

lemma³. Evidence presented here, obtained by the freeze-etching method of specimen preparation for transmission electron microscopy, clearly shows that the circular features represent nuclear pores.

Spermatozoa were obtained from the uteri of oestrous females after normal mating and immediately suspended in a cryoprotective mixture of 25% glycerol in 0.9% saline without prior chemical fixation. That the sperm were still motile was checked by observing a sample of the suspension with phase contrast optical microscopy. The suspension was then centrifuged at 1,000 *g* for 5 min, the sperm resuspended in fresh cryoprotectant and centrifuged again. After removal of the supernatant, aliquots of the paste-like sperm concentrate were transferred to small gold discs which were then plunged into liquid Freon 22. Replicas were prepared according to the procedure outlined by THOMPSON⁴ using a Balzers 360M freeze-etching plant, and were viewed in an AEI EM6B transmission electron microscope.

This technique revealed circular pores arranged in a regular hexagonal pattern (the usual consequence of the packing together of circles of equal size) in the envelope surrounding the condensed chromatin of the sperm nucleus (see Figure 1). The latter was easily recognised by its characteristic lamellar appearance, analogous to that seen in bull and rabbit spermatozoa⁵⁻⁷. Such nuclear pores were confined to that region of the nuclear envelope which directly underlies the basal surface. This is shown in Figure 3, which also shows clearly the so-called 'implantation fossa' or basal plate, this region of the nuclear envelope being devoid of such pores. Evidence that this is truly the basal surface and not a region of membranous scrolls is provided by Figure 2 which shows the fine patterning usually associated with the posterior ring of the spermatozoon in freeze-etch electronmicrographs^{5,7}.

Nuclear pores have been shown to be present in the region caudal to the posterior ring of spermatozoa of humans^{8,9}, rabbits⁶, rodents¹⁰⁻¹² and water buffalo⁷ - but situated in what is usually described as 'redundant nuclear envelope'. This term is generally taken to apply to those parts of the nuclear membrane in excess of that required to enclose the sperm nucleus in its condensed form (e.g. as in the membranous scrolls of the neck region of the spermatozoon). However, in rodent spermatozoa at

least, condensed chromatin is present within that part of the nucleus enclosed by the 'redundant nuclear envelope' (see Figure 3, also, for example, Figure 11 of STACKPOLE and DEVORKIN¹¹) and therefore the term 'redundant' would not seem applicable.

Therefore it seems that pores appear in the nuclear envelope of the rat spermatozoon in a non-redundant region caudal to the posterior ring. From freeze-etching studies it has become clear that it is the protrusion of intranuclear material through such pores which causes the characteristic topography of the basal surface in surface replicas of air-dried smears of spermatozoa. The great advantage of the freeze-etching method of replica preparation is that the process is a physical one, eliminating the danger of chemical fixation artifacts; although a number of other workers do actually fix their material (e.g. in glutaraldehyde) before freezing. Also, the procedure does not involve a 'drying-down' step, and so removes the possibility of any shrinkage of the chromatin, resulting from such a process, being the direct cause of the origin of the circular features (as has been suggested³).

The function of these nuclear pores in the basal region of the spermatozoon head is at present open to speculation, but it may well be the facilitation of the transport of informational and other molecules between the nucleoplasm and the cytoplasm of the sperm cell, not only during the various stages of spermiogenesis, but also in immature spermatozoa within the epididymis and also possibly in mature forms. It is of interest that the basal surface is the only part of the sperm head associated with the cytoplasmic droplet.

³ L. PIKÓ, in *Fertilization* (Eds. C. B. METZ and A. MONROY; Academic Press, New York 1969), vol. 2, chapt. 8, p. 325.

⁴ T. E. THOMPSON, *Veliger* 13, 367 (1971).

⁵ J. K. KOEHLER, *J. Ultrastruct. Res.* 16, 359 (1966).

⁶ J. K. KOEHLER, *J. Ultrastruct. Res.* 33, 598 (1970).

⁷ J. K. KOEHLER, *J. Ultrastruct. Res.* 44, 355 (1973).

⁸ J. K. KOEHLER, *J. Ultrastruct. Res.* 39, 520 (1972).

⁹ H. PEDERSEN, *J. Ultrastruct. Res.* 40, 366 (1972).

¹⁰ D. S. FRIEND and D. W. FAWCETT, *J. Cell Biol.* 63, 641 (1974).

¹¹ C. W. STACKPOLE and D. DEVORKIN, *J. Ultrastruct. Res.* 49, 167 (1974).

¹² D. M. PHILLIPS, *J. exp. Zool.* 191, 1 (1975).

Activité mitotique lors de la période prénéoplasique précédant la cancérisation du foie par la diethylnitrosamine

Study of the Mitotic Activity During the Preneoplastic Period in the Liver of Rats Treated by Diethylnitrosamine

H. BARBASON, A. FRIDMAN-MANDUZIO et E. H. BETZ

Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Université de Liège, 1, rue des Bonnes Villes, B-4000 Liège (Belgique), 25 juillet 1975.

Summary. The chronic administration of diethylnitrosamine in drinking water induces liver tumors in the rat. The preneoplastic period may be divided in two phases differing mainly in the loss of circadian control of mitotic activity in hepatocytes.

L'administration chronique de nitrosamines per os provoque chez le rat un nombre élevé de cancers hépatiques. L'apparition de tumeurs est précédée par une période prénéoplasique pendant laquelle l'homéostasie du tissu hépatique est probablement modifiée. Nous connaissons peu de choses sur la dynamique cellulaire du foie au cours de cette période. Le cancérigène produit des nécroses qui sont suivies d'une activité mitotique. D'autre

part, il apparaît dans le foie des cellules présentant des déficits enzymatiques en glucose-6-phosphatase et en adénosine triphosphatase^{1,2}. On ignore si ces cellules restent soumises aux mécanismes qui normalement contrôlent l'homéostasie du tissu.

De tels mécanismes peuvent être mis en évidence non seulement en étudiant la capacité du foie de répondre à une hépatectomie par une activité mitotique mais aussi

en vérifiant si cette activité présente des variations circadiennes. On sait en effet que tant chez le rat hépatectomisé que chez le rat en croissance, on peut démontrer l'existence de telles variations^{3,4}.

Le but du présent travail est de voir si les mitoses survenant dans le foie de rats traités par la diethylnitrosamine suivaient un rythme circadien. Lorsque cela a été possible, nous avons étudié séparément l'activité mitotique des cellules hépatiques normales et les cellules présentant une déficience enzymatique.

Tableau I. La densité numérique N_v (nombre d'amas de cellules PAS positives par cm^3 de foie)

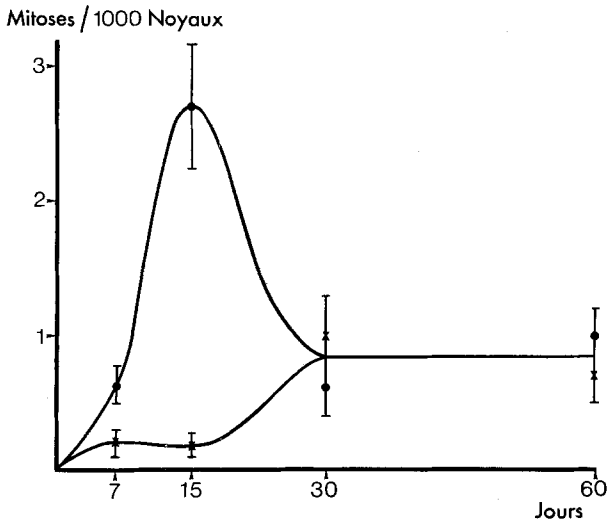
Modalité expérimentale	N_v (par cm^3)	D (μm)	V_v (%)
DENA 30 jours	2095 ± 1220	110 ± 21	0.17 ± 0.10
DENA 60 jours	1355 ± 530	177 ± 32	0.84 ± 0.58

Le diamètre moyen des amas D (exprimé en μm) et la densité de volume V_v (volume des amas par rapport à un volume unitaire de foie normal). La dispersion des mesures a été estimée par la moitié de la plus grande différence entre les valeurs expérimentales regroupées chez 4 rats examinés.

Tableau II. Index mitotique dans les amas de cellules PAS positives et dans les cellules normales

Modalité expérimentale	Mitoses/1000 noyaux	
	Parenchyme normal	Nodules
DENA 30 jours	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.3
DENA 60 jours	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.4

La signification des valeurs a été estimée en calculant l'erreur standard de la moyenne des mesures effectuées chez 5 animaux.



Index mitotique mesuré le matin à 10 h (●) et le soir à 22 h (×) en fonction de la durée du traitement chronique par le DENA. Les traits verticaux indiquent l'erreur standard de la moyenne des mesures effectuées sur 5 animaux.

Méthodes. Des rats Wistar, mâles, de 180 g, sont soumis à l'administration chronique de diethylnitrosamine (DENA) dissoute dans l'eau de boisson à la concentration de 80 mg/l. Dans nos conditions expérimentales, la dose ainsi absorbée est en moyenne de 1 mg/jour/100 g de poids. Une telle dose provoque des hépatomes multifocaux à partir du 3^e mois de traitement.

Au départ, les animaux sont partagés en 5 lots d'au moins 10 animaux chacun. Le premier ne subit aucun traitement et sert de témoin. Les animaux des autres lots reçoivent de la DENA et sont examinés aux 7^e, 15^e, 30^e et 60^e jours après le début du traitement. A chacune de ces étapes, un lot est partagé en deux, 5 animaux sont sacrifiés le matin à 10 h et les 5 autres le soir à 22 h. Tous les animaux sacrifiés sont à jeun depuis 18 h. Les foies sont prélevés en vue de déterminer l'index mitotique et de mesurer les amas de cellules capables de retenir le glycogène^{1,2}. Ces cellules sont mises en évidence par coloration à l'acide periodique Schiff (PAS) après une fixation par congélation-substitution. Ces plages conservent une grande quantité de glycogène malgré 18 h de jeûne³. Les coupes sont projetées sur un écran et leur surface ainsi que celle des plages PAS positives sont mesurées à l'aide d'un planimètre. En appliquant les formules stéréologiques classiques⁵ adaptées logiquement à notre matériel expérimental par FRIDMAN⁶, on calcule le nombre d'amas de cellules PAS positives par unité de volume de foie (N_v) et le volume relatif occupé par ces amas (V_v).

Résultats. Durant les 15 premiers jours de traitement, le foie contient des zones nécrotiques et est le siège de nombreuses mitoses. Ces divisions cellulaires ont un rythme circadien normal, les valeurs les plus élevées s'observant le matin (Figure). Entre le 30^e et le 60^e jour de traitement, l'index mitotique diminue et se stabilise à des valeurs plus basses. Durant cette dernière période, les plages de nécrose ont disparu et aucun rythme circadien ne peut plus être décelé. Il n'y a en effet pas de différence significative entre les index mitotiques mesurés le matin et le soir.

Au 30^e jour de traitement, les cellules capables de conserver le glycogène constituent des amas de plus de 5 cellules. Du 30^e au 60^e jour de traitement (Tableau I), le nombre de ces plages (N_v) ne montre pas de variation nette vu la grande dispersion des mesures alors que leur volume relatif (V_v) augmente de façon considérable.

D'un autre côté, les index mitotiques mesurés dans le parenchyme hépatique normal et dans les plages retenant le glycogène ne sont pas significativement différents (Tableau II). A ce moment, il n'y a plus de rythme circadien dans aucun de ces territoires.

Discussion. Nos résultats suggèrent que la période qui précède le développement des cancers du foie chez les animaux traités par le DENA se divise en deux phases distinctes. Pendant la première, le foie est le siège de nécroses et les cellules hépatiques régénèrent de façon sensiblement normale en restant soumises aux mécanismes d'homéostasie tissulaire. En témoigne la conservation du rythme circadien normalement observé dans le foie en régénération^{3,4}.

¹ H. FRIEDRICH-FRESKA, W. GÖSSNER et P. BÖRNER, Z. Krebsforsch. 72, 226 (1969).

² E. SCHERRER et H. HOFFMAN, Eur. J. Cancer 7, 369 (1971).

³ H. BARBASON, J. VAN CANTFORT et N. HOUBRECHTS, Cell Tissue Kinet. 7, 319 (1974).

⁴ J. VAN CANTFORT et H. BARBASON, Cell Tissue Kinet. 5, 325 (1972).

⁵ E. R. WEIBEL, *Morphometry of the Human Lung* (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1963).

⁶ M. FRIDMAN, *Revue sur les systèmes homogènes de particules sphériques dispersées*. Thèse annexe (Institut d'Astrophysique, Université de Liège 1974), communication n° 146.

Pendant la deuxième phase, l'activité mitotique, sans être aussi élevée que lors de la phase de régénération, est loin d'être négligeable. A ce moment pourtant, les cellules semblent échapper aux mécanismes de régulation normale car le rythme circadien est perdu. D'autres recherches que nous avons réalisées chez des animaux traités par le DENA et soumis à une hépatectomie partielle confirment ce fait (BARBASON et al., sous presse). Des observations allant dans le même sens ont été réalisées récemment par RABES et al.⁷.

Au cours de la deuxième phase de la période prénéoplastique se déroule un autre phénomène: l'augmentation des amas de cellules présentant des déficits enzymatiques et capables de retenir le glycogène. Du 30^e au 60^e jour de traitement, le volume relatif de ces amas est quintu-

plé. Le mécanisme exact de cet accroissement est peu connu. L'index mitotique n'est pas différent dans le parenchyme normal et dans les amas de cellules PAS positives après le jeûne. Il est difficile de tirer une conclusion sans une meilleure connaissance du cycle cellulaire dans ces deux localisations. Des recherches sont poursuivies dans ce sens.

Il n'est pas exclu pourtant que l'augmentation de volume des amas PAS positifs soit simplement due à l'apparition d'amas cellulaires nouveaux qui finissent par confluer.

⁷ H. RABES, R. HARTENSTEIN et P. SCHOLZE, *Experientia* 26, 1356 (1970).

Mitotic Activity of Adrenal Medullary Cells in the Mouse at Different Ages and Following Unilateral Adrenalectomy

A. BENEDETTI

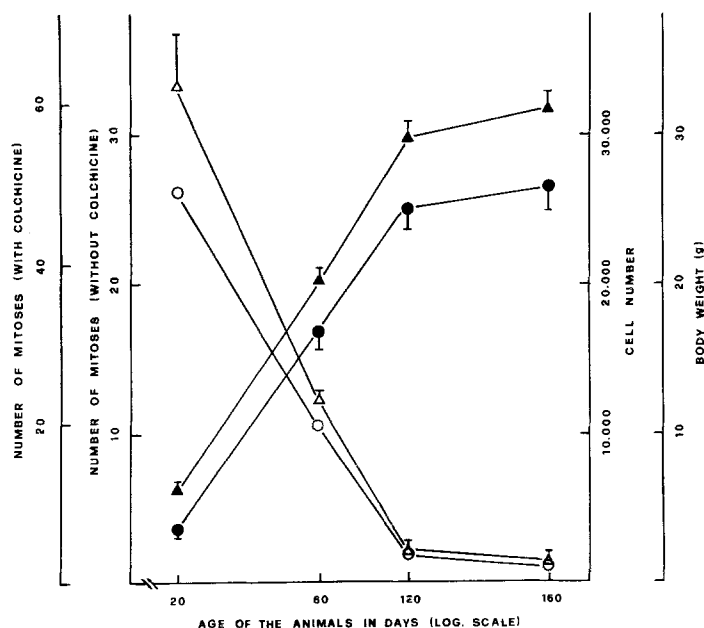
Istituto di Patologia Generale dell'Università di Siena, Via Laterino 8, I-53100 Siena (Italy), 6 January 1975.

Summary. The number of mitoses as well as the number of the cells of the adrenal medulla was determined in the mouse at various ages and after unilateral adrenalectomy. It was found that a decrease in the mitoses and an increase in the cell number occurs up to 4 months. In 12-month-old rats, mitoses, although rare, are still present. No changes in the mitosis and cell number was observed after unilateral adrenalectomy.

Previous studies showed that chromaffin cells of the adrenal medulla of adult rat are able to undergo mitosis^{1,2}. The aim of the present research was to determine the number of mitoses in the adrenal medullary cells of the mouse at various ages and following unilateral adrenalectomy, a condition of possible stimulation to proliferation. The number of mitoses was related to the number of the cells of the whole adrenal medulla to investigate whether the mitotic activity could be ascribed to the growth of the organ or to renewal processes of the chromaffin cells.

Gray mice of 'Snell' strain maintained on a complete semisynthetic diet (Zoofarm, Padua, Italy) were used. Unilateral adrenalectomy was performed through a dorsal inci-

sion in 4-month-old mice. The animals were allowed to drink 1% NaCl and were sacrificed 5, 10 or 15 days after the surgical operation. All the animals were killed at noon³. Some mice were injected i.p. with colchicine (in 8% ethanol solution) at the dose of 0.1 mg/100 g body wt., 3 h before sacrifice. Adrenal glands were fixed either in ethanol-chloroform-acetic acid mixture (6:3:1 v:v) for 3 h or in acetate buffer pH. 5.8 containing formol 10% and potassium bichromate 5% for 12 h. The latter procedure is commonly used for the chromaffin reaction. The whole gland was cut into serial sections (6 µm thick). The sections were stained with ematoxilin and eosin. Each section was examined under the microscope using a



Number of mitoses (with or without colchicine) and of cells per whole adrenal medulla and body weight of mice at various ages. ○—○, number of mitoses (with colchicine); △—△, number of mitoses (without colchicine); ●—●, cell number; ▲—▲, body weight. Vertical bars represents SEM.