

## ACTION DES RAYONS U.V. SUR L'ACIDE ADÉNOSINE-TRIPHOSPHORIQUE DES SPERMATOZOÏDES DE GRENOUILLE

par

D. KANAZIR\* ET M. ERRERA

*Laboratoire de Morphologie animale, Faculté des Sciences, Université libre de Bruxelles (Belgique)*

On sait que l'irradiation par les rayons U.V. fait perdre aux spermatozoïdes un certain nombre de leurs propriétés fondamentales: leur motilité est complètement inhibée et leur pouvoir fécondant est diminué d'autant; après la fécondation, la durée de la première segmentation est considérablement allongée chez l'oursin et le développement embryonnaire est retardé. Chez la grenouille, le noyau du gamète irradié devient, pour des doses relativement faibles, totalement inerte; il est rapidement éliminé et les embryons sont donc haploïdes (voir<sup>7</sup> pour les références à ces travaux). Il nous a donc paru intéressant de rechercher quelles pourraient être les perturbations biochimiques qui se trouvent à l'origine de ces diverses lésions. En ce qui concerne la motilité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, nous avons recherché si l'irradiation ne provoquerait pas une diminution de leurs réserves d'énergie: c'est pourquoi nous avons entrepris des dosages de l'adénosinetriphosphate (ATP) dans les spermatozoïdes normaux et irradiés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Préparation des spermatozoïdes*

Pour chaque expérience, les testicules d'une grenouille (*Rana fusca* ou *Rana esculenta*) sont broyés dans 10 ml d'eau de la ville ou de Ringer dilué (0.01 M) (BRIGGS<sup>4</sup>). La suspension est filtrée sur de la gaze; elle est ensuite centrifugée et remise en suspension dans une dizaine de ml de Ringer de manière à obtenir une suspension dont la densité optique est de 1.0, mesurée à 400 mμ sous une épaisseur de 10 mm. La centrifugation est, dans certains cas, répétée une deuxième fois. Des portions de 2 à 3 ml de la suspension de spermatozoïdes sont irradiées dans de petites boîtes de Pétri, l'épaisseur de la couche étant d'environ 3 mm. Pendant toute la durée de l'irradiation, un dispositif électromagnétique brasse énergiquement la suspension. Les témoins non irradiés sont agités, de la même manière, pendant une durée équivalente à celle de la plus longue irradiation. L'irradiation est effectuée (à + 4° C dans le cas des déterminations de l'ATP) à 14 cm d'une lampe à vapeur de mercure à basse pression (Mineralight), donnant au niveau de la préparation 7,500 ergs/mm<sup>2</sup>/min de lumière à 253.7 mμ principalement. Le calibrage de la lampe a été effectué à l'aide du photomètre U.V. de LATARJET<sup>12</sup>.

*Etude de l'ATP*

Nous avons utilisé, pour le dosage de l'ATP, la méthode de STREHLER<sup>13</sup> sous la forme où nous l'avons déjà employée<sup>9</sup>. Les spermatozoïdes des deux testicules d'une grenouille sont lavés et remis en suspension dans 13 ml de Ringer 0.01 M. Des portions de 3 ml sont irradiées, centrifugées et remises en suspension dans 280 μl d'un tampon contenant du PO<sub>4</sub>KH<sub>2</sub> et du K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> M/15 à pH 7.4. Ces suspensions sont portées à 100° pendant 10 min. 30 μl de ces suspensions chauffées sont ajoutés à 50 μl d'un extrait de 10 organes lumineux de *Photinus pyralis*\*\* dans 1 ml de tampon au phosphate, contenant 1 mg de MgSO<sub>4</sub>.

\* Institut des Sciences nucléaires "Boris Kidric", Belgrade.

\*\* Nous remercions vivement les Drs. STREHLER et McELROY de l'envoi de ce matériel.

L'émission de lumière est instantanément mesurée à l'aide d'une cellule photomultiplicatrice d'électrons. La quantité d'ATP peut être déduite d'une courbe d'étalonnage faite à l'aide de solutions de titre connu. Les résultats obtenus ont été corrigés pour les petites variations de concentrations des différentes portions étudiées, chacune des suspensions ayant été préalablement soumise à un examen néphélométrique.

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

## I. Teneur en adénosinetriphosphate des spermatozoïdes irradiés

Le Tableau I indique les variations de la teneur en ATP des suspensions de spermatozoïdes avant et au cours de l'irradiation. Nous avons ramené arbitrairement les chiffres à une valeur correspondant à la quantité totale d'ATP des deux testicules d'une grenouille. Remarquons que toute l'activité des spermatozoïdes, en présence de l'extrait de *Photinus pyralis*, ne dépend probablement pas uniquement de la présence d'ATP. En effet, nous avons étudié non pas un extrait des spermatozoïdes, mais la suspension totale: celle-ci s'est montrée beaucoup plus active que l'extrait. Il est donc vraisemblable qu'une partie assez considérable de la réserve d'énergie se trouve sous la forme de composés phosphorylés peu solubles ou fortement adsorbés par les structures cellulaires; STREHLER ET TOTTER<sup>15</sup> ont notamment montré que de l'acide ribonucléique pouvait exciter la luminescence du système que nous avons utilisé. Compte tenu de ces restrictions, nous pouvons affirmer qu'immédiatement après l'irradiation, la teneur en ATP des suspensions de spermatozoïdes diminue considérablement.

TABLEAU I

TENEUR EN ADÉNOSINE TRIPHOSPHATE DE SPERMATOZOÏDES DE GRENOUILLE,  
APRÈS IRRADIATION U.V.

Durée des irradiations (minutes)	<i>Rana fusca</i>						<i>Rana esculenta</i>					
	Exp. I			Exp. II			Exp. III			Exp. IV		
	ATP	% ATP restant	% mobilité	ATP	% ATP restant	% mobilité	ATP	% ATP restant	% mobilité	ATP	% ATP restant	% mobilité
0	2.8	—	—	3.01	—	—	6.2	—	—	4.3	—	—
2	—	—	—	3.5	115	—	—	—	—	2.8	66	60
5	—	—	—	3.1	100	—	3.5	56	—	1.4	32	1
15	1.02	36	10	0.65	21	—	0.8	13	—	0.4	9.5	—

ATP: la teneur en ATP, exprimée en %, est ramenée à la quantité totale d'ATP contenue dans les 2 testicules d'une grenouille.

% mobilité: % des spermatozoïdes encore mobiles à la fin de l'expérience.

On voit également que, jusqu'au moment où il ne reste plus que 50% de l'ATP initial, il existe un certain parallélisme entre la perte de l'ATP et celle de la motilité. Cette dernière a été mesurée simplement en observant sous le microscope quelques centaines de spermatozoïdes. Le comptage est facilité en réduisant, à l'aide d'un petit diaphragme, l'ouverture de l'oculaire. Dans le cas de *Rana fusca*, nous avons vérifié le pouvoir fécondant des spermatozoïdes: des irradiations de 5 à 10 minutes ne diminuent pas le nombre des embryons qui se développent; au delà de cette dose, donc au moment où la teneur en ATP diminue, le pourcentage des oeufs fécondés diminue. Mais une irradiation de 1 min suffit déjà à provoquer un ralentissement du développement embryonnaire dû à l'haploïdie; tous les embryons présentent de la microcéphalie et de l'hydropisie caracté-

téristiques du syndrome haploïde; l'examen cytologique confirme que cette faible dose d'U.V. suffit pour inactiver totalement la chromatine paternelle, qui est éliminée au cours des premières mitoses de segmentation (DALCQ ET SIMON<sup>5</sup>, BRACHET<sup>3</sup>).

## II. Libération d'un peptide au cours de l'irradiation

Si on examine au spectrophotomètre le liquide (Ringer ou eau de ville) qui a contenu les spermatozoïdes pendant l'irradiation, on constate que l'absorption entre 280 et 250 m $\mu$  est peu modifiée; tout au plus s'accroît-elle un peu pour les fortes irradiations. Au contraire, l'absorption est notablement accrue aux longueurs d'onde plus faibles (Tableau II). Il n'y a pas de maximum d'absorption correspondant aux acides nucléiques ou aux protéines, si ce n'est une ébauche d'"épaule". Si l'on additionne à cette solution 2 fois son volume d'acide trichloroacétique à 25% on observe une opalescence nette, que nous avons mesurée à 400 m $\mu$  (Tableau II). Ce léger précipité est sédimentable par centrifugation à 3,000 tours/minute et le culot obtenu est soluble dans l'éthanol. De plus, ce constituant est dialysable. Par hydrolyse il libère des acides aminés; on est donc justifié de supposer qu'il s'agit d'un peptide.

TABLEAU II  
PROPRIÉTÉS DU MILIEU DE DISPERSION DES SPERMATOZOÏDES (*R. fusca*)

Durée de l'irradiation (minutes)	Turbidité en présence d'acide trichloroacétique 25 % Extinction à 400 m $\mu$		Extinction à 220 m $\mu$	
	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II
0	0.135	0.120	0.680	0.486
15	0.207	0.214	0.835	0.731
30	0.250	0.388	1.03	0.925

Une analyse chromatographique préliminaire nous a permis d'identifier dans l'hydrolysât (HCl 6 N pendant 18 heures à 130°) les acides aspartique et glutamique, de l'ornithine, de l'alanine, de la glycine et de la valine. D'autre part, la présence de sérine, d'arginine, de lysine, de leucine et d'histidine nous paraît probable. Les solvants utilisés pour les chromatogrammes descendants à une dimension, étaient le propanol, eau, NH<sub>4</sub>OH (80/19/1 en volumes), le butanol normal, eau, acide acétique (100/50/15-20 en volumes) et le phénol saturé d'eau alcalinisé par l'ammoniaque. Notons enfin qu'un essai de précipitation du milieu de dispersion des spermatozoïdes n'a donné, chez *Rana esculenta*, aucune différence de précipitation par l'acide trichloroacétique entre les milieux témoins et les milieux irradiés: ce fait indique un comportement différent des espèces. Une différence de susceptibilité entre diverses espèces de grenouilles apparaît aussi, dans le cas des rayons X, lorsqu'on compare les travaux de DALCQ ET SIMON<sup>5</sup> à ceux de RUGH<sup>14</sup>. Les premiers auteurs ont trouvé que les spermatozoïdes de *Rana fusca* perdent leur pouvoir fécondant après une irradiation de 3,000 r alors que ceux de *Rana pipiens* sont beaucoup plus résistants.

## DISCUSSION

Nos résultats montrent que les réserves énergétiques d'une suspension de spermatozoïdes de grenouilles s'épuisent très rapidement à la suite d'une irradiation U.V.

En effet, les manipulations consécutives au traitement ne durent que quelques minutes (lavage sur la centrifugeuse). Des spermatozoïdes en mouvement consomment certainement des quantités considérables d'ATP et son épuisement rapide résulte très vraisemblablement d'un effet de l'irradiation sur sa synthèse. Il est peu probable que la perte d'ATP soit due à une diminution de la respiration: en effet, celle-ci, particulièrement dans le cas des substrats endogènes, est plutôt stimulée par l'U.V. chez les micro-organismes<sup>1,8,13</sup>. Par contre, la glycolyse anaérobie peut, dans une certaine mesure, être inhibée par l'U.V., chez la levure notamment<sup>2</sup>.

Rappelons que nous avons montré précédemment que chez les bactéries en croissance, seules les phosphorylations anaérobiques sont inhibées par l'U.V.<sup>9,10</sup>. Il serait toutefois intéressant de vérifier, dans le cas présent, l'activité glycolytique et respiratoire des spermatozoïdes immédiatement après leur irradiation: on pourrait ainsi préciser si les phosphorylations sont bloquées au niveau des mécanismes d'utilisation des substrats ou du transfert d'énergie. Le matériel que nous avons utilisé nous paraît très favorable à une telle étude.

D'un point de vue plus spécifiquement biologique, il semble exister un certain parallélisme entre la teneur en ATP, la motilité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

Ce résultat diffère quelque peu de ceux que KOZIN<sup>11</sup> a obtenus sur les spermatozoïdes de coqs, qui perdent plus rapidement leur pouvoir fécondant que leur motilité sous l'effet des rayons X. Il est donc possible qu'à côté de l'ATP, un facteur sensible au rayonnement ionisant soit également indispensable à la fertilité des spermatozoïdes.

En ce qui concerne la libération d'un peptide à la suite de l'irradiation des spermatozoïdes de *Rana fusca*, il ne s'agit là peut-être que d'un phénomène d'intérêt limité puisqu'il n'a pas été retrouvé dans le cas de *Rana esculenta*. On peut cependant, dans une certaine mesure, rapprocher ce résultat de ceux que nous avons obtenus sur de la nucléohistone purifiée<sup>6</sup>: l'irradiation U.V. de solutions concentrées de nucléohistone libère un constituant dialysable, fort semblable du point de vue spectrophotométrique au peptide libéré lors de l'irradiation des spermatozoïdes. Il serait intéressant de répéter les expériences présentes sur la nucléoprotéine purifiée. Remarquons enfin que les observations biologiques montrent que, pour des intensités d'irradiation nettement inférieures à celles utilisées pour la partie biochimique du présent travail, des lésions de la chromatine paternelle se manifestent déjà. Ceci n'a rien d'étonnant, car il est fréquent d'observer qu'un test biologique est de loin plus sensible que la plupart des tests physico-ou biochimiques; le cas des facteurs transformants est frappant à cet égard (ZAMENHOF<sup>17</sup>).

## RÉSUMÉ

L'irradiation de spermatozoïdes de grenouilles diminue très rapidement leur teneur en adénosine-triphosphate. Il semble exister un certain parallélisme entre cet effet, la perte de la motilité des spermatozoïdes et la perte de leur pouvoir fécondant. De plus nous avons montré que, chez *Rana fusca*, un petit peptide est libéré par l'effet de l'irradiation.

## SUMMARY

Irradiation of frog spermatozoa diminishes very rapidly their content of adenosine triphosphate. There appears to be a certain relationship between this effect, the motility of the spermatozoa and their fertilizing capacity. Furthermore, we have observed that, in the case of *Rana fusca*, a small amount of peptide is liberated when the spermatozoa are irradiated.

## ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Bestrahlung von Frosch-Spermatozoen wird ihr Adenosintriphosphatgehalt sehr schnell verringert. Es scheint eine gewisse Beziehung zwischen dieser Wirkung auf die Spermatozoen und dem Verlust ihrer Beweglichkeit und dem Verlust ihrer Befruchtungsfähigkeit zu bestehen. Ferner haben wir gezeigt, dass im Falle von *Rana Fusca* ein kleines Peptid freigesetzt wird, wenn die Spermatozoen bestrahlt werden.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. ADELSTEIN, F. B. HERSHEY, J. R. LOOFBOUROW ET I. W. SIZER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 40 (1952) 269.
- <sup>2</sup> J. G. ALDOUS ET D. K. R. STEWART, *Can. J. Med. Sci.*, 30 (1952) 561.
- <sup>3</sup> J. BRACHET, *Arch. Biol. (Liege)*, 65 (1954) 1.
- <sup>4</sup> R. BRIGGS, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1952) 761.
- <sup>5</sup> A. DALCQ ET S. SIMON, *Arch. Biol. (Liège)*, 42 (1931) 107.
- <sup>6</sup> M. ERRERA, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 115.
- <sup>7</sup> M. ERRERA, *Ann. roy. soc. sci. méd. et nat., Bruxelles*, 5 (1952) 65.
- <sup>8</sup> A. C. GIEZE ET W. H. SWANSSON, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 30 (1947) 283.
- <sup>9</sup> D. KANAZIR ET M. ERRERA, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 451.
- <sup>10</sup> D. KANAZIR ET M. ERRERA, *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- <sup>11</sup> I. KOZIN, *Physiol. Zool.*, 17 (1944) 289.
- <sup>12</sup> R. LATARJET, P. MORENNE ET R. BERGER, *Ann. inst. Pasteur*, 85 (1953) 174.
- <sup>13</sup> E. L. REDFORD ET J. MYERS, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 38 (1951) 217.
- <sup>14</sup> R. RUGH, *Proc. Amer. Phil. Soc.*, 81 (1939) 447.
- <sup>15</sup> B. L. STREHLER ET J. R. TOTTER, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 40 (1952) 28.
- <sup>16</sup> R. THOMAS, *Arch. intern. physiol.*, 61 (1953) 270.
- <sup>17</sup> S. ZAMENHOF, *Sympos. on Phosphorus Metabolism (Baltimore)*, 2 (1952) 301.

Reçu le 4 octobre 1954