

209

00
21

ARTICLE PRINCIPAL
recouvrant en partie
la THESE présentée
en vue de l'obtention

du grade de DOCTEUR ès SCIENCES
à l'Université Pierre et Marie Curie
- Paris 6 -

par Marc GOUBERN

Sujet de la thèse :

Recherches des causes de la dégénérescence testiculaire
du rat en avitaminose A .

soutenu le 26 octobre 1976

devant le jury composé de :

M	M. Pascaud	Président
M	J. Blaizot	Rapporteurs
M	J. Picart	
M	Y. Raoul	
	Melle T. Terroine	Examineurs
M	F. Chapeville	
M	M. Courot	

ARTICLE PRINCIPAL
recouvrant en partie
la THESE présentée
en vue de l'obtention
du grade de DOCTEUR ès SCIENCES
à l'Université Pierre et Marie Curie
- Paris 6 -

par Marc GOUBERN

Sujet de la thèse :

Recherches des causes de la dégénérescence testiculaire
du rat en avitaminose A .

soutenue le

51414047

devant le jury composé de :

M	M. Pascaud	Président
M	J. Blaizot	
M	J. Picart	Rapporteurs
M	Y. Raoul	
Melle T. Terroine		
M	F. Chapeville	Examineurs
M	M. Courot	

DÉSÉQUILIBRE EN VITAMINE A ET ACTIVITÉ D'ENZYMES LYSOSOMALES DANS LE TESTICULE DE RAT

par

Marc GOUBERN, Françoise N'DIAYE-BUISSON, Raymond FERRANDO
et Thérèse TERROINE

Centre de Recherches sur la Nutrition du C.N.R.S., 92-Bellevue
Laboratoire de Nutrition et d'Alimentation, École Vétérinaire, 94-Alfort

(Reçu le 5 mai 1971)

I. INTRODUCTION

Les remarquables travaux de l'École de MELLANBY, FELL, DINGLE, LUCY [cf. DINGLE et FELL (12)] ont mis en évidence l'importance de la vitamine A dans le contrôle de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des lysosomes. En effet, ces études montrent que tout déséquilibre par défaut ou par excès de vitamine A, provoque la labilisation des lysosomes avec, comme conséquence, la libération hors de ces organites des hydrolases qui y sont normalement détenues à l'état latent. Étant donné l'implication fondamentale des lysosomes dans toute structure tissulaire, on comprend donc que la vitamine A, par cette action, contrôle l'intégrité structurelle et fonctionnelle de nombreux

organes. Parmi ceux sensibles à un déséquilibre en vitamine A de la ration, figure le testicule. En ce qui concerne les effets de la carence en vitamine A, les travaux de MASON (26) montrent que celle-ci lèse profondément le testicule en inhibant fortement son développement pondéral et en provoquant une altération caractéristique et réversible de la lignée germinale avec atrophie des tubes séminifères, réduction et même arrêt de la spermatogénèse. Ces effets nocifs de la carence en vitamine A sont d'autant plus importants qu'ils s'observent dans de nombreuses espèces animales [PALLUDAN (27)]. D'autre part, les travaux de MADDOCK, COHEN, WOLBACH (23) montrent qu'une surcharge prolongée en vitamine A entraîne également des lésions dégénératives des tubes séminifères chez le rat ainsi que chez le chien.

D'après ce qui précède, il nous a paru intéressant de rechercher si l'on peut établir un lien entre l'hypofonctionnement du testicule et des modification d'activité d'enzymes lysosomales, lors de déséquilibres en vitamine A, par défaut ou par excès. Notre choix s'est tout naturellement fixé sur la DNase et la RNase acides, étant donné l'importance du DNA et du RNA dans le développement des constituants de la lignée germinale. Par ailleurs, nous avons mesuré l'activité de la hyaluronidase, enzyme localisée spécifiquement dans l'acrosome du spermatozoïde [MALES, TURKINGTON (24)] et dont l'activité nous donne un test biochimique du taux de la spermatogénèse.

D'une façon générale, les études portant sur les avitaminoses présentent la difficulté de discriminer entre les effets propres d'une carence et ceux dus à la sous-alimentation qu'elle induit. On pallie cet inconvénient par l'utilisation d'un lot témoin restreint, comparativement aux lots carencé et témoin *ad libitum*. Dans le cas précis de la carence en vitamine A, l'emploi de l'acide rétinolique permet de tourner cette difficulté. En effet, l'acide rétinolique peut remplacer la vitamine A pour assurer une croissance corporelle optimale [ARENS et VAN DORP (5)] et un état corporel satisfaisant, mais il ne permet pas le maintien des pigments visuels [DOWLING et WALD (14)], ni surtout, dans le cas qui nous occupe, celui de la spermatogénèse. A cet égard HOWELL, THOMPSON et PITT (20) montrent que les changements histologiques du testicule sont identiques chez les rats carencés en vitamine A, qu'ils reçoivent ou non de l'acide rétinolique. Il y a disparition progressive de l'épithélium germinatif, suivie de l'obturation de la lumière des tubes séminifères par les cellules de Sertoli. Ainsi donc, l'emploi de l'acide rétinolique a le gros avantage de permettre d'étudier la dégénérescence du testicule en carence de vitamine A sur un animal par ailleurs normal.

En bref, l'objet de cette étude est de rechercher, au niveau du testicule, l'activité des RNase et/ou DNase lysosomales et de la hyaluronidase, d'une part chez les rats carencés en vitamine A recevant ou non de l'acide rétinolique, d'autre part en hypervitaminose A étudiée chez le rat *in vivo* et *in vitro*. A titre de comparaison, dans les études de surcharges, on envisage non seulement la réponse du testicule qui n'a jamais été étudiée mais également celle du foie, connue pour d'autres enzymes par les travaux de DINGLE, SHARMAN et MOORE (13).

II. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET TECHNIQUES

A. Animaux et régimes expérimentaux, lots et durée d'expérience

1. ANIMAUX.

Nous avons utilisé des rats mâles albinos au sevrage, de souche Wistar CF, pesant approximativement 40 g au départ. Ces animaux sont maintenus à 23 °C durant toute la durée de l'expérience. Ils sont pesés régulièrement.

2. RÉGIMES EXPÉRIMENTAUX.

Le tableau n° I indique la composition du régime de base utilisé.

TABLEAU I

Composition des différents régimes expérimentaux

Constituants pour 1 kg de régime			
Caséine (1).....g	175	Vitamines :	
Cystine.....g	1	Thiamine.....mg	6
Saccharose.....g	720	Riboflavine.....mg	6
Huile d'arachide (2).....g	40	Pyridoxine.....mg	6
Cellulose.....g	20	Niacine.....mg	30
Mélange Salin (3).....g	40	Acide pantothénique.....mg	30
Choline.....g	1	Inositol.....mg	100
Vitamines*.....g	0,7	Ac. p. aminobenzoïque...mg	500
		Acide folique.....mg	1
		Vitamine B ₁₂mg	0,03
		Vitamine E.....mg	30
		Vitamine D ₃U.I.	1 000
		Vitamine K ₁mg	5
		Biotine.....mg	0,2

(1) Caséine dévitaminée N.B.C.
 (2) Huile d'arachide autoclavée 20 mn à 120° C pour les études de carence ; huile d'arachide ordinaire pour les études de surcharge.
 (3) Selon la formule de WESSON (41) fourni par la N.B.C. « Salt mixture W ».

Les animaux témoins reçoivent en plus de la vitamine A sous forme de palmitate incorporé au régime à raison de 8 000 UI/kg. L'acide rétinolique est fourni aux lots

correspondants sous forme de poudre mêlée au régime à raison de 10 mg/kg d'aliment.

Dans les expériences de surcharge en vitamine A, celle-ci est administrée chaque jour, par voie buccale, sous forme de palmitate en solution dans l'huile d'arachide et à la dose de 20 000 UI/100 g de poids corporel.

3. LOTS ET DURÉE D'EXPÉRIENCE.

a. *Expérience de carence en vitamine A.*

Après une période d'accoutumance d'une dizaine de jours au régime carencé, les animaux sont divisés en quatre lots :

- 1° Lot témoin nourri *ad libitum* (lot T);
- 2° Lot témoin nourri *ad libitum* recevant en plus de l'acide rétinoïque (lot TAR);
- 3° Lot carencé en vitamine A (lot C);
- 4° Lot carencé en vitamine A mais recevant de l'acide rétinoïque (lot CAR).

La période d'avitaminose aiguë se situe en moyenne à la sixième semaine pour le lot totalement carencé en vitamine A, date à partir de laquelle tous les animaux sont sacrifiés.

b. *Expérience de surcharge en vitamine A.*

Après quelques jours les animaux sont divisés en trois lots :

- 1° Lot témoin nourri *ad libitum* (lot T);
- 2° Lot *témoin restreint* (lot TR);
- 3° Lot surchargé en vitamine A (lot SA).

Les animaux sont sacrifiés à partir de la huitième semaine, stade correspondant à un état de surcharge assez aigu pour le lot SA.

B. Méthodes de dosage

1. MÉTHODES DE DOSAGE DES DNASE ET RNASE ACIDES.

Les DNase et RNase acides que nous mesurons sont, comme toutes les enzymes lysosomales, définies par trois formes d'activité selon WATTIAUX et DE DUVE (40):

- 1° Une activité *libre*, indice de la fragilité des lysosomes, mesurée ici sur la fraction soluble de l'homogénat;
- 2° Une activité *latente ou potentielle* sans contact avec le substrat; celle-ci n'est mise en évidence qu'après rupture de la membrane lysosomale;
- 3° La somme des mesures de l'activité libre et de l'activité latente constitue l'activité *totale*.

a. *Préparation de l'homogénat.*

Les animaux sont tués par décapitation et soigneusement saignés. Les organes sont immédiatement prélevés, pesés puis dilués au 1/10 dans du saccharose 0,25 M

glacé. L'homogénéisation des tissus est effectuée dans un broyeur verre-teflon de Thomas. La vitesse du piston est de 500 tr/mn avec 5 aller et retour pour le testicule et 7 pour le foie.

L'homogénat est ensuite centrifugé 20 minutes à 20 000 g. L'activité soluble est mesurée sur le surnageant, en milieu isotonique, et l'activité latente sur le culot remis en suspension et traité au triton X-100 pour labiliser les lysosomes.

b. *Dosage de la désoxyribonucléase acide* (E. C. 1965, 3.1.46).

La technique est celle de KOWLESSAR, ALTMAN et HEMPELMANN (21) basée sur l'insolubilité du DNA macromoléculaire dans l' HClO_4 à 10 p. 100. Le désoxyribose libéré est dosé à l'aide du réactif de BURTON (7). Cette méthode a été longuement décrite dans un mémoire de HITIER (19) auquel on voudra bien se rapporter.

L'activité enzymatique est exprimée en μg de phosphore libéré en 30 minutes.

c. *Dosage de la ribonucléase acide* (E.C., 1965, 2.7.7.17).

La digestion du RNA par la ribonucléase acide s'accompagne d'une libération de polynucléotides de faible poids moléculaire. La méthode de dosage utilisée ici emploie la précipitation par une solution d'acétate d'uranyle dans l'acide perchlorique [ANFINSEN (4)] du RNA non hydrolysé et des polynucléotides de fort poids moléculaire. Le substrat employé est du RNA de levure préparé selon ALLEN, CRESTFIELD et SMITH (3). Le milieu d'incubation à pH 5,0 comprend 1 ml de tampon acétate de Na 0,1 M, 1 ml de RNA à 0,1 ou 0,3 p. 100 selon que l'on mesure l'activité libre ou l'activité latente, 1 ml de saccharose 0,75 M ou 1 ml de triton 0,75 p. 100 selon que l'on s'intéresse à la forme libre ou à la forme latente de l'enzyme; 1 ml d'homogénat est ajouté au milieu et l'incubation dure 30 minutes à 37 °C. Des tubes témoins permettent de définir un temps zéro. La réaction est arrêtée par adjonction de 3 ml d'une solution d'acétate d'uranyle 0,25 p. 100 dans HClO_4 10 p. 100. Les tubes sont refroidis 20 minutes au bain glacé puis centrifugés 30 minutes à 8 000 tr/mn. L'absorption d'une fraction aliquote du surnageant est mesurée en UV à 260 $\text{m}\mu$.

L'activité est exprimée par l'augmentation de l'absorption à 260 $\text{m}\mu$ en 30 minutes due à l'acido soluble des produits de dégradation du RNA dans les conditions de l'expérience.

2. DOSAGE DE LA HYALURONIDASE TESTICULAIRE.

La hyaluronidase testiculaire est localisée exclusivement dans l'acrosome des spermatides en développement et dans les spermatozoïdes à maturité [MANCINI, ALONSO, BARQUET, ALVAREZ et NEMIROUSKY (25); STANBAUGH et BUCKLEY (34); SRIVASTAVA, ADAMS et HARTREE (33)].

Le dosage utilise la technique décrite par MALES et TURKINGTON (24) employant un sel de sodium de l'acide hyaluronique de cordon ombilical humain comme substrat. L'activité de l'enzyme est mesurée sur le surnageant obtenu par centrifugation 20 minutes à 20 000 g de l'homogénat traité au triton X 100. L'incubation dure 40 minutes à 37 °C dans un milieu à pH 4,5. Les fragments N-acétylglucosamine terminaux libérés sont caractérisés par le réactif au p-diméthyl-amino benzaldéhyde [REISSIG, STROMINGER et LELOIR (31)]. Les activités sont exprimées en μM de N-acétyl-glucosamine libérées en 10 minutes.

3. DOSAGE DE LA VITAMINE A HÉPATIQUE.

Nous employons la méthode A.E.C. utilisant l'extraction de la vitamine A par l'éther de pétrole sur colonne d'alumine et la lecture directe de l'absorption de la vitamine A et de ses esters en UV à 328 m μ , une gamme étalon étant utilisée.

Les valeurs trouvées sont exprimées en UI de vitamine A.

4. ÉTUDE DE L'ACTION DE SURCHARGES EN RÉTINOL *in vitro*.

Nous avons utilisé le protocole décrit par DINGLE (10). A 2 ml d'homogénat au 1/10 dans du saccharose 0,25 M on ajoute des concentrations variées de rétinol dissous dans 0,1 ml d'alcool absolu. Après une période préliminaire de 40 minutes à 37 °C, l'homogénat est centrifugé 20 minutes à 20 000 g. L'activité de la DNase acide est mesurée sur le surnageant et elle est exprimée en pourcentage de l'activité totale libérée par le traitement.

C. Présentation des résultats

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes accompagnées de l'erreur type de la moyenne.

Les tests statistiques sont effectués par la méthode de comparaison de la moyenne.

III. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Une constatation se dégage clairement de l'ensemble de nos résultats expérimentaux (Tableaux II à VII et figures 2 à 7). D'une façon générale, tout déséquilibre en vitamine A, par excès ou par défaut, provoque au niveau du testicule des animaux un accroissement de l'activité libre des DNase et RNase acides et une augmentation du pourcentage de ces activités par rapport à l'activité totale, ce dernier fait étant un indice biochimique sûr de la fragilité de la membrane lysosomale. Ainsi donc, on retrouve au niveau des testicules cette sensibilité des lysosomes à tout déséquilibre en vitamine A, observée par DINGLE, SHARMAN et MOORE (13), PERUMAL, LAKSHMANAN et CAMA (28), GUHA et ROELS (18) sur des tissus très différents. Ayant dégagé dans leurs grandes lignes nos résultats, nous allons maintenant les examiner plus en détail.

A. Conséquences de la carence en vitamine A sur l'activité des RNase et DNase acides testiculaires

1. POIDS CORPOREL, TESTICULAIRE, ÉTAT GÉNÉRAL ET APPÉTIT DES ANIMAUX.

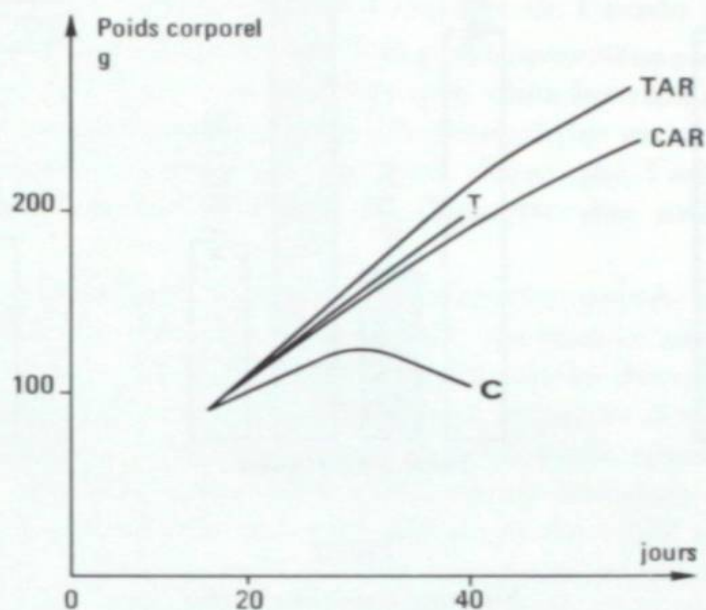


FIG. 1

Évolution pondérale comparée de rats témoins et carencés recevant ou non de l'acide rétinolique

Nombre d'animaux par lots : 5 témoins (T), 10 témoins recevant de l'acide rétinolique (TAR) 9 carencés (C), 14 carencés recevant de l'acide rétinolique (CAR)

Le poids corporel final des animaux carencés en vitamine A et ne recevant pas d'acide rétinolique est réduit de 50 p. 100, comme le montre la figure 2. D'autre part, en accord avec ARENS et VAN DORP (5), THOMPSON, HOWELL et PITT (38), il apparaît bien que l'administration d'acide rétinolique aux rats privés de vitamine A assure une croissance pondérale normale si on la compare, comme le fait l'ensemble des auteurs, au lot témoin mais légèrement subnormale si on la compare au lot témoin recevant en plus de l'acide rétinolique. Cette stimulation très légère de la croissance des rats témoins par l'acide rétinolique, de l'ordre de 8 p. 100, trouve peut-être une explication dans les résultats obtenus par WOJCIK (43) dans des conditions expérimentales toutefois différentes des nôtres. Travaillant sur des rattes recevant comme dans nos expériences 18 p. 100 de caséine, cet auteur constate que le gain de poids de ses animaux est d'autant plus élevé que le régime renferme des quantités croissantes de vitamine A, allant de 9 U.I. à 1350 U.I. par jour. Or, l'acide rétinolique ayant le même effet que la vitamine A sur la croissance, on com-

Bases de référence pour exprimer les activités des DNase et RNase acides chez les rats témoins et carencés en vitamine A

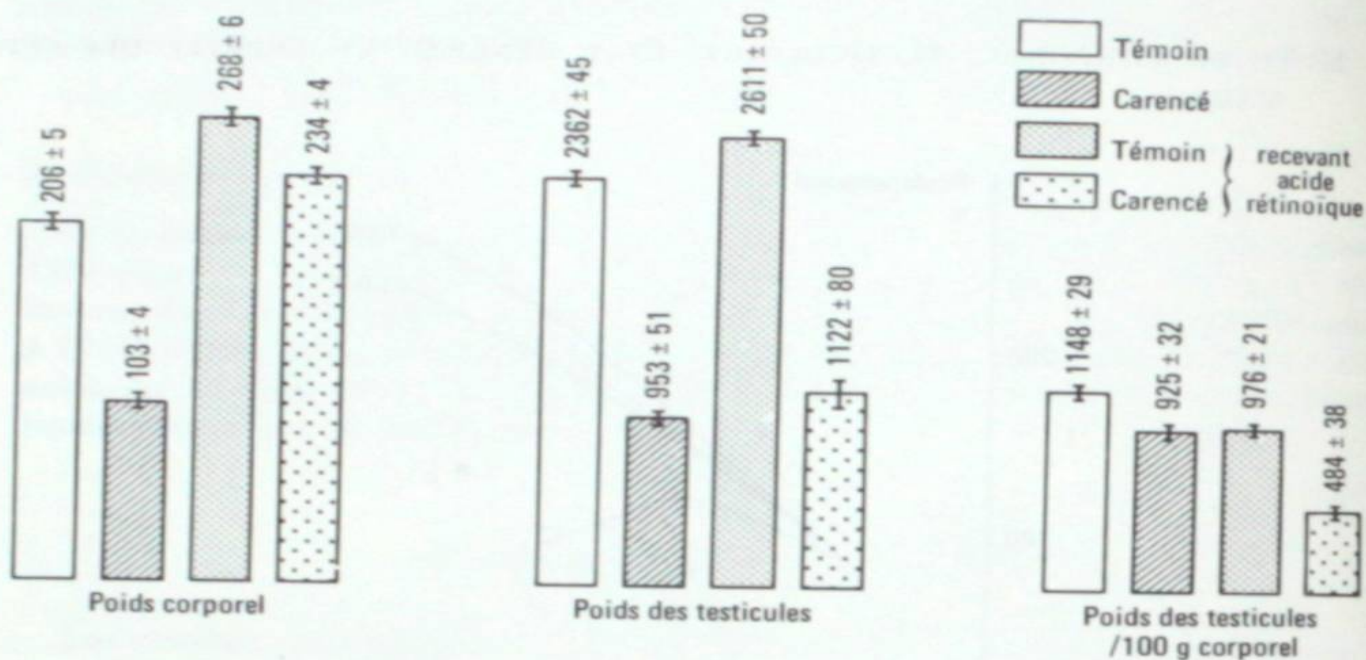


FIG 2

Valeurs expérimentales

Nombre d'animaux par lot :

5 témoins (T), 10 témoins recevant de l'acide rétinolique (TAR), 9 carencés (C), 14 carencés recevant de l'acide rétinolique (CAR)

TABLEAU II

Pourcentage d'écart entre les différents lots

Lots	Poies corporel	Poids des testicules	
		Absolu	Relatif
C comparé à T	— 50 ***	— 60 ***	— 19 ***
CAR comparé à TAR	— 13 ***	— 57 ***	— 50 ***
C comparé à TAR	— 56 ***	— 64 ***	— 5 (+)
CAR comparé à T	+ 14 **	— 52 ***	— 58 ***
TAR comparé à T	+ 30 ***	+ 11 **	— 15 ***
CAR comparé à C	+ 127 ***	+ 18 (+)	— 48 ***

(+) Statistiquement non significatif
 ** Significativement différent à 1 p. 100.
 *** Significativement différent à 1 p. 1 000.

prend qu'une supplémentation en celui-ci à des rats témoins puisse, comme nous le constatons, favoriser leur évolution pondérale.

Tandis qu'au moment du sacrifice, les rats carencés en vitamine A ne recevant pas d'acide rétinoïque présentent quelques cas de xérophtalmie et des lésions sur le dos, ceux carencés en vitamine A mais supplémentés en acide rétinoïque ont un aspect parfaitement sain et un comportement normal. Il est à remarquer que nous n'avons pas fait l'étude de la cécité nocturne chez ces animaux carencés en vitamine A et recevant de l'acide rétinoïque.

Le niveau moyen d'ingestion est de 7,0 g de nourriture sèche par jour chez les animaux carencés en vitamine A, alors que chez les rats également carencés en vitamine A mais supplémentés en acide rétinoïque et chez les lots témoins, il s'élève à 14 g d'aliment par jour. On voit donc que l'acide rétinoïque permet un rétablissement à la normale de l'appétit des animaux carencés en vitamine A.

Bien que l'acide rétinoïque assure aux animaux privés de vitamine A une croissance, un appétit et un aspect général normaux, nous constatons à la suite de HOWELL et COLL. (20) qu'il ne permet pas le développement du testicule (Figure 2 et tableau II). De fait, tandis que le poids des deux testicules des sujets témoins, recevant ou non un supplément d'acide rétinoïque, est respectivement de 2362 et de 2611 mg, celui des sujets carencés en vitamine A est de 953 mg sans supplément d'acide rétinoïque et de 1122 mg avec adjonction de ce dernier facteur. Compte-tenu du fait que tous les animaux n'ont pas pu être sacrifiés en même temps, ce qui amène forcément certaines différences pondérales dans les lots, il n'en demeure pas moins que le poids des testicules des sujets carencés, recevant ou non de l'acide rétinoïque, est diminué de plus de 60 p. 100 par rapport à la moyenne des témoins.

2. ACTIVITÉS DE LA DNASE ET DE LA RNASE ACIDES TESTICULAIRES.

Rapportées au gramme frais de testicule, les activités libre et totale des DNase et RNase acides sont toujours fortement stimulées en carence de vitamine A, avec ou sans acide rétinoïque. Mais il n'y a pas de commune mesure entre l'accroissement spectaculaire de la forme libre qui est respectivement de 700 et 500 p. 100 pour la DNase et la RNase acides et celui de la forme totale qui n'est que de 70 et 100 p. 100 pour chacune des deux enzymes (tableaux III et IV et figures 3 et 4).

Envisageons maintenant les conséquences de l'avitaminose A sur l'activité des deux enzymes au niveau des testicules entiers, c'est-à-dire leur activité absolue. Ici un nouveau facteur entre en jeu, à savoir l'influence dépressive de l'avitaminose A sur le poids du testicule. L'activité absolue est, en effet, la résultante des modifications induites par la carence en vitamine A sur l'activité spécifique des enzymes (stimulation) d'une part et sur le poids des testicules qui les renferment de l'autre (diminution). C'est ce qui permet de comprendre que les variations d'activité absolue enregistrées ne sont pas automatiquement superposables aux variations d'activité spécifique.

Activités de la DNase acide du testicule de rats témoins et carencés en vitamine A

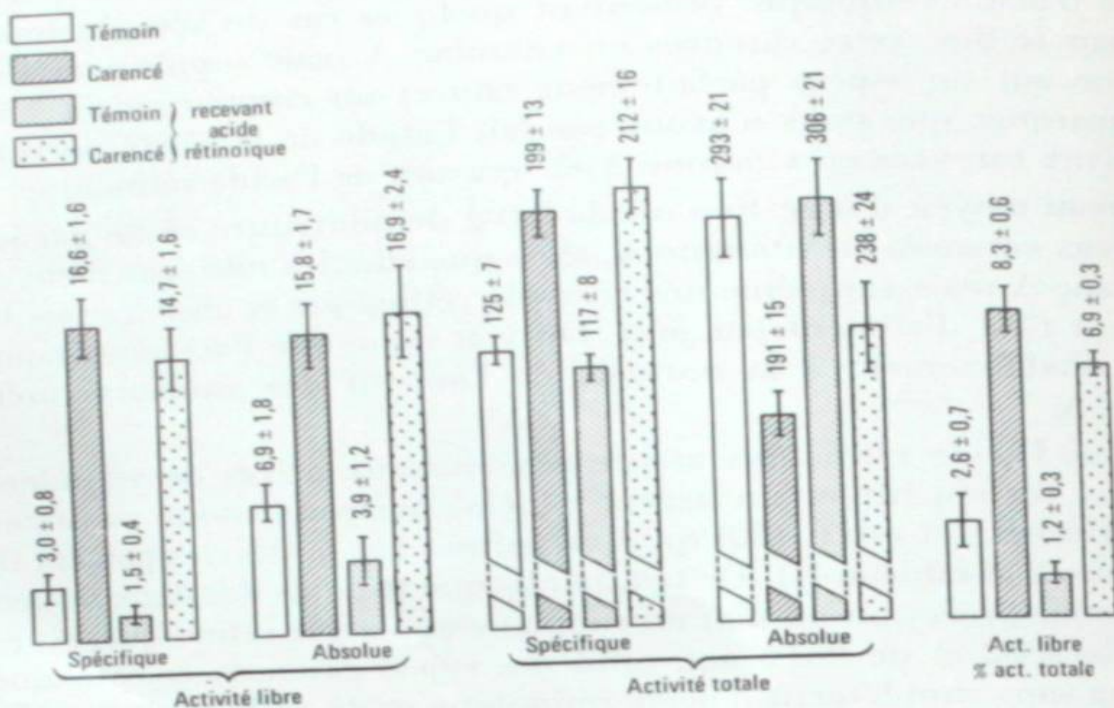


FIG 3

Valeurs expérimentales en µg de phosphore

Nombre d'animaux par lot :

5 témoins (T), 10 témoins recevant de l'acide rétinolique (TAR), 9 carencés (C), 14 carencés recevant de l'acide rétinolique (CAR)

TABLEAU III

Pourcentage d'écart entre les activités DNasiques acides des différents lots

Lots	DNase acide libre		DNase acide totale		Activité libre p. 100 Activité totale
	Spécifique	Absolute	Spécifique	Absolute	
C comparé à T	+ 453***	+ 129 **	+ 59 **	- 35 **	+ 219 ***
CAR comparé à TAR . . .	+ 880***	+ 333 ***	+ 81 ***	- 22 (+)	+ 475 ***
C comparé à TAR	+ 1 007***	+ 305 ***	+ 70 ***	- 38 ***	+ 583 ***
CAR comparé à T	+ 390***	+ 145 *	+ 70 **	- 19 (+)	+ 165 ***
TAR comparé à T	- 50(+)	- 43 (+)	- 6 (+)	+ 4 (+)	- 54 (+)
CAR comparé à C	- 11(+)	+ 7 (+)	+ 7 (+)	+ 25 (+)	- 17 *

+ Statistiquement non significatif
 * Significativement différent à 5 p. 100
 ** Significativement différent à 1 p. 100
 *** Significativement différent à 1 p. 1 000

Activités de la RNase acide du testicule de rats temoins et carencés en vitamine A

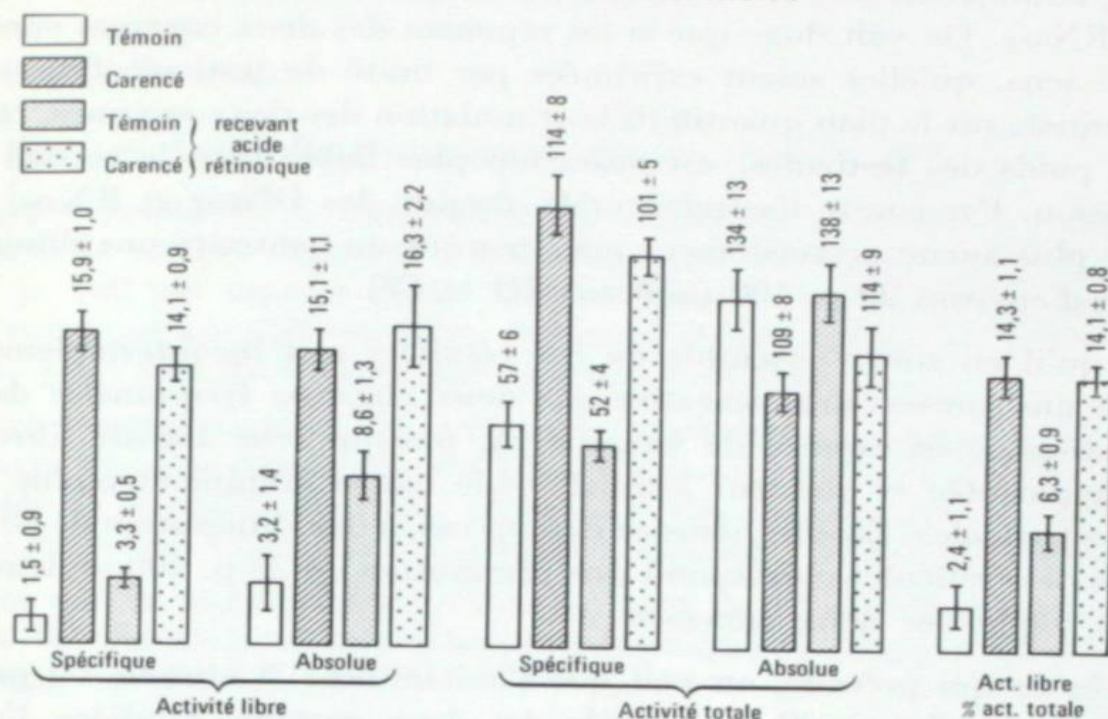


FIG. 4

Valeurs expérimentales en unités arbitraires

Nombre d'animaux par lot :

5 témoins (T), 10 témoins recevant de l'acide rétinoïque (TAR), 9 carencés (C),
14 carencés recevant de l'acide rétinoïque (CAR)

TABLEAU IV

Pourcentage d'écart entre les activités RNasiques acides des différents lots

Lots	RNase acide libre		RNase acide totale		Activité libre p. 100 Activité totale
	Spécifique	Absolue	Spécifique	Absolue	
C comparé à T	+ 960***	+ 372***	+ 100***	- 19 (+)	+ 496***
CAR comparé à TAR . . .	+ 327***	+ 90*	+ 94***	- 17 (+)	+ 124***
C comparé à TAR	+ 382***	+ 76**	+ 119***	- 21 (+)	+ 127***
CAR comparé à T	+ 840***	+ 409***	+ 77***	- 15 (+)	+ 488***
TAR comparé à T	+ 120 (+)	+ 169*	- 9(+)	+ 3 (+)	+ 162*
CAR comparé à C	- 11 (+)	+ 8 (+)	- 11(+)	+ 5 (+)	- 1 (+)

(+) Statistiquement non significatif
* Significativement différent à 5 p. 100
** Significativement différent à 1 p. 100
*** Significativement différent à 1 p. 1 000

En ce qui concerne les activités libres absolues des DNase et RNase acides, la carence en vitamine A, avec ou sans acide rétinoïque, exerce également sur elles une stimulation de l'ordre de 190 p. 100 pour la DNase et de 120 p. 100 pour la RNase. On voit donc que si les réponses des deux enzymes vont dans le même sens, qu'elles soient exprimées par unité de testicule frais ou par organe entier, sur le plan quantitatif la stimulation des deux enzymes, compte tenu du poids des testicules, est beaucoup plus faible pour le second mode d'expression. Par contre l'activité totale absolue des DNase et RNase acides n'accuse plus aucun accroissement mais marque au contraire une diminution modérée d'environ 20 p. 100 (tableaux III et IV).

Quoi qu'il en soit, l'ensemble de ces résultats met incontestablement en évidence une conservation sélective des deux enzymes lysosomales dans les deux testicules, en carence de vitamine A, puisque leur activité libre y est encore augmentée et que leur activité totale baisse infiniment moins que le poids des testicules. En effet, dans ce dernier cas, à une diminution de 60 p. 100 du poids des testicules correspond une diminution de 20 p. 100 seulement de l'activité totale des deux enzymes.

D'après ce qui précède, on voit que l'avitaminose A stimule ou préserve inégalement les formes libre et totale des deux enzymes étudiées, l'effet le plus marqué portant très nettement sur la forme libre. Il s'ensuit que l'avitaminose A induit des modifications dans la répartition de ces activités libre et totale. Ceci ressort du fait que le rapport de l'activité libre à l'activité totale qui est normalement en moyenne de 1,7 p. 100 pour la DNase et de 5 p. 100 pour la RNase se trouve respectivement haussé à 7,5 et 14 p. 100, soit une augmentation de 350 p. 100 pour la DNase et de 170 p. 100 pour la RNase (Tableaux III et IV). Ce fait est intéressant car il constitue un test biochimique sûr, sinon de la labilisation, tout au moins de l'accroissement de la perméabilité de la membrane lysosomale. En effet, cette perturbation peut provoquer la sortie partielle, par exocytose, de la fraction des enzymes étudiées, normalement contenue en réserve dans les lysosomes, ce qui conduit à une élévation de l'activité libre par rapport à l'activité totale [DINGLE (11)]. De sens inverse on peut imaginer une pénétration, par endocytose, de substrats à l'intérieur de la vacuole lysosomale [DAVIES, LLOYD et BECK (9); LLOYD (22)].

A la lumière de ces résultats, on voit que les réponses des enzymes testiculaires des lots carencés en vitamine A, avec ou sans acide rétinoïque, sont rigoureusement semblables. Ainsi donc, l'identité déjà observée sur le plan histologique entre les testicules des animaux carencés, recevant ou non de l'acide rétinoïque, se retrouve également au niveau biochimique. Il apparaît alors que l'acide rétinoïque est inapte aussi bien à assurer une structure histologique normale que des processus biochimiques normaux au niveau testiculaire.

B. Conséquences de l'hypervitaminose A sur l'activité des DNases acides testiculaires et hépatiques

1. ÉTUDE IN VIVO.

a. Analyse pondérale, état général, appétit, réserve hépatique des animaux.

L'hypervitaminose A importante et prolongée provoque, comme précédemment la carence aiguë en vitamine A, une diminution du poids corporel de 47 p. 100 par rapport au lot témoin. Dans cette diminution il faut faire intervenir pour une part modérée, de l'ordre de 10 p. 100, la sous-alimentation induite par l'effet de la surcharge (tableau V et figure 5).

Outre l'amaigrissement, la surcharge importante en vitamine A provoque de graves troubles apparents dans l'aspect des animaux. Ceux-ci, du fait très probable de fractures osseuses, présentent une position difforme de la partie arrière du corps; toutefois, il n'a pas été constaté d'hémorragies importantes.

Alors que le niveau moyen d'ingestion est de 15 g d'aliment sec par jour pour le lot témoin nourri *ad libitum*, il n'est que de 10 g par jour pour le lot surchargé en vitamine A.

Contrairement au poids corporel, le poids des testicules des rats du lot soumis à l'hypervitaminose A est légèrement subnormal; il est en effet de 2221 mg alors qu'il est de 2526 mg chez les témoins restreints et de 2734 mg chez les témoins *ab libitum*. On retrouve ici la fréquente autonomie de réponse pondérale d'organes différents, à un même « stress » nutritionnel puisque, contrairement aux testicules dont le poids est très peu modifié, le foie subit, en hypervitaminose A, une réduction pondérale de 47 ou 24 p. 100 par rapport aux témoins (tableau V). La réserve hépatique des animaux surchargés en vitamine A est de 35.000 U.I. par gramme de foie alors que chez les sujets témoins elle n'est que de 39 U.I.

b. Activités enzymatiques.

Sur le plan enzymatique les effets de l'hypervitaminose A ont été recherchés sur la seule DNase acide. Les conséquences d'une surcharge en vitamine A sur le foie ayant déjà été étudiées par DINGLE et COLL. (13), il nous a paru intéressant de confronter l'influence d'un excès de vitamine A au niveau testiculaire et hépatique. Dans le cas du foie, les différences expérimentales entre l'étude de DINGLE et la nôtre portent sur le taux de surcharge en vitamine A et sur la nature de l'enzyme étudiée qui, chez ces auteurs, est la cathepsine et non la DNase acide.

Exprimée par gramme de testicule frais, l'activité libre de la DNase augmente significativement de 386 p. 100 et l'activité totale de seulement 13 p. 100 par rapport aux témoins *ad libitum*, la différence n'étant pas significative entre les deux lots témoins. Dans les testicules entiers, l'activité libre de

Analyse pondérale chez les rats témoins
et surchargés en vitamine A

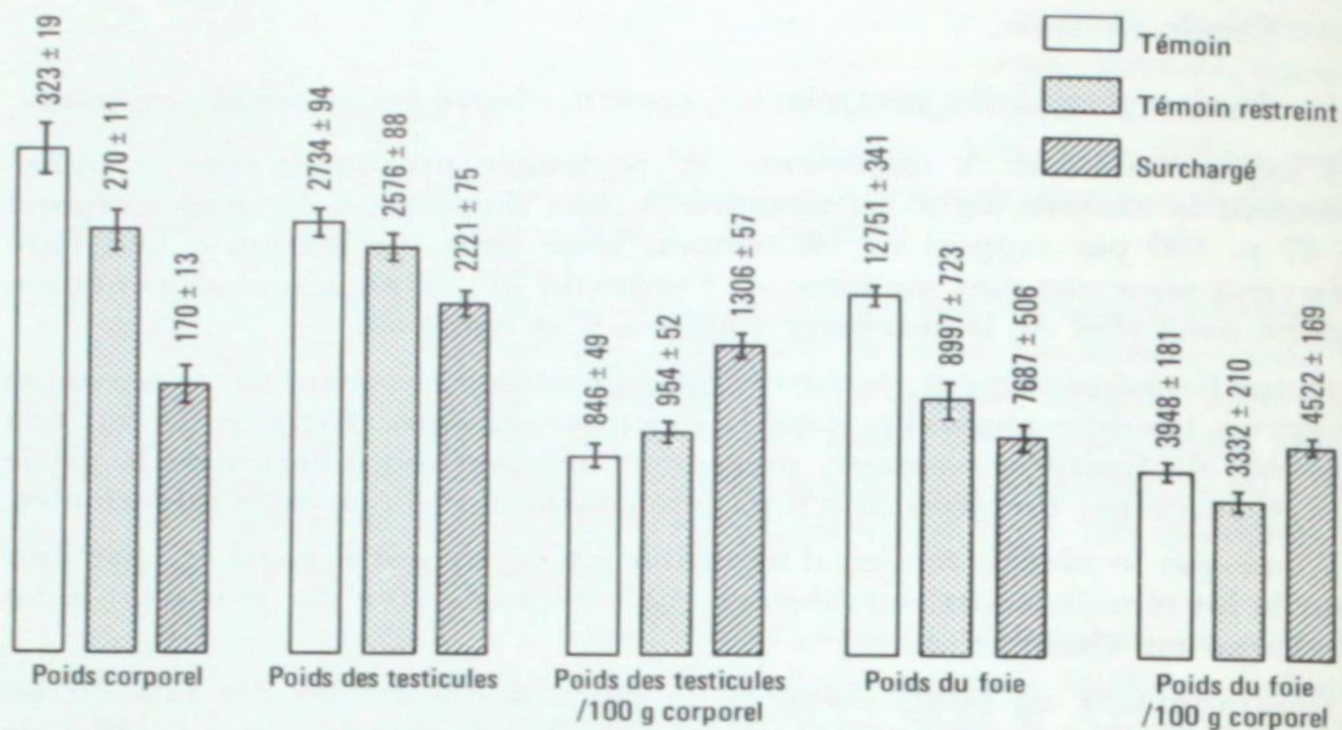


FIG. 5

Valeurs expérimentales

Nombre d'animaux par lot :

7 témoins (T), 6 témoins restreints (TR), 8 surchargés en vitamine A (SA)

TABLEAU V

Pourcentage d'écart entre les différents lots

Lots	Poids corporel	Poids du foie		Poids des testicules	
		Absolu	Relatif	Absolu	Relatif
SA comparé à TR.....	- 37 ***	- 24 (+)	+ 36 ***	- 13 **	+ 37 ***
SA comparé à T.....	- 47 ***	- 47 ***	+ 15 *	- 19 ***	+ 54 ***
TR comparé à T.....	- 16 (+)	- 39 ***	- 16 *	- 6 (+)	+ 13 (+)

(+) Statistiquement non significatif
 * Significativement différent à 5 p. 100
 ** Significativement différent à 1 p. 100
 *** Significativement différent à 1 p. 1 000

Activités de la DNase acide du testicule de rats témoins et surchargés en vitamine A

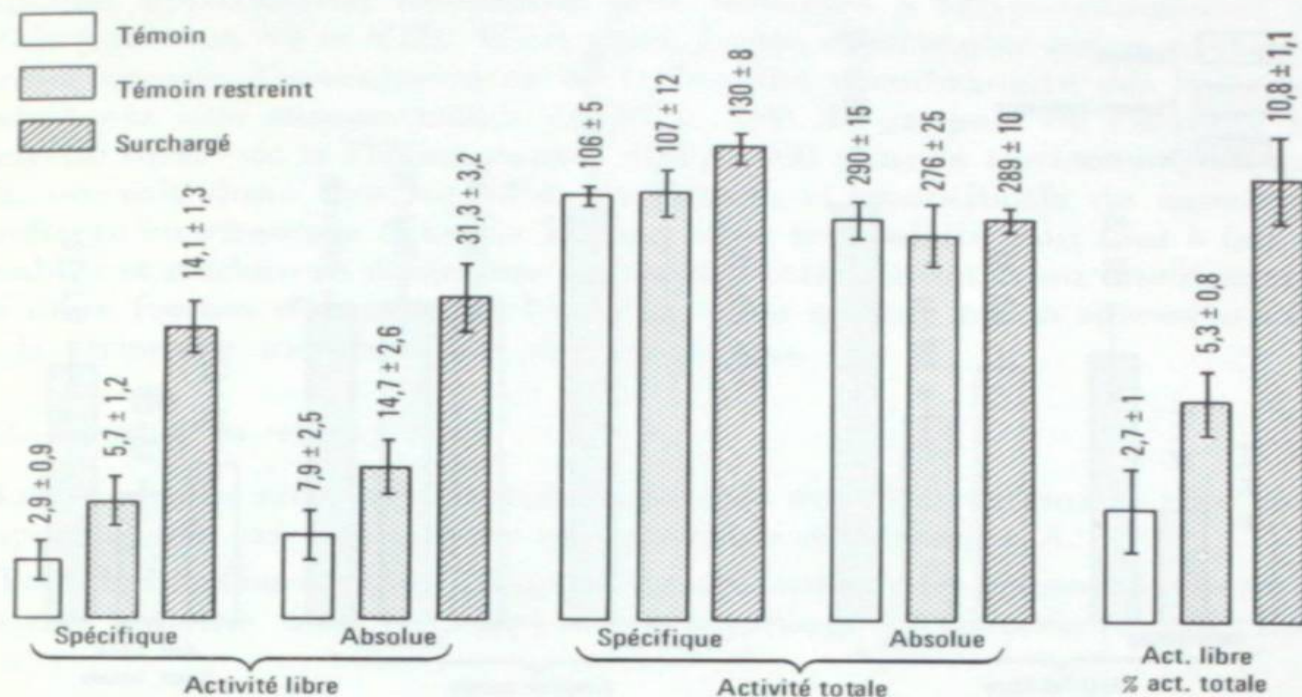


FIG. 6

Valeurs expérimentales

Nombre d'animaux par lot :

7 témoins (T), 6 témoins restreints (TR), 8 surchargés en vitamine A (SA)

TABLEAU VI

Pourcentage d'écart entre les activités DNasiques acides des différents lots

Lots	DNase acide libre		DNase acide totale		Activité libre p. 100 Activité totale
	Spécifique	Absolue	Spécifique	Absolue	
SA comparé à TR	+ 147 ***	+ 113 **	+ 21 (+)	+ 5 (+)	+ 104 ***
SA comparé à T	+ 386 ***	+ 296 ***	+ 23 *	0	+ 300 **
TR comparé à T	+ 96 (+)	+ 86 (+)	+ 1 (+)	- 5 (+)	+ 96 (+)

(+) Statistiquement non significatif
 * Significativement différent à 5 p. 100
 ** Significativement différent à 1 p. 100
 *** Significativement différent à 1 p. 1 000

Activités de la DNase acide du foie de rats témoins et surchargés en vitamine A

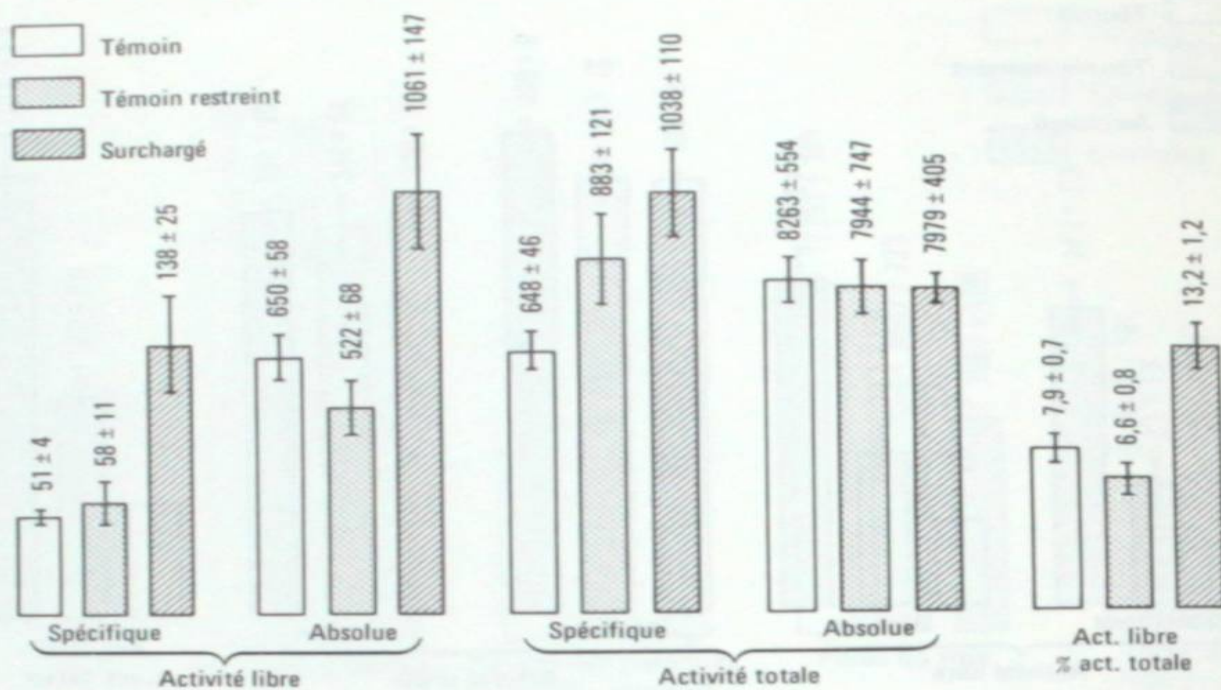


FIG. 7

Valeurs expérimentales

Nombre d'animaux par lot :

7 témoins (T), 6 témoins restreints (TR), 8 surchargés en vitamine A (SA)

TABLEAU VII

Pourcentage d'écart entre les activités DNasiques des différents lots

Lots	DNase acide libre		DNase acide totale		Activité libre p. 100 Activité totale
	Spécifique	Absolue	Spécifique	Absolue	
SA comparé à TR	+ 138 *	+ 103 *	+ 18 (+)	0	+ 100 **
SA comparé à T	+ 171 **	+ 63 *	+ 60 **	- 4 (+)	+ 67 **
TR comparé à T	+ 14 (+)	- 20 (+)	+ 36 (+)	- 4 (+)	+ 16 (+)

(+) Statistiquement non significatif
 * Significativement différent à 5 p. 100
 ** Significativement différent à 1 p. 100
 *** Significativement différent à 1 p. 1 000

pour une dose de 2500 U.I./ml. nous avons une augmentation de 50 p. 100 de l'activité soluble.

D'autre part, la structure des lysosomes de l'animal carencé en A est effectivement altérée car ces organites sont nettement plus sensibles chez les sujets carencés que chez les témoins à l'action labilisante *in vitro* d'une surcharge en rétinol (courbes 1 de la fig. 8). C'est ainsi qu'à la dose de 2.500 U.I. de rétinol par 100 mg de testicules, l'activité soluble s'élève de 65 p. 100 pour les préparations de rats carencés en vitamine A. L'effet labilisant d'une telle dose de rétinol est pratiquement équivalent à l'effet du triton.

Les expériences *in vitro* vont donc dans le sens d'une action directe d'un déséquilibre en vitamine A sur la stabilité *in vivo* des lysosomes.

Les études comparatives des surcharges en rétinol *in vitro* sur le foie et le testicule semblent indiquer une sensibilité plus grande des lysosomes testiculaires. C'est ainsi que pour une surcharge de 1000 I.U. de rétinol, le pourcentage d'augmentation de l'activité soluble de la DNase acide dans le testicule est de 17 p. 100 pour les témoins et de 35 p. 100 pour les carencés alors que dans le foie cette augmentation n'est que de 8 p. 100 pour les témoins et 19 p. 100 pour les carencés (figure 8, courbes 1 et 2).

V. DISCUSSION DES RÉSULTATS

En carence comme en surcharge de vitamine A, nos résultats expérimentaux ont mis en évidence une forte stimulation de la DNase et/ou de la RNase acides libres au niveau du testicule. Le problème qui se pose est de savoir si l'on peut établir une corrélation entre l'augmentation d'activité de ces enzymes essentiellement catabolisantes et les perturbations histologiques et cytologiques au niveau des testicules des rats privés ou surchargés en vitamine A.

A. Cas de la carence en vitamine A

L'avitaminose A entraîne l'effondrement de 60 p. 100 du poids des testicules, indice apparent de leur grave dégénérescence. Or il nous paraît plausible d'établir un lien entre cette dégénérescence testiculaire et l'augmentation d'enzymes lytiques telles que la DNase et la RNase acides et cela d'autant plus que l'action de l'avitaminose A sur le testicule porte spécifiquement sur les éléments de la lignée germinale qui sont fondamentalement dépositaires de RNA et DNA. Nous pensons donc vraisemblable d'établir un trait d'union entre l'augmentation de ces deux hydrolases et la disparition de la lignée germinale et tout particulièrement de celle des spermatozoïdes comme en fait foi notre mesure de la hyaluronidase (tableau VIII).

TABLEAU VIII

Activités de la hyaluronidase du testicule de rats témoins et carencés en vitamine A

Valeurs expérimentales en p.m. de N-acétylglucosamine

Lots	Hyaluronidase	
	Spécifique	Absolue
Γ	36	85
Δ	2	1,9
ΓAR	32	84
ΔAR	5	5,5

Ainsi, mettant en jeu, grâce à leurs lysosomes, les processus d'autophagie, les testicules se trouvent être les propres artisans de leur dégénérescence. En surplus, une telle explication a déjà été avancée en ce qui concerne la répartition d'enzymes lysosomales à l'atteinte provoquée au testicule par la carence E chez le rat [BUNYAN, GREEN, DIPLOCK (6)] et l'avitaminose C chez le cobaye [HITIER (19)].

Comme en témoigne la chute du poids des testicules, nos études portent sur un stade avancé d'avitaminose A. A ce stade, il nous paraît possible de penser que les DNase et RNase acides fortement stimulées interviennent, dans l'expression imagée de DE DUVE, à titre « d'éboueur » des cellules dégénérées. Toutefois deux faits peuvent paraître déconcertants.

D'abord, comment comprendre cette préservation du capital d'enzymes lysosomales dans un organe en pleine involution? En fait, c'est précisément le maintien d'enzymes catabolisantes qui nous semble pouvoir contribuer à ralentir la dégénérescence du testicule en carence A. Deux explications, ne s'excluant pas forcément l'une l'autre, peuvent être avancées pour essayer de comprendre que le stock en ces enzymes lysosomales ne s'effondre pas comme celui des autres constituants du testicule. Pour SCHEIB-PFLEGER et WATTIAUX « il semble raisonnable d'admettre que les hydrolases acides échappent simplement à la fonte protéique généralisée et sont ainsi conservées et progressivement concentrées dans les organes en régression. C'est là évidemment ce qu'on devrait attendre si ces enzymes sont des agents de l'autolyse cellulaire ». Ainsi donc, dans le bloc protéique, les hydrolases acides seraient des protéines particulièrement stables. D'autre part, ne pourrait-on suggérer une synthèse *de novo* d'enzymes dans les lysosomes vienne compenser la libération ou une dégradation de ces enzymes? Une telle explication a été avancée par FELL, DINGLE et LUCY (16) pour l'étude de l'effet lytique d'un déséquilibre en vitamine A sur des cultures embryonnaires.

pour une dose de 2500 U.I./ml. nous avons une augmentation de 50 p. 100 de l'activité soluble.

D'autre part, la structure des lysosomes de l'animal carencé en A est effectivement altérée car ces organites sont nettement plus sensibles chez les sujets carencés que chez les témoins à l'action labilisante *in vitro* d'une surcharge en rétinol (courbes 1 de la fig. 8). C'est ainsi qu'à la dose de 2.500 U.I. de rétinol par 100 mg de testicules, l'activité soluble s'élève de 65 p. 100 pour les préparations de rats carencés en vitamine A. L'effet labilisant d'une telle dose de rétinol est pratiquement équivalent à l'effet du triton.

Les expériences *in vitro* vont donc dans le sens d'une action directe d'un déséquilibre en vitamine A sur la stabilité *in vivo* des lysosomes.

Les études comparatives des surcharges en rétinol *in vitro* sur le foie et le testicule semblent indiquer une sensibilité plus grande des lysosomes testiculaires. C'est ainsi que pour une surcharge de 1000 I.U. de rétinol, le pourcentage d'augmentation de l'activité soluble de la DNase acide dans le testicule est de 17 p. 100 pour les témoins et de 35 p. 100 pour les carencés alors que dans le foie cette augmentation n'est que de 8 p. 100 pour les témoins et 19 p. 100 pour les carencés (figure 8, courbes 1 et 2).

V. DISCUSSION DES RÉSULTATS

En carence comme en surcharge de vitamine A, nos résultats expérimentaux ont mis en évidence une forte stimulation de la DNase et/ou de la RNase acides libres au niveau du testicule. Le problème qui se pose est de savoir si l'on peut établir une corrélation entre l'augmentation d'activité de ces enzymes essentiellement catabolisantes et les perturbations histologiques et cytologiques au niveau des testicules des rats privés ou surchargés en vitamine A.

A. Cas de la carence en vitamine A

L'avitaminose A entraîne l'effondrement de 60 p. 100 du poids des testicules, indice apparent de leur grave dégénérescence. Or il nous paraît plausible d'établir un lien entre cette dégénérescence testiculaire et l'augmentation d'enzymes lytiques telles que la DNase et la RNase acides et cela d'autant plus que l'action de l'avitaminose A sur le testicule porte spécifiquement sur les éléments de la lignée germinale qui sont fondamentalement dépositaires de RNA et DNA. Nous pensons donc vraisemblable d'établir un trait d'union entre l'augmentation de ces deux hydrolases et la disparition de la lignée germinale et tout particulièrement de celle des spermatozoïdes comme en fait foi notre mesure de la hyaluronidase (tableau VIII).

TABLEAU VIII

*Activités de la hyaluronidase du testicule de rats témoins
et carencés en vitamine A*

Valeurs expérimentales en p.m. de N-acétylglucosamine

Lots	Hyaluronidase	
	Spécifique	Absolue
T	36	85
C	2	1,9
TAR	32	84
CAR	5	5,5

Ainsi, mettant en jeu, grâce à leurs lysosomes, les processus d'autophagie, les testicules se trouvent être les propres artisans de leur dégénérescence. Au surplus, une telle explication a déjà été avancée en ce qui concerne la contribution d'enzymes lysosomales à l'atteinte provoquée au testicule par la carence E chez le rat [BUNYAN, GREEN, DIPLOCK (6)] et l'avitaminose C chez le cobaye [HITIER (19)].

Comme en témoigne la chute du poids des testicules, nos études portent sur un stade avancé d'avitaminose A. A ce stade, il nous paraît possible de penser que les DNase et RNase acides fortement stimulées interviennent, selon l'expression imagée de DE DUVE, à titre « d'éboueur » des cellules dégénérées. Toutefois deux faits peuvent paraître déconcertants.

Tout d'abord, comment comprendre cette préservation du capital d'enzymes lysosomales dans un organe en pleine involution? En fait, c'est précisément ce maintien d'enzymes catabolisantes qui nous semble pouvoir contribuer à expliquer la dégénérescence du testicule en carence A. Deux explications, ne s'excluant pas forcément l'une l'autre, peuvent être avancées pour essayer de comprendre que le stock en ces enzymes lysosomales ne s'effondre pas comme celui des autres constituants du testicule. Pour SCHEIB-PFLEGER et WATTIAUX (32) « il semble raisonnable d'admettre que les hydrolases acides échappent tout simplement à la fonte protéique généralisée et sont ainsi conservées et progressivement concentrées dans les organes en régression. C'est là évidemment ce qu'on devrait attendre si ces enzymes sont des agents de l'autolyse tissulaire ». Ainsi donc, dans le bloc protéique, les hydrolases acides seraient les protéines particulièrement stables. D'autre part, ne pourrait-on suggérer qu'une synthèse *de novo* d'enzymes dans les lysosomes vienne compenser une libération ou une dégradation de ces enzymes? Une telle explication a été avancée par FELL, DINGLE et LUCY (16) pour l'étude de l'effet lytique d'un déséquilibre en vitamine A sur des cultures embryonnaires.

En second lieu, comment expliquer que la DNase et la RNase acides détruisent en avitaminose A toute la lignée germinale, à l'exception des spermatogonies, sans faire disparaître les cellules de Sertoli (2,10) qui conservent une apparence histologique normale? On pourrait suggérer qu'à l'image des macrophages, les cellules de Sertoli, qui contiennent les enzymes lysosomales [REISSENWEBER (30); CARR, CLEGG et MEEK (8)] contribuent à détruire le tissu testiculaire sans être elles-mêmes touchées. De fait, dans toute une série d'études ne portant pas sur les avitaminoses mais se plaçant dans des conditions pathologiques, il est bien montré que les cellules de Sertoli contribuent à détruire et à digérer les différents éléments de la lignée germinale sauf les spermatogonies [REDDY et SVOBODA, 29; VILAR, STEINBERGER, (39)].

La question qui reste à résoudre est celle de savoir si l'activation des DNase et RNase acides existe à des stades plus précoces de la dégénérescence du testicule en avitaminose A et si elle contribue à la phase initiale de celle-ci. On peut tout au moins préciser que c'est l'effet de la carence en vitamine A qui intervient spécifiquement dans les processus biochimiques d'activation de ces deux hydrolases, la sous-alimentation n'y ayant aucune part [GOUBERN, N'DIAYE-BUISSON, TERROINE, FERRANDO (17)].

Par ailleurs, il ressort d'une expérience antérieure portant sur le poids des testicules mais non sur leur aspect histologique que le besoin en vitamine A de ces organes chez le rat est très faible. En effet, il y a une différence radicale de réponse selon que l'animal est totalement privé de vitamine A ou bien en reçoit 1, 2, 4, 8, 16 U.I./jour et par animal. En ce qui concerne le poids des testicules, il suffit de passer de 0 à 1 U.I. de vitamine A par jour pour que celui-ci s'accroisse de 390 p. 100 tandis que le passage de 1 à 16 U.I./jour n'entraîne qu'une augmentation de 60 p. 100. Ce seuil apparaît encore mieux si l'on envisage le poids des testicules par 100 g de poids corporel. La différence de réponse est aussi tranchée pour l'activité de la DNase acide. La stimulation apparaît exclusivement dans les testicules des sujets privés de vitamine A. Ainsi, sur la seule base d'études pondérales, les besoins en vitamine A chez le rat pour maintenir une activité normale du testicule, sont très faibles puisqu'il suffit de 1 U.I. à ce récepteur très sensible pour qu'il fonctionne pratiquement normalement. Par contre la dose de 1 U.I./jour est insuffisante pour assurer la croissance corporelle optimale des animaux [GOUBERN, N'DIAYE-BUISSON, TERROINE, FERRANDO (17)].

Au surplus, l'action régulatrice de la vitamine A sur la structure et l'activité fonctionnelle du testicule semble bien être une action directe. D'une part, en effet, PALLUDAN (27), AHLUWALIA et BIERI (2) montrent que l'injection *in situ* de faibles doses de rétinol dans le testicule de porcs ou de rats préalablement carencés se traduit par une reprise de la spermatogenèse au point où la vitamine A a été injectée. Si chez le rat une dose plus forte de rétinol est injectée dans le testicule la spermatogénèse est restaurée dans tout le testicule. D'autre part, l'administration d'hormones diverses (gonadotropes, testiculaire) ne permet pas le retour à la normale de l'activité testiculaire du rat en avitaminose A [AHLUWALIA et BIERI (1)].

B. Cas de l'hypervitaminose A

Alors qu'en avitaminose A nous pouvons envisager une corrélation entre la stimulation d'enzymes lysosomales et la dégénérescence testiculaire, un semblable trait d'union n'apparaît pas de prime abord évident en hypervitaminose A.

En effet, comme la carence, la surcharge en vitamine A stimule l'activité libre de la DNase acide mais, à la différence de la carence, l'hypervitaminose A ne produit aucun effondrement pondéral du testicule. De plus, l'activité de la hyaluronidase testiculaire demeure normale chez les rats surchargés en vitamine A. En effet, l'activité exprimée en μM de N acétyl-glucosamine libérée par gramme de testicule frais est respectivement de 30, 36 et 38 μM chez les lots surchargés, témoins *restreints* et témoins *ad libitum*. Les différences entre les lots ne sont pas significatives. Ainsi donc, d'après nos résultats, les testicules de rats recevant un régime de base bien équilibré paraissent structurellement et fonctionnellement peu touchés par l'hypervitaminose A. Si, contrairement à nous, MADDOCK et coll. (23) trouvent qu'une hypervitaminose A détermine des lésions dégénératives importantes des tubes séminifères chez le rat, c'est peut-être parce que ces auteurs emploient un régime très différent du nôtre.

Reprenant à notre compte l'explication donnée par WEISSMAN et THOMAS (42) en d'autres circonstances, l'hypervitaminose A n'induirait *in vivo* qu'une fragilité plus grande des lysosomes. Cette fragilité serait mise en évidence lors des processus d'homogénéisation, de centrifugation et d'incubation de l'homogénat testiculaire en vue de mesurer l'activité de l'enzyme. Dans ces conditions la très forte stimulation de la DNase est un indice *in vitro* de cette fragilité des lysosomes *in vivo*. On s'explique donc qu'aucun processus autophagique n'ayant lieu *in vivo*, le poids des testicules des sujets en hypervitaminose A demeure normal. A l'appui de cette suggestion nos observations *in vitro* montrent qu'une surcharge en rétinol induit directement une labilisation des lysosomes testiculaires.

C. Spécificité de la dégénérescence testiculaire en avitaminose A

Étant donné les interrelations bien connues entre les vitamines A, E, C (TERROINE, 35) et étant donné que, comme nous l'avons indiqué précédemment, la carence en ces deux derniers facteurs induit tout à la fois dégénérescence testiculaire et stimulation d'enzymes lysosomales, on peut se demander dans quelle mesure les faits que nous observons sont rigoureusement spécifiques de l'avitaminose A ou ne découlent pas des répercussions de cette carence sur les facteurs E et C.

Les conséquences de l'avitaminose A sur les perturbations histologiques et biochimiques du testicule ne nous paraissent pas devoir être mises sur le compte d'une carence secondaire en vitamine E. En effet, si dans les stades avancés de carence en vitamine A il y a des similitudes avec la carence E [TERROINE et DELOST (36)], ces deux carences ont néanmoins des actions différentes. La carence en vitamine A est beaucoup plus rapide que celle en α tocophérol, il est donc peu probable que les modifications observées soient dûes à une carence secondaire en vitamine E, le contraire n'étant pas forcément valable [EDWIN, DIPLOCK BUNYAN, GREEN, (15)]. De plus, tandis que l'altération de l'épithélium germinatif en carence A cède à un traitement par la vitamine A et que la spermatogenèse peut reprendre, la lésion est irréversible en carence E. Enfin l'avitaminose A contrôle la fonction testiculaire de très nombreuses espèces animales tandis que l'action de la vitamine E est beaucoup plus limitée.

En l'absence de dosages d'acide ascorbique dans le testicule de nos rats en carence de vitamine A, on ne peut exclure l'éventualité que les effets histologiques et biochimiques de cette dernière ne soient pas, partiellement au moins, dus à une carence secondaire en acide ascorbique. En effet, au niveau du testicule, le scorbut chez le cobaye exerce une action assez voisine de celle de l'avitaminose A chez le rat : même disparition de la lignée germinale, même persistance des cellules de Sertoli, même activation de la DNase acide liée à une labilisation lysosomale [HITIER (19); TERROINE et HITIER (37)].

Quoi qu'il en soit de ces interrelations vitaminiques possibles, il n'en demeure pas moins que c'est l'avitaminose A *sensu stricto* et non la sous-alimentation qui est impliquée dans les processus histologiques et biochimiques de dégénérescence testiculaire. C'est ce que démontre l'emploi de rats carencés en vitamine A recevant de l'acide rétinolique.

VI. CONCLUSIONS

L'objet de cette étude est de rechercher chez le Rat les conséquences de la carence ou de la surcharge en vitamine A sur les activités au niveau du testicule de deux enzymes lysosomales, la désoxyribonucléase et la ribonucléase acides.

La carence en vitamine A est réalisée sur des animaux recevant ou non de l'acide rétinolique.

De l'ensemble de nos résultats, les conclusions suivantes peuvent être dégagées :

1. Les réponses des DNase et RNase testiculaires des lots carencés en vitamine A avec ou sans acide rétinolique sont rigoureusement semblables. En effet, dans tous les cas, et sans que la sous-alimentation y contribue, l'avita-

minose A stimule et/ou préserve les formes libre et totale des deux enzymes, l'effet le plus marqué portant sur la forme libre. Il s'ensuit une très forte augmentation du pourcentage de l'activité libre par rapport à l'activité totale, fait constituant un test biochimique sûr sinon de la labilisation tout au moins de l'accroissement de la perméabilité membranaire des lysosomes dans les testicules de Rat.

L'acide rétinoïque, incapable d'assurer un développement normal du testicule est donc également inapte à maintenir des processus biochimiques normaux aux niveau de cet organe.

Il apparaît plausible d'établir une corrélation entre la dégénérescence testiculaire en avitaminose A portant particulièrement sur les éléments de la lignée germinale et l'augmentation ou la conservation sélective des RNase et DNase lysosomales dont les propriétés lytiques contribuent à la digestion et à la disparition des cellules germinales dégénérées.

2. L'hypervitaminose A prolongée, tout en affectant sévèrement l'état général des animaux, ne détermine, à la différence de la carence, aucun effondrement pondéral des testicules dont l'activité est apparemment normale comme l'indique le niveau de leur hyaluronidase.

Pourtant les effets de la surcharge en vitamine A sur la DNase acide testiculaire sont qualitativement et quantitativement tout à fait superposables à ceux ci-dessus provoqués par la carence. Mais tandis que dans la carence ces modifications enzymatiques traduisent effectivement l'activité des enzymes *in vivo*, en hypervitaminose A ces mêmes modifications enzymatiques indiquent simplement une fragilité plus grande des lysosomes aux traitements de l'homogénat en vue de mesurer l'activité enzymatique.

Ainsi, puisque l'hypervitaminose A ne provoque pas *in vivo* d'augmentation de la DNase, aucun processus autophagique n'a lieu et l'on s'explique donc que le poids des testicules demeure normal.

3. L'atteinte portée à la stabilité membranaire des lysosomes testiculaires lors de déséquilibres par défaut ou par excès de vitamine A est confirmé par nos études *in vitro*.

4. Les présents résultats montrent qu'on retrouve au niveau des testicules, cette sensibilité des lysosomes à tout déséquilibre en vitamine A déjà observée par d'autres que nous sur des tissus très différents.

Nous remercions vivement M. P. Mainguy, directeur technique aux *Établissements Hoffmann La Roche*, de nous avoir fourni l'acide rétinoïque.