50376
1965
37

50376
1965
37

FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

COLLEGE SCIENTIFIQUE UNIVERSITAIRE

d'AMIENS

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES (Sciences Naturelles)

SECTION DE SCIENCES LILLE

Paul P E R S O N N E

" ETUDE CYTOCHIMIQUE DU DERIVE MITOCHONDRIAL DU SPERMATOZOIDE DE LA TESTACELLE "

Présenté le 30 janvier 1965 devant la commission d'examen

Jury d'examen	M. M. DURCHON	Président
	M. A. LEBEGUE	Examinateurs
	M. E. VIVIER	
	M. J. ANDRÉ	

La spermatogénèse s'accompagne de modifications mitochondriales plus ou moins importantes selon les groupes animaux. Dans certains cas, les transformations sont si complexes-on parle alors de "métamorphose mitochondriale" (André 1962) - qu'elles aboutissent à la constitution, dans la pièce intermédiaire du spermatozoïde, d'une structure nouvelle dont la nature mitochondriale ne peut-être reconnue que si l'on suit son apparition et son évolution au cours de la spermatogénèse.

C'est d'un tel corps mitochondrial à structure et ultrastructure aberrantes que nous avons entrepris l'étude cytochimique. Notre choix s'est porté sur celui de la Testacelle (Pl.I, fig.1) en raison de sa taille importante (500 à 600 microns de long et près d'un micron de diamètre) qui rend son observation possible au microscope ordinaire, et de la bonne connaissance que l'on a de son ultrastructure, à la suite des travaux d'André.

Il est indispensable pour exposer nos résultats de commencer par retracer brièvement l'ultrastructure de la pièce intermédiaire du spermatozoïde de la Testacelle telle qu'elle ressort de ces travaux.

Cette pièce intermédiaire (Pl.II, fig.2) comporte, selon son axe, les fibres axonématiques du flagelle entourées d'une membrane simple; à sa périphérie, elle est entourée d'une membrane plasmatique normale. C'est entre ces deux éléments qu'est situé le dérivé mitochondrial qui fait l'objet de cette étude.

La majeure partie du volume mitochondrial est faite d'un matériel paracristallin de forme très complexe. Il constitue deux

manchons:l'un interne,cylindrique,de position périflagellaire,l'autre externe,sculpté de trois nervures hélicoïdales,alternant avec trois sillons hélicoïdaux.Des trois nervures,l'une,plus saillante,est dite principale,tandis que les deux autres sont dites secondaires.L'espace entre les deux manchons délimite trois canaux hélicoïdaux logés dans les nervures,qui sont nommés les hélices.Dans la nervure principale est logée l'hélice principale qui contient un matériel d'apparence réticulée avec les techniques employées par André.Son angle externe est souvent occupé par un enroulement de membranes.Dans les nervures secondaires sont logées les hélices secondaires qui contiennent un matériel homogène parcouru de petits canaux.

La forme générale hélicoïdale avait déjà été observée par Gatenby (I9I8),mais cet auteur n'avait vu qu'une ou deux hélices.Pour notre part,nous les avons retrouvées toutes trois très aisément au microscope ordinaire.De plus,l'une d'elles,au moins dans les préparations favorables,est vue plus saillante que les deux autres;elle correspond évidemment à l'hélice principale.

Aucune étude cytochimique systématique de cette pièce intermédiaire n'a encore été faite.Cependant,se basant essentiellement sur des données morphologiques,André a conclu que le matériel paracristallin est de nature protéique.Il a fait remarquer que le contenu des hélices secondaires présente des ressemblances avec certains grains de lipofuschine.Il n'a proposé aucune interprétation en termes cytochimiques pour l'hélice principale.

MATERIEL et TECHNIQUES

Nous utilisons l'espéce Testacella haliotidea (Drap.) (Mollusca;Gasteropoda;Pulmonata.).

Faute de ce matériel rare qu'est la Testacelle,nous avons été amené à poursuivre certaines expériences sur l'Escargot: Helix pomatia (L.).La pièce intermédiaire du spermatozoïde de l'Escargot présente en effet,de fortes ressemblances ultrastructurales avec celle de la Testacelle (Grassé et coll. 1956,Tahmisian 1964).

Nous expérimentons sur des animaux fraîchement récoltés ou maintenus depuis peu au laboratoire en terrarium,régulièrement approvisionnés en nourriture,afin d'éviter les modifications métaboliques que peut entraîner le jeûne.

La glande hermaphrodite est disséquée,fragmentée,et selon les cas,utilisée à l'état frais,fixée,mise en frottis (fixés ou non fixés) ou disséquée dans le milieu d'incubation.

I. TECHNIQUES POUR LA MICROSCOPIE ORDINAIRE:

Nous n'indiquerons pas dans ce paragraphe les détails concernant les réactions cytochimiques,ceux-ci figurant dans les tableaux I (glucides),II (protides),III (lipides),IV (activités enzymatiques).

A. Recherche des glucides et des protides:

Les glandes ont été fixées dans les liquides fixateurs

suivants: Bouin,Helly,Flemming sans acide acétique,André (André 1962), Carnoy,formol salé 10%,puis incluses à la paraffine selon la méthode habituelle,et coupées à 3 microns.

Des examens sur frottis fixés au liquide de Bouin pour la recherche des glucides,et au liquide de Carnoy pour celle des protides ont également été pratiqués.

B.Recherche des lipides:

Ces recherches ont été faites sur des frottis et sur des coupes à congélation de tissus frais ou fixés au formol-calcium de Baker.Pour la recherche des lipides masqués (Ciaccio 1926),le démasquage a été effectué,soit lors de la fixation en utilisant le liquide de Da Fano,soit après fixation au formol-calcium en traitant les coupes par des solutions d'acide oxalique à 20%,ou d'acide acétique à 25% selon la méthode d'Ackerman (1952).

C. Recherche de quelques activités enzymatiques:

Des frottis ou de très petits fragments de glande hermaphrodite non fixés sont placés dans les milieux d' incubation suivants:

- pour la recherche des activités succino-déshydrogénasiques,le mélange succinate-nitro B T selon Nachlas et coll. (1957),ou succinate-tétra-nitro B T,ou succinate- iodo-nitro B T,pendant 30 minutes à la température ordinaire.Les contrôles sont effectués dans ces milieux dépourvus de succinate.

- pour la recherche de l'activité cytochrome-oxydasique, le mélange "Nadi" (Moog 1943) pendant 15 minutes à 37°,ou le mélange de Burstone (1959),pendant 15 minutes, 30 minutes ou 45 minutes à la

température du laboratoire.

II. TECHNIQUES POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE:

A. Recherche des glucides et des protides:

a) sans digestion: Fixation au tétroxyde d'osmium à 2% dans un tampon phosphate 0,I M à pH 7,4 selon Millonig (I96I) pendant une heure, inclusion à l'Epon selon Luft (I96I); double coloration à l'acétate d'uranyle pendant 30 minutes et au plomb selon Karnovsky (I96I) pendant I0 minutes.

b) avec digestion: Nous incubons les cellules fraîches, non fixées, dans les milieux et pour les temps suivants: salive à 37° pendant une 45 minutes; α-amylase I% en eau distillée à 37° pendant une heure; trypsine (Nutritional Biochemical Corporation) I mg/ml dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,3 pendant une heure; pan-protéase (Worthongton) 1 mg/ml dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,9 pendant une heure; papaïne (Sigma) 1 mg/ml dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,3 pendant une heure; pepsine (Nutritional Biochemical Corporation) 0,5 mg/ml, 0,3 mg/ml ou 0,1 mg/ml dans HCl 0,02 M à pH 2 pendant I5 à 30 minutes. Puis, les cellules sont fixées au tétroxyde d'osmium, centrifugées dans le fixateur, puis incluses en Epon comme indiqué ci-dessus.

Les digestions par la salive, l'α-amylase et la trypsine, ont également été effectuées, dans les mêmes conditions de concentration, de durée et de température, sur des petits fragments de tissus préalablement fixés à la formaldéhyde (formol 5% dans un tam-

pon phosphate 0,1 M à pH 7,4) pendant 30 minutes à la température du laboratoire.

La digestion pepsique a également été pratiquée sur coupe ultrafine de cellules incluses au glycol-méthacrylate selon la technique de Leduc et Bernhard (I96I):fixation à la formaldéhyde (formol I0% dans un tampon véronal-acétate à pH 7,3-7,5),digestion par une solution de pepsine à 0,5% dans HCl 0,1 N à pH 1,2 pendant 30 minutes ou une heure à 37°.

B. Recherche des lipides:

Nous avons traité notre matériel par le mélange délipidant de Keilig (I944) (méthanol-chloroforme) selon le procédé proposé par Idelman (I964).

C. Recherche de quelques activités enzymatiques:

Les fragments sont:-incubés comme ci-dessus dans les mélanges succinate-nitro B T,nitro B T sans succinate,le mélange "Nadi" (Moog I943),ou le mélange de Burstone (Helix pomatia)

- fixés au tétroxyde d'osmium et inclus en Epon comme indiqué ci-dessus.

- examinés au microscope électronique sans coloration.

O B S E R V A T I O N S

I. RECHERCHE DES GLUCIDES:

A. MICROSCOPIE ORDINAIRE:

1) Présence d'un matériel A.P.S -positif, sa localisation:

Une coupe traitée par la technique de l'A.P.S montre que la pièce intermédiaire renferme un matériel positif sous la forme d'une hélice unique (Pl. III, fig. 3).

Si en plus de cette réaction A.P.S, on pratique une coloration par le vert lumière, on distingue en plus de l'hélice colorée en rouge par l'A.P.S, deux autres hélices colorées par le vert lumière. Un résultat analogue est obtenu avec l'hématoxyline (Elftman 1958) ou le bleu de bromophénol mercurique (Pl. IV, fig. 6). L'hélice A.P.S positive apparaît de taille supérieure aux deux autres. Sur de telles préparations, l'examen attentif de coupes transversales de spermatozoïdes montre qu'elles sont teintées par la coloration de fond utilisée (vert lumière par exemple) et que l'élément A.P.S positif se présente sous la forme d'un point excentré qui décrit une hélice lorsque l'on fait varier la mise au point.

Toutes ces observations rapportées aux données d'André sur l'ultrastructure montrent que le matériel A.P.S positif correspond au contenu de l'hélice principale.

2) Nature de ce matériel A.P.S-positif:

Les observations faites au microscope ordinaire sont

indiquées dans le tableau I.

La réaction d'Hotchkiss-Mc.Manus colore intensément l'hélice principale à l'exclusion de toute autre partie du corps mitochondrial comme nous venons de le voir (Pl.III,fig.3;Pl.IV,fig.6).Cette hélice est également Schiff-positive après une oxydation par l'acide chromique (réaction de Bauer;Pl.V,fig.9),le permanganate de potassium (réaction de Casella;Pl.V,fig.IO),le bismuthate de sodium (réaction de Lhotka),le tétraacétate de plomb en milieu non anhydre (réaction de Schimizu et Kumamoto;Pl.V,fig.14),elle est Schiff-négative après action de ce même réactif en milieu anhydre (réaction de Criegee;Pl.V,fig.13).

L'A.P.S-positivité persiste après traitement par le dimédon selon Bulmer (I959) (Pl.V,fig.12).Elle est bloquée par acétylation (réaction de Mc.Manus et Cason ;Pl.IV,fig.7),ce blocage étant réversible par saponification (réaction de Lillie;Pl.IV,fig.8).Elle disparaît après action de la salive (Pl.III,fig.4) ou de l'α-amylase, mais persiste après action de la β-amylase (Pl.III,fig.5).

Ces résultats nous amènent à conclure que l'hélice principale contient un polysaccharide qui présente les caractères cytochimiques du glycogène.

La colorabilité de l'hélice principale par le carmin de Best (Pl.V,fig.11) est en accord avec cette conclusion.L'absence de colorabilité au bleu alcian,l'absence de réaction de capture du fer et de métachromasie au bleu de toluidine indiquent qu'il ne s'agit pas d'un mucopolysaccharide.

B.MICROSCOPIE ELECTRONIQUE:

Sur des coupes de tissu non digéré,la coloration au

plomb se fixe intensément sur un matériel granulaire contenu dans l'hélice principale (Pl.VI,fig.15).Les grains sensiblement isodiamétriques,mesurent de I50 à 300 Å.Ils sont particulièrement nombreux et tassés dans la portion médiane et postérieure de la pièce intermédiaire où ils remplissent tout le volume de l'hélice principale.Dans la portion antérieure,ils peuvent être moins nombreux et ne pas remplir toute l'hélice.La positivité à l'A.P.S. suit la même répartition longitudinale (Pl.III,fig.3).

La salive et l' α -amylase n'ont pas d'action notable sur ce matériel granulaire dans les conditions de concentration,durée, température,que nous avons employées,si les cellules sont préalablement fixées au formol;elles n'ont qu'une action incomplète sur les cellules non fixées (Pl.VIII,fig.19).Mais,si la digestion amylasique est précédée d'une digestion trypsique,le matériel granulaire disparaît totalement (Pl.VIII,fig.20) alors qu'une digestion trypsique seule ne fait que disloquer l'amas des grains,ceux-ci devenant alors encore plus visibles (Pl.VI,fig.16).

Chez l'Escargot,le plomb colore dans l'hélice principale des rosettes de grains.Leur nature granulaire apparaît plus nettement après une légère action de la pepsine,celle-ci mettant en relief les granules de I50 à 300 Å les constituant (Pl.VII,fig.18).

II. RECHERCHE DES PROTIDES:

A. MICROSCOPIE ORDINAIRE:

Traitée par divers réactifs des protides (Tableau II.), la pièce intermédiaire se colore de façon diffuse sans localisation

préférentielle.C'est après l'action du bleu de bromophénol mercurique que nous observons les résultats les plus démonstratifs.Ces préparations (Pl.IX,fig.21) montrent l'ensemble de la pièce intermédiaire colorée,la coloration étant plus intense selon trois hélices.Comme nous l'avons signalé dans le chapitre précédent,les coupes transversales de spermatozoïdes après traitement par l'A.P.S et par le bleu de bromophénol mercurique présentent un élément A.P.S excentré entouré de matériel coloré par le bleu de bromophénol mercurique.La réaction positive au bleu de bromophénol mercurique nous indique la présence de protides.

Nous avons observé des résultats identiques à ceux-ci en traitant les préparations selon la technique de Yasuma et Ichikawa à la ninhydrine-Schiff (Pl. IX,fig.22),ou de Lillie à la chloramine T-Schiff; aucune coloration n'apparaît si l'on fait précéder cette action d'une désamination par l'acide nitreux.La pièce intermédiaire est positive au réactif de Chèvremont et Frédéricq et au DDD selon Barrnett et Seligman (1952),qui y indiquent la présence de radicaux réducteurs, mais ici,la coloration subsiste après que l'on ait bloqué ceux-ci par le bichlorure de mercure.traitée par l'acroléine-Schiff selon P.Van Duijn (1964) (Pl.IX,fig.23) elle nous montre des images tout à fait semblables à celles obtenues par les procédés cités précédemment,confirmant ainsi la présence de fonctions amines et de radicaux sulfhydrilés.La coloration disparaît après acétylation (Pl. IX,fig. 24).Le liquide de Millon (Bensley et Gersh 1933),qui révèle les groupements aromatiques,réagit de façon diffuse et peu intense avec l'ensemble de la pièce intermédiaire.

Nous avons effectué la recherche des protéines basiques. Nous avons constaté que la pièce intermédiaire se colore par le Fast Green à pH 8,1, très faiblement sans aucun prétraitement (Pl.X, fig.25), et de façon intense après action de l'acide trichloracétique (Pl. X, fig.26). C'est une coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire qu'il est impossible de localiser de façon précise; nous avons fait la même observation après traitement par le jaune naphtol S en milieu acide (Deitch 1955).

Ces résultats nous montrent la présence de protides dans la pièce intermédiaire. Si nous n'avons pu les digérer par la trypsine (0,2 mg/ml dans un tampon borate 0,05 M à pH 8,9 pendant une heure à 37° sur du matériel fixé au Carnoy ou au formol 10% à 20°), ni par la pepsine (2 mg/ml dans HCl 0,02 N à pH 2 pendant 3 heures à37° sur du matériel fixé au Carnoy ou au formol 10% à 20°), c'est sans doute à cause d'un phénomène secondaire qui sera envisagé dans la discussion.

L'absence de localisation précise de ces colorations au sein de la pièce intermédiaire ne nous permet pas de démontrer la nature protidique d'un élément déterminé de celle-ci. Les colorations au bleu de bromophénol mercurique et à l'acroléine-Schiff conduisent cependant à émettre l'hypothèse que le cristal et le contenu des hélices, au moins des secondaires, réagissent positivement.

B. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE:

Tout comme en microscopie ordinaire, nous n'avons pas observé de digestion par la trypsine sur du matériel préalablement fixé au formol à la température du laboratoire. Mais, si les cellules

sont incubées sans fixation, on observe les résultats suivants:

- la trypsine (Pl. XI, fig. 27; Pl. VI, fig. I6), digère la plupart des membranes et dissocie légèrement le cristal sans le faire disparaître: on distingue encore très nettement les tubules en rangées légèrement plus écartées les unes des autres qu'auparavant; ils paraissent vidés de leur contenu (les coupes bien perpendiculaires, montrent un centre clair). Les hélices secondaires sont très éclaircies et ne possèdent pratiquement plus que leurs membranes limitantes et celles des canaux internes. Dans l'hélice principale, comme nous l'avons déjà signalé, il y a une désagrégation des granules de glycogène, ceux-ci devenant encore plus visibles.

- la chymotrypsine (Pl. XI, fig. 28) a une action identique mais plus faible.

- la pan-protéase (Pl. XI, fig. 29) a une action plus poussée. On observe une dilatation importante de la pièce intermédiaire. Le cristal devient moins bien ordonné; les tubules subsistent sous la forme de fins filaments. Les hélices vidées de leur contenu se scindent parfois en de nombreuses vésicules.

- la papaïne (Pl. XI, fig. 30), fait disparaître complétement le cristal. Il ne reste plus de la pièce intermédiaire que l'axe flagellaire entouré de feuillets membraneux concentriques. Après cette action, il est très difficile de reconnaître les différentes régions.

- la pepsine a sur les cellules vivantes une action très violente. Une solution à 0,5 mg/ml agissant pendant une demi-heure ne laisse persister que les fibres axonématiques du flagelle. Celles-ci sont entourées de nombreuses vésicules membraneuses provenant de la

réassociation en vésicules des membranes qui se sont fragmentées sous l'action de l'enzyme. Les enroulements membraneux de l'hélice principale sont aussi conservés (Pl. XII,fig. 31). Ces expériences poursuivies chez l'Escargot,nous ont permis de confirmer cette forte sensibilité à la pepsine. Après incubation des fragments d'ovotestis dans une solution à 0,5 mg/ml,0,3 mg/ml pendant 15 minutes ou à 0,1 mg/ml pendant 30 minutes,on observe les mêmes résultats que ceux que nous venons de décrire chez la Testacelle. Mais si le traitement par la solution à 0,1 mg/ml ne dure que 15 minutes,certains spermatozoïdes sont digérés (Pl. XIII,fig. 34 et 35),tandis que certains spermatozoïdes voisins ne sont que peu attaqués (Pl. VII,fig. 18;Pl.XIII,fig. 34). Toute une gamme existe entre ces deux extrêmes,permettant de suivre l'action de cette enzyme. On constate aussi le résultat de l'action de la pepsine en comparant deux coupes de spermatozoïdes inclus au glycol méthacrylate;l'une,qui sert de témoin n'est pas traitée,tandis que l'autre est mise à incuber à la surface de la solution de pepsine selon la technique de Leduc et Bernhard (1961). On observe (Pl. XII,fig. 32 et 33) qu'après action de la pepsine,la pièce intermédiaire est considérablement dilatée,le cristal est digéré,mais l'aspect général de la pièce intermédiaire est encore très reconnaissable.

III. RECHERCHE DES LIPIDES:

A. MICROSCOPIE ORDINAIRE:

Les résultats concernant les lipides sont indiqués dans le tableau III.

Sur du matériel fixé au formol-calcium,après action du

noir soudan B ou du sulfate de bleu de Nil,même après démasquage,nous n'avons pu observer de coloration,ou alors celle-ci est si faible et si diffuse qu'il est impossible de savoir s'il ne s'agit pas simplement d'un artéfact optique (Pl. XIV,fig. 36).

Les colorations à l'hématoxyline,le test de Baker et le procédé de Smith-Dietrich,dont on a souligné le manque de spécificité, colorent la pièce intermédiaire,mais ne se localisent pas sur un élément déterminé.

Sur frottis de matériel non fixé et traité par le noir soudan,on constate que la coloration se localise sur l'hélice principale (Pl. XIV,fig. 37) ,sous la forme d'un chapelet de grains discontinus de répartition longitudinale très irrégulière.

B. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE:

Après action du mélange de Keilig,selon le procédé proposé par Idelman (1964),on observe une mauvaise conservation morphologique. Les micrographies (Pl. XIV,fig.38) montrent que l'ensemble du matériel de la pièce intermédiaire est respecté,notamment le cristal.On note cependant le vide de l'hélice principale dont le matériel granulaire glucidique a disparu,et la désagrégation de la membrane externe.

IV. RECHERCHE DE QUELQUES ACTIVITES ENZYMATIQUES :

A. MICROSCOPIE ORDINAIRE:

1) Nous avons refait les observations d'André (1962) concernant la coloration au vert Janus et la détection

de l'activité succino-déshydrogénasique.

Le tableau IV montre que la coloration au vert Janus (Michaelis 1900), qui décèle les enzymes de la chaîne respiratoire (Lazarow et Cooperstein 1953), semble intéresser la totalité de la pièce intermédiaire; il est très difficile de distinguer si elle se localise sur le cristal, sur les hélices, ou sur les deux à la fois.

Après incubation dans le mélange succinate-nitro B T ou succinate-tétra-nitro B T, une fine coloration de formazan se dépose selon deux hélices (Pl. XV, fig. 39 et 40). Cette coloration résiste à la déshydratation et au montage dans le baume du Canada. Après incubation dans la mélange succinate-iodo-nitro B T, le formazan se dépose aussi sur deux hélices, mais de façon très discontinue (Pl. XV, fig. 41). Si après cette incubation, on traite les préparations par la technique de l'A.P.S, on observe que l'hélice principale, colorée en rouge par le réactif de Schiff, se place dans les intervalles laissés libres par les deux hélices colorées par le formazan. Ces deux hélices sont donc les hélices secondaires.

Une faible coloration de formazan s'observe sur les hélices secondaires après incubation dans un milieu dépourvu de succinate.

2) Après incubation dans le mélange "Nadi" selon Moog (1943) nous n'avons pu observer de coloration de la pièce intermédiaire, ou alors celle-ci est si faible et si diffuse qu'il est impossible de la distinguer d'un simple artéfact optique. Chez <u>Helix pomatia</u> après incubation dans le milieu de Burstone ou dans le mélange "Nadi" de Moog, nous avons obtenu un résultat analogue.

B. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE:

1) Succino-déshydrogénase:

Les observations faites en microscopie électronique sur des coupes de tissus incubés dans le mélange succinate-nitro B T confirment celles que nous avons faites en microscopie ordinaire. Les grains de formazan, opaques aux électrons, sont plus ou moins aggrégés en rosettes de dimensions variables, la moyenne se situant entre 300 et 800 Å. Ils se localisent électivement sur les hélices secondaires (Pl. XVI, fig. 42 et 43).

Nous avons également observé ce dépôt après incubation dans un milieu dépourvu de succinate, mais de façon beaucoup moins abondante.

2) Cytochrome-oxydase:

Après incubation dans le mélange de Burstone, on observe de nombreuses granulations opaques aux électrons, pour la plupart inférieures à 200 Å et réparties un peu partout sur les coupes. L'examen attentif de leur localisation révèle que les dépôts non spécifiques se rencontrent surtout sur les membranes, jamais sur les noyaux et très rarement libres au sein du cytoplasme ou dans les espaces intercellulaires. Sur les coupes transversales de spermatozoïdes, les grains sont en majorité situés sur le cristal et sur les membranes limitant les hélices; il y en a aussi quelques uns sur les hélices secondaires, mais on n'en voit que très rarement sur l'hélice principale. (Pl. XVII, fig. 44)

Après traitement par le mélange de Burstone, la conservation morphologique est mauvaise. Elle est bien meilleure après incuba-

tion dans le mélange "Nadi" (Moog 1943). Après action de ce réactif, le microscope électronique révèle sur les coupes fines, des dépôts opaques aux électrons, assemblés en petits granules, dont la taille moyenne se situe entre 100 et 400 Å. On observe peu de dépôts non spécifiques, la majorité des grains sont localisés sur le cristal, il y en a aussi quelques uns sur les hélices secondaires, sur les enroulements membraneux de l'hélice principale, et sur les membranes de façon générale (Pl. XVIII, fig. 45).

D I S C U S S I O N

I. INTERPRETATION CYTOCHIMIQUE DE LA STRUCTURE:

Les résultats que nous venons de rapporter nous amènent à compléter et discuter l'interprétation cytochimique qu'avait proposée André (1962) de l'ultrastructure de la pièce intermédiaire.

A. LE MATERIEL CRISTALLIN:

La positivité du matériel cristallin aux réactifs des protides, sa négativité vis à vis des colorants liposolubles, sa digestibilité aux protéases, sa résistance au traitement délipidant, nous conduisent à conclure à la nature protidique du paracristal. L'hypothèse émise par André, essentiellement fondée sur des données morphologiques est ainsi vérifiée.

Il est à souligner que ces protéines sont pepsine-sensibles et trypsine-résistantes, c'est ainsi que se comportent globalement les mitochondries de tissus soumis aux digestions protéolytiques en coupes ultrafines (Leduc et Bernhard 1961). Il y a donc sous le rapport de la sensibilité aux protéases, une parenté entre les protéines, ou tout au moins la majorité des protéines des mitochondries banales, et celles qui constituent le cristal de la Testacelle, en dépit d'un arrangement structural très différent.

Le tableau II montre que nous n'avons pas observé d'action de la pepsine ou de la trypsine sur du matériel fixé au Carnoy ou au formol à la température ordinaire. Ce phénomène est peut-être dû à une fixation trop poussée (fixation à la température du labora-

toire). Selon Leduc et Bernhard (1961), la fixation au formol à la température ordinaire renforce la résistance des protéines à la pepsine et surtout à la trypsine. Ces auteurs constatent que si la fixation est effectuée à 3°, les mitochondries du pancréas de rat sont digérées par la pepsine après 20 minutes; mais après une fixation à 20° pendant 50 minutes, elles ne sont pas digérées après 23 heures. Pour la trypsine, 23 heures d'incubation des tissus fixés à 20° sont nécessaires pour obtenir le même effet qu'après une incubation de 4 à 6 heures sur des tissus fixés à 3°.

Il est raisonnable de penser que ces protéines sont douées de propriétés enzymatiques. En effet, selon André (1962), le paracristal "tire son origine d'un remaniement des molécules engagées dans les crêtes et le feuillet interne de l'enveloppe". Or 25% ou plus des protéines des membranes mitochondriales correspondent aux enzymes de la chaîne respiratoire (Lehninger 1964). Après incubation dans le mélange "Wadi" (Pl. XVIII, fig. 45) ou dans le mélange de Burstone (Pl. XVII, fig. 44), on observe que la majorité des dépôts sont sur le cristal. Dans la mesure où la localisation du produit final correspond bien à celle de l'activité enzymatique, les observations de la répartition des dépôts montrent que l'activité cytochrome-oxydasique est importante sur le cristal. Ces faits peuvent affermir l'hypothèse d'André selon laquelle les protéines cristallisées seraient de nature enzymatique, hypothèse fondée essentiellement sur la ressemblance morphologique signalée par André entre les "particules élémentaires" décrites par Fernandez- Moran (1961 et 1964), et interprétées par lui comme étant des protéines de la chaîne des transporteurs d'électrons, et les tubules de 90 A de diamètre qui constituent le motif du cristal.

B. L'HELICE PRINCIPALE:

a) La série des réactions d'oxydation-Schiff et l'action de l'amylase nous ont amené à conclure que l'hélice principale contient un polysaccharide qui réagit comme le glycogène. A la même localisation, le microscope électronique montre des grains colorables au plomb, disparaissant par l'amylase, morphologiquement identiques aux granules de glycogène monoparticulaire nommés granules β par Drochmans (1962) et que l'on retrouve dans les organes et les animaux les plus divers (Biava 1963; voir dans Revel 1964 une revue de ces travaux). Ces deux séries convergentes de constatations démontrent que nous avons affaire à du glycogène sous la forme β .

Chez l'Escargot, nous avons retrouvé ce glycogène sous la forme de rosettes, c'est à dire sous la forme α selon la terminologie de Drochmans (1962). Une légère action de la pepsine met en relief les granules β de glycogène monoparticulaire les constituant (Pl.VII, fig. 18).

Le fait qu'une digestion trypsique seule dissocie les granules et les rend encore plus visibles suggère que ces granules de glycogène sont associés, d'une manière ou d'une autre, à une protéine que l'on peut penser être soit une protéine structurale soit, plutôt, une protéine fonctionnelle ayant pris part à leur formation ou destinée à leur dégradation. C'est sans doute cette protéine qu'une coloration à l'acétate d'uranyle après inclusion au méthacrylate met en évidence sous la forme d'un réseau faiblement grisé (André 1962; Pl.VI, fig.17); selon toute vraisemblance, les grains de glycogène sont situés dans les mailles du réseau, mais ne sont pas mis en évidence par cette technique.

Nous avons constaté que pour obtenir la disparition du glycogène,il était nécessaire de faire une digestion trypsique avant la digestion amylasique,lorsque nous opérons sur des cellules entières (microscopie électronique). Mais la digestion trypsique n'est pas nécessaire si nous opérons sur des coupes (microscopie ordinaire). Cette différence tient sans doute à la pénétration de l'amylase. Cette enzyme est en contact direct avec le contenu de l'hélice dans le cas des coupes,alors que dans le cas des cellules entières,elle doit traverser diverses membranes et le manchon paracristallin protéique. La molécule d'amylase,assez grosse molécule,ne pénétre que très lentement. Une digestion trypsique préalable fait disparaître les membranes et disloque le cristal protéique (Pl. VI,fig. 17);l'accés de l'amylase à son substrat est ainsi facilité.

b) <u>les enroulements membraneux</u>: André (1962) a signalé la présence d'enroulements membraneux dans l'angle externe de l'hélice principale.Ils n'ont pas une répartition longitudinale continue tout le long de l'hélice principale;ils sont bien visibles dans les portions antérieures et médianes,mais paraissent absents des portions postérieures.

En microscopie ordinaire, après action du noir Soudan sur un frottis de tissu non fixé,nous observons une coloration de l'hélice principale,localisée à la région médiane et qui se présente sous la forme d'un chapelet de grains discontinus et de répartition longitudinale irrégulière.

La concordance de localisation dans les deux cas montre que c'est bien sur les enroulements membraneux de type myélinique de

l'hélice principale que se fixe le noir Soudan. Ces éléments ne se colorent au noir Soudan que sur du matériel non fixé. Un tel phénomène a déjà été signalé par Elftman (1958). Cet auteur a constaté que certaines études sur les lipides s'accomodent mieux de la coloration au noir Soudan effectuée sans fixation préalable. Il a mis en évidence par cette technique, les figures myéliniques de la glande pituitaire antérieure du rat.

C. LES HELICES SECONDAIRES:

En microscopie ordinaire, on observe qu'elles ne se colorent pas par le noir Soudan (Pl. XIV, fig. 36 et 37); et en microscopie électronique, après action du mélange de Keilig, on ne note pratiquement pas de modifications des hélices secondaires. Ces résultats ne nous permettent pas de vérifier l'hypothèse d'André sur la présence de lipofuschine dans leur contenu.

Leur coloration par les réactifs des protides et les résultats de l'action des protéases, nous conduisent à conclure à leur nature protidique.

Ces protéines sont vraisemblablement douées d'activité enzymatique, puisque c'est là que se dépose le formazan dans un milieu pourvu de succinate (Pl. XV, et XVI). Cependant, l'on sait que la localisation du formazan peut-être trompeuse, en raison d'une solubilité des formazans dans les lipides et de leur tendance à se déposer sur les interfaces eau-lipides (Novikoff 1961). Ces faits rendent problématique l'inférence de la position des enzymes dans la cellule vivante à partir de la localisation des dépôts du colorant. Une chance subsiste cepen-

dant qu'après incubation dans le mélange succinate-nitro BT, les dépôts de formazan se fixent sur les sites d'activité succino-déshydrogénasique. Dans le spermatozoïde de la Testacelle, cette enzyme serait donc localisée dans les hélices secondaires.

II. INTERPRETATION FONCTIONNELLE:

La "métamorphose mitochondriale", en dehors de la formation d'une structure nouvelle, se traduit par l'apparition d'un constituant nouveau au sein des mitochondries, le glycogène, et par une ségrégation du matériel enzymatique. Ces résultats nous conduisent à envisager l'interprétation fonctionnelle des transformations qui se produisent au cours de ce phénomène et de l'élément qui en résulte.

A. LA PRESENCE DE GLYCOGENE:

Le dépôt de glycogène commence peu après la métamorphose mitochondriale (André 1962), c'est à dire dans la spermatide d'âge moyen. Il augmente progressivement au fur et à mesure de la maturation du gamète. Pendant ce temps, le métabolisme général de la cellule change profondément: le noyau devient compact et entre en phase d'inertie; la majeure partie du cytoplasme est expulsée. Ce qui reste du cytoplasme est le chondriome métamorphosé, dont il y a tout lieu de penser que l'activité respiratoire est faible. Aucune donnée expérimentale n'existe à ce sujet, mais on sait que ces spermies sont encore immobiles au stade où nous les avons étudiées et qu'elles sont sur le point d'être emmagasinées dans le réceptacle séminal du conjoint, où elles entrent en diapause. Ainsi l'accumulation du glycogène mitochondrial se fait à un moment où la consommation d'énergie par la cellule diminue très largement. Ces

faits suggèrent que l'accumulation du glycogène est un stockage énergétique. Il est probable que cette réserve est catabolisée ultérieurement au moment de la fécondation.

Beaulaton (1964), Tandler et Shipkey (1964), ont récemment rapporté d'autres exemples d'accumulation intramitochondriale de glycogène, respectivement dans la glande prothoracique du ver à soie du chêne et dans la tumeur de Warthin. Il est intéressant de remarquer que dans les deux cas, l'accumulation de glycogène se fait dans des mitochondries plus ou moins transformées, de cellules se trouvant, comme chez la Testacelle, dans une phase où leur métabolisme est profondément modifié. Dans la tumeur de Warthin notamment, il semble que les mitochondries sont biochimiquement moins efficientes que dans les cellules normales. Il apparaît donc que certains chondriosomes spécialisés puissent jouer un rôle dans le métabolisme des polysaccharides. Ce rôle est encore tout à fait inconnu, mais il est sans doute plus facile à concevoir si l'on admet, avec certains auteurs (Chévremont 1963, Nass et Nass 1963, Swift 1964, Luck 1964, Ris communication personnelle), que les mitochondries contiennent de l'ADN, car il pose le problème de l'apparition à l'intérieur de mitochondries, d'enzymes qui en sont normalement absentes.

B. LA SEGREGATION ENZYMATIQUE:

Nous avons rappelé précédement qu'en ce qui concerne la détection des activités enzymatiques, il est toujours problématique d'inférer la position des enzymes sur le vivant de la localisation du produit final. Cependant une telle inférence est possible dans la mesure où il n'y a eu ni solubilité, ni migration du colorant.

Chez la Testacelle, la comparaison des dépôts de formazan, après incubation dans le mélange succinate-nitro B T, et de ceux obtenus après incubation dans le mélange "Nadi", montre que leur localisation est différente. Ce résultat peut indiquer une différence de localisation des activités cytochrome-oxydasique et succino-déshydrogénasique. La succinodéshydrogénase serait uniquement localisée aux hélices secondaires, tandis que les protéines du cristal renfermeraient la majorité de l'activité cytochrome-oxydasique. La séparation que l'on constate entre ces deux activités enzymatiques qui font partie de la chaîne respiratoire, pose le problème du fonctionnement de ce dérivé mitochondrial comparé à celui des mitochondries normales.

Par leur production d'ATP, les mitochondries sont les systèmes générateurs d'énergie de la cellule. Il est généralement considéré que les enzymes du cycle de Krebs sont localisées dans la matrice, tandis que les enzymes de la chaîne respiratoire feraient partie intégrante des crêtes et du feuillet interne de l'enveloppe (Lehninger 1964), dont elles représenteraient environ 25% du contenu protéinique. Pour certains auteurs, les enzymes de la chaîne respiratoire se trouveraient dans les particules mises en évidence par diverses techniques sur les crêtes: "elementary particles (E.P) de Fernández-Morán (1961 et 1964), "inner membrane subunits" de Parsons (1963). Fernández-Morán (1964) a montré que ces particules élémentaires se composent de trois parties: une tête globuleuse de 80 à 100 A de diamètre ayant la même taille que les particules trouvées dans des préparations de cytochrome oxydase purifiée; une tige, siège du complexe III(coenzyme QH2 cytochrome c reductase); une pièce basale qui contient les complexes I (succinate coenzyme Q réductase) et II (DPNH coenzyme Q réductase). Ces deux derniers

complexes pourraient être en relation avec le succinate et le DPNH localisés dans l'espace intermembranaire. Pour d'autres auteurs,Chance (1964),Stasny et Crane(1964),la chaîne des transporteurs d'électrons se trouverait,dans les mitochondries intactes,sur les membranes elles-mêmes et non sur les particules. Cette opinion est aussi celle de Lehninger (1964) pour lequel les "assemblées respiratoires" ne peuvent-être séparées des membranes.

Chez la Testacelle,la morphologie est toute différente. Il n'y a plus de crêtes,il ne subsiste des membranes que l'externe,et il y a apparition d'une structure nouvelle cristalline. Nous avons quelque évidence que ce cristal possède une activité cytochrome-oxydasique. Cette parenté cytochimique renforce la ressemblance morphologique signalée par André (1962) entre les tubules qui le constituent et les"particules élémentaires".

Ces résultats suggèrent que lors de la "métamorphose mitochondriale",il y a une dislocation des membranes et une libération des molécules qui les constituent lors de la phase floue (André 1962). Par la suite,au cours d'un véritable tri,elles se ségrègent,puis se réassocient en une architecture nouvelle,le cristal.

L'apparition de tubules de morphologie voisine de celle des "particules élémentaires" doit-être rapprochée de l'opinion de certains auteurs pour qui les "particules élémentaires" apparaissent à la suite de réassociations moléculaires provoquées par les traitements appliqués aux mitochondries (Sjostrand et coll.1964).Mais,le phénomène se produit ici spontanément,sans intervention de l'expérimentateur.Il tend donc à faire considérer les "particules élémentaires" comme une réalité physiologique,même si les mitochondries banales ne les montrent

d'ordinaire pas après les techniques banales.

Green et Lehninger ont insisté sur la nécessité pour les enzymes des membranes d'être fixées dans un ordre strict et déterminé par la séquence de la chaîne des réactions. Or, chez la Testacelle il semble y avoir une séparation de deux activités de cette chaîne dans des régions différentes et un état de concentration d'une grande partie des molécules incompatibles avec un tel arrangement.

Il est probable que cette situation inhabituelle trouve son explication dans le fait que les spermatozoïdes mûrs se trouvent dans un état d'inertie qu'ils ne quittent que lors de la période d'activation qui précède la fécondation. Il est probable que lors de la reprise d'activité des spermatozoïdes, les modifications inverses se produisent. Les molécules enzymatiques reprenant vraisemblablement une disposition propice à leur fonctionnement pourront cataboliser l'important stock énergétique que représente l'accumulation du glycogène, et permettre par une abondante synthèse d'A.T.P, l'intense activité cellulaire qui se produit à ce moment là.

R E S U M E

L'étude cytochimique du dérivé mitochondrial du spermatozoïde de la Testacelle a été faite corrélativement avec le microscope ordinaire et avec le microscope électronique.

Elle met en évidence:

- la présence, dans l'hélice principale, d'un stock de glycogène monoparticulaire associé à une protéine.
- la nature protéinique du cristal et du contenu des hélices secondaires.
- la localisation probable de l'activité cytochrome-oxydasique dans le cristal et de l'activité succino-déshydrogénasique dans les hélices secondaires.

Une interprétation fonctionnelle de ces résultats est proposée: le glycogène représenterait un stockage énergétique probablement utilisé lors de la fécondation; les protéines enzymatiques des mitochondries originelles se seraient segrégées et réassociées en une architecture nouvelle, où elles subsisteraient à l'état latent, à l'image des nucléoprotéines du noyau.

Mes remerciements vont au Docteur Bernhard qui a eu la bonté de m'accueillir dans son laboratoire où la partie microscopie électronique de ce travail a été faite, et au Professeur Durchon qui a accepté de présider ce jury et qui m'a fort aimablement ouvert les portes de son laboratoire de photographie.

Je suis très reconnaissant au Professeur André de m'avoir confié cette étude. C'est à ses précieux conseils et à sa collaboration active, notamment pour la microscopie électronique que je dois de présenter aujourd'hui ces résultats.

Je suis très redevable à Madame Odile Lepape et à Messieurs Thomeret et Lazarecki d'avoir effectué le travail photographique.

BIBLIOGRAPHIE

ACKERMAN,G.A.,1952. A modification of the sudan black B technique for the possible cytochemical demonstration of masked lipids. Science, 115,629-631.

ALFERT,M.,et GESCWIND,I.,1953. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc.Nation. Acad. Sci., 39,(10), 991-999.

ANDRÉ,J.,1962. Contribution à la connaissance du chondriome. "Etude de s s modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse". J. Ultrastructure Res., Suppl. 3, 1-185 .

BACQ,Z.M., CHEVREMONT,M., et FREDERIC,J.,1943."Une nouvelle méthode histochimique de détection des groupes sulfhydriles". Acta Biol.Belg., 3, 62-64 .

BAKER,J.R.,1946. The histochemical recognition of lipine. Quart.J. micr. Sci., 87, 441.

BARRNETT,R.J.,et SELIGMAN,A.M.,1952. Demonstration of protein bound sulfhydryl and disulfide groups by two new histochemical methods. J. Nat. Cancer Inst.,13,215-216 .

BEAULATON,J.,1964. Sur l'accumulation intramitochondriale de glycogène dans la glande prothoracique du ver à soie du chêne Antherea pernyi (Guér.) pendant les quatrièmes et cinquièmes stades larvaires. Comptes-Rend. Acad. Sc.,258, 4139-4141 .

BENSLEY,R.R.,et GERSH,L.,1933. Studies on cell structure by the Freezing-Drying method. II. The nature of the mitochondria in the hepatic cell of amblystoma. Anat. Rec., 57, 217-237 .

BEST,F.,1906. Uber Karminfarbung des Glykogens und der Kerne. Z.wiss. Mikr., 23, 319-322 .

BIAVA,C.,1963. Identification and structural forms of human particulate glycogen. Laboratory Investigation,12, 1179-1197.

BOHMAG,P.F., 1955. Histochemical studies of the ovarian nurse tissues and oocytes of the milkweed bug,Oncopeltus fasciatus (Dallas). J.Morphol., 96, 381-438 .

BULMER,D., 1959. Dimedon as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. Stain Tecnology, 34, 95-98.

BURSTONE,M.S.,1955. Histochemical methods for protein group . J.Histochem. Cytochem., 3, 32-49 .

BURSTONE,M.S., 1959 . New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome-oxidase). J. Histochem. Cytochem., 7, 112-122 .

CAIN,A.J., 1950 . The histochemistry of lipids in animals. Biolog. Rewiews,Cambridge Philosoph. Soc., 25, 73-112 .

CASELLA,C.,1942. II. Permanganate di Potassio quale ossidante in aleune reazioni istochimiche dei polysaccaridi. Anat. Anz., 93, 289-299 .

CHANCE,B., ESTABROOK,R.W., et LEE,C.P.,1963. Electron transport in oxysomes . Nature,140, 379-380 .

CHANCE,B., 1964. Cytochrome content of mitochondria stripped of inner membrane structure. Nature,143, 136-139 .

CHEVREMONT,M.,1963. Cytoplasmic deoxyribonucleic acids:their mitochondrial localization and synthesis in somatic cells under experimental conditions and during the normal cell cycle in relation to the preparation for mitosis. International Society for Cell Biology,Vol.II, Academic Press Inc., New York,323-333 .

CIACCIO,C., 1926 . Sur la distribution des lipoïdes histogènes (histolipoïdes) dans la cellule. C.R. Ass. Anat.,21,160.

CRIEGEE,R ,1930. Oxydation ungesättiger Kohlenwasserstoffe mit Blei(4) salzen. Liebigs Ann. Chem.,481,263-302 .

CRIEGEE,R.,1931. Eine oxydative Spaltung von Glykogen.II.mitteil,über oxydationen mit Blei (IV)salzen. Ber.deut.chem. Ges.,64,260-6 .

CRIEGEE,R., 1932. Eine neues Verfahren zur Bestimmung der Ringstruktur von Zuckern und Zuckerderivaten. Ann. Chemie,495, 211-225)

CRIEGEE,R., 1937. Die oxydative Spaltung der C-C Bindung. Angew.Chem., 50,153-155 .

DEITCH,A.D., 1955. Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye,naphtol yellow S,by tissue sections and by purified proteins. Laboratory Investigation, 4, 324-351 .

DIETRICH,A.,1910 . Zur Differenzialdiagnose der Fettsubstanzen. Verh. dtsch. path. Ges., 14, 263.

DROCHMANS,P.,1962. Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. J.Ultrastructure Res., 6, 141-161 .

ELFTMAN,H., 1958. Effects of fixation in lipoid histochemistry. J.Histochem. Cytochem.,6, 319-321 .

ELFTMAN,H.,1958 . Combined Schiff procedures. Stain Technology,38, 127-130 .

FERNÁNDEZ-MORÁN,H.,1962. Molecular organization of the cell membranes. Circulation,26, 1039 .

FERNÁNDEZ-MORÁN,H., ODA,T., BLAIR,P.V.,et GREEN,D.E.,1964 . A macromolecular repeating unit of mitochondrial structure and function. Correlated electron microscopic and biochemical studies of isolated mitochondria and submitochondrial particles of beef heart muscle. J. Cell Biol.,22, 63- 100 .

GATENGY,J.B., 1918 . The cytoplasmic inclusions of germ-cells. III.The spermatogenesis of some other pulmonates. Quart. J. Micr. Sc.,63,197-258 .

GRASSE,P.P.,CARASSO,N.,et FAVARD,P.,1956. Les ultrastructures cellulaires au cours de la spermiogènése de l'Escargot (Helix pomatia L.) : évolution des chromosomes,du chondriome,de l'appareil de Golgi,etc... Ann. Sci. Nat. Zool. 11ème série, 339-380 .

GREEN,D.E.,HAFETI,Y.,1961. The mitochondrion and biochemical machines. Science, 133,13-19 .

GREEN,D.E., 1964. The mitochondrion. Scientific American,210, 63-74 .

HALE,C.W.,1946. Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues. Nature,157, 802 .

HOTCHKISS,R.D.,1948. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch. Biochem.,16, 131-141 .

IDELMAN,S.,1964. Action du methanol-chloroforme sur les liposomes des cellules cortico-surrénales. Comptes-Rend. Acad. Sc.,257,297-298 .

KARNOVSKY,M., 1961. Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy. J. Biophysic. Biochem. Cytol.,11,729-732 .

KEILIG,I.,1944 . Uber Spezifitätsbreite und grundlagen der Markscheidenfärbungen. Virchows Arch.,312,405-420 .

LAZAROW,A., et COOPERSTEIN,S.J.,1953 . Studies on the enzymatic basis for the Janus green B staining reaction. J. Histochem.Cytochem.,1, 234-241 .

LEDUC,E.H., et BERNHARD,W.,1961 . Ultrastructural cytochemistry. Enzyme and acid hydrolysis of nucleic acids and protein. J. Biophysic.Biochem. Cytol.,10, 437-455 .

LEHNINGER,A.L., 1964. The mitochondrion. W.A. Benjamin,Inc.,New York.

LHOTKA,J.F., 1952. Histochemical use of sodium bismuthate. Stain Technology,27, 259-262 .

LILLIE,R.D.,1954 . Histopathologie Technic and Practical Histochemistry. 2nd.Edn.,Blakiston, New York .

LILLIE,R.D., 1958 . Acetylation and nitrosation of tissue amines in histochemistry. J. Histochem. Cytochem., 6, 352-362 .

LISON,L.,1949 . Sur la réaction de Bauer appliquée à la recherche histochimique du glycogène. C.R.Soc.Biol.,143,117 .

LISON,L.,1960. Histochimie et cytochimie animales . Gauthier-Villars, Paris.

LUCK,D., 1964. Some aspects of mitochondria synthesis in Neurospora. Fourth Annual Meeting of the American Society for Cell Biology,Cleveland

LUFT,J.,1961. Improvements in epoxy resin embedding methods . J. Biophysic. Biochem. Cytol., 9, 409-414 .

Mc. MANUS J.F.A., 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature,158, 202 .

Mc. MANUS,J.F.A., et CASON,J.F.,1950. Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques . I. periodic acid methods. J.Nat.Cancer Inst.,10, 1343 .

Mc.MANUS,J. .A.,et CASON,J.F.,1950 . Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques . I. periodic acid methods. J.exp.Med., 91,651-654 .

MICHAELIS,L.,1900 . Die vitale Farbung,eine Darstellungsmethode der Zellgranula. Arch.Mikroskopy Anat., 55, 558-575 .

MILLONIG,G.,1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO4 solutions in fixation . J.Appl.Phys.,32,1937 .

MOOG,F.,1943. Cytochrome oxidase in early chick embryos. J.Cell.comp. Physiol.,22, 223-231 .

MULLER,G.,1955. Uber eine Vereinfachung der Reaktion nach Hale (1946). Acta Histochem.,2,68-70 .

NASS,M.M.K., et NASS,S.,1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. J.Cell Biol., 19, 593-611 .

NASS,S.,et NASS,M.M.K., 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. J.cell Biol.,19, 613-629 .

NACHLAS,M.M.,TSOU,K.C.,DE SOUZA,E.,CHENG,C.S.,et SELIGMAN,A.M.,1957. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-Nitrophenyl substituted ditetrazole. J.Histochem.Cytochem.,5, 420-436 .

NOVIKOFF,A.B.,1961. Mitochondria (chondriosomes) in BRACHET,J.,and MIRSKY,A.E. (Eds.),The Cell,Vol II,299-421 .

PEARSE,A.G.E.,1961. Histochemistry Theorical and Applied. J et A.Churchill,London.

PARSONS,D.F.,1963. Mitochondrial structure:two types of subunits on negatively stained mitochondrial membranes. Science,140, 985-987 .

REVEL,J.P.,1964. Electron microscopy of glycogen. J.Histochem.Cytochem., 12, 104-114 .

RIS,H., Communication personnelle.

SCHIMIZU,N.,et KUMAMOTO,T.,1952. A lead tetra-acetate Schiff method for polysaccharides in tissue sections. Stain Technology, 27, 97-106 .

SJÖSTRAND,F.S.,ANDERSSON CEDERGREN,E., and KARLSSON,U.,1964. Myelin-figures formed from mitochondrial material. Nature,202, 1075-1078 .

SMITH,J.L.,MAIR,W.,and THORPE,J.F.,1909. An investigation of the principles underlying Weigert's method of staining medullated nerve. J. Path. Bact., 13,14.

STASNY,J.T.,and CRANE,F.L.,1964. The effect of sonic oscillation on the structure and function of beef heart mitochondria. J. Cell Biol., 22, 49-62 .

STEEDMAN,H.F.,1950. Alcian blue 8GS: a new stain for mucin. Quart.J. Micr.Sci.,91, 477-479 .

SWIFT,H.,1964. Nucleic acids of mitochondria and chloroplast. II ème Congrès International d'Histochimie et de Cytochimie,Francfort; Schiebler,T.H.,Pearse,A.G.E, et Wolff,H.H. Editeurs;Springer-Verlag, Berlin, 82.

TANDLER,B., and SHIPKEY,F.H.,1964. Ultrastructure of Warthin's Tumor. I. Mitochondria. J. Ultrastructure Res.,11,292-305 .

TAHMISIAN, Th.N., 1964. An orderly domains of particles associated with cytomembranes during spermatogenesis in Helix aspersa. Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 64, 25-31 .

VAN DUIJN, P., 1961. Acrolein-Schiff, a new staining method for proteins. J. Histochem. Cytochem., 9, 234-241 .

TABLEAU I : Glucides

REACTION	METHODE	FIXATEUR	COLORATION DE L'HE ICELPRINCIPALE
- A.P.S (Hotchkiss 1948 - Mc.Manus 1946)	F,P	B,H,A,F-cal, Fl(ss.ac.),F	+
- Acide chromique-Schiff (Bauer 1933, modifié par Lison 1949)	F,P	H,B,F-cal	+
- Permanganate de potassium-Schiff (sol.aq. 0,5%; Casella 1942)	P	B,H	+
- Bismuthate de sodium-Schiff (Lhotka 1952)	P	B	+
- T.A.P-Schiff en milieu anhydre (Criegee 1930,1931,1932,1937;modifié par Lison 1960;20 minutes à la température du laboratoire)	P	B,H	-
T.A.P-Schiff en milieu non anhydre (Schimizu et Kumanoto 1952;20 minutes à la température du laboratoire)	P	B,H,F-cal	+
- A.P.S-dimédon (Bulmer 1959)	P	B,H,F-cal	+
- A.P.S après acétylation (Mc.Manus et Cason 1950;Lison 1960)	P	H	-
- A.P.S après pyridine (3 heures)	P	B,H	+
-A.P.S après acétylation puis saponification (Lillie 1954)	P	H	+
- A.P.S après digestion par l'α amylase (sol.aq. 1%,1 h. à 37°)	P	H	-
- A.P.S après digestion par la β amylase (sol.aq. 1%,1 h. à 37°)	P	H	+
- A.P.S après digestion par la salive 45 minutes à 37° (Lillie 1954)	P	H	-
- Bauer après digestion par la salive 45 minutes à 37° (Lison 1960)	P	H	-
- Schiff sans oxydation préalable (Mc.Manus 1946)	P	B,H,A,Fl(ss.ac.)	-
- Carmin de Best (1906)	P	B,H	+
- Métachromasie au bleu de toluidine (sol.aq. à 1% dans le tampon acétate M/5 pH 3,8 à 5,1;Lison 1960)	P	B,H	-
- bleu alcian (sol.0,1% dans l'acide acétique 3%,30 minutes;Steedman 1950)	P	B,H	-
- Capture du fer (Muller 1953) (réaction de Hale(1946)modifiée	P	B,H	-

METHODES: F:Frottis ; P: coupes à la paraffine

Fixateurs: A:André (1962);B:BOUIN; C:Carnoy; F:formol 10%; F-cal:formol-calcium
Fl (ss.ac.): Flemming sans acide acétique; H:Helly .

TABLEAU II : Protides

REACTION	METHODE	FIXATEUR	RESULTAT ET OBSERVATIONS	
- Bleu de bromophénol mercurique (Bonkag 1955)	E,P	H,Fl, C,B	+	les trois hélices colorées,les deux secondaires plus intensément.
- Bleu de bromophénol mercurique après digestion trypsique (0,2mg/ml dans un tampon borate 0,05 M à pH 8,9,1 heure)	E,P	C	+	La coloration subsiste
- Bleu de bromophénol mercurique après digestion pepsique (1 mg/ml dans HCl 0,02 N à pH 2, 1 heure.)	E,P	C	+	La coloration subsiste
- acroléine-Schiff (P.Van Duijn 1960)	P	H,C	+	Les trois hélices sont colorées.
- Acroléine-Schiff après acétylation (P.Van Duijn 1960)	P	H,C	-	La pièce intermédiaire n'est plus colorée.
- Chloramine T-Schiff 6 heures à 37° (Burstone 1955)	E,P	H	+	Faible coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire.
- ninhydrine-Schiff (Yasuma et Ichikawa 1953)	P	H,F	+	Faible coloration de la pièce intermédiaire.
- ninhydrine-Schiff après désamination par l'acide nitreux (Lillie 1958)	P	H,F	-	La pièce intermédiaire n'est plus colorée.
- ferricyanure ferrique (Chévremont et Frédéric 1943)	P,C	F,F-cal.	+	Coloration générale diffuse de la pièce intermédiaire.
- Ferricyanure ferrique après traitement par HgCl2	P,C	F,F-cal	+	La coloration subsiste
- DDD (Barrnett et Seligman 1952)	P	F	+	Coloration générale de la pièce intermédiaire.
- DDD après action de HgCl2	P	F	+	La coloration subsiste
- réaction de Millon (Bensley et Gersh 1933)	P	H,F,C	+	Coloration générale diffuse de la pièce intermédiaire.
- Fast Green alcalin (Alfert et Geschwind 1953)	E,P	F	-	la pièce intermédiaire est à peine colorée
- Fast Green alcalin après traitement par l'acide trichloracétique 5%,15 mn à 90° (Alfert et Geschwind 1953)	E,P	F	+	très forte coloration de la pièce intermédiaire.

METHODES: F:frottis ; P: coupes à la paraffine ; C: coupes à congélation.

FIXATEURS: A:André (1962); B:Bouin; C:Carnoy; F:formol10% ; F-cal:formol-calcium
Fl(ss.ac. : Flemming sans acide acétique ; H:Helly.

TABLEAU III : Lipides

REACTION	METHODE	FIXATEUR	RESULTAT ET OBSERVATIONS	
- Noir Soudan B	C,F	F-cal.; Da Fano	-	pas de coloration de la pièce intermédiaire
- Noir Soudan B après postchromisation	C	F-cal	-	"
- Noir Soudan B après démasquage (Ackerman 1952)	C	F-cal	-	"
- Noir Soudan B	F	non fixé	+	coloration discontinue de l'hélice principale
- Noir Soudan B à l'alcool butylique tertiaire (Lison 1960)	F	F-cal.	-	pas de coloration de la pièce intermédiaire.
- test de Baker (1946) coloration par l'hématéine acide	C	F-cal	+	Coloration générale de la pièce intermédiaire
- réaction de Smith-Dietrich (1900-1910)	C	F-cal.	+	"
- coloration par le sulfate de bleu de Nil (Lison 1960)	C	F-cal	-	pas de coloration de la pièce intermédiaire.

METHODE: F:frottis ; C: coupes à congélation

Fixateurs: A: André (1962) ; B:Bouin; C: Carnoy; F: formol 10%; F-cal.:formol-calcium; Fl (ss.ac.) : Flemming sans acide acétique ; H:Helly.

TABLEAU IV : Activités enzymatiques

REACTION	METHODE	FIXATEUR	RESULTAT ET OBSERVATIONS	
- coloration au vert Janus (Michaelis 1900)	F	matériel frais	+	coloration générale diffuse
SUCCINODESHYDROGENASE				
- Incubation dans le mélange succinate-nitro B T (Nachlas 1957)	F,C	matériel non non fixé	+	Les hélices secondaires seules sont colorées
- Incubation dans le mélange nitro B T sans succinate	F	"	+	Les hélices secondaires sont colorées,mais moins intensément.
- Incubation dans le mélange succinate-tétra-nitro B T	F	"	+	Les hélices secondaires sont colorées
- Incubation dans le mélange succinate-iodo-nitro B T	F	"	+	"
CYTOCHROME-OXYDASE				
- Incubation dans le mélange "Nadi" (Moog 1938)	F	matériel non fixé	-	Coloration faible et diffuse impossible à distinguer d'un artéfact optique.
- Incubation dans le milieu de BURSTONE (1959) (Helix pomatia)	F	"	-	"

METHODE: F:frottis; C: coupes à congélation.

PU LILLE

LEGENDE DES FIGURES

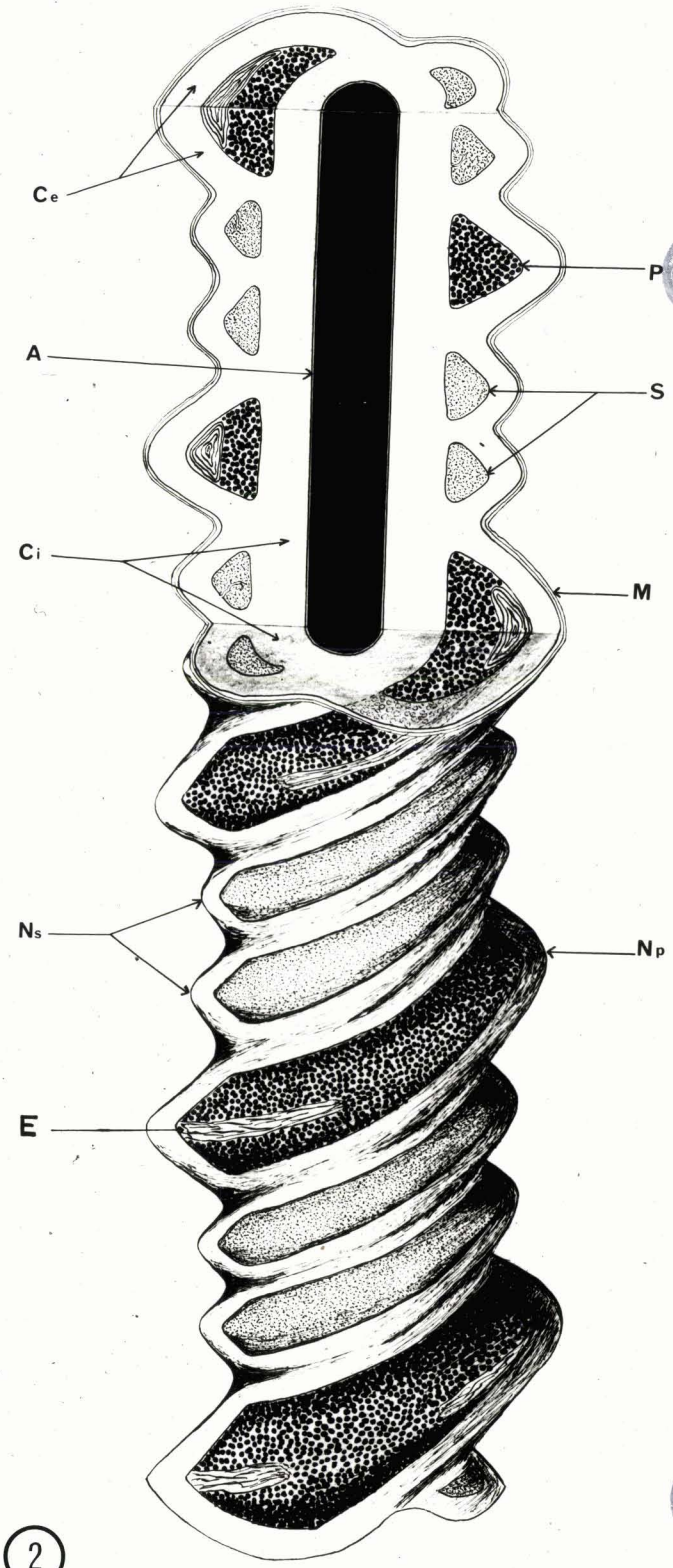
A	Axonème
C	Côte
Ci	manchon interne du paracristal
Ce	manchon externe du paracristal
E	Enroulements membraneux de l'hélice principale
G	Glycogène
M	Membrane externe
N	Noyau
Np	Nervure principale
Ns	Nervure secondaire
O	Ovocyte
P	hélice principale
S	hélice secondaire

BU LILLE

BU LILLE

PLANCHE II

Figure 2: Schéma tridimensionnel, représentant l'ultrastructure de la pièce intermédiaire du spermatozoïde de la Testacelle. Dans la portion inférieure, les hélices sont supposées vues par transparence au travers du paracristal.



BU LILLE

BU LILLE

2

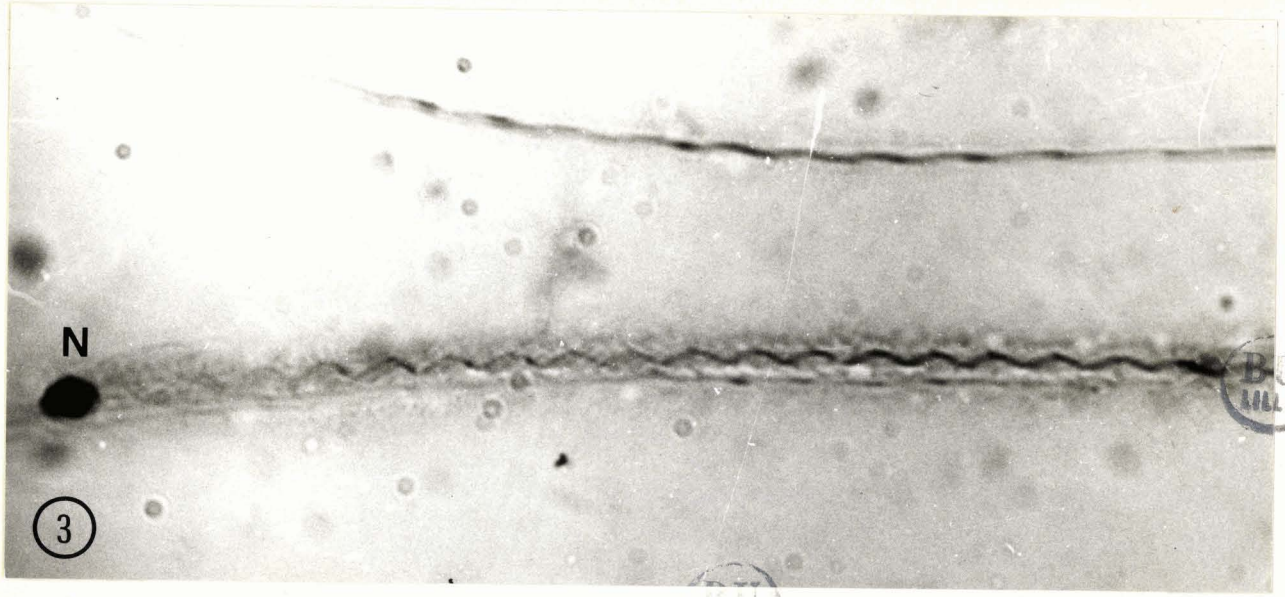
PLANCHE III

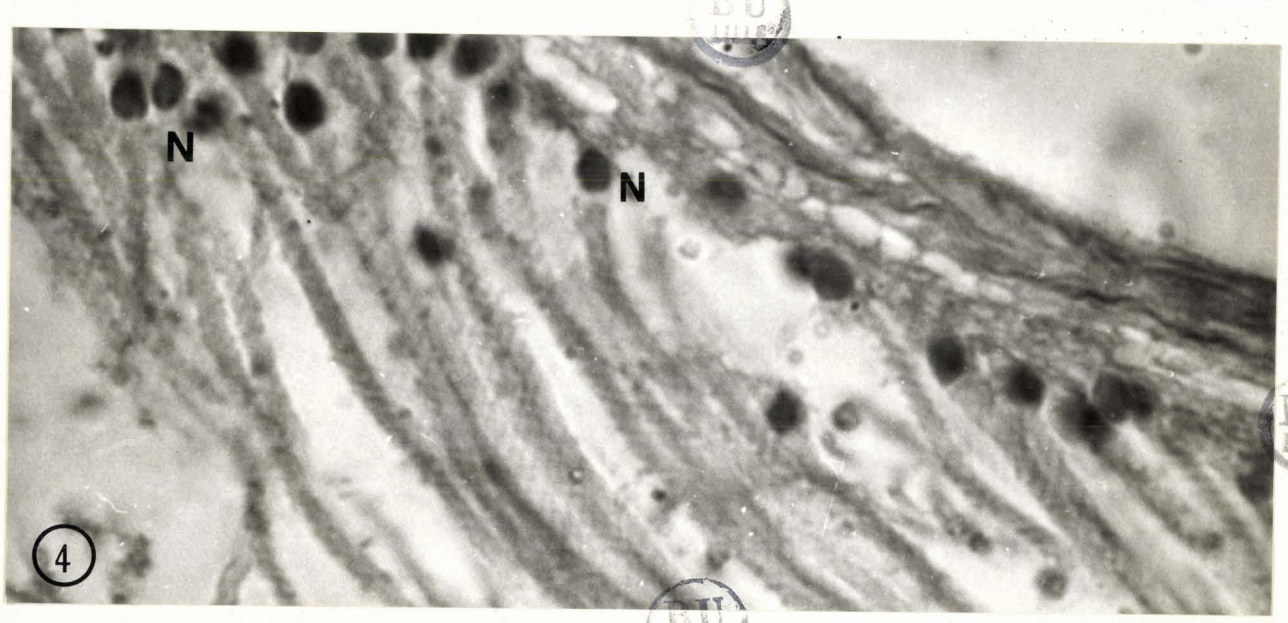
REACTIONS A.P.S. MICROSCOPIE ORDINAIRE

Figure 3: réaction Hotchkiss-Mc.Manus (frottis). Horizontalement portion antérieure d'un spermatozoïde comprenant à gauche le noyau N et le début de la pièce intermédiaire très longue et de structure hélicoïdale. On voit très nettement une hélice fortement colorée par la réaction Hotchkiss-Mc.Manus (hélice principale). Cette réaction est d'autant plus intense que l'on s'éloigne du noyau. × 2.000

Figure 4: Réaction Hotchkiss-Mc.Manus précédée d'une digestion salivaire (coupe). L'hélice principale n'est pas plus apparente que les hélices secondaires . × 2.000

Figure 5: Réaction Hotchkiss-Mc.Manus précédée d'une digestion par la β-amylase. L'hélice principale reste aussi fortement colorée par la réaction Hotchkiss-Mc.Manus que sur les préparations qui n'ont pas subi cette digestion (Figure 3) × 2.000





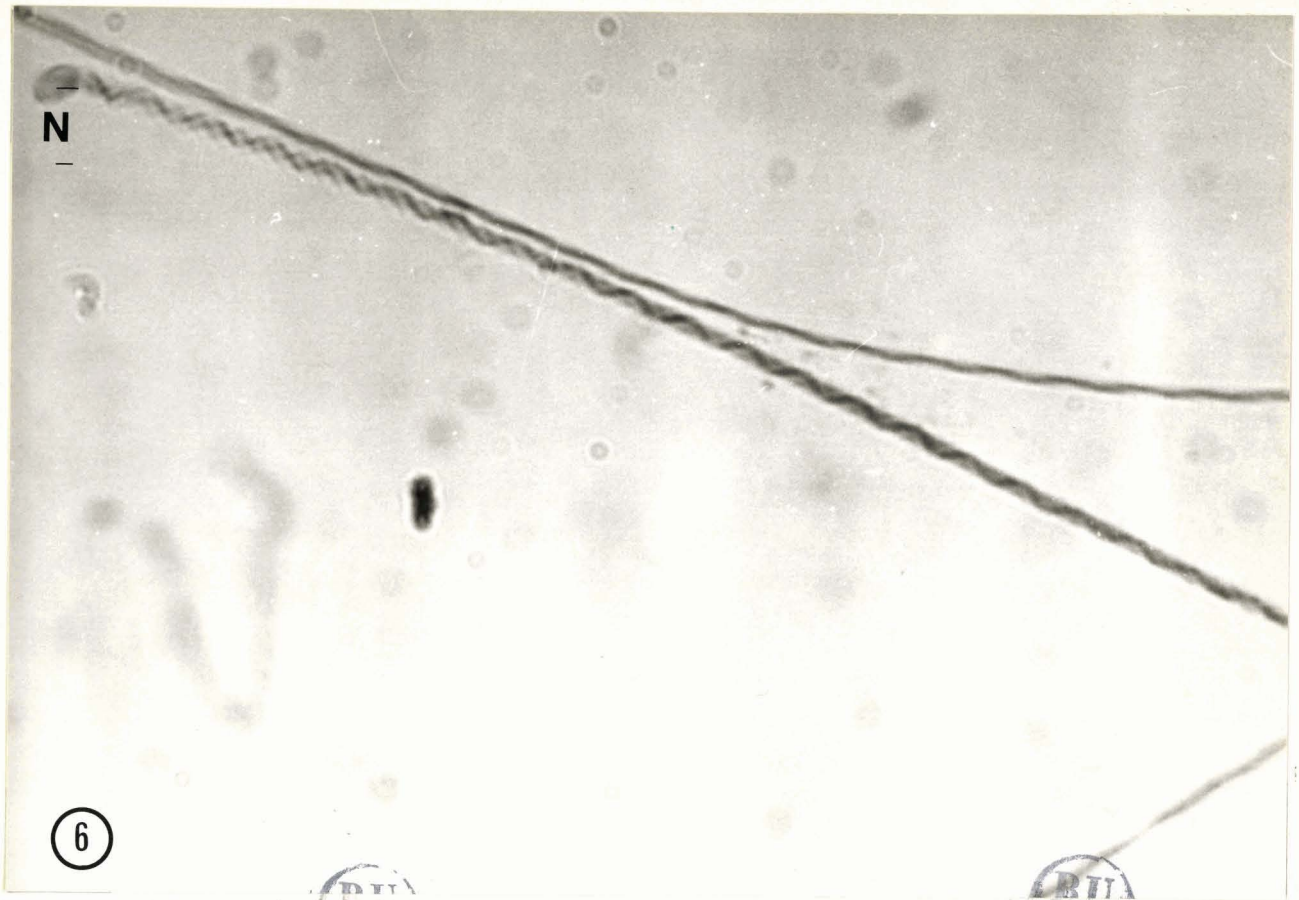
BU LILLE

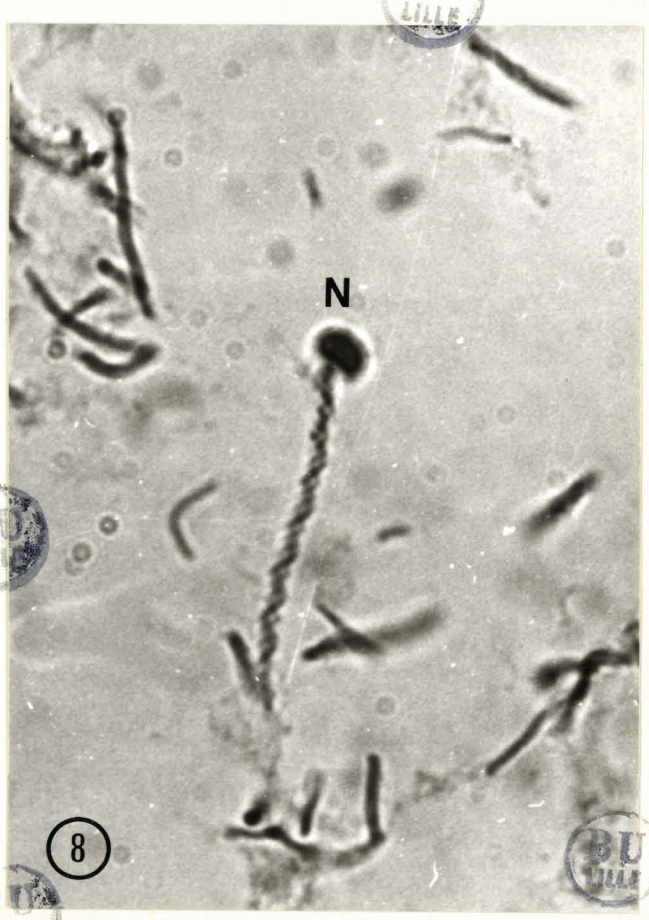
PLANCHE IV

REACTIONS A.P.S - MICROSCOPIE ORDINAIRE

Figure 6: Réaction Hotchkiss-Mc.Manus combinée avec une coloration au bleu de bromophénol mercurique (frottis). On reconnaît les trois hélices;deux d'entre elles sont faiblement colorées au bleu de bromophénol (hélices secondaires);la troisième est fortement colorée par la réaction Hotchkiss-Mc.Manus (hélice principale.) × 2.000

Figures 7 et 8: Acétylation réversible. Figure 7 Acétylation. La colorabilité de l'hélice principale est inhibée. Figure 8:Acétylation suivie de saponification.La colorabilité est régénérée. × 2.000





BU LILLE

PLANCHE V

REACTIONS DU GLYCOGENE

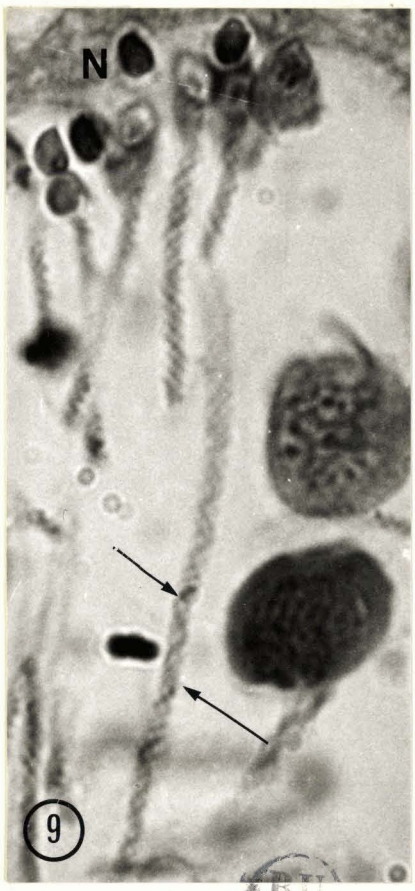
Figure 9: Réaction de Bauer (coupe). l'hélice principale est colorée (flèche). La coloration est moins intense qu'après la réaction d'Hotchkiss-Mc.Manus . × 2.000

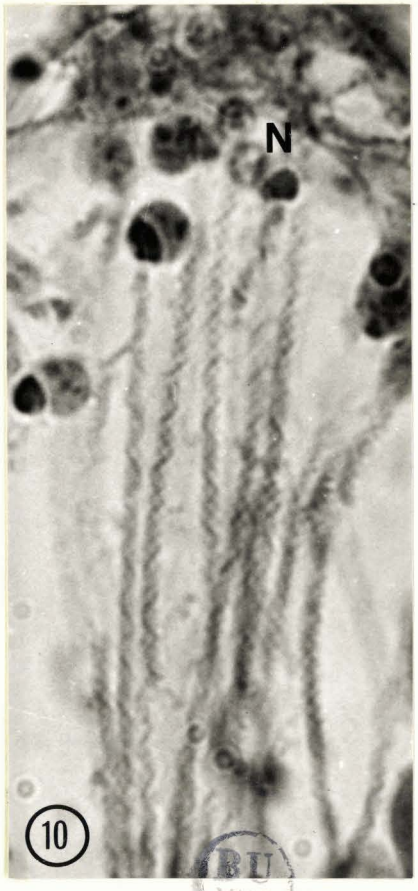
Figure 10: Réaction de Casella (coupe). L'hélice principale est colorée. × 2.000

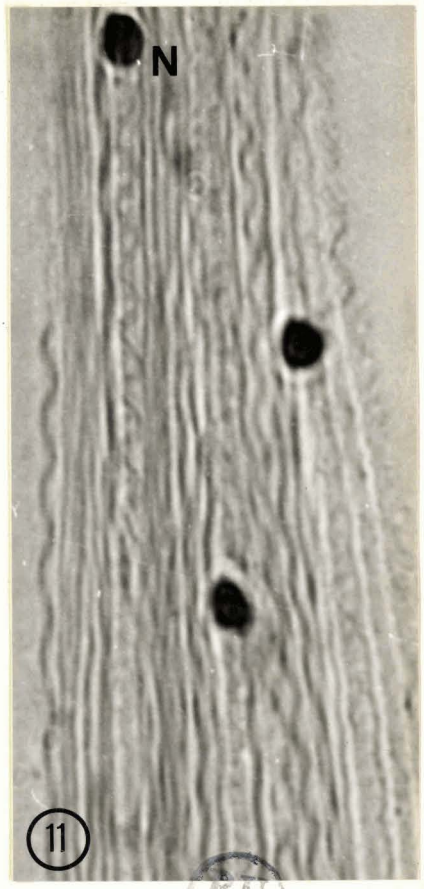
Figure 11: Coloration au carmin de Best (frottis). L'hélice principale est colorée. Le pas de l'hélice est ici très long car on est dans la portion terminale de la pièce intermédiaire. × 2.000

Figure 12: Réaction A.P.S-Dimédon, selon Bulmer. L'hélice principale garde une forte positivité au réactif de Schiff. × 2.000

Figures 13 et 14: Réactions tétraacétate de plomb-Schiff. Figure 13 réaction de Criegee (en milieu anhydre). L'hélice principale n'est pas colorée. × 2.000; figure 14: réaction de Schimizu et Kumamoto (en milieu non anhydre). L'hélice principale est fortement colorée. × 2.000







BU LILLE

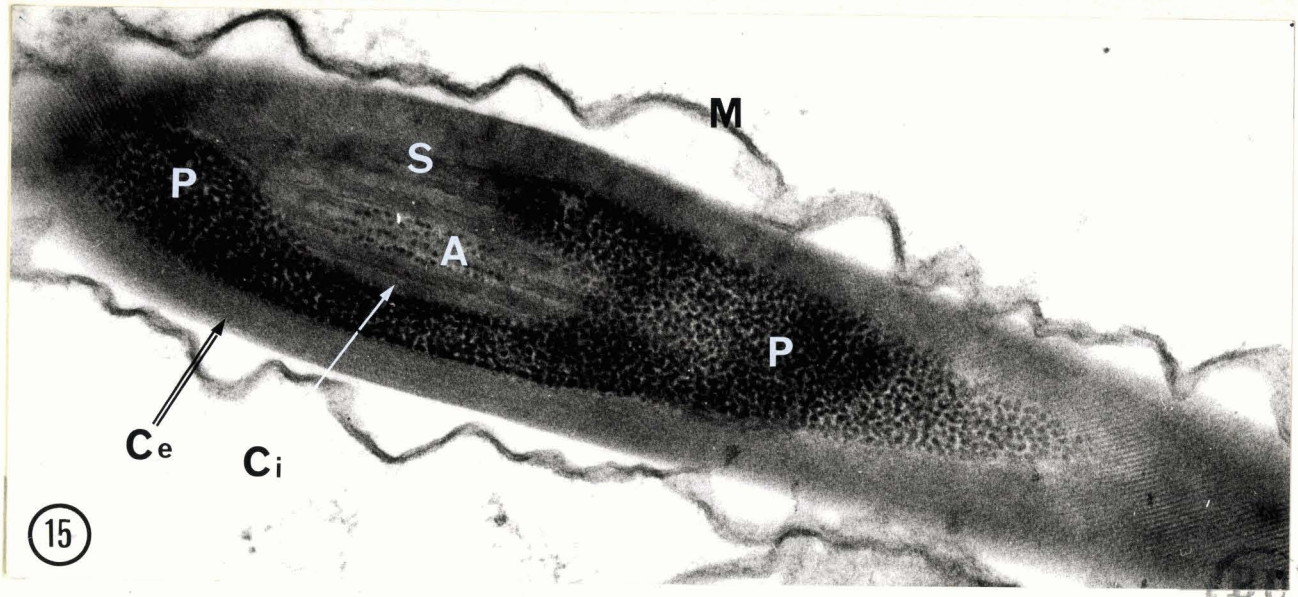
PLANCHE VI

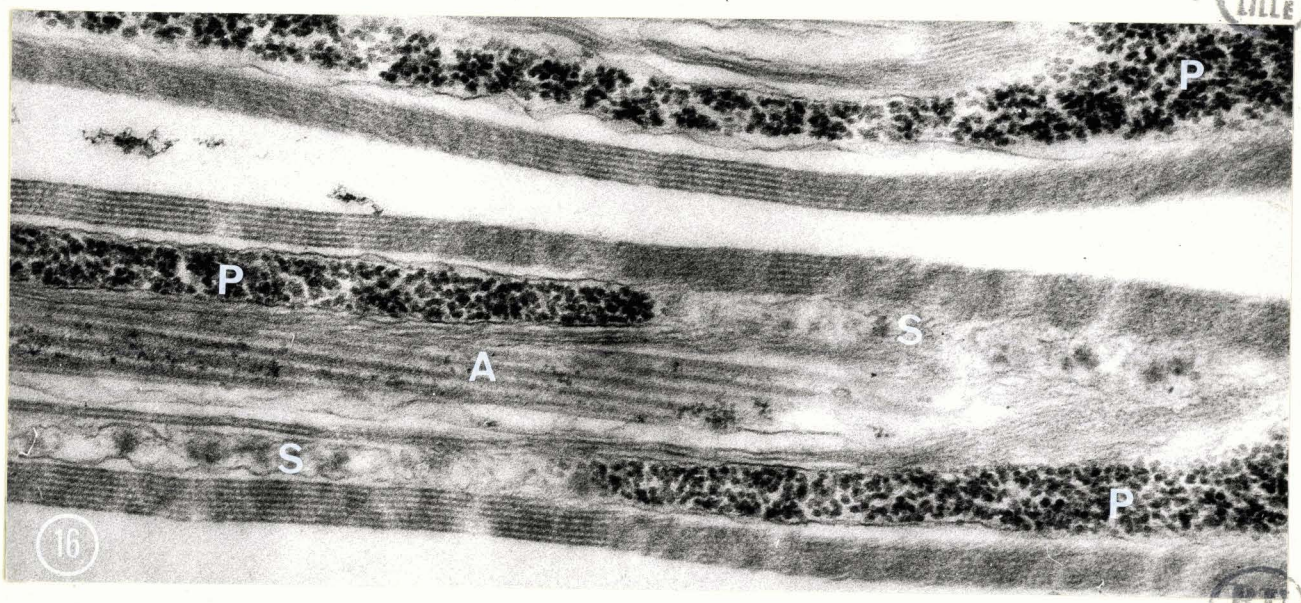
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Figure 15: Ultrastructure;coloration de Karnovsky. Coupe légèrement oblique de la portion terminale de la pièce intermédiaire. On voit les deux manchons cristallins:le manchon interne périflagellaire (flèche simple) et le manchon externe (flèche double). Entre-eux se trouvent les hélices:dans la partie supérieure gauche,les hélices secondaires S soudées en un seul ensemble car on est dans la portion terminale;l'hélice principale P ici très importante en volume (portion terminale) est remplie de granules de 150 à 300 Å de diamètre,fortement colorés par le plomb. Ces granules sont du glycogène sous la forme β . × 45.000

Figure 16: Digestion trypsique. Coupe longitudinale de la pièce intermédiaire après digestion trypsique. Les granules de glycogène sont légèrement dissociés les uns des autres. La membrane externe de la cellule a disparu . P: hélice principale; S: hélices secondaires. × 45.000

Figure 17: Ultrastructure;coloration à l'acétate d'uranyle. Coupe longitudinale de la pièce intermédiaire après coloration à l'acétate d'uranyle. L'hélice principale P est remplie d'un réseau grisé,probablement protéinique. Le glycogène ,non coloré,est vu sous forme de taches claires enserrées par les mailles du réseau. S: hélices secondaires. × 45.000


M
S
P
A
P
Ce
Ci
15


P
P
S
A
S
P
16

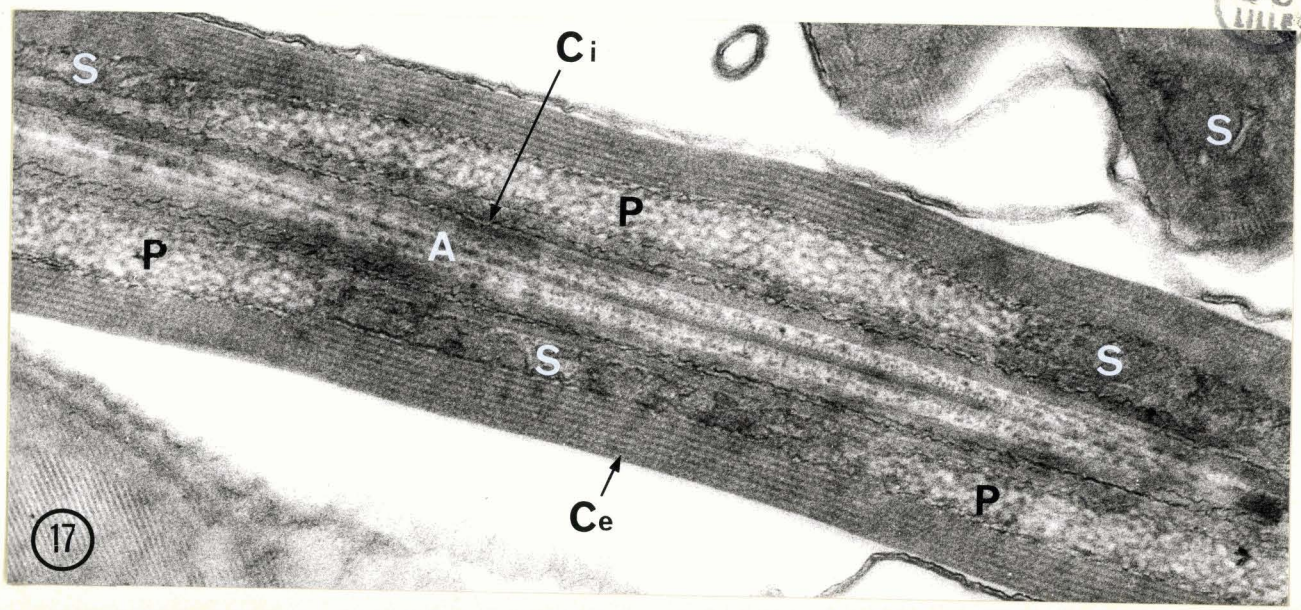
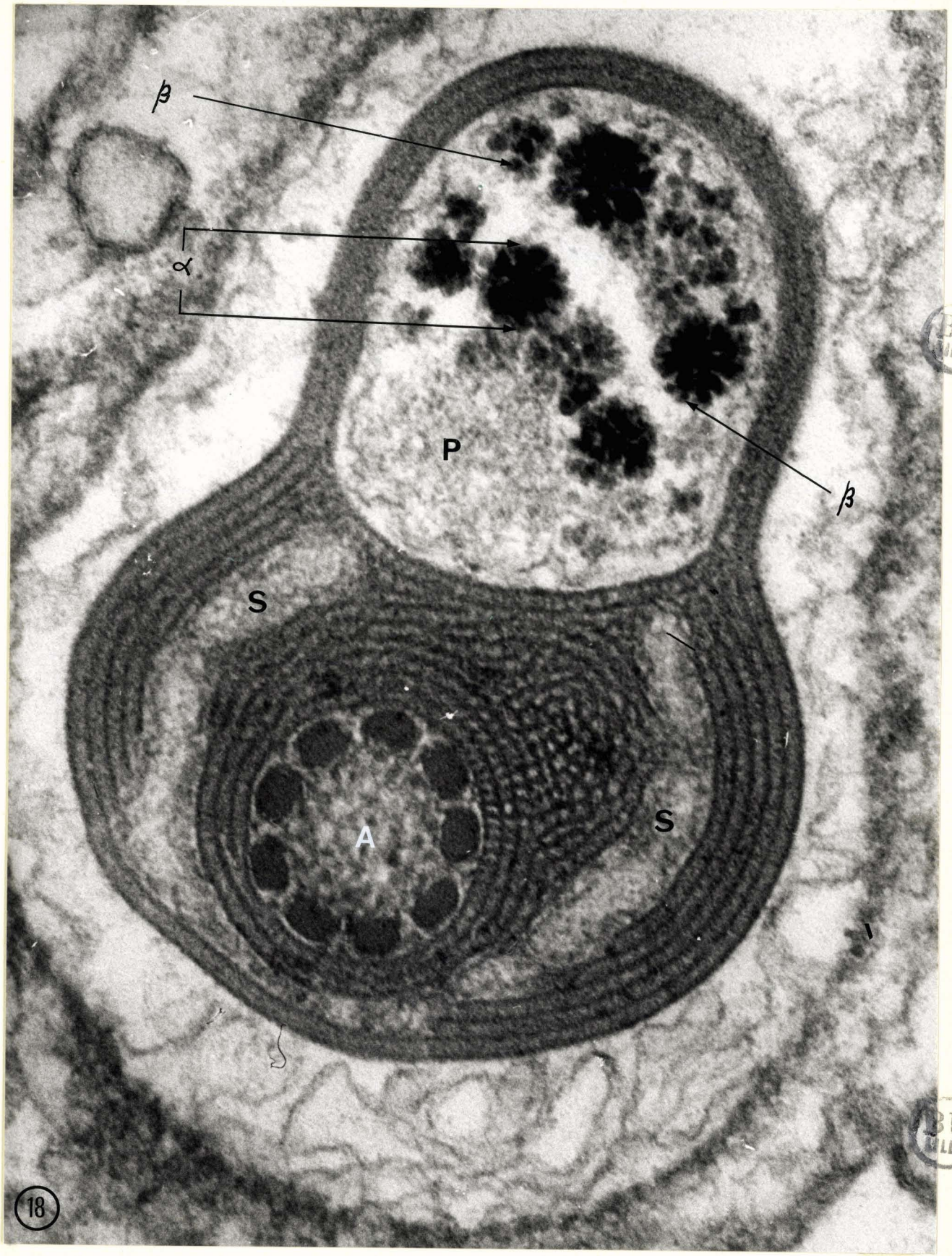

Ci
S
S
P
P
A
S
S
Ce
P
17

PLANCHE VII

Helix pomatia - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Figure 18: Digestion pepsique à son début (0,1 mg/ml pendant 15 minutes). Coloration de Karnovsky. Coupe transversale de la région antérieure d'un spermatozoïde peu modifié par ce traitement. On observe dans l'hélice principale P des éléments fortement colorés au plomb, morphologiquement identiques aux rosettes α de glycogène. La légère action de la pepsine met en relief les granules β, dont les rosettes sont constituées.
× 150.000



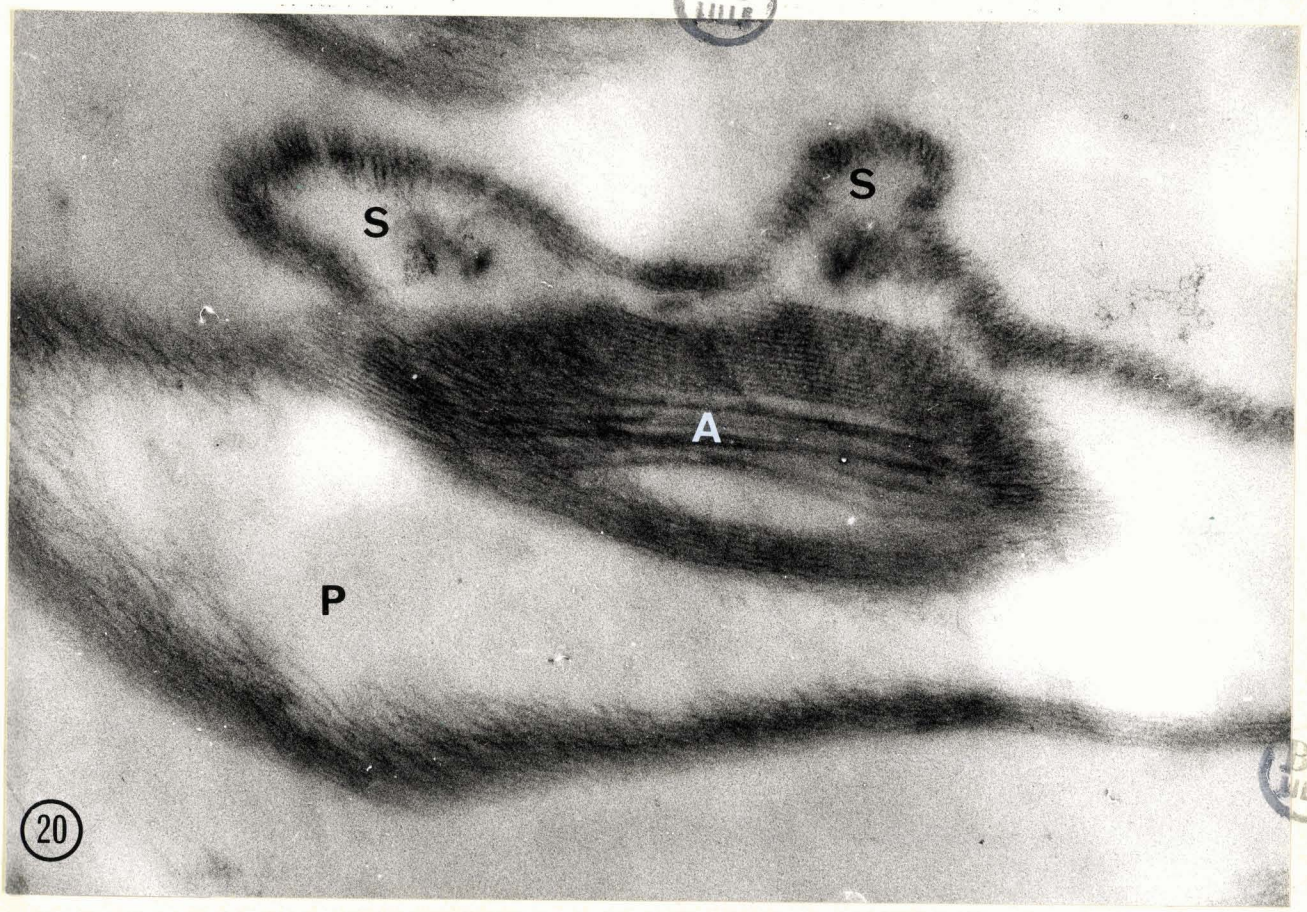
BU LILLE
BU LILLE

PLANCHE VIII

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Figure 19: Digestion salivaire. Coupe longitudinale de la région antérieure de la pièce intermédiaire, après digestion salivaire. L'hélice principale P ne contient presque plus de grains de glycogène (flèches); elle contient encore un matériel grisé, probablement protéinique. S: hélices secondaires. × 45.000

Figure 20: Double digestion trypsine-amylase. Coupe oblique de la région antérieure de la pièce intermédiaire, après digestion trypsique puis amylasique. On observe une disparition totale du glycogène et du matériel grisé de l'hélice principale. × 45.000



BU LILLE

PLANCHE IX

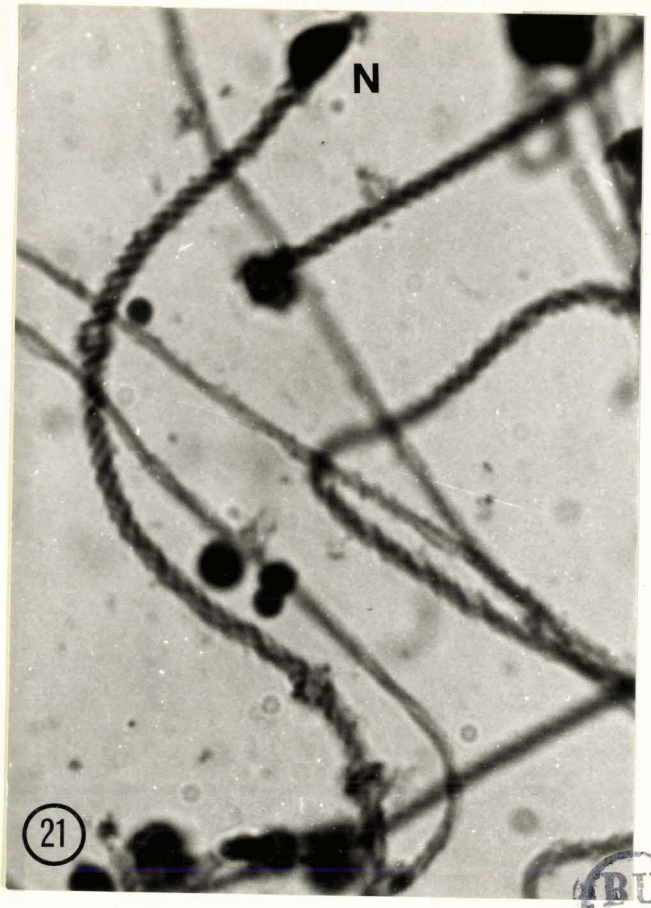
REACTIONS DES PROTIDES - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

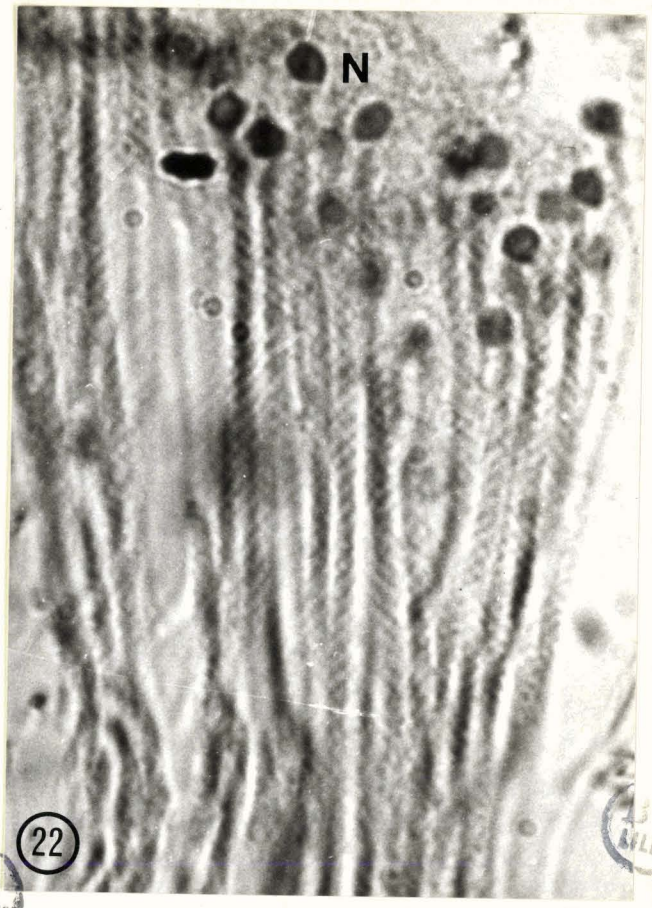
Figure 21: Coloration au bleu de bromophénol mercurique (frottis). La pièce intermédiaire se colore fortement. Les trois hélices sont colorées. × 2.000

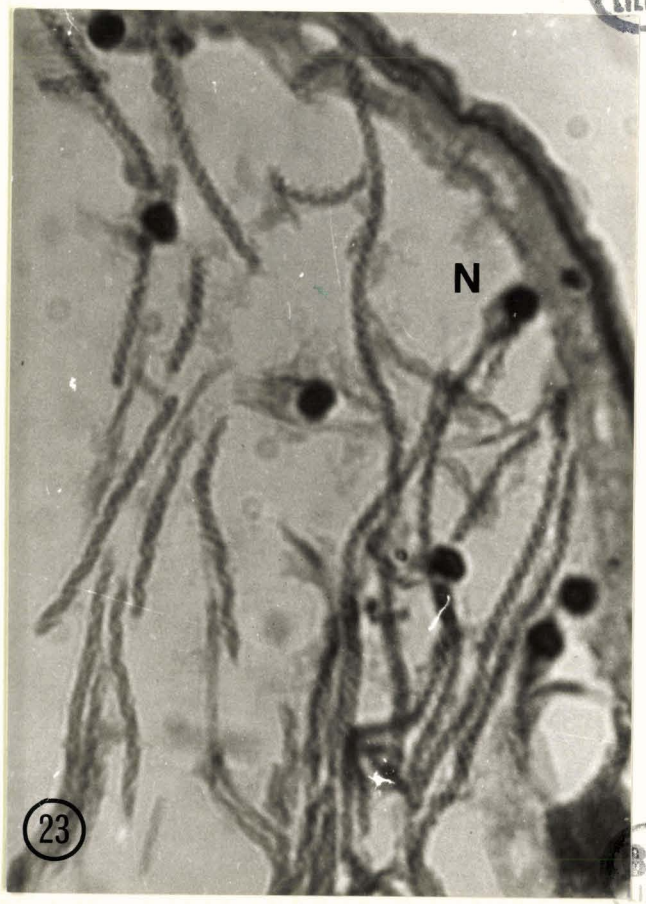
Figure 2. Réaction à la ninhydrine-Schiff. On constate que l'ensemble de la pièce intermédiaire réagit faiblement. × 2.000

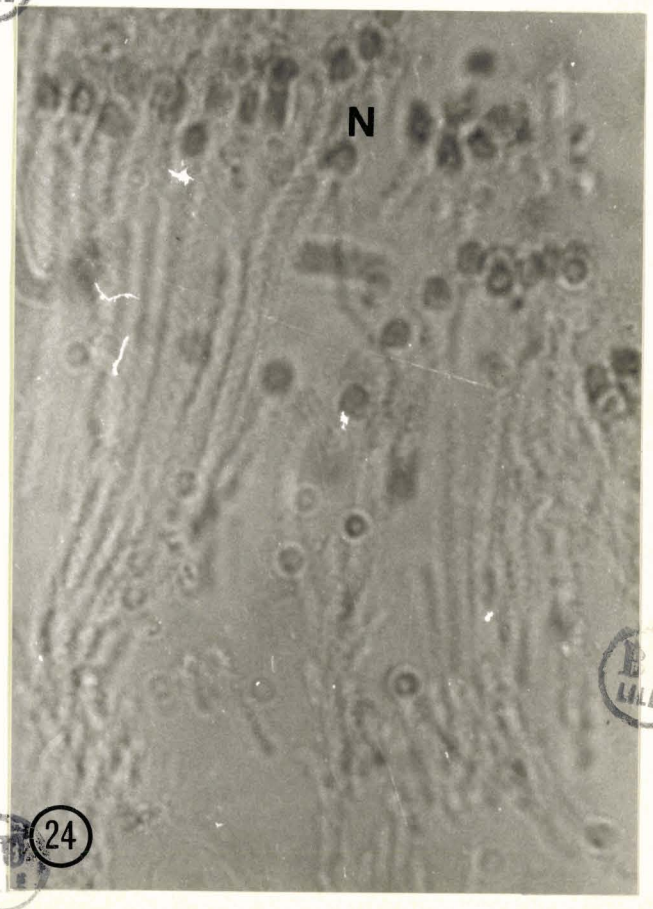
Figures 23 et 24: Réaction acroléine-Schiff.

Figure 23: Réaction acroléine-Schiff. On observe une forte coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire. Figure 24: Réaction acroléine-Schiff après acétylation. La colorabilité de la pièce intermédiaire est inhibée. × 1.200









BU LILLE

PLANCHE X

REACTIONS DES PROTEINES BASIQUES: coloration par le Fast-Green

Figure 25: Coloration au Fast- Green alcalin sans aucun prétraitement. On observe que la pièce intermédiaire est très faiblement colorée. Dans les noyaux des spermatozoïdes, certains éléments sont fortement colorés. × 1.200

Figure 26: Coloration par le Fast-Green alcalin après action de l'acide trichloracétique. On note une très forte coloration de l'ensemble de la pièce intermédiaire. × 1.200

BU LILLE

BU LILLE

PLANCHE XI

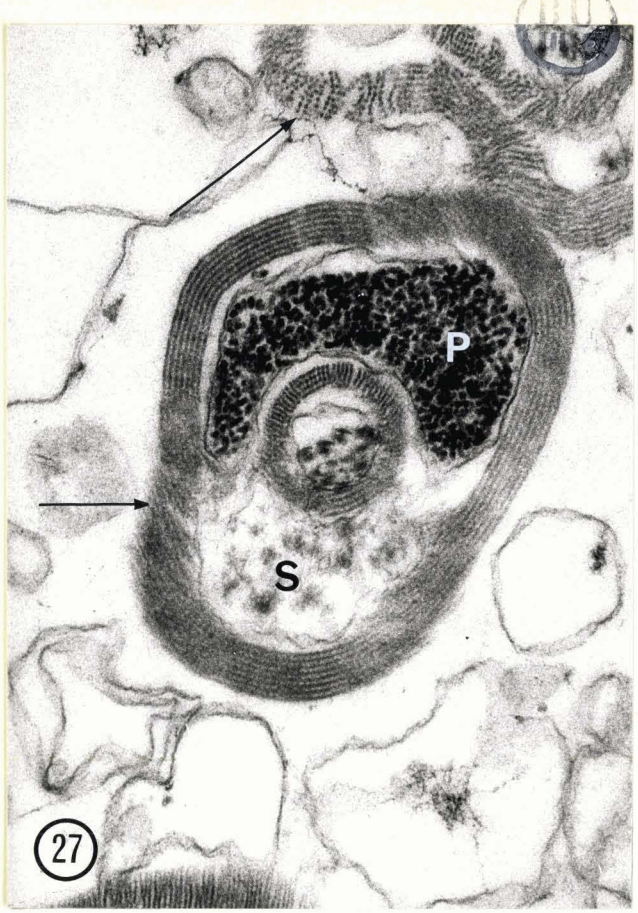
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE : Action des protéases

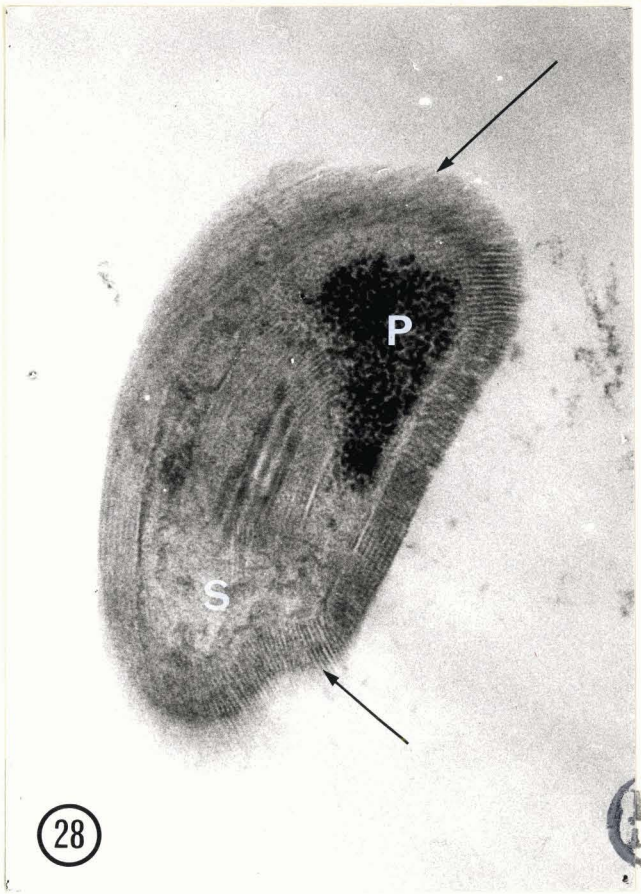
Figure 27:Digestion trypsique. Coupe transversale dans la région postérieure de la pièce intermédiaire après digestion par la trypsine (0,2 mg/ml dans un tampon borate 0,05 M à pH 8,9 pendant 1 heure). La membrane externe a disparu.Les granules de glycogène sont légèrement dissociés.Le contenu des hélices secondaires a disparu. Le paracristal est peu dissocié; les rangées de tubules sont légèrement écartées les unes des autres (flèches). × 45.000

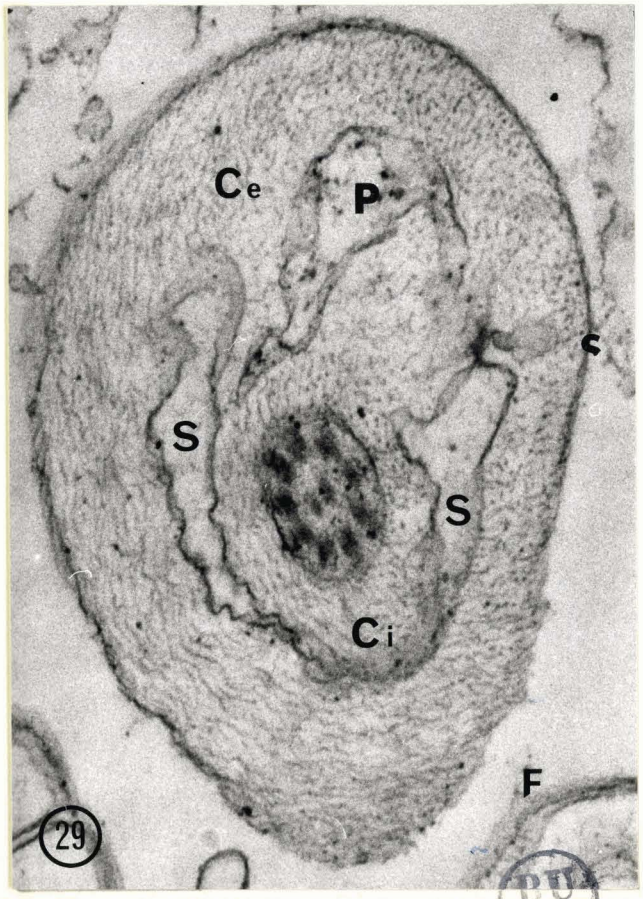
Figure 28: Digestion par la chymotrypsine. Coupe transversale de la région postérieure de la pièce intermédiaire après action de la chymotrypsine (1 mg/ml dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,3 pendant 1 heure). La membrane externe a disparu. On note une très légère dislocation du paracristal (flèches). × 45.000

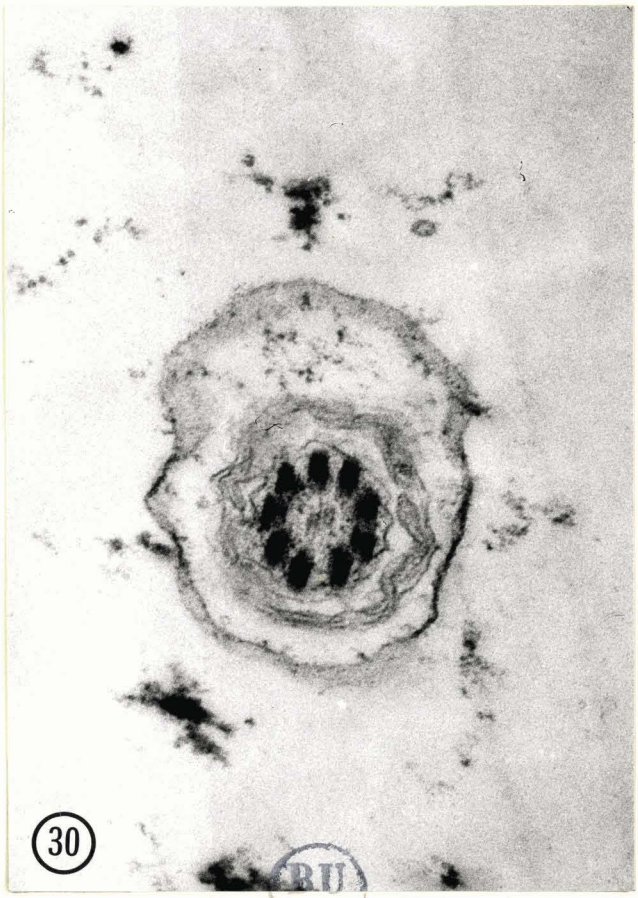
Figure 29: Digestion par la pan-protéase. Coupe transversale de la région postérieure de la pièce intermédiaire après action de la pan-protéase (1mg/ml dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 7,9). On observe que le contenu des trois hélices a disparu,il ne subsiste que quelques granules de glycogène dans l'hélice principale. Le cristal est fortement attaqué,partiellement disparu. Les tubules subsistent sous la forme de fins filaments.Cette dislocation entraine une importante dilatation de la pièce intermédiaire. × 45.000

Figure 30: Digestion par la papaïne.Coupe transversale de la région postérieure de la pièce intermédiaire après action de la papaïne (1 mg/ml dans un tampon phosphate 0,05M à pH 7,3 pendant 1 heure.). Le cristal après cette action a complétement disparu,il ne reste plus de la pièce intermédiaire que des feuillets membraneux entourant l'axonème:A. × 45.000









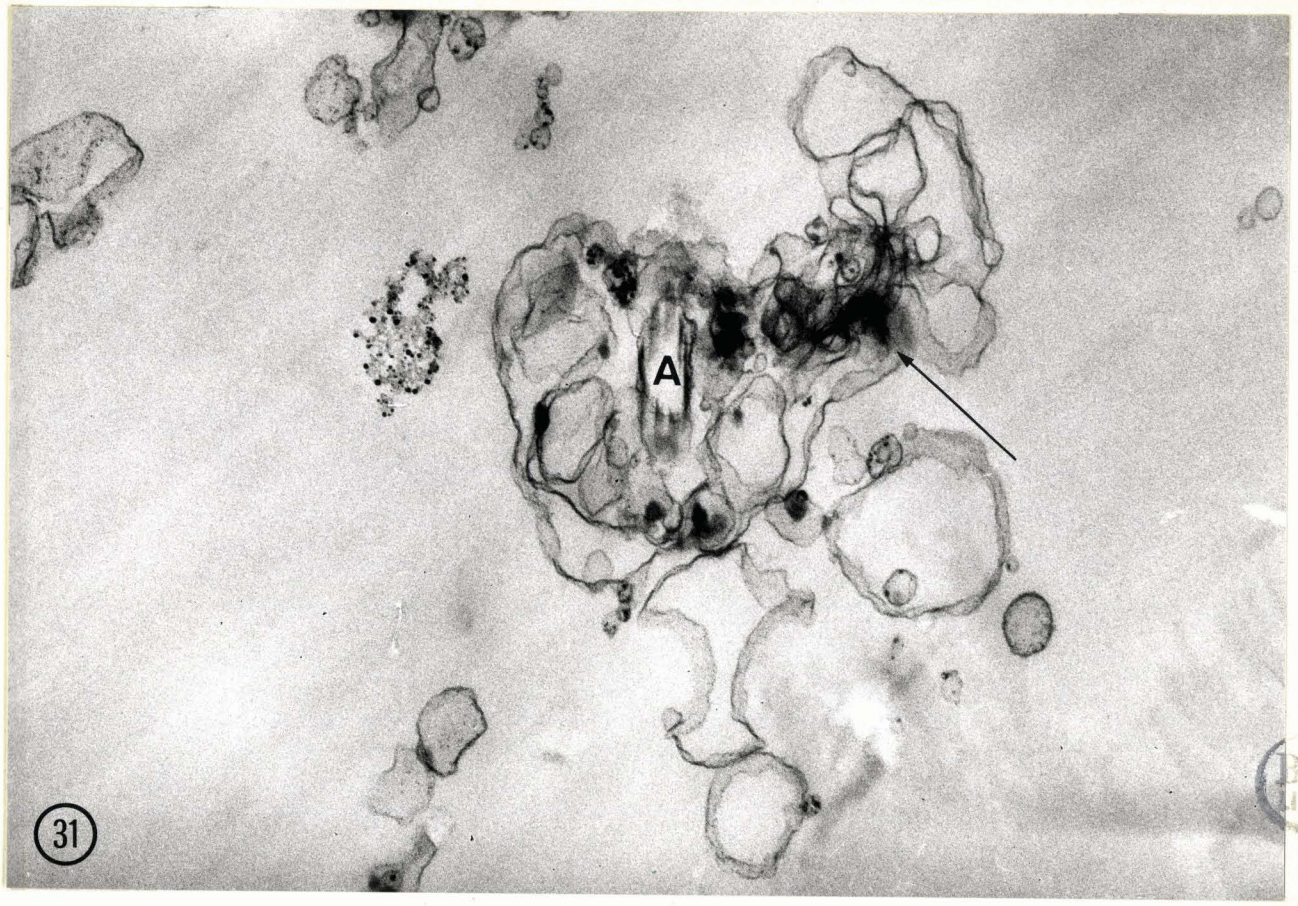
BU LILLE

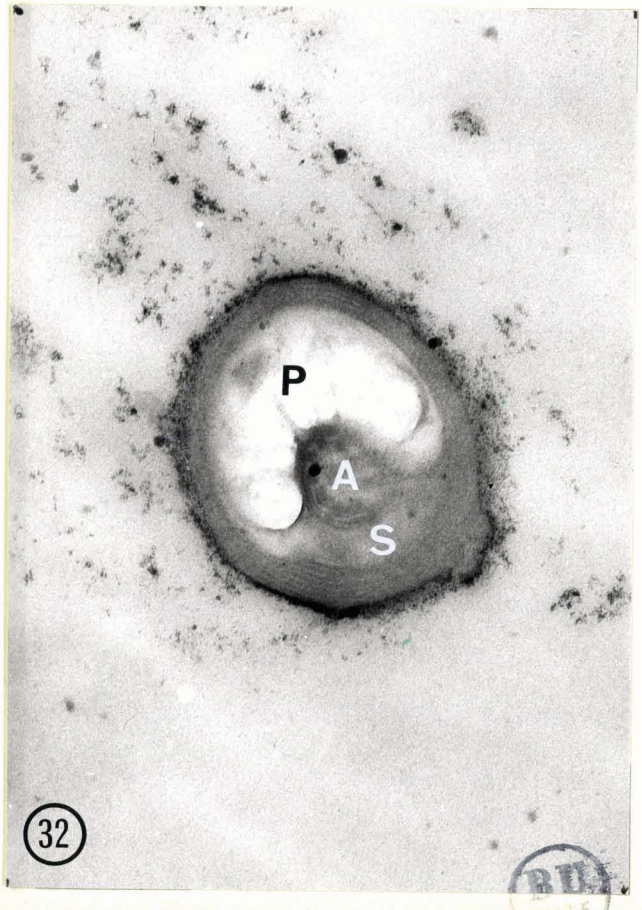
PLANCHE XII

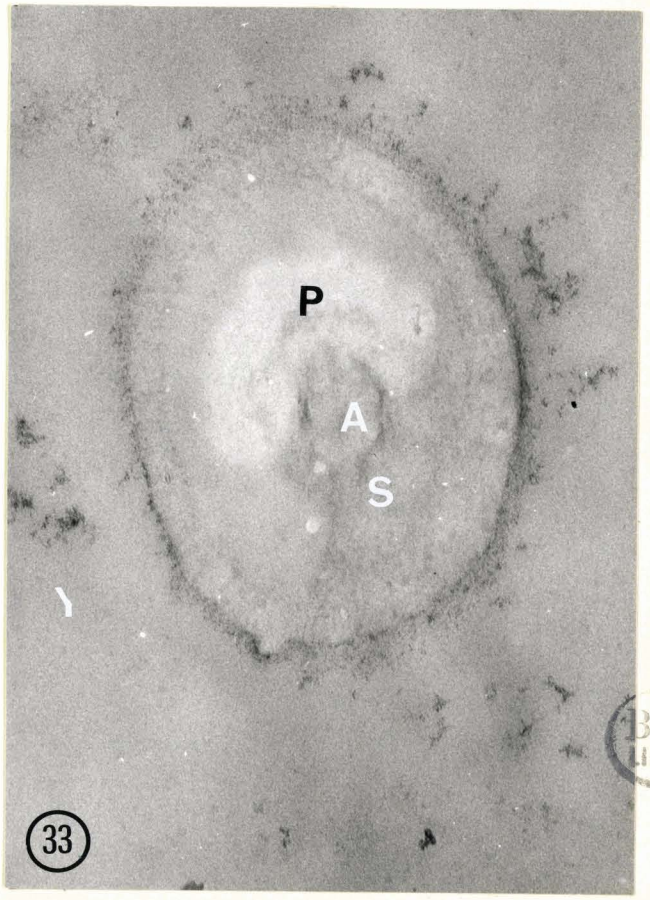
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE - ACTION DE LA PEPSINE

Figure 31: Digestion par la pepsine. Coupe transversale de la région postérieure de la pièce intermédiaire après action de la pepsine (0,5 mg/ml dans HCl 0,02 N à pH 2 pendant une demi-heure). On observe une disparition totale du cristal et de profondes modifications de la pièce intermédiaire. Seules subsistent des membranes fragmentées par l'enzyme, puis réassociées en vésicules. Les enroulements membraneux de l'hélice principale sont aussi conservés (flèche). x 45.000

Figures 32 et 33: Action de la pepsine sur des coupes de pièces intermédiaires de spermatozoïdes inclus au glycol-méthacrylate. Figure 32: témoin. Coupe de la pièce intermédiaire non traitée par la solution d'enzyme. Figure 33: Coupe digérée (pepsine 0,5% pendant 30 minutes). On observe une disparition presque complète du cristal et une dilatation de la pièce intermédiaire. x 45.000







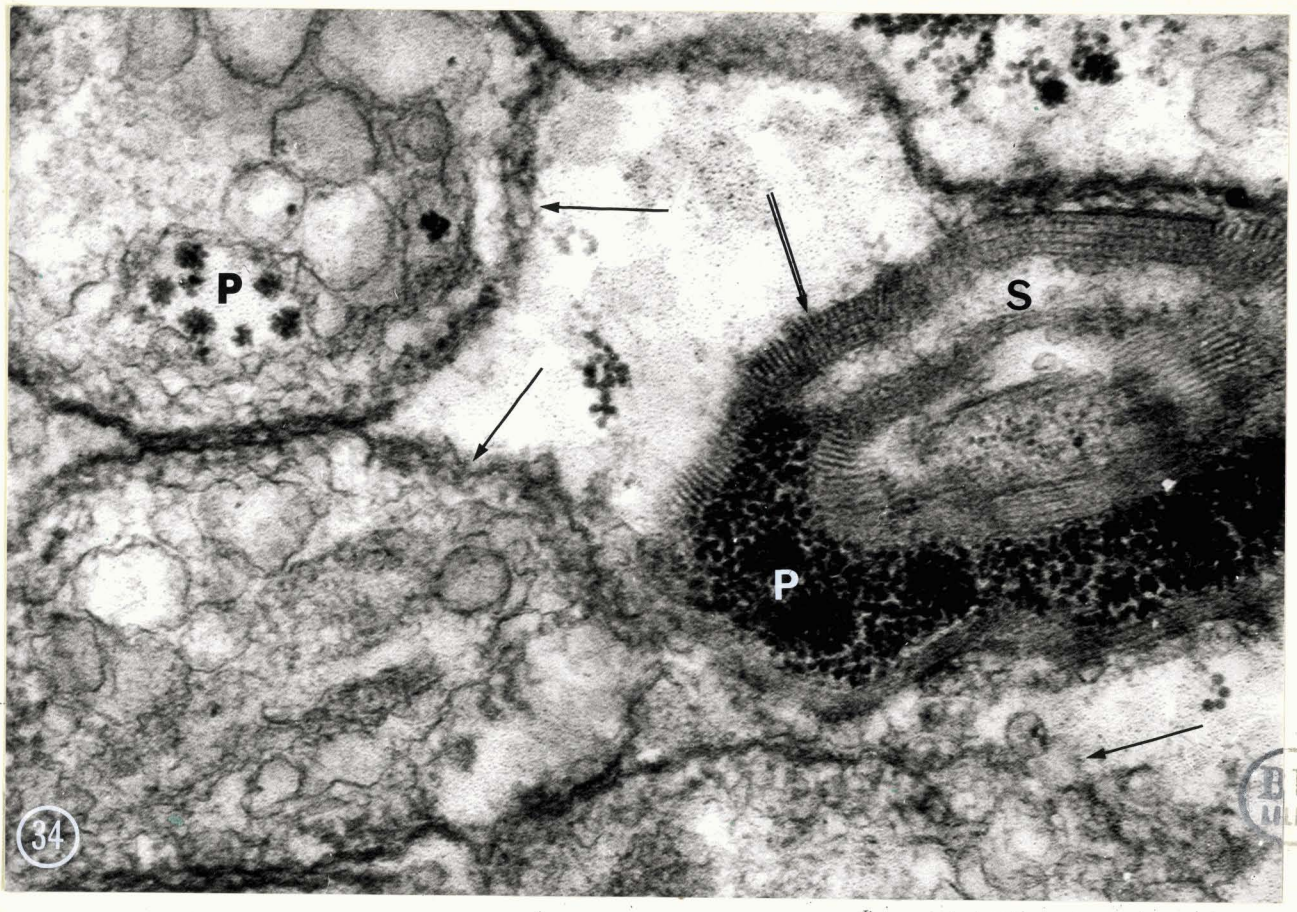
BU LILLE

PLANCHE XIII

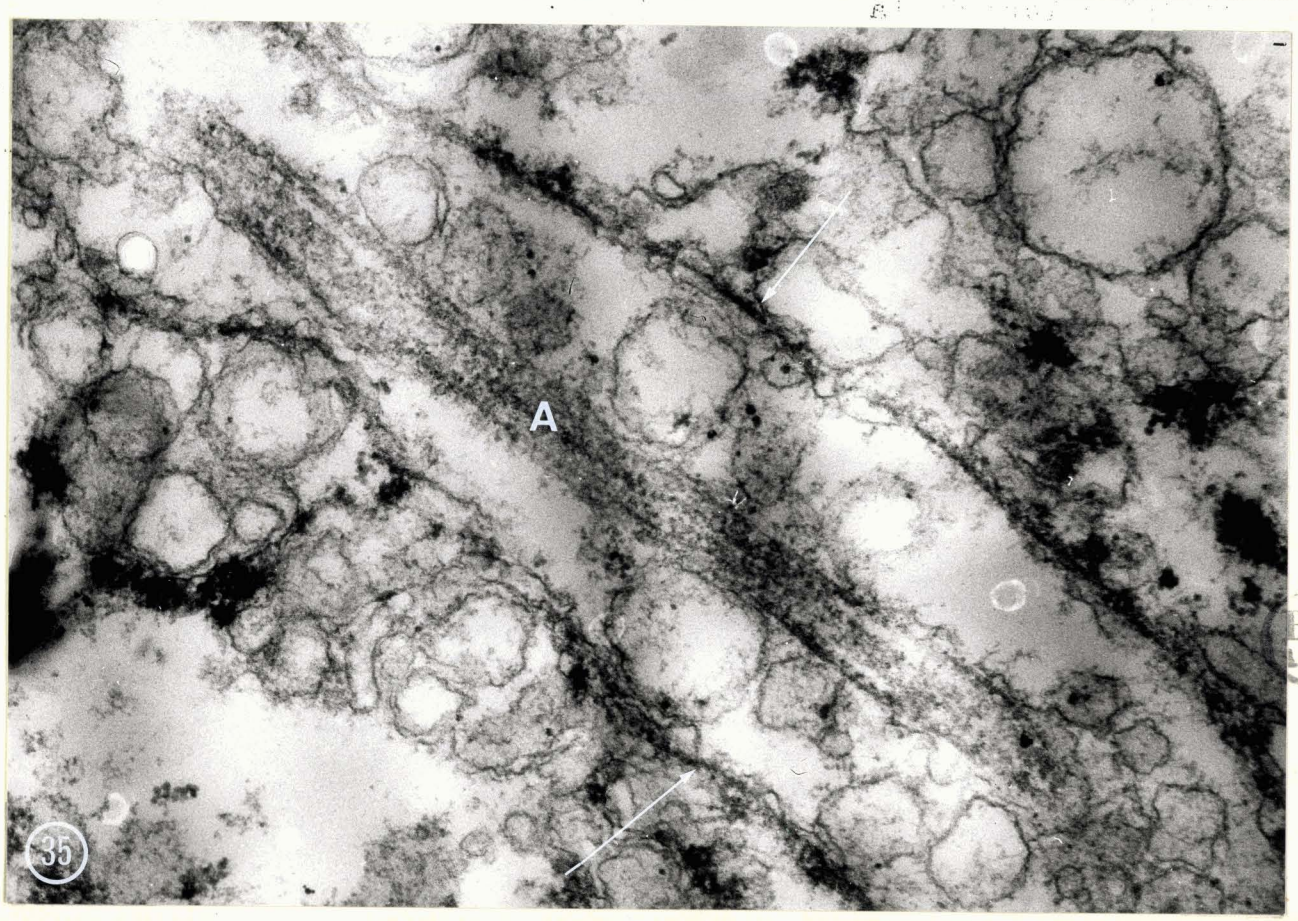
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE - ACTION DE LA PEPSINE (Helix pomatia)
(pepsine 0,1 mg/ml dans HCl 0,02 N pendant 15 minutes)

Figure 34: Coupes légèrement obliques de spermatozoïdes. On observe que certaines pièces intermédiaires sont digérées (flèche simple), tandis que d'autres voisines ne sont encore que peu attaquées (flèche double). × 60.000

Figure 35: Coupe oblique de la pièce intermédiaire d'un spermatozoïde digéré. Le paracristal a disparu. On reconnait l'axonème A, la membrane externe (flèche). A l'intérieur, les membranes fragmentées forment de nombreuses vésicules. × 60.000



BU LILLE



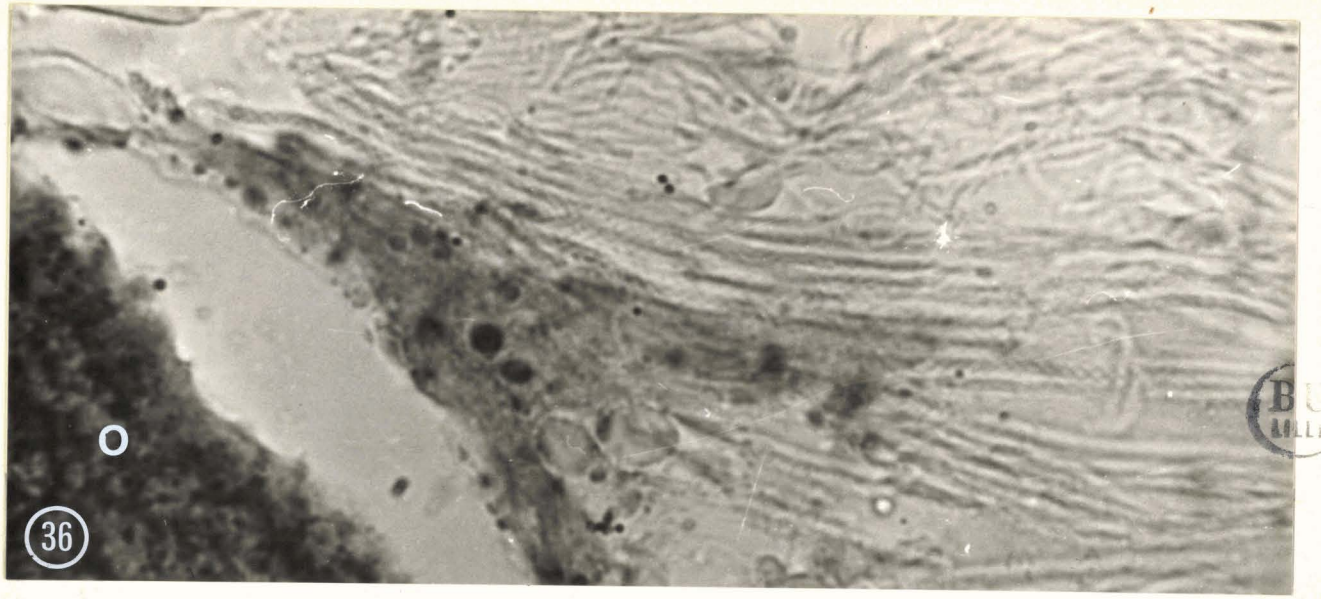
BU LILLE

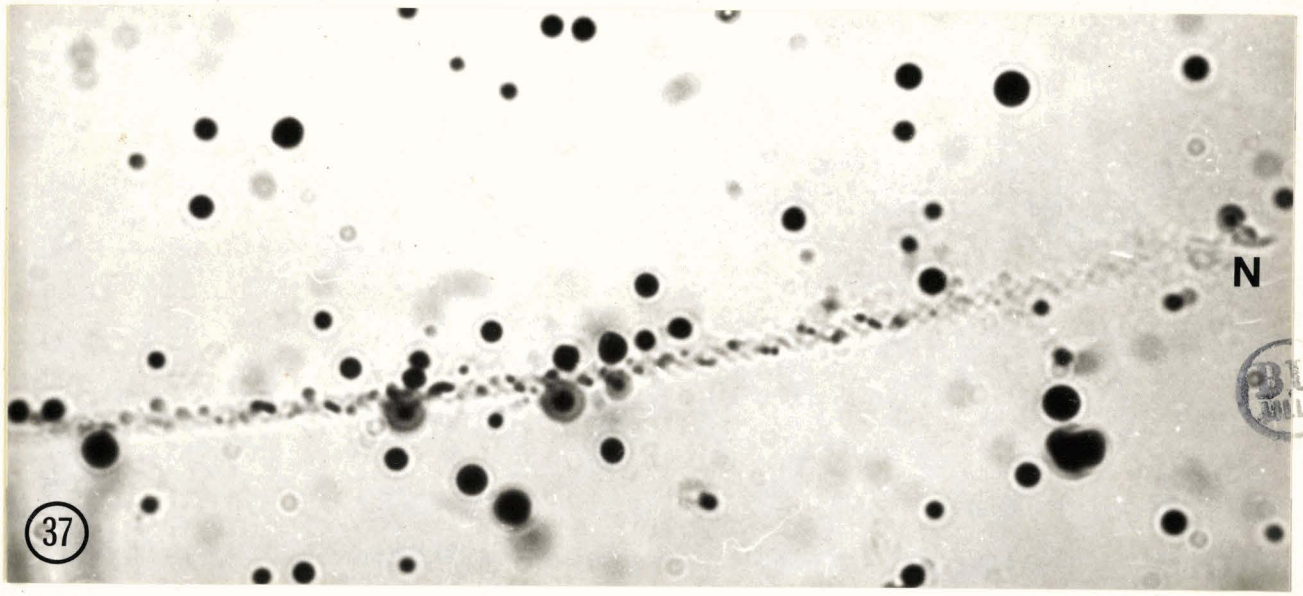
PLANCHE XIV

RECHERCHE DES LIPIDES

Figures 36 et 37: microscopie ordinaire. Figure 36: coloration au noir soudan sur des coupes à congélation de matériel fixé au formol-calcium. On n'observe pas de coloration de la pièce intermédiaire. L'ovocyte O est abondamment coloré. × 1.200 . Figure 37: coloration au noir soudan sur un frottis non fixé. On observe une coloration de répartition longitudinale discontinue sur l'hélice principale. Sur le fond, on note la présence de nombreuses gouttelettes colorées; ce sont les gouttelettes lipidiques des cellules nourricières et des ovocytes libérées lors de la mise en frottis. × 2.000

Figure 38: microscopie électronique. Coupe oblique de la portion postérieure de la pièce intermédiaire de spermatozoïdes traités par le mélange délipidant de Keilig. Le paracristal est toujours présent (flèche simple). On reconnaît l'axonéme A , la membrane externe est dissociée (flèche double). On observe une disparition de l'hélice principale. × 45.000


O
36


N
37

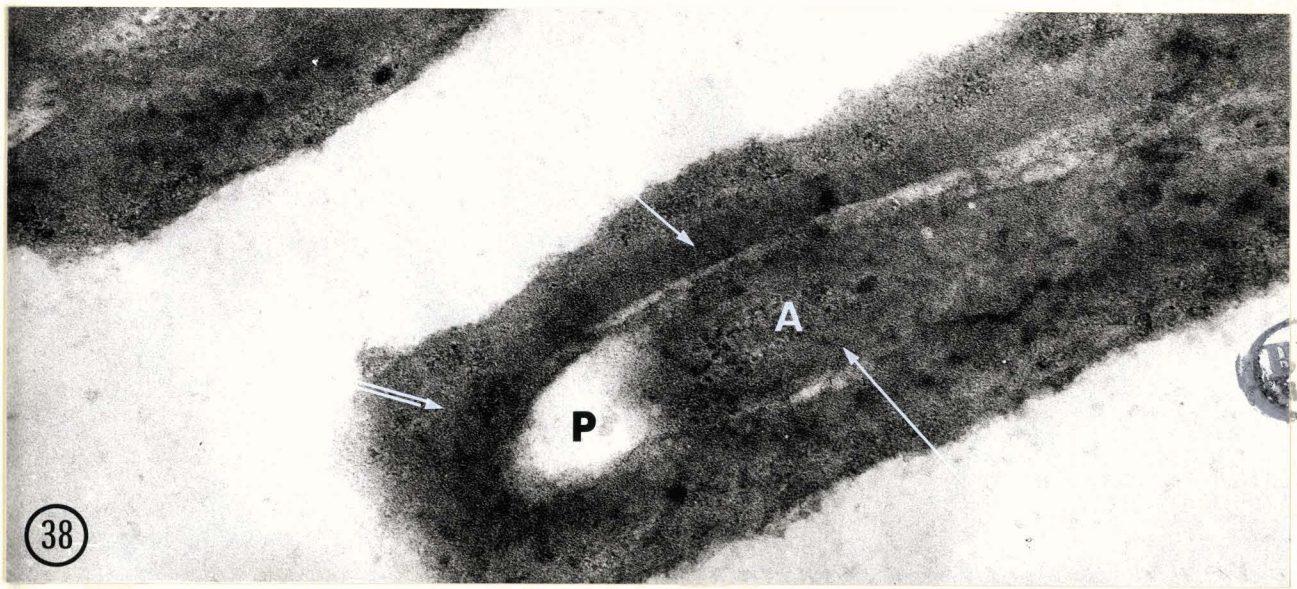
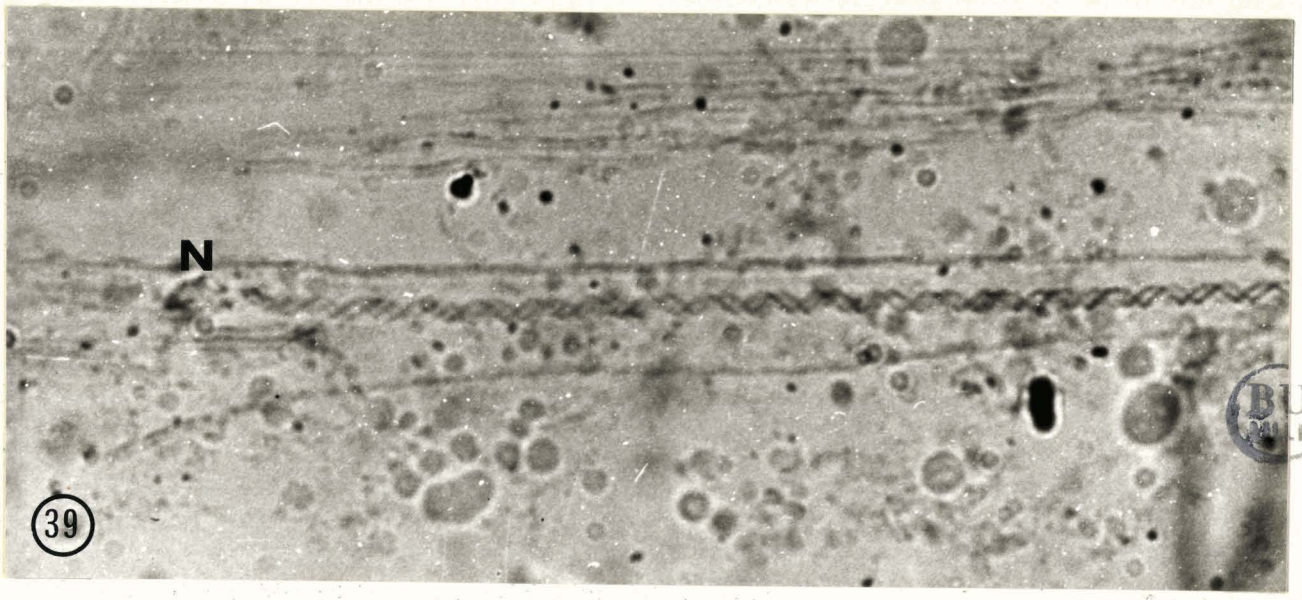

A
P
38

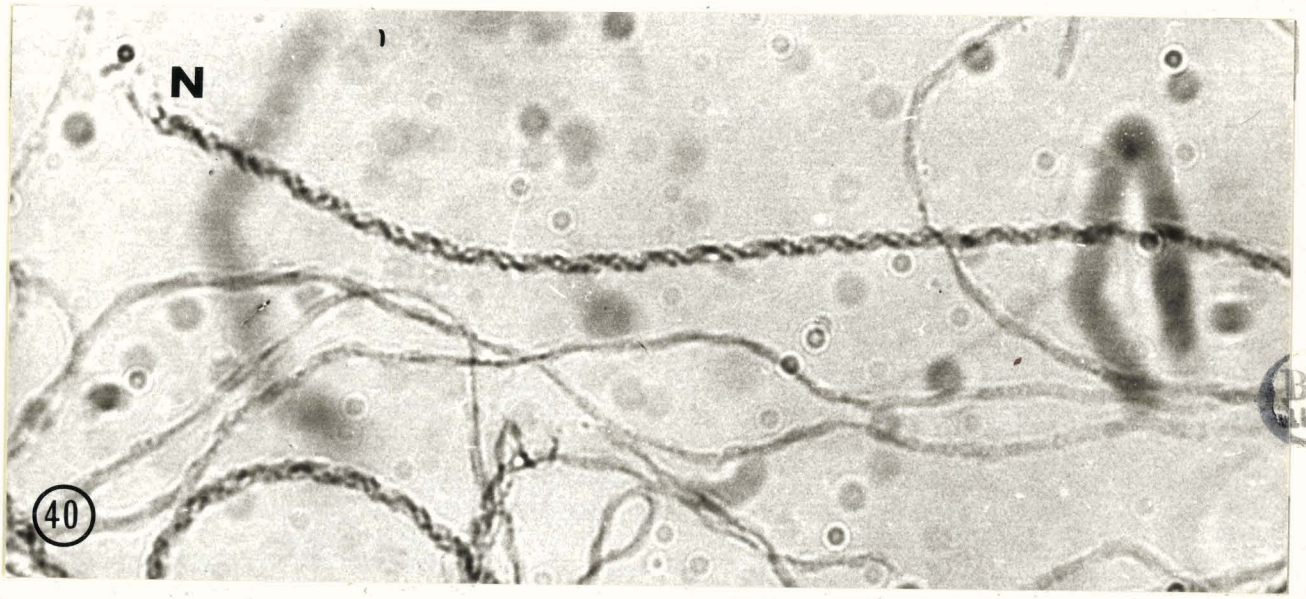
PLANCHE XV

LOCALISATION DE L'ACTIVITE SUCCINO-DESHYDROGENASIQUE

(Microscopie ordinaire)

Figures 39,40,41: Incubation dans le mélange sel de tétrazolium-succinate. Les dépôts de formazan sont localisés sur les hélices secondaires. × 2.000 . Figure 39: incubation dans le mélange nitro B T-succinate . Figure 40: incubation dans le mélange tétra nitro B T-succinate. Figure 41: incubation dans le mélange iodo nitro B T-succinate. On note que la coloration dans ce dernier cas est discontinue et plus grossière.


N
39


N
40

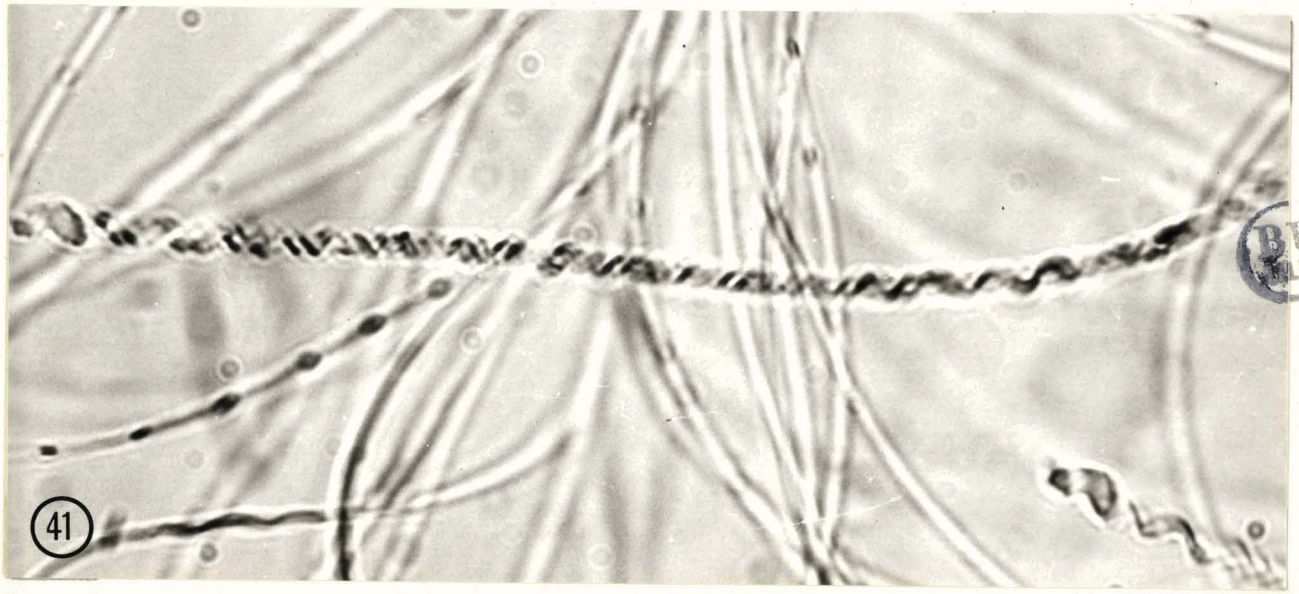
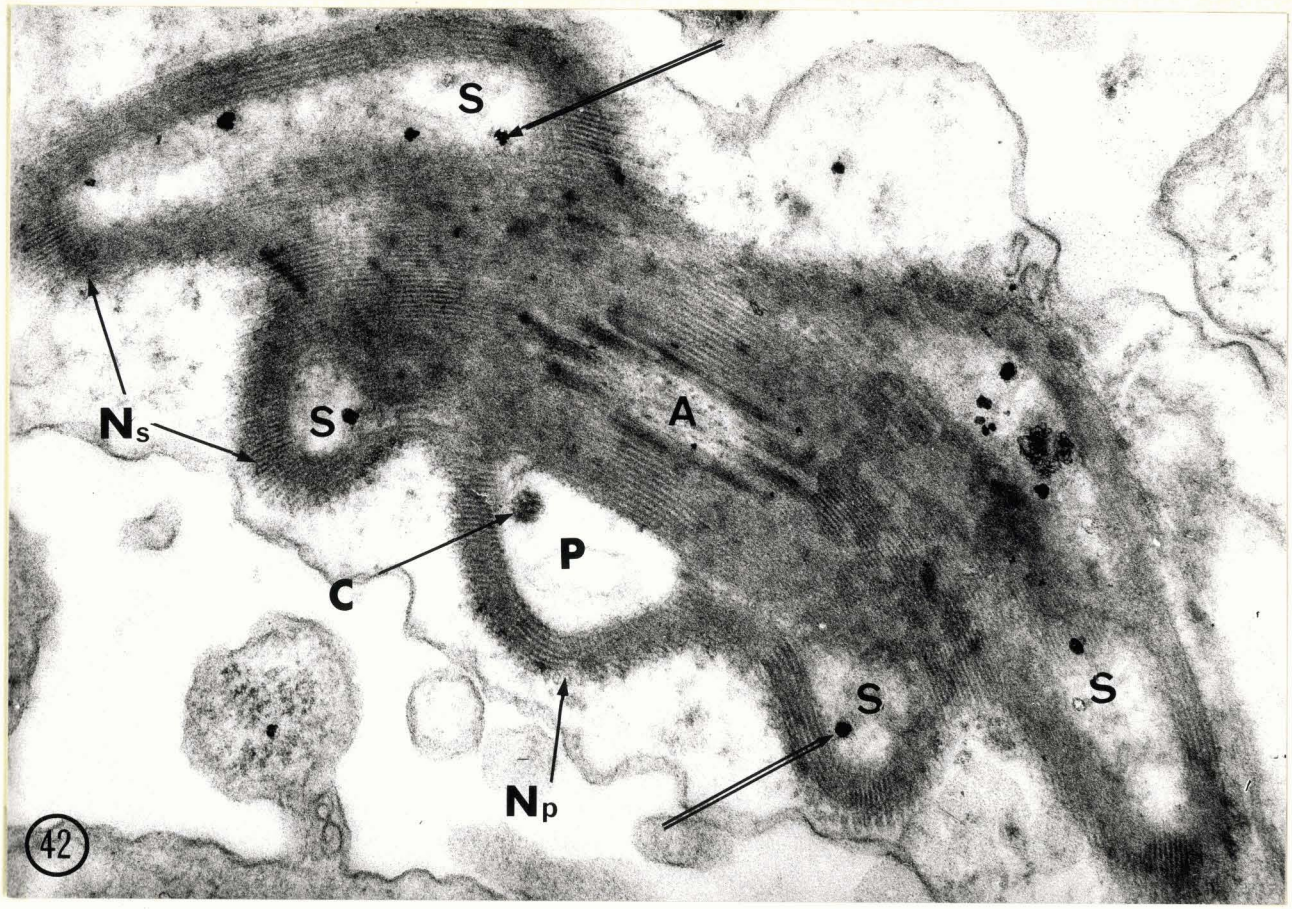

41

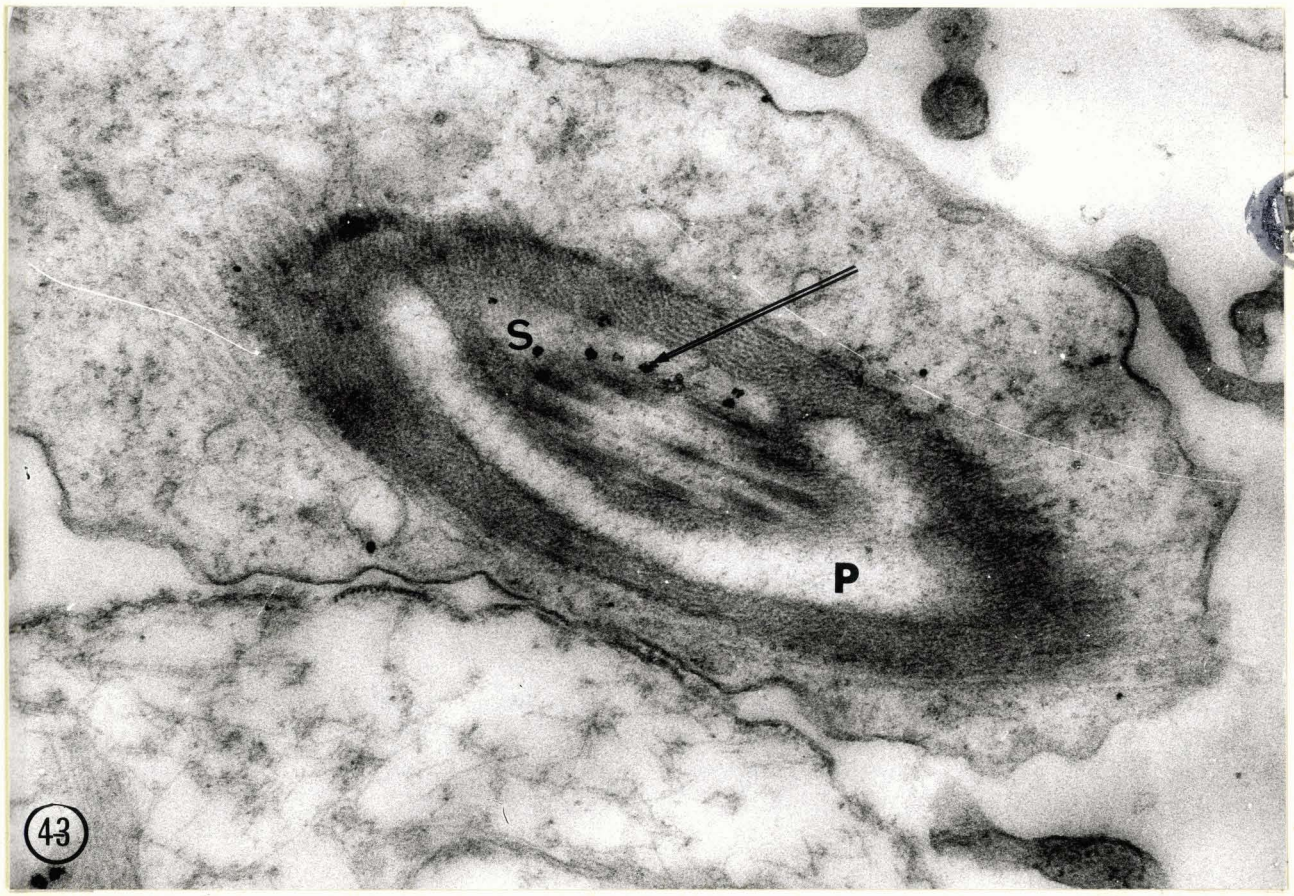
PLANCHE XVI

LOCALISATION DE L'ACTIVITE SUCCINO-DESHYDROGENASIQUE

(Microscopie électronique)

Figures 42 et 43: Coupes de pièces intermédiaires de spermatozoïdes incubés dans le mélange nitro B T-succinate. On observe une localisation des dépôts de formazan (flèche double) aux hélices secondaires. × 45.000 . Figure 42: coupe oblique de la région antérieure. Figure 43: coupe oblique de la région postérieure où les deux hélices secondaires sont fusionnées.





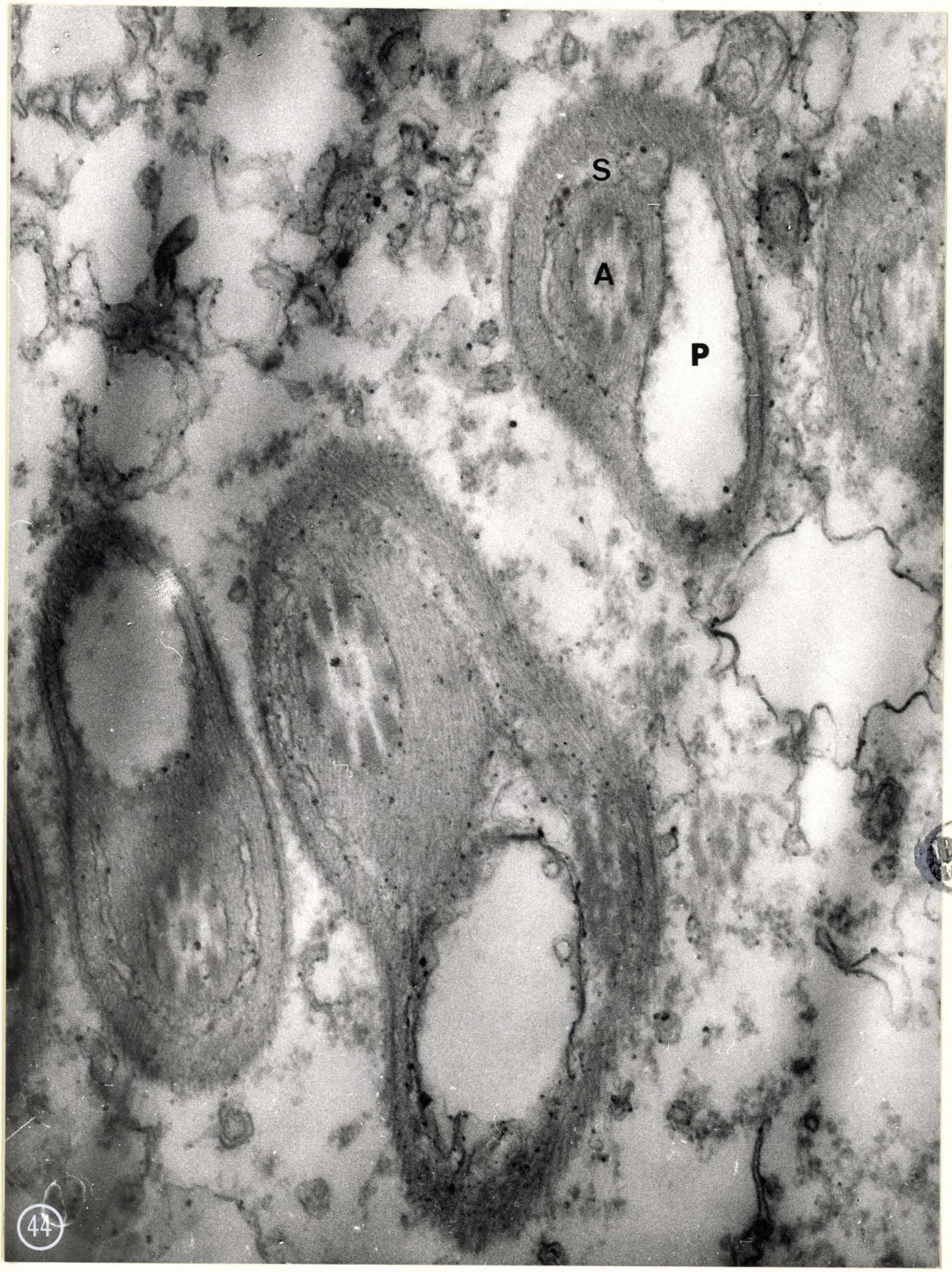
BU LILLE

PLANCHE XVII

LOCALISATION DE LA CYTOCHROME-OXYDASE

(Microscopie électronique) (*Helix pomatia*)

Figure 44 : Coupes transversales de la pièce intermédiaire de spermatozoïdes d'Escargot incubés dans le milieu de Burstone. Les dépôts sont fins, essentiellement localisés au paracristal et aux membranes le séparant des autres régions de la pièce intermédiaire. La conservation générale est médiocre. Les dépôts non spécifiques sont assez abondants et se rencontrent surtout sur les membranes, jamais sur les noyaux et très rarement libres au sein du cytoplasme ou dans les espaces intercellulaires. × 62.000



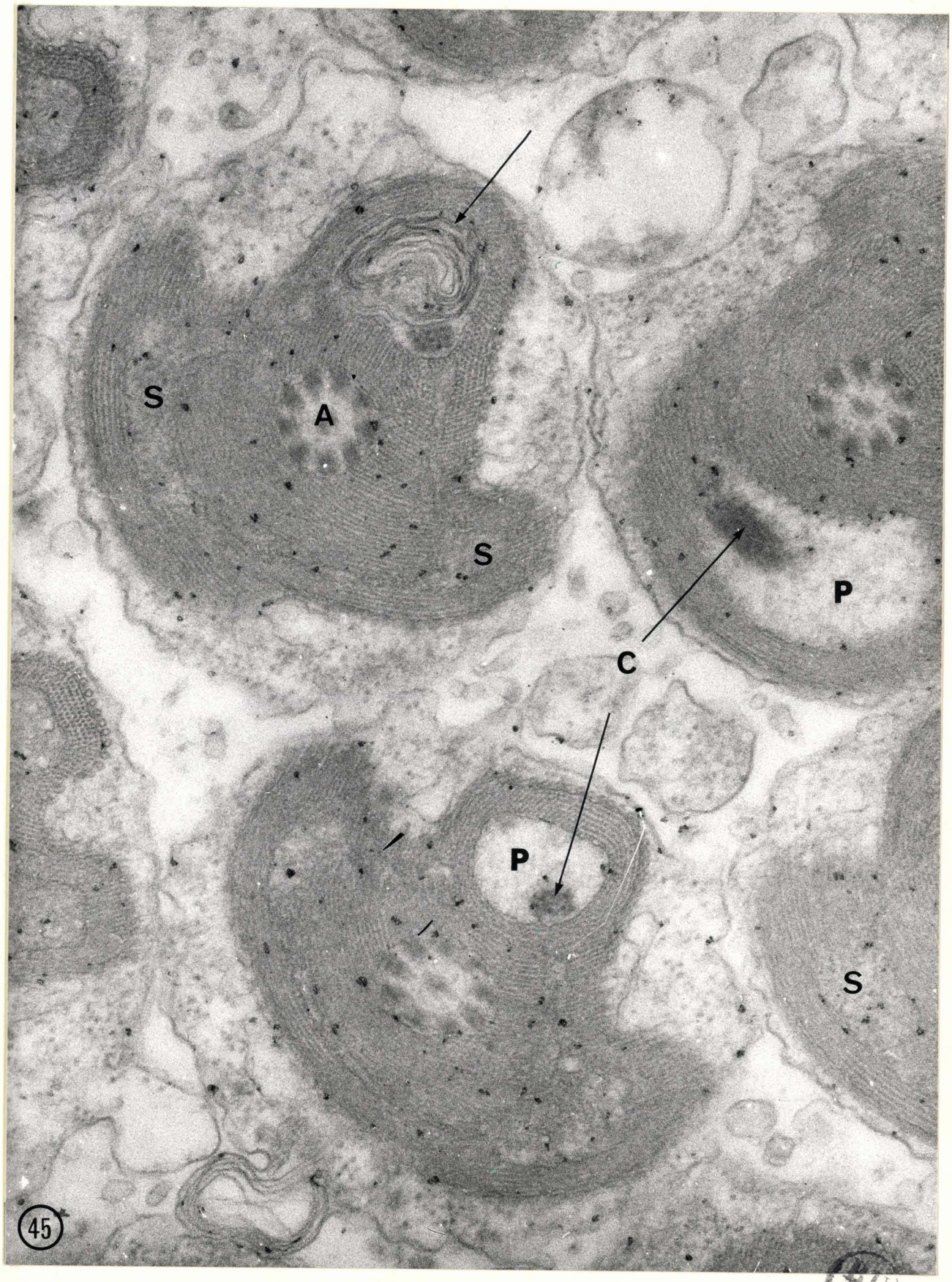
BU
LILLE

PLANCHE XVIII

LOCALISATION DE LA CYTOCHROME-OXYDASE
(Microscopie électronique)

Figure 45: Coupes transversales de régions antérieures de pièces intermédiaires de spermatozoïdes incubés dans le mélange "Wadi" selon Moog (1943). Les dépôts sont en majorité localisés sur le paracristal. On en observe aussi quelques-uns répartis de façon non spécifique sur le fond, sur les hélices secondaires, sur les enroulements membraneux de l'hélice principale (flèche) et de façon générale sur les membranes. × 45.000

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE


S
A
S
P
C
P
S
45