Activité de l'anhydrase carbonique dans l'épididyme de rat au cours du développement

H. MEMBRE, R. HATIER, G. GRIGNON

Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté de Médecine,
Vandoeuvre-les-Nancy, Cédex, France
B.P. 184, 54505.

Summary. *Carbonic anhydrase activity in the growing rat epididymis.*

The enzyme, carbonic anhydrase (CA), has been studied by an histochemical procedure during the postnatal development of the rat epididymis. Its activity first appeared at Day 14 in the early differentiating cells, *i.e.* the narrow cells, and only in them. These cells, found in the initial segment and the head of the adult epididymis, showed considerable activity. At Day 35 they disappeared in the other segments (corpus and tail), while the light cells which became apparent immediately showed more discrete CA activity.

No carbonic anhydrase activity was found in the seminiferous epithelium, the testicular interstitial tissue or the rete testis.

Introduction.

L'activité de l'anhydrase carbonique (A.C., E.C. 4.2.1.1.) a été mise en évidence chez le rat, dans de nombreux organes impliqués dans des processus de sécrétion et de transfert des électrolytes : rein (Muther, 1971), pancréas (Churg et Richter, 1972), estomac (Salganick *et al.*, 1972 ; Narumi et Maki, 1973), muqueuse intestinale (Suzuki, 1980), foie (Lönnerholm, 1980), poumon (Sugai *et al.*, 1981), plexus choroïdes (Masuzawa *et al.*, 1981), et épididyme (Cohen *et al.*, 1976) ; Goyal *et al.*, (1980) l'ont également signalée au niveau de l'épididyme du taureau.

Le pH du fluide testiculaire, basique dans le rete testis, devient acide dans la tête de l'épididyme du rat (Levine et Marsh, 1971 ; Levine et Kelly, 1978). Le mécanisme de cette acidification est mal connu et les types cellulaires épididymaires possédant une activité anhydrase carbonique importante ne sont pas rigoureusement identifiés. De plus, à notre connaissance, il n'existe actuellement aucune donnée sur l'apparition de l'activité anhydrase carbonique au cours du développement.

Matériel et méthodes.

Des rats de souche Wistar, à différents stades postnatals (10, 12, 14, 20, 30, 40 et 60 jours) sont anesthésiés au nembutal en solution à 30 mg/kg par voie intrapéritonéale. La fixation est réalisée au niveau de l'aorte abdominale par perfusion d'une solution de glutaraldéhyde 3 % et de saccharose 8 % tamponnée à pH 7,2 par une solution de cacodylate 0,17 M, précédée de celle de sérum physiologique hépariné.

Les différentes régions de l'épididyme selon Reid et Cleland (1957), sont immergées pendant 1 à 2 heures dans le même fixateur. Après rinçage dans le tampon additionné de saccharose, les tissus sont coupés à 14 μ au cryostat à - 20 °C. Les coupes récupérées sur filtre Millipore (HA, diamètre des pores 0,45 μ) sont mises à flotter sur le milieu d'incubation décrit par Hansson (1967) modifié par Rosen (1970), à température ambiante pendant des temps variables. Les coupes sont ensuite rincées dans le tampon contenant du saccharose, déshydratées et montées au Permount.

Des coupes témoins sont incubées dans un milieu contenant de l'acétazolamide (inhibiteur spécifique de l'activité de l'enzyme) 10 μ M.

Résultats.

1) *Morphologie.* — Sun et Flickinger (1979) ont décrit classiquement au niveau de l'épithélium épididymaire plusieurs types cellulaires :

- les cellules principales, prismatiques, plus hautes dans la tête de l'épididyme que dans la queue, à stéréocils au pôle apical ;
- les cellules basales, situées dans la profondeur de l'épithélium ;
- les cellules claires, à vacuoles apicales claires et à inclusions lipidiques basales ;
- les cellules étroites, rétrécies dans leur tiers moyen, plus denses que les cellules principales ;
- les cellules en « halo », considérées comme des lymphocytes.

2) *Localisation histochimique chez l'adulte.* — Après 2 à 4 min d'incubation sur le milieu de Hansson la réaction apparaît seulement au niveau des cellules

FIG. 1. — *Epididyme de rat jusqu'au 12^e jour postnatal.* Dans n'importe quel segment, les noyaux exhibent cette discrète coloration. $\times$ 600.

FIG. 2. — *Jonction corps-queue de l'épididyme de rat adulte.* 4 min d'incubation. Les cellules claires montrent une activité A.C. principalement au niveau de leurs parois. $\times$ 320.

FIG. 3. — *Tête de l'épididyme de rat adulte.* 4 min d'incubation. Les cellules étroites de l'épithélium présentent un net précipité de sulfure de cobalt ainsi que quelques cellules myoépithéliales et les globules rouges des capillaires voisins. $\times$ 600.

FIG. 4. — *Epididyme de rat entre le 14^e et le 35^e jour postnatal.* L'activité A.C. apparaît dans tous les segments. Toutes les cellules colorées affectent l'aspect des cellules étroites. $\times$ 320.

FIG. 5. — *Epididyme de rat adulte.* Les cellules étroites, conservant l'activité A.C., subsistent dans le segment initial en haut et la tête en bas. $\times$ 130.

étroites dont on sait qu'elles sont exclusivement localisées dans le segment initial et la tête de l'épididyme et au niveau des cellules claires qui, elles, n'existent que dans le corps et la queue. L'intensité de la coloration est comparable à celle des hématies des capillaires voisins.

Dans tous les segments de l'épididyme, les autres catégories de cellules épithéliales (cellules principales, cellules en halo et cellules basales), les spermatozoïdes et le stroma conjonctif ne sont pas colorés. Les cellules musculaires possèdent parfois au niveau de la tête une discrète réaction positive. L'ensemble des constituants du testicule voisin : épithélium séminifère, tissu interstitiel, rete testis, ne présentent aucune coloration.

3) *Test d'inhibition.* — Toutes les réactions histochimiques de l'A.C. sont testées par inhibition par l'acétazolamide, inhibiteur spécifique de l'A.C. Son addition à la concentration de 10 μ M empêche l'apparition de la réaction positive normalement observée après 2 à 4 min d'incubation. Cependant, si l'incubation est prolongée 20 ou 30 min, les coupes témoins montrent une coloration au niveau des noyaux et des stéréocils. A 60 min d'incubation, cette coloration s'intensifie, et envahit tout l'épithélium. Le précipité diffuse alors hors de son site de production. Il s'agit donc d'une coloration non catalytique, et seule la coloration observée après 2 à 4 min d'incubation dans le milieu de Hansson représente la réaction catalytique de mise en évidence de l'A.C.

4) *Activité anhydrase carbonique au cours du développement.* — Jusqu'à 12 jours postnataux, tous les noyaux de l'épithélium épididymaire présentent un précipité discret de sulfure de cobalt (fig. 1). Au 14^e jour, l'activité A.C. apparaît dans toutes les régions de l'épididyme (segment initial, tête, corps et queue) au niveau du cytoplasme des cellules étroites (fig. 4). Son intensité est d'emblée semblable à celle observée sur des coupes d'épididyme adulte.

Cette localisation subsiste dans tous les segments jusqu'aux environs du 35^e jour. A 40 et à 60 jours, la réaction positive persiste dans les cellules étroites du segment initial et de la tête. Au niveau du corps et de la queue, il n'y a plus de cellules étroites à ces stades ; une réaction positive, mais d'intensité moindre, est observée au niveau de la région baso-latérale des cellules claires. A cette époque l'épithélium épididymaire a acquis sa structure adulte caractéristique ; en effet l'activité enzymatique de l'A.C. est limitée aux cellules étroites du segment initial et de la tête et aux cellules claires du corps et de la queue, les autres types cellulaires ne montrant aucune coloration.

Discussion.

Cette étude confirme et précise la localisation de l'activité A.C. dans l'épididyme du rat décrit par Cohen *et al.* (1976). Toutefois, à la différence de cet auteur, nous avons utilisé un temps d'incubation très court (2 à 4 min), ce qui permet d'éviter l'apparition de la réaction non catalytique et donc la coloration des noyaux et des stéréocils obtenue par Cohen. Ceci est confirmé par l'utilisation de l'acétazolamide qui inhibe l'activité enzymatique mise en évidence dans les temps

courts d'incubation, mais qui n'inhibe pas l'apparition des colorations plus tardives. Il semble donc bien que la coloration intense observée par Cohen au niveau des stéréocils et des cellules myoépithéliales du corps et de la queue soit le résultat d'une réaction non catalytique obtenue après des temps d'incubation trop longs (30 min).

On sait que le fluide testiculaire va être acidifié au niveau de l'épididyme. Chez le rat, Levine et Marsh (1971) observent une diminution du pH de 7,3 à 6,5 entre la lumière du tube séminifère et la tête de l'épididyme. Cette acidification paraît liée à la présence d'une activité anhydrase carbonique de l'épithélium épидидymaire et accessoirement à la sécrétion d'acide lactique (Scott *et al.*, 1963 ; Wales *et al.* 1966) et de glycérophosphorylcholine (Mann, 1964). Les cellules étroites du segment initial et de la tête de l'épididyme qui possèdent une importante activité A.C. sont vraisemblablement impliquées dans le mécanisme d'abaissement rapide du pH. Par ailleurs, les caractères morphologiques de ces cellules sont peu compatibles avec une fonction de réabsorption à leur niveau.

De la tête à la queue de l'épididyme le pH varie peu (de 6,5 à 6,8). L'activité A.C. est localisée le long des membranes basolatérales des cellules claires. Cette situation pourrait être liée ici à une fonction de réabsorption d'eau, de gaz carbonique et de certains ions. En effet, Suzuki (1980) et Masuzawa *et al.* (1981) rapportent l'activation par l'anhydrase carbonique de deux enzymes impliquées dans les processus de transport actif transmembranaires : le Mg^{2+} - HCO_3^- -ATPase et le Mg^{2+} - Na^+ - K^+ -ATPase. Ces transports éviteraient ainsi l'accumulation de CO_2 et d'ions dans la lumière épидидymaire où sont stockés les spermatozoïdes.

L'étude du développement montre que les cellules étroites qui se différencient au 14^e jour après la naissance possèdent d'emblée une activité anhydrase carbonique. L'apparition de cette activité est donc beaucoup plus précoce chez le Rat que chez le Taureau où elle apparaît tardivement au cours de la 50^e semaine après la naissance (Goyal *et al.*, 1980), alors que la spermatogenèse est bien établie et que, par ailleurs, la différenciation des cellules de l'épithélium épидидymaire est faite, ce qui n'est pas le cas chez le Rat.

Les cellules étroites et les cellules claires sont d'emblée dotées d'activité anhydrase carbonique ce qui constitue pour elles un caractère histochimique commun. Cette constatation ne peut manquer d'évoquer l'hypothèse de Sun et Flickinger (1979) pour qui les cellules claires proviendraient de la transformation des cellules étroites.

Enfin, il convient de noter que la différenciation des cellules étroites et donc l'apparition de l'A.C. sont indépendantes de l'arrivée du fluide séminal et des spermatozoïdes dans la lumière épидидymaire qui apparaissent plus tardivement et en tout état de cause après le 20^e jour post-natal. Cette remarque est à mettre en relation avec les observations de Delongéas *et al.* qui montrent que les cellules étroites au moins sont capables de se différencier *in vitro* et chez l'animal castré.

Reçu en août 1984.

Accepté en juin 1985.

Références

- CHURG A., RICHTER W. R., 1972. Histochemical distribution of carbonic anhydrase after ligation of the pancreatic duct. *Am. J. Pathol.*, **68**, 23-30.
- COHEN J. P., HOFFER A. P., ROSEN S., 1976. Carbonic anhydrase localization in the epididymis and testis of the rat : histochemical and biochemical analysis. *Biol. Reprod.*, **14**, 339-346.
- DELONGEAS J. L., GELLY J. L., 1985. Epididymal differentiation in organ culture and in castrated rat. *Exp. Cell Biol.* (sous presse).
- GOYAL H. O., FERGUSON J. G., HRUDKA F., 1980. Histochemical activity of carbonic anhydrase in testicular and excurrent ducts of immature, mature intact and androgen-deprived bulls. *Biol. Reprod.*, **22**, 991-997.
- HANSSON H. P. J., 1967. Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. *Histochemie*, **11**, 112-128.
- LEVINE N., MARSH D. J., 1971. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J. Physiol.*, **213**, 557-570.
- LEVINE N., KELLY H., 1978. Measurement of pH in the rat epididymis *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.*, **52**, 333-335.
- LÖNNERHOLM G., 1980. Carbonic anhydrase in rat liver and rabbit skeletal muscle ; further evidence for the specificity of the histochemical cobalt-phosphate method of Hansson. *J. Histochem. Cytochem.*, **28**, 427-433.
- MANN T., 1964. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*, 202-208. Methuen, London.
- MASUZAWA T., SHIMABUKURO H., SATO F., SAITO T., 1981. Ultrastructural localization of carbonic anhydrase activity in the rat choroid plexus epithelial cell. *Histochemistry*, **73**, 201-209.
- MUTHER T. F., 1971. A critical evaluation of the histochemical methods for carbonic anhydrase. *J. Histochem. Cytochem.*, **20**, 319-330.
- NARUMI S., MAKI Y., 1973. Possible role of cyclic AMP in gastric acid secretion in rat. Activation of carbonic anhydrase. *Biochim. biophys. Acta*, **311**, 90-97.
- REID B. L., CLELAND K. W., 1957. The structure and function of the epididymis. I. The histology of rat epididymis. *Austr. J. Zool.*, **5**, 223-246.
- ROSEN S., 1970. Localization of carbonic anhydrase activity in transporting urinary epithelia. *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 668-670.
- SALGANIK R. I., ARGUTINSKAYA S. V., BERSIMBAEV R. I., 1972. The stimulating action of gastrin pentapeptide, histamine and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on carbonic anhydrase in rat stomach. *Experientia*, **28**, 1190-1191.
- SCOTT T. W., WALES R. G., WALLACE J. C., WHITE I. G., 1963. Composition of ram epididymal and testicular fluid and the biosynthesis of glyceryl-phosphoryl-choline by the rabbit epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, **6**, 49-59.
- SUGAI N., NINOMIYA Y., OOSAKI T., 1981. Localization of carbonic anhydrase in the rat lung. *Histochemistry*, **72**, 415-424.
- SUN E. L., FLICKINGER C. J., 1979. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am. J. Anat.*, **154**, 27-56.
- SUZUKI S., 1980. Carbonic anhydrase, Mg^{2+} - HCO_3^- -ATPase and Mg^{2+} - Na^+ - K^+ -ATPase in rat intestinale mucosa : effects of adrenalectomy and aldosterone administration. *J. Steroid Biochem.*, **14**, 449-456.
- WALES R. G., WALLACE J. C., WHITE I. G., 1966. Composition of bull epididymal and testicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, **12**, 139-144.
-