MÉTABOLISME DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE ET DES PROTÉINES DANS LES SPERMATOCYTES ET LES SPERMATIDES DU BÉLIER (*OVIS ARIES*)

I. — INCORPORATION ET DEVENIR DE LA ^3H -URIDINE

M. LOIR

*Station de Physiologie de la Reproduction,
Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A.,
37 - Nouzilly*

RÉSUMÉ

L'analyse quantitative d'autoradiogrammes réalisés sur des coupes de matériel fixé par le Clarke ou par le Bouin, sur des empreintes et sur des frottis de spermatozoïdes, 2 heures, 4 heures, 1, 3, 6, 5, 15 et 26 jours après injection de ^3H -uridine, a permis d'étudier les caractères et les variations de la synthèse de l'ARN dans les spermatocytes et les spermatides du Bélier, ainsi que son devenir.

L'ARN produit par les spermatocytes est essentiellement autosomal, celui synthétisé au niveau des nucléoles et éventuellement des chromosomes sexuels étant quantitativement négligeable.

La synthèse d'ARN par chaque génome haploïde, après être passée par un maximum au cours du stade préleptotène, est basse au début de la prophase méiotique. Elle croît ensuite régulièrement jusque dans les spermatides rondes sans subir de variation brusque après chaque division méiotique, puis diminue pour s'annuler lorsque les noyaux commencent à perdre leur forme sphérique. Les vieilles spermatides n'incorporent pas de ^3H -uridine. Les divisions méiotiques pourraient être à l'origine de la restriction de l'activité synthétique de la chromatine, tandis qu'ultérieurement c'est sa condensation qui serait responsable du blocage total du génome.

Selon le type cellulaire les ayant produits, les ARNs de la méiose et de la spermiogenèse se comportent différemment quant à leur durée de vie, leur transfert dans le cytoplasme et leur sensibilité au Bouin. 22 heures après synthèse, la proportion d'ARN disparu des noyaux est d'environ 20 p. 100 pour les spermatocytes leptotènes-zygotènes et de 80 p. 100 pour les spermatides rondes. La proportion d'ARN transféré dans le cytoplasme étant plus élevée pour ces cellules-là que pour celles-ci, il apparaît que l'ARN des spermatides — synthétisé en grande quantité — est plus rapidement détruit que celui produit — en faible quantité — en début de prophase méiotique. En outre, l'acido-solubilité du premier est plus élevée que celle du second. Seul l'ARN synthétisé aux stades leptotène-zygotène persiste jusqu'à la fin de la spermiogenèse, soit 26 jours après sa synthèse ; il se rassemble alors dans les sphères chromatophiles des corps résiduels. L'ARN produit par les spermatides rondes a disparu 15 jours plus tard. Le stade pachytène constitue une phase de transition.

Les ARN présents dans les noyaux entrant en division passent dans le cytoplasme puis reviennent dans les noyaux-fils. Leur forte affinité pour la chromatine qui les a produits prend fin rapidement lorsque celle-ci se condense ; ils sont alors transférés irréversiblement au cytoplasme.

INTRODUCTION

L'usage des techniques cytochimiques (DAOUST et CLERMONT, 1955) et autoradiographiques (MONESI, 1964, 1965 ; UTAKOJI, 1966 ; LAVAPPA, 1969) a permis d'étudier la répartition de l'ARN, les fluctuations de sa synthèse et son devenir dans les cellules germinales des Rongeurs. Les données obtenues sont, soit simplement appréciables, soit semi-quantitatives. Quant à la nature et à la fonction des ARN's de la spermatogenèse, elles n'ont été étudiées que chez le Hamster et uniquement pour les spermatocytes pachytènes (MURAMATSU *et al.*, 1968).

Avant d'aborder l'étude qualitative des ARN's de la méiose et de la spermiogenèse chez un mammifère autre qu'un rongeur : le Béliér, nous avons tenté de connaître avec précision les variations quantitatives de la synthèse ribonucléique et le devenir des ARN's synthétisés par les spermatocytes et les spermatides. Pour cela nous avons fait appel à la technique de l'autoradiographie quantitative utilisant la ^3H -5 uridine comme précurseur marqué.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — Animaux et traitements

10 béliers de race *Ile-de-France* âgés de 18 mois à 4 ans ont été utilisés au cours de la saison sexuelle (septembre-décembre).

Les injections et les castrations ont été faites sous anesthésie générale à l'Ercylène. Le précurseur, en solution dans 2,5 ml de sérum physiologique, a été injecté dans l'artère testiculaire, en 5 mn, selon HOCHEREAU *et al.* (1964), à des doses de 2 à 4 μCi par gramme de testicule.

Les castrations ont été effectuées aux temps suivants : 2 heures, 4 heures, 1, 3, 6, 5, 15 et 26 jours après injection. Pour les trois derniers temps nous avons fait, en sus des fixations de fragments testiculaires, des frottis de spermatozoïdes des différentes régions de l'épididyme (tête, corps, queue) ; ils ont été fixés par les vapeurs de formol pendant 15 minutes.

B. — Précurseur marqué

Nous avons utilisé la ^3H -5-Uridine (C. E. A. France ; activité spécifique : 19 Ci/mM). Ce précurseur permet un marquage spécifique de l'ARN des spermatocytes méiotiques et des spermatides ; le traitement à la RNase ou à l'acide perchlorique supprime, en effet, la totalité du marquage de ces cellules 2 ou 4 heures après injection. Dans les spermatocytes préleptotènes, 2 heures après injection, 65 p. 100 seulement du marquage nucléaire est RNase — et acide perchlorique — sensible. La fraction restante peut être supprimée par la DNase ; elle représente une proportion du marquage total beaucoup plus élevée que celle observée généralement dans les cellules somatiques (COMINGS, 1966 ; SIRLIN et LOENING, 1968 ; SCHAEER *et al.*, 1969) mais elle est proche de celle observée pour les spermatogonies B₂ et les spermatocytes préleptotènes chez le Taureau (HOCHEREAU-DE-REVIERS, 1970). La possibilité d'une légère contamination par l' ^3H -6-uridine ne peut expliquer cette observation. Le processus par lequel l'uridine est convertie en précurseur de l'ADN sans perte de son ^3H -5-C (COMINGS, 1966), doit être particulièrement important dans ces cellules germinales, au moins chez les bovidés.

Nous ignorons comment varie au cours de la période post injection la disponibilité du précurseur pour les cellules considérées. Nous ne savons donc pas dans quelle mesure l'intervalle de 2 heures après injection peut être assimilé à un simple « pulse ». Néanmoins, dans les cellules germinales du Hamster (MURAMATSU *et al.*, 1968) ainsi que dans différents organes de la Souris, l'incorporation de la ^3H -uridine (SCHAER *et al.*, 1969) continue 2 heures après que le précurseur ait été administré. Ainsi, il est vraisemblable que chez le Bélier la localisation du marquage observé 2 heures après injection diffère peu des sites de synthèse de l'ARN et que ses variations quantitatives reflètent celles de la synthèse ribonucléique.

C. — Préparation des autoradiogrammes

Des fragments de testicule ont été fixés, soit dans le Clarke (3 h), soit dans le Bouin Hollande (3 j). La fixation par le Bouin entraîne une réduction du volume des blocs de 45 p. 100 (ATTAL et COURROT, 1963) tandis que celle produite par le Clarke est seulement de 26 p. 100. Après les deux fixations, les volumes nucléaires (fig. 1) sont identiques pour les jeunes spermatocytes ; ils diffèrent ensuite progressivement. Les deux fixateurs ayant un effet contractant sur les tissus, il est vraisemblable qu'ils agissent de même sur les noyaux et que les différences de volume proviennent du fait que le Bouin les contracte plus que le Clarke.

Tous les ARNs (sauf, sans doute, les ARNs solubles) sont préservés après fixation par le Clarke (LEBLOND *et al.*, 1963 ; SURLIN et LOENING, 1968) tandis que le Bouin, qui contient de l'acide picrique concentré et a un pH de 3,5, solubilise une partie des acides nucléiques des tissus (SCHNEIDER et MAURER, 1963).

Après inclusion dans la paraffine, les coupes ont été faites à 4 μ . Nous avons aussi réalisé des empreintes testiculaires ; elles ont été fixées par le Clarke pendant 1 heure.

Des digestions ont été effectuées, uniquement sur des coupes de matériel fixé par le Clarke. L'ARN a été supprimé, soit par un traitement à la RNase (Worthington Corp. Cryst.) à 0,1 p. 100 dans l'eau distillée à pH 6,5 à 40°C pendant 4 heures, soit par l'acide perchlorique à 10 p. 100 à 20°C pendant le même temps. L'ADN a été supprimé par un traitement à la DNase (Worthington Corp. Cryst.) à 0,01 p. 100 dans un tampon Sørensen à pH 7 avec 0,2 mM de Mg Cl_2 à 37°C pendant 24 heures.

Toutes les lames ont été passées dans le TCA à 5 p. 100 à 40°C pendant 5 minutes et lavées 2 heures à l'eau courante. Nous avons utilisé l'émulsion Ilford K5, posée selon ROGERS (1967). Les autoradiogrammes ont été stockés à l'obscurité à 40°C pendant 40 à 100 jours, en présence d'actigel. Ils ont été développés avec le révélateur Kodak D19 et colorés après fixage par l'hématoxyline d'Ehrlich.

D. — Analyse quantitative des autoradiogrammes

1. Marquage nucléaire des spermatocytes et des spermatides rondes.

Sauf dans quelques cas où les grains d'argent ont été comptés visuellement, les comptages ont été faits avec un MPV Leitz. Ce microphotomètre à fond noir mesure la quantité de lumière réfléchie par les grains d'argent présents sur une surface de coupe, déterminée par le diaphragme de mesure de forme circulaire et de diamètre variable. Il y a une bonne corrélation entre les nombres de grains et les valeurs fournies par le MPV (ROGERS, 1961 ; HOCHEREAU-DE-REVIERS, 1970). Certains comptages ont été faits par les deux méthodes ; la similitude des résultats confirme leur équivalence. Les comptages ont été corrigés pour le bruit de fond déterminé par la mesure du nombre de grains présents dans des zones sans tissu et à proximité des cellules mesurées.

Les noyaux des spermatocytes et des spermatides rondes étant généralement sphériques, leurs sections sont régulièrement circulaires ; les comptages sont faits sur la surface entière des grandes sections, l'ouverture du diaphragme de mesure étant ajustée à chaque section mesurée. Les valeurs ainsi obtenues représentent le *marquage par section nucléaire moyenne*.

Il n'a pas été fait de corrections pour l'auto-absorption. Les variations de la masse de matière sèche par unité de surface ne sont pas connues, mais il est vraisemblable que, dans les spermatocytes et les spermatides rondes, elles ne sont pas très importantes et qu'elles sont de toute façon progressives, de sorte que l'erreur que nous faisons en assimilant des variations de marquage à des variations de quantité de précurseur doit être faible.

Les nombres de grains par section nucléaire moyenne ne constituent pas des données directement utilisables. Pour permettre des comparaisons entre les différents types nucléaires, ces valeurs ont été rapportées à l'unité de surface (*densité de marquage nucléaire*). Cependant, lorsque la taille des noyaux varie, l'unité de surface ne correspond pas à une quantité constante de chromatine. Nous avons tenté de rapporter les valeurs de marquage à une entité biologique constante : le génome haploïde. Le marquage par section nucléaire est proportionnel à la radioactivité d'une

fraction de noyau dont le volume est égal à la surface S de la section, multipliée par une épaisseur grossièrement identique pour tous les noyaux. Lorsque la taille des noyaux change, ce volume varie comme S^1 tandis que le volume nucléaire varie comme $S^{3/2}$. La radioactivité du noyau entier est donc égale, en valeurs relatives, aux valeurs de marquage par section nucléaire moyenne, multipliées par $S^{(3/2-1)}$ soit $S^{1/2}$. Pour établir la courbe de variation de la *radioactivité du génome haploïde*, les nombres obtenus pour le noyau entier sont divisés respectivement par 4 et 2 pour les spermatocytes I et les spermatocytes II. Cette courbe diffère de celle de la densité de marquage uniquement par des différences d'amplitude plus importantes dues au fait que la densité de marquage varie comme $S^{-3/2}$.

2. Marquage nucléaire des vieilles spermatides

Les mesures ont été faites avec le MPV Leitz non sur le noyau entier dont le profil n'est pas circulaire mais sur une aire circulaire de surface constante (bouchon) et les valeurs de marquage ont été rapportées à l'unité de surface (densité de marquage nucléaire). Pour les dernières spermatides rondes (S_{8b}), nous avons procédé également de cette façon pour nous assurer de l'identité des valeurs de densité de marquage obtenues avec les deux méthodes.

3. Marquage cytoplasmique des spermatocytes et des spermatides rondes

Si les mesures du marquage nucléaire n'offrent pas de difficulté du fait que les limites des noyaux sont bien visibles, il n'en est pas de même pour le marquage cytoplasmique, les limites des cellules germinales et des cellules de Sertoli étant peu visibles.

Les cellules considérées, approximativement sphériques, ayant leurs noyaux généralement au centre, nous avons mesuré le marquage sur une couronne circulaire de cytoplasme, de largeur égale au demi-rayon nucléaire et concentrique à chaque noyau mesuré. Nous avons rapporté les valeurs obtenues à l'unité de surface (densité de marquage cytoplasmique). Les observations que nous avons pu faire lorsque les limites cellulaires étaient discernables ainsi que les images obtenues en microscopie électronique confirment qu'en procédant de cette façon les valeurs obtenues sont peu influencées par le cytoplasme des cellules de Sertoli ou des autres cellules germinales. Cette méthode permet de comparer les densités de marquage cytoplasmique des différents types cellulaires entre elles et avec les densités de marquage nucléaire. Le fait que le rapport nucléocytoplasmique ne varie pas de façon significative dans les cellules considérées permet d'assimiler les rapports densité de marquage cytoplasmique/densité de marquage nucléaire à des rapports de quantités de précurseur présent dans ces deux compartiments cellulaires.

4. Marquage cytoplasmique des vieilles spermatides

Nous avons mesuré le marquage sur une zone circulaire, de surface constante, du cytoplasme post nucléaire et rapporté les valeurs obtenues à l'unité de surface. Pour les spermatides S_{8b} , nous avons utilisé cette méthode en même temps que celle appliquée pour les spermatides rondes pour vérifier la concordance des valeurs obtenues dans les deux cas.

Nous ignorons comment varie le volume cytoplasmique des vieilles spermatides chez le Bélier. Chez le Rat (ROOSEN-RUNGE, 1955 ; PALKOVITS *et al.*, 1966), il diminue progressivement après que le noyau ait fini de se condenser. Il est possible qu'il évolue de même chez le Bélier. Quoi qu'il en soit, ce problème n'entre pas en ligne de compte pour l'interprétation des résultats si nous comparons les densités de marquage cytoplasmique de la même catégorie de vieilles spermatides à des temps post injection différents.

E. — Représentation des courbes de marquage

Chez le Bélier, ORTAVANT (1958) a divisé le cycle de l'épithélium séminifère en 8 stades (tabl. 1); il en a déterminé la durée ainsi que celle des stades de la prophase méiotique. A la suite d'observations réalisées sur squashes (LOIR, 1971), nous avons remplacé l'appellation du stade diplotène selon ORTAVANT par pachytène 2, le stade pachytène étant appelé pachytène 1. CLERMONT et LEBLOND (1955) ont défini chez le Bélier 15 stades de spermatides (tabl. 1) ; nous avons subdivisé le 8^e en 8_a et 8_b d'après l'évolution du nucléoplasme.

Nous avons utilisé un système de double abscisse, c'est-à-dire que nous avons porté le marquage en fonction simultanément des stades du cycle de l'épithélium séminifère (chiffres romains) et des stades cellulaires (préleptotène... spermatides rondes...), l'importance de chacun d'eux étant proportionnelle à sa durée. Lorsque l'intervalle post-injection est court (deux ou quatre heures), les stades — du cycle de l'ES et cellulaires — auxquels les cellules marquées sont observées sont ceux auxquels elles se trouvaient lors de l'injection. Lorsque l'intervalle devient plus long, ceci

n'est plus vrai. Dans ce cas, il est nécessaire de faire la distinction entre le stade auquel les cellules sont parvenues lors de la castration et le stade auquel elles se trouvaient lorsqu'elles ont incorporé le précurseur injecté. Les synthèses de molécules et leur devenir ultérieur étant dépendants des phases du cycle cellulaire, nous avons choisi d'indiquer les stades d'incorporation par les stades cellulaires (leptotène, zygotène... spermatides rondes...) et les stades atteints lors de l'observation par les stades de l'épithélium séminifère. Le décalage entre les deux échelles est déterminé par l'intervalle de temps séparant l'injection de la castration.

TABLEAU I

*Correspondance entre les stades du cycle de l'épithélium séminifère
et les stades cellulaires de la méiose et de la spermiogénèse*

Entre parenthèses : durée des stades en jours

I (2,2)	II (1,1)	III (1,9)	IV (1,1)	V (0,4)	VI (1,3)	VII (1,1)	VIII (1,0)					
P ₁	Leptotène	Zygotène			Pachytène 1							
	Pachytène 2			C II	Spermatides rondes							
					1	2	3	4	5	6	7	
		MS			Spermatides allongées							Spz.
8 _a	8 _b	9	10	11	12	13			14		15	

Les « spermatides s'allongeant » (MS) et les « spermatides allongées » constituent les « vieilles spermatides ».

Les valeurs de marquage portées en ordonnées correspondent — ou découlent pour les densités de marquage et la radioactivité du génome haploïde — soit à des nombres de grains d'argent, soit à des quantités de lumière réfléchie (MPV) en unités arbitraires. Dans les deux cas, les nombres indiqués n'ont qu'une signification relative et ne permettent pas des comparaisons en valeur absolue, soit entre deux graphiques différents, soit sur un même graphique entre courbes pour lesquelles il est indiqué des échelles d'ordonnées distinctes. Ceci parce que l'importance du marquage d'un autoradiogramme dépend entre autres paramètres :

- des variations individuelles entre les animaux injectés,
- de la distribution non homogène et aléatoire des précurseurs dans les testicules,
- des traitements autoradiographiques.

Pour éliminer l'influence de ces facteurs, il aurait fallu utiliser un grand nombre d'animaux, prélever et analyser un nombre élevé de fragments testiculaires et traiter simultanément tous les autoradiogrammes des différentes expériences ; ce qui n'a pu être fait.

RÉSULTATS

A. — 2 et 4 heures après injection

1. Localisation du marquage

Deux heures après injection, le marquage est exclusivement nucléaire pour toutes les catégories cellulaires, sauf celles en cours de division. Les noyaux leptotènes et zygotènes étant compacts, sur coupes aussi bien que sur empreintes, la localisation

du marquage ne peut pas y être précisée. Dans les noyaux pachytènes dont les chromosomes sont bien individualisés, le marquage est à peu près exclusivement chromosomal. Dans les spermatocytes II et les spermatides rondes, le marquage est disséminé sur le noyau mais les masses d'hétérochromatine ne sont pas marquées. Les cellules en division sont, soit marquées sur le cytoplasme (1^{re} division), soit non marquées (2^e division). Les spermatides dès qu'elles s'allongent ne sont jamais marquées quel que soit le temps d'exposition.

Sur coupes, la vésicule sexuelle est généralement non marquée. Sur empreintes, il n'y a pas de grains d'argent sur la partie hétérochromatique mais il y en a souvent un ou plusieurs à la périphérie et sur le centre euchromatique (88 noyaux pachytènes observés). Ces marquages, périphérique et central, sont plus intenses dans les noyaux pachytènes 2 que dans les noyaux pachytènes 1 (tabl. 2). Ces observations ne permettent pas, en l'absence de données complémentaires, de conclure à l'inactivité de la vésicule sexuelle, comme chez les Rongeurs (MONESI, 1965 ; UTAKOJI, 1966 ; LAVAPPA, 1969).

TABLEAU 2

Fréquence de marquage, par un grain d'argent, de la vésicule sexuelle dans les noyaux pachytènes, 2 heures après injection de ³H-uridine

Comptages effectués sur empreintes et corrigés pour le bruit de fond. Chiffres entre parenthèses nombre de noyaux observés. Différence significative entre les stades pachytène 1 et pachytène 2. P = 0,05

	Partie hétérochromatique (%)	Zone centrale (%)	Périphérie (%)
Pachytène 1 (46)	0	8	10
Pachytène 2 (42)	0	27 *	28 *

Le marquage des nucléoles est difficile à détecter du fait de leur petite taille. Cependant, il apparaît que dans les jeunes noyaux préleptotènes la densité de marquage est légèrement plus forte sur les nucléoles que sur le nucléoplasme et que, ensuite, les nucléoles sont marqués légèrement au stade pachytène. Cette observation indique qu'ils ne sont pas totalement inactifs comme ceux du Hamster (UTAKOJI, 1966 ; MURAMATSU *et al.*, 1968), mais qu'ils incorporent un peu d'uridine comme ceux de la Souris (SOLARI et TRES, 1967). L'ARN nucléolaire est quantitativement négligeable comparé à celui d'origine chromosomique.

Quatre heures après injection, le marquage des noyaux diffère peu de celui observé à 2 heures. En outre, le cytoplasme est très légèrement marqué ; toutes les cellules en cours de division sont marquées, principalement sur le cytoplasme.

2. Variation quantitative

Deux heures après injection (matériel fixé par le Clarke) (fig. 2, 3 et 4), l'incorporation de ³H-uridine dans l'ARN synthétisé par les génomes haploïdes passe par un maximum au cours du stade préleptotène, est faible au stade leptotène-zygotène

puis augmente rapidement et progressivement du stade pachytène aux spermatides S_3 . Elle s'annule brièvement lors des divisions I et II. Ces deux courtes solutions de continuités mises à part, elle ne subit pas de variations brusques à la fin de la méiose. Autrement dit, les spermatocytes I en fin de prophase incorporent 4 fois plus de ^3H -uridine que les très jeunes spermatides et les spermatocytes II deux fois plus. L'incorporation d' ^3H -uridine diminue à partir des spermatides S_3 , en deux phases. La première correspond aux spermatides S_3 , S_{3a} dont l'allure interphasique du nucléoplasme ne varie pas. La seconde, plus rapide, concerne les spermatides S_{3b} , dont la chromatine commence à se condenser. L'incorporation d'uridine est nulle dans les vieilles spermatides.

FIG. 1. — Variations du volume nucléaire V après fixation par le Clarke (●; 110 noyaux par point en moyenne) et par le Bouin Hollande (○; 70 noyaux par point en moyenne) (mesures sur autoradiogrammes) et variation du rapport cytonucléoplasmique (Clarke; ▲; 25 cellules par point), dans les spermatocytes et les spermatides du Béliet.

Cartouche : contraction nucléaire relative due au Bouin par rapport à celle occasionnée par le Clarke.

Ordonnée gauche : volume nucléaire ($100 \mu^3$).

Ordonnée droite : rapport C/N.

Ordonnée du cartouche : contraction nucléaire relative en p. 100.

Légende figs. 1 à 10 : PL : stade préleptotène ; L : leptotène ; Z : zygotène ; P₁, P₂ : pachytène ; CII : spermatocytes II ; ES : spermatides rondes ; SC : sphères chromatophiles. Traits verticaux : ± 1 écart-type.

Les données obtenues sur le matériel fixé par le Bouin Hollande (fig. 4) diffèrent du point de vue quantitatif, mais l'allure du phénomène n'est pas modifiée. Il apparaît que la proportion de ^3H -uridine incorporée dans de l'ARN dissous par le Bouin dépend du type nucléaire ; elle est basse au début de la prophase, augmente régulièrement dans les noyaux pachytènes et reste constante dans les spermatides rondes. La réduction relative du volume nucléaire après la fixation par le Bouin (fig. 1) varie de la même façon.

B. — 24 heures après injection (fig. 5)

La localisation intranucléaire du marquage est identique à celle observée 2 et 4 heures après injection mais sa distribution dans les cellules et entre les différents types cellulaires est très différente. En outre, les noyaux des spermatides S_3 et S_{10}

FIG. 2. — Variation du marquage par section nucléaire moyenne
Ordonnée : nombre de grains par section nucléaire (nombres arbitraires MPV)

FIG. 3. — Variation de la densité de marquage nucléaire
Ordonnée : densité de marquage en valeurs arbitraires

FIG. 4. — Variation relative de la radioactivité incorporée par le génome haploïde des spermatocytes et des spermatoïdes

Les 2 courbes correspondant au Clarke et au Bouin n'étant pas comparables en valeur absolue, elles ont été portées sur le même graphique en position relative arbitraire en prenant en considération le fait que la courbe « Clarke » doit avoir en tous points des valeurs supérieures à celles de la courbe « Bouin », de l'ARN ayant été dissous par ce dernier fixateur.

Cartouche : variation de l'acido-solubilité de l'ARN (valeurs relatives).

Ordonnées gauche (Clarke) et droite (Bouin) radioactivité en unités arbitraires.

FIG. 2-4. — Variations de l'incorporation de la ^3H -uridine par les noyaux des spermatocytes et des spermatoïdes, 2 heures après injection

Matériel fixé par le Clarke (●) ; 90 noyaux par point en moyenne. Les 3 graphiques correspondent à des expressions différentes des valeurs de marquage. Sur la figure 2, pour le stade préleptotène, le marquage total et le marquage RNase-sensible (▲) sont indiqués tous les deux. Sur les figures 3 et 4, seul le marquage RNase-sensible est porté. Sur la figure 4, nous avons porté, en outre, la courbe de variation établie à partir des valeurs obtenues sur matériel fixé par le Bouin Hollande, (○) ; 120 noyaux par point en moyenne.

sont marqués. Le pic de marquage nucléaire n'est plus dans les jeunes spermatides rondes mais dans les spermatocytes pachytènes moyens. Le cytoplasme des différents types cellulaires est bien marqué. Le rapport des densités de marquage cytoplasmique et nucléaire varie dans les cellules considérées : il est constant pendant les stades leptotène et zygotène, diminue au stade pachytène et garde une valeur constante dans les spermatides rondes. Le marquage des spermatocytes en division ne diffère pas de celui observé 4 heures après injection.

FIG. 5. — 1 jour après injection

Les données obtenues sur le matériel fixé par le Bouin ne sont pas très différentes de celles obtenues après fixation par le Clarke surtout en ce qui concerne les noyaux ; le marquage cytoplasmique est relativement plus bas.

Le traitement par la RNase entraîne l'absence totale de grains d'argent sur toutes les catégories cellulaires sauf sur les noyaux des jeunes spermatocytes leptotènes dont le marquage, résultant d'une incorporation au stade préleptotène, est réduit seulement de 40 p. 100, le marquage restant pouvant être supprimé par la DNase.

C. — 3 jours après injection (fig. 6)

Le front de marquage se situe dans les spermatides S_{13} qui ont leur noyau et leur cytoplasme marqués. Les spermatocytes ayant incorporé l' ^3H -uridine aux stades

FIG. 6. — 3 jours après injection

FIG. 8. — 15 jours après injection

FIG. 9. — 26 jours après injection

FIG. 5-9. — Variation des densités de marquage nucléaire (●) et cytoplasmique (○) des spermatocytes et des spermatides, 1, 3, 6, 5, 15 et 26 jours après injection de ^3H -uridine

Matériel fixé par le Clarke. 90 à 40 cellules par point en moyenne. ▲ : densité de marquage nucléaire RNase-sensible des jeunes spermatocytes.

Cartouches : variation du rapport : densité de marquage cytoplasmique/densité de marquage nucléaire (C/N).

Ordonnées : densités de marquage en valeurs arbitraires.

Ordonnées des cartouches : marquage cytoplasmique en p. 100 du marquage nucléaire.

FIG. 10. — Variation des densités de marquage nucléaire 2 heures (—), 24 heures (---) et 3 jours (---) après injection de ^3H -uridine

Stade préleptotène : marquage RNase-sensible. La position relative des 3 courbes a été déterminée de la façon suivante. Le marquage RNase-résistant (incorporation dans l'ADN) au stade préleptotène correspond à une quantité constante dans le temps de ^3H -uridine ; ceci permet de calculer que l'ARN présent à 2 heures au stade préleptotène restant dans les noyaux au bout d'un jour correspond à 36 p. 100 de la quantité initiale et au bout de 3 jours à 12 p. 100.

Cartouche : variation de la quantité d'ARN disparu des noyaux 1 jour après sa synthèse (---) et 3 jours après (---), en pourcentage de la quantité d'ARN présent à 2 heures.

Ordonnée gauche : densité de marquage nucléaire à 2 heures.

Ordonnées droites : densités de marquage nucléaire à 24 heures (à gauche) et 3 jours (à droite).

F. — 26 jours après injection (fig. 9)

Les spermatides allongées des stades IV, V et début VI, ont un très fort marquage nucléaire insensible à la RNase et à l'acide perchlorique froid. Au stade V, l'ADN de ces spermatides devient progressivement résistant à la DNase ; cette enzyme supprime ou réduit le marquage des seuls noyaux non totalement réfractaires à son action (après DNase ils sont peu ou pas du tout colorés par l'hématoxyline d'Ehrlich).

Les cytoplasmes des spermatides allongées sont marqués et en particulier les sphères chromatophiles, y compris celles en cours de résorption dans l'épithélium séminifère au stade I. Les spermatozoïdes épидидymaires ne sont pas marqués.

DISCUSSION

A. — *Activité synthétique des spermatocytes et des spermatides*

Dans les spermatocytes, la synthèse ribonucléique varie comme chez les Rongeurs (MONESI, 1964, 1965 ; UTAKOJI, 1966), jusqu'au stade pachytène. Ensuite, elle diffère. Au lieu de diminuer progressivement jusqu'à la métaphase I et d'être faible ou nulle dans les spermatocytes secondaires et les spermatides, la production d'ARN continue à croître jusqu'à la fin du stade pachytène, c'est-à-dire la fin de la prophase. L'absence de variations brusques à la fin de la méiose, dans l'activité synthétique des génomes haploïdes, mise en évidence chez le Bélier, n'a pas été rapportée chez les Rongeurs, du fait de l'absence d'observations quantitatives. Ce résultat confirme l'indépendance, quant à l'aspect quantitatif, de la synthèse d'ARN par chaque génome haploïde dans les cellules polyploïdes ; elle a déjà été mise en évidence pour des cellules cultivées de Hamster (CRIPPA, 1966) et des cellules d'embryon de Loche (KAFIANI *et al.*, 1968).

Le parallèle existant dans les spermatocytes I entre l'augmentation du volume nucléaire et celle de l'incorporation de ³H-uridine peut être rapproché d'observations mettant en évidence une relation entre l'activation de la synthèse ribonucléique et l'accroissement du volume du noyau (HARRIS, 1967 ; GURDON, 1968 ; GURDON et WOODLAND, 1968). Selon GURDON et HARRIS, l'augmentation du volume nucléaire constitue un processus de dérépession non spécifique. Dans les spermatides rondes, le volume nucléaire continue à croître. Pourtant, dès les spermatocytes II, l'incorporation de ³H-uridine par chaque génome haploïde augmente moins rapidement qu'en fin de prophase puis décroît en deux temps. Il est vraisemblable que les événements responsables de la réduction de l'activité synthétique de la chromatine diffèrent au cours des deux. Le fait que ce soit après les spermatocytes I que la production d'ARN cesse d'évoluer parallèlement à la variation du volume nucléaire, suggère que ceux agissant en premier peuvent être liés aux divisions méiotiques. En ce qui concerne la phase finale conduisant à la répression complète du génome, l'hypothèse proposée par GLEDHILL *et al.* (1966) peut être reprise. Selon ces auteurs, la diminution du nombre des groupes DNP-PO₄ libres serait en relation avec la condensation croissante de la chromatine des spermatides et à l'origine de l'arrêt de la synthèse de l'ARN. Les observations effectuées chez la Souris (BRACHET et HULIN, 1969) et le Taureau

(DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1969) après incubation avec l'actinomycine D marquée, vont dans le même sens que les données obtenues avec la ^3H -uridine quant à l'arrêt de la transcription du génome au cours de la spermiogenèse.

B. — *Devenir des ARN's de la prophase méiotique
et de la spermiogenèse*

Chez le Bélier, selon ORTAVANT (1958) et HOCHEREAU *et al.* (1964), c'est au stade préleptotène que l'ADN se réplique pour la dernière fois au cours de la spermatogenèse. Le marquage RNase-résistant et DNase-sensible de ces noyaux 2 ou 4 heures après injection, et des noyaux de certains spermatocytes ou de certains spermatides pour des temps post injection plus longs, correspond à une incorporation de la ^3H -uridine dans l'ADN. La quantité de précurseur ainsi incorporé ne varie plus ensuite au cours de l'évolution des spermatocytes et des spermatides. Elle constitue, de ce fait un marqueur qui permet, outre de tester que le déroulement temporel de la spermatogenèse n'est pas modifié par les injections de ^3H -uridine, de connaître approximativement quelle fraction d'ARN synthétisé au stade préleptotène reste dans les noyaux aux différents temps de castration et, en conséquence, de connaître l'évolution dans le temps de la quantité d'ARN nucléaire des autres types cellulaires.

La proportion d'ARN disparaissant des noyaux au cours des 3 jours suivant la synthèse (fig. 6) dépend du stade cellulaire. Notamment, 24 heures après, environ 80 p. 100 de l'ARN des noyaux des spermatides ont disparu contre environ 20 p. 100 seulement pour les spermatocytes leptotènes et zygotènes. Au cours des 2^e et 3^e jours, la diminution est beaucoup moins importante, en particulier pour les vieux spermatocytes et les spermatides. La quantité d'ARN transféré au cytoplasme 24 heures et 3 jours après sa synthèse est proportionnellement beaucoup plus importante en début de prophase méiotique qu'ensuite. Le passage d'ARN dans le cytoplasme n'explique donc pas l'importante disparition d'ARN des noyaux des vieux spermatocytes et des spermatides, principalement au cours des premières 24 heures.

Dès 3 jours, l'ARN produit par les noyaux leptotènes et zygotènes est celui qui persiste dans les cellules (noyau et cytoplasme) en quantité la plus importante; il parvient dans les corps résiduels 26 jours après sa synthèse. Au contraire, l'ARN produit par les spermatides a totalement disparu 15 jours plus tard.

Il apparaît donc que les ARN's de la prophase méiotique et de la spermiogenèse ont un comportement variable quant à leur durée de vie, à leur tendance à passer dans le cytoplasme. Ceux synthétisés en grande quantité par les spermatides rondes se comportent de façon identique quel que soit le stade. Ils sont pour leur plus grande part métabolisés dans les 24 heures suivant leur apparition; ceux restant alors disparaissent de toute façon plus vite que ceux produits par les spermatocytes; on en retrouve une proportion relativement faible dans le cytoplasme. Ceux des stades leptotène et zygotène sont très stables et passent dans le cytoplasme en proportion relativement importante. Quant à ceux synthétisés au cours du stade pachytène, ils ont un comportement non homogène du fait qu'ils correspondent à une phase de transition entre les 2 précédentes. Chez le Hamster, une fraction importante de l'ARN testiculaire disparaît au cours des 18 heures suivant sa synthèse (MURAMATSU *et al.*, 1968). Il apparaît ici que toutes les cellules germinales ne produisent pas ces ARN's

rapidement métabolisés en quantité égale ; ils sont essentiellement présents dans les vieux spermatocytes et dans les spermatides. Chez le Hamster, ils sont hétérogènes et ont une taille moléculaire élevée. Chez le Bélier, le fait :

- que la quantité d'ARN nucléaire solubilisé par le Bouin 2 heures après fixation et la quantité d'ARN disparu des noyaux après 24 heures évoluent parallèlement,
- que le marquage nucléaire soit moins sensible au Bouin à 24 heures qu'à 2 heures et qu'il n'y soit plus du tout 3 jours après,

suggère qu'ils sont facilement dissous par l'acide picrique concentré ; ce caractère, comme l'a proposé KASTEN (1965) pourrait refléter une petite taille moléculaire et dans ce cas le fait que la sensibilité de l'ARN au Bouin change dans les spermatocytes et les spermatides pourrait être lié à une évolution des types moléculaires produits. Il peut aussi être en relation avec d'autres facteurs tels qu'une réduction du couplage avec des protéines (GEUSKENS, 1965). L'investigation de ces points apportera des informations sur les caractères et les fonctions des ARN's de la fin de la spermatogenèse.

Des ARN's « rapidly labelled » ont été trouvés dans des types cellulaires divers (ATTARDI *et al.*, 1966 ; SHEARER et MCCARTHY, 1967 ; BILLING *et al.*, 1969 ; CHURCH et MCCARTHY, 1970). C'est dans le noyau qu'ils sont métabolisés. Il n'est pas possible de dire actuellement où se fait leur destruction dans les spermatocytes et les spermatides du Bélier.

C. — *Comportement de l'ARN nucléaire lors des divisions méiotiques*

Lorsque les spermatocytes entrent en division, l'ARN nucléaire passe très rapidement dans le cytoplasme. Ce phénomène est général pour les cellules entrant en méiose ou en mitose. RAO et PRESCOTT (1970), NEYFAKH et KOSTOMAROV (1971) et NEYFAKH *et al.* (1971) ont démontré que dans le cas de la mitose, cet ARN revient, au moins en partie, dans les noyaux fils. Chez le Bélier, quel que soit le temps post-injection (24 h à 6,5 jours), les marquages nucléaires et cytoplasmiques ne sont pas différents de ce qu'ils pourraient être en l'absence de divisions. Pour expliquer le marquage des noyaux post méiotiques, l'hypothèse d'une néosynthèse à partir de nucléotides marqués persistant dans les cellules est invraisemblable pour des temps post injection si longs. Une autre possibilité serait que l'ARN dispersé dans le cytoplasme y soit détruit et que les nucléotides résultants soient utilisés pour une néosynthèse ; ce processus entraînerait une solution de continuité du marquage des cellules en division ; nous n'en avons pas observé. Il est donc plausible que les ARN's ayant quitté le noyau des cellules en division reviennent dans les noyaux fils. Ce retour se ferait dans les cellules en télophase avancée qui à 4 h ont à la fois leur noyau et leur cytoplasme marqués. Cette observation met en évidence la forte affinité des ARN's pour la chromatine qui les a produits et établit que la mitose et la méiose ne diffèrent pas quant au comportement de l'ARN présent dans les noyaux entrant en division.

D. — *Passage dans le cytoplasme des spermatides en cours d'allongement de l'ARN nucléaire*

Lorsque le noyau des spermatides commence à s'allonger, l'ARN qu'il contient passe dans le cytoplasme. Les spermatides du stade II — qui ne synthétisent pas

d'ARN — sont les dernières dont le noyau en contient. L'hypothèse d'une impossibilité de détecter ultérieurement la ^3H -uridine, éventuellement présente, du fait de l'auto-absorption, ne peut être retenue au vu des résultats obtenus avec les acides aminés tritiés (Loir, 1972). L'évolution des marquages nucléaire et cytoplasmique 15 jours après injection suggère que le départ de l'ARN des noyaux des spermatides S_8 - S_{10} résulte d'un phénomène actif.

Reçu pour publication en septembre 1971.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le professeur J. BRACHET et le docteur B. L. GLEDHILL pour leurs critiques, lors de la préparation du manuscrit.

SUMMARY

PROTEIN AND RIBONUCLEIC ACID METABOLISM IN SPERMATOCYTES AND SPERMATIDS OF THE RAM (*OVIS ARIES*).

I. — INCORPORATION AND FATE OF ^3H -URIDINE

Spermatozoa prints and smears fixed by Clarke or Bouin were quantitatively analyzed by autoradiograms 2 hours, 4 hours, and 1, 3, 6, 5, 15, and 26 days after ^3H -uridine injection, thus enabling us to study the characteristics and variations of RNA synthesis in ram spermatocytes and spermatids as well as the fate of ^3H -uridine.

The RNA produced by spermatocytes is mainly autosomal, that synthesized in the nucleoli and possibly in the sex chromosomes being quantitatively insignificant.

RNA synthesized by each haploid genome is low at the beginning of the meiotic prophase after passing through a maximum during the preleptotene stage. Then it increases regularly up to the round spermatid stage without undergoing sudden variation after each meiotic division, then decreases to zero when the nuclei begin to lose their spheric shape. Old spermatids do not incorporate ^3H -uridine. Meiotic divisions may cause restriction of the synthetic activity of the chromatin, while its condensation would subsequently be responsible for complete genome blockage.

Depending on the cell type producing them, meiotic and spermatogenetic RNAs behave differently as to their life span, cytoplasmic transfer, and sensitivity to Bouin. 22 hours after synthesis, about 20 p. 100 of the RNA has disappeared from nuclei of leptotene-zygotene spermatocytes and about 80 p. 100 from round spermatids. The proportion of RNA transferred in the cytoplasm being higher for the first type of cells than for the second, it seems that spermatid RNA — synthesized in large quantity — is more rapidly destroyed than that produced in small quantity at the beginning of the meiotic prophase. Moreover, acido-solubility of the former is higher than the latter. Only RNA synthesized at the leptotene-zygotene stages persists to the end of spermiogenesis or 26 days after its synthesis. Then it gathers in the chromatophilic spheres of the residual bodies. RNA produced by round spermatids disappears 15 days later. The pachytene stage constitutes a transition phase.

The RNAs present in the dividing nuclei pass into the cytoplasm and then return in the daughter nuclei. When the chromatin which produced them condenses, they are no longer strongly attracted by it, and are then irrevocably transferred to the cytoplasm.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ATTAL J., COUROT M., 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogenèse chez le taureau. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **3**, 219-241.
- ATTARDI G., PARNAS H., HUANG M. H., ATTARDI B., 1966. Giant size rapidly labeled nuclear RNA and cytoplasmic messenger RNA in immature Duck erythrocytes. *J. Mol. Biol.*, **20**, 145-182.
- BILLING R. J., INGLIS A. M., SMELLIE R. M. S., 1969. The distribution of deoxyribonucleic acid like ribonucleic acid in rat liver cells. *Biochem. J.*, **113**, 571-572.
- BRACHET J., HULIN N., 1969. Binding of tritiated actinomycin and cell differentiation. *Nature*, **222**, 481-482.
- CHURCH R. B., MCCARTHY B. J., 1970. Unstable nuclear RNA synthesis following estrogen stimulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **199**, 103-114.
- CLERMONT Y., LEBLOND C. P., 1955. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the « periodic acid-schiff » technique. *Amer. J. Anat.*, **98**, 229-253.
- COMINGS D. E., 1966. Incorporation of tritium of ³H-5-Uridine into DNA. *Expl. Cell Res.*, **41**, 677-681.
- CRIPPA M., 1966. The rate of ribonucleic acid synthesis during the cell cycle. *Expl. Cell Res.*, **42**, 371-375.
- DAoust R., CLERMONT Y., 1955. Distribution of nucleic acids in germ cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the Rat. *Amer. J. Anat.*, **98**, 255-279.
- DARZYŃKIEWICZ Z., GLEDHILL B. L., RINGERTZ N. R., 1969. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the Bull. *Expl. Cell Res.*, **58**, 435-438.
- GEUSKENS M., 1965. Synthèse de deux types différents de RNA dans le suc nucléaire de l'ovocyte d'Asterie au début de l'ovogenèse. *Arch. Biol.*, **76**, 87-95.
- GLEDHILL B. L., GLEDHILL M. P., RIGLER R., RINGERTZ N. R., 1966. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the Bull. *Expl. Cell Res.*, **41**, 652-665.
- GURDON J. B., 1968. Changes in somatic cell nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **20**, 401-414.
- GURDON J. B., WOODLAND H. R., 1968. The cytoplasmic control of nuclear activity in animal development. *Biol. Rev.*, **43**, 233-267.
- HARRIS H., 1967. The reactivation of the red cell nucleus. *J. Cell Sci.*, **2**, 23-32.
- HOCHEREAU-DE-REVIERS M. T., 1970. *Étude des divisions spermatogoniales et du renouvellement de la spermatogonie souche chez le taureau*. Thèse Doct. Sci., Univ. Paris.
- HOCHEREAU M.-T., COUROT M., ORTAVANT R., 1964. Marquage des cellules germinales du Bélier et du Taureau par injection de Thymidine tritiée dans l'artère spermatique. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **4**, 157-161.
- KAFIANI C. A., TIMOFEEVA M. J., MELNIKOVA N. L., NEYFAKH A. A., 1968. Rate of RNA synthesis in haploid and diploid embryos of loach (*Misgurnus fossilis*). *Biochim. Biophys. Acta*, **169**, 274-277.
- KASTEN F. H., 1965. Loss of RNA and protein, and changes in DNA during a 30-hour cold perchloric acid extraction of cultured cells. *Stain technol.*, **40**, 127-135.
- LAVAPPA K. S., 1969. Morphological and physiological aspects of male meiotic chromosomes of dwarf (armenian and chinese) hamsters. *Dis. Abstr.*, **29**, 2302 B-2303 B.
- LEBLOND C. P., PINHEIRO P., DROZ B., AMANO M., WARSHAWSKY H., 1963. Sites of RNA and protein synthesis in the cell as shown by radioautography. *Can. Cancer Conf.*, **5**, 19-36.
- LOIR M., 1971. Évolution morphologique des chromosomes méiotiques chez le Bélier (*Ovis aries*). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **272**, 2587-2590.
- LOIR M., 1972. Métabolisme de l'acide ribonucléique et des protéines dans les spermatocytes et les spermatides du Bélier (*Ovis aries*). II. Variations de l'incorporation et devenir de la ³H-lysine, de la ³H-arginine et de la ³⁵S-cystine. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* (à paraître).
- MONESI V., 1964. Ribonucleic acid synthesis during mitosis and meiosis in the Mouse testis. *J. Cell Biol.*, **22**, 521-532.
- MONESI V., 1965. Synthetic activities during spermatogenesis in the Mouse : RNA and protein. *Expl. Cell Res.*, **39**, 197-224.
- MURAMATSU M., UTAKOJI T., SUGANO H., 1968. Rapidly-labeled nuclear RNA in chinese hamster testis. *Expl. Cell Res.*, **53**, 278-282.
- NEYFAKH A. A., KOSTOMAROVA A. A., 1971. Migration of newly synthesized RNA during mitosis. I. Embryonic cells of the Loach (*Misgurnus fossilis* L.). *Expl. Cell Res.*, **65**, 340-344.
- NEYFAKH A. A., ABRAMOVA N. B., BAGROVA A. M., 1971. Migration of newly synthesized RNA during mitosis. II. Chinese Hamster fibroblasts. *Expl. Cell Res.*, **65**, 345-352.
- ORTAVANT R., 1958. *Le cycle spermatogénétique chez le Bélier*. Thèse Doct. Sci., Univ. Paris, 127 pp.

- PALKOVITS M., CZEIZEL E., PALKOVICH I., 1966. Über die Kariometrische Untersuchung der spermatogenese bei Albinoratten. *Z. Zellforsch.*, **74**, 449-453.
- RAO M. V. N., PRESCOTT D. M., 1970. Inclusion of predivision labelled nuclear RNA in post division nuclei in *Amoeba proteus*. *Expl. Cell Res.*, **62**, 286-292.
- ROGERS A. W., 1961. A simple photometric device for the quantitation of silver grains in autoradiographs of tissue sections. *Expl. Cell Res.*, **25**, 228-239.
- ROGERS A. W., 1967. *Techniques of autoradiography*. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, London, New-York, 335 p.
- ROOSEN-RUNGE E. C., 1955. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino Rat. III. Volume changes in the cells of the seminiferous tubules. *Anat. Rec.*, **123**, 385-398.
- SCHAEER J. C., GRIEDER A., HEINIGER H. J., SCHINDLER R., 1969. Comparison of ³H-cytidine and ³H-5-uridine as precursors of RNA. *Expl. Cell Res.*, **56**, 449-452.
- SCHNEIDER V. G., MAURER W., 1963. Autoradiographische Untersuchung über den Einbau von H-3-Cytidin in die Kerne einiger Zellarten der Maus und über den Einfluss des Fixationsmittels auf die H-3-Aktivität. *Acta Histochem*, **15**, 171-181.
- SHEARER R. W., MCCARTHY B. J., 1967. Evidence for Ribonucleic acid molecules restricted to the cell nucleus. *Biochemistry*, **6**, 283-289.
- SIRLIN J. L., LOENING U. E., 1968. Nucleolar 4S Ribonucleic acid in dipteran salivary glands in the presence of inhibitor. *Biochem. J.*, **109**, 375-387.
- SOLARI A. J., TRES L., 1967. The localization of nucleic acid and the argentaffin substance in the sex vesicule of Mouse spermatocytes. *Expl. Cell Res.*, **47**, 86-96.
- UTAKOJI T., 1966. Chronology of nucleic acid sinthesis in meiosis of the male chinese hamster. *Expl. Cell Res.*, **42**, 585-596.
-