LA SPERMATOGENÈSE DE *POECILIA RETICULATA*

I. — ESTIMATION DU NOMBRE DE GÉNÉRATIONS GONIALES ET RENDEMENT DE LA SPERMATOGENÈSE

R. BILLARD

avec la collaboration technique de Anne-Marie ESCAFFRE

Station centrale de Physiologie animale,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

L'étude anatomique du testicule de *Poecilia reticulata* a permis d'identifier des tubules séminifères à l'intérieur desquels se déplacent des cystes qui sont des groupes de cellules isogéniques à développement synchrone entourés de cellules de Sertoli. A la fin de la spermatogenèse, chaque cyste forme un spermatozeugme qui se déverse dans un canal testiculaire. La partie de la spermatogenèse qui se déroule à l'intérieur de cystes dure 36 jours avec un rendement final de l'ordre de 65 p. 100 et compte 14 générations spermatogoniales.

INTRODUCTION

La plupart des Poissons Téléostéens cyprinodontiformes présentent une activité sexuelle continue au cours de l'année, ce qui les distingue des autres Téléostéens à cycle reproducteur annuel marqué. La gonade des Poissons de ce groupe est impaire et se trouve localisée dans la cavité générale au-dessous de la vessie natatoire. Cependant, chez le guppy *Lebistes reticulatus* = *Poecilia reticulata* PETERS au cours de l'embryogenèse, deux ébauches peuvent être identifiées (GOODRICH et *al.*, 1934) et cette origine double se traduit encore chez le mâle adulte par la forme bilobée du testicule. Chez *Platy-poecilus*, CHAVIN et GORDON (1958) notent que le lobe gauche est plus gros que le lobe droit.

A l'intérieur des testicules, les spermatogonies sont disposées à la périphérie et les spermatozoïdes au centre. Les spermatogonies ont été décrites par VAUPEL (1929) chez *Lebistes reticulatus* et GEISER (1924) chez *Gambusia*. Ces deux auteurs n'identifient morphologiquement que 2 à 3 types de gonies, mais GEISER (1922) signale

qu'il y a 5 à 13 000 spermatozoïdes par spermatozeugme, ce qui implique 10 à 12 divisions goniales. SHARMA et *al.* (1960) notent des différences morphologiques dans les chromosomes métaphasiques des différentes générations goniales ; les chromosomes sont allongés au début et plus contractés lors des dernières divisions.

Tous les auteurs ont identifié les différentes étapes de la prophase méiotique qui est comparable au schéma classique. Cependant, VAUPEL (1929), SHARMA et *al.* (1940) signalent chez *Lebistes*, immédiatement après le pachytène, un « stade diffus » au cours duquel les chromosomes perdent leur colorabilité. Au cours de la spermiogenèse, VAUPEL (1929) note l'absence d'acrosome, ce que PORTE et FOLLENIUS ont confirmé en microscopie électronique. Au contraire, VASISHT (1954) signale la présence d'acrosome chez *Lebistes*, *Gambusia* et *Xiphophorus* mais les preuves apportées par cet auteur ne sont pas convaincantes. Les spermatozoïdes restent groupés en paquets de structure caractéristique appelés spermatozeugmes qui ne présentent pas d'enveloppe externe à la différence des spermatophores (PHILIPPI, 1909).

Le travail présent envisage :

- l'anatomie du testicule de *Poecilia reticulata* ;
- la description morphologique et biométrique des différents types cellulaires de la spermatogenèse ;
- une évaluation du nombre de générations spermatogoniales se déroulant à l'intérieur des cystes ;
- et le rendement de la spermatogenèse.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Les guppies proviennent d'une souche élevée au laboratoire. Les animaux utilisés sont adultes, âgés de plus de 5 mois, élevés à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, éclairés pendant 12 heures par jour à l'aide de tubes fluorescents « blanc super », donnant une intensité lumineuse de 400 lux au fond de chaque aquarium dont la hauteur est de 15 cm et la contenance de 15 litres. L'eau, non courante, renouvelée par moitié tous les mois est aérée en permanence et contient des plantes aquatiques et des limnées. Les animaux reçoivent quotidiennement une alimentation constituée de 60 p. 100 de daphnies séchées et moulues, de 30 p. 100 de « tetramin » du commerce et de 10 p. 100 d'un granulé pour alevin de Truite « SARB » contenant 55 p. 100 de protéines.

Méthodes

Méthodes histologiques.

Les mâles sont sacrifiés après anesthésie et les testicules prélevés immédiatement sont fixés pendant au moins 4 jours dans le fixateur Bouin-Hollande, soit *in toto*, soit après isolement des tubules séminifères dans de l'eau physiologique à 8 p. 1 000. Les tubules sont coupés longitudinalement après double inclusion gélase-paraffine, un soin tout particulier est apporté à la réalisation des coupes sériees dont l'épaisseur de 5 μ doit être constante pour permettre le comptage des cellules appartenant à un même cyste. Les coupes sont colorées par la réaction de Feulgen (hydrolyse dans HCL, 10 minutes à 58-60°C).

Méthodes biométriques et statistiques.

Sur 100 tubules prélevés sur 3 mâles différents, les méthodes biométriques suivantes ont été utilisées :

- mesures du diamètre de cellules ou de cystes réalisées à l'aide d'un micromètre oculaire ou à dédoublement d'image (grossissement 2 500) ;

— numérations de cellules par cyste faites sur coupes sériées.

La répartition des cellules n'étant pas toujours homogène dans un cyste, il est nécessaire d'effectuer les comptages sur toutes les coupes intéressant le cyste.

Le nombre total de fragments nucléaires (A) comptés dans 1 cyste est corrigé selon la formule de MARRABLE (1962) :

$$N = A \frac{E}{E + (D - 2K)}$$

N = nombre corrigé

E = épaisseur de la coupe

D = diamètre du noyau

K = facteur de correction correspondant au diamètre de la fraction de noyau qui échappe aux comptages

k = 1, 725 μ pour les gonies et les spermatocytes I

k = 1 pour les spermatides et les spermatocytes II (dans ce cas, N = A)

Les spermatozeugmes obtenus dans les conditions précisées par ailleurs (BILLARD, 1969 a) sont étalés sur lames quadrillées dans de l'eau physiologique à 10 p. 1 000 où ils sont dissociés par agitation. Après séchage des lames, les spermatozoïdes sont comptés en microscopie à contraste de phase.

Les intervalles de confiance des moyennes $\bar{x} \pm t \sqrt{\frac{S^2}{n}}$ sont figurés sur les graphiques. Les comparaisons de moyennes sont faites par le test t ou l'analyse de variance.

RÉSULTATS

1. Structure du testicule

La figure 1 schématise l'organisation générale du testicule. Dans chaque lobe, à partir d'une cavité centrale importante, rayonne un grand nombre de tubules (photo 1 a) dont les extrémités distales, aveugles, s'orientent vers la périphérie et plus particulièrement vers les vaisseaux sanguins. Les tubules, dont le nombre moyen compté sur 50 mâles après microdissection est de $246 \pm 12,7$, communiquent avec la cavité centrale (qualifiée de canal testiculaire (VAUPEL 1929; DULZETTO, 1934), par un court canal qui présente un épithélium primatique fortement sécréteur et qui peut être appelé canal éfférent. L'aspect de l'épithélium de ce canal éfférent est très différent de celui du tubule et du canal testiculaire (photo 2).

FIG. 1. — Schéma du testicule de *Poecilia* adulte

La surface pointillée correspond au canal testiculaire qui est rempli de spermatozeugmes

Les 2 canaux testiculaires qui occupent presque toute la longueur du testicule se jettent postérieurement dans un canal unique qui correspond au canal déférent, tapissé intérieurement par un épithélium sécréteur et entouré à l'extérieur par du tissu conjonctif et des fibres musculaires lisses. Le canal déférent débouche au niveau d'un sinus urogénital par un sphincter.

2. Les types cellulaires

a) Les spermatogonies.

A l'extrémité aveugle des tubules il existe un groupe de spermatogonies de taille différente, caractérisées par un noyau de grande taille 8-10 μ , un seul nucléole à peu près central et quelques filaments de chromatine qui rayonnent vers la périphérie (photo 1 b). Ces spermatogonies ne sont pas organisées en cystes et leurs divisions ne sont pas synchrones (photo 6). Cette zone du tubule avec des spermatogonies « libres », est qualifiée d'apex et ne sera pas analysée ici.

Immédiatement au-dessous de l'apex, il est quelquefois possible d'identifier une seule gonie entourée par une cellule de Sertoli (photo 7) ce qui correspond sans doute au point de départ d'un cyste. Au-delà se succèdent une série de cystes de taille croissante. Les générations spermatogoniales dont le nombre sera discuté plus loin et qui sont groupées dans ces cystes ne peuvent pas être identifiées morphologiquement. Il existe toujours un ou plusieurs nucléoles qui sont progressivement masqués par la chromatine dont la densité augmente avec les générations.

FIG. 2. — Évolution de la taille du noyau des cellules germinales au cours de la spermatogénèse

- diamètre nucléaire
- longueur du plus grand axe des spermatides et spermatozoïdes
- ◐ diamètre orthogonal maximum correspondant

La taille des spermatogonies diminue régulièrement au cours de la phase de multiplication (fig. 2). La taille moyenne des gonies finales est particulièrement faible (3,25 μ). Par contre, la taille des cystes contenant ces différentes générations augmente progressivement (fig. 3). Les premières générations peuvent donc être identifiées par la taille des noyaux et les dernières par la taille des cystes. Sur ces cystes, la plus grande longueur est perpendiculaire à l'axe du tubule pour les premières générations spermatogoniales et parallèle pour les autres cystes (photo 16).

FIG. 3. — Évolution du diamètre des cystes au cours de la spermatogénèse

- diamètre maximum
- diamètre orthogonal correspondant
- le nombre de mesures dans chaque cas varie de 30 à 50
- T₁ spermatozeugmes dans le canal éférent
- T₂ spermatozeugmes dans le canal testiculaire
- T₃ spermatozeugmes éjaculés

b) Les spermatocytes.

Les spermatocytes leptotène se différencient des gonies finales par une plus grande taille du noyau et sont repérables par l'individualisation de filaments chromosomiques, mais plusieurs amas de chromatine subsistent (photo 3). Le zygotène se traduit par un épaississement des chromosomes (photo 4), qui se contractent fortement au pachytène. A ce moment, le cytoplasme est très clair (photo 5). Le diplotène se caractérise par une accumulation périphérique des chromosomes (photo 8 b). Les spermatocytes II apparaissent le plus souvent avec des chromosomes contractés et il est fréquent de voir dans un même cyste le passage spermatocytes I diplotène-spermatocytes II (photo 8 a).

c) Les spermatides.

L'étude ultrastructurale de la spermiogénèse est présentée par ailleurs (BILLARD, 1969 c) et seules les principales étapes aisément identifiables en microscopie optique et utilisables pour une analyse quantitative sont présentées ici :

— S₁ (spermatides rondes). Pendant cette phase, la chromatine occupe d'abord tout le noyau (1^{re} période S₁ a) (photo 9). Le noyau prend ensuite l'allure d'une demi-sphère présentant une légère dépression au centre et qui apparaît sur coupe, sous une forme de croissant — (photo 10) (2^e période S₁ b). Puis le noyau s'allonge et selon l'angle de coupe on se trouve en présence de cercle ou de bâtonnets à l'intérieur des cystes (photo 11) (3^e période S₁ c).

— S₂ (spermatides allongées). Le noyau se creuse d'une gouttière longitudinale et dans les cystes correspondants on est alors en présence de spermatides se présentant soit en forme de fer à cheval soit en forme de bâtonnets légèrement incurvés si la coupe est sagittale (photo 12).

— S₃ (spermatides lancéolées). L'allongement final du noyau aboutit à une forme caractéristique en fer de lance (photo 13).

— S₄ (spermatides insérées sur cellules de Sertoli). Au cours des phases S₂ et S₃ les spermatides s'orientent vers la périphérie et finalement viennent toutes se placer autour des cellules nourricières, la tête vers l'extérieur et les flagelles convergeant vers le centre sans qu'il soit possible de délimiter au microscope optique la limite du cytoplasme de ces cellules de Sertoli. On peut distinguer 2 sous-périodes :

1. S₄ *a* élimination des gouttelettes de cytoplasme, qui glissent le long des flagelles (photo 14).

2. S₄ *b* le cytoplasme est complètement éliminé et les spermatides apparaissent toujours insérées en faisceaux autour des noyaux des cellules de Sertoli (photo 15 *a*). Sur coupe tangentielle favorable (photo 15 *b*), il est possible de compter le nombre de spermatides de chaque faisceau, soit $172 \pm 4,63$ ($n = 130$). Ce nombre varie à l'intérieur d'un même cyste mais aussi entre cyste d'un même mâle ou de mâles différents. Les spermatides ont perdu leur forme lancéolée et apparaissent comme des bâtonnets (photo 14 *b*).

d) *Les cellules de Sertoli.*

Les cellules de Sertoli, dont les rapports avec les cellules germinales font l'objet d'une étude spéciale (BILLARD, 1969 *b*), se rencontrent à l'intérieur même de l'apex (photos 1 *b* et 17) ; elles se retrouvent ensuite à la périphérie des cystes mais jamais à l'intérieur. Le noyau présente un nucléole central et de fines granulations de chromatine (photos 7 et 9 *c*), la forme aplatie et allongée tend à devenir sphérique pendant la spermiogénèse.

TABLEAU I
*Évolution du nombre de cellules de Sertoli entourant les cystes
au cours de la spermatogénèse*

Phases de la spermatogénèse	Nombre moyen de cellules de Sertoli par cyste	Nombre de cystes mesurés	
Génération spermatogoniales	G ₄	4,4 ± 0,77	8
	G ₅	5,9 ± 1,13	8
	G ₆	7,7 ± 0,76	10
	G ₇	10,1 ± 1,32	10
	G ₈	15,0 ± 1,21	10
	G ₉	19,6 ± 1,09	8
	G ₁₀	26,9 ± 2,66	8
	G ₁₁	40,7 ± 3,87	10
	G ₁₂	49,2 ± 5,51	12
	G ₁₃	70,4 ± 2,85	8
	G ₁₄	100,2 ± 12,44	6
	Leptotène	105,3 ± 10,14	6
	Zygotène	100,3 ± 10,00	10
	Pachytène	107,2 ± 14,37	6
Spermatocytes II	116,6 ± 10,29	6	
Spermatides	S ₁	136,2 ± 6,27	11
	S ₂	132,2 ± 5,11	11
	S ₃	121,8 ± 9,27	10
	S ₄	124,4 ± 4,62	15
Spermatozeugmes	0		

Le nombre de cellules de Sertoli présentes autour de chaque cyste (tabl. 1) augmente au cours de la spermatogenèse et diminue ensuite en même temps que le nombre de spermatides par cyste. Il existe une relation particulièrement marquée au niveau des spermatocytes et des spermatides entre le nombre de cellules germinales présentes dans un cyste et le nombre de cellules de Sertoli autour de ce même cyste (tabl. 2).

TABLEAU 2

Coefficient de corrélation r entre le nombre de cellules de Sertoli autour d'un cyste et le nombre de cellules germinales à l'intérieur de ce cyste

	Nombre de données	Nombre de cellules de Sertoli ($\bar{x}$)	Nombre de cellules germinales ($\bar{y}$)	r	Tests t et z
Spermatides	8	138,4	23 114	+ 0,77	significatif
Spermatocytes	20	103,8	6 088,6	+ 0,69	hautement significatif
G ₁₃	6	69,2	2 839,7	— 0,013	non significatif
G ₁₂	11	48,8	1 592,2	+ 0,59	id
G ₁₁	8	29	737,5	+ 0,57	id
G ₁₀	7	27,7	421,6	+ 0,58	id
G ₉	10	7,7	23,85	+ 0,19	id

La fin de la spermatogenèse correspond à la dégénérescence des cellules de Sertoli qui entourent le cyste ; il en résulte un spermatozeugme qui se trouve à la base du tubule et s'engage dans le canal éférent. Ces spermatozeugmes dont les spermatozoïdes sont disposés sur deux rangées concentriques sont plus petits que les cystes à spermatides et que les spermatozeugmes du canal testiculaire (fig. 3).

3. Résultats quantitatifs et interprétation

a) Nombre de générations spermatogoniales.

La répartition de la fréquence des cystes d'après leur nombre de cellules (fig. 4) fait apparaître une série de pics successifs correspondant aux générations spermatogoniales, aux spermatocytes I, spermatocytes II et spermatides. Les cystes à spermatogonies se distribuent selon 13 pics. Les pics correspondants aux dernières générations spermatogoniales sont parfaitement individualisés alors que les premiers pics ne sont pas totalement séparés. L'analyse quantitative ne porte que sur ces cystes de 2 cellules et plus, en raison des difficultés d'identifier les cystes à 1 cellule au microscope optique. Compte tenu de cette première génération il y a donc 14 générations spermatogoniales se déroulant à l'intérieur de cystes et qui sont numérotées de G₁ à G₁₄ sur les figures et tableaux.

b) Rendement.

Sachant que les cellules d'un même cyste résultent des divisions successives de la cellule identifiée dans le plus petit cyste, la connaissance du nombre moyen de

cellules par cyste (tabl. 3, col. 2) pour chaque pic de la figure 3, permet d'évaluer le rendement à chaque phase de la spermatogenèse (tabl. 3, col. 3). Le rendement de chaque division est de l'ordre de 90 à 100 p. 100, à l'exception de G_4 qui est plus faible et qui est responsable, intervenant au début, du rendement plus faible des divisions goniales, 76,3 p. 100 contre 98 p. 100 pour les spermatocytes I et 92 p. 100 pour la spermiogenèse. Le rendement final peut être calculé d'après le rapport entre le nombre de spermatozoïdes comptés par spermatozeugmes 21 769 et le nombre théorique de cellules qui devrait exister dans ce spermatozeugme si toutes les divisions avaient un rendement de 100 p. 100 (tabl. 3, col. 1). Ce rendement final est de l'ordre de 65 p. 100.

FIG. 4. — Distribution des cystes d'après le nombre de cellules par cystes

Les numéros G_2 - G_{14} correspondent aux numéros des générations spermatogoniales et les flèches indiquent le niveau du rendement théorique maximum pour chaque division (se reporter à la discussion).

c) Durée de la spermatogenèse.

La durée de l'intervalle leptotène – fin de la spermatogenèse a été exposée par ailleurs (BILLARD, 1968) et se trouve rappelée (tabl. 3, col. 5). Connaissant la fréquence relative des cystes appartenant à chaque étape de la spermatogenèse, comptée sur 100 tubules et la durée de certaines de ces étapes, il est possible d'évaluer à 36 jours la durée totale de la spermatogenèse se déroulant à l'intérieur de cystes.

La durée de chaque génération spermatogoniale (tabl. 3, col. 6) dont l'évaluation est fondée sur la fréquence relative des cystes, tend à diminuer au fur et à mesure des divisions, mais de façon irrégulière.

DISCUSSION

Structure du testicule

Le testicule apparaît constitué par des tubules, en continuité avec le canal testiculaire, dont l'extrémité aveugle est orientée vers la périphérie des gonades (fig. 1). Les cystes à l'intérieur desquels les cellules germinales se divisent, se déplacent dans les tubules et les spermatozeugmes se déversent et s'accumulent dans le canal testiculaire.

TABEAU 3
Tableau interprétatif des données quantitatives sur la spermatogenèse de Poecilia

	Nombre de cellules par cyste		Rendement des différentes phases	Fréquence relative des cystes	Durée de chaque phase en heure	
	Théorique (1)	Observé (2)			D'après marquage (5)	Calculée (6)
G ₁	1	1,97 ±	0,06	5,99		51,8
G ₂	2	3,87 ±	0,26	6,25		54,1
G ₃	4	6,35 ±	0,28	4,59		39,7
G ₄	8	12,71 ±	0,43	5,99		51,8
G ₅	16	24,37 ±	1,07	4,85		41,9
G ₆	32	49,4 ±	2,27	5,23		45,2
G ₇	64	99,8 ±	5,14	4,85		41,9
G ₈	128	185,7 ±	11,7	3,32		28,7
G ₉	256	405,8 ±	21,6	2,93		25,4
G ₁₀	512	784 ±	47,6	4,46		38,6
G ₁₁	1 024	1 596 ±	75,7	4,72		40,8
G ₁₂	2 048	3 086 ±	183	97		40,8
G ₁₃	4 096	6 045 ±	454	2,42		21,0
G ₁₄	8 192	6 021 ±	311	3,19	24 — 30	27,6
Leptotène.....	—	6 035 ±	254	3,83	24 — 30	33,1
Zygotène.....	—	5 922 ±	382	4,59	36 — 42	39,7
Pachytène.....	—	11 846 ±	437	1,27	4 — 6	11,0
Spermatocytes II.....	16 284	23 501 ±	1 150	6,12	42 — 54	53,0
S ₁	32 568	21 661 ±	2 478	5,99	48 — 60	51,8
S ₂	—	21 561 ±	2 246	5,73	48 — 60	49,6
S ₃	—	21 561 ±	2 246	8,93	60 — 72	77,2
S ₄	—	21 769 ±	1 118			
Spermatozoignes.....			101			

La relation entre les tubules et le canal testiculaire n'a jamais été décrite et DULZETTO (1933) imagine simplement que les cystes chez *Gambusia* localisés au milieu d'une trame conjonctive, migrent vers le centre au cours de leur maturation et que les spermatozeugmes passent dans le canal testiculaire en traversant la paroi par « diapédèse ». Par contre, cet auteur de même que L'ANGLER (1913) ont identifié le canal testiculaire et sa fonction de réceptacle séminal. COLLIER (1936), chez *Gambusia*, a signalé que le canal déférent rejoint postérieurement l'uretère et se trouve entouré, à partir de ce niveau, par un tissu conjonctif épais et quelques fibres élastiques. Un sinus urogénital qui s'organise au moment de la puberté a été identifié chez *Platypoecilus* par CHAVIN et GORDON (1951) alors que CHRISTMAN (1928) estime qu'il n'y a pas d'orifice urogénital chez *Lebistes* adulte, le conduit urinaire étant indépendant et plus postérieur que le conduit génital.

Spermatogenèse

Chez *Poecilia reticulata* la spermatogenèse progresse dans les tubules par groupes de cellules isogéniques à développement synchrone, les cystes, entourés de cellules de Sertoli qui disparaissent à la fin de la spermatogenèse, ce qui les différencie des cellules de Sertoli de la plupart des autres vertébrés qui sont permanentes. Cette situation semble être le cas général chez les Cyprinodontiformes et a été également rapportée par STANLEY (1966) chez deux poissons Élasmobranches.

Le nombre de 14 générations spermatogoniales évalué d'après la répartition des cystes selon leur nombre de cellules (fig. 4) est confirmé par le nombre de spermatozoïdes par spermatozeugme (tabl. 3, col. 2).

Les différents types cellulaires décrits par VAUPEL (1929) ont été identifiés à l'exception du « stade diffus ». Il est à noter qu'une telle disparition de la chromatine à la fin de la prophase méiotique a été niée chez l'Épinoche par MAKINO (1934). D'autres auteurs signalent des phases où la chromatine est diffuse : chez *Betta splendens* (BENNINGTON, 1936) et chez *Platypoecilus* (RALSTON, 1934). Les stades classiques de la prophase méiotique sont parfois difficiles à identifier et à rattacher aux types principaux représentés sur les photos et la figure 5. La petite taille des éléments germinaux et en particulier des spermatides rondes dont le diamètre nucléaire est de $2,5 \mu$ est à souligner. De telles dimensions ont été signalées chez *Platypoecilus* (CHAVIN et GORDON, 1951).

Le nombre moyen de cellules de Sertoli autour des cystes à spermatides varie de 121 à 136, ce qui est très différent du chiffre de 10 avancé par MELDEN (1950). L'augmentation du nombre de cellules de Sertoli fait supposer que ces cellules se multiplient, bien qu'aucune mitose n'ait jamais été décelée même après injection de colcémide. Il faut noter cependant que le noyau des cellules de Sertoli peut être marqué après injection de thymidine tritiée. Sachant qu'il existe 172 spermatides par cellule de Sertoli, on peut calculer le nombre de spermatides par cyste : $172 \times 124 = 21\,328$, et confirmer ainsi les comptages de spermatides sur coupes sériées et de spermatozoïdes sur frottis. Le nombre de spermatides par cellule de Sertoli sur $S_4 b$ n'étant pas caractéristique d'un cyste ou d'un mâle, il n'est pas possible d'utiliser cette valeur comme critère de rendement. Chez *Poecilia velifera* et *mexicana*, le nombre de spermatides groupées autour de chaque cellule de Sertoli serait plus faible — entre 80 et 100 — (RASCH, 1968).

Le nombre de cellules germinales dans un cyste est plus élevé lorsque le nombre de cellules de Sertoli entourant ce cyste est lui-même plus élevé ainsi que l'indiquent les coefficients de corrélation du tableau 1. On est donc en droit de penser que les cellules de Sertoli ont une importance dans le rendement spermatogénétique surtout au niveau des spermatocytes I et des spermatides. C'est également au cours de ces 2 phases que la forme des cellules nourricières se modifie et que leur volume tend à augmenter (BILLARD, 1969 *b*).

FIG. 5. — Schéma de la spermatogenèse chez *Poecilia reticulata*. La représentation des phases principales ne signifie pas que tous ces cystes sont simultanément présents dans un même tubule.

Le rendement final de la spermatogenèse, évalué à 65 p. 100 d'après le rapport entre les nombres réels et théoriques de spermatozoïdes par spermatozoeugme, ne tient pas compte des dégénérescences qui peuvent intervenir sur G₁ et G₂. Dans le cas de la disparition d'une cellule dans un cyste G₂ on se trouverait ramené à un cyste à une cellule qui n'est pas comptabilisé. Il en résulterait un décalage ; les cystes

seraient affectés à la génération précédente et les estimations de rendement s'en trouveraient faussées. Toutefois, les cellules en dégénérescence sont visibles à l'intérieur des cystes et 3 p. 100 seulement des cystes G_2 présentent une cellule en picnose, ce qui peut être considéré comme négligeable. En outre, un certain nombre de cystes en dégénérescence complète (2,5 p. 100) peuvent être repérés sans qu'il soit toutefois possible de définir sur quels cystes se sont produites les dégénérescences, mais leur localisation dans la partie antérieure du tubule permet de penser qu'elles interviennent surtout au cours des premières générations spermatogoniales (photo 16). Les disparitions totales de cystes, qui semblent peu fréquentes, échappent à l'analyse quantitative et les calculs proposés n'en ont pas tenu compte.

Il apparaît que chez *Poecilia reticulata*, le nombre particulièrement élevé de divisions spermatogoniales, associé à une durée de spermatogenèse relativement brève, est responsable, grâce à un rendement de 65 p. 100, de la forte production spermatogénétique constatée dans cette espèce : $150 \cdot 10^8$ spermatozoïdes par gramme de testicule frais et par jour (BILLARD, 1969 a).

CONCLUSIONS

Le testicule de *Poecilia reticulata* est constitué de tubules séminifères dont la partie aveugle est colonisée par des spermatogonies libres qui s'individualisent périodiquement pour donner des cystes dans lesquels a lieu la plus grande partie de la spermatogenèse. Les cystes progressent dans les tubules et au terme de leur évolution, se déversent dans le canal testiculaire sous forme de spermatozeugmes. La distribution de fréquence des cystes d'après leur nombre de cellules permet de conclure à l'existence de 14 générations spermatogoniales se déroulant à l'intérieur de cystes. L'identification morphologique n'est possible qu'au niveau des premières générations d'après la taille du noyau, mais la taille des cystes permet d'identifier les dernières générations.

La partie de la spermatogenèse se déroulant à l'intérieur de cystes dure 36 jours. Le rendement des multiplications goniales, 76,3 p. 100, est plus faible que celui de la prophase méiotique, 98 p. 100, et de la spermiogenèse, 92 p. 100, le rendement final étant de 65 p. 100. Au cours des deux dernières phases, le rendement de la spermatogenèse est meilleur lorsque le nombre de cellules de Sertoli est plus grand.

Reçu pour publication en décembre 1968.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié des conseils de Y. CLERMONT, M.-T. HOCHEREAU, R. ORTAVANT et C. THIBAUT. L'élevage des animaux a été assuré par B. BONICEL.

SUMMARY

THE SPERMATOGENESIS OF THE GUPPY « POECILIA RETICULATA ».

1. — ESTIMATION OF THE NUMBER OF GONIAL GENERATIONS
AND SPERMATOGENETIC YIELD

In the testis of the Guppy, the seminiferous elements are formed in a highly-branched system of 250 collecting tubules opening on two symmetrical longitudinal testicular ducts. The first gonial generations are packed in the blind end of each tubule. From this gonial cluster is drawn at regular intervals one spermatogonium entirely surrounded by a cytoplasmic extension of a single Sertoli cell. These bicellular units constitute the earliest spermatocyst stage. Investigations on the frequency distribution of cysts according to their cell numbers allowed us to distinguish 14 gonial generations.

The spermatocysts increase in size as they proceed through the seminiferous tubules, and eventually flow into the testicular ducts. The number of Sertoli cells enclosing each cyst increase depending on the size of cysts. The number of primary spermatocytes and spermatides is all the higher as the number of Sertoli cells is greater. This stresses the importance of the Sertoli cells in the spermatogenetic yield. The yields were 76 per cent for gonial cell divisions, 98 per cent for meiotic prophase, 92 per cent for spermiogenesis. The total spermatogenetic yield was 65 per cent.

Within the cysts, the earliest gonial generations last for 50 hours, the latest for 20 to 40 hours. The total duration of spermatogenesis is 36 days.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BENNINGTON M. L., 1937. Germ cell origin and spermatogenesis in Siamese fighting fish *Betta Splendens*. *J. Morph.*, **60**, 103-125.
- BILLARD R., 1968. Influence de la température sur la durée et l'efficacité de la spermatogenèse du Guppy *Poecilia reticulata*. *C. R. Acad. Sci.*, **266**, 2287-2290.
- BILLARD R., 1969 a. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. II. La production spermatogénétique. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **9**, sous presse.
- BILLARD R., 1969 b. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. III. Ultrastructure des cellules de Sertoli. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **9** (à paraître).
- BILLARD R., 1969 c. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. IV. Ultrastructure de la spermiogenèse. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **9**, (à paraître).
- CHAVIN W., GORDON M., 1951. Sex determinations in *Platypoecilus maculatus*. I. Differentiation on the gonads in members of all male broods. *Zoologica*, **36**, 135-143.
- CHRISTMAN G. C., 1928. *The morphology of the primary and accessory genital organs of certain poeciliidae*. Thèse Cornell Univ.
- COLLIER N., 1936. The mechanism of internal fertilization in *Gambusia*. *Copeia*, **1**, 45-53.
- DULZETTO F., 1933. La struttura del testicolo di *Gambusia holbrooki* (GRD) e la sua evoluzione in rapporto con lo sviluppo del gonopodio. *Arch. Zool. Ital.*, **19**, 405-437.
- GEISER S. W., 1922. Seasonal changes in the testes of *Gambusia affinis*: the top minnow (abstr.) *Anat. Rec.*, **23**, 104-105.
- GEISER S. W., 1924. Sex ratio and spermatogenesis in the top minnow *Gambusia holbrooki*. *Biol. Bull.*, **47**, 175-203.
- GOODRICH H. B., DEE J. E., FLYNN C. M., MERCER R. M., 1934. Germ cells and sex differentiation in *Lebistes reticulatus*. *Biol. Bull.*, **67**, 83-96.
- KIRTON K. T., DESJARDINS C., HAFS H. D., 1967. Distribution of sperm in male rabbits after various ejaculations frequencies. *Anat. Rec.*, **158**, 287-292.
- LANGER W. F., 1913. Beitrage zur morphologie der viviparen cyprinodontiden. *Morph. Jahrb.*, **57**, 193-307.
- MAKINO S., 1934. The chromosomes of the sticklebacks *Pungitius tymensis* (NIKOLSKY) and *P. pungitius* L.). *Cytologia*, **5**, 155-166.
- MARRABLE A. W., 1962. The counting of cells and nuclei in microtome sections. *J. Micr. Sci.*, **103**, 331-347.
- MELDEN A. B., 1950. Sperm formation in *Gambusia affinis*. *TEXAS J. Sci.*, **2**, 395-399.

- PHILIPPI E., 1909. Spermatophoren bei Fishen. *Verh. deutsch. Zool. Gesellsch*, **17**, 105-108.
- PORTE A., FOLLENIUS E., 1960. La spermiogenèse chez *Lebistes reticulatus*. Étude au microscope électronique. *Bull. Soc. Zool. France*, **85**, 82-88.
- RALSTON A. M., 1932. *Spermatogenesis of the top minnow Xiphophorus helleri, the mexican swordtail*. Thèse Northwestern Univ.
- RASCH E. M., 1968. Changes in fine structure during spermatogenesis in the viviparous teleost fish *Poecilia* (abstract). *J. Histochem. Cytochem.*, **16**, 515.
- SHARMA G. P. PARSHAD R., NAYYAR R.P., 1960. Chromosome number and meiosis in three species of fishes. *Res. Bull. Panj. Univ.*, **11**, 99-103.
- STANLEY H. P., 1966. The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). *Z. Zellforsch.*, **75**, 453-468.
- VASISHT M. S., 1954. Fish spermatogenesis with particular reference to the fate of the cytoplasmic inclusions. III. Spermatogenesis of Actinopterygii (Cyprinodontidae). *Res. Bull. Panj. Univ.*, **62**, 169-175.
- VAUPEL J., 1929. The spermatogenesis of *Lebistes reticulatus*. *J. Morph.*, **47**, 555-587.
- WOLF L. F., 1931. The history of the germ cells in the viviparous teleost *Platypoecilus maculatus*. *J. Morph.*, **52**, 115-153.
-

ABRÉVIATIONS UTILISÉES SUR LES PHOTOS

- A = apex des tubules
C. c. = cellules du canal testiculaire
C. E. = canal efférent
C. s. = cellules sécrétrices du canal efférent
C. t. = canal testiculaire
D = diplotène
e. p. = cellule de l'épithélium constituant la paroi du tubule
G_n = numéro de la génération spermatogoniale
L. s. = liquide séminal
P = Pachytène
S = cellule de Sertoli
S_n = étape de la spermiogenèse
spz = spermatozeugme
II = spermatocytes II
-

PLANCHE I

- PHOTO 1 a. — *Coupe longitudinale d'un tubule isolé de testicule de Guppy après microdissection et double inclusion géluse paraffine* (la coupe n'étant pas parfaitement sagittale, les cystes S₁ et S₄ apparaissent plus petits que le cyste Pachytème P, alors qu'ils sont, en réalité, plus gros) (× 160.)
- 1 b. — *Apex d'un tubule* : les spermatogonies de l'apex ne présentent qu'un seul nucléole, alors que dans le cyste immédiatement sous-jacent, 2 nucléoles peuvent être identifiés dans le noyau des spermatogonies G₂. Contraste de phase (× 650.)
- 2 a. — *Coupe dans un testicule de Guppy adulte* : les canaux efférents tapissés par des cellules produisant des sécrétions abondantes, débouchent dans le canal testiculaire. Les cellules de la paroi du canal testiculaire (c. t.) sont basses et ne sont pas sécrétrices. Les spermatozeugmes présents dans le canal testiculaire baignent dans un liquide très éosinophile sécrété par les cellules du canal efférent et qui peut être considéré comme un liquide séminal (L. s.) (+ 140.)
- 2 b. — *Détail montrant la disposition d'un spermatozeugme engagé dans le canal efférent et coupé transversalement selon son plus petit diamètre*. Les spermatozoïdes sont disposés sur 2 couches dont la plus externe est étroitement appliquée contre les cellules sécrétrices du canal efférent (× 330.)
- 3-4-5. — *Spermatocytes I* : successivement Leptotène, Zygotène, Pachytène.
- a. — *vue d'ensemble des cystes* (× 500)
- b. — *Détail des noyaux* (× 2 500)
- 3 b. — *la chromatine des spermatocytes Leptotène est encore très diffuse avec de nombreux amas et commence à s'organiser en filaments.*
- 4 b. — *Sur les spermatocytes Zygotène la chromatine se présente sous forme d'un réseau dense de filaments épais.*
- 5 b. — *Les filaments chromatiniens tendent à se contracter au Pachytène et le noyau diminue progressivement de taille, alors que les dimensions du cyste ne varient pas ; il s'ensuit un écartement des noyaux.*

PLANCHE II

- PHOTO 6 . — *Spermatogonies en division en 2 points différents d'un apex dans le testicule d'un jeune mâle. Seules 2 spermatogonies sur 10 sont en division dans cet apex. Contraste de phase ($\times 1\ 000$).*
- 7 . — *Individualisation d'un cyste G_1 ; le cytoplasme d'une cellule de Sertoli (S), entoure complètement une gonie venant de l'Apex situé immédiatement au-dessus. Contraste de phase ($\times 1\ 800$).*
- 8 a. — *A l'intérieur d'un cyste, passage des spermatocytes I diplotène aux spermatocytes II. La vague de division démarre à un pôle du cyste et progresse vers le pôle opposé. Il existe encore quelques spermatocytes Diplotène au milieu des spermatocytes II ($\times 500$).*
- 8 b. — *Spermatocytes diplotène caractérisés par la disposition périphérique de la chromatine ($\times 2\ 500$).*
- 9 . — *Cyste de spermatides rondes S_{1a} . La répartition des cellules n'est pas homogène à l'intérieur du cyste ($\times 500$).*
- 9 b. — *Spermatides rondes S_{1a} immédiatement après la division des spermatocytes II : des filaments de chromatine sont encore visibles ($\times 2\ 000$).*
- 9 c. — *Spermatides rondes S_{1a} plus âgées que les précédentes ; la chromatine est plus compacte. En bordure du cyste, la cellule de Sertoli (S) se différencie facilement, par son noyau ovoïde avec un nucléole central, de la cellule de l'épithélium constituant la paroi du tubule (c. p.) ($\times 1\ 500$).*
- 10 a. — *Cyste à spermatides en croissant S_{1b} . Le cytoplasme commence à glisser le long des flagelles vers le centre du cyste ($\times 500$).*
- 10 b. — *Le noyau qui a pris la forme d'une demi-sphère évidée en son centre, apparaît en coupe sous la forme d'un croissant ($\times 2\ 000$).*
- 11 a. — *Cyste à spermatides S_{1c} ($\times 500$) dont les noyaux se sont allongés prenant grossièrement l'allure de cylindres légèrement incurvés et qui apparaissent sous la forme de cercles ou de bâtonnets selon l'angle de coupe-11 b ($\times 2\ 000$).*

PLANCHE III

- PHOTO 12 a. — Cyste à spermatides allongées S_2 . Les spermatides se disposent en travées, la tête orientée vers la périphérie du cyste ($\times 500$).
- 12 b. — Détail de ces spermatides qui ont en coupe longitudinale l'allure de fer à cheval ($\times 2\ 000$).
- 13 a. — Cyste à spermatides en fer de lance S_3 ($\times 500$).
- 13 b. — Le noyau prend une forme en pointe, ce qui le différencie de celui de la phase précédente ($\times 2\ 000$).
- 14 a. — Spermatides insérées sur cellules de Sertoli S_{4a} , toutes les spermatides ont migré à la périphérie du cyste et se disposent sur une seule couche continue. Le cytoplasme, sous forme de gouttelettes s'écoule le long des flagelles vers le centre du cyste ($\times 500$).
- 14 b. — La spermatide a pris une forme plus effilée et l'encoche nucléaire visible durant les 2 phases précédentes a presque complètement disparu. Cette forme est conservée par les spermatozoïdes ($\times 2\ 000$).
- 15 a. — Spermatides insérées sur cellules de Sertoli S_{4b} : les têtes spermatiques paraissent se regrouper autour des noyaux des cellules de Sertoli et il n'y a plus de cytoplasme le long des flagelles ($\times 500$).
- 15 b. — Coupe tangentielle de cyste S_{4b} montrant la disposition des cellules de Sertoli autour du cyste. Les spermatozoïdes sont insérés sur toute la surface de la cellule, sauf au niveau des limites cellulaires des cellules de Sertoli ($\times 700$).
- 16 a. — Coupe longitudinale de la partie antérieure d'un tubule montrant la disposition des cystes à spermatogonies : le plus grand axe des cystes est perpendiculaire à l'axe du tubule pour les premières générations spermatogoniales ($\times 300$).
- 16 b. — Détail de l'apex montrant un cyste en dégénérescence (c. d.) ($\times 100$).