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

III. — ÉTUDE CYTOCHIMIQUE DES TRANSFORMATIONS PROTÉIQUES DANS LES VIEILLES SPERMATIDES

M. LOIR

*Station de Recherches sur la Physiologie de la Reproduction,
Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A.,
Nouzilly B. P. 1, 37380 Monnaie*

RÉSUMÉ

Les modifications des DNP des vieilles spermatides du Bélier et spécialement celles de leur contenu en arginine, lysine et cystine et de leur basicité, ont été étudiées à l'aide de techniques cytochimiques semi-quantitatives. Les résultats obtenus ont été confrontés à ceux fournis par l'autoradiographie.

Le contenu des noyaux en lysine (réactions à la ninhydrine-Schiff et au DNFB) diminue progressivement au cours de la phase d'élongation ; simultanément la basicité des histones décroît. Le fait que la teneur en lysine du cytoplasme augmente dans le même temps suggère l'existence d'un transfert de la lysine nucléaire dans le cytoplasme. Le rôle de granules nucléaires protéiques et basiques dans ce processus reste hypothétique. Il en est de même quant à la forme sous laquelle la lysine quitte le noyau et nous ignorons si ce départ correspond à une élimination de protéines nucléaires.

Dans le cytoplasme la lysine est liée à des protéines qui sont soit dispersées soit rassemblées dans des structures granulaires. Celles-ci disparaissent à la fin de la spermiogenèse dans les corps résiduels et contribuent alors à la formation de la sphère chromatophile.

Les noyaux des spermatides allongées, pauvres en lysine, s'enrichissent fortement en arginine — (test de Sakaguchi) et en cystine (réactions au DDD, au ferricyanure ferrique et au tétrazoium alcalin). L'incorporation de ces 2 acides aminés correspond à l'apparition et à l'accumulation de protéines très basiques dont les caractères cytochimiques sont du type histones et qui restent stables dans les spermatozoïdes, au moins pendant la durée du transit épididymaire.

INTRODUCTION

Une étude autoradiographique des modifications affectant les nucléoprotéines des cellules germinales à la fin de la spermatogenèse a confirmé l'existence chez le Bélier (LOIR, 1972 *b*) des phénomènes mis en évidence principalement chez les Rongeurs (LISON, 1955 ; MONESI, 1964 ; VAUGHN, 1966). Elle a permis en outre d'acquérir des données nouvelles notamment quant à l'origine de la lysine et de la cystine des nucléoprotéines du spermatozoïde. Cependant, les observations autoradiographiques fournissant des renseignements de type « différentiel » sur l'évolution quantitative des acides aminés considérés et étant par ailleurs d'interprétation parfois difficile, il est apparu nécessaire de les compléter par des observations cytochimiques, lesquelles fournissent des « bilans » quantitatifs.

Nous rapporterons ici les données obtenues.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé des Béliers de race *Ile-de-France* âgés de 3 à 4 ans au cours de la saison sexuelle. Les castrations ont été effectuées sous anesthésie générale à l'ercylène.

Des fragments testiculaires ont été fixés par les mélanges suivants : Bouin Hollande, 3 jours ; formol neutre à 10 p. 100, 6 ou 12 h ; alcool trichloracétique, 24 h et Clarke, 3 h. Des frottis de spermatozoïdes de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme furent fixés par le formol pendant 2 h. Après inclusion à la paraffine, les coupes ont été réalisées à 4 μ et à 8 μ .

A. — Techniques cytochimiques utilisées

1. Protéines.

- Bleu de Bromophénol (BPB) (MAZIA *et al.*, 1953).
Fixation : Bouin Hollande.

2. Protéines basiques ; variations quantitatives et qualitatives.

- Fast green (FG) à pH 8,1 (ALFERT et GESCHWIND, 1953).
- BPB à pH 8,2 (RINGERTZ et ZETTERBERG, 1966).
- FG-éosine à pH 8,3 (BLOCH, 1966).

Pour ces 3 techniques, fixation par le formol. L'extraction des acides nucléiques a été réalisée soit par l'acide picrique à 60°C soit par l'acide trichloracétique (TCA) à 90°C à 8 p. 100, cette concentration étant moins susceptible que celle à 5 p. 100 d'entraîner une éventuelle perte d'histones riches en lysine (ROSSELET et RUCH, 1968), soit encore par la RNase ou par la DNase (LOIR, 1972 *a*).

Pour la dernière coloration des mesures ont été faites par la méthode du bouchon avec un microspectrophotomètre MPV Leitz à 530 et 650 m μ et le rapport des extinctions a été calculé pour chaque cellule.

3. Protéines basiques ; rapport g. guanidyl/g. ϵ -NH₂.

- FG à pH 8,1 après traitement par l'acide nitreux.
- BPB à pH 8,2 ; *idem*.

4. Groupes NH_2 ; lysine liée aux protéines.

- Réaction à la ninhydrine-Schiff (YASUMA et ICHIKAWA, 1953).
- Réaction au DNFB (BLOCH, 1966).
- Réaction au DNFB-2,4-dichloro α -naphtol (d'après DANIELLI, 1949).

Pour ces 3 techniques, fixation par le Bouin Hollande. Les protéines basiques nucléaires étant liées à l'ADN au niveau de leurs groupes basiques, la possibilité que certains groupes $\varepsilon-NH_2$ ne soient pas révélés par les 3 réactions précédentes a été testée. L'extraction préalable des acides nucléiques a entraîné une légère diminution générale de la coloration, due sans doute à la perte de quelques protéines ou polypeptides. Le couplage des protéines avec l'ADN n'empêche donc pas la détection d'une partie de leurs groupes $\varepsilon-NH_2$. Une observation similaire a été faite pour la coloration par le dansylchlorure (ROSSELET et RUCH, 1968).

5. Groupes guanidyl; arginine liée aux protéines.

- Test de Sakaguchi (NOTENBOOM *et al.*, 1967).
Coupes fixées par le Clarke, le formol et le Bouin Hollande et frottis de spermatozoïdes épидидymaires.

6. Groupes SH.

- Méthode au ferricyanure ferrique (CHEVREMONT et FRÉDÉRIC, 1943). Fixation par le formol.
- Réaction au DDD (BARNETT et SELIGMAN, 1957). Fixations par le Bouin et l'alcool-TCA.

7. Groupes SS + SH.

- Réaction au tétrazolium alcalin (GOMORI, 1956). Fixation par le Bouin et l'alcool-TCA.
- Méthode au ferricyanure ferrique après traitement par le sulfure d'ammonium.
- Réaction au DDD après traitement par le thioglycérol. Elle a été appliquée, en outre des coupes, sur des frottis de spermatozoïdes épидидymaires.

8. Groupes SS.

- Réaction à l'acide performique-Schiff (PEARSE, 1954). Le blocage des groupes SS ne réduit pas la coloration nucléaire des vieilles spermatides. La cystine n'est donc pas à l'origine de la coloration.
- Réaction au DDD après traitement par l'acide iodoacétique puis par le thioglycérol.

B. — Dépouillement semi-quantitatif des colorations

Mis à part la coloration au FG-éosine à pH 8,3, les autres colorations n'ont pas fait l'objet de mesures microspectrophotométriques. Les empreintes, qui constituent les préparations adéquates pour faire valablement de telles mesures, ne permettent pas, contrairement aux coupes, de reconnaître les différents stades de spermatides. Pour cette raison nous avons effectué les différentes colorations essentiellement sur coupes et nous les avons dépouillées de la façon suivante. L'intensité de coloration des noyaux et dans certains cas des cytoplasmes a été estimée, par un seul observateur, selon une échelle subjective allant de 0 à 5, cette estimation étant facilitée par la comparaison simultanée de 2 ou 3 stades différents. Seuls les noyaux des spermatides S ro-Spz (isolés et à plat) ont été considérés; en effet, l'assimilation des variations de l'intensité de coloration à des variations de quantité de colorant fixé par les noyaux entiers n'est possible que pour eux du fait que leurs profil et volume varient peu et qu'ils sont généralement en entier dans l'épaisseur des coupes. Dans certains cas, les estimations ont été répétées à plusieurs mois d'intervalle; la reproductibilité de telles déterminations semi-quantitatives est apparue satisfaisante. Leur validité a été confirmée par les mesures réalisées dans ce laboratoire avec un UMSP Zeiss sur des cellules germinales de Bélier colorées par le FG à pH 8,2 ou par le test de Sakaguchi (ESNAULT, non publié).

Les graphiques ont été établis en fonction des stades des spermatides et des stades du cycle de l'épithélium séminifère (LOIR, 1972 a).

OBSERVATIONS

A. — Granules nucléaires et cytoplasmiques

Après coloration par le bleu de bromophénol acide, le nucléoplasme des spermatides S 8 *b* est homogène. Il en est de même pour les spermatides S 11-spz. Au contraire dans le noyau des spermatides S 9 surtout et S 10, il existe des granules BPB-positifs (pl. I A). La même observation est faite après les colorations des groupes ϵ -NH₂ tandis que de tels granules sont peu visibles après le test de Sakaguchi et très difficilement observables après les réactions au DDD pour les groupes SS et SH.

Le bleu de bromophénol acide met en évidence dans le cytoplasme des spermatides S 11 l'existence de granules intensément colorés dont le nombre augmente rapidement (pl. I B). Dans les spermatides S 13 et S 14 leur taille croît et leur nombre diminue. Au stade VIII ils sont accolés aux sphères chromatophiles (Pl. I C) ; ils ne sont plus visibles à la fin de ce stade. Les 2 réactions des groupes NH₂ colorent ces granules, moins fortement toutefois que ceux des noyaux. Après le test de Sakaguchi les cytoplasmes sont abîmés et il n'est pas possible de préciser l'existence de tels granules (pl. II D).

B. — Observations cytochimiques

1. Coloration au bleu de bromophénol acide.

Après coloration au BPB acide (pl. I A-C), les noyaux des spermatides S 1-S 11 sont moyennement colorés ; à partir des spermatides S 12, la coloration nucléaire croît et devient rapidement intense. L'intensité de coloration cytoplas-

FIG. 1. — Variation de l'intensité de coloration au FG à pH 8,1 en fonction du temps de traitement par le TCA chaud pour les spermatocytes I (○), les spermatides S 11-S 12 (□), les spermatozoïdes testiculaires (●) et les sphères chromatophiles (Δ).

Ordonnée : intensité de coloration

Abscisse : temps de traitement par le TCA en minutes

mique, faible dans les spermatides rondes, croît notablement à partir des spermatides S 8 *b*-S 9 pour être maximum dans les spermatides S 12-S 13 et décroître ensuite. Dans les spermatides S 13-S 14 les corps d'Ebner sont peu visibles ; au stade VIII, les sphères chromatophiles sont bien colorées.

2. Colorations au FG et au BPB alcalins.

Les colorations au FG ou au BPB alcalins permettent les observations suivantes. La qualité de colorant fixé par le noyau diminue dans les spermatides S 11 pour augmenter ensuite, d'abord rapidement (S 12-S 13) puis lentement (S 14-Spz) (fig. 2 ; pl. I D-F), cette dernière phase du phénomène n'étant observable qu'après

FIG. 2. — Variation de la colorabilité par le FG à pH 8,1 après traitement par le TCA chaud, des noyaux des vieilles spermatides

Abscisse : stades des spermatides (chiffres arabes) et stades du cycle de l'ES (chiffres romains)
Ordonnée : intensité de coloration

extraction des acides nucléiques par le TCA, l'ADN des vieilles spermatides allongées étant extrait incomplètement ou pas du tout par l'acide picrique et la DNase. Mis à part les sphères chromatophiles, aucune structure cytoplasmique n'est colorée quel que soit le mode d'extraction utilisé. Après traitement à l'acide picrique ou au TCA, ou à la RNase, les sphères chromatophiles sont d'autant plus colorées qu'elles sont plus grosses ; après DNase, elles sont invisibles. Les colorations sont inexistantes en l'absence de suppression des acides nucléiques.

FIG. 3. — Variation de l'intensité de coloration nucléaire des vieilles spermatides, après le test de Sakaguchi (O) et après désamination et coloration par le FG à pH 8,1 (V). — — — : variation de la densité de marquage nucléaire des vieilles spermatides, 4 heures après injection de ^3H -arginine. . . . : variation du rapport des densités de marquage nucléaire par la ^3H -arginine et la ^3H -lysine (A/L), 4 h après injection (LOIR, 1972 b).

Abscisses et ordonnée droite : *idem* fig. 2

Lorsque les colorations au FG ou au BPB alcalins sont précédées par une désamination, les noyaux des spermatides S 12-Spz. sont seuls colorés (fig. 3). Tout comme les noyaux des autres cellules germinales et des cellules somatiques, les sphères chromatophiles ne sont pas visibles.

3. Coloration par le mélange FG-éosine à pH 8,3.

Les mesures effectuées après coloration par le mélange FG-éosine à pH 8,3 montrent que l'éosinophilie des histones après être passée par une valeur minimum dans les spermatides rondes présente un pic dans les spermatides S 9-S 10 et est à nouveau basse à partir des spermatides S 12 (fig. 6). L'éosinophilie de la région

FIG. 4. — Variation des intensités de coloration nucléaire après la réaction au DDD pour les groupes SH (Δ) et pour les groupes SS ($\circ$). — — : variation de la densité de marquage nucléaire 5 h après injection de ^{35}S -cystine (ordonnée gauche) (LOIR, 1972 b).

Abscisses et ordonnée droite : *idem* fig. 2

FIG. 5. — Variation des intensités de coloration nucléaire ($\circ$) et cytoplasmique ($\bullet$) des spermatides et des sphères chromatophiles ($\blacktriangle$) après la réaction au DNFB-2,4 dichloro α -naphtol. — — : variation de la densité de marquage nucléaire (empreintes), 4 h après injection de ^3H -lysine (LOIR, 1972 b).

Abscisse et ordonnée droite : *idem* fig. 2

FIG. 6. — Variation du rapport des extinctions à 530 m μ et à 650 m μ (éosinophilie) après coloration par la technique au FG-éosine à pH 8,3. $\bullet$: noyaux des spermatocytes et des spermatides ; $\blacktriangle$: sphères chromatophiles. 14 données par point en moyenne. Traits verticaux : $\pm$ écart type.

Abscisse : stades cellulaires.

Ordonnée : valeur du rapport des extinctions à 530 et 650 m μ .

antérieure des noyaux S 11 et S 12 diminue plus rapidement que celle de la région postérieure ; la limite entre les deux zones est nette et recule progressivement vers l'arrière du noyau. Au stade VIII, l'éosinophilie des sphères chromatophiles est bien supérieure à celle des spermatozoïdes.

4. Réactions à la ninhydrine-Schiff et au DNFB.

Les données fournies par les réactions à la ninhydrine-Schiff et au DNFB sont identiques. La quantité de colorant fixé par les noyaux est élevée dans les spermatozoïdes S 10 (fig. 5 ; pl. II A) ; elle diminue rapidement ensuite mais ce phénomène n'affecte pas le noyau de façon homogène. En effet, tandis que l'intensité de coloration de la partie antérieure diminue dans les spermatozoïdes S 11 puis varie peu ensuite, celle de la partie postérieure change peu mais c'est l'importance de cette zone qui diminue, sa limite antérieure progressant vers l'arrière du noyau qu'elle atteint dans les vieilles spermatozoïdes S 12. Dans les spermatozoïdes S 13-Spz la coloration des noyaux reste basse (fig. 5 ; pl. II B). Les variations notées avec le BPB acide concernant les cytoplasmes, les corps d'Ebner et les sphères chromatophiles, se retrouvent avec les deux réactions, les sphères chromatophiles étant alors intensément colorées. Dans le cas de la réaction au DNFB, la coloration n'est pas sensiblement modifiée par le blocage des groupes —SH. Par contre, elle est fortement atténuée par une désamination de quelques heures et totalement supprimée après 48 h.

5. Test de Sakaguchi.

Après le test de Sakaguchi, l'intensité de coloration nucléaire des spermatozoïdes S 1-11 est faible (fig. 3 ; pl. II C). Dans les spermatozoïdes S 12 et les jeunes spermatozoïdes S 13, la quantité de colorant fixé par les noyaux augmente rapidement (fig. 3 ; pl. II D). Il semble qu'elle varie peu ensuite tant dans les spermatozoïdes que dans les spermatozoïdes épидидymaires. Les corps d'Ebner et surtout les sphères chromatophiles sont bien colorées, toutefois l'intensité de coloration de ces dernières reste légèrement inférieure à celle des spermatozoïdes S 15-Spz.

6. Réaction au DDD.

La spécificité de la réaction au DDD pour les groupes —SH a été confirmée par le fait que le traitement par l'acide iodoacétique ou la suppression de l'incubation avec le DDD empêchent totalement l'apparition de la coloration. Lorsque la réaction est effectuée après le traitement réducteur, l'intensité de coloration nucléaire (SH + SS), moyenne dans les spermatozoïdes S 1 à S 11 augmente dans les spermatozoïdes S 12 et S 13. En l'absence de réduction préalable, l'intensité de coloration (SH) ne varie pas de façon détectable au cours de la spermiogénèse. Après mise en évidence des groupes —SS— seuls, l'intensité de coloration, très basse dans les spermatozoïdes S 1 à S 11 (fig. 4 ; pl. II E), croît rapidement dans les spermatozoïdes S 12 et S 13 puis ne varie plus de façon détectable ensuite (fig. 4 ; pl. II F) ; elle est alors légèrement supérieure à celle due aux groupes —SH. Après la mise en évidence de l'un ou l'autre des groupes soufrés, l'intensité de coloration cytoplasmique des spermatozoïdes S 10-S 13 croît légèrement ; celle des corps d'Ebner augmente avec leur taille et les sphères chromatophiles sont bien colorées. Il ne

semble pas qu'il y ait de différences sensibles entre la tête, le corps et la queue de l'épididyme quant au contenu nucléaire des spermatozoïdes en groupes SH + SS.

7. *Test de CHEVREMENT et FRÉDÉRIC et réaction au tétrazolium alcalin.*

Lorsque les groupes —SH, présents ou résultant de la réduction des groupes —SS—, sont bloqués avant l'une ou l'autre des deux réactions des « fonctions réductrices », les colorations n'apparaissent pas ; ceci établit la spécificité de ces réactions pour les groupes —SH dans les cellules considérées. Les résultats sont similaires avec les deux réactions bien que plus nets avec le test de CHEVREMENT et FRÉDÉRIC. Avec cette réaction, en l'absence de traitement réducteur la coloration des spermatides et des spermatozoïdes est très faible ; les sphères chromatophiles sont légèrement colorées. Après réduction, la coloration générale est augmentée ; l'intensité de coloration nucléaire devient élevée dans les spermatides S 12-S 13 et le reste ensuite ; la coloration des sphères chromatophiles est également accrue.

DISCUSSION

A. — *Coloration des protéines basiques*

Certaines observations ont conduit à envisager que le temps de 15 minutes classiquement utilisé pour le traitement par le TCA avant les colorations au FG ou au BPB alcalins n'est pas optimum pour tous les types cellulaires. Pour cette raison, nous avons fait agir le TCA chaud pendant des temps variant de 3 à 28 minutes ; simultanément, la disparition des acides nucléiques a été suivie sur lames couplées colorées 1 h par le bleu de toluidine à pH 4,1. Il est apparu que, si le temps pour lequel la quantité de FG fixée par les noyaux est maximum, se situe pour les spermatocytes I et les spermatides rondes entre 14 et 21 minutes, il se situe entre 7 et 14 minutes pour les jeunes spermatides allongées et au-delà de 28 minutes pour les spermatozoïdes testiculaires (fig. 1). Ces observations sont confirmées par une étude quantitative réalisée dans ce laboratoire avec un UMSP Zeiss (ESNAULT, non publié). Les noyaux des spermatocytes I n'étant plus colorés par le bleu de toluidine après 14 minutes de traitement par le TCA tandis que ceux des spermatozoïdes testiculaires le sont encore après 22 minutes, il est vraisemblable que ces différences correspondent à des différences de sensibilité de l'ADN au TCA chaud. Cette observation est en accord avec celle de BRACHET *et al.* (1968) selon laquelle il existe dans l'ADN des spermatozoïdes une composante acido-résistante. Ces résultats nous ont conduit à considérer pour l'établissement des courbes de variation de la colorabilité au FG alcalin, non les valeurs obtenues pour un temps unique de traitement par le TCA, mais, pour chaque type cellulaire, la valeur maximum parmi celles fournies par les différents temps utilisés.

Des observations réalisées sur plusieurs systèmes modèles ont permis à BLOCH (1966) de proposer que l'éosinophilie observée après coloration par le FG-éosine à pH 8,3 serait due à une « histone riche en lysine ». Le mécanisme de la réaction n'est pas connu ; ceci invite donc à être très réservé quant à l'interprétation des observations permises par cette technique. Néanmoins, nous devons noter que celles faites chez le Bélier vont généralement dans le sens de l'hypothèse de BLOCH. Ainsi, dans

les spermatocytes et les spermatides l'éosinophilie augmente lors des phases présumées de synthèse d'histones somatiques (LOIR, 1972 *b*). Les sphères chromatophiles riches en lysine ont une éosinophilie élevée. Enfin, dans les spermatides S 11-S 12 son évolution est parallèle à celle de la quantité de lysine dans le noyau.

B. — Arginine et cystine nucléaires des vieilles spermatides

Le test de Sakaguchi confirme l'existence chez le Bélier d'une forte augmentation du contenu nucléaire des vieilles spermatides en arginine. La considération des observations rapportées ici et de la variation du taux d'incorporation de la ^3H -arginine (LOIR, 1972 *b*) indique une absence de turnover des protéines dans lesquelles l'arginine est incorporée. La constance de la quantité d'arginine nucléaire dans les spermatides allongées et les spermatozoïdes épидидymaires a déjà été établie chez le Taureau (GLEDHILL *et al.*, 1966).

Dans les spermatides S 12-S 15 la basicité des histones devient élevée ; ceci pourrait indiquer une augmentation de leur quantité mais reflète plutôt une modification de leur composition. En effet, le rapport nombre de groupes guanidyl/nombre de groupes $\epsilon\text{-NH}_2$ de ces histones devient grand. Ceci suggère que l'arginine est incorporée essentiellement dans les histones des vieilles spermatides.

Les résultats obtenus avec les réactions des groupes soufrés montrent que leur quantité totale augmente dans les noyaux après la phase d'allongement et que cette variation est due uniquement à un enrichissement des DNPs en groupes SS, c'est-à-dire en cystine. La quantité de cet acide aminé qui était inférieure à celle de cystéine dans les noyaux des spermatides rondes lui est supérieure ou tout au moins égale dans les spermatozoïdes testiculaires. La confrontation, d'une part de l'évolution du contenu nucléaire en groupes SS et de l'autre de la variation de l'incorporation de la ^{35}S -cystine (LOIR, 1972 *b*) indique, comme pour l'arginine, que les protéines dans lesquelles la cystine est incorporée sont quantitativement stables. Chez certains mammifères, selon CALVIN et BEDFORD (1971), elles subiraient au cours de la maturation épидидymaire un remaniement par oxydation progressive des groupes SH en liaisons SS. Chez le Bélier, nous n'avons pas étudié l'évolution de ces groupes dans les spermatozoïdes épидидymaires mais seulement celle de la totalité des groupes soufrés, laquelle ne varie pas. Il est vraisemblable que le remaniement structural mis en évidence par CALVIN et BEDFORD, entre autres chez le Taureau, existe aussi chez le Bélier.

Les comportements en fin de spermiogenèse, tant autoradiographiques que cytochimiques de la cystine et de l'arginine permettent de supposer que les deux acides aminés sont incorporés dans les mêmes protéines c'est-à-dire dans les « nouvelles histones ». Parmi les histones somatiques, c'est précisément celle riche en arginine qui contient des groupements soufrés (ORD et STOCKEN, 1966).

C. — Devenir de la Lysine nucléaire des spermatides

1. Réduction du contenu nucléaire en lysine.

Le contenu du noyau en lysine liée à des protéines diminue dans les spermatides S 11-S 12 bien que le taux d'incorporation nucléaire de la ^3H -lysine passe par une valeur maximum dans ces mêmes spermatides. Ce fait met en évidence l'existence

d'un processus quantitativement important de réduction du contenu nucléaire de cet acide aminé, sinon des protéines le contenant, simultanément à une synthèse de protéines l'incorporant. Dans les spermatides S 8 b-S 12, la basicité relative du cytoplasme augmente et il apparaît qu'il s'enrichit particulièrement en lysine liée à des protéines. La confrontation de cette observation avec la précédente, suggère l'existence d'un transfert de la lysine, du noyau au cytoplasme, ce phénomène commençant dans les spermatides S 8 b et ayant une importance maximum approximativement dans les spermatides S 11.

La colorabilité des noyaux des spermatides S 9-S 11 par le FG ou le BPB alcalins diminue. Ce changement peut être dû soit à une réduction de la quantité des histones soit à une diminution de leur basicité par réduction de leur contenu en un ou plusieurs des trois acides aminés basiques, soit encore aux deux mécanismes. Dans le cas présent rien ne permet d'opter pour l'une des hypothèses. Chez le Rat, VAUGHN (1966) a considéré que les histones somatiques étaient totalement transférées au cytoplasme à l'apparition des nouvelles histones. Chez ce Rongeur comme chez le Bélier, le seul fait établi est l'appauvrissement des DNPs en lysine. Le fait que cet acide aminé soit retrouvé ultérieurement dans le cytoplasme lié à des protéines basiques ne préjuge ni des mécanismes accompagnant son départ du noyau, ni de la forme sous laquelle il est éliminé, ni des protéines nucléaires dont il tire origine, celles-ci pouvant être, outre des histones, certaines protéines non histones.

Les colorations des groupes NH_2 mettent en évidence que, dans les spermatides S 11 et S 12 au moins, le phénomène de réduction de la lysine nucléaire ne concerne pas le noyau de façon homogène. L'appauvrissement en lysine intéresse d'abord la partie antérieure du noyau puis s'étend progressivement à la partie postérieure. La réduction de l'éosinophilie procède de façon identique. Ces observations peuvent être rapprochées de l'évolution structurale des noyaux (LOIR, 1970) : la condensation de la chromatine procède de l'avant vers l'arrière. Si la perte de lysine par la DNP correspondait au moins pour une part à des histones riches en lysine, la spermiogenèse constituerait une exception au fait que ce sont les histones riches en lysine qui sont responsables de l'état condensé de la chromatine (LITTAU *et al.*, 1965 ; MIRSKY *et al.*, 1968).

2. Devenir cytoplasmique de la lysine.

Chez le Rat (VAUGHN, 1966) une partie de la lysine quittant le noyau serait associée à des granules d'abord nucléaires puis cytoplasmiques. Chez le Bélier, la signification des granules nucléaires, basiques, riches en lysine, observés dans les spermatides S 9-S 10 reste hypothétique : ils n'existent que pendant une partie de la phase d'élimination de la lysine. Ils sont disparus lorsque commencent à apparaître les granules cytoplasmiques, eux aussi basiques et riches en lysine ; ce fait établit que les granules cytoplasmiques ne peuvent être les granules nucléaires passés tels quels dans le cytoplasme ; elle n'exclut pas cependant que les constituants des uns puissent être à l'origine des autres.

Les granules cytoplasmiques pourraient résulter de l'agrégation de protéines cytoplasmiques contenant la lysine d'origine nucléaire. Cette hypothèse est soutenue par le fait que dans les spermatides S 13-S 14 leur teneur en lysine augmente tandis que celle du cytoplasme diminue ; ceci suggère qu'il existe une concentration des protéines riches en lysine au niveau de ces granules. Un tel phénomène concernerait également les corps d'Ebner puis les sphères chromatophiles dont la colorabilité au

DNFB et à la ninhydrine-Schiff augmente progressivement. Il est improbable que cette augmentation soit due aux protéines basiques des ribosomes (BUTTLER, COHN et SIMSON, 1960) qui s'accumulent dans ces corps, VAUGHN ayant établi chez le Rat (1966) que la lysine et l'ARN de ces structures ont une origine différente.

A la fin de la spermiogenèse, les granules cytoplasmiques disparaissent à proximité des sphères chromatophiles dont la richesse en protéines somatiques similaires cytochimiquement aux histones somatiques et en lysine devient élevée ; il est vraisemblable que, comme chez le Rat leurs constituants participent à l'élaboration de ces structures.

Le transit de la lysine du noyau aux sphères chromatophiles s'effectuerait donc sous deux formes : des protéines dispersées, présentes dans le cytoplasme dès le début de la phase d'élimination et des structures organisées apparaissant au cours de la seconde partie de cette phase.

La signification de l'association, dans les sphères chromatophiles, des ribosomes des spermatides à des protéines basiques dont la lysine est d'origine nucléaire reste hypothétique mais l'éventualité d'une relation avec la coordination locale du déroulement de la spermatogenèse mérite d'être envisagée.

Reçu pour publication en octobre 1971.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre gratitude au Professeur M. GABE et au Docteur B. L. GLEDHILL pour la lecture critique qu'ils ont faite de ce manuscrit.

SUMMARY

RIBONUCLEIC ACID AND PROTEIN METABOLISM IN RAM SPERMATOCYTES AND SPERMATIDS.

III. — CYTOCHEMICAL STUDY OF PROTEIN TRANSFORMATION IN OLD SPERMATIDS

DNP modification of late spermatids in the ram, and especially that of spermatid arginine, lysine and cystine content and basicity, are studied using semi-quantitative cytochemical techniques. The results are compared with those obtained by autoradiography.

Nucleus lysine content (ninhydrine-Schiff and DNFB reactions) progressively decreases during the elongation phase ; histone basicity simultaneously decreases. The fact that cytoplasmic lysine content increases in the same time suggests that there is a nuclear lysine transfer in the cytoplasm. The role of protein nuclear granules in this process remains hypothetical. The same is true of the form in which lysine leaves the nucleus, and we do not know if this corresponds to nuclear protein elimination.

Lysine in the cytoplasm is bound to proteins which are either dispersed or gathered in granular structures. These disappear at the end of spermiogenesis in the residual bodies and contribute to forming the chromatophilic spheres.

The lysine-poor nuclei of elongate spermatids become rich in arginine (Sakaguchi's test) and in cystine (D.D.D, ferric ferricyanide and alkaline tetrazolium reactions). Incorporation of these 2 amino acids corresponds to the appearance and accumulation of very basic proteins having cytochemical characters of a histone type which remain stable in the spermatozoa, at least during epididymal transit.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALFERT M., GESCHWIND I. I., 1953. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **39**, 991-999.
- BARNETT R. J., SELIGMAN A. M., 1952. Histochemical demonstration of protein bound sulphhydryl groups. *Science*, **116**, 323-327.
- BLOCH D. P., 1966. Histone differentiation and nuclear activity. *Chromosoma*, **19**, 317-339.
- BUTLER J. A. V., COHN P., SIMSON P., 1960. The presence of basic proteins in microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 386-388.
- CALVIN H. I., BEDFORD J. M., 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fert.*, **13** (suppl.), 65-76.
- CHEVREMONT M., FRÉDÉRIC J., 1943. Une nouvelle méthode histochimique de mise en évidence des substances à fonction sulfhydryle. *Arch. Biol. (Liège)*, **54**, 589-605.
- DANIELLI J. F., 1949. Studies on the cytochemistry of proteins. *Symposia Quantitative Biol.*, **14**, 32-39.
- GLEDHILL B. L., GLEDHILL M. P., RIGLER R., RINGERTZ N. R., 1966. Changes in deoxyribonucleo-protein during spermiogenesis in the Bull. *Expl. Cell. Res.*, **41**, 652-665.
- GOMORI G., 1956. Histochemical methods for protein-bound sulphhydryl and disulphide groups. *Quart. J. Micro. Sci.*, **97**, 1-9.
- LISON L., 1955. Variation de la basophilie pendant la maturation du spermatozoïde chez le Rat et sa signification histochimique. *Acta histochem.*, **2**, 47-67.
- LITTAU V. C., BURDICK C. J., ALLFREY V. G., MIRSKY A. E., 1965. The role of histones in the maintenance of chromatin structure. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **54**, 1204-1212.
- LOIR M., 1970. *Introduction à l'étude des métabolismes de l'acide ribonucléique et des protéines dans les spermatoocytes et les spermatides du Béliér (Ovis aries)*. Thèse 3^e cycle. Fac. Sci., Caen, n° 74.
- LOIR M., 1972 a. Métabolisme de l'acide ribonucléique et des protéines dans les spermatoocytes et les spermatides du Béliér (*Ovis aries*). I. Incorporation et devenir de la ³H-uridine. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 203-219.
- LOIR M., 1972 b. Métabolisme de l'acide ribonucléique et des protéines dans les spermatoocytes et les spermatides du Béliér (*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.*, **12**, 411-429.
- MAZIA D., BREWER P. A., ALFERT M., 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol. Bull.*, **104**, 57-67.
- MIRSKY A. E., BURDICK C. J., DAVIDSON E. H., LITTAU V. C., 1968. The role of lysine-rich histone in the maintenance of chromatin structure in metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **61**, 592-597.
- 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.
- NOTEMBOOM C. D., VAN DE VEERDONK F. C. G., VAN DE KAMER J. C., 1967. A fluorescent modification of the Sakaguchi reaction on arginine. *Histochemie*, **9**, 117-121.
- ORD M. G., STOCKEN L. A., 1966. Metabolic properties of histones from Rat liver and thymus gland. *Biochem. J.*, **98**, 888-897.
- PEARSE A. G. E., 1954. *Histochemistry theoretical and applied*. London, J. and A. Churchill Ltd.
- RINGERTZ N. R., ZETTERBERG A., 1966. Cytochemical demonstration of histones and protamines : Mechanism and specificity of the alkaline bromphenol blue binding reaction. *Expl. Cell. Res.*, **42**, 243-259.
- ROSSELET A., RUCH F., 1968. Cytofluorometric determination of lysine with Dansylchlorid. *J. Histochem. Cytochem.*, **16**, 459-466.
- 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.
- YASUMA A., ICHIKAWA T., 1953. Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining. A new histochemical staining method for protein. *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, 296-299.

ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LES FIGURES
ET DANS LES PLANCHES

C II, C 2 : spermatocytes II
 E : corps d'Ebner
 L : stade leptotène
 LS : spermatides allongées
 MS : spermatides s'allongeant
 P, P 1, P 2 : stade pachytène
 PL : stade préleptotène
 S : spermatozoïdes testiculaires
 SC : sphères chromatophiles
 S 1 à S 15 : stades des spermatides
 Z : stade zygotène

PLANCHE I

A-C : Coloration par le bleu de Bromophénol à pH 4 ; fixation par le Bouin Hollande, coupes ; $\times 1\,000$. *A* : stade II du cycle de l'ES. *B* : stade IV. *C* : stade VIII. Dans les spermatides S 9 le cytoplasme est homogène et le noyau contient quelques granules BPB positifs (flèches). Au contraire dans les spermatides S 12 de fins granules sont visibles dans le cytoplasme (flèches) et le noyau en est dépourvu. En fin de spermiogénèse, les granules cytoplasmiques, moins nombreux mais plus gros, sont rassemblés près des sphères chromatophiles.

D-F : Coloration par le FG à pH 8,1 ; fixation par le formol ; coupes ; $\times 1\,000$. *D* : stade II du cycle de l'ES. *E* : stade III. *F* : stade VIII. La colorabilité des noyaux passe par un maximum dans les vieilles spermatides S 12 du stade III ; elle est élevée dans les spermatozoïdes testiculaires. Les sphères chromatophiles du stade VIII sont fortement colorées.

PLANCHE II

A-B : Réaction au DNFB-2.4 Dichloro α naphtol ; fixation par le Bouin Hollande ; coupes ; x 1.000. A : stade II du cycle de l'E. S. B : stade VIII. Au stade III les noyaux des spermatides sont très colorés ; au stade VIII ceux des spermatozoïdes testiculaires le sont très peu, mais les sphères chromatophiles le sont beaucoup.

C-D : Test de Sakaguchi ; fixation par le Clarke, coupes ; x 1.000. C : stade III du cycle de l'E. S. D : stade VIII. La coloration des noyaux des spermatides S13 est supérieure à celle des noyaux des spermatides S11.

E-F : Réaction au DDD après traitements par l'acide iodoacétique et le thioglycérol (SS) ; coupes ; x 1.000. E : stade II du cycle de l'E. S. F : stade VIII. Les noyaux des spermatides sont très peu colorés au stade S10 et le sont beaucoup au stade S15.

G : Réaction au DDD (SH) ; coupes ; x 1.000. Stade VII du cycle de l'E. S.