

APPLICATION DE LA TECHNIQUE
DE SÉPARATION DES CELLULES
PAR SÉDIMENTATION A 1 g
A L'ÉTUDE DES PROTÉINES NUCLÉAIRES
DES SPERMATIDES DE BÉLIER

M. LOIR

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

RÉSUMÉ

La synthèse des protéines nucléaires et les modifications des protéines nucléaires basiques au cours de la spermiogenèse ont été étudiées chez le Bélier sur des populations de spermatides séparées par sédimentation à 1 g. Nos résultats établissent :

1. Que la synthèse de la protéine spécifique du spermatozoïde est précédée par celle, dans les spermatides dont le noyau s'allonge, de protéine(s) de type histone, tandis que les spermatides ronds synthétisent essentiellement des protéines non histones.

2. Que les histones « somatiques » quittent la chromatine lorsque les noyaux s'allongent et se condensent. Elles sont remplacées par une protéine unique. Plusieurs protéines nucléaires basiques sont présentes transitoirement dans les noyaux impliqués dans ce processus de remplacement.

Chez les Mammifères, bien que la protéine basique spécifique du spermatozoïde ait été chimiquement caractérisée [3, 14] peu est connu de sa synthèse et des mécanismes impliqués dans le déplacement des histones. Nous avons étudié le métabolisme des protéines nucléaires dans les spermatides de Bélier à l'aide de l'autoradiographie quantitative et de techniques cytochimiques [7, 8]. Cependant, ces techniques ne permettent pas la résolution des phénomènes au niveau des classes de protéines en particulier des fractions histones. Du fait de la diversité des types cellulaires présents dans le testicule, la séparation de populations pures de spermatides est une nécessité préliminaire à l'investigation des changements biochimiques des nucléoprotéines pendant la spermiogenèse.

Nous avons utilisé la méthode de séparation de cellules par sédimentation à 1 g selon MEISTRICH [15] pour étudier l'incorporation de cinq acides aminés dans les protéines nucléaires des spermatides et pour effectuer une analyse électrophorétique des nucléoprotéines basiques de ces cellules.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Animaux

Vingt-sept béliers adultes de race *Ile-de-France* et 19 de race *Préalpes* ont été utilisés tout au long de l'année.

Séparation des spermatides

Les suspensions de cellules testiculaires ont été réalisées par trypsinisation selon la méthode de MEISTRICH [15] modifiée pour éviter les variations thermiques au cours des manipulations. Cette méthode a été décrite précédemment [9]. Des fragments testiculaires étaient incubés à 30°C dans 0,23 p. 100 de trypsine et 20 µg/ml de DNase dans 10 ml de PBS plus 0,1 p. 100 de glucose (PBSG), pendant 18 mn. Après filtration et dilution 3 fois avec de la sérum-albumine bovine (BSA) dans du PBS, la solution enzymatique était ôtée par centrifugation. Un à $3,5 \times 10^8$ cellules étaient resuspendues dans 20 ml de BSA ou de Ficoll 0,2 p. 100 dans du PBS et refroidies à 2°C en 45 mn.

Pour chaque testicule 2 séparations à 1 g étaient réalisées à 2°C selon LAM *et al.* [5] dans des gradients non linéaires soit de BSA (0,5-2-4 p. 100), soit de Ficoll (0,5-1-2,75 p. 100) dans du PBS. Après un temps de sédimentation de 3,5 ou 4 ou 5 h étaient collectées soit des fractions de 11, 5 ml, soit 4 populations définies par les vitesses de sédimentation (SV) reportées dans le tableau 1.

La distribution dans les fractions et les populations des spermatides aux stades de maturation décrits par CLERMONT et LEBLOND [2] et par LOIR [6] était déterminée par comptage au microscope à contraste de phase soit des cellules, soit des noyaux.

Incorporations de thymidine

Des béliers ont été injectés avec de la ^3H -thymidine à des doses de 1 à 2 µCi/g de testicule et castrés entre 20 h et 30 j plus tard. Chaque testicule a été utilisé pour l'autoradiographie et pour 2 séparations. La technique d'autoradiographie quantitative a été décrite par ailleurs [6]. Après séparation, les cellules des fractions étaient collectées sur filtres Whatman GF/A et traitées selon MEISTRICH [15] pour comptage à scintillation liquide [9].

Incorporations d'acides aminés

Des fragments de testicule étaient incubés à 30°C pendant 27 ou 45 mn avec l'un des acides aminés suivants : ^3H -arg., ^3H -lys., ^3H -leu., ^3H -try. : 10 µCi/ml ; ^{35}S -Cys., ^{14}C -Cys. : 1 µCi/ml. Deux incubations étaient faites simultanément dont l'une avec 100 µg/ml de cycloheximide. Après incubation les suspensions de cellules étaient préparées par trypsinisation. Une fraction des cellules était séparée à 1 g tandis que des frottis étaient réalisés avec le reste puis traités pour l'autoradiographie quantitative. Après collecte, les noyaux étaient préparés dans les fractions par le cetrimide [12], comptés et traités pour préparer les protéines nucléaires totales [10] dont la radioactivité était mesurée par comptage à scintillation.

Electrophorèse des protéines basiques des spermatides et des spermatozoïdes

Après séparation dans la BSA, 4 populations étaient collectées. Dans chacune, les noyaux étaient préparés par 0,5 p. 100 de Triton X-100 [9]. Les protéines acido-solubles étaient extraites par SO_4H_2 0,4N.

Par ailleurs, les noyaux de cellules testiculaires isolées par la trypsine et mécaniquement furent préparés et extraits par SO_4H_2 0,4N, directement pour 1 moitié, après extraction des

protéines non histones pour l'autre [11]. Des noyaux de spermatides DNase-résistants furent obtenus à partir de 20 g de testicule après traitement par la RNase et la DNase [6] et extraits par SO_4H_2 0,4N. Certains extraits acides de noyaux testiculaires furent traités par moitié pour l'oxydation des groupes sylfhydryls et par moitié pour la réduction des groupes disulfures selon LOIR et LANNEAU [11].

Des spermatozoïdes éjaculés et de la tête et la queue de l'épididyme ainsi que des noyaux DNase-résistants furent traités par le 2-mercaptoéthanol [14] avant extraction des protéines acido-solubles. Certains lots furent alkylés tandis que d'autres furent oxydés comme décrit ci-dessus.

Les électrophorèses furent réalisées selon PANYIM et CHALKLEY [16]. Les gels furent colorés soit par l'amido black [16], soit par le buffalo black [17]. Les gels colorés par l'amido black furent mesurés à 620 nm sur un microdensitomètre ISCO.

RÉSULTATS

La séparation des cellules testiculaires de Bélier donne 6 bandes caractérisables par leur vitesse de sédimentation. Les 4 moins rapides correspondent quasi exclusivement à des spermatides. Les 2^e et 3^e bandes contiennent en outre des corps résiduels et des lobes cytoplasmiques qui disparaissent lors de la préparation des noyaux. La distribution des diverses spermatides dans les 4 populations récoltées est présentée dans le tableau I. Les résultats obtenus après marquage par la ³H-thymidine confirment et complètent ces distributions.

TABLEAU I

Distribution des spermatides dans les populations I à IV en pourcentage des noyaux (moyenne ± SD). 9 séparations ; gradient BSA ; 3,5 ou 4 h

Populations limites (mm/h)	Stades des spermatides				
	1-8a	8b-9a	9b-11	12	13-S
I 4,8-3,5	90 ± 3,6	5 ± 1,5			
II 3,5-2,35	49 ± 10,5	30 ± 10	9 ± 1	5 ± 1	4 ± 1
III 2,35-1,2	2 ± 0,5	19 ± 7	25 ± 5	33 ± 4	18 ± 5,5
IV 1,2-0,45			2 ± 0,5	14 ± 5	83 ± 6

Dans nos conditions de marquage, l'incorporation de ¹⁴C-leucine croît linéairement pendant 2,5 h. Par ailleurs, après marquage *in vivo*, les incorporations par les cellules germinales sont similaires à celles obtenues après incubation. Ceci permet de considérer les données obtenues par marquage *in vitro* comme représentatives du métabolisme des spermatides *in situ*. Les variations d'incorporation des 5 acides aminés dans les nucléoprotéines des spermatides sont présentées figure 1. Les

variations observées entre 4,8 et 0,45 mm/h sont similaires à celles observées par autoradiographie compte tenu de la distribution des spermatoïdes dans les fractions. Il y a cependant une atténuation des variations entre 1,2 et 3,5 mm/h où sédimentent la plupart des spermatoïdes 8b-12a, ceci étant dû à la distribution étalée des spermatoïdes 12b-13. La cycloheximide inhibe l'incorporation des 5 acides aminés.

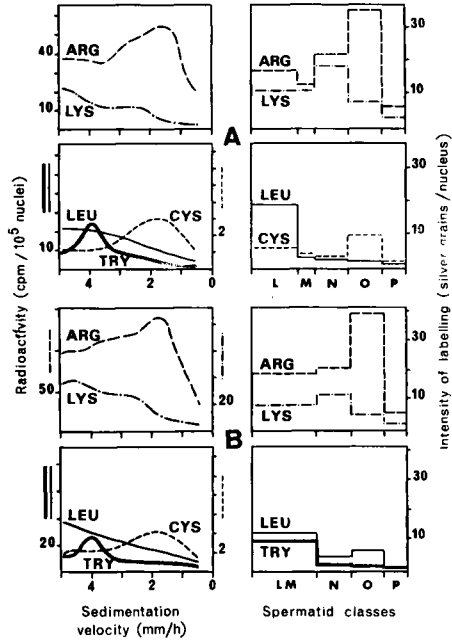


FIG. 1. — Incorporation de 5 acides aminés marqués dans les protéines nucléaires des spermatoïdes de bœlier en fonction de la vitesse de sédimentation (gauche) et des stades de spermatoïdes en autoradiographie (droite). Incubations de 27 mn (A) et de 45 mn (B). Chaque courbe est une moyenne pour 2 ou 4 bœliers. L : spermatoïdes 1-8a ; M : 8b ; N : 9-12a ; O : 12b-13 ; P : 14-S. (LOIR, LANNEAU [10]).

Les résultats d'une analyse électrophorétique des protéines basiques des spermatoïdes sont présentés figure 2 et tableau 2. Les 5 fractions histones sont présentes dans les populations I à III mais leur quantité décroît progressivement et est très faible dans la population IV. Dans la population III, F₁ augmente transitoirement en quantité et en proportion relative en même temps que sa mobilité électrophorétique modale diminue. Dans les populations II à IV, les noyaux contiennent plusieurs protéines basiques (N, P₁, P₂, 1 à 15), généralement plus rapides que F_{2a1}. Ces protéines sont aussi extraites des noyaux des cellules testiculaires indépendamment de la méthode de préparation des cellules et du traitement de la chromatine. Aucune protéine n'est extraite par SO₄H₂ seul des noyaux DNase-résistants. Par contre, après traitement de ces noyaux ainsi que des noyaux de spermatozoïdes par le 2-mercaptoéthanol une seule protéine basique (nommée a et correspondant à la bande 14-15) est extraite. Les expériences d'oxydation et de réduction des groupements soufrés indiquent que la bande 14-15 est riche en cystéine. L'oxydation de la bande a donne plusieurs bandes dont les principales (a₂-a₅ ; fig. 2) correspondent aux oligomères d'ordre 2 à 5.

TABLEAU 2

Analyse quantitative des protéines basiques dans les populations I à IV

Les surfaces sous chaque portion des traces densitométriques ont été rapportées à 10×10^6 noyaux. La bande F₁ est exprimée également en pourcentage des histones totales

	I	II	III	IV
Toutes histones	22,2	17,5	16,7	2,2 ?
F ₃ , F _{2a1} , F _{2b} , F _{2a2}	17,5	14,0	10,4	
F ₁	4,7	3,5	6,3	
	21 %	20 %	38 %	
Protéines 1 à 15	1,7	2,9	8,7	3,9

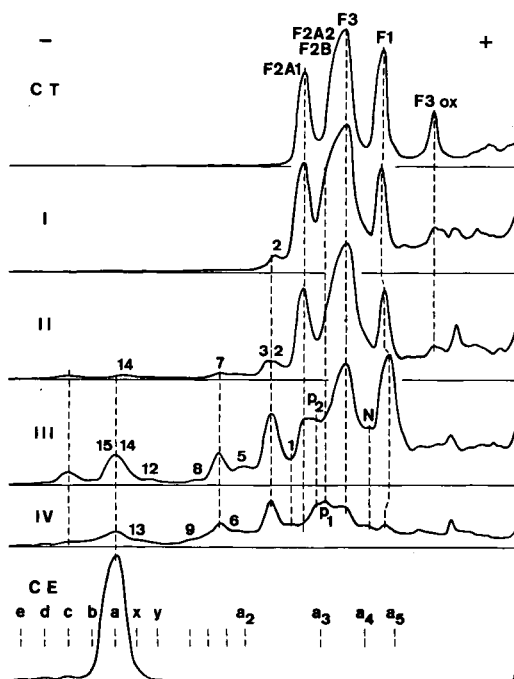


FIG. 2. — Tracés densitométriques des électrophorèses des protéines basiques des 4 populations de spermatozoaires (I à IV), des spermatozoaires de la queue de l'épididyme (CE) et du thymus de veau (CT). N, P₁, P₂, 1 à 15 : noms de bandes. b à y, a₂ à a₅ : position des bandes induites par l'oxydation de la bande a. Lignes courtes en pointillé : position des dimères de b, c et d. 15 à 65 µg de protéines furent déposés sur les gels. (LOIR, LANNEAU [11]).

DISCUSSION

Les données obtenues par incubation *in vitro* avec les 5 acides aminés confirment et complètent pour des temps de marquage courts nos observations antérieures [7]. Il apparaît que les spermatides rondes synthétisent essentiellement des protéines non-histones puisqu'elles sont riches en tryptophane et modérément riches en cystéine. L'apparition dans les spermatides 12b-13 de la nucléoprotéine basique spécifique des spermatozoïdes, riche en arginine et en cystéine et pauvre en lysine et tryptophane est précédée par la synthèse dans les spermatides 9-12a de protéine(s) acido-soluble(s) [7] riche(s) en arginine et lysine et pauvre(s) en tryptophane et cystéine. Trois protéines avec des caractéristiques similaires ont été isolées des spermatides de truite [13] et une des spermatides de rat [4].

L'évolution des nucléoprotéines basiques des spermatides mise en évidence par électrophorèse est en accord avec nos observations cytochimiques et autoradiographiques [7, 8]. C'est dans les spermatides 9-12 que les histones somatiques quittent les noyaux. L'augmentation transitoire de la concentration nucléaire de F₁ suggère que cette histone pourrait être l'une des protéines synthétisées par les spermatides 9-12a. Si cela était, une telle synthèse simultanée au déplacement des histones serait l'un des aspects les plus intrigants de la spermiogenèse. L'étude de ce point sera reprise ultérieurement.

Le fait que les protéines basiques, différentes des histones, jusqu'à la bande 15, ne résultent pas d'une dégradation protéolytique des histones, est établi par les diverses méthodes d'extraction utilisées et par leur absence dans la population I. Elles ne correspondent pas non plus aux oligomères a₂ à a₅ de la bande 14-15. Par contre, les bandes au-delà de 15 sont des produits de dégradation (b à e) de la bande 14-15. Cette bande correspond à la protéine nucléaire basique spécifique du spermatozoïde analysée par COELINGH *et al.* [3]. Nos résultats montrent que cette protéine est acido-soluble (et alors très sensible à la protéolyse *in vitro*) dans les noyaux DNase-sensibles tandis que dans les noyaux DNase-résistants son extraction nécessite un traitement réducteur violent. Ce comportement, qui explique sa faible quantité dans les extraits acido-solubles de la population IV (fig. 2), est en accord avec le fait qu'au stade 13 les noyaux deviennent riches en groupes disulfures [8].

La signification et le rôle des protéines P₁, p₂, 1 à 13 dans le processus de remplacement des histones somatiques par la protéine propre au spermatozoïde sont inconnus. Certaines protéines pourraient correspondre à celles dont nous avons démontré la synthèse dans les spermatides 9-12a. Certaines pourraient résulter de la protéolyse *in vivo* des histones, qui a été démontrée jouer chez la Truite un rôle important dans le déplacement des histones [13]. L'étude des mécanismes d'apparition (synthèse *de novo* ou dégradation de protéines préexistantes), du devenir et la purification et la caractérisation de ces protéines devraient permettre un progrès important dans la connaissance des mécanismes d'élaboration des gamètes mâles chez les Mammifères.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de l'aide de la D. G. R. S. T., contrat n° 74-70038.

SUMMARY

CELL SEPARATION BY VELOCITY SEDIMENTATION AT 1 g
FOR THE STUDY OF NUCLEAR PROTEINS IN RAM SPERMATIDS

The synthesis of nuclear proteins and changes in nuclear basic proteins throughout ram spermiogenesis were investigated by pulse-labelling with 5 amino-acids and by electrophoresis in four spermatid populations obtained by sedimentation at 1 gravity.

Suspensions of 1 to 3.5×10^8 testis cells were separated by velocity sedimentation at 1 gravity in BSA or Ficoll gradients. The distribution of spermatids at different maturation stages throughout the gradient was determined using histological techniques and confirmed by kinetic profiles and autoradiographic analyses of ^3H -thymidine incorporation.

Cells were pulse-labelled before separation with ^3H -leu, ^3H -arg., ^3H -lys., ^3H -try., ^{35}S and ^{14}C -cys. for 27 and 45 mn. The incorporation of radioactivity into nuclear proteins was determined firstly as a function of sedimentation velocity of spermatids and secondly as a function of the stage of spermatid maturation by quantitative analysis of autoradiograms. Our results suggest that the synthesis of the sperm-specific nucleoprotein is preceded in elongating spermatid nuclei by that of histone-like protein(s), while the round spermatids synthesize mainly non-histone proteins.

Acid-soluble proteins were extracted in four spermatid populations from nuclei prepared with 0.05 p. 100 Triton X-100. They were also extracted from epididymal and ejaculated spermatozoa after treatment with 2-mercaptoethanol. The basic proteins were analysed by electrophoresis on polyacrylamide gels. Our results evidence that somatic histones present in round spermatid nuclei are displaced from chromatin while nuclei elongate and condense. They are replaced by a unique basic protein acid-soluble in the first stage of its synthesis then acid-insoluble unless treated with 2-mercaptoethanol. Several basic proteins faster or slightly slower than F_{2a1} are present in nuclei involved in this process of replacement. They are not result of experimental proteolysis. Some of them should be fragments of displaced histones while some others are probably proteins synthesized *de novo*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BARTLEY J., CHALKLEY R., 1970. Further studies of a thymus nucleohistone-associated protease. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4286-4292.
- [2] CLERMONT Y., LEBLOND C. P., 1955. Spermiogenesis of Man, Monkey, Ram and other mammals as shown by the « periodic acid-schiff » technique. *Amer. J. Anat.*, **96**, 229-253.
- [3] 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.
- [4] KISTLER W. S., GEROGH M. E., WILLIAMS-ASHMAN H. G., 1973. Specific basic proteins from mammalian testes. Isolation and properties of small basic proteins from rat testes and epididymal spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, **248**, 4532-4543.
- [5] LAM D. M. K., FURRER R., BRUCE W. R., 1970. The separation, physical characterization and differentiation kinetics of spermatogonial cells of the mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **65**, 192-199.
- [6] LOIR M., 1972. Métabolisme de l'acide ribonucléique et des protéines dans les spermatocytes et les spermatides du bélier (*ovis aries*). I. Incorporation et devenir de ^3H -Uridine. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 203-219.

- [7] LOIR M., 1972. 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. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 411-429.
- [8] LOIR M., 1972. Métabolisme de l'acide ribonucléique et des protéines dans les spermatocytes et les spermatides du bélier (*ovis aries*). III. Étude cytoplasmique des transformations protéiques dans les vieilles spermatides. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 531-544.
- [9] LOIR M., LANNEAU M., 1974. Separation of ram spermatids by sedimentation at unit gravity. *Exptl. Cell Res.*, **83**, 319-327.
- [10] LOIR M., LANNEAU M., 1975. Synthesis of nuclear proteins in ram spermatids. *Experientia*, **31**, 401-402.
- [11] LOIR M., LANNEAU M., 1975. An electrophoretic analysis of the basic nuclear proteins of ram spermatids. *Exptl. Cell Res.*, **92**, 509-512.
- [12] LOIR M., WYROBEK A., 1972. Density separation of mouse spermatid nuclei. *Exptl. Cell Res.*, **75**, 261-265.
- [13] MARUSHIGE R., DIXON G. H., 1971. Transformation of trout testis chromatin. *J. Biol. Chem.*, **246**, 5799-5805.
- [14] MARUSHIGE Y., MARUSHIGE K., 1974. Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta*, **340**, 498-508.
- [15] MEISTRICH M. L., 1972. Separation of mouse spermatogenic cells by velocity sedimentation. *J. Cell Physiol.*, **80**, 299-312.
- [16] PANYIM S., CHALKLEY R., 1969. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337-346.
- [17] WRAY W., STUBBLEFIELD E., 1970. A highly sensitive procedure for detection of histones in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **38**, 454-460.
-