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

II. — VARIATION DE L'INCORPORATION ET DEVENIR DE LA ^3H -LYSINE, DE LA ^3H -ARGININE ET DE LA ^{35}S -CYSTINE

M. LOIR

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

RÉSUMÉ

L'analyse quantitative d'autoradiogrammes réalisés sur des coupes de matériel fixé par le Bouin, le formol et le Clarke, sur des empreintes et sur des frottis de spermatozoïdes épидидymaires entre 2 heures et 29 jours après injection de ^3H -lysine, de ^3H -arginine et de ^{35}S -cystine, a permis d'aborder l'étude de la synthèse et du devenir des protéines nucléaires dans les spermatocytes et les spermatides du Bélier.

La considération du rapport des quantités de lysine et d'arginine incorporée, de la variation de l'incorporation de ^{35}S -cystine et de l'acido-solubilité du marquage confirme l'existence au stade préleptotène d'une synthèse d'histones de type « somatique » simultanée à la réplication de l'ADN. Elle suggère que de telles protéines seraient également synthétisées au début du stade pachytène et pendant la phase d'élongation du noyau des spermatides.

La synthèse des protéines non histones, que reflète l'incorporation de ^{35}S -cystine, ne varie pas notablement dans les spermatocytes et les spermatides rondes.

L'enrichissement en arginine des DNPs des spermatides allongées, déjà mis en évidence chez les Rongeurs, est confirmé. Il s'accompagne d'une incorporation importante de cystine.

La chronologie des phénomènes permet d'exclure que l'apparition dans les spermatides allongées des nouvelles protéines, riches en arginine et en cystine, soit responsable du blocage de l'activité génétique.

L'essentiel de la lysine des nucléoprotéines du gamète provient des spermatocytes en fin de méiose et des spermatides rondes. Une faible proportion de celle incorporée aux stades préleptotène, pachytène I et spermatides en cours d'allongement participe à la composition du noyau parce que certaines protéines dans lesquelles la lysine a été incorporée sont métabolisées rapidement, et parce qu'une fraction importante de la lysine restant dans les noyaux des dernières spermatides rondes est transférée dans le cytoplasme au cours de la phase d'élongation nucléaire. Cette lysine d'origine nucléaire s'accumule finalement dans les sphères chromatophiles.

Les protéines nucléaires riches en arginine et en cystine apparaissant dans les vieilles spermatides sont plus stables que celles synthétisées aux autres phases de la méiose et de la spermiogénèse. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par cytochimie établissant qu'elles ne subissent pas de turn-over, au moins jusqu'à la fin du transit épидидymaire. Le rôle de la richesse en cystine de ces protéines dans la stabilisation structurale de la chromatine du spermatozoïde est envisagé.

INTRODUCTION

A la suite des travaux de MIESCHER (1897) établissant que chez les poissons les protéines du noyau du spermatozoïde étaient du type protamine, il fut longtemps admis qu'il en était de même chez les Mammifères. En 1956, ALFERT notait que les caractères cytochimiques de la DNP du spermatozoïde de rongeur étaient du type histone (insolubilité dans le TCA 5 p. 100 chaud). Ce résultat était confirmé par MONESI (1964) et par VAUGHN (1966). En fait, les études biochimiques des nucléoprotéines du spermatozoïde qui ont été réalisées chez le Taureau (BRIL-PETERSEN et WESTENBRINK, 1963 ; COELINGH *et al.*, 1969) et chez le Verrat (HENRICKS et MAYER, 1965) n'ont pas mis en évidence d'histones classiques mais plutôt des protéines basiques particulières très riches en arginine ainsi qu'en cystine (chez le Taureau, la demi-cystine constitue 5,7 à 6,3 p. 100 de la nucléoprotéine contre environ 1 p. 100 pour les protéines nucléaires somatiques).

A la suite des travaux de LISON (1955), de MONESI (1964, 1965), de GLEDHILL *et al.* (1966) et de VAUGHN (1966), nous savons que, chez les mammifères, le remplacement des histones somatiques par la protéine basique propre au spermatozoïde se fait lors de la phase d'allongement des spermatides, mais nous ignorons à quel moment a lieu l'augmentation de la teneur en cystine. La substitution des protéines basiques s'accompagnerait d'un départ du noyau des histones somatiques riches en lysine) synthétisées au début de la prophase méiotique et qui finalement s'accumuleraient dans la sphère chromatophile des corps résiduels (VAUGHN, 1966).

Nous avons repris chez le Bélier l'étude de ces phénomènes en tentant de les préciser. Pour cela, nous avons fait appel à la technique de l'autoradiographie quantitative, utilisant comme précurseurs marqués la ^3H -lysine, la ^3H -arginine et la ^{35}S -cystine et des temps post-injection échelonnés entre 2 heures et 29 jours.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — Animaux et traitements

17 béliers de race *Ile-de-France* âgés de 18 mois à 4 ans ont été utilisés au cours de la saison sexuelle et dans quelques cas au cours de la première saison transitoire (janvier-février).

Les précurseurs ont été injectés dans les conditions décrites précédemment (LOIR, 1972 a). Les castrations ont été effectuées aux temps suivants :

- ^3H -lys. : 2 heures, 4 heures, 1, 6, 15, 20, 23 et 29 jours après injection.
- ^3H -arg. : 4 heures, 1, 5 et 29 jours après injection.
- ^{35}S -cys. : 5 heures et 5 jours après injection.

B. — Précurseurs marqués

Nous avons utilisé les précurseurs suivants :

- ^3H -4 L-lysine (chlorhydrate — CEA — activité spécifique 4 Ci/mM) ; 6 à 9 μCi par gramme de testicule.
- ^3H -4 L-arginine (chlorhydrate — CEA — activité spécifique : 7 Ci/mM) ; 10 μCi par gramme de testicule.
- ^{35}S DL-cystine (activité spécifique : environ 40 mCi/mM) ; 10 μCi par gramme de testicule.

La technique autoradiographique utilisée ne révèle les acides aminés marqués que s'ils sont incorporés dans des protéines ou dans des polypeptides. Par ailleurs quelques coupes de matériel fixé par le formol après injection de ^3H -lysine ont été traitées par le TCA chaud ; ce traitement ne réduit pas les marquages nucléaires et cytoplasmiques (tableau 3) suggérant ainsi que l'incorporation a lieu dans des protéines.

L'injection de lysine marquée conduit à un marquage spécifique de la lysine liée aux protéines (LAURENCE et BUTLER, 1965). Nous manquons de données précises quant au devenir de l'arginine injectée ; les auteurs ayant utilisé en autoradiographie l' ^3H -arginine admettent implicitement que ce précurseur permet un marquage spécifique de l'arginine liée aux protéines. Ce que nous savons du métabolisme des acides aminés soufrés dans l'organisme (ROSE, 1957 ; LEBLOND *et al.*, 1957) permettrait de supposer que le marquage observé après injection de ^{35}S -cystine correspond à la cystine liée aux protéines. Cependant, il n'est pas exclu que cet acide aminé ne soit pas incorporé en tant que tel mais le soit plutôt sous forme de cystéine. Quoiqu'il en soit, nos observations cytochimiques (LOIR, 1972 b) indiquent que dans le cas des spermatides allongées du Bélier, l'incorporation de ^{35}S -cystine s'accompagne d'une augmentation des groupes SS (cystine) et non des groupes SH (cystéine).

Nous ignorons comment évolue la disponibilité des précurseurs marqués au niveau des cellules germinales. Selon certaines observations (LEBLOND *et al.*, 1957 ; LAURENCE et BUTLER 1965 ; DROZ et BARONDES, 1969) chez les rongeurs l'incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines continue encore 1 à 8 heures après injection de sorte qu'il est vraisemblable que les variations et les localisations des marquages observées 2, 4 ou 5 heures après injection reflètent la synthèse plutôt que le devenir des protéines.

C. — Préparation des autoradiogrammes

Des fragments de testicule ont régulièrement été fixés par le Bouin Hollande (3 jours). Dans quelques cas le formol et le Clarke ont également été utilisés. Le Bouin comme le formol insolubilise les protéines tissulaires (BLOCH et HEW, 1960 ; ALLFREY *et al.*, 1968) et les protège contre les traitements solubilisateurs, y compris le TCA chaud (sauf les protamines qui après fixation y sont solubles — ALFERT et GESCHWIND, 1953). Au contraire le Clarke entraîne une perte d'histones (MONESI, 1965 ; ALLFREY *et al.*, 1968 ; DICK et JOHNS, 1968) et après cette fixation le traitement des coupes par le TCA chaud supprime une fraction supplémentaire de protéines, vraisemblablement des histones (MONESI, 1965).

Après inclusion dans la paraffine, les blocs ont été coupés à 4 μ sauf ceux marqués par la ^{35}S -cystine qui ont été coupés à 2 μ . Quelques coupes de matériel marqué par la ^3H -lysine et fixé par le formol et le Clarke ont été traitées par le TCA 8 p. 100 pendant 17 min à 90°C.

Nous avons également réalisé des empreintes testiculaires qui ont été fixées par le formol pendant 2 heures et des frotis de spermatozoïdes des différentes régions de l'épididyme de tous les béliers castrés plus d'un jour après injection ; ils ont été fixés par les vapeurs de formol pendant 15 min.

Toutes les lames ont été passées dans le TCA 5 p. 100 à 40°C pendant 5 min et lavées 2 heures à l'eau courante.

Les coupes ont été colorées par la méthode du PAS pour faciliter l'identification des stades des spermatides en se référant au développement du système acrosomique. Selon SAWICKI et ROWINSKI (1969), cette coloration effectuée avant autoradiographie entraîne une légère diminution du marquage par un effet de chémographie négative et non par une action au niveau des substances marquées.

Nous avons régulièrement utilisé l'émulsion coulable Ilford K 5 et dans quelques cas pour augmenter légèrement le pouvoir de résolution l'émulsion Ilford L 4. La pose des émulsions et les traitements autoradiographiques ultérieurs ont été précédemment décrits (LOIR, 1972 a).

D. — *Analyse quantitative des autoradiogrammes
et représentation des courbes de marquage*

Les méthodes employées pour mesurer sur coupes les marquages nucléaires et cytoplasmiques et pour représenter les courbes de marquage ont été décrites précédemment (LOIR, 1972 a). Lorsque le marquage nucléaire des vieilles spermatides a été mesuré sur des empreintes, les comptages ont été faits visuellement sur le noyau entier.

Le noyau des vieilles spermatides n'étant pas sphérique mais de forme variable, l'établissement de la courbe de variation de la radioactivité du noyau entier, tel qu'il a été proposé pour les cellules rondes (LOIR, 1972 a), n'est pas possible. Ceci rend non seulement impossible la comparaison avec le génôme haploïde des spermatocytes et des spermatides rondes mais constitue également une difficulté majeure dans l'interprétation des données autoradiographiques relatives aux spermatides S 9 à S 11. La condensation progressive du noyau de ces spermatides entraîne, pour une même quantité de précurseur présente dans le noyau entier, une densité de marquage nucléaire d'autant plus forte que la condensation du contenu nucléaire est plus avancée. Nous ne pouvons donc pas assimiler les variations de densité de marquage à des variations de quantité de précurseur.

D'autre part, nous ignorons comment varie la concentration nucléaire en matière sèche des spermatides S 9-S 11. Toutefois, le fait que le spermatozoïde contienne 50 p. 100 de matière sèche contre 10 à 20 p. 100 dans les cellules somatiques (BARER *et al.*, 1953) permet de supposer que la concentration augmente alors fortement et qu'il en est de même pour l'auto-absorption. De ce fait le marquage donne une indication de la quantité de précurseur présente, d'autant plus sous-estimée que la condensation progresse. Du fait que les effets de la condensation progressive des protéines et de l'auto-absorption croissante sont opposés, ils s'annulent partiellement l'un l'autre.

Un troisième facteur affecte le marquage nucléaire des vieilles spermatides, sur coupes mais non sur empreintes. L'épaisseur des noyaux devenant petite en comparaison de celle des coupes, la probabilité qu'ils ne soient pas en contact avec l'émulsion devient élevée. Le marquage cytoplasmique interfère alors avec celui des noyaux. De ce fait, le marquage nucléaire doit être considéré comme étant en réalité plus élevé lorsqu'il est supérieur au marquage cytoplasmique et plus bas lorsqu'il lui est inférieur. Des comptages faits sur empreintes confirment qu'il en est bien ainsi.

RÉSULTATS

A. — *Localisation et caractères du marquage 2 à 4 heures
après injection de ³H-lysine et de ³H-arginine*

2 et 4 heures après injection des acides aminés tritiés, le marquage est à la fois nucléaire et cytoplasmique à tous les stades de la méiose et de la spermiogenèse. Dans les spermatocytes le marquage concerne les chromosomes, qu'ils soient dispersés ou non ; le nucléoplasme est très peu marqué. Dans les spermatocytes II et les spermatides rondes, le marquage est distribué régulièrement sur tout le noyau. Il en est de même pour les vieilles spermatides et ceci suggère que le marquage observé concerne plutôt le noyau que l'acrosome qui couvre sa partie antérieure. Le marquage des nucléoles n'a pas été précisé du fait qu'ils sont petits et qu'il n'y a pas de zones nucléaires plus marquées que d'autres.

Les spermatocytes en division ont un marquage chromosomal plus bas et un marquage cytoplasmique plus élevé qu'avant ou après division. Les corps d'Ebner et les sphères chromatophiles ne sont jamais marqués, bien que quelques grains d'argent soient observés sur le cytoplasme les entourant. Après injection d'³H-lysine, le rapport des marquages cytoplasmique et nucléaire (C/N) ne varie pas de façon significative entre 2 et 4 heures.

TABLEAU I

Effet de la fixation par le Clarke sur la densité de marquage nucléaire (grains/10 $\mu^2 \pm$ écart type) de 4 catégories de cellules germinales (en moyenne, 40 mesures par donnée) 2 heures après injection d' ^3H -Lysine

	Spermatocytes préleptotènes	Spermatocytes zygotènes (St. III-IV)	Spermatocytes pachytènes (St. I)	Spermatides s'allongeant (St. III)
Valeur observée	2,22 $\pm$ 0,07	1,23 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,06
Valeur théorique	5,05	1,23	1,40	1,75
Réduction	55 %	(0 %)	28 %	49 %

Valeur théorique : nombre de grains d'argent par 10 μ^2 s'il n'y avait pas de pertes de protéines pendant la fixation par le Clarke. Les valeurs sont calculées à partir de celles observées sur matériel fixé par le Bouin Hollande (fig. 1) — fixateur n'entraînant pas de perte de protéines — sur la base de la valeur 1,23 arbitrairement fixée pour les noyaux zygotènes. Cette valeur a été choisie pour la raison suivante. C'est celle observée après fixation par le Clarke et nous faisons l'hypothèse, autorisée par le fait que le TCA chaud est sans action sur les noyaux zygotènes, que le Clarke ne dissout pas de matériel radioactif dans ces noyaux. S'il en est autrement c'est-à-dire si la réduction de marquage due au Clarke n'est pas nulle, cela ne change pas l'ordre de grandeur relatif des réductions de marquage des autres catégories cellulaires.

TABLEAU 2

Effet du traitement avant autoradiographie, par le TCA chaud de coupes de matériel fixe par le Clarke, sur la densité de marquage nucléaire (grains 10 $\mu^2 \pm$ écart type) de 4 catégories de cellules germinales (en moyenne, 40 mesures par donnée), 2 heures après injection d' ^3H -lysine

	Spermatocytes préleptotènes	Spermatocytes zygotènes (St. III-IV)	Spermatocytes pachytènes (St. I)	Spermatides s'allongeant (St. III)
Sans traitement TCA	2,22 $\pm$ 0,07	1,23 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,06
Avec traitement TCA	1,54 $\pm$ 0,08	1,24 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,04	0,53 $\pm$ 0,06
Réduction	33 %	0 %	20 %	42 %

Comptages effectués sur les mêmes sections de tubes séminifères, sur des coupes sériées, l'une étant traitée par le TCA chaud l'autre ne l'étant pas et les 2 étant traitées simultanément pour les techniques autoradiographiques.

L'efficacité du traitement par le TCA a été contrôlée sur coupes sériées par la coloration au FG pH 8,1 (Loir, 1972 b).

Deux heures après injection d' ^3H -lysine, la réduction de marquage nucléaire entraînée par le Clarke dépend du stade cellulaire (tabl. 1). Le traitement par le TCA chaud des coupes de matériel fixé par le Clarke supprime une fraction supplémentaire de marquage selon une relation identique avec les stades cellulaires (tabl. 2).

FIG. 1. — Variation des densités de marquage nucléaire (—●—●—) et cytoplasmique (—○—○—) des spermatocytes et des spermatozoa 4 heures après injection de ^3H -lysine; coupes de matériel fixé par le Bouin. Variation de la densité de marquage nucléaire des vieilles spermatozoa, 4 heures après injection de ^3H -lysine (—▲—▲—); empreintes fixées par le formol. 90 cellules par point en moyenne.

Ordonnées gauche (coupes) et droite (empreintes) : densités de marquage en valeurs arbitraires. Traits verticaux : $\pm$ écart type.

Abbreviations utilisées dans les figures 1 à 14 : PL : stade préleptotène ; L : st. leptotène ; Z : st. zygotène ; P 1, P 2 : st. pachytène ; C II : spermatocytes II ; ES : spermatozoa ronds ; MS : spermatozoa s'allongeant ; LS : spermatozoa allongés ; S : spermatozoa épидидymaires ; T : tête de l'épididyme ; T 1 : tête proximale ; T 2 : tête distale ; C : corps de l'épididyme ; Q : queue ; Q 1 : queue proximale ; Q 2 : queue distale ; SC : sphères chromatophiles ; A 2 : gonies A 2 ; IN : gonies intermédiaires ; B 1, B 2 : gonies B 1, B 2.

FIG. 2. — Variation des densités de marquage nucléaire (—●—●—) et cytoplasmique (—○—○—) des spermatocytes et des spermatozoa, 4 heures après injection d' ^3H -arginine. Coupes de matériel fixé par le Bouin. 65 cellules par point en moyenne.

Ordonnée : densité de marquage en valeurs arbitraires.

Cartouche : détail du marquage des cellules en division.

Traits verticaux : $\pm$ écart type.

B. — Localisation du marquage dans les vieilles spermatides 5 heures après injection de ^{35}S -cystine

Dans les vieilles spermatides, les grains d'argent sont nombreux au-dessus et autour des noyaux. Du fait du faible pouvoir de résolution obtenu avec le ^{35}S , il ne peut être exclu que ce marquage ait aussi une origine extranucléaire.

C. — Variation des incorporations 2, 4 et 5 heures après injection

Elle est représentée pour les 3 acides aminés sur les figures 1-4.

FIG. 3. — Variation des densités de marquage nucléaire (—●—●—) et cytoplasmique (—○—○—) des spermatocytes et des spermatides, 5 heures après injection de ^{35}S -cystine. Matériel fixé par le Bouin. 90 cellules en moyenne par point.

Ordonnée : densité de marquage en valeurs arbitraires.

Traits verticaux : $\pm$ intervalle de confiance à 5 p. 100 de la moyenne.

FIG. 4. — Variations relatives de la radioactivité incorporée par le génome haploïde des spermatocytes et des spermatides rondes, 4 heures après injection de ^3H -arginine (—○—○—), 4 heures après injection de ^3H -lysine (—●—●—) et 5 heures après injection de ^{35}S -cystine (—▼—▼—). Ce graphique est établi d'après les données utilisées pour les figures 1, 2 et 3.

Pour les vieilles spermatides ces courbes ne pouvant être établies ce sont les courbes de variation des densités de marquage qui sont indiquées. Les courbes correspondant à la ^3H -arginine et à la ^3H -lysine ne peuvent être comparées en valeurs absolues ; leur position relative a été déterminée de sorte que le rapport Lys/Arg. soit en moyenne proche de 1,2 (cf. discussion).

Ordonnées gauches : radioactivité en unités arbitraires.

Ordonnées droites : densité de marquage en unités arbitraires.

Cartouche variation du rapport Lys/Arg.

Il est à noter que :

— les incorporations de ^3H -lysine et de ^3H -arginine par les noyaux des spermatocytes et des spermatides rondes évoluent de façon sensiblement identique, tandis que celle de ^{35}S -cystine diffère beaucoup d'elles,

— dans les vieilles spermatides l'incorporation nucléaire de ^3H -arginine est parallèle à celle de ^{35}S -cystine mais non à celle de ^3H -lysine qui passe par un maximum dans les spermatides s'allongeant,

— malgré leur comportement peu différent dans les spermatocytes et les spermatides rondes, les deux acides aminés basiques ne sont pas incorporés par les noyaux dans un rapport constant ; l'incorporation de la lysine prévaut dans les noyaux préleptotènes et fin zygotènes-pachytènes (fig. 4).

Les incorporations des acides aminés tritiés par le cytoplasme des cellules considérées varient moins que pour les noyaux. L'augmentation du marquage cytoplasmique dans les vieilles spermatides après injection de ^{35}S -cystine pourrait refléter en partie celle du marquage nucléaire.

TABLÉAU 3

Effet du traitement avant autoradiographie, par le TCA chaud, de coupes de matériel fixe par le formol, sur la densité de marquage nucléaire (grains/10 $\mu^2 \pm$ écart type) de 2 catégories de cellules germinales (en moyenne, 40 mesures par donnée) 2 heures après injection de ^3H -lysine

	Spermatocytes pachytènes (St. VIII)	Spermatides s'allongeant (St. III)
Sans traitement TCA	1,12 $\pm$ 0,07	1,71 $\pm$ 0,08
Avec traitement TCA	1,16 $\pm$ 0,09	1,65 $\pm$ 0,09

Cf. tableau 2 pour détails.

D. — *Évolution des marquages entre un et 29 jours après injection*

I. ^3H -lysine.

24 heures après injection, les marquages nucléaires et cytoplasmiques des spermatocytes et des spermatides diffèrent peu de ceux observés à 2 ou 4 heures. Ceci est vrai également pour leur rapport (C/N) sauf dans les spermatides rondes où il montre une tendance à diminuer (fig. 13).

Cinq jours plus tard (fig. 5) les différences entre les marquages nucléaires des diverses catégories de spermatocytes et de spermatides sont fortement atténuées par rapport à ce qu'elles étaient 2 ou 4 heures après injection (fig. 1). Parmi les spermatozoïdes épидидymaires, seuls ceux de la tête sont marqués.

A 15, 20, 23 et 29 jours après injection (fig. 6 à 9) les marquages résultant d'incorporations aux stades préleptotène, pachytène 1 et spermatides s'allongeant ne présentent plus de réduction aussi importante que pendant les six premiers jours.

FIG. 5-9. — Variation des densités de marquage nucléaire (●) et cytoplasmique (○) des spermatocytes et des spermatoïdes (fixation par le Bouin; 500 cellules par point en moyenne) et de la densité de marquage nucléaire des spermatozoïdes épидидymaires (200 par point) (—●—), 6, 15, 20, 23 et 29 jours après injection de ^3H -lysine. Pour chaque temps, les 2 courbes de densité de marquage nucléaire ne sont pas comparables en valeurs absolues; la position de celle relative aux spermatozoïdes épидидymaires a été choisie arbitrairement de façon qu'elle se situe dans le prolongement de celle correspondant aux spermatoïdes; il est en effet plausible que le contenu en matériel radioactif des cellules germinales ne subit pas de modification brusque lors du passage des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères.

Cartouche; Variations du rapport des densités de marquage cytoplasmique et nucléaire (C/N) à 4 heures ($\Delta\Delta\Delta\Delta$) et aux différents temps de castration ($\text{---}\blacktriangle\text{---}\blacktriangle\text{---}$).

Ordonnées gauches (coupes) et droites (frottis) : densité de marquage en unités arbitraires. Traits verticaux : $\pm$ écart type.

FIG. 6. — 15 jours après injection de ^3H -lysine

Lorsque les cellules qui étaient aux deux premiers de ces stades lors des injections parviennent aux stades spermatides s'allongeant et jeunes spermatides allongées, le rapport C/N prend une valeur très supérieure à ce qu'il était à l'origine ; il semble qu'il en soit de même pour la ³H-lysine incorporée par les gonies. Au contraire, lorsque

les cellules qui étaient aux stades leptotène, fin de prophase et spermatides rondes y arrivent, ce rapport varie peu ou est fortement réduit (fig. 13).

A 15 jours, les sphères chromatophiles ne sont pas marquées ; elles le sont à partir de 20 jours.

FIG. 7. — 20 jours après injection de ^3H -lysine

FIG. 8. — 23 jours après injection de ^3H -lysine

FIG. 9. — 29 jours après injection de ^3H -lysine

FIG. 10. — 5 jours après injection de ^3H -arginine.
 —△—△— : rappel de la variation de la densité de marquage nucléaire des vieilles spermatides
 4 heures après injection de ^3H -arginine.

FIG. 10-II. — Variation des densités de marquage nucléaire (●) et cytoplasmique (○) des spermatocytes et des spermatides (fixation par le Bouin; 40 cellules par point en moyenne) et de la densité de marquage nucléaire des spermatozoïdes épididymaires (180 par point) (—■—■—), 5 et 29 jours après injection de ^3H -arginine. Même légende que fig. 5-9.

Le marquage des spermatozoïdes épидидymaires varie selon les régions de l'épididyme et les temps post-injection (fig. 5-9 et 14) ; il passe par un maximum correspondant à une incorporation dans les spermatides rondes et par deux minimums correspondant aux stades zygotène-pachytène I et aux vieilles spermatides (fig. 14).

FIG. 11.

FIG. 11. — 29 jours après injection de ^3H -arginine

FIG. 12.

FIG. 12. — Variation des densités de marquage nucléaire (●) et cytoplasmique (○) des spermatozoïdes, 5 jours après injection de ^{35}S -cystine ; 80 cellules par point. Variation de la densité de marquage nucléaire des spermatozoïdes épидидymaires (—●—●—) ; 130 spermatozoïdes par point. Même légende que figure 5-9.

2. ^3H -arginine.

Les marquages cytoplasmiques et nucléaires ainsi que leur rapport (fig. 13) ne diffèrent pas sensiblement 24 heures après injection de ceux observés 20 heures plus tôt.

FIG. 13. — Évolution au cours des 5 jours suivant l'incorporation de ^3H -arginine (partie supérieure), du rapport des densités de marquage cytoplasmique et nucléaire (C/N) pour des incorporations aux stades préleptotène (▽), leptotène (○), pachytène I (□), fin pachytène 2 (●), spermatides rondes (■) et spermatides s'allongeant (◆).

Évolution au cours de la prophase méiotique et de la spermiogenèse du rapport C/N pour la ^3H -lysine (partie inférieure) incorporée aux mêmes stades, que la ^3H -arginine.

Ces graphiques réunissent les données obtenues, pour la ^3H -arginine à 4 heures, 24 heures et 5 jours, pour la ^3H -lysine à 4 heures, 24 heures, 6, 15, 20, 23 et 29 jours (cartouches des figures 5-9).

Les 2 premiers points de chaque courbe correspondent à 4 heures et à 24 heures.

Ordonnée : valeur du rapport C/N

Les stades du cycle de l'épithélium séminifère sont indiqués par leurs limites.

Cinq jours après injection d' ^3H -arginine (fig. 10), les marquages résultant d'incorporations aux stades préleptotène et pachytène sont peu différents de ceux

observés pour la ^3H -lysine ; ils ont subi une réduction identique. Les marquages correspondant à une incorporation par les vieilles spermatides ne semblent pas avoir subi de réduction. Les noyaux des spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires

FIG. 14. — Évolution du marquage des spermatozoïdes de l'épididyme par la ^3H -lysine, en fonction des stades cellulaires auxquels elle a été incorporée. Ce graphique réunit les courbes de marquage des spermatozoïdes épидидymaires (fig. 5-9) établies aux temps post-injection de 6 jours : ▼, 15 jours : ■, 20 jours : ●, 23 jours : ▲, 29 jours : ◆. M' étant pas comparables en valeurs absolues, la position relative des courbes a été choisie de sorte que leur ensemble décrive une courbe continue et régulière.

- : densité de marquage nucléaire des spermatozoïdes S-13-S 14 29 jours après injection.
- ▼—▼— : variation de la radioactivité incorporée par le génome haploïde des spermatocytes et des spermatozoïdes ronds 4 heures après injection de ^3H -lysine (ordonnée gauche).
- ▲—▲— : variation de la densité de marquage nucléaire des vieilles spermatides, 4 heures après injection de ^3H -lysine (ordonnée droite). La position de ces 2 courbes par rapport aux courbes de marquage des spermatozoïdes épидидymaires est arbitraire ; elles peuvent cependant être comparées étant toutes relatives au génome haploïde.

sont marqués sur toute leur surface ; leur partie antérieure ou postérieure n'est pas préférentiellement marquée (comptages portant sur, en moyenne, 120 spermatozoïdes du stade VIII, de la tête et du corps de l'épididyme).

29 jours après injection d' ^3H -arginine (fig. 11), les marquages des cellules ayant incorporé aux stades gonies A_2 - B_2 et préleptotène sont peu différents de ceux observés au même temps avec la ^3H -lysine ; toutefois le marquage des sphères chromatophiles est moins élevé. Les marquages diffèrent par contre pour les cellules ayant incorporé au stade pachytène.

3. ^{35}S -cystine.

5 jours après injection (fig. 7), le marquage nucléaire des spermatozoïdes et des spermatozoïdes épидидymaires correspondant à une incorporation par les vieilles spermatides présente un pic net, plus marqué que 5 heures après injection.

DISCUSSION

A. — Synthèses protéiques nucléaires dans les spermatocytes et les spermatozoïdes

Sans démonstration d'une production de nouvelles molécules protéiques, l'incorporation d'acides aminés ne peut être considérée comme une preuve suffisante de synthèse de protéines (ALLFREY *et al.*, 1957). Nous n'avons pas utilisé dans nos

expériences d'inhibiteurs des synthèses protéiques de sorte que nous ne pouvons exclure que certaines incorporations ne résultent d'une conversion de protéines pré-existantes par remplacement de certains acides aminés. Notons cependant qu'il a été établi que :

- lors du turnover des histones somatiques le remplacement progressif des molécules en place correspond à une synthèse vraie (CHALKLEY et MAURER, 1965),
- l'apparition de l'histone très riche en arginine dans les spermatides de *Drosophila* correspond à une synthèse (DAS *et al.*, 1964),
- la protamine remplaçant dans les spermatides de Salmonides les histones somatiques est synthétisée *de novo* (INGLES et DIXON, 1967).
- lors de l'apparition des histones riches en arginine chez la Souris (MONESI, 1965), au moins six acides aminés sont incorporés en même temps que l'arginine.

I. *Spermatocytes I et spermatides rondes.*

Dans les spermatocytes I, le marquage nucléaire est principalement chromosomal et de ce fait il concerne essentiellement les protéines associées à l'ADN : protéines acides, protéines résiduelles et histones. Cette observation est en accord avec l'idée selon laquelle les protéines chromosomales, acides et histones, sont beaucoup plus actives métaboliquement que toutes les autres protéines nucléaires (STEELE et BUSCH, 1963 ; HNILICA, 1967). Dans les spermatocytes II et les spermatides rondes, il est permis de supposer que le marquage concerne les mêmes classes de protéines nucléaires. Les protéines acides et résiduelles sont acido-insolubles et contiennent de la cystine ; leur rapport molaire lys./arg. est de 1-1,25 (HNILICA, 1967 ; WANG, 1967). Les histones sont acido-solubles ; elles contiennent une quantité négligeable de cystine (HNILICA, 1967 ; SENSKU et IWAI, 1970) ; leur rapport molaire lys./arg. est de 1,5-1,9 pour l'histone totale (HNILICA, 1967).

Après injection de ^3H -lysine, le marquage des noyaux préleptotènes est réduit par la fixation au Clarke et par le traitement au TCA chaud. Le rapport des quantités de ^3H -lysine et de ^3H -arginine incorporées par ces noyaux (rapport L/A) est élevé. Enfin, l'incorporation de ^{35}S -cystine n'est pas plus élevée dans ces spermatocytes que dans ceux en méiose. Ces observations suggèrent que les pics de marquage observés au stade préleptotène après injection des deux acides aminés basiques reflètent une synthèse d'histones, laquelle coïncide avec la synthèse de l'ADN, tandis que le marquage observé après injection de ^{35}S -cystine concerne la synthèse des protéines non histones, qui est indépendante de la replication de l'ADN (CAVE, 1968). L'existence d'une synthèse d'histones a été présumée dans les jeunes spermatocytes I du Rat (VAUGHN, 1966) mais non chez la Souris (MONESI, 1965).

Pendant le stade pachytène, le marquage nucléaire possède les mêmes caractéristiques que pendant le stade préleptotène. Ceci suggère à nouveau l'existence d'une synthèse d'histones ; elle serait, par rapport aux autres synthèses de protéines nucléaires, quantitativement moins importante (tabl. 1 et 2) que la précédente. Dans tous les cas où un turnover des histones a été mis en évidence en dehors des phases de replication de l'ADN, la synthèse est peu importante (SPALDING *et al.*, 1966 ; GURLEY et MARDIN, 1968). Cependant, dans les spermatocytes il pourrait y avoir une synthèse tardive d'histones qui prendrait fin au début du stade diplotène (BOG-

DANOV *et al.*, 1968 ; ANTROPOVA et BOGDANOV, 1970). Dans le cas présent, il est possible qu'une fraction du marquage par les acides aminés tritiés corresponde à un tel phénomène.

2. Vieilles spermatides.

Après injection de ^3H -lysine, le marquage nucléaire présente un pic dans les spermatides S 9-S 11. D'après ce que nous avons dit quant à l'interprétation du marquage de ces cellules, il ne peut être totalement exclu que la variation de la quantité de lysine incorporée par les noyaux entiers ne présente pas ce pic. Néanmoins, il y a une forte présomption que les noyaux de ces spermatides incorporent plus de lysine que ceux des spermatides rondes et il reste que le rapport L/A est élevé et que le marquage est fortement réduit par le Clarke et par le TCA chaud. Ces faits conduisent à émettre l'hypothèse que les spermatides S 9-S 11 synthétisent des histones de type somatique (riches en lysine). L'existence d'une telle synthèse précédant dans les spermatides celles des nouvelles histones riches en arginine, n'a pas été rapportée chez les Mammifères. Une augmentation de la quantité d'histones de type somatique des spermatides a été démontrée chez la truite (MARUSHIGE et DIXON, 1969). Chez la Sauterelle l'hypothèse de l'existence d'un tel phénomène a été proposée par CLAYPOOL et BLOCH (1967).

Dans les spermatides S 12 et dans les suivantes l'incorporation nucléaire de la lysine est basse tandis que celle de l'arginine est très élevée. Le noyau de ces cellules ne se condensant plus, l'existence du pic d'incorporation de ce dernier acide aminé n'est pas douteuse. Selon les données obtenues par cytochimie (LOIR, 1972 *b*) il correspond essentiellement à une synthèse d'histones. Ce résultat est en accord avec ce que l'on sait de la spermiogenèse. L'apparition de nouvelles histones caractérisées par un contenu très élevé en arginine et remplaçant les histones dites somatiques est un phénomène général en fin de spermatogenèse. Chez les Mammifères, il a été démontré chez la Souris (MONESI, 1964, 1965) chez le Rat (LISON, 1955 ; VAUGHN, 1966) et chez le Taureau (GLEDHILL *et al.*, 1966).

Dans les spermatides allongées, l'incorporation de ^{35}S -cystine atteint une valeur élevée, simultanément à celle d' ^3H -arginine. Ce résultat, confirmé par des observations cytochimiques (LOIR, 1972 *b*) met en évidence que c'est lors de la synthèse des nouvelles histones que le contenu nucléaire en cystine des cellules germinales augmente. Chez la Souris MONESI (1965) a conclu que les vieilles spermatides incorporaient faiblement ou pas du tout les acides aminés autres que l'arginine, mais il n'a pas utilisé la cystine marquée. Or nous avons injecté 2 Souris mâles par voie intrapéritonéale avec de la ^{35}S -cystine ($5\mu\text{ Ci/g}$) ; elles furent sacrifiées 8 heures après injection. Il est apparu que la ^{35}S -cystine est activement incorporée par les noyaux des spermatides S11-S15. Le métabolisme des protéines nucléaires dans les spermatides allongées semble donc similaire chez les Rongeurs et les Ovins.

B. — Synthèses protéiques et métabolisme de l'ARN dans les spermatides

Les données obtenues ne fournissent guère d'indications sur le rôle éventuel du métabolisme des protéines dans la réduction de la synthèse d'ARN par la chromatine des spermatides S3-S8a. Dans les spermatides S8b, l'initiation de la syn-

thèse de protéines riches en lysine, vraisemblablement du type histones somatiques, pourrait être responsable de la chute accélérée de l'incorporation d'³H-uridine et du blocage final de la synthèse d'ARN. Il a en effet été démontré que l'activité de la chromatine est réduite par la présence d'histones (BONNER *et al.*, 1968 ; MARUSHIGE et DIXON, 1969). Chez le Bélier comme chez la Souris, les nouvelles histones riches en arginine ne peuvent être à l'origine du blocage de l'activité génétique puisqu'elles apparaissent après que la synthèse ribonucléique ait cessé. Sur ce point les Poissons diffèrent des Mammifères ; en effet, dans les spermatides de Truite, l'activité de la chromatine est réduite aussi en deux étapes et la seconde est simultanée au remplacement des histones par la protamine (MARUSHIGE et DIXON, 1969).

C. — *Devenir de la lysine incorporée par les noyaux des spermatocytes et des spermatides*

Les noyaux des spermatozoïdes de Bélier comme ceux des spermatides S13-S15 contiennent très peu de lysine (LOIR, 1972 b). Les valeurs de marquage des spermatozoïdes épидидymaires à des temps variables après injection d'³H-lysine permettent de conclure que c'est surtout celle incorporée par les derniers spermatocytes I, par les spermatocytes II et par les spermatides rondes qui constitue l'essentiel de la lysine nucléaire du spermatozoïde tandis que celle incorporée par les noyaux préleptotènes, pachytènes I et ceux des spermatides s'allongeant, entre très peu dans la composition de ses DNPs.

Les données obtenues 6 jours après injection de ³H-lysine et 5 jours après injection d'³H-arginine mettent en évidence que pendant les jours suivant leur synthèse une fraction importante des protéines nucléaires apparues aux stades préleptotène et pachytène I a été métabolisée et ceci à une vitesse plus élevée que les protéines synthétisées aux autres stades. D'après le marquage observé 15 jours après injection de ³H-lysine, les protéines des stades préleptotène et pachytène I ne se dégraderaient plus ensuite aussi rapidement.

Le rapport C/N reste constant ou diminue lorsque les cellules qui étaient aux stades leptotène, fin de prophase et spermatides rondes — ce sont précisément les stades dont provient l'essentiel de la lysine du spermatozoïde — deviennent des spermatides s'allongeant. Ce fait rend improbable que l'augmentation de ce rapport pour les anciens spermatocytes préleptotènes et pachytènes I, ainsi d'ailleurs que pour les gonies, soit due à des facteurs autre qu'une augmentation de la quantité de lysine cytoplasmique par rapport à celle de lysine nucléaire. Lorsque ces mêmes spermatocytes préleptotènes et pachytènes I arrivent en fin de spermiogenèse, les sphères chromatophiles deviennent fortement marquées, alors qu'elles ne le sont pas pour les spermatocytes II par exemple. Ces observations suggèrent qu'une partie de la lysine incorporée par les noyaux préleptotènes, pachytènes I et ceux des gonies les quitte et passe dans le cytoplasme lorsqu'ils arrivent au stade spermatides s'allongeant, pour finalement s'accumuler dans les sphères chromatophiles. Dans le cas de la lysine incorporée par les noyaux de ces spermatides, l'évolution du marquage 6 jours après injection indique que le phénomène de métabolisation des protéines jouerait un rôle plus important que le passage au cytoplasme car le marquage de ce dernier augmente peu et les sphères chromatophiles sont peu marquées.

C'est donc parce qu'elle est incorporée dans des protéines rapidement métabolisées ou parce qu'elle est éliminée des noyaux des spermatides que la lysine des stades préleptotène, pachytène 1 et spermatides s'allongeant, participe peu à la composition des DNPs du spermatozoïde. A ces trois stades, les cellules germinales synthétisent des histones et des protéines, non histones ; il reste à savoir lesquelles sont concernées par ces phénomènes de dégradation rapide et d'élimination.

Le transfert dans le cytoplasme de la lysine nucléaire incorporée au début de la prophase méiotique est simultané à celui de l'ARN (LOIR, 1972 *a*) synthétisé en même temps et qui seul persiste jusqu'à la fin de la spermiogenèse ; tous les deux se retrouvent finalement réunis dans les sphères chromatophiles. La signification de ces faits reste hypothétique. Elle pourrait se situer au niveau de la stabilisation des ARNs, dans le noyau puis dans le cytoplasme. Dans le cas des spermatocytes de *Drosophile* (HENNIG, 1968), des ovocytes d'*Astérie* (GEUSKENS, 1965) et des cellules Hela (HARRIS, 1964) il a été proposé que les ARNs nucléaires associés à des protéines seraient stables et que ceux n'y étant pas se dégraderaient rapidement. Dans le cytoplasme des cellules somatiques l'ARN chromosomal serait lié à des protéines (CARTOUZOU *et al.*, 1969 ; HENSKAW et LOEBENSTEIN, 1970).

D. — *Devenir de l'arginine et de la cystine incorporées par les vieilles spermatides*

5 jours après injection d'³H-arginine et de ³⁵S-cystine les variations du marquage nucléaire des dernières spermatides et des spermatozoïdes épидидymaires présentent un pic correspondant à une incorporation dans les spermatides allongées. Le marquage correspondant à cette période semble devenu proportionnellement plus élevé par rapport à celui des cellules qui étaient au stade spermatides rondes lors des injections. Ces observations suggèrent que les protéines nucléaires synthétisées par les spermatides allongées sont plus stables que celles apparaissant aux autres phases de la méiose et de la spermiogenèse.

Il est vraisemblable que la teneur élevée en cystine de ces protéines est associée avec la stabilisation structurale de la chromatine ainsi que l'ont discuté ORD et STOKEN (1969) dans le cas des cellules somatiques pour le passage à la forme disulfure des groupes soufrés des histones riches en arginine (F 3). Il a en effet été mis en évidence que c'est sa richesse en cystine qui donne au noyau du spermatozoïde de Mammifère sa structure kératinoïde et sa résistance particulière aux agents physiques et chimiques (BORENFREUND *et al.*, 1961 ; BRIL-PETERSEN et WESTENBRINK, 1963 ; CHAMBERLAIN et WALKER, 1965 ; HENRICKS et MAYER, 1965). Il est entre autre résistant à la DNase ; c'est dans les spermatides S 12 que ce caractère apparaît (LOIR, 1972 *a*) ; l'incorporation de cystine est alors maximum.

Reçu pour publication en octobre 1971.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Professeur J. BRACHET et le Docteur B. L. GLEDHILL dont les critiques nous ont été précieuses pour la préparation du manuscrit.

SUMMARY

RIBONUCLEIC ACID METABOLISM AND PROTEINS

IN RAM (*OVIS ARIES*) SPERMATOCYTES AND SPERMATIDS.

II. — VARIATION OF THE INCORPORATION AND FATE OF ³H-LYSINE, ³H-ARGININE AND ³⁵S-CYSTINE

The synthesis and fate of nuclear proteins in ram spermatocytes and spermatids was studied by making a quantitative analysis of autoradiograms of sections, imprints and smears of epididymal spermatozoa fixed in Bouin, formol, and Clarke's solutions between 2 hours and 29 days after injection of ³H-lysine, ³H-arginine, and ³⁵S-cystine.

The variation in the ratio of the quantities of lysine and arginine incorporated, the variation in ³⁵S-cystine incorporation, and the acido-solubility of labelling confirm the existence of histone synthesis of a « somatic » type at the preleptotene stage which is simultaneous with DNA replication. This suggests that such proteins might also be synthesized at the beginning of the pachytene stage and during the elongation phase of the spermatid nucleus.

The synthesis of non-histone proteins which is indicated by the incorporation of ³⁵S-cystine, does not vary markedly in spermatocytes and round spermatids.

The arginine enrichment of DNPs of elongated spermatids (already demonstrated in rodents) is confirmed. It is accompanied by a large cystine incorporation.

Chronology of the phenomena shows that the new proteins, rich in arginine and cystine, appearing in the elongated spermatids are not responsible for blocking genetic activity.

Most gamete nucleoprotein lysine comes from spermatocytes at the end of meiosis and from round spermatids. A small proportion of that incorporated at the preleptotene, pachytene 1, and elongating spermatid stages goes into the nucleus composition because some proteins which incorporate lysine are rapidly metabolized, and because a large fraction of the lysine remaining in the nuclei of the last round spermatids is transferred into the cytoplasm during nuclear elongation phase. This lysine of nuclear origin finally accumulates in the chromatophilic spheres of the residual bodies.

Nuclear proteins rich in arginine and cystine appearing in old spermatids are more stable than those synthesized at other phases of meiosis and spermiogenesis. This agrees with results obtained by cytochemistry which indicate that nuclear proteins does not undergo a turnover, at least up to the end of epididymal transit. The role of the cystine richness of these proteins in the structural stabilization of spermatozoa chromatin is considered.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALFERT M., 1956. Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the Salmon. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 109-114.
- ALFERT M., GESCHWIND I. I., 1953. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **39**, 991-999.
- ALLFREY V. G., MIRSKY A. E., OSAWA S., 1957. Protein synthesis in isolated cell nuclei. *J. Gen. Physiol.*, **40**, 451-490.
- ALLFREY V. G., POGO B. G. T., LITTAU V. C., GERSHEY E. L., MIRSKY A. E., 1968. Histone acetylation in insect chromosomes. *Science*, **159**, 314-316.
- ANTROPOVA E. N., BOGDANOV Y. F., 1970. Cytophotometry of DNA and histone in meiosis of *Pyrrhocoris apterus*. *Expl. Cell. Res.*, **60**, 40-44.
- BARER R., ROSS K. F. A., THACZYK S., 1953. Refractometry of living cells. *Nature*, **171**, 656-663.
- BLOCH D. P., HEW H. Y. C., 1960. Changes in nuclear histones during fertilization and early embryonic development in the pulmonate snail *Helix aspersa*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**, 69-81.
- BOGDANOV Y. F., LIAPUNOVA N. A., SHERUDILO A. I., ANTROPOVA E. N., 1968. Uncoupling of DNA and histone synthesis prior to prophase I of meiosis in the cricket *Grillus (acheta) domesticus* L. *Expl. Cell. Res.*, **52**, 59-70.
- BONNER J., DAHMUS N. E., FAMBROUGH D., HUANG R. C., MARUSHIGE K., TUAN D. Y. H., 1968. The biology of isolated chromatin : chromosomes, biologically active in the test tube, provide a powerful tool for the study of gene action. *Science*, **159**, 47-56.

- BORENFREUND E., FITT E., BENDICH A., 1961. Isolation and properties of deoxyribonucleic acid from mammalian sperm. *Nature*, **191**, 1375-1377.
- BRIL-PETERSEN E., WESTENBRINK H. G. K., 1963. A structural basic protein as a counterpart of deoxyribonucleic acid in mammalian spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta*, **78**, 152-154.
- CARTOUZOU G., POIRÉE J. C., LISSITZKY S., 1969. Rapidly-labelled ribonucleic acid-protein complexes of the thyroid tissue. *Europ. J. Biochem.*, **8**, 357-369.
- CAVE M. D., 1968. Chromosome replication and synthesis of non-histone proteins in giant polytene chromosomes. *Chromosoma*, **25**, 392-401.
- CHALKLEY R., MAURER R., 1965. Turnover of template-bound histone. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **54**, 498-505.
- CHAMBERLAIN P. J., WALKER P. M. B., 1965. The thermal denaturation of nucleoprotein in Boar sperm. *J. Mol. Biol.*, **11**, 1-11.
- CLAYPOOL C. J., BLOCH D. P., 1967. Synthesis of ribonucleic acid and histone change during spermatogenesis in the Grasshopper *Chortophaga viridifasciata*. *Nature*, **215**, 966-967.
- COELINGH J. P., ROZIJN T. H., MONFOORT C. H., 1969. Isolation and partial characterization of a basic protein from bovine sperm heads. *Biochim. Biophys. Acta*, **188**, 353-356.
- DAS C. C., KAUFMANN B. P., GAY H., 1964. Autoradiographic evidence of synthesis of an Arginine-rich histone during spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **204**, 1008-1009.
- DAVIS J. R., FIRLIT C. F., 1965. Effect of glucose on uptake of L-lysine-H³ in cells of the seminiferous epithelium. *Amer. J. Physiol.*, **209**, 425-432.
- DICK C., JOHNS E. W., 1968. The effect of two acetic acid containing fixatives on the histones content of calf thymus deoxyribonucleo-protein and calf thymus tissue. *Expl. Cell. Res.*, **51**, 626-632.
- GEUSKENS M., 1965. Synthèse de deux types différents de RNA dans le suc nucléaire de l'ovocyte d'As-térie au début de l'oogenèse. *Arch. Biol.*, (Liège), **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.
- GURLEY L. R., HARDIN J. M., 1968. The metabolism of histone fractions. I. Synthesis of histone fractions during the life cycle of mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 285-292.
- HARRIS H., 1964. Function of the short-lived ribonucleic acid in the cell nucleus. *Nature*, **201**, 863-867.
- HENNIG W., 1968. Ribonucleic acid synthesis of the Y-chromosome of *Drosophila hydei*. *J. Mol. Biol.*, **38**, 227-239.
- HENRICKS D. M., MAYER D. T., 1955. Characterization of the basic protein associated with DNA in mammalian spermatozoa. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **119**, 769-772.
- HENSHAW E. C., LOEBENSTEIN J., 1970. Rapidly labelled polydisperse RNA in Rat-liver cytoplasm: evidence that it is contained in ribonucleoprotein particles of heterogeneous size. *Biochim. Biophys. Acta*, **199**, 405-420.
- HNILICA L. S., 1967. Proteins of the cell nucleus. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, **7**, 25-606.
- INGLES C. J., DIXON G. G., 1967. Phosphorylation of protamine during spermatogenesis in trout testis. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **58**, 1011-1018.
- LISON L., 1955. Variation of the basophilie pendant la maturation du spermatozoïde chez le Rat et sa signification histochemique. *Acta histochem.*, **2**, 47-67.
- LOIR M., 1972 a. Métabolisme de l'acide ribonucléique et des protéines dans les spermatocytes et les spermatides du Bélier (*Ovis aries*). I. Incorporation et devenir de l'³H-uridine. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 203-219.
- LOIR M., 1972 b. Métabolisme de l'acide ribonucléique. III. Étude cytochimique des transformations protéiques dans des vieilles spermatides. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, à paraître.
- LAURENCE D. J. R., BUTLER J. A. V., 1965. Metabolism of histones in malignant tissues and liver of the Rat and Mouse. *Biochem. J.*, **96**, 53-62.
- LEBLOND C. P., EVERETT N. B., SIMMONS B., 1957. Sites of protein synthesis as shown by radioautography after administration of S³⁵-labeled methionine. *Amer. J. Anat.*, **101**, 225-272.
- MARUSHIGE K., DIXON G. H., 1969. Developmental changes in chromosomal composition and template activity during spermatogenesis in trout testis. *Dev. Biol.*, **19**, 397-414.
- MIESCHER F., 1897. *Die Histochemischen und physiologischen Arbeiten*. Leipzig.
- MONESI V., 1964. Autoradiographic evidence of a nuclear histone synthesis during Mouse spermiogenesis in the absence of detectable quantities of nuclear ribonucleic acid. *Expl. Cell. Res.*, **38**, 683-688.
- MONESI V., 1965. Synthetic activities during spermatogenesis in the Mouse: RNA and protein. *Expl. Cell. Res.*, **39**, 197-224.
- ORD M. G., STOCKEN L. R., 1969. Further studies on phosphorylation and the thiol: disulphide ratio of histones in growth and development. *Biochem. J.*, **112**, 81-89.
- SAWICKI W., ROWINSKI J., 1969. Periodic Acid-Schiff reaction combined with quantitative autoradiography of ³H-thymidine or ³⁵S-sulfate-labeled epithelial cells of colon. *Histochemie*, **19**, 288-294.
- SENSHU T., JWAI K., 1970. Fractionation of Calf thymus histone by a new method of CM-cellulose chromatography. *J. Biochem.*, **67**, 473-485.

- SPALDING J., KAJIWARA K., MUELLER G. C., 1966. The metabolism of basic proteins in Hela Cell nuclei. *Proc. nat. Acad. Sci.*, **56**, 1535-1542.
- STEELE W. J., BUSCH H., 1963. Studies on acidic nuclear proteins of the Walker tumor and liver. *Cancer Res.*, **23**, 1153-1163.
- ROSE W. C., 1957. The amino acid requirements of adult Man. *Nutr. Abstr. Rev.*, **27**, 631-647.
- VAUGHN J. C., 1966. The relationship of the « Sphere chromatophile » to the fate of displaced histones following histone transition in Rat spermiogenesis. *J. Cell. Biol.*, **31**, 257-278.
- WANG T. Y., 1967. The isolation, properties, and possible functions of chromatin acidic proteins. *J. Biol. Chem.*, **242**, 1220-1226.
-