

MARQUAGE DES SPERMATOZOÏDES DE VERRAT AVEC DU PHOSPHORE RADIOACTIF, ^{32}P *IN VIVO*

G. SINGH

*Station de Recherches de Physiologie animale,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise).*

SOMMAIRE

Deux Verrats Large White ayant reçu 20 mc de $^{32}\text{PO}_4\text{HNa}_2$ par voie intraveineuse ont été collectés 2 fois par semaine, pendant 3 mois à l'aide d'un vagin artificiel. La radioactivité spécifique du plasma séminal, du résidu spermatique délipidé, de l'acide désoxyribonucléique a été calculée pour chaque éjaculat. Celle du plasma séminal atteint chez les deux animaux un maximum le 14^e jour après l'injection puis diminue graduellement. Par contre celle de l'acide désoxyribonucléique, nulle jusqu'au 39^e jour après l'injection, devient significative à cette date et passe par un maximum le 46^e jour chez les deux Verrats. Cette date d'apparition des spermatozoïdes à acide désoxyribonucléique radioactif est plus précoce chez le Verrat que chez le Bélier et le Taureau.

Pour de nombreuses études : durée de la spermatogenèse, durée du transit épидidymaire, fécondation, il est important de pouvoir marquer les spermatozoïdes de Mammifères. Plusieurs auteurs ont essayé et réussi à le faire à l'aide de radioisotopes, en particulier chez le Bélier (ORTAVANT, 1954a et b, 1956, 1959; DAWSON, 1958a), chez le Taureau (DAWSON, 1958b; ORGEBIN et al., 1958; KOEFOED-JOHNSON, 1959; ORGEBIN, 1961), chez la Souris (SIRLIN et EDWARDS, 1955, 1958) et chez le lapin (FOOTE et KOEFOED-JOHNSON, 1959). Chez le Verrat, les seuls résultats existant à notre connaissance sont ceux obtenus par HEATH et al., (1935) à l'aide de ^{35}S , administré sous forme de ^{35}S méthionine et de ^{35}S ergothionine. Ces auteurs ont obtenu un marquage du plasma et des spermatozoïdes. Mais le stade spermatogénétique d'incorporation du ^{35}S et la fraction biochimique marquée ne sont pas connus.

Cependant par suite du développement de l'insémination artificielle porcine la connaissance des paramètres spermatogénétiques présente un grand intérêt chez cet animal. Aussi nous a-t-il semblé nécessaire de reprendre le marquage des spermatozoïdes de Verrat en utilisant du ^{32}P puisqu'on sait que cet élément peut s'incorporer non seulement dans le plasma séminal mais aussi dans l'acide désoxyribonucléique des spermatozoïdes (ORTAVANT, 1954a, 1956).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Deux Verrats adultes de race Large White ont reçu par voie intraveineuse 20 mc de phosphore radioactif sous forme $^{32}\text{PO}_4\text{HNa}_2$.

Le sperme a été collecté deux fois par jour à l'aide d'un vagin artificiel pendant 3 mois à partir de la date d'injection. Après l'examen de routine de chaque éjaculat, les différentes fractions phosphorées ont été extraites selon une technique modifiée de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945) et SCHNEIDER (1946) et standardisée dans ce laboratoire, comme suit :

Deux parties aliquotes d'un même éjaculat, contenant chacune environ 1.109 spermatozoïdes sont centrifugées à froid pendant 20 minutes à 600 tours/minute. Après récupération du plasma séminal, les culots sont lavés 3 fois à l'aide d'une solution glacée de Krebs-Henseleit-Ringer. Puis ils sont homogénéisés à 0°C , avec une solution à 10 p. 100 d'acide trichloracétique dans un Potter-Elvehjem. Après centrifugation le surnageant de chacun contenant le phosphore acidosoluble est séparé et le culot lavé deux fois avec de l'acide trichloracétique à 10 p. 100, puis avec une solution glacée d'éthanol-acétate, (MARKO et BUTLER 1950), enfin avec de l'eau distillée froide.

Les phospholipides sont alors extraits par un mélange de chloroforme-méthanol (2 : 1) pendant une heure à température du laboratoire. Après centrifugation, le culot est lavé deux fois avec le mélange chloroforme-méthanol, enfin avec de l'éther.

Le résidu délipidé sec est hydrolysé avec NaOH, N à 37°C pendant 20 heures. Après avoir centrifugé l'hydrolysate une partie aliquote du surnageant est traitée avec 0,2 vol. HCL, 6N et 1,0 vol. ATC 5 p. 100, pendant 30 minutes à froid afin de précipiter la fraction contenant l'acide désoxyribonucléique. Celui-ci est ensuite extrait à l'aide d'une solution d'acide trichloracétique à 5 p. 100 pendant 15 minutes à 95°C .

L'activité spécifique a été calculée après mesure de la radioactivité et détermination des teneurs en phosphore (ALLEN, 1940) du plasma séminal et de l'acide désoxyribonucléique. En ce qui concerne le résidu délipidé, l'activité a été rapportée à un milligramme de substance.

RÉSULTATS

Dès la première collecte de sperme qui a eu lieu le 4^e jour après l'injection, une certaine activité apparaît dans le plasma séminal (0,9 coups/mn/ μgP) ; puis elle décroît régulièrement pour devenir très faible vers le 60^e jour (fig. 1).

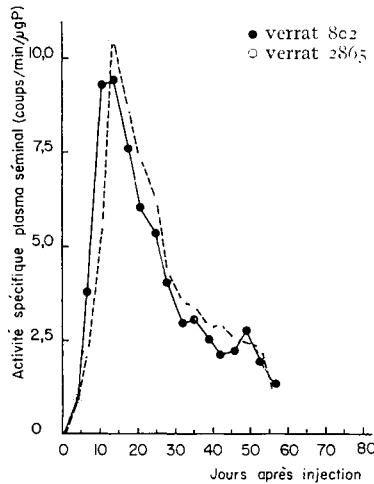


FIG. 1. — Radioactivité spécifique du plasma séminal.

La radioactivité spécifique du résidu spermatique délipidé commence à être significative vers le 11^e jour après l'injection et atteint un premier maximum vers le 18^e jour : 7,3 et 6,2 coups/mn/ μgP . Mais il faut attendre le 30^e jour après l'injection

pour assister, à une augmentation importante et brutale de l'activité de ce résidu qui atteint un deuxième maximum le 46^e jour : 78,2 et 76,7 coups/mn/ μ gP. Puis cette activité diminue graduellement tout en restant importante, même 91 jours après l'injection : 34,4 et 22,8 coups/mn/ μ gP.

Cette brusque augmentation de la radioactivité du résidu spermatique délipidé le 39^e jour après l'injection est due à l'apparition de spermatozoïdes à acide désoxyribonucléique marqué puisque l'activité spécifique de cette fraction phosphorée, nulle jusqu'à cette date, devient alors significative : 0,7 et 1,9 coups/mn/ μ gP, pour atteindre un maximum précisément le 46^e jour après l'injection : 8,9 et 10,0 coups/mn/ μ gP (fig. 2). Elle diminue ensuite graduellement sans s'annuler même 91 jours après l'injection : 1,3 et 1,1 coups/mn/ μ gP.

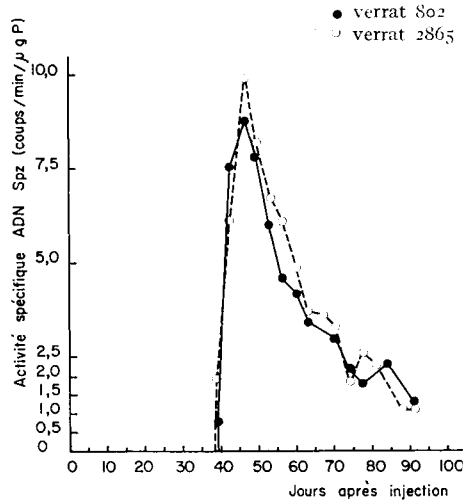


FIG. 2. — Radioactivité spécifique de l'acide désoxyribo-nucléique (ADN).

Si la radioactivité du plasma séminal subit une évolution comparable à celle observée chez le Bélier et chez le Taureau, animaux chez lesquels, dans des conditions de collectes comparables, le maximum de radioactivité spécifique apparaît vers le 13-14^e jour après l'injection (ORTAVANT, 1955 ; DAWSON, 1958a ; ORGEBIN, 1961), les spermatozoïdes à acide désoxyribonucléique marqué apparaissent beaucoup plus précocement, chez le Verrat, 39 jours après l'injection de ^{32}P alors que chez le Bélier cela se produit le 42-45^e jour (ORTAVANT, 1955 ; DAWSON, 1958a) et chez le Taureau le 49-52^e jour (DAWSON, 1958a ; KOEFOED-JOHNSON, 1959 ; ORGEBIN, 1961). Cette date d'apparition plus précoce chez le Verrat peut provenir soit d'une durée de spermatogenèse plus courte, soit d'une vitesse de transit épидidymaire plus rapide.

Reçu en octobre 1961.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie R. ORTAVANT, Directeur de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, pour lui avoir suggéré ce travail et l'avoir guidé tout au long de sa réalisation.

Ce travail a pu être effectué grâce à deux bourses du gouvernement français.

SUMMARY

THE LABELLING OF BOAR SPERMATOZOEA WITH RADIOACTIVE PHOSPHORUS, « IN VIVO ».

- 1) Semen was collected twice a week from two Boars after the injection of the radioactive phosphate. The first collection was made on the 4th day and the last one 91 days after the injection.
- 2) The different fractions of the phosphorus containing components were obtained and the activities of seminal plasma, phospho-proteins + ribonucleic acid, desoxyribonucleic acid and residue sperm were determined.
- 3) The phosphorus estimation of different fractions studied were obtained spectrometrically and their specific activities estimated.
- 4) Results of the investigation revealed that :
 - a) the specific activity of the total phosphorus containing components in the seminal plasma appeared a few days after the injection while it reached the maximum in 14 days ;
 - b) the phosphorus, containing compounds in the phospho-proteins + ribonucleic acid showed the first appearance of activity on the 11th day after the injection which increased slowly up to 25 days there after the curves showed frequent rise and fall of the activity in both Boars ;
 - c) the activity of the total phosphorus in the desoxyribonucleic acid appeared at first on the 39th day after the injection which increased slowly up to 46 days when it reached the maximum ; thereafter it decreased slowly in both Boars ;
 - d) the total phosphorus in the residue sperm showed the activity in the first ejaculate obtained on the 4th day after the injection which remained low until the activity appeared in the desoxyribonucleic acid when it began to rise from the 39th day upto 46th day after the injection ; thereafter a slow fall was noted.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLEN R. J. L., 1940. The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, **34**, 858-865.
- DAWSON R. M. C., 1958a. The labelling of Ram semen *in vivo* with radioactive phosphate and (Carboxy-¹⁴C) stearic acid. *Biochem J.*, **68**, 512-518.
- DAWSON R. M. C., 1958b. The labelling of Bull semen with phosphorus 32 *in vivo*. *Nature*, **181**, 1014-1015.
- FOOTE R. H., KOEFOED-JOHNSON H. H., 1959. The use of adenine-8-c¹⁴ for studying spermatogenesis in the Rabbit. *J. Anim. Sci.*, **18**, 1953, (Abstr.).
- HEATH H., RIMINGTON C., GLOVERT T., MANN T., LEONE E., 1953. Studies using radioactive sulphur on ergothioneine formation in the Pig. *Biochem. J.*, **54**, 606-611.
- KOEFOED-JOHNSON H. H., 1959. Influence of ejaculation frequency on the time required for sperm formation and epididymal passage in the Bull. *Nature*, **185**, 49-50.
- MARKO A. M., BUTLER G. C., 1950. The isolation of sodium deoxyribonucleate with sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.*, **190**, 165-175.
- ORGBIN M. C., 1961. Étude du transit épидидymaire des spermatozoïdes de Taureau marqués à l'aide du ³²P. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **1**, 117-120.
- ORTAVANT R., 1952. Recherches quantitatives sur la spermatogénèse et les réserves spermatiques du Bêlier 2nd Int. Congr. Physiol. Pathol. Anim. Reprod. Art. Ins. (Copenhagen), 63-69.
- ORTAVANT R., 1954a. Détermination de la vitesse du transfert des spermatozoïdes dans l'épididyme de Bêlier à l'aide de ³²P. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, 866-868.
- ORTAVANT R., 1954b. Étude des générations spermatogoniales chez le Bêlier. *C. R. Soc. Biol.*, **148**, 1958-1960.
- ORTAVANT R., 1955. Étude sur la spermatogénèse des animaux domestiques à l'aide du phosphore 32. *Conférence internationale sur l'utilisation de l'énergie atomique à des fins pacifiques (Genève)*, **12**, 243-245.
- ORTAVANT R., 1956. Action de la durée d'éclaircissement sur les processus spermatogénétiques chez le Bêlier. *C. R. Soc. Biol.*, **150**, 471-474.
- ORTAVANT R., 1959. Le cycle spermatogénétique chez le Bêlier. *Ann. Zootech.*, **8**, 183-244, 271-321.
- SCHMIDT G., THANNHAUSER S. J., 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, ribonucleic acid and phospho-proteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83-89.
- SCHNEIDER W. C., 1946. Phosphorus compounds in animal tissues III. A comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *J. Biol. Chem.*, **164**, 747-751.
- SIRLIN J. L., EDWARDS R. G., 1955. The labelling of Mouse sperm by adenine 8-C¹⁴. *Exp. Cell. Res.*, **9**, 596-599.
- SIRLIN J. L., EDWARDS R. G., 1958. The labelling of mammalian spermatozoa with radioactive tracers. *J. Exp. Zool.*, **137**, 363.