

MISE EN ÉVIDENCE DE LA NATURE PROTÉIQUE DE CORPS ÉNIGMATIQUES PRÉSENTS DANS LE TESTICULE DE *SCYLIORHINUS CANICULA* L. (ELASMOBRANCHE).

par

Germaine Collenot et Denise Damas

Université Paris VII, Laboratoire d'Anatomie comparée ;
Université Paris VI, Laboratoire de Cytologie ;
Station biologique de Roscoff (1).

Résumé

Chez *Scyliorhinus canicula*, le cytoplasme apical des cellules de Sertoli contient, à la fin de la spermiogenèse, une inclusion volumineuse et homogène ou corps problématique. Le cytoplasme apical est caduc et, lors de la spermiation, il se détache et il entraîne ainsi dans les canalicules efférents, le corps problématique et les spermatozoïdes. L'étude de cette inclusion sertolienne à l'aide de méthodes histochimiques montre qu'il s'agit d'une sécrétion de nature protéique, riche en lysine, cystéine et tryptophane.

Introduction

La structure du testicule des Sélaciens est connue, dans ses grandes lignes, depuis le milieu du siècle dernier. Les travaux de Stannius (1840) et Semper (1875) ont montré que, chez les Chondrichthyens, l'évolution des cellules germinales se fait dans des cystes clos et de manière synchrone pour un cyste donné.

Chez *Scyliorhinus canicula*, les testicules sont relativement volumineux ; de forme allongée, ils s'étendent de la région œsophagienne à la région rectale sur une longueur de 12 à 15 cm. L'unité structurale du testicule est le cyste (ou ampoule) dans la paroi duquel évoluent les éléments germinaux. Les cystes se forment par la prolifération des cellules germinales initiales, groupées en une zone de genèse superficielle qui s'étend ventralement tout le long du testicule. Au fur et à mesure du développement, les cystes sont repoussés dorsalement par les cystes nouvellement formés. En coupe transversale, le testicule apparaît, au-delà de la zone de genèse, constitué d'arceaux concentriques (Planche I,1). Au terme de leur évolution, les cystes atteignent la zone dorsale et les spermatozoïdes sont évacués grâce à un réseau de canalicules efférents qui relient les ampoules les plus

(1) Avec la collaboration technique de F. Allizard.

dorsales au canal longitudinal ; ce dernier assure le transport des spermatozoïdes en direction de l'épididyme.

De nombreux travaux se sont attachés à préciser tel ou tel aspect de la morphologie de l'appareil génital ou du fonctionnement testiculaire. Ici, nous envisageons ceux ayant trait aux cellules de Sertoli, qui dérivent des cellules folliculaires entourant les cellules germinales initiales. Dans les cystes jeunes à spermatogonies, les noyaux des cellules de Sertoli sont groupés en une couronne centrale puis, dès

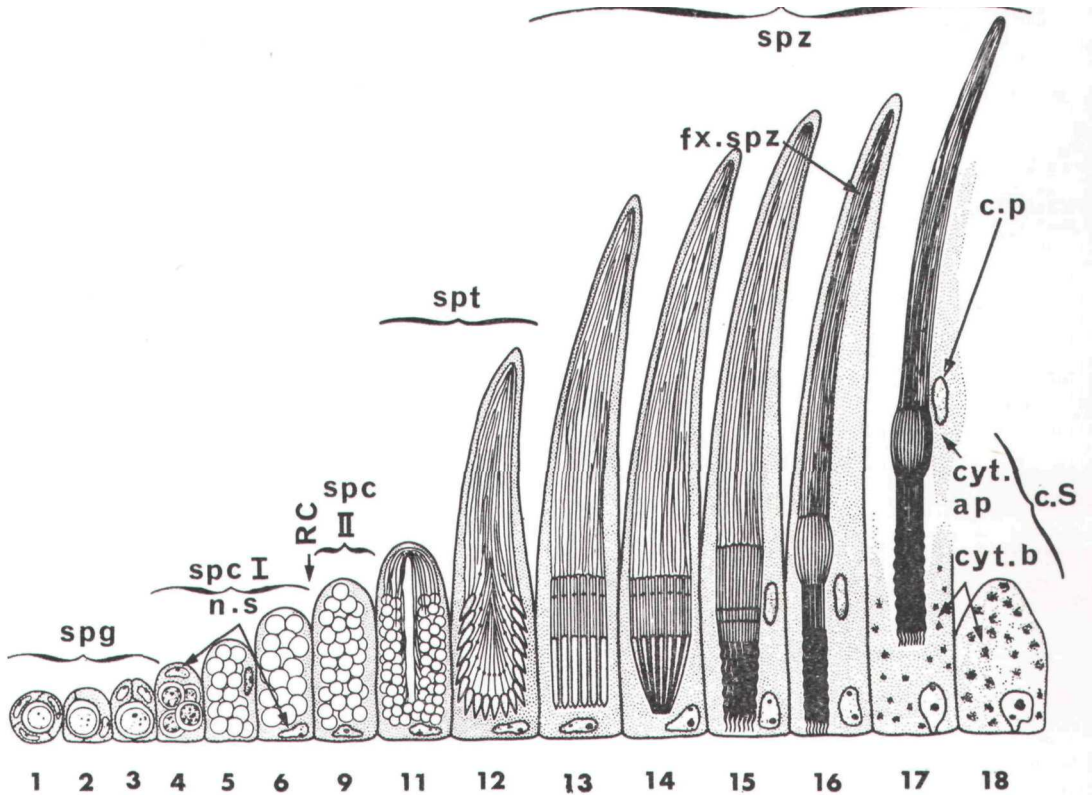


FIG. 1

Représentation schématique de l'évolution des éléments germinaux et sertoliens au cours de la spermatogenèse de la Roussette (modifié d'après Stanley, 1966). Les différentes étapes correspondent aux stades définis par Mellinger, 1965.

c.p : corps problématique ; c.S : cellule de Sertoli ; cyt.ap : cytoplasme apical ; cyt.b : cytoplasme basal ; fx.spz : faisceaux de spermatozoïdes ; n.s : noyau sertolien ; RC : réduction chromatique ; spc I : spermatocyte I ; spc II : spermatocyte II ; spg : spermatogonie ; spt : spermatide ; spz : spermatozoïde.

le début de la méiose, ils émigrent à la périphérie des cystes (Jensen, 1883 ; Swaen et Masquelin, 1883). Les spermatides et les spermatozoïdes sont implantés dans le cytoplasme sertolien jusqu'au niveau de la basale et, à la fin de la spermiogenèse, dans chaque cellule de Sertoli, les spermatozoïdes se groupent en un seul faisceau au voisinage duquel apparaît le corps problématique (Semper, 1875). Mellinger (1965) a décrit les étapes de la formation du corps problématique en rapport avec les divers stades de la spermatogenèse (Fig. 1) et il en

a abordé l'étude histochimique. Ainsi, à la fin de la spermiogenèse (stades 16 et 17), dans chaque cellule de Sertoli on peut observer, au-dessus du noyau, à côté du faisceau de spermatozoïdes et dans la partie apicale du cytoplasme sertolien, une inclusion ovoïde de grande taille (8 à 10 μ , dans sa plus grande longueur), de structure homogène, le corps problématique (c.p.). Cette inclusion résulte de la fusion de granules précurseurs qui sont apparus aux stades 15 et 16. Lorsque les spermatozoïdes sont mûrs (stade 17), ils sont libérés dans les canalicules efférents avec une partie apicale du cytoplasme sertolien qui contient le corps problématique. Ultérieurement, l'ampoule, réduite aux noyaux sertoliens entourés du cytoplasme basal (cyt. b), dégénère. On retrouve les corps problématiques dans le sperme au niveau de l'épididyme mais ils ont disparu du sperme au niveau du canal déférent (Stéphan, 1902).

Dans le cadre de travaux en cours concernant, d'une part l'ultra-structure des cellules de Sertoli au cours de la spermatogenèse et, d'autre part les modalités de l'apparition du corps problématique et son rôle éventuel dans la biologie du sperme, nous avons été amenées à préciser la nature chimique de cette inclusion ; ce sont les résultats de cette dernière étude que nous rapportons ici.

Matériel et techniques

Les testicules ont été prélevés sur des Roussettes pêchées au large de Roscoff (Manche occidentale) et gardées en élevage à la Station biologique de Roscoff.

En vue de l'étude histologique classique, des tranches de testicule ont été fixées dans le liquide de Bouin aqueux ou alcoolique, les fixateurs de Regaud ou de Carnoy. Les pièces ont été incluses dans la paraffine et débitées en coupes de 7,5 μ d'épaisseur. Des fragments ont été congelés et coupés au cryostat pour la recherche des lipides par le noir soudan B.

L'examen de coupes colorées par des méthodes classiques : hématoxyline-éosine, trichrome de Prenant, azan, méthode à l'acide périodique-Schiff, ainsi que les résultats négatifs obtenus après la coloration par le noir soudan B, ont orienté notre étude vers la recherche de groupements protéiques. Dans ce but, des fragments de tissus ont été fixés pendant six heures dans une solution de formaldéhyde à 10 p. 100 dans du sérum physiologique pour Sélacien (15 p. 1.000 de chlorure de sodium), inclus dans la paraffine et débités en coupes minces de 7,5 μ d'épaisseur. Les différentes réactions employées ont été réalisées selon les protocoles relevés sur le manuel de Ganter et Jolles (1969-1970) :

Méthode de Lipp (1954), visualisant le caractère amphotère d'une protéine et permettant d'en déterminer le point isoélectrique apparent ;

Méthode au Fast green salt FCF à pH 8 (Alfert et Geschwind, 1953), méthode à la ninhydrine-Schiff (Yasuma et Ichikawa, 1952-1953), associées à une désamination par l'acide nitreux, indi-

quant le caractère basique d'une structure protéique et sa richesse en amines primaires ;

Fuchisine paraldéhyde de Gomori (1950), révélant de façon signalétique les corps électro-négatifs ;

Méthode de Glenner ou réaction du rosindole (1957), décelant spécifiquement les noyaux indols du tryptophane ;

Réaction au DDD de Barrnett et Seligman (1952-1954), méthode au ferricyanure-ferrique de Chèvremont et Frédéric (1943), méthode au tétrazolium alcalin de Pearse (1953), visualisant les groupes thiols (SH), blocage spécifique de ces radicaux par l'iodoacétate de sodium (20 h à 37°) ;

Test de Sakaguchi (var. Baker, 1947), colorant de façon élective le radical guanidyle de l'arginine ;

Réaction au DNFB de Danielli-Burstone (1955) ou réaction générale des protéines, révélant les radicaux NH₂, SH, phénol et imidazole.

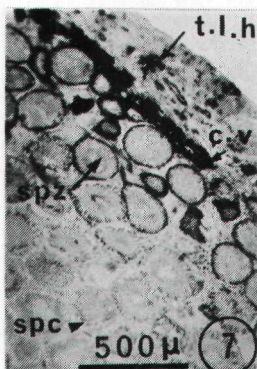
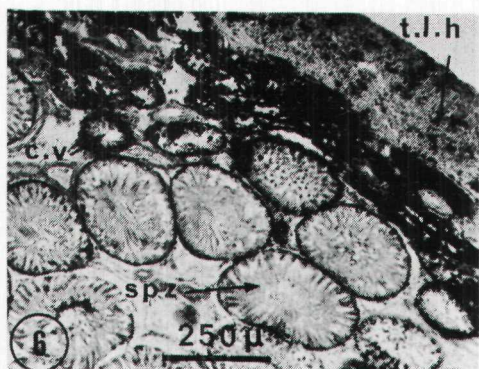
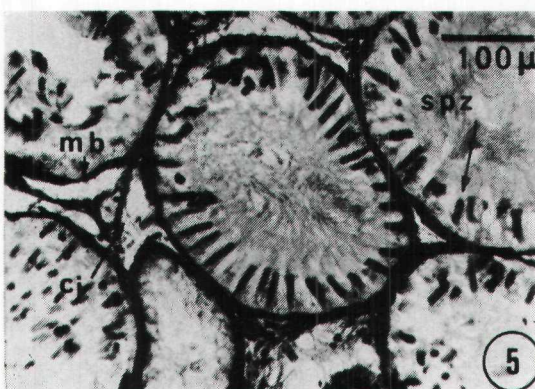
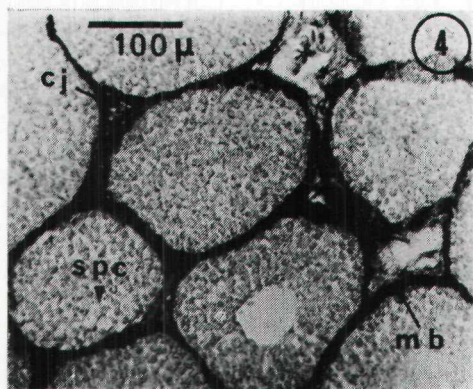
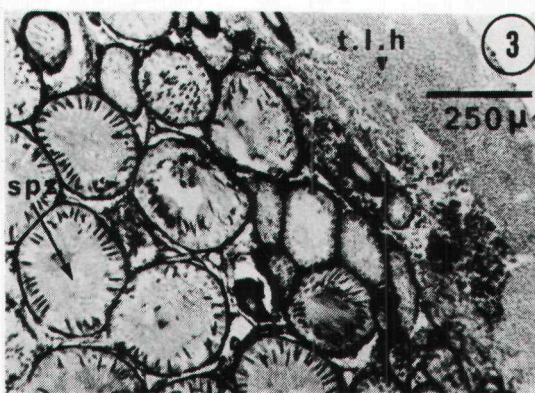
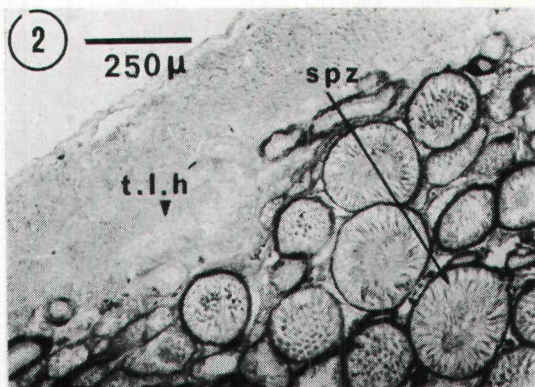
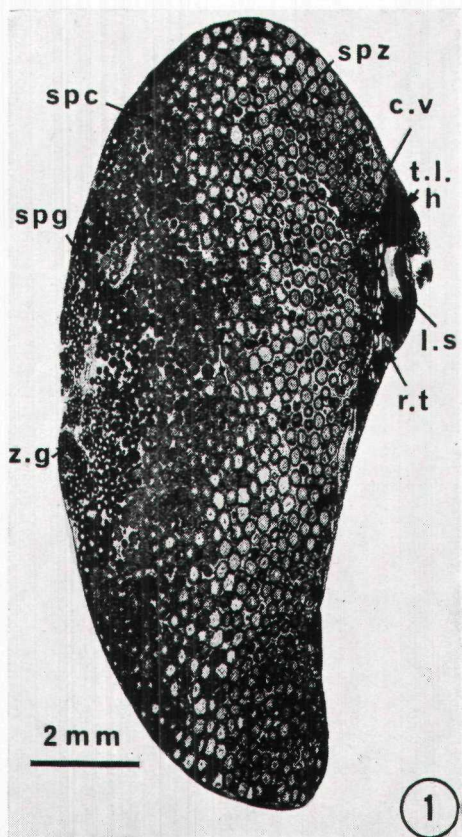
La recherche des activités phosphatasiques alcalines et acides a été faite sur des tranches de testicule fixées pendant 24 h par l'acétone à 4°. Après déshydratation par l'acétone et éclaircissement, l'inclusion est faite dans la paraffine à 48° ; les pièces sont débitées en coupes minces de 7,5 µ d'épaisseur et sont étalées à l'eau gélatinée sur platine tiède. La présence d'une activité phosphatasique a été mise en évidence par des méthodes basées sur le dépôt, au siège de l'activité de l'enzyme, soit de phosphate de calcium (méthodes de Gomori-Takamatsu, 1939, pour les phosphatases alcalines et de Gomori, 1952, pour les phosphatases acides) ; soit de naphtyles (méthodes de Pearse, 1960, pour les phosphatases alcalines et de Barka, 1960, pour les phosphatases acides).

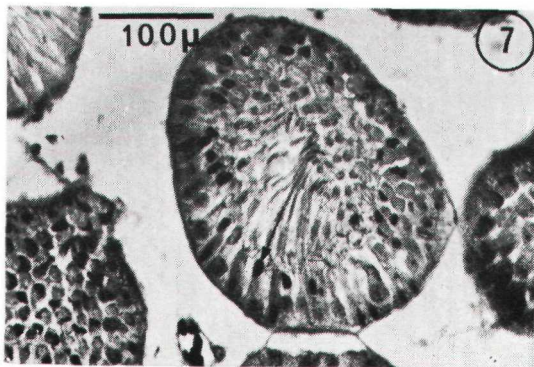
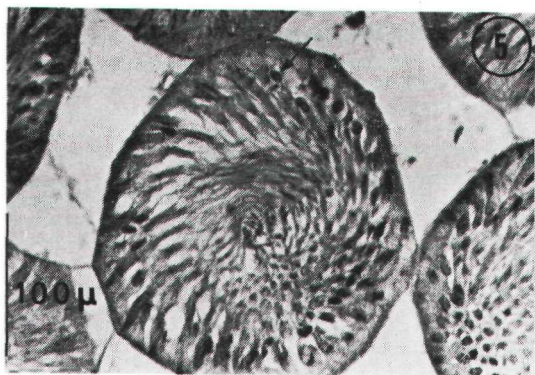
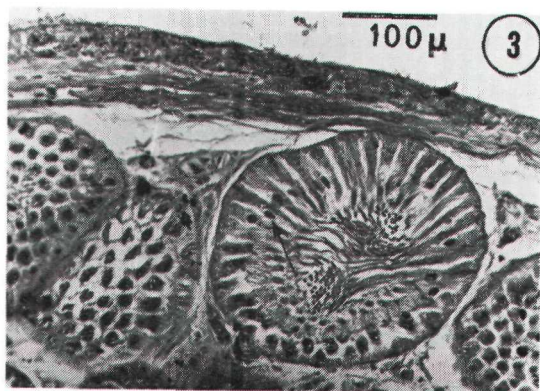
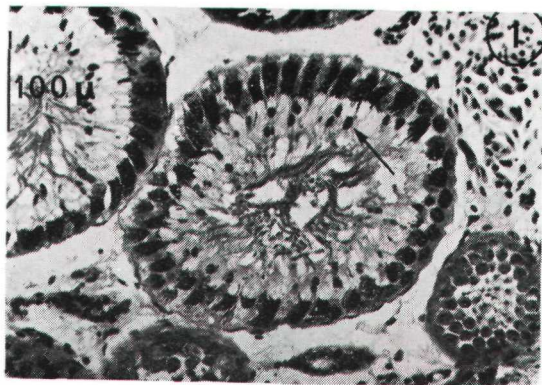
PLANCHE I

Anatomie microscopique et répartition des activités phosphatasiques dans le testicule de la Roussette.

1 : coupe transversale du testicule, montrant la répartition des différentes zones (hématoxyline-éosine) ; 2 : méthode de Pearse (phosphatases alcalines) - réaction positive dans la zone des cystes à spermatozoïdes, négative dans la zone hématopoiétique périphérique ; 3 : méthode de Gomori (phosphatases alcalines) - mêmes résultats que plus haut ; 4 : méthode de Gomori (phosphatases alcalines) - cyste jeune, réaction positive au niveau de la membrane basale et du tissu conjonctif inter-ampullaire ; 5 : méthode de Gomori (phosphatases alcalines) - cystes à spermatozoïdes, très forte réaction au niveau de la membrane basale et du tissu conjonctif ; 6 : méthode de Barka (phosphatases acides) - réaction forte dans les cystes à spermatozoïdes, les cystes vidés et la zone hématopoiétique périphérique ; 7 : méthode de Gomori (phosphatases acides) - même résultat que plus haut, la réponse négative des cystes jeunes est très visible ; 8 : méthode de Gomori (phosphatases acides) - cystes à spermatozoïdes à fort grossissement, réaction forte au niveau du cytoplasme basal ainsi que dans les hématies ; réaction négative au niveau du cytoplasme apical entourant le corps problématique.

cj : tissu conjonctif ; c.v. : cystes vidés de leur contenu et réduits aux cellules de Sertoli ; hé : hématies ; l.s. : lacune sanguine ; mb : membrane basale ; r.t. : rete testis ; t.l. : tissu lymphoïde hématopoiétique ; spc : spermatocyte ou zone à spermatocytes ; spg : spermatogonie ou zone à spermatogonies ; spz : spermatozoïdes ou zone à spermatozoïdes ; z.g. : zone de genèse.





RÉSULTATS

A. - Étude des principaux radicaux protéiques
présents dans les corps énigmatiques (tableau I).

Le caractère amphotère, nettement visualisé par la méthode de Lipp (Planche II, 1 et 2), permet d'envisager la présence de matériel protéique ; il s'agit vraisemblablement de protéines « basiques » (point isoélectrique apparent situé entre 8 et 9). Ce caractère basique est confirmé par deux tests qui sont l'acidophilie forte au Fast green salt FCF à pH 8 (Planche II, 7) et le résultat positif à la méthode à la ninhydrine-Schiff (Planche II, 8). En théorie, la réaction peut également être fournie par des lipides aminés (phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) ; en fait, leur présence est peu probable sur coupes à la paraffine. La coloration forte disparaît après désamination par l'acide nitreux. Le fort pourcentage de groupes aminés permet d'envisager la présence en forte concentration de lysine ou d'arginine. La recherche de l'arginine n'ayant donné aucun résultat, il doit s'agir essentiellement de **lysine**. L'absence de coloration par la méthode à la fuchsine paraldéhyde sans prétraitement, signalétique des structures électronégatives, est un argument indirect en faveur de la basicité des corps énigmatiques.

Ces éléments sont également riches en **tryptophane**, comme le prouve leur forte colorabilité à la réaction spécifique du rosindole.

Ils sont aussi riches en **cystéine**, puisqu'ils réagissent positivement à toute une série de méthodes basées sur des principes différents : méthode au DDD (Planche II, 6), au ferricyanure ferrique (Planche II, 3), au tétrazolium alcalin (Planche II, 4) ou au RSR ; la première étant seule spécifique des groupes thiols, les autres ont été contrôlées par blocage spécifique de ces radicaux.

Il ne semble pas exister de noyaux cycliques phénols, histochemiquement décelables. La réaction « générale » de Danielli-Burstone correspond à la présence démontrée plus haut de lysine et de cystéine (Planche II, 5).

PLANCHE II

Histochimie des protéines des corps problématiques dans les cystes mûrs du testicule de Roussette (tous les clichés sont à la même échelle).

1 : méthode de Lipp, test effectué au bleu de méthylène à pH 12 - basophilie franche ; 2 : même test effectué au ponceau de xylydine à pH 5 - acidophilie nette ; 3 : réaction de Chèvremont et Frédéric - caractère réducteur vis-à-vis du ferricyanure ferrique ; 4 : méthode de Pearse au tétrazolium alcalin - caractère réducteur vis-à-vis du sel, visualisé sous forme d'un formazan ; 5 : réaction au DNFB ou réaction « générale » des protéines, positive ; 6 : méthode au DDD de Barrnett et Seligman, formation de thioester au niveau des structures étudiées ; 7 : réaction au fast green FCF, acidophilie à pH 8 ; 8 : méthode à la ninhydrine-Schiff, coloration rose-pourpre.

fx.spz : faisceaux de spermatozoïdes ; → corps problématique.

TABLEAU 1
Réactions histochimiques des corps énigmatiques ; recherche des protéines.

Méthode	Signification de la réaction	Résultat au niveau des corps énigmatiques	Conclusions
Lipp	structure { bl. méthylène, pH 12 amphotère { ponceau xyl., pH 2 = protéine	+ +	Protéine
	pH d'extinction de la colorabilité pour les deux colorants = pHi	8 > pHi > 9	Protéine basique
fuch sine paraldéhyde sans prétraitement	structure électronégative	—	
fast green salt pH 8	acidophilie = protéine basique (lysine, arginine ou histidine)	+	Lysine, arginine ou histidine
ninhydrine-Schiff désamination, puis ninhydrine-Schiff	+ } NH ₂ de protéines basiques — } (lysine ou arginine)	+ —	Lysine ou arginine
test de Sakaguchi	spécifique radical guanidyle (arginine)	—	pas d'arginine
Glenner	spécifique radical indol (tryptophane)	+	Tryptophane
azoréaction	noyaux phénols pouvant ou non appartenir à des protéines (tyrosine)	—	pas de tyrosine
DDD	spécifique radical SH (cystéine)	+	
Chèvremont et Frédéric ou tétrazolium alcalin	groupes réducteurs pouvant ou non être des SH	+ +	Cystéine
iodoacétate de sodium, puis Chèvremont et Frédéric ou tétrazolium alcalin	blocage spécifique des SH	— —	
DNFB	radicaux NH ₂ , SH, phénol ou imidazole	+	confirme la présence de lysine et cystéine

B. - Étude de la répartition des phosphatases alcalines et acides.

L'activité phosphatasique alcaline est localisée dans le tissu conjonctif inter-ampullaire et sur les membranes basales qui entourent les cystes (Planche I, 4 et 5). Cette activité est particulièrement intense dans la zone de genèse et dans la zone des cystes à spermatozoïdes (Planche I, 2, 3 et 5).

Par contre, les phosphatases acides sont présentes (Planche I, 6 à 8) dans les cystes à spermatozoïdes (spz), dans les cystes vidés (c.v.) et dans les hématies (hé). L'activité phosphatasique acide est localisée au niveau du cytoplasme basal des cellules de Sertoli (Planche I, 8, cyt. b). Etant donné que les cystes vidés, réduits au noyau

sertolien entouré du cytoplasme basal, dégénèrent et finissent par se résorber totalement, l'étude cytochimique ultrastructurale permettra de vérifier si cette activité est liée éventuellement à des organites de nature lysosomiale, impliqués dans des processus de dégénérescence. Cette activité phosphatasique apparaît dès le stade 17 et il faut noter que le corps problématique et le cytoplasme caduc qui l'entoure sont dépourvus de phosphatases acides et ne sont pas concernés par des phénomènes de dégénérescence (Planche I, 8, cyt. ap.).

Discussion

Tout d'abord, il convient d'établir une distinction nette entre, d'une part, le corps problématique inclus dans chaque cellule de Sertoli chez *Scyliorhinus canicula* et, d'autre part, les corps résiduels que l'on rencontre au cours de la spermatogenèse normale des Mammifères. Ces derniers sont formés par des cellules germinales abortives qui sont phagocytées par les cellules de Sertoli ; ils constituent des inclusions de structure hétérogène qui ont un caractère acide, lié à la présence de résidus nucléaires. Chez la Roussette, il n'existe pas de corps résiduels de ce type au cours de la spermatogenèse normale.

Dans le cadre d'une étude actuellement en cours, nous avons pu constater que l'ultrastructure des cellules de Sertoli varie au cours de la spermatogenèse. Ainsi, pendant la spermiogenèse, alors que le noyau des spermatides s'allonge (stades 13 et 14), le cytoplasme sertolien comporte un réticulum lisse abondant qui est très vraisemblablement lié à une activité stéroïdogène démontrée par ailleurs (Collenot et Ozon, 1964 ; Collenot, 1971). Dès le stade 15, le réticulum lisse se raréfie et il fait place à un réticulum granulaire qui s'étend à l'ensemble du cytoplasme au cours des dernières étapes de la spermiogenèse (stades 16 et 17), où l'on peut constater la présence d'un corps problématique dans chaque cellule de Sertoli. L'étude histo-chimique de ce dernier a permis d'établir qu'il était constitué de protéines basiques et que les acides aminés les plus abondamment représentés semblent être la lysine, le tryptophane et la cystéine.

L'activité stéroïdogène du début de la spermiogenèse et la formation du corps problématique, apparaissent comme deux modalités de l'activité de la cellule de Sertoli dont le déterminisme reste à établir.

La nature protéique du grain peut être mise en relation avec l'apparition du réticulum granulaire. La présence d'un ergastoplasme abondant et la biosynthèse des protéines sont deux phénomènes classiquement associés (cellules des acini des glandes séreuses, plasmocytes, cellules embryonnaires, etc.). Dans le cas qui nous intéresse, la cellule de Sertoli en fin de spermiogenèse élabore, grâce à son réticulum granulaire, un grain de sécrétion protéique particulier, le corps problématique, dont le rôle n'est pas encore démontré.

Summary

Histochemical demonstration of the protein constitution of the problematic bodies in *Scyliorhinus canicula* Sertoli cells.

In *Scyliorhinus canicula*, the apical cytoplasm of Sertoli cells contains, at the end of spermiogenesis, a voluminous and homogeneous inclusion, the problematic body. When spermiation happens, the apical cytoplasm, which is deciduous, gets free and carries away problematic body and spermatozoa in the ductuli efferentes. The study of this sertolian inclusion, by histochemical methods, shows that it is a protein secretion, rich in lysin, cystein and tryptophan.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- COLLENOT, G., 1971. — Structure et activité endocrine du testicule de *Scyliorhinus canicula* L. depuis l'éclosion jusqu'à l'état adulte. Thèse D. ès Sciences, Paris.
- COLLENOT, G. et OZON, R., 1964. — Mises en évidence biochimique et histochimique d'une A 5-3- β -hydroxystéroïde-deshydrogénase dans le testicule de *Scyliorhinus canicula* L. *Bull. Soc. Biol. Paris*, 89, pp. 577-587.
- JENSEN, O.S., 1883. — Recherche sur la spermatogenèse. *Arch. Biol. Liège*, 4, pp. 669-747.
- LALLEMAND, F., 1841. — Observations sur le développement des zoospermes de la Raie. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, 2^e sér., 15, pp. 257-262.
- MELLINGER, J., 1965. — Stades de la spermatogenèse chez *Scyliorhinus canicula* L. : description, données histochimiques, variations normales et expérimentales. *Z. Zellforsch.*, 67, pp. 653-673.
- SEMPER, c., 1875. — Das Urogenitalsystem der Plagiostomen und seine Bedeutung für das der übrigen Wirbeltiere. *Arch. zool.-zoot. Inst. Würzburg*, 2, pp. 195-509.
- STANLEY, H.p., 1966. — The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus canicula* and *Torpedo marmorata* Elasmobranchii. *Z. Zellforsch.*, 75, pp. 453-468.
- STANNIUS, H., 1840. — Über die männlichen Geschlechtstheile der Rochen und Haien. *Arch. Anat. Physiol. wiss. Med.*, pp. 41-43.
- STEPHAN, p., 1902. — Sur le développement de la cellule de Sertoli chez les Séla-ciens. *C.R. Soc. Biol. Paris*, 54, pp. 773-775.
- SWAEN, A. et MASQUELIN, H., 1883. — Etude sur la spermatogenèse. *Arch. Biol. Liège*, 4, pp. 749-801.