ÉVOLUTION DES STRUCTURES NUCLÉAIRES AU COURS DE LA SPERMIOGÉNÈSE : ORIGINE ET ÉVOLUTION DES CORPS INTRANUCLÉAIRES CHEZ LE CRIQUET *LOCUSTA MIGRATORIA*

M. GUSSE et Ph. CHEVAILLIER

*Laboratoire de Biologie cellulaire, E. R. A. n° 400,
Université Paris - Val de Marne,
94000 Créteil*

RÉSUMÉ

Pendant les premiers stades de la spermiogénèse du Criquet, 3 types de corps intranucléaires sont étudiés du point de vue de leur structure fine et de leurs propriétés cytochimiques. Ces inclusions intranucléaires sont formées de protéines, essentiellement des protéines non-histones, associées à des ARN (corps intranucléaires de type 2 et 3) ; elles représentent sous la forme d'amas denses granulaires ou fibrillaires des formes de ségrégation puis d'élimination de constituants d'origine nucléolaire ou nucléoplasmique (grains interchromatiniens). Les inclusions de type 1 correspondent à des régions où la chromatine ne présente pas le même degré de condensation que le reste du noyau. Tous ces corps intranucléaires disparaissent pendant la seconde moitié de la spermiogénèse.

INTRODUCTION

Les différentes étapes de la spermiogénèse se traduisent par des modifications de la structure et de la composition chimique du noyau, en particulier au niveau de la chromatine. Au terme de cette évolution, dans le spermatozoïde, le contenu nucléaire n'est plus représenté que par des désoxyribonucléoprotéines qui adoptent des orientations spatiales souvent caractéristiques des espèces étudiées. Le noyau a perdu alors ses protéines non-histones, ses ribonucléoprotéines et ses enzymes.

Chez les Orthoptères, ces transformations se réduisent essentiellement sur le plan chimique à un remplacement des histones somatiques par des protéines plus basiques (BLOCH et BRACK, 1964 ; CLAYPOOL et BLOCH, 1967 ; CHEVAILLIER et GUSSE, sous presse) qui, selon la nomenclature proposée par BLOCH (1969), se rangent dans la catégorie des « histones riches en arginine ». Parallèlement à ces rema-

niements chimiques, la chromatine subit de profonds remaniements dans sa structure fine qui se terminent dans le spermatozoïde mûr par un état homogène, compact, opaque aux électrons, après être passée par des formes fibrillaires, réticulaires et lamellaires (GIBBONS et BRADFIELD, 1957 ; YASUZUMI et ISHIDA, 1957 ; DASS et RIS, 1958 ; KAYE et McMASTER-KAYE, 1966 ; CHEVAILLIER et GUSSE, sous presse).

Au cours de la phase d'homogénéisation de la chromatine, un certain nombre d'inclusions bien différenciées se forment et se maintiennent temporairement dans le nucléoplasme. La présence de ces corps intranucléaires localisés entre les fibres chromatinienues avait déjà été remarquée chez les Orthoptères dans les spermatides jeunes de *Gryllus domesticus* par KAYE et McMASTER-KAYE (1966), ainsi que chez *Acrida lata* par YASUZUMI et coll. (1970) et YASUZUMI (1974). Ces corps intranucléaires ont été généralement interprétés comme des formes d'élimination de matériel nucléaire (RNP, protéines en particulier) sans que leur structure et leur composition chimique n'aient été clairement élucidées. Ils sont peut-être à rapprocher des corps nucléaires que de nombreux auteurs ont décrit dans les noyaux interphasiques de tissus somatiques variés normaux ou pathologiques (HAY et REVEL, 1963 ; SWIFT, 1962 ; SIMAR, 1969 ; ALTMANN et PFEIFER, 1969 ; BOQUIST, 1964 ; POPOFF et STEWART, 1968) et pour lesquels BOUTEILLE, KALIFAT et DELARUE ont établi une classification (1967).

Le but de ce travail était de préciser la composition chimique, la structure et la signification fonctionnelle des corps intranucléaires qui apparaissent transitoirement dans les jeunes spermatides du Criquet *Locusta migratoria*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'évolution nucléaire au cours de la spermiogenèse a été étudiée sur les testicules du Criquet *Locusta migratoria* élevé dans notre laboratoire.

Deux types d'études parallèles ont été entrepris, d'une part, en cytochimie photonique, d'autre part, en cytochimie ultrastructurale.

Les études cytochimiques en microscopie photonique ont été réalisées sur des coupes semi-fines de 1 micron d'épaisseur. Le matériel fixé par le formol à 10 p. 100 dans le tampon de Sørensen 0,1M à pH 7,2 a été inclus dans un mélange epon-araldite. Les protéines totales ont été détectées par la coloration au jaune de naphthol S dans les conditions préconisées par TAS et coll. (1974). La mise en évidence des protéines basiques a été réalisée par la technique de BLOCH et HEW après hydrolyse de l'ADN par l'acide picrique en solution aqueuse saturée. Différentes techniques de détection des acides aminés ont pu être utilisées avec succès, en particulier la méthode de LISON et PINHEIRO pour le tryptophane et celle de BARNETT et SELIGMAN (1952) pour la mise en évidence de la cystéine et de la cystine. La détection des acides nucléiques a été réalisée par la méthode d'Einarson à la galloxyanine sur des testicules fixés au formol et inclus dans le glycol-méthacrylate. L'hydrolyse des acides nucléiques avant la coloration a été effectuée par incubation des coupes soit dans la ribonucléase en solution à 0,1 p. 100 dans le tampon de Sørensen 0,1M à pH 6,8, soit dans la désoxyribonucléase en solution à 0,1 p. 100 dans le même tampon à pH 7,2.

Pour les études cytochimiques au niveau ultrastructural, 3 techniques ont été essentiellement utilisées au cours de ce travail. Il s'agit de la coloration préférentielle des ribonucléoprotéines (méthode de BERNHARD, 1969), de la méthode de MENTRÉ (1972) pour la mise en évidence des acides nucléiques et, enfin, de la méthode de MOYNE pour la mise en évidence de l'ADN (1972). Cette étude de la composition chimique des corps intranucléaires a été complétée par différentes extractions enzymatiques sur coupes ultrafines.

En vue d'extractions ultérieures par les protéases, les lobes testiculaires, fixés par le tétroxyde d'osmium en solution à 1 p. 100 dans le tampon de Sørensen 0,1M à pH 7,2, sont inclus dans un mélange epon-araldite. Les coupes sont traitées par l'eau oxygénée à 5 p. 100 dans

l'eau bidistillée puis incubées soit dans la pronase en solution à 0,1 p. 100 dans le tampon de Sørensen 0,1M à pH 7,4, soit dans la pepsine à 0,5 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 0,05N.

En vue d'extractions ultérieures par les nucléases, les testicules, fixés par le formol, sont inclus dans le glycol-méthacrylate. Les acides nucléiques sont alors hydrolysés sur coupes ultra-fines soit par la ribonucléase en solution à 0,1 p. 100 dans le tampon de Sørensen 0,1M à pH 6,8, soit par la désoxyribonucléase en solution à 0,1 p. 100 dans le même tampon à pH 7,0 additionné de 0,01M de $MgSO_4$.

Dans tous les cas, les coupes ont été contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb et observées au microscope électronique Philips EM-300.

RÉSULTATS

1. — *Étude structurale*

Durant les premiers stades de la spermiogenèse du Criquet (stades I, II, III, cf. CHEVAILLIER et GUSSE, sous presse), on assiste à une homogénéisation progressive de la chromatine. Cependant, pendant cette même période, il persiste dans le noyau un certain nombre d'organites nettement individualisés qui sont les corps intranucléaires. Trois types principaux ont pu être reconnus sur la base de leur structure qui est propre à chacun d'eux.

Le type 1, de contours irréguliers, caractéristique des stades II et III de la spermiogenèse, est constitué par un enchevêtrement lâche de fibres dont le diamètre varie entre 50 et 70 Å (fig. 2). A faible grandissement, ce type de formation apparaît comme moins opaque aux électrons que la chromatine.

Le type 2 est constitué par des associations de granules, de 250 Å de diamètre (fig. 1 et 2) regroupés en amas généralement ovoïdes à contours plus ou moins nettement définis.

Le type 3, très compact, d'aspect homogène à faible grandissement, est formé en fait d'une trame fibrillaire noyée dans une matrice peu dense aux électrons. Les fibres qui le composent ont un diamètre de 30 à 40 Å.

Si la présence de ces divers corps intranucléaires est constante pendant les premières étapes de la spermiogenèse, il s'agit cependant de structures qui évoluent de manière progressive et leur importance relative dans les noyaux peut varier. Les corps intranucléaires de type 1, nettement individualisés au cours du stade I, se pulvérisent ensuite en éléments de plus en plus petits au fur et à mesure de l'organisation de la chromatine. Parallèlement, leur structure évolue pour se résoudre en masses compactes, de 300 à 500 Å de diamètre, très opaques aux électrons, et dans lesquelles aucune organisation n'est décelable. Ces structures disparaissent lorsque la spermatide est en voie d'élongation et que la chromatine s'oriente suivant le grand axe du noyau (stade IV). Les corps intranucléaires de type 2, visibles dès le stade I, sous forme de granules denses, épars dans le nucléoplasme, se réunissent ensuite en amas volumineux, très souvent associés aux corps intranucléaires de type 3 (fig. 1). Les espaces intergranulaires diminuent progressivement ; l'ensemble prend alors une forme sphérique à contours nettement définis (fig. 2) dont le diamètre diminue peu à peu. Les inclusions de type 1 sont bien visibles dès le stade d'homogénéisation de la chromatine (stade II) et persistent jusqu'à la fin du stade III où elles finissent par disparaître.

2. --- Étude cytochimique des corps intranucléaires

Si la microscopie photonique ne permet pas de préciser les types de corps intranucléaires mis en évidence, les techniques cytochimiques utilisées permettent cependant de préciser la nature chimique des corps intranucléaires persistant dans le noyau des spermatides. Dans les spermatides de stades II et III, quand les amas d'hétérochromatine ont disparu par décondensation, l'identification des corps intranucléaires est plus facile. Les résultats cytochimiques obtenus en microscopie photonique montrent que les corps intranucléaires, appartenant selon toute vraisemblance aux types 2 et 3, sont riches en ARN et en protéines. Celles-ci contiennent du tryptophane, de la cystéine et de la cystine. Il s'agit donc très probablement de protéines non-histones. Les différentes techniques cytochimiques mises en œuvre à l'échelle ultra-structurale et les extractions enzymatiques nous ont permis de définir plus précisément la composition chimique de chaque type de corps intranucléaires. Les corps intranucléaires 2 et 3 conservent leur opacité aux électrons lorsque les préparations sont traitées par la méthode de BERNHARD. On les met également en évidence par la méthode de MENTRÉ, mais ils ne fixent pas le thallium utilisé selon la technique de MOYNE. Suivant leurs dimensions et peut-être également selon le type auquel ils appartiennent, ils sont extraits plus ou moins complètement par les protéases, aussi bien par la pepsine que par la pronase. Après ces extractions, il peut subsister une trame plus ou moins lâche qui laisse supposer une teneur variable en protéines ; en particulier, les inclusions de type 3, après leur pulvérisation, sont extrêmement sensibles à l'action des protéases. La désoxyribonucléase est sans action sur les corps intranucléaires 2 et 3 ; la ribonucléase, par contre, extrait facilement les inclusions de type 3, beaucoup plus difficilement les granules du type 2, très compacts et peu accessibles à l'action enzymatique. Les inclusions de type 1 ribonucléase-résistantes ne sont pas extraites par les enzymes protéolytiques. Elles sont par contre très sensibles à l'action de la désoxyribonucléase.

CONCLUSION ET DISCUSSION

L'ensemble des techniques utilisées dans ce travail nous a permis de préciser la structure et la composition chimique des 3 types de corps intranucléaires visibles dans les jeunes spermatides de Criquet.

Les corps intranucléaires de type 1, de structure finement fibrillaire contiennent de l'ADN et des protéines associées, l'ARN en étant absent. Leur trame fibrillaire est en relation directe avec les fibres chromatiniennes. Ces images peuvent être interprétées comme des fibres de chromatine n'ayant pas atteint le même stade de condensation que le reste de la chromatine, ceci pouvant être dû à une différence de nature des protéines combinées à l'ADN qu'elles contiennent.

Les corps intranucléaires de type 2, de structure granulaire, sont riches en ARN et en protéines. Par leurs dimensions (diamètre moyen : 250 Å), par leurs caractères

cytochimiques, par leur résistance aux extractions par la ribonucléase, ils peuvent être assimilés aux granules interchromatiniens présents dans les noyaux interphasiques (SWIFT, 1959 ; RIS, 1962 ; BERNHARD et GRANBOULAN, 1963). Ces granules dispersés dans le nucléoplasme pendant le stade I de la spermiogenèse se regroupent en amas importants au stade II ; ils sont alors très souvent associés aux corps intranucléaires de type III. Par la suite, au moment où les fibres chromatinienues commencent à s'orienter, les espaces intergranulaires diminuent ; les amas de ces granules s'organisent en sphères. Ces inclusions disparaissent ensuite rapidement au fur et à mesure de l'élongation nucléaire. Elles disparaissent à la fin du stade III, sans que leur mode d'élimination ait pu être précisé.

Les corps intranucléaires de type 3, de structure très compacte, visibles au stade I de la spermiogenèse, sont représentés par des masses de 1 à 2 μ en moyenne, constituées d'un réseau fibrillaire dense, noyé dans une matrice amorphe. Ils sont constitués d'ARN et de protéines. Ils correspondent aux constituants nucléolaires fibrillaires qui, au cours de l'évolution ultérieure du noyau, se pulvérisent en éléments de taille moindre, plus riches en protéines. Parallèlement, la structure fibrillaire disparaît ; les granules, de taille inférieure au micron, sont opaques aux électrons, sans que l'on puisse y définir une organisation précise ; ils sont alors beaucoup plus sensibles à l'action des protéases.

Dans chacun des cas, aucun processus précis d'élimination à partir du noyau n'a pu être décelé ; la diminution progressive de la taille des corps intranucléaires et les remaniements structuraux qu'ils subissent font penser à une élimination par solubilisation des constituants plus qu'à un passage transmembranaire sous forme figurée.

La comparaison des corps intranucléaires de la spermatide de Criquet avec des structures homologues déjà décrites s'est révélée difficile. Certes, de nombreux auteurs ont décrit, dans des noyaux interphasiques de tissus somatiques normaux ou pathologiques, différents types d'inclusions intranucléaires. Les granules de type 2 observés sur notre matériel peuvent être apparentés aux granules interchromatiniens décrits notamment par SWIFT (1959), RIS (1962), BERNHARD et GRANBOULAN (1963). Les corps de type 3 sont à rapprocher des formations de type « spotted nucleoli » observés par KOEHLER (1962) ou MONTGOMERY (1964) après irradiation de cellules par des rayons X. Dans les noyaux de tissus germinaux, peu d'observations analogues ont été publiées. KAYE et McMASTER-KAYE (1966) ont montré chez le Grillon la présence de corps intranucléaires très voisins des inclusions de types 2 et 3 mais sans en préciser la structure ni la signification fonctionnelle. Ils suggèrent toutefois un enrichissement en protéines non-histones et en ARN de ces structures parallèlement à un appauvrissement du nucléoplasme en ces mêmes constituants. Chez *Acrida*, YASUZUMI et coll. (1970) décrivent la présence d'éléments granulaires composés d'ADN et d'ARN en leur attribuant un rôle dans la polymérisation des nucléoprotéines. Chez le Criquet migrateur, l'ADN n'a pu être détecté à l'intérieur des corps intranucléaires de types 2 et 3 et leur rôle éventuel dans l'organisation des fibres de chromatine peut être difficilement retenu.

En conclusion, l'apparition des corps intranucléaires décrits au cours de la spermiogenèse du Criquet et formés de protéines et de RNP est en relation étroite avec l'arrêt des synthèses d'ARN nucléaires. Elle est le prélude à la simplification

de la composition chimique du noyau de la spermatide qui, au terme de son évolution, dans le spermatozoïde, ne contient plus que des fibres de désoxyribonucléoprotéines.

*Colloque D. G. R. S. T., Biologie de la Procréation,
Paris, 7-8 mars 1975.*

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une aide à la recherche de la D. G. R. S. T. (contrat n° 71-7-3244) et du C. N. R. S. (E. R. A. n° 400). Nous remercions M. le Professeur GALLE de nous avoir permis l'accès au microscope électronique Philips 300. Ce travail a été effectué avec la collaboration technique de M^{me} M. L. OGER.

SUMMARY

EVOLUTION OF NUCLEAR STRUCTURES DURING SPERMIOGENESIS : ORIGIN AND EVOLUTION OF INTRANUCLEAR INCLUSIONS OF THE LOCUST. *LOCUSTA MIGRATORIA*

During the first stages of the spermiogenesis of the Locust, 3 different types of intranuclear inclusions were studied for their fine structure and cytochemical properties. These intranuclear inclusions are constituted of proteins the nonhistone proteins being predominantly present ; these proteins are associated with RNA (intranuclear inclusions 2 and 3). They can be interpreted as segregation forms of nucleolar and nucleoplasmic components (interchromatinic granules) which occur in clusters of dense granules or fibrils. Type 1 inclusions are nuclear regions where fibrils of chromatin are not so tightly packed as in the remainder of the nucleus. All these intranuclear bodies disappear during the second half of spermiogenesis.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALTMANN H. W., PFEIFER U., 1969. Beitrag zur Kenntnis der Karyosphäridien (« nuclear-bodies »). Fetthaltige Sphäridien nach partieller hepatektomie. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, **2**, 220-228.
- BARNETT R. J., SELIGMAN A. M., 1952. Histochemical demonstration of protein bound sulphydryl groups. *Science*, **116**, 323-327.
- BERNHARD W., 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.*, **27**, 250-265.
- BERNHARD W., GRANBOULAN N., 1963. The fine structure of the cancer cell nucleus. *Exptl. Cell. Res.*, suppl., **9**, 19-53.
- BLOCH D. P., 1969. A catalog of sperm histones. *Genetics*, **61**, 93-112.
- BLOCH D. P., BRACK S. D., 1964. Evidence for the cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermiogenesis in the grasshopper *Chortophaga viridifasciata*. *J. Cell Biol.*, **22**, 327-340.
- BOQUIST L., 1969. Intranuclear rods in pancreatic islet β -cells. *J. Cell Biol.*, **43**, 377-381.
- BOUTEILLE M., KALIFAT S. R., DELARUE J., 1967. Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases. *J. Ultrastruct. Res.*, **19**, 474-486.
- CHEVAILLIER Ph., GUSSE M., 1975. Évolution de la composition chimique et de la structure fine de la chromatine au cours de la spermiogénèse du Criquet *Locusta migratoria*. *J. Micr. Biol. Cell.*, **23**, 153-164.
- 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.
- DASS C. M. S., RIS H., 1958. Submicroscopic organization of the nucleus during spermiogenesis in the grasshopper. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 129-132.

- GIBBONS I. R., BRADFIELD J. R. G., 1957. The fine structure of nuclei during sperm maturation in the locust. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 133-140.
- HAY E. D., REVEL J. P., 1963. The fine structure of the DNP component of the nucleus. An electron microscope study utilizing autoradiography to localize DNA synthesis. *J. Cell Biol.*, **16**, 29-51.
- KAYE J. S., McMASTER-KAYE R., 1966. The fine structure and chemical composition of nuclei during spermiogenesis in the house cricket. I. Initial stages of differentiation and the loss of nonhistone protein. *J. Cell Biol.*, **31**, 159-179.
- KOEHLER J. K., 1962. Electron microscope observations of radiation induced Hela giant cells. *Proto-plasma*, **54**, 493-503.
- LISON L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales*. Gauthier-Villars, édit., Paris, 842 p.
- MENTRE P., 1972. Coloration sur coupes ultra-fines des acides nucléiques et de certains polysaccharides par le thallium en solution alcoolique. *J. Micr.*, **14**, 251-270.
- MONTGOMERY P. O. B., KARNEY D., REYNOLDS R. C., McCLENDON D. E., 1964. Cellular and subcellular effects of ionizing radiations. *Am. J. Pathol.*, **44**, 727-746.
- MOYNE G., 1972. Une méthode cytochimique de mise en évidence de l'ADN à l'usage de la microscopie électronique. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, D., **274**, 247-250.
- POPOFF N., STEWART S., 1968. The fine structure of nuclear inclusions in the brain of experimental golden hamsters. *J. Ultrastruct. Res.*, **23**, 347-361.
- SIMAR L. J., 1969. Ultrastructure et constitution des corps nucléaires dans les plasmocytes. *Z. Zellforsch.*, **99**, 235-251.
- SWIFT H., 1959. Studies on nuclear fine structure. *Brookhaven Symp. Biol.*, 12 BNL (C 22), 134-151.
- SWIFT H., 1962. Nucleoprotein localization in electron micrographs : metal bonding and radioautography. In *Interpretation of ultrastructure*, *Symp. intern. Soc. Cell Biol.*, (R. J. C. HARRIS, édit.), **1**, 213-232. Academic Press, New York.
- TAS J., OUD P., JAMES, J., 1974. The naphtol yellow S stain for proteins tested in a model system of polyacrylamide film and evaluated for practical use in histochemistry. *Histochemistry*, **40**, 231-240.
- YASUZUMI G., 1974. Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. *Internat. Rev. Cytol.*, **37**, 53-119.
- YASUZUMI G., ISHIDA H., 1957. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. II. Submicroscopic structure of developing spermatid nuclei of grasshopper. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 663-668.
- YASUZUMI G., SUGIOKA T., TSUBO I., MATANO Y., 1970. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XIX. Peculiar granular body clusters in early spermatid nuclei of grasshopper. *Z. Zellforsch. Mikr. Anat.*, **109**, 450-464.

PLANCHE I

FIG. 1 et 2

Structure des corps intranucléaires de types 1, 2 et 3. Fixation par le glutaraldéhyde à 2 p. 100. Noter (fig. 1) le début d'organisation des corps intranucléaires de type 2 formés par des amas de granules interchromatiniens.

FIG. 1 : $\times 110\ 000$; FIG. 2 : $\times 80\ 000$

ch : chromatine

gic : granules interchromatiniens

1-3 : corps intranucléaires

PLANCHE II

FIG. 3 et 4

Technique de Bernhard. Les corps intranucléaires de type 2 et 3 conservent leur opacité aux électrons ; $\times 12.000$. ch : chromatine ; gic : granulès interchromatiniens.

FIG. 5 et 6

Extractions par la pronase en solution à 0.1 % dans le tampon de Sørensen 0.1 M pH 7,4 pendant 30 minutes. Noter l'extraction partielle du matériel constitutif du type 3 alors que les inclusions de type 1 sont peu modifiées. Fixation par le tétroxyde d'osmium et traitement préalable des coupes par l'eau oxygénée à 5 % pendant 30 minutes ; $\times 12.000$.

FIG. 7 et 8

Extractions par la pepsine en solution à 0,5 % dans l'HCl 0,05 N ; fixation et prétraitement identiques à ceux indiqués précédemment (fig. 5 et 6). Les résultats obtenus sont également similaires $\times 12.000$.

PLANCHE III

FIG. 9 et 10

Technique de Mentré : mise en évidence des acides nucléiques ARN et ADN. Noter la positivité de la réaction au niveau des corps intranucléaires de type 2 et 3 ; $\times 33.000$. ch : chromatine.

FIG. 11 et 12

Technique de Moyne : mise en évidence de l'ADN. La réaction est négative pour les corps intranucléaires de type 3, faiblement positive pour le type 1. Noter les relations entre le réseau fibrillaire de l'inclusion et les fibres de chromatine ; $\times 33.000$.

PLANCHE IV

FIG. 13 à 17

Matériel fixé par le formol en solution aqueuse à 10 % dans le tampon de Sørensen 0,1 M à pH 7,2 ; inclusion dans le glycol-méthacrylate. Fig. 13 : coupe témoin traitée par le tampon de Sørensen 0,1 M à pH 6,8 pendant 2 heures.

FIG. 14 et 15

Extraction par la ribonucléase pendant 2 heures. L'extraction est importante au niveau des inclusions de type 3, moins marquée au niveau des inclusions de type 2 ; $\times 12.000$.

FIG. 16 et 17

Extraction par la désoxyribonucléase. Les corps intranucléaires 2 et 3 ne sont pas extraits ; $\times 12.000$.