

## **Modifications des propriétés cytophotométriques des désoxyribonucléohistones des cellules endométriales au cours de la décidualisation chez la ratte**

par H. DUPONT, J. C. NICOLLE \*, C. ESNAULT \*, G. MAYER

*Laboratoire d'Histologie et Embryologie, Université de Bordeaux II,  
146, rue Léo-Saignat 33076 Bordeaux Cedex.*

*\* Station de Physiologie de la Reproduction, I.N.R.A.,  
Nouzilly, 37380 Monnaie.*

---

**Summary.** *Cytophotometrical changes in deoxyribonucleohistones of endometrial cells in rat decidualization.*

Using Zetterberg's cytophotometric method to determine changes in histone arginine and lysine residues in endometrial cells on day 5 in pseudopregnant rat, we showed that oil stimulus modified the affinity of lysine basic binding capacity in G1 cells within 2 hrs. These modifications did not seem to intervene either in polyploidygenesis or in binucleated cell formation. These cells in the G1 phase would represent heteropyknotic cells previously described by us (Dupont *et al.*, 1971). The existence of this population refutes Galassi's hypothesis which proposed that cells in G2 on day 5 evolve into decidual cells without passing through mitosis.

---

### **Introduction.**

L'endomètre au cours de la progestation chez la ratte, est soumis à une préparation par les hormones ovariennes qui lui confèrent au jour 5 des propriétés nouvelles. Les noyaux des fibroblastes prennent un aspect vésiculeux (Allen, 1931 ; Leroy, 1974) et le ralentissement de leur synthèse d'ADN en relation avec un faible index mitotique se traduit sur histogramme par une répartition de leurs valeurs ADN-Feulgen en G1 et G2 (Sartor *et al.*, 1977). Dès lors, la muqueuse utérine acquiert un état de sensibilité à l'égard du blastocyste ou à tout autre stimulus intrautérin qui se manifeste par la reprise des cycles cellulaires en relation avec un fort index mitotique (Leroy, 1974 ; Zhinkin et Samoshkina, 1967) et l'apparition 24 h plus tard d'une importante population de fibroblastes (79 p. 100) à noyaux petits et hyperchromatiques (Dupont, Duluc et Mayer, 1971). Il en résulte une métaplasie des cellules du chorion qui s'organisent en petite tumeur organique : le déciduome.

Nous avons montré précédemment que les cellules déciduales évoluaient différemment dans les régions mésométriales et antimésométriales. Les cellules mésométriales se divisent par mitoses dans les cellules mono- et binuclées limitant leur ploïdie

à 4 n, tandis que le passage d'un processus mitotique à un processus endomitotique permet aux cellules antimésométrales d'accéder à 32 n (Dupont, 1977 ; Dupont *et al.*, 1974, 1975, 1978).

Or, on sait que les histones interviennent dans la régulation de l'expression des gènes (Clever et Ellgaard, 1970) ainsi que dans la préparation à la division cellulaire (Bradbury *et al.*, 1974a, b).

C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier les propriétés cytophotométriques des histones dans les fibroblastes de la muqueuse utérine en période de réceptivité et dans les cellules déciduales mono et binucléées des régions mésométrales et antimésométrales.

### Matériel et méthodes.

Des Rattes vierges de souche Wistar pesant de 150 à 180 g sont mises au mâle fécond. La présence d'un bouchon vaginal date le 1<sup>er</sup> jour de la grossesse. Ce même jour à 10 h, on sectionne la trompe gauche au niveau de la jonction tubo-utérine, afin d'obtenir une corne stérile. Les ovo-implantations qui ont lieu dans la corne droite fertile servent de témoin de l'équilibre hormonal gravidique. Le jour 5 à 10 h, on injecte dans la corne utérine gauche stérile 0,05 ml d'huile d'arachide (cette technique permet d'obtenir des déciduomes dont l'aspect est semblable à celui du déciduome dû à l'agression de l'endomètre par l'œuf).

Les animaux sont sacrifiés les jours 4, 5, 6 et 8 à 10 h. Le jour 5, des rattes dont la corne gauche a été rendue stérile servent de témoin à l'action du stimulus déciduo-gène sur un 2<sup>e</sup> lot d'animaux dans les mêmes conditions expérimentales.

Pour chaque jour, une série de 4 animaux est étudiée. Les utérus sont prélevés ; les épithéliums sont éliminés en frottant la face interne de l'utérus sur une lame de verre.

Les régions mésométrales et antimésométrales de la muqueuse sont séparées au scalpel puis les tissus sont dissociés au microbroyeur dans une solution isotonique selon une technique précédemment décrite (Dupont, Duluc et Mayer, 1971).

Les suspensions cellulaires sont fixées au formol neutre à 10 p. 100 puis les préparations sont hydrolysées à l'acide picrique saturé (PA) à 60 °C pendant 3 h et colorées au bleu de bromophénol (BPB) (Merck) à 0,01 p. 100 et pH 8,2 pendant 1 h selon la technique de Zetterberg et Auer (1969).

Les mesures d'absorption sont effectuées sur un ultramicrospectrophotomètre, UMPSI Zeiss à 370 et 592 nm.

Les masses de BPB et de PA liées à la chromatine sont calculées à partir des équations suivantes :

$$M_{BPB} = E_{592}$$

$$M_{PA} = E_{370} - E_{592} \times \frac{E_{370}}{E_{592}}$$

$E_{592}$  et  $E_{370}$  sont les extinctions totales des noyaux à 592 et 370 nm.

$M_{BPB}$  et  $M_{PA}$  permettent la détection des résidus arginyls et lysyls disponibles ainsi dans chaque cellule au sein d'un tissu aussi hétérogène que le tissu décidual.

## Résultats.

A chaque jour d'expérimentation, nous avons mesuré le rapport des résidus lysyls/arginyls + lysyls sur des séries de 4 animaux à raison de 30 mesures individuelles par animal dans les régions mésométrales et antimésométrales.

Les moyennes et variances sont calculées, puis comparées par le test de Student entre chaque animal dans les régions mésométrales et antimésométrales ainsi que pour les cellules mono- et binucléées. Pour faciliter la lecture des résultats, les variations entre animaux n'étant pas significativement différentes, nous avons groupé les valeurs individuelles des séries de 4 animaux de chaque jour et nous avons calculé leur moyenne et variance dans les régions mésométrales et antimésométrales ainsi que pour les cellules mono et binucléées. Puis, nous avons comparé ces valeurs par le test de Student pour chaque jour d'expérimentation.

Enfin, nous avons déterminé pour chaque jour dans les régions mésométrales et antimésométrales les masses totales d'histone dans chaque noyau, puis nous avons réparti ces valeurs individuelles sur histogramme de fréquence afin de considérer différentes populations au cours du cycle cellulaire. Nous avons ensuite comparé par le test de Student les moyennes des pourcentages du contenu en résidus lysyls de ces différentes populations.

La représentation graphique de ces valeurs moyennes à chaque jour d'expérimentation illustre les modifications des résidus arginyls et lysyls dans les histones *in situ* au cours de la progestation, avant et après le stimulus déciduoqène (fig. 1).

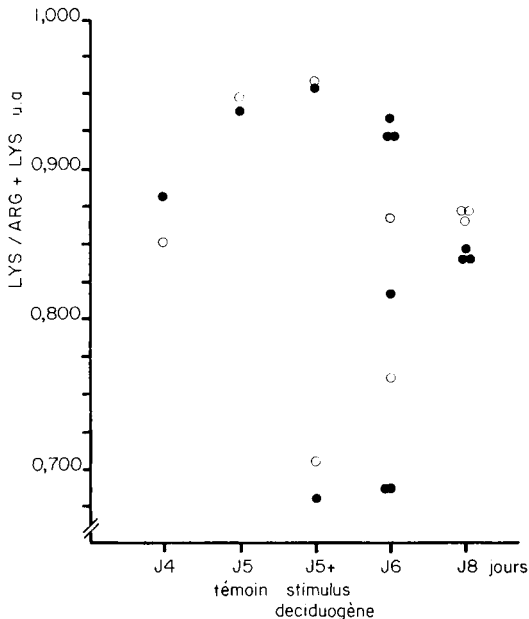


FIG. 1. — Représentation graphique des moyennes des rapports des résidus arginyls et lysyls des histones *in situ* dans les cellules endométrales au cours de la décidualisation. u. a. : unités arbitraires. ○ et ● : cellules mononucléées mésométrales et antimésométrales, ○○ et ●● : cellules binucléées mésométrales et antimésométrales.

— Le jour 4, on distingue dans la région antimésométrale 3 fractions protéiques 0-11, 12-16 et  $> 16$ . Les moyennes du pourcentage des résidus lysyls dans toutes les cellules antimésométrales, le jour 4, est constant quelle que soit la masse totale d'histone. Il est permis de considérer la moyenne de toutes les cellules individuelles soit  $M = 0,869$  ( $S^2 = 0,0006$ ).

Dans la région mésométrale, le pourcentage des résidus lysyls est constant dans toutes les cellules ( $M = 0,852$ ,  $S^2 = 0,0013$ ) et n'est pas significativement différent de celui des cellules antimésométrales. Ainsi, le pourcentage des résidus lysyls est constant au jour 4 dans toutes les cellules méso et antimésométrales.

— Le jour 5 de la grossesse chez des animaux qui n'ont pas reçu de stimulus déciduogène, on note dans la région antimésométrale, plusieurs populations d'histones totales 0-4, 5-8, 9-15, 16-22 dont les pourcentages des groupements lysyls ne sont pas significativement différents. La valeur moyenne du pourcentage de la lysine est de 0,939 ( $S^2 = 0,0018$ ). Il en est de même pour les cellules de la région mésométrale ( $\bar{M} = 0,942$ ;  $S^2 = 0,016$ ) dont les valeurs des résidus lysyls ne diffèrent pas significativement de celles de la région antimésométrale ( $P = 0,80$ ). Cependant on note une augmentation significative du pourcentage des résidus lysyls dans les cellules utérines le jour 5 par rapport à celui du jour 4 (0,869 à 0,939;  $p > 0,001$ ).

— Chez les animaux qui ont reçu une injection intra-utérine d'huile à 10 h le jour 5, on note 2 h après le traumatisme des modifications importantes du pourcentage des résidus lysyls. On observe une population hétérogène dont certains noyaux riches en histones totales ont un taux de résidus lysyls inchangé tandis que les cellules dont le contenu en histone est plus faible ont une baisse de l'affinité tinctoriale des résidus lysyls. Ce phénomène est observé dans la région mésométrale où se distingue 2 fractions protéiques qui diffèrent par leurs propriétés de liaison avec le colorant. Certaines cellules montrent une baisse de la liaison du BPB avec des groupes lysyls des histones.

— 24 h après le traumatisme déciduogène, les cellules de la région mésométrale offrent la même hétérogénéité que précédemment. Cependant on observe pour les cellules les plus pauvres en résidus lysyls une augmentation par rapport aux cellules mésométrales du jour 5, de la capacité de lier le BPB ( $\bar{M} = 0,708$  à  $0,762$ ;  $p = 0,02$ ). On constate également dans les cellules de la région antimésométrale une augmentation du contenu en résidus lysyls pour les cellules les plus dépourvues (0,680 à 0,817,  $p > 0,001$ ). Enfin, on note une différence entre les cellules antimésométrales et mésométrales (0,817 pour 0,762;  $P = 0,02$ ).

— 72 h après le traumatisme, on observe un taux des résidus lysyls remarquablement constant dans les cellules mononucléées et binucléées des régions antimésométrales (0,844 et 0,846,  $P = 0,858$  et  $0,860$ ;  $P = 0,80$ ).

Les cellules mononucléées antimésométrales et mésométrales ont des valeurs qui ne sont pas significativement différentes, les cellules mésométrales ayant un contenu en résidus lysyls relativement plus élevé bien que non significatif de celui des cellules antimésométrales (0,853 et 0,846;  $p = 0,10$ ). Il en est de même entre les cellules binucléées des régions mésométrales et antimésométrales (0,860 et 0,844;  $P = 0,10$ ).

Enfin, si on compare le taux des résidus lysyls des cellules antimésométrales le jour 8 à celui du jour 5 sans stress, leur valeur est significativement très différente. Les cellules au jour 8 sont moins riches en résidus lysyls que celles du jour 5.

D'autre part, les cellules antimésométrales au jour 8 ont moins d'affinité pour le BPB que les cellules antimésométrales du jour 4 (0,846 et 0,869 ;  $P > 0,001$ ).

## Discussion.

Des données récentes ont montré que les histones étaient associées par leurs régions basiques à l'hélice d'ADN sous forme de grains ou nucléosomes de 2 molécules formée chacune d'histones H2a, H2b, H3 et H4 (Baldwin *et al.*, 1975 ; Korcberg et Thomas, 1974). Cette structure séquentielle suggère que tous les résidus sont essentiels pour maintenir l'association ADN-Histone. Une légère modification des propriétés des nucléosomes, répétée dans toute la chromatine pourrait provoquer une dissociation massive de l'empaquetage de la chromatine nécessaire préalablement à l'activation spécifique des gènes (Mac Lean et Hilder, 1977).

Les variations observées chez les animaux témoins et les animaux traités suggèrent les réflexions suivantes :

1) Les modifications de l'affinité des liaisons de l'acide picrique aux résidus arginyls du jour 4 au jour 5 s'accompagnent d'une intense activité métabolique de la part des fibroblastes qui deviennent riches en ARN (Psychoyos, 1966) et dont le noyau prend un aspect « vésiculeux » (Allen, 1931 ; Dupont, Duluc et Mayer, 1971 ; Leroy 1974).

2) Sous l'effet d'un stimulus au jour 5 de la progestation, on observe par rapport aux témoins des modifications des propriétés cytochimiques des histones 2 h après l'application du stimulus. Le sens de ces variations vers un accroissement considérable du rapport résidus arginyls/lysyls est semblable à ce qu'observe Alvarez (1974), dans les hépatocytes 3 h après une hépatectomie partielle. Selon cet auteur, ces variations reflèteraient un état de condensation, décondensation de la chromatine qui peut être préexigé pour la synthèse des acides nucléiques.

On peut imaginer que ces cellules en présynthèse représenteraient les cellules « d'aspect quiescent » que nous avons préalablement décrites 24 h après le traumatisme (Dupont, Duluc et Mayer, 1971). Leur population relativement abondante 2 h après le stimulus atteint 72 p. 100, après 24 h. Cela pourrait signifier que sous l'effet d'un stimulus artificiel, la majorité des fibroblastes de la muqueuse serait engagée dans un cycle de réduplication en vue de la préparation à la mitose. Ce recrutement massif, illustre une relative synchronisation de la décidualisation.

3) Ces modifications cytochimiques ne semblent pas intervenir dans la genèse des cellules binucléées ni dans l'obtention de la polyploïdie puisqu'à 72 h on n'observe pas de valeurs significativement différentes entre les cellules mono et binucléées des régions mésométrales et antimésométrales ni entre les cellules mononucléées antimésométrales hautement polyploïdes et mésométrales diploïdes.

Les modifications du contenu en résidus arginyls des fibroblastes du jour 4 au jour 5 suggèrent une préparation qui correspond le jour 5 à un état de sensibilité en présence d'un blastocyste ou de tout stimulus déciduogène.

Il paraît vraisemblable de penser que l'induction déciduale aurait pour effet de stimuler les fibroblastes en présynthèse quant à leur contenu en histone afin de les engager dans des cycles successifs au cours desquels ils exprimeront leurs potentialités nouvelles. Cette stimulation présynthétique des cellules déciduales est en accord avec les données fournies par la littérature sur d'autres tissus en cours de prolifération (Mueller, 1971).

L'existence de cette population cellulaire stimulée en G1 réfute l'hypothèse de Galassi (1968), selon laquelle les cellules en G2 du jour 5 se transformeraient directement en cellules déciduales sans franchir la mitose.

Reçu en juillet 1978.

Accepté en septembre 1978.

### Références

- ALLEN W. M. I., 1931. Cyclical alterations of the endometrium of the rat during the normal cycle, pseudopregnancy and pregnancy. II. Production of decidualomata during pregnancy. *Anat. Rec.*, **48**, 65-103.
- ALVAREZ M. R., 1974. Early nuclear cytochemical changes in regenerating mammalian liver. *Exp. Cell Res.*, **83**, 225-230.
- BALDWIN J. P., BOSELEY P. G., BRADBURY E. M., JKEL K., 1975. The subunit structure of the eukaryotic chromosome. *Nature*, **253**, 245-249.
- BRADBURY E. M., INGLIS R. J., MATTHEWS H. R., 1974a. Control of cell division by very lysine riche histone (Fl) phosphorylation. *Nature*, **247**, 1. 257-261.
- BRADBURY E. M., INGLIS R. J., MATTHEW, LONGAN T. A., 1974b. Molecular basis of control of mitotic cell division in eukaryotes. *Nature*, **249**, 553-555.
- CLEVER U., ELLGAARD E. G., 1970. Puffing and histone acetylation in polyenes chromosomes. *Science*, **169**, 373-374.
- DUPONT H., 1977. *Contribution à l'étude des premiers stades de la gestation chez la ratte : Cytologie des cellules déciduales et du blastocyste*. Thèse d'Etat Bordeaux.
- DUPONT H., DULUC A. J., MAYER G., 1971. Evolution cytologique et genèse de la polyploïdie dans le déciduome expérimental chez la ratte en gestation unilatérale. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série D*, **272**, 2360-2363.
- DUPONT H., ESNAULT C., DULUC A. J., MAYER G. 1974. Evolution de la polyploïdie dans le déciduome expérimental chez la ratte en grossesse unilatérale. Etude cytophotométrique. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série D*, **279**, 501-504.
- DUPONT H., ESNAULT C., DULUC A. J., MAYER G., 1975. Etude cytophotométrique de l'acide désoxyribonucléique dans les cellules mésométrales du déciduome expérimental chez la ratte en grossesse unilatérale. *C. R. Soc. Biol.*, **4**, 935-936.
- DUPONT H., SARTOR P., DUPONT M. A., DULUC A. J., MAYER G., 1978. Evolution du déciduome expérimental chez la ratte : filiation cellulaire et morphogenèse. *Biol. cell.*, **32**, 217-224.
- GALASSI L., 1968. Autoradiographic study of the decidual cell reaction in the rat. *Develop. Biol.*, **17**, 75-84.
- KORNBERG R. D., THOMAS J. O., 1974. Chromatin structure : oligomers of the histones. *Science*, **184**, 865-868.
- LEROY F., 1974. *Etude fonctionnelle de l'acide désoxyribonucléique dans l'endomètre de rongeur*. Ad. Arscia S. A. Bruxelles.
- Mac LEAN N., HILDER V. A., 1977. Mechanisms of chromatin activation and repression. In BOURNE G. H., DANIELLI J. F. *International review of cytology*, **48**, 1-54. Acad. Press, New York.
- MUELLER G. C., 1971. Biochemical perspectives of the G1 and S intervals in the replication cycle of animals cells : a study in the control cell growth, 269-307. In BASERGA R., *The cell cycle and cancer*. Dekker M. Inc., New-York.

- PSYCHOYOS A., 1966. Etude des relations de l'œuf et de l'endomètre au cours du retard de la nidation ou des premières phases du processus de nidation de la ratte. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **263**, 1755-1758.
- SARTOR P., DUPONT H., DUPONT M. A., MAYER G., 1977. The action of high doses of oestradiol on implantation and decidual reaction in the rat. *Anim. Reprod. Sci.*, **1**, 93-96.
- ZETTERBERG A., AUER G., 1969. Early changes in the binding between DNA and histone in human leucocytes exposed to phytohemagglutinin. *Exp. Cell Res.*, **56**, 122-126.
- ZHINKIN L. N., SAMOSHKINA N. A., 1967. DNA synthesis and cell proliferation during the formation of deciduomata in mice. *J. Embryol. exp. Morph.*, **17**, 593-605.
-