DÉROULEMENT ET DURÉE DU CYCLE SPERMATOGÉNÉTIQUE CHEZ LE BÉLIER

PREMIÈRE PARTIE

PAR

R. ORTAVANT

Station de recherches de Physiologie animale
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (S.-et-O.)

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction

Techniques et méthodes

- A. — Les animaux et les conditions d'élevage
 - Race
 - Alimentation
 - Habitat
- B. — Prélèvement des échantillons à analyser
 - 1^o L'appareil génital
 - 2^o Les spermatozoïdes :
 - a) Les techniques de récolte du sperme
 - b) Séparation des spermatozoïdes à partir du canal épидидymaire
 - 3^o Libération et détermination des spermatides à noyaux allongés et des spermatozoïdes dans le testicule
- C. — Techniques histologiques
 - 1^o Obtention et coloration des coupes histologiques :
 - a) Réaction de Feulgen
 - b) Coloration acide periodique-Schiff
 - 2^o Numération des cellules dans les coupes histologiques
- D. — Techniques physico-chimiques :
 - 1^o Extraction des différentes fractions phosphorées des cellules germinales et des spermatozoïdes et détermination de leur radioactivité spécifique :
 - a) Sur homogénats de spermatozoïdes
 - b) Sur coupes histologiques
 - 2^o Mise en évidence du ³²P par la technique autoradiographique

PREMIÈRE PARTIE

**DÉFINITION ET ÉTUDE HISTOLOGIQUE
DU CYCLE SPERMATOGÉNÉTIQUE****I. — Associations cellulaires et cycle spermatogénétique**

A. — Définitions

B. — Étude du cycle de l'épithélium séminifère chez le Bélier

1^o Historique2^o Définition des stades du cycle de l'épithélium séminifère chez le Bélier3^o Fréquence des stades du cycle de l'épithélium séminifère chez le Bélier

C. — Le cycle spermatogénétique représente-t-il une constante biologique

II — Origine du cycle spermatogénétique : générations spermatogoniales

A. — Historique

1^o Les spermatogonies : définition et classification2^o Le renouvellement des spermatogonies

B. — Étude des spermatogonies chez le Bélier.

1^o Étude morphologique des spermatogonies2^o Évolution des spermatogonies au cours du cycle de l'épithélium séminifère. Étude caryométrique :

a) Populations spermatogoniales

b) Évolution de la taille nucléaire des spermatogonies au cours de la spermatogenèse

C. — Discussion

III. — Les autres éléments du cycle spermatogénétique

A. — Les spermatocytes.

1^o Les spermatocytes de 1^{er} ordre2^o Les spermatocytes de 2^e ordre

B. — Les spermatides

1^o Historique :

a) Le noyau des spermatides

b) Les constituants cytoplasmiques des spermatides

2^o La spermiogénèse chez le Bélier. Résultats personnels**IV. — Conclusion**

INTRODUCTION

L'insémination artificielle des animaux domestiques, technique d'acquisition récente, a progressé à une allure telle que, 20 ans après son apparition dans l'élevage, des millions de veaux ou agneaux lui sont annuellement redevables de leur naissance. Si son développement a attiré l'attention sur l'importance de la valeur génétique du mâle par suite de la multiplication de ses descendants, il a surtout accusé l'effet des moindres déficiences dans la qualité du sperme utilisé sur la fécondité du cheptel. C'est pourquoi, l'utilisation de l'Insémination Artificielle a provoqué un grand nombre de travaux de recherches afin d'obtenir le meilleur rendement possible de cette technique.

Il est curieux cependant de constater que la majorité de ces travaux porte sur le sperme récolté : son métabolisme, sa dilution, sa conservation, alors que les processus fondamentaux qui président à la formation des spermatozoïdes (spermatogenèse) sont très peu connus chez les Mammifères domestiques.

En effet, si une analyse précise du déroulement des phénomènes spermatogénétiques chez les animaux de laboratoire résulte des travaux fondamentaux d'un certain nombre de chercheurs, dont von EBNER, SERTOLI, REGAUD, ROOSEN-RUNGE, CLERMONT sont les plus représentatifs, nos connaissances sur la spermatogenèse des animaux domestiques restent très imprécises malgré le travail de SCHOENFELD. C'est pourquoi il nous a paru indispensable d'en reprendre l'étude d'une façon aussi complète que possible.

Nous avons d'abord cherché à acquérir une *connaissance précise du déroulement du cycle spermatogénétique*. A cette fin, nous avons surtout fait appel à l'histologie que nous avons utilisée dans un but non seulement descriptif, mais aussi quantitatif chaque fois que cela était possible.

La spermatogenèse étant un phénomène essentiellement dynamique nous nous sommes attachés à déterminer d'une part, la production de spermatozoïdes par unité de temps, d'autre part la *durée du déroulement des différents processus spermatogénétiques*, cette dernière notion étant la base de toute étude sur l'influence des divers facteurs pouvant modifier l'activité spermatogénétique. Il est en effet indispensable de connaître le temps qui s'écoule entre le moment où un facteur déterminé agit sur certaines cellules germinales et le moment où les spermatozoïdes issus de ces cellules seront collectés pour être utilisés. C'est ainsi que la méconnaissance de cette donnée a entraîné certaines contradictions dans l'étude de l'influence de l'alimentation sur la production du sperme. Pour ce

faire nous avons fait appel à des techniques extrêmement variées : parmi celles-ci l'utilisation d'éléments marqués nous a été d'un précieux secours.

Enfin nous avons cherché comment se comportaient les données que nous avions définies sur l'animal normal, lorsque la spermatogenèse était profondément modifiée par l'un des principaux facteurs contrôlant son activité : *la durée d'éclairement*.

Les résultats que nous avons obtenus sur le Bélier nous paraissent justifier la publication de ce mémoire. Cependant il ne faudrait pas généraliser nos résultats aux différents animaux domestiques : nous montrerons, en particulier dans un mémoire ultérieur, les variations constatées dans la spermatogenèse du Taureau.

TECHNIQUES ET MÉTHODES

A. — LES ANIMAUX ET LES CONDITIONS D'ÉLEVAGE

Les animaux sur lesquels ont porté nos recherches étaient tous des Béliers de race Ile-de-France car les 1 500 000 animaux de cette race sont concentrés dans une aire géographique assez restreinte autour de Paris, ce qui permet un approvisionnement facile. Chez les Ovins, la saison normale de reproduction se situe à l'automne. Cependant dans certains troupeaux de race Ile-de-France la période de « lutte » commence dès la fin du printemps. Malgré cette pratique, nous désignerons comme saison sexuelle l'époque s'écoulant de septembre à décembre inclus et comme saison non sexuelle, la période allant de mars à juin.

Les 178 animaux que nous avons utilisés étaient âgés d'au moins 18 mois : ils étaient donc tous sexuellement actifs puisque PHILLIPS et ANDREWS (1936) ont montré, sur des Béliers Southdown et Shropshire, que les spermatozoïdes apparaissaient dans le testicule dès le 147^e jour. Comme d'autre part ces auteurs ont constaté l'importance d'une forte alimentation dans le développement testiculaire, nous n'avons utilisé que des animaux normalement développés et en bon état.

Les rations distribuées par bélier étaient les suivantes :

Période hivernale (novembre-avril)

Foin	1,500 kg
Betteraves + Balle de Blé	2 kg
Paille	à volonté
Concentré (Tourteau de lin + Céréales)	350 à 400 g

Période estivale (mai-novembre)

Herbe verte (luzerne, trèfle, prairie, ray-grass, dactyle)	7 à 8 kg
Paille	à volonté
Concentré	300 g

Pendant les expériences d'éclairement l'alimentation était identique quelle que soit la saison, à savoir :

Foin	1,500 kg
Pulpe sèche	1,500 kg
Concentré	300 g
Paille	à volonté

Tous les béliers utilisés en dehors des expériences sur l'influence de la durée d'éclairement étaient gardés pendant toute l'année sous un hangar ouvert sur 3 côtés. Ils étaient donc soumis aux variations climatiques naturelles. Pour les études sur l'influence de la durée d'éclairement, ils restaient par groupes de 3 ou 4 dans des cases de 10,5 m², dont les murs étaient blanchis à la chaux. L'éclairage était fourni par 2 tubes lumière du jour de 40 watts dont le déclenchement ou l'interruption étaient réglés par des horloges électriques. L'intensité lumineuse au niveau des yeux des béliers était de 145 lux vers le plafond et de 29 lux vers les murs des cases. Les animaux sortaient tous les jours de 9 heures à 16 heures 30 minutes dans des parcs à l'intérieur de la bergerie, eux-mêmes ouverts sur des parcs extérieurs. Ils recevaient leur alimentation pendant leur séjour dans ceux-là.

B. — PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS A ANALYSER

1° L'appareil génital.

Dans la majorité des cas, les animaux étaient abattus par égorgeement et saignée totale dans un abattoir situé à l'intérieur même du laboratoire. Les organes génitaux étaient prélevés de 2 à 5 minutes après la mort de l'animal et les différentes opérations à effectuer pouvaient être accomplies immédiatement.

Cependant, dans quelques cas, notamment lorsque les animaux étaient injectés avec du ³²P, il était nécessaire de procéder par castration. En effet, la carcasse de ces béliers étant radioactive ne pouvait être livrée au commerce. On aurait pu attendre que la radioactivité soit éliminée en conservant les carcasses congelées pendant 3 mois (PIGOURY et NIZZA, 1954), mais nous avons préféré garder les animaux pendant 1 an avant de les abattre : les carcasses ne contenaient alors plus de radioactivité détectable. La castration était accomplie sous anesthésie générale par le protoxyde d'azote et le cyclopropane, ou sous anesthésie locale par l'aminocaïne. De grandes précautions d'aseptie devaient être prises avec les animaux ayant reçu du ³²P, sinon des infections post-opératoires se développaient facilement.

2° Les spermatozoïdes.

a) **Techniques de récolte du sperme.** — Normalement, le sperme des animaux domestiques est recueilli soit par prélèvement dans le vagin de la femelle, soit à l'aide d'un vagin artificiel, soit enfin par stimulations électriques.

α) *Récolte à l'aide d'un vagin artificiel* : La première méthode est peu utilisée car elle présente de nombreuses imperfections : récupération incomplète de l'éjaculat, pollution du sperme par des bactéries ou des sécrétions vaginales même lorsque des lavages du vagin ont été effectués auparavant (MAC KENZIE et BERLINER, 1937).

La récolte à l'aide d'un vagin artificiel est le procédé le plus utilisé. On peut en trouver une description détaillée dans ANDERSON (1945), TERRILL (1947), BONADONNA (1948).

Sur les béliers nous avons utilisé un vagin artificiel identique à celui décrit par TERRILL (1947). Le lubrifiant utilisé était une pâte soluble à l'eau froide (DAUZIER et autres 1952), qui présente l'avantage sur la vaseline, généralement utilisée, de permettre un nettoyage du matériel beaucoup plus facile. La température du vagin artificiel variait selon les animaux de 42°C à 46°C (RODIN, 1934 et 1940). Lors des premiers essais, la brebis boute-en-train était toujours en chaleur, mais par la suite les récoltes étaient effectuées aussi facilement à l'aide d'une brebis non en rut. Le vagin artificiel était aseptisé avec de l'alcool 95° et l'éjaculat recueilli dans un tube stérile gradué au 1/10 de ml.

β) *Récolte du sperme à l'aide de stimulations électriques* : La récolte à l'aide d'un vagin artificiel offre un inconvénient important : elle dépend de la bonne volonté du bélier. Si, pour une raison quelconque : création de réflexes d'inhibition (SOKOLOVA, 1940), le bélier refuse de se prêter à la collecte, toute étude quantitative sur la production du sperme devient impossible. Il est donc nécessaire de disposer d'une technique indépendante de la volonté de l'animal : la stimulation électrique de l'éjaculation répond à cette condition.

Historique : BATELLI (1922) fut le premier, du moins à notre connaissance, à utiliser les stimulations électriques pour obtenir du sperme. Il plaçait une électrode au contact de la nuque et une autre dans la bouche d'un Cobaye, puis appliquait 2 fois un courant alternatif de 47 périodes sous 30 volts pendant environ 2 secondes avec un intervalle d'une ou deux minutes. Il obtenait ainsi l'éjaculation. De plus, la répétition de ce traitement tous les 3 ou 4 jours n'entraînait pas de diminution de poids des animaux.

Puis, MOORE et GALLAGHER (1929, 1930) modifièrent la technique pour étudier le fonctionnement des glandes accessoires du Cobaye. Mais c'est à GUNN (1936) que revient le mérite d'avoir utilisé les stimula-

tions électriques comme moyen de collecte courant chez le Bélier. GUNN plaçait une électrode dans le rectum de l'animal après avoir effectué un lavement à l'aide d'une solution de ClNa, puis piquait une aiguille dans le muscle longissimus dorsi au niveau de la 4^e vertèbre lombaire. Il employait du courant alternatif de 50 périodes sous 30 volts et 180 à 200 milliampères, et appliquait 10 à 20 (parfois jusqu'à 37) stimuli pendant 5 à 10 secondes avec des intervalles de repos identiques. D'une façon presque constante l'animal éjaculait du sperme normal sous tous les rapports. Toutes les techniques utilisées par la suite sont plus ou moins dérivées de celle de GUNN. BONADONNA (1938), BRADY et GILDOW (1939), TERRILL (1940) modifièrent légèrement soit la forme de l'électrode lombaire (tampon, rouleau), soit la fréquence des stimulations sur des Béliers et des Boucs.

Elle fut adaptée aux animaux de laboratoire (Souris, Rat, Cobaye) par de nombreux auteurs : TINET (1939), DURFEE et autres (1940), BORDET (1941), JOEL (1941), COLLERY (1944) avec des résultats variables et chez les animaux à fourrure par DUFFEE (1939), puis par BENHAM et ENDERS (1941).

Une nouvelle étape dans la technique de l'électroéjaculation fut marquée par la mise au point d'une électrode rectale bipolaire pour Bélier (LAPLAUD et CASSOU, 1945) possédant l'avantage de provoquer des réactions beaucoup moins violentes chez l'animal. Des applications et des modifications de cette électrode furent effectuées par ORTAVANT, THIBAUT et LAPLAUD (1948), LAURANS et CLÉMENT (1950), MATA et CANO (1952), LIKAR et KAMBI (1953).

L'électrode bipolaire de LAPLAUD, fut utilisée pour la première fois chez le Taureau par THIBAUT, LAPLAUD et ORTAVANT (1948). Ces auteurs, tenant compte des essais de KUN et PECZENICK (1937) sur le Rat commencent l'opération par une phase préparatoire où les excitations sont faibles, puis terminent par une phase d'attaque où l'intensité des excitations est beaucoup plus forte (ORTAVANT et THIBAUT, 1952). Au cours de la phase préparatoire on obtient surtout des sécrétions accessoires provenant des glandes urétrales (LUTWAK-MANN et ROWSON, 1953) ; le sperme riche en spermatozoïdes est éjaculé lors de la phase d'attaque. Cette technique fut préconisée comme méthode courante de collecte de sperme chez les Taureaux par LAPLAUD, ORTAVANT et THIBAUT (1948), et utilisée avec ou sans modifications par MASCARENHAS et GOMES (1950), EGRON (1952), MARDEN (1953), DZIUK, GRAHAM et PETERSEN (1954), LEBRETON (1954), RICHEMME (non publié). Elle a été simplifiée récemment par ROWSON et MURDOCH (1955).

Chez le Verrat, l'électroéjaculation fut effectuée par LAPLAUD et CASSOU (1948) et surtout par DZIUK et autres (1954).

— *Mécanismes et conditions d'action des stimulations électriques :*

Le mécanisme d'action des stimulations électriques reste obscur. On admet en général l'existence de 3 étages de centres réglant la fonction sexuelle (DENAMUR et SIMONNET, 1950) : un étage bulbo-médullaire, un étage diencéphalique et un étage cortical.

L'étage principal, bulbo-médullaire, renferme le centre de l'érection situé dans la moelle lombaire de L₁ à S₃, et le centre de l'éjaculation superposé anatomiquement au précédent de L₂ à L₃, mais indépendant fonctionnellement. L'éjaculation peut en effet avoir lieu après section de la moelle épinière au-dessus de la région lombaire.

L'étage diencéphalique permet l'élaboration de l'instinct sexuel, et l'étage cortical, siège des réflexes conditionnels, peut devenir un centre d'inhibition. Bien que certains auteurs aient obtenu l'éjaculation en inhibant les centres supérieurs par anesthésie à l'éther (SUZUKI, 1952), l'anesthésie ne semble pas avoir amélioré le rendement de l'électroéjaculation (GUNN, 1936 ; KOBOZIEFF et LARVOR, 1953 ; DZIUK et autres, 1954). Comme, d'autre part, FERRIS et autres (1936) ont montré que le lieu de passage le plus dangereux du courant électrique dans le corps est la région du cœur, il est nécessaire que les excitations électriques ne stimulent que les centres lombaires.

Toutes ces raisons expliquent pourquoi les électrodes recto-lombaires de GUNN étaient une amélioration sur les électrodes céphaliques, l'électrode rectale bipolaire de LAPLAUD et CASSOU (1945) une amélioration par rapport aux électrodes recto-lombaires de GUNN. La réduction minimum de la zone d'excitation a été réalisée récemment par ROWSON et MURDOCH (1955) chez le Taureau puisque leur électrode se réduit à deux anneaux.

Les caractéristiques du courant utilisé ont été discutées surtout par DALZIEL et PHILLIPS (1948) pour le Rat et le Lapin. Ces auteurs ont obtenu leurs meilleures réponses avec des courants de 500 à 1 000 périodes, bien qu'avec un courant de 60 périodes les résultats soient constants ; ils ont préconisé des stimulations brèves et une intensité de 8 à 16 mA. Chez le Taureau, MARDEN (1953) a trouvé une légère supériorité des courants de 20 à 30 périodes, par contre DZIUK et autres (1954) ne constatèrent pas de différence pour des courants de 15 à 900 périodes. C'est pourquoi, pour des raisons pratiques et économiques, nous préférons utiliser les courants de secteur à 50 périodes.

— *Technique utilisée*. Pour nos expériences, nous avons eu recours à l'électrode rectale bipolaire de LAPLAUD et CASSOU (1945) : cylindre long de 30 cm et de 3 cm de diamètre, possédant 13 anneaux en laiton isolés par des anneaux en ébonite et reliés alternativement aux deux bornes d'un potentiomètre pouvant débiter sous 2 à 24 volts, un courant alternatif de 50 périodes, ayant une intensité maximum de 1,0 ampère.

L'animal est solidement sanglé et contenu dans un travail, mais les membres sont laissés libres. Après avoir pratiqué un lavement à l'aide d'une solution de ClNa à 10 p. 1 000 et vidé le rectum des excréments, l'électrode lubrifiée est introduite dans celui-ci. Toutes les excitations sont obtenues en faisant varier progressivement l'intensité du courant de zéro, ou d'une faible valeur, à une valeur de pointe qui va en augmentant avec le déroulement de l'opération et vice-versa. La durée totale de chaque excitation varie de 3 à 5 secondes et l'intervalle entre chaque stimulation est de deux à trois secondes.

Au cours de la première partie ou phase préparatoire, l'augmentation de l'intensité du courant est très faible. Cette phase doit être assez courte, au maximum 5 à 6 excitations. Contrairement à ce qui se passe chez le Taureau, il n'est en effet pas recommandé de prolonger cette phase, sinon l'éjaculation est plus difficile à obtenir, bien que l'érection soit favorisée. DZIUK et autres (1954) signalent également ce phénomène chez le Bouc et le Bélier pour des courants de 1 à 2 volts.

Puis on augmente progressivement l'intensité des stimulations en faisant bien attention à ce que au cours de chaque stimulation la phase de décroissance soit beaucoup plus rapide que la phase d'accroissement. Après quelques excitations (2 à 6) on obtient en général un éjaculat normal. Si, après 5 ou 6 excitations l'animal n'a pas éjaculé, il est inutile de continuer : très souvent l'éjaculation se produit 30 secondes plus tard. S'il n'en est pas ainsi, une ou deux fortes stimulations après un repos de 2 à 3 minutes, donneront à coup sûr le sperme. Les échecs dans l'emploi de cette méthode ont été extrêmement rares.

Le maintien de l'électrode et les stimulations peuvent être effectuées par le même opérateur, tandis que le sperme est récolté par un deuxième opérateur dans un cône en caoutchouc à l'extrémité duquel est attaché un tube de récolte gradué au 1/10^e de ml. Il est indispensable de prendre un certain nombre de précautions relatives à la température du cône et du tube de récolte. On sait en effet que le sperme est très sensible aux chocs de température (BIRILLO et PUHALSKII, 1936 ; GLADCINOVA, 1937). C'est pourquoi si on n'opère pas dans un local où la température peut être réglée, il est nécessaire d'enrober le tube et le cône de collecte dans un manchon en coton préalablement mis dans une étuve à 37°. Ainsi, même si l'opération demande quelques minutes, les récipients de collecte conservent une température suffisante pour éviter toute action nocive sur la vitalité du sperme. A l'aide de cette technique, on peut obtenir plusieurs éjaculats successifs : nous en avons obtenu jusqu'à 4 en moins de 30 minutes, soit 9 ml de sperme. On peut ainsi très facilement récolter des quantités importantes de spermatozoïdes et provoquer une diminution des réserves spermatiques de la queue de l'épididyme indépendamment de la volonté de l'animal.

Nous n'avons jamais observé d'accident bien qu'ayant effectué plus de 600 récoltes. Certains béliers étaient soumis pendant près de deux mois à des collectes quotidiennes (sauf le dimanche) sans qu'il en résulte un effet nocif sur leur santé. Ces faits confirment les observations de GUNN (1936), et de HILL et autres (1956).

γ) *Comparaison des différentes méthodes de collecte* : BRADY et GILDOW (1939), TERRILL (1940) ont comparé les 3 méthodes de collecte. Ils ont constaté que la récolte au vagin artificiel fournissait la plus grande concentration et le plus grand nombre de spermatozoïdes, l'électroéjaculation donnant le plus grand volume. ORTAVANT, LAPLAUD et THIBAUT (1948) ont effectivement constaté en opérant par électroéjaculation sur des béliers Mérinos, une plus faible concentration en spermatozoïdes et recueilli un nombre total de spermatozoïdes légèrement inférieur à celui récolté au vagin artificiel. Cependant, au cours des expériences rapportées dans ce travail, nous n'avons pas observé de différence dans le nombre total de spermatozoïdes récoltés par stimulations électriques ou à l'aide d'un vagin artificiel sur des béliers Ile-de-France (tableau I).

TABLEAU I

Comparaison de différentes techniques de récolte de sperme.

Béliers	Nombre total de spz (10^8) récoltés		Auteur
	Vagin artificiel	Stimulation électr.	
Mérinos.....	3,2 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,5	ORTAVANT, LAPLAUD et THIBAUT (1948) ORTAVANT (non publié)
Ile-de-France.....	4,75 $\pm$ 0,40	4,90 $\pm$ 0,60	

Si l'on provoque plusieurs fois l'éjaculation, comme nous l'avons indiqué précédemment, la quantité totale de spermatozoïdes recueillis peut être très importante.

Enfin, TERRILL (1940) sur le Bélier, RICHEMME, ORTAVANT et THIBAUT (non publié), DZIUK et autres (1954) sur le Taureau, ne trouvent pas de différence dans le pouvoir fécondant du sperme récolté au vagin artificiel ou par des stimulations électriques.

Par conséquent le sperme récolté grâce à la technique électrique est normal sous tous les rapports.

b) **Séparation des spermatozoïdes à partir du canal épидидymaire.** — Les spermatozoïdes entassés dans le canal épидидymaire progressent, entraînés dans le fluide épидидymaire par les mouvements ciliaires de l'épithélium (Mac MILLAN et HARRISSON, 1955), et peut-être aussi poussés par l'arrivée de nouveaux spermatozoïdes. Dans une section de 10 μ d'épaisseur du canal épидидymaire, il n'est pas rare de voir une grande quantité

de spermatozoïdes dépassant parfois la centaine. On conçoit facilement que, si on ouvre le canal épидидymaire à un endroit, les spermatozoïdes se répandent dans le milieu ambiant. C'est sur ce principe que sont basées la plupart des techniques d'extraction des spermatozoïdes de l'épididyme. Nous avons utilisé celle de DALLAM et THOMAS (1953) légèrement modifiée.

L'épididyme est divisé en général en 6 fractions : la tête, le corps et la queue étant séparés en une partie proximale et une partie distale. Chacune de ces fractions est découpée à l'aide de ciseaux dans du sérum physiologique en un grand nombre de fragments aussi petits que possible. On laisse l'ensemble macérer à froid (0°C, + 2°C) pendant environ 30 minutes, puis on filtre sur 6 couches de gaze. Le filtrat est centrifugé pendant 10 minutes à 4 800 t/mn ; le culot est homogénéisé très brièvement (environ 10 secondes) à très faible vitesse (500 à 800 t/mn) dans un appareil de POTTER-ELVEJEHM, cette opération étant uniquement destinée à remettre en suspension dans du sérum physiologique froid les spermatozoïdes récoltés. Une deuxième centrifugation pendant 5 minutes à 3 000 t/mn permet de récupérer un nouveau culot de spermatozoïdes. Ce culot est congelé ⁽¹⁾, puis homogénéisé dans les mêmes conditions que précédemment. Une nouvelle centrifugation (5 minutes à 3 000 t/mn) permet d'éliminer une grande partie des hématies. Deux nouvelles homogénéisations dans de l'eau distillée suivies de centrifugations (10 minutes à 2 000 t/mn) permettent d'obtenir une préparation de spermatozoïdes pratiquement pure.

3° Libération et détermination de la quantité totale de spermatides à noyaux allongés et de spermatozoïdes testiculaires.

Comme nous le verrons dans les chapitres ultérieurs, les spermatides présentent, pendant certaines phases du cycle de l'épithélium séminifère, un noyau allongé très semblable à celui des spermatozoïdes mûrs. Elles sont alors aisément reconnaissables et constituent un excellent point de repère au cours du cycle spermatogénétique. Cependant les noyaux de ces spermatides sont réunis en faisceaux et enrobés dans le cytoplasme du syncytium de Sertoli où ils subissent ou ont subi la copulation décrite pour la première fois par BENDA (1887). Pour les compter il est nécessaire d'une part de rompre cette liaison et d'autre part de séparer les noyaux les uns des autres sans les détériorer.

a) **Historique :** C'est l'observation de CROSSMON (1937), selon laquelle les noyaux sont éjectés des cellules musculaires après traitement du tissu par l'acide citrique, qui conduisit STONEBURG (1939), puis DOUNCE (1943

⁽¹⁾ Nous avons toujours obtenu une meilleure élimination des hématies après congélation.

a, b, c) à la mise au point d'une technique précise d'isolement des noyaux. Ce dernier auteur opère par broyage des tissus dans un Waring Blendor pendant 10 à 15 minutes, en présence d'une solution d'acide citrique $\frac{M}{475}$ ou $\frac{M}{14}$ selon qu'il opère sur du foie ou des tumeurs. Cependant la technique de Dounce a été critiquée par HOERR (1943) qui prétend que l'utilisation du Waring Blendor est trop brutale et qu'il est préférable d'utiliser une solution à 0,85 p. 100 de ClNa à la place de l'eau distillée.

Quelle que soit la technique utilisée, il faut remarquer que les noyaux des spermatides à chromatine condensée et ceux des spermatozoïdes sont beaucoup plus résistants que les autres noyaux aux différents traitements. C'est ainsi que ZITTLE et O'DELL (1941) sont obligés d'utiliser un vibreur ultrasonique pour séparer la tête des spermatozoïdes de leur queue. De même MANN (1949) utilisant un agitateur mécanique rapide avec de fines billes de verre, trouve une rupture et une disparition de la queue et de la pièce intermédiaire ; par contre, il ne constate aucun effet visible sur la tête des spermatozoïdes. En comptant les têtes à la fin de l'expérience, MANN trouve que leur nombre correspond exactement à celui des spermatozoïdes originellement présents dans la suspension spermatique. Leur résistance est également importante vis-à-vis des solutions hypotoniques et hypertoniques (BLACKSHAW et EMMENS, 1951 ; BROCHART, 1951), bien que certains auteurs signalent une légère différence des dimensions des têtes dans les solutions non isotoniques (PURSLEY et HERMAN, 1950). Cependant aucun de ces auteurs ne signale une destruction de tels noyaux par éclatement ou rétrécissement. On peut donc employer pour leur séparation des techniques plus brutales que celles utilisables avec d'autres catégories de cellules.

b) Technique utilisée : Nous avons essayé d'adapter la technique de DOUNCE au testicule en tenant compte des critiques qui ont été formulées et des observations déjà faites sur la résistance des noyaux spermatiques.

Nous avons utilisé un broyeur Turmix à lames tranchantes, tournant à 12 000 t/mn. Puisqu'on a critiqué l'action brutale du Waring Blendor, nous avons essayé de réduire la durée de broyage au minimum. Le testicule est débarrassé de l'albuginée, puis coupé en morceaux de la grosseur d'une noix, et enfin broyé dans le Turmix en présence d'environ 300 cc d'une solution à 0,9 p. 100 de ClNa ou à $\frac{M}{15}$ d'acide citrique. La bouillie est mise à macérer à $+ 1^{\circ}\text{C}$ après rinçage du Turmix avec une solution identique à celle du broyage de façon que le volume total de liquide soit égal à environ 600 cc pour un testicule de 200 g. Les deux solutions, sérum physiologique ou acide citrique $\frac{M}{15}$, nous ont donné éga-

lement de bons résultats : les numérations effectuées après broyage et macération ne nous ont pas révélé de différences significatives. Il est à noter cependant qu'avec l'acide citrique, l'examen microscopique est un peu moins facile.

Influence du temps de broyage et de macération : Nous avons utilisé des temps de broyage bien inférieurs à ceux préconisés par DOUNCE puisque cet auteur conseille des temps allant de 10 à 15 minutes. Les testicules de différents béliers étaient partagés en 2 parties aussi semblables que possible et de poids connu. Une moitié était soumise à un broyage de une minute, et l'autre moitié à un broyage de 2 minutes. On constate que dans le deuxième cas on retrouve moins de noyaux que dans le premier, comme le montre le tableau ci-dessous.

TABLEAU II

Influence du temps de broyage sur le nombre de spermatides et de spermatozoïdes (10^8) libérés par gramme de tissu testiculaire (après macération de 48 h).

Temps de Broyage	1 minute	2 minutes
Nombre de noyaux	1,006 $\pm$ 0,020	0,816 $\pm$ 0,018
Nombre de données	11	11

Ainsi, un broyage de 2 minutes détruit un certain nombre de noyaux.

On ne peut cependant descendre en dessous de 1 minute. En effet pour des quantités de tissu testiculaire de l'ordre de 100 grammes des temps de broyage inférieurs à 1 minute donnent une bouillie imparfaite. D'ailleurs, même après 1 minute de broyage, la libération des spermatides n'est complète qu'après 48 heures de macération, bien que la bouillie présente une apparence homogène. Après 24 heures de macération les résultats des numérations sont significativement inférieurs à ceux obtenus les jours suivants, ainsi que le montre l'examen du tableau suivant.

TABLEAU III. — *Influence de la durée de macération après 1 minute de broyage sur les résultats des numérations des spermatides et des spermatozoïdes.*

Organe	Temps de macération				
	24 h	48 h	72 h	96 h	5-6-7 jours
Testicule	87,9 $\pm$ 3,8	100	101,9 $\pm$ 2,6	103,8 $\pm$ 4,4	99,2 $\pm$ 3,7
Nombre de données	17	103	45	27	14
Tête épидидyme	93,3 $\pm$ 7,2	100	101,9 $\pm$ 4,3	106,3 $\pm$ 4,7	88,6 $\pm$ 9,2
Nombre de données	14	71	35	25	7
Queue épидидyme	99,7 $\pm$ 6,9	100	105,8 $\pm$ 2,9	100,0 $\pm$ 3,6	111,3 $\pm$ 6,3
Nombre de données	10	92	36	30	16

Dans ce tableau les résultats des numérations sont tous rapportés à ceux obtenus après 48 heures de macération.

Ainsi, il apparaît que le temps de boyage optimum est de 1 minute, à 12 000 tours, et que les numérations doivent être effectuées sur des broyats ayant subi de 48 heures à 96 heures de macération en chambre froide.

c) **Numérations.** — Les numérations ont été faites à l'aide d'un hématimètre après dilution de 1 cc de bouillie dans 9 cc de sérum physiologique formolé. Les prélèvements ne sont effectués qu'après une bonne homogénéisation de la bouillie de façon à réduire les écarts entre les différentes numérations. Nous avons utilisé l'hématimètre Thoma, les noyaux étant comptés pour chaque numération dans 128 carrés. En effectuant 4 numérations à partir de la même bouillie, nous avons obtenu sur 22 testicules une déviation standard sur la moyenne variant de 1,1 à 9,3 p. 100 avec une moyenne de 4,7 p. 100. Nous retrouvons ainsi les résultats indiqués par la plupart des auteurs qui ont discuté l'utilisation de l'hématimètre pour les numérations des spermatozoïdes (COMSTOCK et autres, 1943 ; ÉMIK et SIDWELL, 1947 ; BANGS et UNDERWOOD, 1948 ; ROTSCCHILD, 1950 ; COX et MELROSE, 1953).

C. — TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

1° Obtention et coloration des coupes histologiques.

Les prélèvements sur les testicules de Bélier étaient effectués à différents endroits sur un même testicule, également situés sur les différents testicules, et fixés immédiatement. A cet usage nous avons utilisé le Bouin-Hollande, pour les études générales sur le cycle spermatogénétique, puis, pour les différentes recherches sur la spermiogenèse, l'Orth-Muller, le Flemming doux, le Helly et le Regaud. Pour les frottis de l'acrosome, les fixateurs qui nous donnèrent les meilleurs résultats furent le Rossman, le formol et surtout les vapeurs d'acide osmique à 2 p. 100 pendant 20 minutes sur frottis humides. Après inclusion, les coupes étaient effectuées à 10 μ pour l'étude générale et à 5 μ ou 2,5 μ pour l'étude des spermatoocytes ou des spermatides.

Nous avons utilisé la coloration à l'hématoxyline ferrique de REGAUD pour l'étude du matériel de Golgi ou des mitochondries, et l'hémalum pour l'autoradiographie. Mais les deux colorations auxquelles nous avons fait le plus souvent appel sont la réaction nucléaire de Feulgen et la réaction acide periodique-Schiff de MAC-MANUS (1946).

a) **Réaction de Feulgen.** — La réaction nucléaire de Feulgen a été très utilisée en histologie, soit pour faire des études sur l'acide désoxyribonucléique des cellules, soit simplement comme coloration courante des noyaux cellulaires. La réaction de Feulgen dépend de la formation

d'un composé coloré en pourpre quand des fonctions aldéhydiques ou pseudoaldéhydiques réagissent avec la fuschine décolorée par l'anhydride sulfureux.

Cette réaction a été autrefois souvent critiquée soit pour son manque de spécificité, soit pour son incapacité à localiser exactement l'acide désoxyribonucléique (ADN). Cependant la plupart des auteurs admettent aujourd'hui que dans certaines conditions la réaction de Feulgen est spécifique de l'ADN. Cette réaction est actuellement très employée et elle a même été transformée en un test microchimique pour la détermination quantitative de l'ADN dans les préparations histologiques (RIS et MIRSKY, 1949 ; SIBATANI et NAORA, 1953 ; SIBATANI et FUKUDA, 1953 ; SIBATANI, 1954 ; LEUCHTENBERGER, 1954 ; NAORA, 1955) à condition que certaines précautions soient respectées.

Le mécanisme de la réaction se déroule classiquement de la façon suivante : l'hydrolyse acide ménagée de l'ADN produit d'abord une dépolymérisation de celui-ci (ERRERA, 1952), puis libère les bases puriques : adénine et guanine, qui découvrent chacune le groupement pseudoaldéhydique actif du désoxyribose donnant ainsi naissance à une molécule d'acide thymique (ELY et ROSS, 1949 ; THOMAS, 1950).

2) *Influence du temps d'hydrolyse* : La libération des bases est rapide ; elle est pratiquement complète après 15 à 16 minutes d'hydrolyse avec ClH, N, à 60°C. Parallèlement a lieu un deuxième phénomène constitué par la solubilisation de l'acide thymique après 12 minutes d'hydrolyse ; cependant, cette solubilisation ne devient importante qu'après 20 minutes (THOMAS, 1950), elle tend alors à diminuer l'intensité de la coloration nucléaire.

Nous avons essayé les hydrolyses avec ClH, 6 N à froid (ITIKAWA et OGURA, 1954) ou avec PO_4H_3 (HASHIM, 1953), mais les résultats nous sont apparus inférieurs à ceux de l'hydrolyse classique.

En fait, pour le testicule de Bélier, nous avons obtenu les plus belles colorations après 19 minutes d'hydrolyse dans ClH, N, à 60°C, après fixation au Bouin-Hollande. Le résultat de l'hydrolyse dépend en effet du fixateur.

3) *Influence des fixateurs* : Il est classique d'utiliser le Carnoy comme fixateur des tissus destinés à subir la réaction de Feulgen. Cependant ce fixateur n'a pas d'action protectrice vis-à-vis de la solubilisation de l'acide thymique, ou de la nucléohistone, action que possèdent les fixateurs à base de formol (RIS et MIRSKY, 1949, SIBATANI et FUKUDA, 1953). C'est ainsi que pour les tissus fixés au Carnoy l'intensité de coloration diminue après 15 minutes d'hydrolyse, tandis que pour les tissus fixés au formol il faut attendre plus de 25 minutes d'hydrolyse pour observer une diminution de l'intensité de coloration. De plus, avec le formol on obtient une répartition plus homogène de la coloration dans le noyau,

ce qui peut présenter un grand avantage pour les mesures quantitatives (RIS et MIRSKY, 1949). Avec le testicule de Béliér, nous avons fait des constatations identiques.

γ) *Influence de la durée de coloration* : Celle-ci a été étudiée par ELY et ROSS (1949) et RIS et MIRSKY (1949). Pour le testicule de Béliér, nous avons obtenu les meilleurs résultats après 70 à 80 minutes de coloration à la température du laboratoire. Si on prolonge la durée d'action du réactif de Schiff on constate une diminution de l'intensité de coloration, mais celle-ci n'est appréciable qu'après plusieurs heures, sans doute due à une nouvelle hydrolyse acide par le réactif de Schiff.

δ) *Influences diverses* : Nous avons toujours constaté une très forte augmentation de l'intensité de coloration par lavage des coupes à l'eau du robinet pendant 15 à 30 minutes après les 3 rinçages à l'eau sulfureuse d'une minute chacun.

Après avoir subi la coloration de l'eulgen les coupes étaient passées pendant quelques secondes dans une solution très diluée de vert lumière (environ 1 p. 1 000), et montées dans le baume, selon la technique classique.

b) **Coloration acide periodique-Schiff.** — Cette coloration (PAS) a été développée par MAC MANUS (1946) et HOTCHKISS (1948) ; elle a été préconisée par LEBLOND (1950), LEBLOND et CLERMONT (1952), CLERMONT (1953) pour l'étude de la spermiogenèse des Mammifères. Elle est basée sur l'oxydation des groupements 1-2 glycol ou α-amino alcool par l'acide periodique avec production d'aldéhyde.

Les aldéhydes produits recolorent le réactif de Schiff. Nous avons utilisé des solutions alcooliques (HOTCHKISS, 1948) et procédé comme suit :

- oxydation des coupes déparaffinées ou des frottis pendant 10 minutes dans la solution d'acide periodique ;
- lavage dans l'alcool 70° pendant 1 minute ;
- passage dans la solution réductrice pendant 5 minutes de façon à enlever l'excès d'acide periodique (facultatif) ;
- lavage dans l'alcool 70° pendant 1 minute ;
- coloration dans le réactif de Schiff pendant 45 minutes ;
- rinçage dans 3 baigns d'eau sulfureuse (1 minute chacun) ;
- lavage à l'eau du robinet pendant 15 à 30 minutes.

Les meilleures colorations ont été réalisées après fixation à l'Orth-Muller ou au Regaud. On peut réaliser les deux réactions : Eulgen et PAS sur une même coupe, en effectuant l'hydrolyse avant l'oxydation et en colorant au réactif de Schiff après les 2 traitements chimiques (CLERMONT, 1953). Il est recommandé, dans ce cas, de ne pas utiliser la solution réductrice. Nous n'avons cependant, *avec les deux réactions combinées*,

jamais obtenu d'aussi bons résultats qu'avec chacune, effectuée séparément. On peut aussi colorer les noyaux par l'hématoxyline ou l'hémalum après traitement au PAS.

2° Numération des cellules dans les coupes histologiques.

Les numérations de cellules dans des coupes histologiques risquent souvent d'être entachées d'erreurs si on ne prend pas certaines précautions. ABERCROMBIE (1946) a fait une étude précise de ces précautions et a proposé une formule permettant de calculer le nombre P de centres nucléaires réellement présents dans une coupe histologique :

$$P = A \frac{E}{E + D} \quad (1)$$

Dans cette formule, A représente le nombre de noyaux effectivement comptés, D le diamètre nucléaire moyen et E l'épaisseur de la coupe histologique. Cette formule suppose que l'on compte tous les noyaux présents dans la coupe, jusqu'aux infiniment petits. Dans les coupes histologiques de testicules, il ne peut en être ainsi pour les spermatogonies : en effet les noyaux ayant un très petit diamètre sont souvent difficilement identifiables, il existe donc en fait un diamètre inférieur au-dessous duquel les noyaux ne sont plus comptés. La formule de ABERCROMBIE devient donc :

$$P = A \frac{E}{E + 2\sqrt{\left(\frac{Dm}{2}\right)^2 - \left(\frac{Di}{2}\right)^2}} \quad (2)$$

dans laquelle :

Dm = diamètre moyen de la population,

Di = diamètre inférieur de la population.

Cette formule d'ailleurs n'est qu'approchée. On peut également, pour vérifier les résultats, compter, lorsque c'est possible, les noyaux dans des coupes histologiques beaucoup plus épaisses que le diamètre nucléaire des cellules considérées. La comparaison des résultats obtenus donne en général une bonne concordance.

D. — TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

1° Extraction des différentes fractions phosphorées des cellules germinales et des spermatozoïdes, et détermination de leur radioactivité spécifique.

Le ^{32}P , injecté par voie intrapéritonéale à nos animaux sous forme de $\text{PO}_4 \text{HNa}_2$, se trouve incorporé dans différents composés au sein des cellules germinales. Si on veut étudier leur activité spécifique, il est néces-

saire de séparer ces différentes fractions. C'est ce que nous avons essayé de faire sur les spermatozoïdes et sur les cellules germinales du testicule.

a) **Extraction et mesure de la radioactivité des différentes fractions phosphorées des homogénats de spermatozoïdes.** — SCHMIDT et THANNHAUSER (1945) furent les premiers à proposer un procédé de fractionnement donnant des résultats satisfaisants. Leur technique a rendu de très grands services, et a été largement utilisée avec ou sans modifications. L'hydrolyse alcaline de l'acide ribonucléique (ARN) donne naissance à des nucléotides cycliques fortement alcali-labiles, tandis que l'acide désoxyribonucléique (ADN) ne subit pas une telle dégradation. Ce dernier peut donc être précipité et séparé en milieu acide après l'hydrolyse alcaline. La même année SCHNEIDER (1945), mettait au point un procédé d'extraction des acides nucléiques par l'acide trichloracétique chaud et, en combinant les 2 techniques (1946), pouvait isoler les fractions ribonucléiques et désoxyribonucléiques avec plus de précision.

La technique de SCHMIDT et THANNHAUSER a été critiquée par DAVIDSON et SMELLIE (1952), HOKIN et HOKIN (1952), DRASHER (1953). En effet, le fractionnement n'est pas parfait, la fraction ARN pouvant être contaminée soit par l'apparition d'une quantité significative de ADN alcali-soluble, soit par du phosphore inorganique, soit par un reliquat de phospholipides. De plus DAVIDSON, FRAZER et HUTCHINSON (1951) ont, avec du ^{32}P , montré que la fraction ADN était souvent contaminée elle aussi par du phosphore inorganique déjà sous cette forme au départ ou provenant de l'hydrolyse des phosphoprotéines. Nous verrons par la suite ce qu'il faut penser de ces critiques dans le cas présent.

OGUR et ROSEN (1949, 1950) préconisèrent une nouvelle technique de séparation des acides nucléiques par extraction à l'acide perchlorique à différentes concentrations et à différentes températures. Cette technique donne d'excellents résultats sur les tissus végétaux, mais elle est moins facilement applicable aux tissus animaux car l'acide perchlorique froid extrait aussi de l'ADN en même temps que de l'ARN (HARBERS et NEUMANN, 1954).

Les techniques classiques d'isolement des acides nucléiques sont difficiles à appliquer aux spermatozoïdes de Bélier car leur ADN est insoluble dans les solutions salines (THOMAS et MAYER, 1949 ; MANN, 1954 ; DALLAM et THOMAS, 1953).

Cependant DALLAM et THOMAS (1953) ont pu isoler l'ADN des spermatozoïdes de Bélier après action de NaOH, 0,1N puis d'une solution à parties égales de NaOH, 2N et ClNa, 2M et plusieurs solubilisations et précipitations successives.

Nous avons surtout eu recours à la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945), celle de DALLAM et THOMAS (1953) n'ayant

été utilisée qu'occasionnellement. Nous avons donc opéré de la façon suivante :

a) Procédé d'extraction de SCHMIDT et THANNHAUSER (Tableau IV).

TABLEAU IV

Extraction de différentes fractions phosphorées des spermatozoïdes de bélier.

La suspension lavée de spermatozoïdes est homogénéisée dans au moins 10 volumes d'une solution glacée (0°C, + 2°C) d'acide trichloroacétique (ATC) à 10 p. 100 pendant deux minutes environ, puis laissée au repos pendant 30 minutes à cette même température. Après centrifugation, le résidu est à nouveau extrait deux fois puis lavé avec de l'eau distillée. Ce nombre d'extractions est suffisant pour enlever la presque totalité du P acido-soluble, car la radioactivité de la dernière extraction est extrêmement faible.

Le résidu est suspendu dans 5 volumes d'éthanol 95 p. 100 froid pendant 10 minutes, centrifugé, lavé à nouveau par une même quantité d'éthanol froid afin qu'il ne reste aucune trace d'acide trichloracétique, puis extrait à 3 reprises avec 10 volumes d'un mélange alcool-éther (1/1)

bouillant pendant 5 minutes chaque fois, et enfin lavé avec 5 volumes d'éther.

100 mg de résidu sec ainsi délipidé sont alors hydrolysés avec 10 ml d'une solution de NaOH, N à 37°C pendant 20 heures. Après centrifugation, l'ADN et les protéines sont précipités avec 0,2 volume ClH, 6N + 1 volume ATC 5 p. 100 froid. Ce précipité, lavé deux fois avec 3 ml de ATC 5 p. 100 froid, est extrait par 5 ml d'acide trichloracétique 5 p. 100 à 90°C.

β) *Détermination du phosphore* : La détermination de la quantité de phosphore dans chacune des fractions extraites a été effectuée selon la technique d'ALLEN (1940).

Une partie aliquote est mise à minéraliser pendant 1 heure avec le mélange suivant :

Acide sulfurique : 3 parties,

Acide perchlorique : 2 parties.

Puis on ajoute 2 parties ou plus d'acide nitrique, selon la quantité de matière organique à détruire. Après refroidissement on introduit une solution de molybdate d'ammonium à 8,3 p. 100 (1 ml) puis le réactif d'ALLEN (2 ml) et on complète le volume à 25 ml avec de l'eau distillée. Le développement de la coloration s'effectue à l'obscurité, puis les mesures sont faites 10 minutes après.

γ) *Mesure de la radioactivité* : Une partie aliquote de la fraction extraite est mise dans une coupelle en verre et séchée sous une lampe infrarouge. Il est nécessaire que l'étalement de cette fraction soit bien uniforme dans la coupelle. Après séchage la coupelle est portée sous un compteur cloche à atmosphère d'halogène avec une géométrie constante et la radioactivité mesurée.

Les résultats ont toujours été rapportés au jour de l'injection.

b) **Extraction des différentes fractions phosphorées des coupes histologiques pour l'autoradiographie.** — Une revue récente et critique des techniques utilisables a été faite par HARBERS et NEUMANN (1954).

Une partie du ^{32}P est perdue au cours des différentes opérations histologiques (fixation, inclusion, déparaffinage...) : phosphore inorganique, phosphore acido-soluble et un peu de phosphore lipidique (VINCENT, 1954 ; KAMINSKY, 1955). Cependant il reste encore une grande quantité de ^{32}P , surtout dans les acides nucléiques et les phosphoprotéines. Les techniques utilisées procèdent alors soit par extraction enzymatique, soit par extraction chimique.

L'utilisation de la ribonucléase est théoriquement parfaite. Cependant il est nécessaire de prendre un certain nombre de précautions : l'enzyme doit être exempt de désoxyribonucléase, ce qui est parfois difficile à obtenir ; d'autre part la digestion enzymatique de l'acide ribonucléique n'est

pas totale. Il reste toujours un noyau, un « core » résistant à l'action de l'enzyme. Les conditions de son utilisation ont été discutées par VERCAUTEREN (1950). De même la désoxyribonucléase donne parfois des résultats médiocres en cytochimie. Nous avons cependant obtenu de bons résultats en utilisant cette dernière dissoute à 0,2 p. 100 dans un tampon véronal sur des coupes à 37°C pendant 5 heures.

C'est pourquoi les extractions chimiques sont très souvent utilisées : c'est à elles que nous avons fait appel. L'hydrolyse alcaline de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945) a été adaptée aux coupes histologiques par SULKIN (1951). Cet auteur extrait l'ARN en traitant les coupes par une solution de KOH, 0,1 N pendant 45 minutes à la température de la pièce. Il ne constate pas d'extraction de l'ADN. Cependant HARBERS et NEUMANN (1953) contestent ce dernier fait et trouvent que les noyaux subissent une légère perte en ADN.

L'action des différents acides a été revue par ATKINSON (1952). SULKIN et KUNTZ (1950) ont utilisé sur les tissus animaux la technique préconisée par ERICKSON, SACHS et OGUR (1949) sur les tissus végétaux : c'est-à-dire l'extraction différentielle des acides nucléiques par l'acide perchlorique. Mais la technique la plus intéressante semble être l'élimination du phosphore ribonucléique par l'acide chlorhydrique. En effet, de nombreux auteurs (ELY et ROSS, 1949 ; VENDRELY-RENDAVEI, 1949 ; POUYET 1949) ont montré qu'une hydrolyse avec HCl normal à 60°C pendant 10 minutes enlevait tout l'ARN des coupes histologiques, sans toucher à l'ADN. Après les traitements histologiques classiques, l'extraction des lipides avec un mélange d'alcool-éther ou avec de la pyridine, et l'hydrolyse chlorhydrique, seul le phosphore contenu dans l'ADN reste sur les coupes. Le phosphore de l'ADN n'est extrait qu'après 12 minutes d'hydrolyse, et, 2 à 10 p. 100 seulement du phosphore désoxyribonucléique sont solubilisés après 13 minutes, (SIBATANI et FUKUDA, 1953). Cette technique possède en outre l'avantage de permettre la coloration de Feulgen.

Nous avons utilisé les 3 réactifs : KOH, ClO_4H , et ClH selon les indications que nous venons de donner, sur des coupes ayant subi ou non l'action de l'alcool-éther (1/1) à 70°C pendant 10 minutes. Après chaque traitement, les coupes étaient très soigneusement lavées dans l'eau distillée.

2° Mise en évidence du ^{32}P dans les cellules par la technique autoradiographique.

L'autoradiographie, technique histo- ou cytochimique récente, est basée sur la propriété qu'ont les particules ionisantes (rayons α , β ou γ) émises par les corps radioactifs d'impressionner les émulsions photogra-

phiques. Il est souvent commode, parfois même c'est la seule méthode, d'utiliser cette propriété pour détecter et localiser les radioéléments contenus dans différentes cellules. Des mises au point ont été faites récemment par FARRAGGI (1952), DONIACH, HOWARD et PELC (1953), BOYD (1955).

Nous avons d'abord utilisé l'émulsion pelliculable Kodak pour la détection du ^{32}P dans la masse de spermatozoïdes rassemblés dans le canal épидидymaire selon la technique de DONIACH et PELC (1950) et de ZAJDELA (1951). Mais cette technique dans laquelle on compte les grains d'argent impressionnés, est assez difficile à utiliser avec le ^{32}P par suite de la faible épaisseur de l'émulsion. En effet, HERZ (1951), LAMERTON (1953), ont déterminé pour le film pelliculable Kodak le rendement en grains d'argent des particules β émises : si pour ^{35}S il est de 1,8 grains par particule β émise, pour ^{32}P il n'est que de 0,5 à 0,77 grains. DONIACH et PELC (1950) ont déterminé qu'une concentration minimum de 10 grains par 100 μ^2 au-dessus du « bruit de fond » est nécessaire pour que l'autoradiographie soit positive. Il faut donc que plus de 40 atomes de ^{32}P se désintègrent dans cette surface. Une telle radioactivité est souvent difficile à obtenir surtout si l'on étudie l'incorporation du ^{32}P dans l'acide désoxyribonucléique des cellules d'animaux de la taille des Ovins.

Plus récemment, des émulsions nucléaires extrêmement sensibles, pouvant détecter les traces d'électrons d'énergie élevée, ont été mises au point (BOYD et LEVI, 1950 ; LEVI, 1954). La plupart des auteurs s'accordent actuellement à reconnaître la grande efficacité de l'émulsion Ilford G5. C'est celle qui nous a donné les meilleurs résultats. Outre sa sensibilité, elle présente l'avantage de pouvoir être coulée sous différentes épaisseurs et permet d'adapter ainsi l'épaisseur de la couche d'émulsion à la radioactivité des coupes et à la précision d'examen que l'on désire.

Nous avons essayé d'utiliser cette émulsion sous couche épaisse selon la technique de LEVI (1954) mais il était alors difficile d'examiner les cellules testiculaires. C'est pourquoi nous avons préféré augmenter les doses de ^{32}P injectées aux animaux et diminuer l'épaisseur de l'émulsion. Les meilleurs résultats nous ont été donnés par l'obtention d'une couche d'émulsion séchée et développée de 5 à 8 μ d'épaisseur.

L'émulsion est rendue liquide par chauffage à 50°C, puis conservée à 40, 45°C. Quelques gouttes sont alors déposées sur les préparations tièdes, et étalées à l'aide d'un agitateur. L'émulsion est ensuite gélifiée, en abaissant la température, et séchée pendant une nuit à l'aide d'un ventilateur. Les lames sont conservées en boîtes, dans un « château » de plomb à + 1°C. Du chlorure de calcium maintient un taux d'humidité constant à l'intérieur des boîtes.

Après 10 à 30 jours d'exposition, les laines sont révélées à l'aide d'un révélateur à l'amidol (FARAGGI, 1952) pendant 20 minutes à 19-20°C. La composition de ce révélateur est la suivante :

Sulfite de sodium anhydre	18 gr
Bromure de potassium à 10 %	8 cc
Amidol	4,5 gr
Eau distillée q.s.p.....	1 000 cc

Ce révélateur doit être utilisé immédiatement.

Puis les préparations rincées sont passées pendant 5 à 8 minutes dans un bain d'arrêt d'acide acétique 2 p. 100, et enfin fixées, après un nouveau rinçage, pendant 2 à 3 heures dans une solution d'hyposulfite de sodium à 300 grammes par litre. Après lavage pendant 2 à 3 heures à l'eau du robinet, les coupes sont colorées à l'hémalum pendant 30 minutes, puis, après un nouveau lavage, séchées à l'aide d'un ventilateur et examinées.

PREMIÈRE PARTIE

DÉFINITION ET ÉTUDE HISTOLOGIQUE DU CYCLE
SPERMATOGÉNÉTIQUEI. — ASSOCIATIONS CELLULAIRES ET CYCLE
SPERMATOGÉNÉTIQUE

A. — DÉFINITIONS

Une section orthogonale quelconque d'un tube séminifère de testicule de Bélier contient plusieurs générations de cellules germinales superposées : une ou deux couches de spermatogonies, de spermatocytes, de spermatides et parfois aussi une couche de spermatozoïdes. Cela provient de ce que « la néoformation de nouvelles lignées spermatiques, c'est-à-dire de l'ensemble des générations cellulaires depuis la spermatogonie-souche jusqu'au spermatozoïde, se poursuit sur toute la surface interne de la membrane du tube, sans attendre que les lignées précédentes aient achevé leur évolution et aient disparu sous forme de spermatozoïdes ». (REGAUD, 1901).

On constate en outre que le développement de n'importe quelle génération de cellules germinales est étroitement lié à celui des autres générations situées dans la même section orthogonale du tube. Il en résulte donc à l'intérieur des tubes séminifères une organisation en associations cellulaires constantes, qui se succèdent dans le temps, en un point donné du tube séminifère, selon un ordre parfaitement régulier, caractérisant ainsi un cycle de l'épithélium séminifère.

De plus, dès 1871, VON EBNER montre chez le Rat, que cette succession des associations cellulaires a lieu non seulement en un point donné du tube séminifère, mais aussi le long de celui-ci : en suivant le tube sur une longueur suffisante on retrouve la combinaison choisie à l'origine ; c'est *l'onde spermatogénétique*. Ainsi « l'onde est dans l'espace ce que le cycle est dans le temps » (REGAUD, 1901). En outre, REGAUD (1900) trouva que cette succession dans l'espace ne se fait pas selon une génératrice du tube mais « suivant une bande enroulée en hélice d'un bout à l'autre du tube séminifère ».

Cependant, plusieurs auteurs (CURTIS, 1918; CLELAND, 1951) ont à l'aide de reconstructions graphiques de tubes séminifères de Souris,

FIG. 1. — *Tube séminifère au stade 1.* Les spermatozoïdes ont été éliminés dans la lumière du tube séminifère. Les spermatides possèdent un noyau rond ($\times 230$).

FIG. 2. — *Tube séminifère au stade 2.* Les noyaux des spermatides s'allongent ($\times 230$).

FIG. 3 et 4. — Les noyaux ronds des spermatides (fig. 3) s'allongent et leur intensité de coloration augmente (fig. 4) ($\times 1150$).

FIG. 5. — *Tube séminifère au stade 3*. Les spermatozoa forment des faisceaux dont la pointe se dirige vers les noyaux de Sertoli ($\times 230$).

FIG. 6. — *Tube séminifère au stade 4 a*. Apparition des divisions méiotiques ($\times 230$).

FIG. 7. — *Tube séminifère au stade 4 b*. Les spermatocytes de 2^e ordre ont remplacé les vieux spermatocytes de 1^{er} ordre venant de se diviser ($\times 230$).

FIG. 8. — *Tube séminifère au stade 4 c*. Apparition des 2^e divisions de maturation ($\times 230$).

FIG. 9. — *Tube séminifère au stade 5*. Les nouvelles spermatides ont remplacé complètement les spermatocytes de 2^e ordre. Le noyau de ces jeunes spermatides présente un aspect réticulé ($\times 230$).

FIG. 10. — *Tube séminifère au stade 6*. La chromatine des noyaux des jeunes spermatides devient poussiéreuse cependant que les faisceaux des vieilles spermatides restent toujours en « copulation » avec les noyaux de Sertoli ($\times 230$).

FIG. 11. — *Détail d'un fragment de tube séminifère au stade 5* ($\times 1150$).

FIG. 12. — *Détail d'un fragment de tube séminifère au stade 6* faisant apparaître l'évolution de l'aspect des noyaux des jeunes spermatides réticulés au stade 5 (fig. 11) et poussiéreux au stade 6 ($\times 1150$).

FIG. 13. — *Tube séminifère au stade 7.* Les faisceaux des vieilles spermatides effectuent un mouvement centripète ($\times 230$).

FIG. 14. — *Tube séminifère au stade 8a.* Les faisceaux de vieilles spermatides ont atteint le bord de la lumière du tube séminifère ($\times 230$).

FIG. 15. — *Tube séminifère au stade 8b.* Les spermatozoïdes sont expulsés dans la lumière du tube séminifère ($\times 230$).

FIG. 16. — *Tube séminifère au stade 1.* Après l'expulsion des spermatozoïdes, l'épithélium séminifère est de nouveau au stade 1 ($\times 230$).

de Lapin, de Chien, de Cobaye, trouvé qu'il existe de nombreuses irrégularités dans la propagation de cette onde et que la découverte de VON EBNER n'est que partiellement valable, sur des segments autonomes de tubes séminifères. Ainsi, il semble bien que ce soit surtout *la succession dans le temps* qui confère un *caractère cyclique* à la spermatogenèse.

Mais une certaine confusion s'étant créée dans les termes nous pensons qu'il est utile de donner les définitions de ceux que nous utiliserons.

La *durée du cycle spermatogénétique* est l'intervalle de temps compris entre l'apparition de la spermatogonie-souche et l'élimination des spermatozoïdes issus de celle-ci. Elle représente la durée de formation de la lignée spermatogénétique.

Le *cycle de l'épithélium séminifère* est constitué par la série de changements se succédant dans une aire donnée de l'épithélium séminifère entre deux apparitions successives de la même association cellulaire (LEBLOND et CLERMONT, 1952 b).

B. — ÉTUDE DU CYCLE DE L'ÉPITHÉLIUM SÉMINIFÈRE

1^o Historique.

Les associations cellulaires identifiées à l'intérieur d'un cycle de l'épithélium séminifère servent à diviser ce cycle en phases ou stades permettant un découpage chronologique de celui-ci. Le nombre de stades identifiés par les différents auteurs est très variable, car ceux-ci n'ont pas tous utilisé les mêmes critères, ni choisi la même origine. Pour les uns, l'origine coïncide avec l'apparition d'une couche uniforme de spermatozoïdes, à l'intérieur de l'épithélium séminifère (BROWN, 1885 ; WALDEYER, 1906 ; MOREE, 1947) ; pour d'autres, le cycle commence aussitôt après la disparition des spermatozoïdes de l'épithélium séminifère (BENDA, 1887 ; REGAUD, 1901 ; CURTIS, 1918 ; ROOSEN-RUNGE et GIESEL, 1950) ; pour d'autres enfin, il commence au moment de la deuxième division de maturation des spermatocytes ou de l'apparition d'une nouvelle génération de spermatides (LENHOSSEK, 1898 ; VAN HOOFF, 1912 ; SCHOENFELD, 1901 ; CLERMONT, 1954).

Les critères utilisés pour établir une telle classification sont divers : multiplications goniales, évolution de l'élément chromatique des spermatocytes, spermiogenèse, présence ou absence de spermatozoïdes, groupement des cellules germinales entre elles et avec les noyaux de Sertoli. La plupart des auteurs utilisent d'ailleurs plusieurs critères pour décrire leurs stades. Seuls, LEBLOND et CLERMONT (1952 b) préconisent une classification basée sur un critère homogène : le développement de l'acrosome au cours de la spermiogenèse. Ceci leur permet de définir avec précision 14 stades dans le cycle de l'épithélium séminifère du Rat.

Nous avons cherché à établir un tableau de correspondance des classifications proposées par les différents auteurs qui ont étudié la spermatogenèse (tableau V).

Mais un tel travail comporte nécessairement des imprécisions, il est en effet difficile d'effectuer des comparaisons par suite de la diversité des critères et des espèces étudiées; nous nous sommes attachés à les réduire au minimum. MOREE (1947), puis LEBLOND et CLERMONT (1952 *b*) avaient déjà essayé d'établir une telle correspondance, mais dans les deux cas, les tableaux étaient incomplets et, de plus, dans celui de MOREE, il nous a semblé s'être glissées quelques erreurs.

TABLEAU V

Correspondance des stades du cycle de l'épithélium séminifère, décrits par divers auteurs

Année	Auteur	Stades								Total
		I	2	3	4	5	6	7	8	
1956.	ORTAVANT									8
1950.	ROOSEN-RUNGE et GIESEL	I	2	3	4	5	6	7	8	8
1918.	CURTIS	I	2	3	4	5	6	7	8	8
1900.	REGAUD	I	2	3-4	5-6	7	7-8	9-10	11-12	12
1887.	BENDA	I	II-III	III-IV	V	VI	VI	VI	VI	6
1947.	MOREE	3	4-5	5-6-7	8-9-10	11	12	12-1	1-2	12
1906.	WALDEYER	I	2	3-4	5	6	6	6	6-1	6
1888.	VON EBNER	4	5	6-7	8-9	10	10-11	12-1	2-3	12
1885.	BROWN	I	2	3-4-5	6	7	8-9	9	10-1	10
1945.	ROLSHOVEN	III	III	IV	IV	V	V	VI-I	1-11	6
1952 ^b	LEBLOND et CLERMONT	IX	X-XI	XII-XIII	XIV	I	II-III-IV-V	VI-VII	VII-VIII	14
1912.	VAN HOOFF	V	V	VI-VII-VIII-IX	X-XI-I	II	III	IV	IV	11
1902.	SCHOENFELD	2	2	3-4-5	6	(1)	(1)	I	I	6
1898.	LENHOSSEK	(3)	3	4	5	1	1	(1)	2	5
1953.	ESDANIAN	5	1	1	2-3	3	4	4	4-5	5

2° Définition des stades du cycle de l'épithélium séminifère chez le Bélier.

Pour notre travail sur le Bélier, nous avons choisi une classification identique à celles de CURTIS (1918) et de ROOSEN-RUNGE et GIESEL (1950). En effet, après de légères modifications, elle présente une précision suffisante (8 stades) et, surtout, chaque stade est très facile à déterminer, même avec un objectif à faible grossissement. Il est simplement nécessaire d'avoir recours à un objectif à immersion lorsque se présentent des spermatoïdes de transition entre les stades 5 et 6. Cette classification permet ainsi un travail très rapide. De plus, elle s'appuie sur les grands événements de la spermatogenèse.

Voici d'ailleurs comment sont définis les stades que nous avons utilisés :

Le stade 1 va du début de l'absence de spermatozoïdes attachés à

l'épithélium séminifère au début de l'élongation et de l'augmentation de colorabilité du noyau des spermatides. Ce stade est caractérisé par la présence des spermatides à noyaux ronds dans lesquels la chromatine ne se colore pas en une masse homogène (fig. 1 et 3).

Stade 2 : du début de l'élongation des noyaux et de l'augmentation de colorabilité de la chromatine des spermatides, jusqu'à la formation des faisceaux de ces spermatides (fig. 2 et 4).

Stade 3 : du début de la formation des faisceaux de spermatides jusqu'au commencement de la première division de maturation des spermatocytes (fig. 5).

Stade 4 : du début de la première division de maturation des spermatocytes jusqu'à la fin de la deuxième (fig. 6, 7, 8).

Le *stade 5* commence immédiatement après la fin de la deuxième division de maturation et finit au moment où la chromatine des noyaux des spermatides nouvellement formées devient poussièreuse (fig. 9).

Les noyaux des nouvelles spermatides présentent, à ce stade, des caryosomes (5 à 6) reliés par des filaments formant un réseau lâche (fig. 11).

Le *stade 6* va du début de la condensation en poussière de la chromatine des noyaux des nouvelles spermatides jusqu'au moment où plus *aucun* faisceau des spermatides de la génération précédente n'est en contact avec les noyaux de Sertoli (fig. 10 et 12).

Le *stade 7* : du début à la fin du mouvement des faisceaux de spermatozoïdes vers la lumière. Ce stade se termine quand tous les spermatozoïdes bordent la lumière de l'épithélium séminifère (fig. 13).

Stade 8 : de la fin du mouvement centripète des spermatozoïdes jusqu'au moment où aucun spermatozoïde n'est attaché à l'épithélium séminifère. C'est le stade de l'élimination des spermatozoïdes (fig. 14 et 15).

Les critères donnés par CURTIS (1918), ROOSEN-RUNGE et GIESEL (1950) pour différencier les stades 5, 6 et 7 (mouvement centrifuge, puis centripète, des faisceaux de spermatozoïdes) ont été remplacés par des critères plus précis portant sur les noyaux des spermatides nouvellement formées (apparence de la chromatine). Il est en effet très difficile de distinguer si les faisceaux de spermatozoïdes accomplissent un mouvement centrifuge ou un mouvement centripète.

3° Fréquence des stades de l'épithélium séminifère chez le Bélier.

Nous avons cherché à déterminer la fréquence de chacun des stades, donc leur durée relative chez divers Béliers au cours de la saison sexuelle. Dans ce but, nous avons classé dans tel ou tel stade les sections orthogonales des différents tubes séminifères rencontrés sur une coupe. Pour divers stades (en particulier les stades 2, 4 et 5), on rencontre parfois sur certaines sections transversales la juxtaposition des images de deux

stades différents. Ce phénomène est le résultat de la progression hélicoïdale de l'onde spermatogénétique d'après REGAUD (1900) ou de légères différences dans la durée du cycle spermatogénétique d'après CLELAND (1951). Nous avons classé de telles sections dans le stade couvrant la plus grande superficie du tube. Les fréquences ont été calculées sur environ 400 sections orthogonales de tubes séminifères pour chaque bélier ainsi que le montre le tableau VI.

TABLEAU VI

Fréquence des stades du cycle de l'épithélium séminifère chez des Béliers abattus à quelques heures d'intervalle (1 seul observateur).

Stades	Nombre de sections transversales					% de sections transversales					
	Bélier 13	Bélier 92	Bélier 95	Bélier 96	Bélier 101	Bélier 13	Bélier 92	Bélier 95	Bélier 96	Bélier 101	Moyenne
1	93	88	140	125	118	25,0	21,4	25,2	28,9	26,5	25,4 $\pm$ 1,2
2	33	26	34	25	26	8,8	6,3	6,2	5,8	5,8	6,6 $\pm$ 0,6
3	58	60	95	73	74	15,6	14,6	17,1	16,8	16,6	16,2 $\pm$ 0,5
4	30	35	43	37	37	8,1	8,5	7,8	8,5	8,3	8,2 $\pm$ 0,2
5	30	29	38	25	23	8,1	7,0	6,9	5,8	5,2	6,6 $\pm$ 0,5
6	52	84	91	64	79	14,0	20,3	16,4	14,8	17,8	16,7 $\pm$ 0,8
7	30	38	39	36	36	8,1	9,2	7,0	8,3	8,1	8,1 $\pm$ 0,4
8	46	52	74	48	52	12,3	12,6	13,4	11,1	11,7	12,2 $\pm$ 0,4
Total ...	372	412	554	433	445	100	100	100	100	100	100,0

On remarque que la fréquence, donc la durée des différents stades de la spermatogenèse, est remarquablement constante chez les différents Béliers abattus au même moment, les variations observées étant simplement d'ordre statistique. Cependant en abattant des animaux à différents moments du cycle diurne nous avons constaté quelques variations dans la fréquence des stades : il y avait en particulier une légère augmentation de la fréquence du stade 4 au cours de la nuit. Cependant les différences enregistrées sont assez faibles. La moyenne des fréquences de chacun des stades de l'épithélium séminifère effectuée sur 19 animaux est consignée dans le tableau VII. Les deux stades les plus longs sont les stades 1 et 3, le stade 5 étant le plus court.

On remarque, immédiatement, qu'une des principales différences réside dans la durée du stade 1 : chez le Rat, ce stade est très court puisqu'il représente moins de 4 p. 100 du cycle de l'épithélium séminifère, alors que, chez le Bélier, il occupe près du quart de ce cycle. Par contre les stades 6, 7 et 8 sont près de 2 fois plus longs chez le Rat que chez le Bélier, et des résultats préliminaires nous permettent de penser que le Taureau se comporte comme le Bélier. Or, ces stades sont définis par la migration des spermatozoïdes vers la lumière des tubes séminifères. Ceci indique que les relations entre le syncytium de Sertoli et les spermatides sont

beaucoup plus étroites chez le Rat que chez le Bélier. Cependant, il semble bien que chez le Rat, comme chez le Bélier, les variations

TABLEAU VII

Comparaison du cycle de l'épithélium séminifère chez le Bélier et le Rat.

Stades	Rat (d'après)		Bélier
	ROOSEN-RUNGE et GIESEL (1950)	LEBLOND et CLERMONT (1952) (Calculés)	ORTAVANT (1956)
1	3,7	2,50	21,7 $\pm$ 0,9
2	4,8	4,97	10,6 $\pm$ 0,8
3	14,5	17,39	18,4 $\pm$ 0,6
4	4,8	4,95	10,5 $\pm$ 0,5
5	9,4	12,12	4,2 $\pm$ 0,4
6	33,6	19,78	13,1 $\pm$ 0,8
7	11,6	20,10	10,8 $\pm$ 0,7
8	17,6	18,47	10,3 $\pm$ 0,6

observées d'un animal à l'autre dans la fréquence des différents stades soient faibles. Ceci prouve qu'au sein d'une même espèce, le cycle de l'épithélium séminifère se déroule avec une extrême rigidité.

C. — LE CYCLE SPERMATOGÉNÉTIQUE REPRÉSENTE-T-IL UNE CONSTANTE BIOLOGIQUE

Cette rigidité dans le déroulement du cycle de l'épithélium séminifère pose un problème biologique important.

CLELAND (1951), niant la constance de la durée du cycle spermatogénétique, prétend que la présence des différents stades le long d'un tube séminifère résulte de variations de la durée du cycle spermatogénétique aux différents points de ce tube : de faibles différences de durée du cycle spermatogénétique entre 2 zones voisines du tube séminifère, en se totalisant au cours des cycles successifs, peuvent créer une différence de phase entre les deux zones.

Il est cependant difficile d'admettre que la régularité des associations cellulaires rencontrées dans les tubes séminifères et la constance de chacun des stades chez différents Rats (LEBLOND et CLERMONT, 1952 b) et chez les différents Béliers que nous avons examinés puissent se réaliser s'il existait des durées variables du cycle spermatogénétique, c'est-à-dire si chaque processus simple de ce cycle n'avait pas une durée constante.

C'est pourquoi nous avons pensé que la durée du cycle spermatogénétique représente une constante biologique et qu'il est important de l'étudier. Nous chercherons d'abord à en définir les différents éléments, puis nous essaierons de démontrer la constance de sa durée.