

MISE EN EVIDENCE ET ETUDE CYTOCHIMIQUE D'UNE PROTEINE BASIQUE EXTRANUCLEAIRE DANS LES SPERMATOZOÏDES DES CRUSTACES DECAPODES

PHILIPPE CHEVAILLIER

From Laboratoire de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences, Rennes, France

ABSTRACT

Extranuclear basic proteins have been detected in the capsule of the spermatozoa of three species of decapod crustaceans (*Nephrops norvegicus* L., Macrura; *Eupagurus bernhardus* L., Anomura; *Carcinus maenas* Penn., Brachyura). Their properties have been studied by cytochemical methods. Their position inside the capsule of the spermatozoon has been specified with the aid of the electron microscope. Present in a constant fashion in the three species cited, their relative importance is very variable. In contrast to the refringent cone of the spermatozoon of *Ascaris*, which contains an acid protein, ascaradine, the capsule of the spermatozoon of the three decapod crustaceans studied contains basic proteins which we propose to designate by the general term "decapodine".

Les spermatozoïdes des crustacés décapodes (Fig. 1, 2, 3) comprennent fondamentalement trois parties (8): (a) le noyau, de forme et de volume très variables, est considéré comme la partie postérieure du gamète; (b) le collier, région moyenne, renferme un peu de cytoplasme avec quelques restes mitochondriaux et les centrioles; (c) la capsule, plus ou moins volumineuse suivant les espèces, représente la région antérieure du spermatozoïde. Il n'existe pas de flagelle et les spermatozoïdes sont immobiles.

La capsule est une formation complexe située en avant du noyau dont elle est séparée plus ou moins nettement par la membrane nucléaire et par le collier. Elle est traversée suivant son axe longitudinal par un filament axial constitué de fibrilles et éventuellement de tubules. Autour de cette formation fibrillaire s'organise la capsule proprement dite. Il a été beaucoup écrit au sujet de cette capsule, sur sa structure et sa signification. Mais les travaux effectués ont été réalisés généralement uniquement sur des bases morphologiques, soit au microscope photonique (8, 19-22, 33, 34, 41, 49),

soit au microscope électronique (11, 27, 31, 39, 50), le plus souvent sur une seule espèce. Quelques travaux ayant trait à la physiologie de ces spermatozoïdes aberrants lors de la fécondation sont déjà parus (10, 40) et les recherches dans ce domaine devront également nous apporter des éclaircissements sur la signification fonctionnelle de cette formation. Avant d'aborder cet aspect du problème (aspect physiologique), nous avons étudié de façon comparée les spermatozoïdes de trois espèces de décapodes (14-16), par la microscopie classique et par la microscopie électronique (aspect morphologique), et par les méthodes cytochimiques (aspect biochimique). La cytochimie nous semble être une méthode très valable pour l'étude de la signification de la capsule. Jusqu'à présent, les rares publications où l'aspect biochimique est envisagé (11, 27, 31, 32, 39, 50) notent simplement que la capsule est PAS-positive; ceci permet généralement aux auteurs de l'homologuer purement et simplement à l'acroosome d'un spermatozoïde flagellé, les polysaccharides détectés étant associés à des protéines chez l'écrevisse *Procambarus clarkii*

(31, 32), et à du RNA chez le crabe *Eriocheir japonicus* (50).

Dans une publication précédente, nous avons étudié de façon comparée le contenu intracapsulaire, au moyen des techniques cytochimiques et du microscope électronique (16). Le microscope électronique révèle la présence de différentes régions ayant des densités variables aux électrons suivant les espèces considérées. Nous avons montré que les aspects ultrastructuraux observés peuvent être mis en parallèle avec les différentes substances visualisées au microscope photonique par les méthodes cytochimiques. Trois types de substances ont été ainsi détectées à l'intérieur de la capsule: polysaccharides, protéines, et protéines basiques, dont la présence est constante, mais dont l'importance varie considérablement d'une espèce à une autre suivant le groupe de décapodes considéré.

Nous nous attacherons à montrer dans cette note la présence de protéines basiques intracapsulaires dans les spermatozoïdes des crustacés décapodes étudiés et à réunir les premières informations relatives à ces protéines obtenues à l'aide des techniques cytochimiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous nous sommes adressé à trois espèces de crustacés, chacune représentant l'un des trois types de décapodes et possédant des spermatozoïdes de

morphologie très différente: *Nephrops norvegicus* L. (macroure), *Eupagurus bernhardus* L. (anomoure) et *Carcinus maenas* Penn. (brachyoure).

Les acides nucléiques (DNA et RNA) ont été recherchés après fixation par le mélange de Clarke-Carnoy (éthanol absolu: 3 vol; acide acétique Cé: 1 vol), par les méthodes de Feulgen, de Brachet et d'Einarson.

Pour la détection des polysaccharides, le matériel a été fixé par le liquide de Gendre (solution saturée d'acide picrique dans l'alcool à 90°, 80 ml; formol, 15 ml; acide acétique Cé, 5 ml), puis traité par la méthode de McManus au PAS.

Les protéines totales ont été étudiées après fixation par le liquide de Carnoy et par le liquide de Gendre à l'aide de la méthode de Yasuma et Ichikawa (ninydrine-Schiff) et dans quelques cas par la technique de Burstone au DNFB. Nous avons également utilisé le fast green FCF en solution aqueuse à 0,1% à pH 2,8 et la méthode de Bonhag au bleu de bromophénol mercurique.

Pour la mise en évidence des protéines basiques, le matériel a été fixé par le formol neutre à 10% (formaldéhyde Merck pour analyse neutralisée par du carbonate de calcium Prolabo pour analyse, diluée par de l'eau distillée ou de l'eau de mer filtrée). Elles ont été détectées par la méthode d'Alfert et Geschwind (1, 2) (solution de fast green FCF, G. T. Gurr, C. I. 42053, à 0,1% dans l'eau distillée amenée à pH 8-8,2 par la soude, avec ou sans prétraitement à 90°C pendant 15 minutes par l'acide trichloracétique

Abréviations utilisées dans les figures

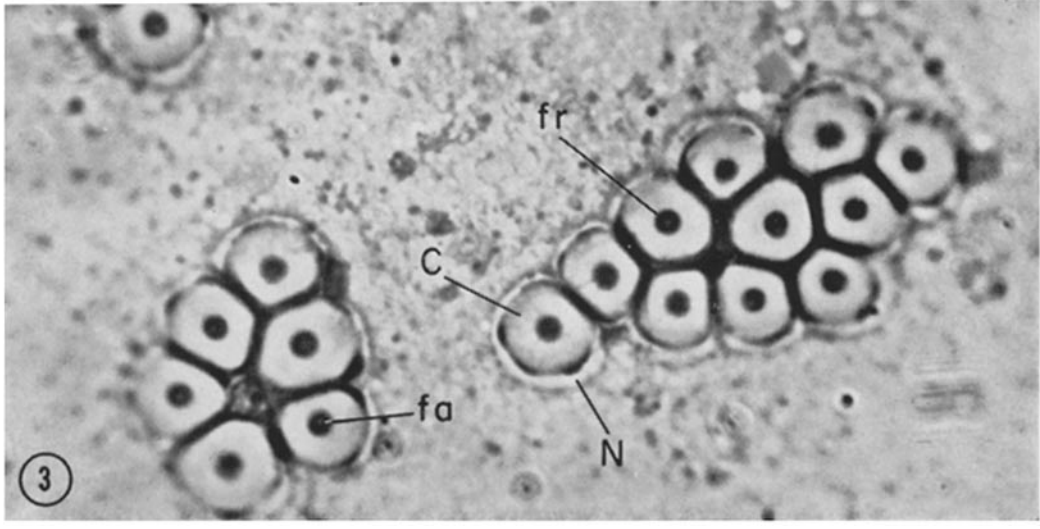
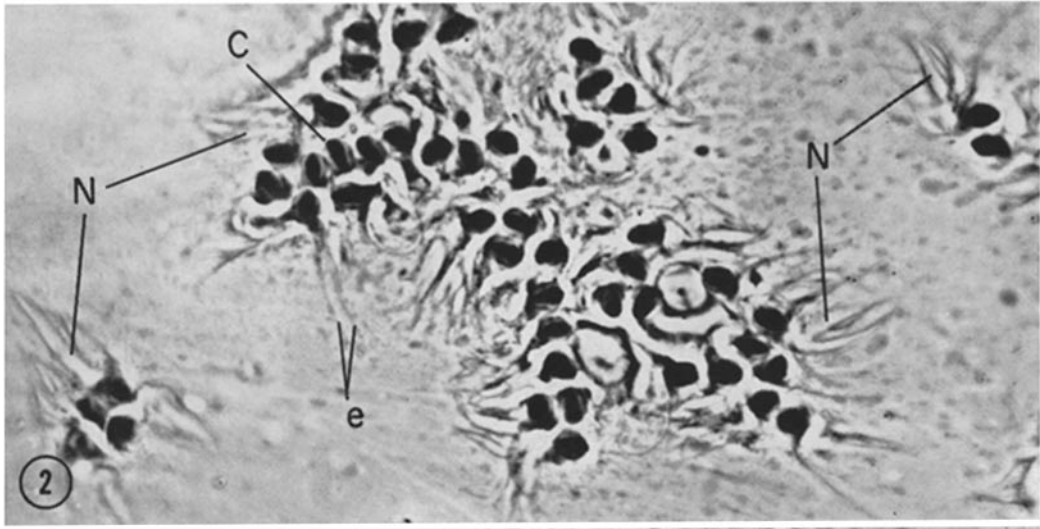
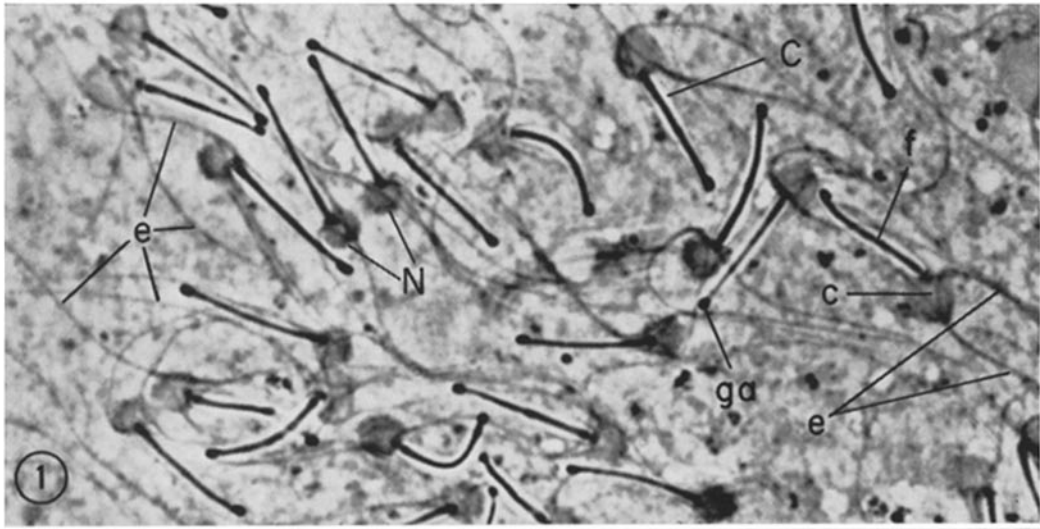
<i>anp</i> , anneau nucléaire péricapsulaire	<i>fp</i> , formation périphérique
<i>c</i> , collier	<i>fr</i> , formation réticulée
<i>C</i> , capsule	<i>ga</i> , granule apical
<i>e</i> , épines	<i>L</i> , systèmes lamellaires
<i>f</i> , bâtonnet axial	<i>mn</i> , membrane nucléaire
<i>fa</i> , formation axiale	<i>N</i> , noyau
<i>fh</i> , formation homogène	<i>t</i> , tubules

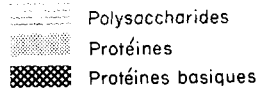
FIGURES 1-3 Structure des spermatozoïdes des trois espèces de crustacés décapodes étudiées (observations réalisées au microscope à contraste de phase). $\times 1000$.

FIGURE 1 *Nephrops norvegicus*, Macroure: le noyau relativement dense est de forme subsphérique; la capsule, long cylindre d'aspect clair, est parcourue sur toute sa longueur par le bâtonnet axial qui aboutit au granule apical.

FIGURE 2 *Eupagurus bernhardus*, Anomoure: le noyau de forme très irrégulière apparaît en clair; la capsule est ovoïde et dense.

FIGURE 3 *Carcinus maenas*, Brachyoure: le noyau, d'apparence claire, entoure la capsule de forme sphérique dans laquelle un anneau central constitue la région la plus dense.

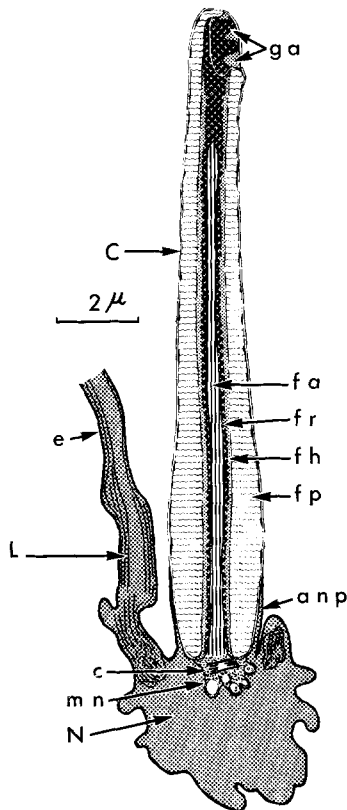




 Polysaccharides

 Protéines

 Protéines basiques



FIGURES 4-6. Schémas des spermatozoïdes des crustacés décapodes étudiés réalisés à partir des micrographies obtenues au microscope électronique et des données cytochimiques publiées antérieurement (15, 16).

FIGURE 4 Schéma du spermatozoïde de la langoustine *Nephrops norvegicus*.

Merck pour analyse à 5%), la méthode de Bloch et Hew (7) (solution à 0,1% dans l'eau distillée à pH 8-8,2 d'éosine Y, G. T. Gurr, C. I. 45380, avec ou sans hydrolyse préalable des nucléoprotéines par une solution aqueuse saturée d'acide picrique Fluka pour analyse à 60°C, pendant une nuit), la méthode de Bloch (coloration pendant 1 heure par une solution de bleu de bromophénol Kuhlmann à 0,1% dans l'eau distillée amenée à pH 2,3 par l'acide acétique Cé). Nous avons également expérimenté la méthode de Bloch au fast green-éosine Y¹ après extraction des

¹ Bloch, D. P. 1966. Dinitrofluorobenzene-Sakaguchi reaction for the cytochemical characterization of proteins. Communication personnelle.

acides nucléiques par l'acide trichloracétique chaud; on colore d'abord 30 minutes par le fast green en solution alcaline comme dans la technique d'Alfert et Geschwind puis pendant 2-4 heures par le mélange fast green à 0,05%, éosine Y 0,05% à pH 8,2-8,3 dans le tampon tris-HCl.

Des bloquages ont été effectués pour contrôler l'acidophilie des protéines détectées: acétylations et désaminations ont été réalisées pendant des temps variables, de 15 minutes à 4 heures. L'acide nitreux a été préparé au moment de l'emploi en mélangeant volume à volume une solution à 5% d'acide trichloracétique Merck pour analyse et une solution à 5% de nitrite de sodium Prolabo pour analyse. Les acétylations ont été conduites à 60°C au moyen d'anhydride acétique Prolabo pour analyse renfermant 2% d'acide acétique.

Les protéines basiques ont également été recherchées par la méthode de Black et Ansley (3, 4) au moyen du nitrate d'argent ammoniacal.

La présence éventuelle d'arginine a été recherchée par la réaction de Sakaguchi, selon la variante de McLeish (29) ou de Bloch² avec ou sans prétraitement par le DNFB. Le tryptophane a été recherché par les méthodes d'Adams, de Glenner (36) et de Lison et Pinheiro (28). Les acides aminés soufrés ont été recherchés par la méthode de Barnett et Seligman au DDD (28 et 36).

Le fer a été recherché par les méthodes de Lison et Bunting pour le fer Fe⁺⁺⁺ et de Tirman et Schmetzter pour le fer Fe⁺⁺. Des essais de démasquage du fer éventuellement impliqué dans des combinaisons organiques ont été réalisés par l'eau oxygénée, par l'alcool sulfurique selon la technique de Macallum et par incinération des coupes de matériel fixé au formol neutre (28).

OBSERVATIONS

Localisation des Protéines

Basiques Extranucléaires

Les protéines basiques extranucléaires sont localisées dans la capsule des spermatozoïdes (16), mais occupent dans cette formation un volume plus ou moins important suivant les espèces considérées (Fig. 4, 5, 6).

Chez la langoustine *Nephrops norvegicus* (14, 15), la majeure partie de la capsule contient en abondance des polysaccharides représentant une formation périphérique qui se révèle au microscope électronique comme une zone finement fibrillaire, peu dense aux électrons. La formation périaxiale est constituée de deux substances: l'une homogène,

² Bloch, D. P. 1966. Fast green-eosin method for histone staining. Communication personnelle.

constituée de protéines banales, l'autre que nous avons appelée formation réticulée renferme des protéines basiques en petites quantités. De telles protéines basiques extranucléaires sont décelables

de façon beaucoup plus nette dans le granule apical coiffant le filament axial dans la région antérieure de la capsule; c'est plus précisément dans la partie interne de ce granule apical que se localisent les protéines basiques détectées. Au microscope électronique, cette région interne a une structure lamellaire et est entourée par une substance homogène, moins dense aux électrons, renfermant des protéines banales.

Chez le pagure *Eupagurus bernhardus* (16), par contre, les protéines basiques occupent la majeure partie du volume de la capsule et ont la même répartition que les protéines banales; elles sont toutefois absentes de la formation axiale et d'une mince bande périphérique renfermant des polysaccharides peu abondants. Parfois, dans les spermatozoïdes jeunes, s'observe un granule apical très mince, mais plus dense que le reste de la capsule. Au microscope électronique, le contenu intracapsulaire diffère de celui de l'espèce précédente; sa structure est uniforme, l'opacité aux électrons relativement grande d'ailleurs, ne variant qu'en fonction de différences de densité d'un même matériel; la partie périphérique qui renferme des protéines banales et des polysaccharides est beaucoup moins dense aux électrons.

Chez le crabe *Carcinus maenas* (16), les protéines basiques sont présentes en quantités importantes au niveau d'un manchon situé autour de la formation fibrillaire axiale et dans le granule apical. Le manchon périaxial, très dense aux électrons, a une structure rappelant celle de la formation réticulée de la langoustine. La majeure partie de la capsule est constituée par des protéines banales et des poly-

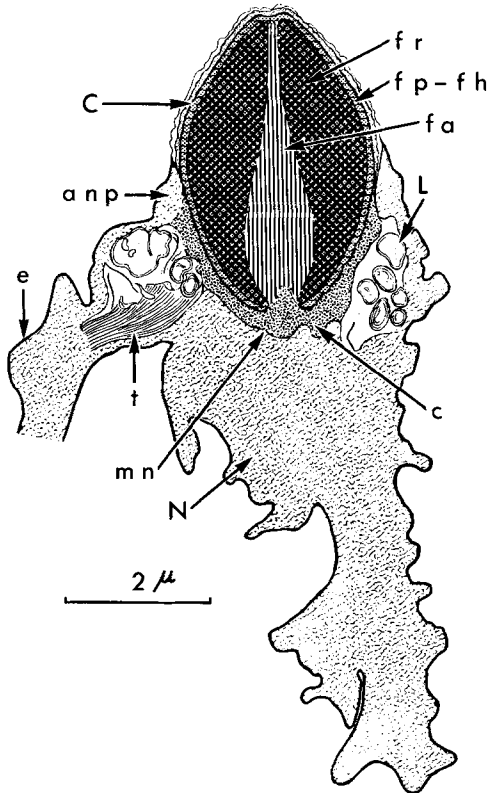


FIGURE 5 Schéma du spermatozoïde du pagure *Eupagurus bernhardus*.

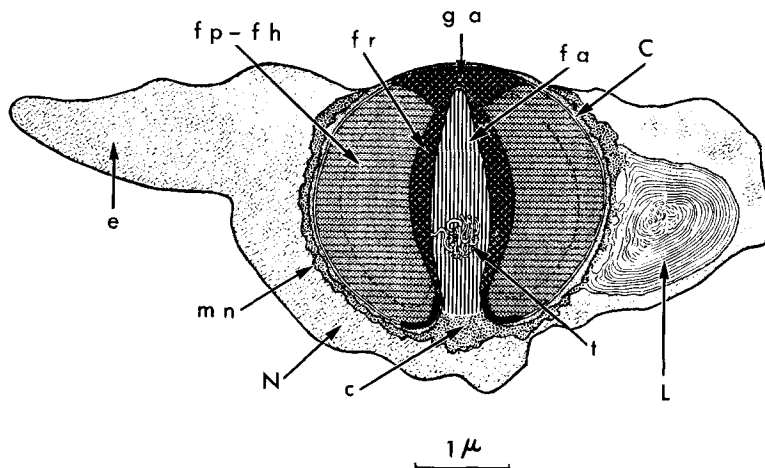


FIGURE 6 Schéma du spermatozoïde du crabe *Carcinus maenas*.

saccharides, occupant une position plus périphérique que les protéines basiques. Le granule apical a une structure homogène.

Caractères Cytochimiques des Protéines Basiques Capsulaires

Les réactions générales des protéines (ninhydrine-Schiff, bleu de bromophénol mercurique, fast green en solutions acétifiées, DNFB) colorent le bâtonnet axial intracapsulaire chez la langoustine, et l'ensemble de la capsule chez le pagure et chez le crabe (Fig. 7, 8). Chez ces deux dernières espèces, la coloration générale obtenue par la technique de Yasuma et Ichikawa est d'intensité relativement faible dans le cas du pagure et, chez le crabe, la coloration est intense, sauf au centre, au niveau de la formation axiale et du manchon périaxial.

Les protéines basiques de la capsule des spermatozoïdes des trois espèces de crustacés décapodes étudiées sont facilement mises en évidence par les colorants acides utilisés en solutions aqueuses à pH alcalins (fast green FCF, éosine Y) ou à pH 2,3 dans le cas du bleu de bromophénol (Fig. 9, 10). Les colorations sont toujours intenses sauf le long du filament axial chez la langoustine où la réaction demeure discrète. Ces protéines peuvent également être détectées même si l'on omet l'hydrolyse acide des nucléoprotéines pratiquée pour la mise en évidence des protéines basiques nucléaires (acide trichloracétique ou acide picrique); dans ce cas, on obtient une coloration très spécifique des sites intracapsulaires où se localisent les protéines étudiées. Elles ne semblent donc pas liées à un acide nucléique; de même une hydrolyse du RNA par la ribonucléase n'augmente pas l'intensité de la

coloration. Avec la coloration combinée au fast green-éosine Y, les protéines basiques capsulaires fixent beaucoup plus de fast green que d'éosine, même si on traite les coupes directement par le mélange fast green-éosine en omettant le traitement préliminaire par la solution pure de fast green; l'éosine est toujours fixée à l'état de traces sur les sites révélés.

Les histones des noyaux des cellules germinales ou somatiques du testicule ne sont plus révélables après une acétylation ou la désamination pendant 1 heure des radicaux ϵ -amino de la lysine qui entrent dans leur constitution. Par contre, les protéines basiques capsulaires continuent à fixer les colorants acides; chez la langoustine toutefois, les sites acidophiles présents le long de l'axe fibrillaire ne réagissent plus, peut-être en raison de leur faible concentration à ce niveau. Acétylation et désamination menées pendant 4 heures provoquent une très forte diminution de l'acidophilie des constituants basiques intracapsulaires sans que toutefois la réaction soit totalement nulle.

Nous avons également cherché à mettre en évidence les protéines basiques capsulaires au moyen de la méthode de Black et Ansley (3, 4) après fixations au formol neutre, aux liquides de Gendre et de Carnoy. Nous avons certes observé des réductions du nitrate d'argent ammoniacal, mais les résultats que nous avons obtenus n'ont pas été toujours très réguliers (Fig. 11, 12).

La présence d'arginine a été révélée au niveau des granules apicaux chez la langoustine et chez le crabe. Les manchons périaxiaux chez ces deux espèces ainsi que l'ensemble de la capsule du pagure nous ont donné des résultats négatifs. La réaction de Barnett et Seligman au DDD donne des résultats positifs, ce qui indiquerait l'existence

FIGURE 7 Détection des protéines totales (réaction de Yasuma et Ichikawa: ninhydrine-Schiff) chez le pagure *Eupagurus bernhardus*. $\times 900$.

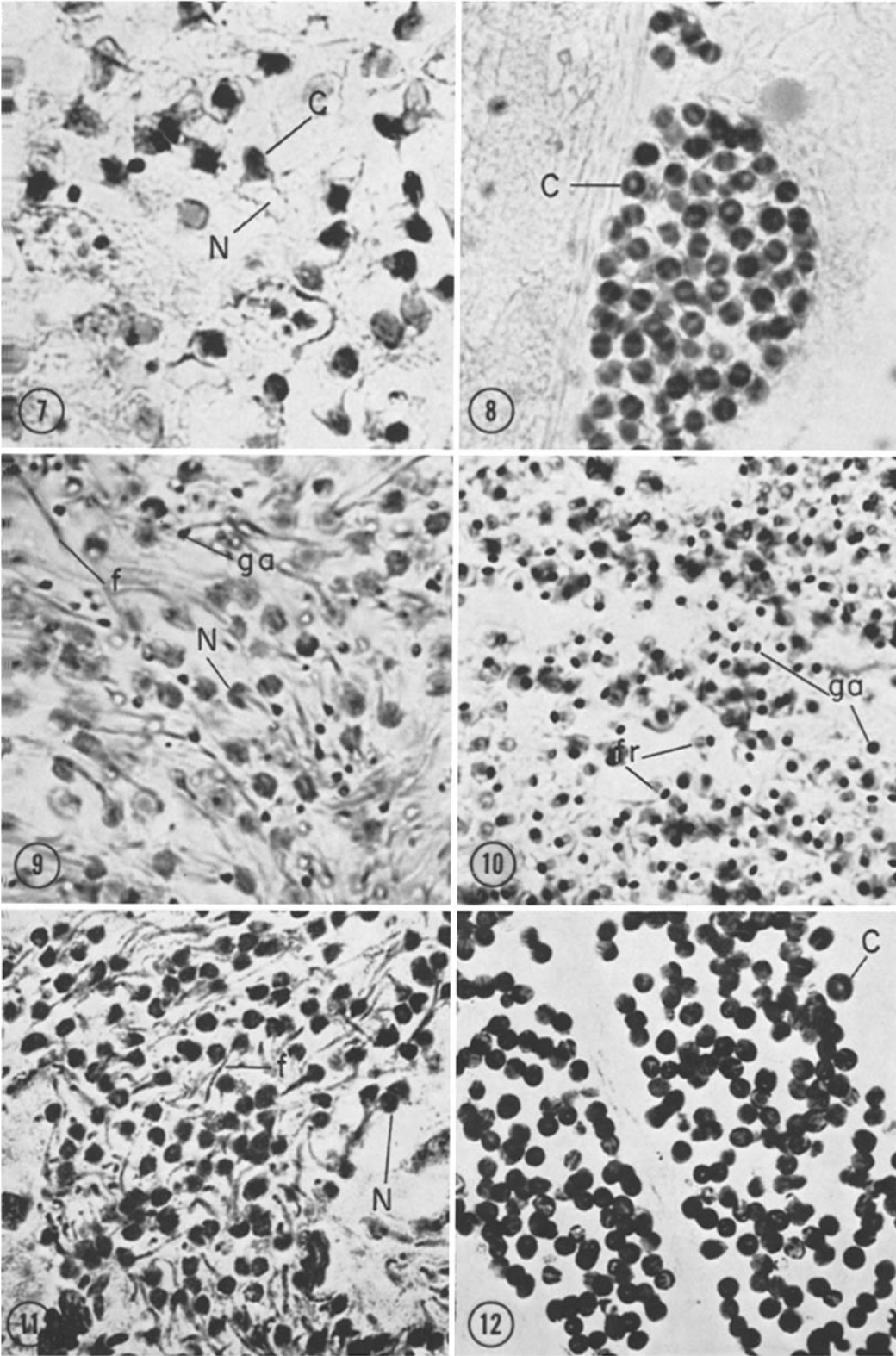
FIGURE 8 Même réaction chez le crabe *Carcinus maenas*. $\times 900$.

FIGURE 9 Détection des protéines basiques par la méthode de Bloch et Hew à l'éosine Y à pH 8,2 chez la langoustine *Nephrops norvegicus*. $\times 900$.

FIGURE 10 Même réaction chez le crabe. $\times 900$.

FIGURE 11 Détection des protéines basiques par la méthode de Black et Ansley chez la langoustine. $\times 900$.

FIGURE 12 Même réaction chez le pagure. $\times 900$.



de radicaux sulfhydriles. Le tryptophane est absent des formations considérées.

Toutes les tentatives de détection du fer se sont soldées par des échecs.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

De nombreux travaux ont montré la présence de protéines basiques (histones ou protamines) dans les noyaux des tissus les plus variés aussi bien d'origine animale que d'origine végétale (9, 12, 23, 38).

Récemment, des protéines basiques ont été détectées dans le cytoplasme soit au moyen des techniques biochimiques soit par les méthodes cytochimiques. Butler et collab. (13), Setterfield et collab. (42) ont ainsi montré la présence de protéines basiques au niveau des ribosomes, en association avec leur RNA.

La majorité des travaux effectués à l'aide des techniques cytochimiques, signalant la présence de protéines basiques extranucléaires, ont trait à des études relatives à l'ovogenèse. Cowden a obtenu dans le cytoplasme des ovocytes de limace une réaction positive au fast green, réaction qu'il considéra par suite comme non spécifique. Taleporos (47) signale la présence d'histone et d'une petite quantité de protamine dans le cytoplasme de l'oeuf de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*; ces protéines disparaissent du reste durant les premiers stades du développement embryonnaire. Pour Taleporos, leur présence doit être mise en parallèle avec l'existence de DNA cytoplasmique. Horn (24) a également détecté la présence de protéines basiques dans le cytoplasme des ovocytes d'amphibiens ainsi que dans les blastomères issus des premières mitoses de segmentation au niveau des plaquettes vitellines. Plus récemment, Davenport et Davenport (17, 18) ont retrouvé une protéine basique dans le cytoplasme des jeunes ovocytes d'ascidies et de mollusques, protéine associée au RNA.

Alfert et Goldstein ont mis en évidence une protéine basique associée au RNA dans le cytoplasme de *Tetrahymena*. Horn et Ward (25) obtiennent par le fast green une intense coloration du cytoplasme des cellules des glandes salivaires des larves de *Drosophila virilis*, en rapport avec une abondante quantité d'arginine cytochimiquement décelable. Enfin, Whitfield et Youdale (48) détectent par une variante de la méthode d'Alfert et Geschwind des protéines basiques cytoplasmiques associées au RNA des fibroblastes de souris à

croissance rapide. Spicer et Lillie (44) et Spicer (43) ont pu mettre en évidence une protéine basique associée aux polysaccharides acides des sécrétions muqueuses. Signalons également les observations de Personne (37) relatives au dérivé mitochondrial de la testacelle; dans cette formation, l'auteur signale la présence de protéines basiques qui se sont révélées comme étant des cytochromes. Sud (45, 46) étudiant la composition cytochimique du corps chromatoïde de la couleuvre *Natrix natrix* conclue à la présence de protéines basiques associées à du RNA; cette formation disparaît au cours de la spermiogenèse.

De nombreux travaux ont étudié l'évolution des protéines basiques nucléaires au cours de la spermiogenèse (2, 5, 6, 7, 30), mais celles-ci sont toujours liées au DNA et les modifications qu'elles subissent affectent leur teneur en arginine (synthèse d'histones enrichies en arginine ou de protamines).

Une protéine acide, l'ascaridine, a été décrite dans le cône réfringent des spermatozoïdes aberrants de l'*Ascaris* (35).

Nous avons donc mis en évidence pour la première fois (14-16) des protéines basiques extranucléaires dans ce qui est souvent interprété comme l'homologue d'un acrosome de spermatozoïde flagellé (10). Depuis, Bloch (5) a signalé également la présence de protéines basiques dans le spermatozoïde du crabe *Emerita analoga*, tout à fait analogues à celles détectées chez les trois espèces que nous avons étudiées. La capsule du spermatozoïde des décapodes apparaît donc comme une formation originale, des protéines basiques n'ayant jamais été détectées, au moins jusqu'à maintenant dans des acrosomes de spermatozoïdes flagellés. Il est également intéressant de noter que ces protéines basiques sont libres; elles ne sont pas associées à un acide nucléique (DNA ou RNA) comme c'est le cas en général, ni à un polysaccharide acide (43, 44). En effet, les polysaccharides intracapsulaires sont des polysaccharides neutres et, de toute façon, occupent dans la capsule des situations différentes de celles occupées par les protéines basiques.

Les techniques révélant ces protéines en faisant appel à une réaction de désamination oxydative (alloxane- et ninhydrine-Schiff) donnent des colorations relativement modérées. D'autre part, les groupements responsables de leur acidophilie à pH alcalins résistent aux tentatives de désamination et d'acétylation réalisées durant des temps connus

pour bloquer les groupes ϵ -amino de la lysine: au bout d'une heure de tels traitements, sur notre propre matériel, les histones somatiques (histones des noyaux des cellules des canaux déférents et des cellules somatiques intratesticulaires) ainsi que les histones des noyaux des cellules germinales jusqu'au stade spermatide ont perdu leur pouvoir de fixer les colorants acides à pH alcalin. Par contre, pendant les mêmes temps, les protéines basiques intracapsulaires conservent leurs propriétés acidophiles.

En certains sites tout au moins, de l'arginine a été détectée (granules apicaux de la langoustine et du crabe), ceci expliquant la résistance de ces sites aux essais de désamination et d'acétylation. Par contre, il ne nous a pas été possible de détecter d'arginine chez le pagure; cependant, les protéines basiques présentes en abondance dans la capsule

des spermatozoïdes de cette espèce résistent également aux tentatives de blocage des radicaux acidophiles.

L'absence de fer, même masqué, ne plaide pas en faveur de l'hypothèse de l'analogie de ces protéines avec des cytochromes.

Résistant à l'hydrolyse trichloracétique des nucléoprotéines, les protéines basiques détectées sont probablement des histones libres, enrichies en arginine au moins au niveau des granules apicaux. Plusieurs fractions de protéines basiques existeraient donc dans la capsule des spermatozoïdes des crustacés décapodes. Nous proposons de donner le nom général de "décapodine" à ces protéines basiques nouvellement décrites. Le problème de leur origine fera l'objet d'une publication ultérieure.

Received for publication 14 June 1966.

BIBLIOGRAPHIE

- ALFERT, M. 1956. Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2:109.
- ALFERT, M., et I. GESCHWIND. 1953. A selective method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 39:991.
- BLACK, M. M., et H. R. ANSLEY. 1964. Histone staining with ammoniacal silver. *Science.* 143: 693.
- BLACK, M. M., et H. R. ANSLEY. 1966. Histone specificity revealed by ammoniacal silver staining. *J. Histochem. Cytochem.* 14:177.
- BLOCH, D. P. 1966. Cytochemistry of the histones. *Protoplasmatologia.* 5:56.
- BLOCH, D. P., et S. D. BRACK. 1964. Evidence for the cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermiogenesis in the grasshopper, *Chortophaga viridifasciata* (De Geer). *J. Cell Biol.* 22:327.
- BLOCH, D. P., et H. Y. C. HEW. 1961. Methods for the cytochemical characterization of nuclear basic proteins and their application to problems of development. *Ann. Histochem.* 6: 497.
- BLOCH, F. 1935. Contribution à l'étude des gamètes et de la fécondation chez les Crustacés Décapodes. *Trav. Sta. Zool. Wimereux.* 12:185.
- BONNER, J., et P. O. P. Ts'o. 1964. The Nucleohistones. Holden-Day, Inc., San Francisco.
- BOWEN, R. H. 1925. Further notes on the acrosome of the animal sperm. The homologies of the non-flagellate sperms. *Anat. Record.* 31:201.
- BROWN, G. G. 1966. Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the Decapod *Callinectes sapidus*. *J. Ultrastruct. Res.* 14:425.
- BUSCH, H. 1965. Histones and other nuclear proteins. Academic Press Inc., N. Y.
- BUTLER, J. A. V., P. COHN, et P. SIMSON. 1960. The presence of basic proteins in microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 38:386.
- CHEVAILLIER, P., et P. L. MAILLET. 1965. Structure et ultrastructure du spermatozoïde de la Langoustine, *Nephrops norvegicus* L. Colloque annuel de la Société Française de microscopie électronique, Marseille. *J. Microscopie.* 4:128.
- CHEVAILLIER, P., et P. L. MAILLET. 1965. Structure fine et constitution cytochimique du spermatozoïde de la Langoustine, *Nephrops norvegicus* L. (Crustacé Décapode). *J. Microscopie.* 4:679.
- CHEVAILLIER, P. 1966. Structure et constitution cytochimique de la capsule du spermatozoïde des Crustacés Décapodes. *Compt. Rend.* 262: 1546.
- DAVENPORT, R., et J. C. DAVENPORT. 1965. A cytochemical study of cytoplasmic basic proteins in the ascidian oocyte. *J. Cell Biol.* 25:319.
- DAVENPORT, R., et J. C. DAVENPORT. 1965. Cytoplasmic basic proteins in the oocytes of three species of Molluscs. *Exptl. Cell Res.* 39:74.
- FASTEN, N. 1914. Spermatogenesis of the American crayfish, *Cambarus virilis* and *Cambarus immunis* (?), with special reference to synapsis and the chromatoid bodies. *J. Morphol.* 25:587.
- FASTEN, N. 1918. Spermatogenesis of the Pacific

- Coast Crab, *Cancer magister* Dana. *Biol. Bull.* **34**:277.
21. FASTEN, N. 1924. Comparative studies in the spermatogenesis of various *Cancer* crabs. *J. Morphol.* **39**:47.
 22. FASTEN, N. 1926. Spermatogenesis of the black-clawed crab, *Lophopanopeus bellus* (Stimpson) Rathbun. *Biol. Bull.* **50**:277.
 23. FELIX, K., H. FISCHER, et A. KREKELS. 1956. Protamines and nucleoprotamines. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* **6**:2.
 24. HORN, E. C. 1962. Extranuclear histone in the Amphibian oocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **48**:257.
 25. HORN, E. C., et C. L. WARD. 1957. The localization of basic proteins in the nuclei of larval *Drosophila* salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **43**:776.
 26. KORNGUTH, S. E. 1965. Localization of a basic protein in the myelin of various species with the aid of fluorescence and electron microscopy. *J. Cell Biol.* **26**:157.
 27. LANGRETH, S. G. 1965. Ultrastructural observations on the sperm of the crab *Cancer borealis*. *J. Cell Biol.* **27**:56 A.
 28. LISON, L. 1960. Histochimie et cytochimie animales. Gauthier-Villars, Paris.
 29. McLEISH, L., L. G. E. BELL, L. F. LA COUR, et J. CHAYEN. 1957. The quantitative cytochemical estimation of arginine. *Exptl. Cell Res.* **12**:120.
 30. MONESI, V. 1964. Autoradiographic evidence of a nuclear histone synthesis during mouse spermiogenesis in the absence of detectable quantities of nuclear ribonucleic acid. *Exptl. Cell Res.* **36**:683.
 31. MOSES, M. J. 1961. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*). I. Structural characterization of the mature sperm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**:222.
 32. MOSES, M. J. 1961. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*). II. Description of stages. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**:301.
 33. NATH, V. 1942. The Decapod sperm. *Trans. Natl. Inst. Sci. India.* **2**:87.
 34. NATH, V. 1956. Cytology of spermatogenesis. *Intern. Rev. Cytol.* **5**:395.
 35. PANIJEL, J. 1951. Metabolisme des nucléoprotéines dans la gamétogenèse et la fécondation. Hermann et Cie, Paris.
 36. PEARSE, A. G. E. 1960. Histochemistry theoretical and applied. J. & A. Churchill, London.
 37. PERSONNE, P. 1965. Etude cytochimique du dérivé mitochondrial du spermatozoïde de la Testacelle: recherche des protéines et des lipides. *J. Microscopie.* **4**:627.
 38. PHILLIPS, D. M. P. 1962. The histones. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* **12**:211.
 39. POCHON-MASSON, J. 1965. Schéma général du spermatozoïde vésiculaire des Décapodes. *Compt. Rend.* **260**:5093.
 40. POCHON-MASSON, J. 1965. Schéma du spermatozoïde dévaginé de *Homarus vulgaris* (Décapode Macroure). *Compt. Rend.* **260**:5352.
 41. RATHNAVATHY, C. K. 1941. The spermatogenesis of *Clibanarius olivaceus* Henderson. *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B.* **13**:379.
 42. SETTERFIELD, G., J. M. NEELIN, E. N. NEELIN, et S. T. BAYLEY. Studies on basic proteins from ribosomes of buds of pea-seedlings. *J. Mol. Biol.* **2**:416.
 43. SPICER, S. S. 1962. Basic protein visualized histochemically in mucinous secretions. *Exptl. Cell Res.* **28**:480.
 44. SPICER, S. S., et R. D. LILLIE. 1961. Histochemical identification of basic proteins with Biebrich scarlet at alkaline pH. *Stain Technol.* **36**:365.
 45. SUD, B. N. 1961. Histochemistry and significance of the chromatoid body in spermatogenesis of the grass-snake, *Natrix natrix*. *Biochem. J.* **78**:16.
 46. SUD, B. N. 1961. Morphological and histochemical studies of the chromatoid body in the grass-snake, *Natrix natrix*. *Quart. J. Microscop. Sci.* **102**:51.
 47. TALEPOROS, P. 1959. Cytoplasmic "histones" and "protamines" in the egg of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Histochem. Cytochem.* **7**:322.
 48. WHITFIELD, J. F., et T. YOUNDALE. 1965. The demonstration of cytoplasmic basic proteins in strain L mouse fibroblasts. *Exptl. Cell Res.* **40**:421.
 49. WORLEY, E. K. 1939. A study of the sperm-forming components in three species of Decapoda (*Pagurus pollicaris* Say, *Homarus americanus* Milne-Edwards, and *Libinia emarginata* Leach). *La Cellule.* **48**:149.
 50. YASUZUMI, G. 1960. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. VII. Spermatid differentiation in the crab, *Eriocheir japonicus*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**:73.