niveau de cet organe, est un prérequis essentiel non seulement pour comprendre la pathologie fonctionnelle de l'ovaire au moment de l'insémination artificielle (IA) ou la fécondation in vitro (FIV), pour éliminer les ovocytes contenant des anomalies méiotiques d'appariements ou de recombinaisons chromosomiques, mais aussi pour exploiter ce mécanisme pour améliorer la thérapie en cancérologie, les maladies neurodégénératives, et auto-immune.

# **Références bibliographiques**

1. Albamonte, M.I., Albamonte, M.S., Bou-Khair, R.M., Zuccardi, L., Vitullo, A.D., 2019. The ovarian germinal reserve and apoptosis-related proteins in the infant and adolescent human ovary. *J Ovarian Res* 12, 22.
2. Axay, J., Haque, N., Lateef, A., Patel, A., Patel, P., 2017. Apoptosis and Its Role in Physiology. *International Journal of Livestock Research*, 1.
3. Ball, P., Peters, A., 2004. chapitre :The ovarian cycle. In, *Reproduction in Cattle Vol. 250*. Wiley, pp. 40-44.
4. Barret, J.P., 2011. Conduite de la reproduction des animaux domestiques In, *Zootecnie générale*, Vol. 318. Tec & Doc Lavoisier, p. 190.
5. Bazot, M., Fédida, B., Dechoux-Vodovar, S., Beldjord, S., Thomassin-Naggara, I., 2016. Ovaires : variations physiologiques et pathologies fonctionnelles. *Feuillets de Radiologie* 56, 65-84.
6. Belotti, E., Stassi, A.F., Velázquez, M., Díaz, P., Marelli, B., Rey, F., Notaro, U., Ortega, H., Salvetti, N., 2017. Changes in the Proliferation/Apoptosis Balance in the Bovine Ovary: A Key Early Event in Follicular Persistence. *Cells Tissues Organs* 204, 314-325.
7. Bressenot, A., Marchal, S., Bezdetnaya, L., Garrier, J., Guillemin, F., Plenat, F., 2009. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *J Histochem Cytochem* 57, 289-300.
8. Carella, F., Feist, S., Bignell, J., De Vico, G., 2015. Comparative pathology in bivalves: Etiological agents and disease processes. *Journal of invertebrate pathology* 131.
9. Carou, M.C., Cruzans, P.R., Maruri, A., Stockert, J.C., Lombardo, D.M., 2015. Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: morphological features and clearance by homologous phagocytosis. *Acta Histochem* 117, 92-103.
10. Crowley, L.C., Marfell, B.J., Waterhouse, N.J., 2016. Detection of DNA Fragmentation in Apoptotic Cells by TUNEL. *Cold Spring Harb Protoc* 2016.
11. D'Haeseleer, M., Cocquyt, G., Van Cruchten, S., Simoens, P., Van den Broeck, W., 2006. Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Theriogenology* 65, 757-772.
12. Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D., Zhao, H., 2008. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* 44, 250-254.
13. Driancourt, A.M., Cognié, Y., 1997. controle de la folliculogenèse terminale par les gonadotropines In: *Combarnous, Y., Nail, P.V. (Eds.), Les gonadotropines Quae*, p. 397.
14. Driancourt, A.M., Fréret, S., Dizier, M., 2014. cycle oestriens. In: *Dizier, M.S., Maillard, C.S. (Eds.), La reproduction animale et humaine, Vol. 800. Quae*, pp. 226-227.
15. Driancourt, A.M., Fréret, S., Dizier, M., 2014. Cycles oestriens. In: *Dizier, M.S., Maillard, C.S. (Eds.), La reproduction animale et humaine, Vol. 800. Quae*, pp. 226-227.
16. Driancourt, A.M., Gogéon, A., Monniaux, D., Royère, D., Thibault, C., 2001. folliculogenèse et ovulation In: *Thibault, C., Levasseur, M.C. (Eds.), La reproduction chez les mammifères et l'homme Vol. 928. INRA*, pp. 323-324.
17. Driancourt, M.A., Thatcher, W.W., Terqui, M., Andrieu, D., 2011. Fonctionnement des ovaires. In: *Adamo, C., Antignac, J.-P., Auger, J., Balaguer, P., Bourc'his, D., Bujan, L., Chevrier, C., Cotinot, C., Cravedi, J.-P., Laudet, V., Livera, G., Slama, R. (Eds.), reproduction et environnement Vol. 740*, p. 101.
18. Drion, P.V., Bekers, J.F., Ectors, F.J., Hanzen, C., Houtain, J.Y., Lonergan, P., 1996. Régulation de la croissance folliculaire et lutéale. *Le point vétérinaire*, 11.
19. Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K., Palanisamy, M., 2012. Applications of immunohistochemistry. *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 4, S307-309.
20. Edinger, A.L., Thompson, C.B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16, 663-669.
21. Elmore, S., 2007a. Apoptosis A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
22. Elmore, S., 2007b. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.

23. Escobar, M.L., Echeverría, O.M., Vázquez-Nin, G.H., 2015. Necrosis as Programmed Cell Death. In, *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, pp. 420-432.
24. Frandson, R.D., Wilke, W.L., Fails, A.D., 2013a. Anatomy of the female reproductive system In: John Wiley and Sons (Ed.), *Anatomy and Physiology of Farm Animals* Wiley, pp. 421-428.
25. Frandson, R.D., Wilke, W.L., Fails, A.D., 2013b. The ovary and estrous cycles. In: John Wiley and Sons (Ed.), *Anatomy and Physiology of Farm Animals* Wiley, pp. 429-438.
26. Genton, C.Y., 2006. L'immunohistochimie son principe, ses applications et ses limites. *Clin Mother Child Health* 3, 477-481.
27. Grasso, D., Ropolo, A., Vaccaro, M., 2015. Autophagy in Cell Fate and Diseases. In.
28. Hanson, K.M., Finkelstein, J.N., 2019. An accessible and high-throughput strategy of continuously monitoring apoptosis by fluorescent detection of caspase activation. *Anal Biochem* 564-565, 96-101.
29. Hilton, D., Love, S., Barber, R., 1997. Demonstration of Apoptotic Cells in Tissue Sections by In Situ Hybridization Using Digoxigenin-labeled Poly(A) Oligonucleotide Probes to Detect Thymidine-rich DNA Sequences. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45, 13 - 20.
30. Holubec, H., Payne, C., Bernstein, H., Dvorak, K., Bernstein, C., Waltmire, C., Warneke, J., Garewal, H., 2005. Assessment of Apoptosis by Immunohistochemical Markers Compared to Cellular Morphology in Ex Vivo-stressed Colonic Mucosa. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 53, 229-235.
31. Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M., Betteridge, K., 2009. Comparative reproduction. In: Elsevier Health Sciences (Ed.), *Essentials of Domestic Animal Embryology* Vol. 472. Elsevier Health Sciences, pp. 27-31.
32. Ireland, J.J., Murphee, R.L., Coulson, P.B., 1980. Accuracy of Predicting Stages of Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum<sup>1</sup>. *J Dairy Sci* 63, 155-160.
33. Jin, Z., El-Deiry, W.S., 2005. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy* 4, 139-163.
34. Kassouri-Maouche, S., Boukenaoui-Ferrouk, N., Charallah, S., Moudilou, E., Chakhma, A., Exbrayat, J.M., Amirat, Z., Khammar, F., 2019. Atretic ovarian follicles morphology and immunolocalization of active caspase-3 in Algerian Bedouin goat (*Capra hircus*) ovaries. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 25, 147-156.
35. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Curriet, A.R., 1972. Apoptosis a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics 26, 239-257.
36. Kiess, W., Gallaher, B., 1998. Hormonal control of programmed cell death/ apoptosis. *European Journal of Endocrinology* 138, 482-491.
37. Leborgne, M.C., Tanguy, J.M., Foisseau, J.M., Selin, I., Vergonzanne, G., Wimmer, E., 2014. chapitre : Anatomie des appareils reproducteurs In, *Reproduction des animaux d'élevage (édition 2013)* Vol. 38. Educagri, pp. 18-27.
38. Lefevre, B., 2011. Follicular atresia: Its features as predictive markers for the outcome of assisted reproduction. *Gynecol Obstet Fertil* 39, 58-62.
39. Leung, P., Cheng, C.K., 2003. Gn-RH as an Autocrine Regulator in the Human Ovary. *The Ovary: Second Edition*, 289-304.
40. Liebich, H.G., Budras, K.D., 2010. Pelvic cavity and inguinal region, including urinary and genital organs : female genital organs. In: Budras, K.D. (Ed.), *Bovine Anatomy An Illustrated Text* Vol. 144. Schluetersche, p. 86.
41. Linford, R., Nabors, B., 2014. chapitre : Anatomy of the Reproductive System of the Cow In, *Bovine Reproduction* Vol. 807. Wiley, pp. 191-194.
42. Majtnerová, P., Rousar, T., 2018. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports* 45, 1-10.
43. Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., Ohkura, S., 2012. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries. *Reproduction and development* 58, 44-50.
44. Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale, Vol. 345. Masson.

45. Mcgee, E., Hsueh, A., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews* 21 2, 200-214.
46. Mercié, P., Belloc, F., 2000. Mécanismes physiopathologiques et méthodes d'analyse. *Lexique* 5, 90-96.
47. Monniaux, D., 2002. Apoptose ovocytaire et évolution de la réserve ovarienne. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 30, 822-826.
48. Monniaux, D., Caraty, A., Clément, F., Dalbies, T.R., Dupont, J., Fabre, S., Gérard, N., Mermillod, P., Monget, P., Uzbekova, S., 2009. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *Inra Productions Animales* 59-76, 64.
49. Monniaux, D., Mandon-P , B., Monget, P., 1999. L'atrésie folliculaire, un gaspillage programmé. *médecine/sciences* 15, 157-166.
50. Nagata, S., 2018. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology* 28, 489-517.
51. Nakayama, M., Manabe, N., Nishihara, S., Miyamoto, H., 2000. Species-specific Differences in Apoptotic Cell Localization in Granulosa and Theca Interna Cells during Follicular Atresia in Porcine and Bovine Ovaries. *Journal of Reproduction and Development* 46, 147-156.
52. Newbold, A., Martin, B., Cullinane, C., Bots, M., 2014. Detection of Apoptotic Cells Using Immunohistochemistry. *Cold Spring Harbor protocols* 2014, pdb.prot082537.
53. Nishimura, R., Komiyama, J., Tasaki, Y., Acosta, T.J., Okuda, K., 2008. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 78, 529-536.
54. Okuda, K., Korzekwa, A., Shibaya, M., Murakami, S., Nishimura, R., Tsubouchi, M., Woclawek-Potocka, I., Skarzynski, D.J., 2004. Progesterone Is a Suppressor of Apoptosis in Bovine Luteal Cells1. *Biology of Reproduction* 71, 2065-2071.
55. Paul, D.C., Giovanni, G., Luc, D.ô.t., Motozumi, M., Akio, M., Jill , C., 2010. Bovine Ovary. In, *PRACTICAL ATLAS OF RUMINANT AND CAMELID REPRODUCTIVE ULTRASONOGRAPHY*, Vol. 228, pp. 35-54.
56. Perez Marquez, H.J., Ambrose, D.J., Schaefer, A.I., Cook, N.J., Bench, C.J., 2019. Infrared thermography and behavioral biometrics associated with estrus indicators and ovulation in estrus-synchronized dairy cows housed in tiestalls. *J Dairy Sci* 102, 4427-4440.
57. Picton, H.M., 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55, 1193-1210.
58. Porter , D.A., Harman, R.M., Cowan, R.G., Quirk, S.M., 2001. Susceptibility of ovarian granulosa cells to apoptosis differs in cells isolated before or after the preovulatory LH surge. *Molecular and Cellular Endocrinology* 176 13–20.
59. Riccardi, C., Nicoletti, I., 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1, 1458-1461.
60. Riedl, S.J., Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
61. Santos, S.S., Ferreira, M.A., Pinto, J.A., Sampaio, R.V., Carvalho, A.C., Silva, T.V., Costa, N.N., Cordeiro, M.S., Miranda, M.S., Ribeiro, H.F., Ohashi, O.M., 2013. Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. *Theriogenology* 79, 344-350.
62. Saraste, A., Pulkki, K., 1999. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis 45, 528-537.
63. Shen, S., Kepp, O., Michaud, M., Martins, I., Minoux, H., Metivier, D., Maiuri, M.C., Kroemer, R.T., Kroemer, G., 2011. Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene* 30, 4544-4556.
64. Slot, K.A., Voorendt, M., Boer-Brouwer, M., Vugt, H., Teerds, K., 2006. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *The Journal of endocrinology* 188, 179-192.
65. Tajima, K., Orisaka, M., Hosokawa, K., Amsterdam, A., Kotsuji, F., 2002. Effects of Ovarian Theca Cells on Apoptosis and Proliferation of Granulosa Cells: Changes During Bovine Follicular Maturation. *Biology of Reproduction* 66, 1635-1639.

66. Vasseur, C., Christin-Maître, S., Bouchard, P., 1999. Physiopathologie de l'insuffisance ovarienne prématurée : faits et perspectives. *M S-medicine Sciences* 15, 204-211.
67. Vázquez-Nin, G.H., Escobar, M.L., Echeverría, O.M., 2011a. Apoptosis. In: Springer Science & Business Media (Ed.), *Cell Death in Mammalian Ovary*, Vol. 233, pp. 63-78.
68. Vázquez-Nin, G.H., Escobar, M.L., Echeverría, O.M., 2011b. Autophagy. In: Springer Science & Business Media (Ed.), *Cell Death in Mammalian Ovary* Vol. 233. Springer Netherlands, pp. 81-102.
69. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84, 627-639.
70. Widmann, C., 2005. Mécanismes de survie au stress cellulaire. *Rev Med Suisse* 1.
71. Yadav, V.K., Lakshmi, G., Medhamurthy, R., 2005. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280, 10357-10367.
72. Yu, Y.S., Sui, H.S., Han, Z.B., Li, W., Luo, M.J., Tan, J.H., 2004. Apoptosis in granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. *Cell Res* 14, 341-346.

# **Annexes**

## **Annexe 01 :**

**Titre :** Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle

**Auteurs :** M.D'haeseleer G.CocquytS. VanCruchtenP.SimoensW. Van DenBroeck

**Revue :** Theriogenology Volume 65, Issue 4, 1 March 2006, Pages 757-772

**Mots clés :** Bovin, Ovaire, Apoptose, Stades du cycle

### **Résumé :**

L'apoptose a été localisée dans tous les types de cellules ovariennes de 23 vaches à divers stades du cycle œstral, en utilisant la détection de la caspase-3 active, le marquage d'extrémité in situ (TUNEL) et la coloration fluorescente de l'ADN (DAPI). Très peu de cellules apoptotiques ont été trouvées dans les follicules tertiaires primordiaux, primaires, secondaires et vitaux. En revanche, l'apoptose dans les follicules tertiaires atrétiques était beaucoup plus fréquente, et des scores apoptotiques élevés ont été enregistrés lors de l'utilisation de la technique TUNEL et des scores inférieurs avec le test de la caspase-3. Les follicules atrétiques kystiques ont montré en général un score apoptotique plus élevé que les follicules atrétiques oblitérant, avec des scores intermédiaires à élevés dans les cellules de la granulosa et des scores inférieurs dans les cellules thécales. Dans les corps jaunes, les grandes et petites cellules de lutéine avaient des scores intermédiaires à élevés en utilisant le test de la caspase-3 et des scores intermédiaires à faibles en utilisant le test TUNEL. Indépendamment de la méthode de détection, les scores étaient plus élevés dans les cellules de lutéine que dans les cellules de stroma capsulaire. Dans toutes les structures ovariennes examinées, des variations des scores apoptotiques ont été observées aux différents stades du cycle, suggérant une influence dépendant du cycle sur l'apoptose, bien que les corrélations avec les concentrations plasmatiques de progestérone soient faibles.

## **Annexe 02 :**

**Titre :** Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary

**Auteurs :** Slot, K.A.; Voorendt, M.; Boer-Brouwer, de M.; Vugt, van H.H.; Teerds, K.J.

**Revue :** Journal of Endocrinology, Vol 188(2), 179 - 192. ISSN 0022-0795

**Mots clés :** cellules épithéliales de surface, acide ribonucléique messenger, cellules immunitaires lutéales, facteur de croissance i, corps jaune, cellules de la granulosa, atrésie folliculaire, apoptose induite, gonadotrophine chorionique, corps jaunes

### **Résumé :**

Dans la présente étude, la localisation des protéines impliquées dans l'apoptose ovarienne a été étudiée tout au long du cycle œstral en présence de taux d'hormones fluctuants. L'expression et les protéines de l'ARNm Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax et caspase-3 ont été détectées dans tous les extraits de tissu ovarien, bien que la quantité de protéine varie avec la phase du cycle œstral. Les taux de protéines Fas, Bax et caspase-3 étaient les plus élevés au dioestrus et ont diminué par la suite vers le metoestrus. En revanche, les taux de ligand Fas et de protéine Bcl-2 étaient les plus bas au dioestrus et augmentaient vers le metoestrus. L'immunohistochimie a révélé que la coloration de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 était plus prononcée dans les follicules pré-antraux sains que dans les follicules atrétiques. En revanche, les protéines pro-apoptotiques Fas, Fas ligand, Bax et la caspase-3 active étaient plus principalement présentes dans les follicules atrétiques. Dans l'épithélium de surface ovarien, l'immunocoloration Fas, procaspase-3 et Bcl-2 est apparue indépendante de la phase du cycle œstral. La coloration du ligand Fas et du Bax a été détectée en particulier pendant le proœstrus dans les cellules OSE entourant les follicules ovulatoires, tandis que la caspase-3 active n'a été observée que dans les cellules OSE au site postovulatoire pendant l'œstrus. La proportion de cellules lutéales qui se sont colorées positivement pour Fas, Bax et caspase-3 a augmenté avec l'âge du corps jaune, tandis que l'immunocoloration du ligand Fas et de

Bcl-2 était la plus forte dans les corps jaunes nouvellement formés et a diminué par la suite. En conclusion, les composants de la voie de signalisation Fas ont été exprimés de manière différentielle tout au long du cycle œstral dans une variété de types de cellules ovariennes, ce qui peut correspondre à des mécanismes de survie hormonodépendants.

#### **Annexe 03 :**

**Titre :** Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: Morphological features and clearance by homologous phagocytosis

**Auteurs :** María Clara Carou , Paula Romina Cruzans , Alejandro Maruri , Juan Carlos Stoc kert , Daniel Marcelo Lombardo

**Revue :** Acta Histochemica Volume 117, Issue 1, January 2015, Pages 92-103

**Mots clés :** Apoptose, Cellules de la granulosa bovine, phagocytose homologue, BGC-1GnRH

#### **Résumé :**

L'apoptose est impliquée dans de nombreux processus physiologiques de l'ovaire, tels que le recrutement de cellules germinales prénatales, l'atrésie folliculaire, l'ovulation et la lutéolyse. Sur la base de la nécessité de l'implication des cellules phagocytaires pour atteindre la clairance de l'apoptose et que l'atrésie folliculaire est déclenchée par de faibles stimuli apoptotiques, nous postulons que les cellules de la granulosa corps apoptotiques engloutis (AC) doivent effectuer ce processus macrophagique. L'apoptose ayant été définie au début en termes d'aspects morphologiques, nous décrivons ici l'apoptose induite par un analogue de la GnRH (acétate de leuprolide, LA) au niveau histologique sur les cellules de la granulosa bovine (culture primaire, CPGB, et une lignée cellulaire établie, BGC-1). Nous avons observé deux principaux types d'apoptose. Dans le type A, la cellule entière ou la majeure partie est compactée en un seul grand courant alternatif qui est ensuite englouti par les cellules voisines ou simplement détaché. Dans le type B, de petites portions de cellules, avec ou sans matière nucléaire, deviennent des AC qui sont également phagocytées. L'apoptose et la phagocytose homologue ont été confirmées par TUNEL et Immunocytochimie pour Bax et la caspase active 3. L'induction de l'apoptose était significative dans les cellules BGC-1 traitées pendant 24 h avec 100 nM LA. Les cellules CPGB ont montré deux types de réponse avec différentes doses de LA. Le sérum de veau foetal était nécessaire pour trouver l'apoptose induite par LA .

#### **Annexe 04 :**

**Titre :** Susceptibility of ovarian granulosa cells to apoptosis differs in cells isolated before or after the preovulatory LH surge

**Auteurs :** Dale A. Porter, Rebecca M. Harman, Robert G. Cowan, Susan M. Quirk

**Revue :** Molecular and Cellular Endocrinology 176 (2001) 13–20

**Mots clés :** Apoptose; Antigène Fas; Surtension LH; Follicule; Ovaire

#### **Résumé :**

La poussée de l'hormone lutéinisante initie les dernières étapes du développement du follicule ovarien et induit l'ovulation et lutéinisation des follicules préovulatoires. Examiner si l'exposition à la poussée de LH modifie la sensibilité des cellules folliculaires à des cellules d'apoptose, de granulosa et de thèque ont été isolées à partir de follicules préovulatoires bovins avant et 14 h après l'injection de GnRH à induire une surtension de LH. Les cellules de granulosa isolées avant le pic de LH étaient sensibles à l'apoptose induite par le ligand Fas soluble ou retrait de sérum, tandis que les cellules isolées après le pic de LH étaient résistantes à l'apoptose. La résistance à l'apoptose médiée par Fas était non associée à une diminution des taux d'ARNm ou de protéines de Fas. Prétraitement des cellules de la granulosa isolées après le pic de LH avec le cycloheximide, inhibiteur de la synthèse des protéines, a rendu les cellules sensibles à l'apoptose médiée par Fas, indiquant que l'inhibition de l'apoptose était médiée par l'expression de facteurs de survie labiles. Les cellules Theca étaient sensibles à l'apoptose médiée par Fas avant et après une exposition à la

surtension de LH. La résistance à l'apoptose des cellules de la granulosa des follicules préovulatoires après le pic de LH peut être important pour l'ovulation et la lutéinisation normales.

#### **Annexe 05 :**

**Titre :** Hypoxia Promotes Luteal Cell Death in Bovine Corpus Luteum

**Auteurs :** Ryo Nishimura, Junichi Komiyama, Yukari Tasaki, Tomas J. Acosta, and Kiyoshi Okuda<sup>2</sup>

**Revue :** Biology of reproduction Vol 78, 529–536 (2008)

**Mots clés :** apoptose, corps jaune, progestérone, transduction du signal, hypoxie

#### **Résumé :**

Un faible taux d'oxygène causé par une diminution de l'apport sanguin est connu pour induire diverses réponses des cellules, y compris l'apoptose. La présente étude a été menée pour examiner si une faible teneur en oxygène conditions (hypoxie) induisent l'apoptose des cellules lutéales chez les bovins. Cellules médio-utérales bovines incubées sous hypoxie (3% O<sub>2</sub>) ont montré beaucoup plus de mort cellulaire que ceux incubés sous normoxie (20% O<sub>2</sub>) à 24 et 48 h de culture, et avait des niveaux de progestérone (P<sub>4</sub>) significativement plus bas à partir de 8 h. Caractéristiques de l'apoptose, telles que noyaux rétrécis et fragmentation de l'ADN, ont été observés dans des cellules cultivées sous hypoxie pendant 48 h. L'hypoxie a augmenté les expressions d'ARNm de BNIP3 et caspase 3 à 24 et 48 h de culture. L'hypoxie n'avait pas effet significatif sur les expressions de l'ARNm BCL2 et BAX. L'hypoxie a également augmenté la protéine BNIP3 et activé la caspase-3. Traitement de la mort cellulaire atténuée P<sub>4</sub>, ARNm de la caspase-3 expression et activité caspase-3 sous hypoxie. Résultats globaux de la présente étude indiquent que l'hypoxie induit la cellule lutéale l'apoptose en augmentant l'expression de la protéine proapoptotique, BNIP3, et en activant la caspase-3, et que l'induction de l'apoptose par hypoxie est partiellement causée par une diminution de P<sub>4</sub> production. Parce que l'hypoxie supprime la synthèse de P<sub>4</sub> chez les bovins cellules lutéales, nous suggérons que la carence en oxygène causée par une diminution de l'apport sanguin dans le corps jaune bovin est l'un des les principaux facteurs contribuant à la fois au fonctionnement lutéolyse.

#### **Annexe 06 :**

**Titre :** Prostaglandin F<sub>2</sub>α mediated Activation of Apoptotic Signaling Cascades in the Corpus Luteum during Apoptosis

**Auteur :** Vijay K. Yadav, Garimella Lakshmi, and Rudraiah Medhamurthy

**Revue :** The journal of biological chemistry Vol. 280, No. 11, Issue of March 18, pp. 10357–10367, 2005

#### **Résumé :**

Il a été démontré que la prostaglandine F<sub>2</sub> (PGF 2α) agissant via un récepteur couplé à la protéine G induit l'apoptose dans le corpus luteum de nombreuses espèces. Des études ont été réalisées pour caractériser les changements dans la ou les cascade (s) de signalisation apoptotique aboutissant à l'apoptose du tissu lutéal pendant PGF 2α - lutéolyse induite chez les espèces bovines dans lesquelles l'initiation de l'apoptose était démontrable 18 h après traitement exogène PGF 2α. Une analyse des bras d'éléments de la cascade de signalisation apoptotique révéla cette PGF 2α injection a déclenché une augmentation du rapport de Bax à Bcl-2 dans le tissu lutéal dès 4 h après le traitement qui est resté élevé jusqu'à 18 h. Cette augmentation était associée à l'élévation de la caspase-9 active et -3 niveaux de protéines et activité (p <0,05 à 4–12 h, mais a une poussée d'activité n'a été observée qu'à 18 h après le traitement qui n'a pas pu être expliquée par les changements dans le Rapport Bax / Bcl-2 ou changements de translocation de Bax à mitochondries. Examen du tissu lutéal pour FasL / Fas la cascade des récepteurs de la mort a révélé une expression accrue de FasL et Fas à 18 h accompagné d'un important (p <0,05) induction dans l'activité caspase-8 et niveaux de Bid tronqués. De plus, l'administration intrabursale d'inhibiteurs spécifiques de la caspase, en aval du cascades de signalisation apoptotique extrinsèque et intrinsèque, dans un modèle de rat pseudo-enceinte a révélé une plus grande importance de la cascade de signalisation apoptotique extrinsèque dans la médiation de l'apoptose du tissu lutéal pendant le traitement par PGF 2α. La DNase responsable de l'apoptose induite par PGF 2α. La fragmentation de l'ADN s'est avérée être une DNase dépendante du Ca<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup>, sensible à la température et active de manière

optimale dans des conditions de pH neutre. Cette DNase putative a été inhibée par l'inhibiteur recombinant de la DNase activée par la caspase, et l'immunodéplétion de la DNase activée par la caspase à partir des lysats lutéaux a aboli l'activité de fragmentation de l'ADN. Ensemble, ces données démontrent pour la première fois des changements temporels et spatiaux dans les cascades de signalisation apoptotique au cours de l'apoptose induite par PGF 2 $\alpha$  dans le corps jaune .

**Annexe 07 :**

**Titre :** The ovarian germinal reserve and apoptosis-related proteins in the infant and adolescent human ovary

**Auteurs :** María Itatí Albamonte, Mirta Susana Albamonte, Ricardo M. Bou-Khair, Luis Zuccardi & Alfredo Daniel Vitullo

**Revue :** Journal of Ovarian Research volume 12, Article number: 22 (2019)

**Résumé :**

L'ovaire pubertaire normal présente tous les stades de développement folliculaire et un rapport de protéine BAX / BCL2 biaisé en faveur de la protéine BAX proapoptotique comparable à l'ovaire adulte. Cependant, les adolescents souffrant d'une maladie extra-gonadique maligne présentent un développement folliculaire limité après un traitement médicamenteux cytotoxique et une capacité réduite de croissance folliculaire in vitro. Nous avons évalué l'expression des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille des gènes BCL2, les protéines FAS / FAS-L de la voie de l'apoptose extrinsèque, le marqueur spécifique aux cellules germinales VASA, le marqueur de pluripotence OCT3 / 4 et les marqueurs de apoptose précoce et tardive de l'ovaire de patients pubertaires atteints d'une maladie extra-gonadique maligne, ayant reçu ou non une chimiothérapie pré-chirurgicale, entrant dans un programme de cryoconservation.