Evolution ultrastructurale des cellules germinales fœtales jusqu'aux spermatogonies adultes chez le singe *Macaca fascicularis*

J.-P. FOUQUET

Université P. et M. Curie, Laboratoire de Physiologie
de la Reproduction des Vertébrés, Bât. A, 6^e étage,
4, place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05.

Summary. *Ultrastructural evolution of the germinal line of the crab-eating macaque, Macaca fascicularis, from foetal gonocytes to adult spermatogonia.*

Ultrastructural changes in the spermatogonial line of the macaque, *Macaca fascicularis*, were studied during foetal development (from day 37), childhood and puberty. The different cell types and their distinctive morphological characteristics have been identified by studying adjacent thick and thin sections under light and electron microscopy.

The main criteria used were : organization of the rough endoplasmic reticulum (RER) and its relation to mitochondria, chromatin distribution, stainability and perichromatin granule content, nucleolar organization and differentiation of the nuclear membrane including the lamina and nuclear vacuoles or cisternae. According to their ultrastructure, the following main cell classes were distinguished : gonocytes (37 to 43-day foetuses), prespermatogonia (50 to 110-day foetuses), pale type A (Ap) and dark type A (Ad) adult-type spermatogonia which differentiated progressively in 120 to 140-day foetuses. During childhood, the testis contained only Ap and Ad spermatogonia. At the onset of meiosis (about 48 months after birth), type B spermatogonia appeared, and the different classes of spermatogonia were found lying directly on the basal lamina of the sex cords. The filiation of the spermatogonial line during development has been discussed.

Introduction.

Les spermatogonies du testicule des mammifères adultes et leur mode de renouvellement sont bien connus grâce à l'histologie classique (Clermont, 1972). L'ultrastructure de ces cellules a été décrite chez les rongeurs et les mammifères domestiques (Dym et Fawcett, 1971), les singes (Cavicchia et Dym, 1978, Dym et Cavicchia, 1978) et l'homme (Rowley *et al.*, 1971). Les spermatogonies proviennent de la multiplication et de l'évolution de cellules germinales fœtales que l'on classe dans l'ordre en : cellules germinales primordiales (PGC), gonocytes et pré-spermatogonies (Bustos-Obregon *et al.*, 1975 ; Ortavant *et al.*, 1977 ; Gondos, 1977 ; Wartenberg, 1981). L'évolution ultrastructurale des cellules germinales

chez le fœtus et (ou) le jeune a été étudiée chez l'homme (Wartenberg *et al.*, 1971 ; Gondos et Hobel, 1971 ; Fukuda *et al.*, 1975), le mouton (Courot, 1971), le porc (Pelliniemi, 1976), le rat (Eddy, 1974 ; Mauger et Clermont, 1974), la souris (Clark et Eddy, 1975), le lapin (Gondos et Conner, 1973 ; Gondos *et al.*, 1973) pour ne citer que quelques exemples.

Ces travaux montrent que les spermatogonies de type adulte apparaissent généralement après la naissance. Ils permettent de retracer la chronologie de l'évolution de la lignée des spermatogonies mais la filiation des différents types cellulaires demeure incertaine.

L'objectif de ce travail est donc de décrire l'évolution ultrastructurale de la lignée des spermatogonies au cours du développement fœtal et postnatal chez *Macaca fascicularis*, afin de préciser la chronologie et les modalités de la différenciation des spermatogonies de type adulte. Des critères de filiation des différents types cellulaires ont été recherchés.

Matériel et méthodes.

Tous les testicules étudiés proviennent de singes *Macaca fascicularis* élevés en captivité. Quarante-deux fœtus d'âge connu (37-150 jours) ont été prélevés par césarienne (Dang et Fouquet, 1979), leurs testicules ont été découpés et fixés par immersion dans du glutaraldéhyde 1-2,5 p. 100 (1 p. 100 glutaraldéhyde + 1 p. 100 paraformaldéhyde dans quelques cas) en tampon cacodylate 0,125 M, pH 7,4. Des fragments de testicule de 12 singes impubères âgés de 5 jours à 41 mois ont également été fixés par immersion dans un mélange glutaraldéhyde 2,5 p. 100-paraformaldéhyde 2,5 p. 100 en tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,4. Les testicules de 4 singes prépubères d'environ 48 mois avec présence de spermatocytes et (ou) de spermatides rondes et de 4 adultes (2 de 53 et 54 mois, 2 d'âge inconnu) ont été perfusés par l'artère testiculaire avec le mélange précédent. Dans tous les cas, les blocs ont été postfixés par OsO_4 1-2 p. 100 dans le même tampon, déshydratés et inclus en Epon. L'évolution testiculaire a été surveillée sur coupes épaisses (0,5-1 μm) colorées au bleu de toluidine et examinées avec un microscope à lumière. Les coupes fines sériées

PLANCHE I

- FIG. 1. — Aspect général d'un gonocyte (G) non encore encerclé par des futures cellules de Sertoli (S) dans un testicule d'un fœtus de 39 jours. Noter une légère dilatation de la citerne périnucléaire (→) au niveau d'un repli de l'enveloppe nucléaire. $\times 9\ 000$.
- FIG. 2. — Agrandissement de la figure 1 montrant le nucléole avec ses 3 composants : fibrillaire clair (fc), fibrillaire dense (fd) et granulaire (gr), la chromatine avec ses rares granules péri-chromatiniens (•) et des mitochondries à crêtes tubulaires et lamellaires. $\times 20\ 000$.
- FIG. 3. — Préspermatogonies (P) complètement encerclées par les futures cellules de Sertoli (S), chez un fœtus de 71 jours : vacuoles nucléaires (V), piles de citernes du REG (→). $\times 5\ 300$.
- FIG. 4. — Détail d'une vacuole nucléaire dans une préspermatogonie (fœtus de 82 jours) montrant son contenu filamenteux et sa membrane (mv) semblable à la membrane nucléaire interne (m ni). $\times 40\ 000$.

adjacentes ont été contrastées avec l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Venable et Coggeshall, 1965) et examinées au microscope électronique (Philips 201C ou JEM 100 B).

Résultats.

1) *Structure des cellules germinales primordiales (PGC) et des gonocytes : fœtus âgés de 37 à 43 jours.* — La différenciation de la crête génitale en testicule s'effectue au cours de cette période (Dang et Fouquet, 1979). A 37 jours, on observe donc encore, par définition, des PGC dans la crête génitale, puis, dans les jours suivants, des gonocytes progressivement inclus dans les cordons sexuels de l'ébauche du testicule. Les PGC et les gonocytes ont exactement la même organisation cytoplasmique et nucléaire (fig. 1). Ils sont plus grands et plus clairs que les cellules somatiques qui les entourent et les compriment plus ou moins (plus petit diamètre : 10-15 μm , plus grand diamètre : 20-25 μm) leur conférant ainsi une forme grossièrement sphérique souvent aplatie. Le noyau est irrégulièrement lobé ou déformé par de profondes invaginations de l'enveloppe nucléaire (fig. 1). Il possède 1 ou 2 grands nucléoles (plus grand diamètre : 3-4 μm) de type réticulé en position subcentrale, formés des 3 composants classiques : fibrillaire clair, fibrillaire dense, granulaire (fig. 2). La chromatine est finement granulaire, dispersée et claire, elle contient de rares mottes d'hétérochromatine et très peu de granules périchromatiniens. La membrane nucléaire interne porte une mince lamina (50-100 nm) et la citerne périnucléaire présente parfois de petites dilatations (fig. 1) où l'on détecte un matériel filamenteux. Ces petites dilatations localisées de l'enveloppe du noyau peuvent être interprétées comme les premiers signes de la différenciation des vacuoles nucléaires que l'on observe ultérieurement.

PGC et gonocytes ont un cytoplasme clair, pauvre en organites (fig. 1 et 2). On note la présence de polysomes dispersés, de quelques citernes solitaires de REG avec de rares prolongements lisses. Les dictyosomes sont petits et dépourvus de signes d'activité sécrétoire. Les mitochondries sphériques et dispersées au hasard possèdent des crêtes tubulaires et lamellaires. On observe en outre quelques gouttes lipidiques et des microtubules.

PLANCHE II

FIG. 5. — *Coupe semi-fine d'un testicule fœtal de 122 jours.* $\times 985$. La plupart des pré-spermatogonies (P) sont engagées dans la transformation en spermatogonies A et il existe déjà quelques spermatogonies de type Ap et At (intermédiaire entre Ap et Ad).

FIG. 6. — *Coupe fine adjacente de P en évolution* : absence de piles de citernes du REG, mitochondries groupées contre des citernes du réticulum endoplasmique ($\rightarrow$) ou des plaques denses ($\blacktriangleright$), structure du noyau inchangée (euchromatine très dispersée et vacuoles nucléaires V). $\times 10\,000$.

FIG. 7. — *Coupe fine adjacente de At*, même arrangement des mitochondries que dans la figure 6, par contre, le noyau possède une euchromatine plus finement serrée (riche en granules périchromatiniens $\blacktriangleright$) et une projection nucléaire (P). $\times 14\,000$.

2) *Evolution des gonocytes en préspermatogonies.* — Chez les fœtus âgés de 43 à 47 jours, l'organisation des gonocytes change. Leur REG est plus développé, formant des piles de 5 à 10 citernes. Puis, vers 48-50 jours, quelques-uns d'entre eux présentent une vacuole nucléaire (rarement 2) à contenu filamenteux, accolée à la membrane nucléaire interne et limitée par une membrane de même type (fig. 3 et 4). Pendant ces quelques jours l'encerclement de tous les gonocytes par les futures cellules de Sertoli est achevé, les séparant ainsi de la lame basale des cordons sexuels. Ce sont ces cellules germinales, totalement encadrées, plus différenciées que les gonocytes et possédant au moins une vacuole nucléaire qui ont été appelées conventionnellement préspermatogonies (fig. 3) (Fouquet et Dang, 1980 a et b).

Chez les fœtus de plus de 50 jours, la population des cellules germinales est donc hétérogène et constituée, selon la distinction précédente, d'une majorité de gonocytes en évolution et d'une proportion croissante de préspermatogonies. Cette période de différenciation s'achève vers 70 jours lorsque tous les gonocytes sont devenus des préspermatogonies. Ces cellules possèdent alors au moins 2 à 3 vacuoles nucléaires de 0,5 à 3 μm de diamètre, accolées ou non à la membrane interne.

3) *Evolution des préspermatogonies en spermatogonies : fœtus âgés de 110 à 150 jours.* — Il faut attendre plus d'un mois pour déceler les signes d'une reprise de l'évolution morphologique des préspermatogonies. Leur transformation, qui conduit aux premières spermatogonies A de type adulte, se manifeste d'abord au niveau du cytoplasme puis du noyau.

Dans un premier temps (fœtus de 110-120 jours) on note :

- a) une dispersion du REG avec disparition des piles de citernes formées au stade précédent ;
- b) un arrangement des mitochondries par paires (ou groupes) au contact, soit de citernes localement lisses du REG, soit de plaques denses. La signification et les rapports possibles entre ces deux modes d'attachement des mitochondries reste à élucider. Ces cellules (fig. 5 et 6) qui possèdent encore de grandes vacuoles nucléaires, mais déjà des mitochondries appariées, sont un type de transition entre les préspermatogonies et les spermatogonies ; on ne les retrouve plus après 130 jours.

PLANCHE III

FIG. 8. — *Coupe semi-fine dans un testicule fœtal de 134 jours.* $\times 985$ (Spermatogonies Ap et Ad typiques).

FIG. 9. — *Coupe fine adjacente de Ap* ($\times 10\ 000$) avec encart. ($\times 20\ 000$).

FIG. 10. — *Coupe fine adjacente de Ad* ($\times 12\ 500$) avec encart ($\times 30\ 000$). Ap et Ad sont séparées de la lame basale des cordons par des branches des cellules de Sertoli (S), les mitochondries sont arrangées de la même manière ($\Rightarrow$) et $\blacktriangleright$), des vacuoles nucléaires rudimentaires (V) ou citernes (ci) existent dans les deux types cellulaires. Contrairement à Ap, Ad possède une chromatine finement serrée, dense sauf un liseret périphérique et une zone centrale ou périnucléolaire d'euchromatine très dispersée (e). Comparer également les nucléoles, les granules périchromatiniens ($\blacktriangleright$) et les lamina (L).

Dans un second temps (foetus de 120-130 jours), les vacuoles nucléaires deviennent petites (moins de $0,5\ \mu\text{m}$) ou se réduisent à de courtes citernes souvent dépourvues de matériel filamenteux. De plus, une diversification des cellules germinales devient évidente en fonction de la structure de leur noyau. Certaines cellules conservent une chromatine finement granulaire et dispersée, faiblement colorable, contenant peu de granules périchromatiniens. Le dénombrement des granules (sur 20 coupes de noyau à un grandissement final de 25 000) fournit une valeur moyenne de : 95 pour $100\ \mu\text{m}^2$. Les nucléoles restent de type réticulé avec les 3 composants classiques et se situent aussi bien en position centrale qu'à proximité de l'enveloppe nucléaire. La membrane interne de l'enveloppe porte une *lamina* d'apparence discontinue ou irrégulière dont l'épaisseur atteint localement 150 nm. Ces cellules (fig. 8 et 9) ont une structure cytoplasmique et nucléaire semblable à celle des spermatogonies A pâles (Ap) du testicule adulte (fig. 16). D'autres cellules ont également un noyau à nucléoles réticulés mais dont l'euchromatine est sensiblement plus serrée (plus colorable) et plus riche en granules périchromatiniens. La lamina est parfois plus épaisse et l'enveloppe nucléaire émet occasionnellement des projections lamellaires en direction du cytoplasme. Ces cellules (fig. 5 et 7) sont vraisemblablement de futures spermatogonies A denses (Ad), leur noyau a un aspect intermédiaire entre celui des spermatogonies de type Ap et Ad de l'adulte.

Cette interprétation est justifiée par le fait que dans les jours qui suivent (foetus de plus de 130 jours) on peut identifier, en plus des gonies Ap et des types A intermédiaires, des cellules à noyau dense (fig. 8 et 10) ayant acquis tous les caractères nucléaires des spermatogonies Ad de type adulte (fig. 17). Elles ont une chromatine finement granulaire beaucoup plus tassée et d'après les comptages, environ 4,5 fois plus de granules périchromatiniens (427 pour $100\ \mu\text{m}^2$) que les Ap, ce qui leur confère une plus grande colorabilité. Malgré une densification générale de la chromatine, un liseré clair d'euchromatine très dispersée persiste contre l'enveloppe nucléaire ainsi qu'une grande plage sans localisation particulière, englobant souvent un nucléole.

L'enveloppe nucléaire présente parfois des projections comme celles signalées dans les formes A intermédiaires, mais surtout, la lamina est continue et

PLANCHE IV

FIG. 11. — Pont intercellulaire (pic) entre deux spermatogonies At (foetus de 134 jours) complètement encadrées (sauf $\rightarrow$) par des branches des cellules de Sertoli (S). $\times 6\ 000$.

FIG. 12. — Spermatogonies Ap et Ad dans un testicule de 14 mois post natal. Noter la chromatine plus dense avec un halo périnucléolaire très dispersé (e) et la projection nucléaire dans Ad. $\times 2\ 500$.

FIG. 13. — Coupe semi-fine dans un testicule de 48 mois (méiose initiale) dans lequel on reconnaît les spermatogonies Ap, At et Ad ainsi que les B. $\times 630$.

FIG. 14. — Coupe semi-fine d'un stade VI de la spermatogenèse (selon Clermont, 1969) dans un testicule adulte : spermatogonies Ad et B. $\times 630$.

FIG. 15. — Spermatogonies B au stade VI : coupe fine adjacente d'une cellule de la figure 14. Noter les mitochondries dispersées (certaines accolées à l'enveloppe nucléaire) et les mottes d'hétérochromatine. $\times 7\ 500$.

plus épaisse (150-300 nm) que celle des Ap. Enfin les nucléoles, proches ou accolés à l'enveloppe nucléaire n'ont généralement plus le type réticulé classique mais un aspect compact ou en sphère creuse ; leur structure est fibrillaire et le composant granulaire est pratiquement absent ou indiscernable.

Au terme de la gestation, la population des cellules germinales possède la même organisation cytoplasmique mais elle est hétérogène par l'organisation du noyau. On reconnaît unies par des ponts intercellulaires depuis l'âge de 130 jours (fig. 11) des spermatogonies Ad typiques apparues les dernières et qui représentent près de 50 p. 100 de la population, des spermatogonies Ap et des formes intermédiaires qui les ont précédées.

4) *Evolution des spermatogonies au cours de l'enfance jusqu'à la puberté.*

— Dans les mois qui suivent la naissance (fig. 12) et précèdent l'initiation de la méiose (vers 48 mois chez les singes d'élevage étudiés ici), on n'observe pratiquement aucune modification structurale des différentes classes de spermatogonies A (table 1). Par contre, leurs proportions respectives varient au cours de l'enfance. Entre la naissance et 12 mois, les spermatogonies Ad sont les plus nombreuses, elles représentent environ 60 p. 100 de l'ensemble des spermatogonies A, les 40 p. 100 restant correspondant aux Ap et aux A d'aspect intermédiaire en proportions sensiblement égales. A partir de 24 mois la proportion des Ap, bien que variable d'un animal à l'autre, tend à augmenter de sorte que lors de l'initiation de la méiose les gonies Ad, Ap et A d'aspect intermédiaire sont représentées selon un rapport approximatif 2/2/1.

Dès que l'on reconnaît avec certitude les premiers spermatocytes zygotène-pachytène grâce aux complexes synaptinémaux (fig. 13) il est possible d'identifier les spermatogonies B (fig. 13, 14 et 15) ; leur noyau est constitué d'euchromatine et de mottes d'hétérochromatine associées à l'enveloppe et aux nucléoles, il est pauvre en granules périchromatiniens. Les nucléoles ont une structure réticulée, ils occupent une position grossièrement centrale. L'enveloppe nucléaire ne différencie pas de petites citernes ou vacuoles périphériques, elle ne forme pas de projection et sa lamina est discontinue et mince (généralement moins de 100 nm d'épaisseur). Les gonies B comme les A contiennent peu d'organites cytoplasmiques, sans prédominance particulière, par contre leurs mitochondries ne sont pas arrangées par paires ou groupes mais distribuées au hasard, certaines étant accolées à l'enveloppe nucléaire.

Il convient enfin de noter que l'initiation de la méiose est accompagnée de la mise en place de la « blood-testis-barrier » donc de l'organisation définitive des tubes séminifères en compartiment basal et adluminal comme il a été décrit chez

PLANCHE V

Spermatogonies Ap (fig. 16) et Ad (fig. 17) dans un testicule adulte, coupes semi-fines ($\times 985$) et fines ($\times 12\,500$) adjacentes. Comparer avec les mêmes types cellulaires et les mêmes symboles chez le fœtus (fig. 8, 9 et 10). Noter aussi la persistance de citernes (ci) ou de vacuoles rudimentaires (V) dans les spermatogonies adultes qui reposent directement sur la lame basale (lb) des tubes séminifères.

16

17

le rat (Vitale *et al.*, 1973). C'est à ce moment seulement que les cellules de Sertoli s'écartent pour permettre aux spermatogonies de venir s'appliquer contre la lame basale des cordons séminifères (fig. 16 et 17) alors qu'elles en étaient séparées depuis le stade préspermatogonie (fig. 3) et pendant l'enfance (fig. 12).

Discussion.

L'existence de spermatogonies de type A et B, subdivisés en différentes classes est bien connue chez tous les mammifères adultes (Clermont, 1972). Leur identification repose principalement sur l'aspect de la chromatine et sur des critères topographiques aussi bien en microscopie à lumière (Clermont, 1972) qu'en microscopie électronique (Dym et Fawcett, 1971). L'observation au microscope électronique permet de définir des critères cytoplasmiques supplémentaires mais la minceur des coupes est souvent un inconvénient pour apprécier les différences au niveau de la chromatine (Dym et Fawcett, 1971 ; Mauger et Clermont, 1974 ; Cavicchia et Dym, 1978 ; Dym et Cavicchia, 1978). Toute étude visant à définir des caractères ultrastructuraux différentiels entre les spermatogonies impose donc leur identification préalable au microscope à la lumière, sur coupes épaisses de matériel inclus dans un support en plastique. En combinant les observations par microscopie à lumière et électronique sur coupes sériées, épaisses et fines, le présent travail aboutit aux mêmes conclusions que les travaux antérieurs chez différentes espèces de singes (Clermont, 1969 ; Dang, 1970 ; Clermont et Antar, 1973 ; Cavicchia et Dym, 1978 ; Dym et Cavicchia, 1978). Les spermatogonies de type A sont subdivisées en deux classes : A dense (Ad) et A pâle (Ap) aisément reconnaissables des spermatogonies B (tabl. 1). Les différences entre Ap et Ad sont exclusivement nucléaires (tabl. 1). Ap doit sa faible colorabilité à la grande dispersion de son euchromatine et à sa pauvreté en granules périchromatiniens contrairement à Ad. La persistance de régions claires d'euchromatine dispersée dans les noyaux Ad et la plus grande épaisseur de la lamina permettent aussi de les distinguer des Ap. La position et la structure des nucléoles sont en général suffisamment différentes pour confirmer le diagnostic différentiel des deux types de noyaux au microscope électronique. Les projections de l'enveloppe nucléaire semblent caractéristiques des Ad mais elles ne sont pas assez fréquentes pour constituer un critère utile. Enfin, Ad comme Ap possèdent des citernes ou vacuoles nucléaires rudimentaires.

Il est important de noter qu'en se fondant sur les caractères nucléaires ci-dessus, certaines spermatogonies A ne peuvent être rangées ni dans le type Ap, ni dans le type Ad en raison de leur aspect intermédiaire. Cette difficulté a déjà été soulignée par d'autres auteurs (Cavicchia et Dym, 1978 ; Dym et Cavicchia, 1978) qui l'ont mise sur le compte de la minceur des coupes, mais ce sont aussi l'organisation de la chromatine, plus ou moins tassée et le nombre des granules périchromatiniens qui sont en cause. L'existence de ces cellules intermédiaires qui représentent vraisemblablement des formes de transition soulève un problème qui sera repris plus loin.

TABLE 1
Caractères distinctifs des principaux types cellulaires de la lignée spermatogoniale (*)

Types cellulaires					
Caractères distinctifs	Gonocytes 37-43 j pc	Préspermatogonies 50-110 j pc	Spermatogonies Ap à partir de 120 j pc	Spermatogonies Ad à partir de 130 j pc	Spermatogonies B vers 48 mois pp
— Contacts avec la lame basale des cordons séminifères	+	—	— (+ après l'initiation de la méiose)	— (+ après l'initiation de la méiose)	+
— Ponts intercellulaires	—	—	+	+	+
— Cytoplasme :					
REG	dispersé	pires de citernes dispersées	dispersé paires ou groupes	dispersé paires ou groupes	dispersé dispersées
mitochondries	dispersées				
— Noyau :					
diamètre max.	12-12,5 µm	12-12,5 µm	8-10 µm	7-9 µm	9-12 µm
nucléoles	réticulé, central	réticulé, central	phérique	compact, périphérique	réticulé, central
aspect de la chromatine.	euchromatine claire et rares mottes	euchromatine claire et rares mottes	euchromatine très dispersée, peu colorable, sans mottes	euchromatine tassée colorable (sans mottes) avec régions très dispersées claires	nombreuses mottes d'hétérochromatine
granules périchromatiniens	rares	rares	rares	4,5 fois plus nombreux que ds Ap	rares
vacuoles nucléaires	—	+ (grandes et nombreuses)	rudimentaires ou en citernes	rudimentaires ou en citernes	—
projections nucléaires lamina	mince	mince	discontinue, épaisseur max. : 150 nm	+ continue, épaisseur max. : 300 nm	mince

(*) Les types cellulaires intermédiaires ne sont pas mentionnés. Tous les types cellulaires ont sensiblement la même taille (plus grand diamètre 20-25 µm) sauf les spermatogonies B (plus grand diamètre 15-20 µm).

La population diversifiée des spermatogonies du testicule adulte provient de l'évolution des cellules germinales primordiales (PGC) qui peuplent l'ébauche de la gonade. Le premier problème à résoudre était donc de savoir quand et comment se déroule cette évolution. Au cours du développement foetal et postnatal les relations cellules germinales-futures cellules de Sertoli sont modifiées, l'ultrastructure des cellules germinales et leur activité mitotique changent. En suivant ces divers paramètres, il est possible de reconnaître dans la plupart des cas 3 types cellulaires principaux : gonocytes, préspermatogonies et spermatogonies (voir in Wartenberg, 1981). La comparaison de ces stades évolutifs chez différentes espèces présente un intérêt limité car les critères de classification retenus par les auteurs ne sont pas strictement les mêmes (Gondos *et al.*, 1973 ; Wartenberg, 1981). Quoi qu'il en soit, s'il est clair que le schéma évolutif de la lignée germinale varie d'une espèce à l'autre, certains critères morphologiques sont communs à toutes les espèces (Dym et Fawcett, 1971 ; Gondos et Hobel, 1971 ; Fukuda *et al.*, 1975 ; Eddy, 1974 ; Mauger et Clermont, 1974 ; Clark et Eddy, 1975 ; Wartenberg *et al.*, 1971) : du stade gonocyte jusqu'au stade spermatogonies A les mitochondries sont à crête tubulaire et lamellaire ; dans tous les cas, mais à un stade variable selon l'espèce, les mitochondries s'unissent par paires ou groupes contre des citernes du reticulum endoplasmique ou des plaques denses et des ponts intercellulaires relient des cellules de même type. La classification proposée pour les types cellulaires de la lignée spermatogoniale chez *Macaca fascicularis* est classique en apparence mais elle a le mérite de prendre en compte des critères ultrastructuraux précis (tabl. 1). Puisque les cellules germinales pâles et denses des fœtus d'environ 130 jours ont exactement les mêmes caractères ultrastructuraux que les spermatogonies Ap et Ad de l'adulte, il est permis de penser qu'il s'agit bien des mêmes types cellulaires. La différenciation des spermatogonies A de type adulte semble donc très précoce chez le singe, seuls les contacts étendus avec la lame basale des cordons séminifères ne s'établissent qu'avec l'initiation de la méiose. Dans tous les autres cas décrits, les spermatogonies A adultes ne s'observent qu'après la naissance mais avant l'initiation de la méiose. Il faut cependant noter que chez le lapin (Gondos *et al.*, 1973) et l'homme (Gondos et Hobel, 1971 ; Wartenberg *et al.*, 1971), les préspermatogonies du fœtus possèdent déjà certains caractères typiques des spermatogonies A adultes (mitochondries groupées, ponts intercellulaires et contacts éventuels avec la lame basale des cordons séminifères) mais leur différenciation ne s'achève que pendant l'enfance.

Parmi les critères morphologiques utilisés pour distinguer les types cellulaires de la lignée spermatogoniale, les vacuoles nucléaires méritent attention. On sait qu'elles naissent à partir de la membrane nucléaire interne dans les préspermatogonies (Fouquet et Dang, 1980 a et b), leur signification étant inconnue. La formation et la régression de vacuoles nucléaires dans la lignée spermatogoniale n'ont jamais été signalées chez aucun mammifère mais des citernes nucléaires ont été décrites dans les spermatogonies Ad de l'homme (Rowley *et al.*, 1971), dans les spermatogonies et les spermatocytes du rat (Russell, 1977) et dans les spermatogonies du singe (Cavicchia et Dym, 1978). Ces structures ont été considérées comme un signe possible de dégénérescence des spermatogonies chez

l'homme (Chemes *et al.*, 1978). Cette hypothèse est difficilement acceptable chez *Macaca fascicularis* car toutes les préspermatogonies du fœtus et la plupart des spermatogonies A (peut-être toutes) possèdent des citernes nucléaires. Quelle que soit leur signification, ces structures constituent un marqueur naturel transmis au fil des générations jusqu'aux spermatogonies adultes.

L'un des objectifs de ce travail était de rechercher des critères morphologiques de filiation de la lignée spermatogoniale. Dans le passé, les travaux de ce genre se sont heurtés à diverses difficultés : critères de distinction des différents types cellulaires trop imprécis pour déceler les formes de transition (Mauger et Clermont, 1974) ; coexistence de types cellulaires différents dans une même période de différenciation (Wartenberg, 1981) avec phénomènes de dégénérescence frappant indistinctement tous les types cellulaires. Ces difficultés sont particulièrement sensibles chez les espèces à développement lent. Dans le cas de l'homme, pour ne reprendre qu'un exemple, le testicule adulte contient 4 classes de spermatogonies (Rowley *et al.*, 1971), on ne connaît ni la chronologie de leur différenciation, ni si elles dérivent des gonocytes ou des préspermatogonies du fœtus (Wartenberg *et al.*, 1971) ; Bustos-Obregon *et al.*, 1975).

Chez *Macaca fascicularis*, tous les types cellulaires ont pu être caractérisés ainsi que des formes de transition au cours de périodes de différenciation suffisamment distinctes. Chez le fœtus, il semble qu'on puisse admettre la séquence évolutive suivante : gonocytes → préspermatogonies → spermatogonies Ap et Ad en s'appuyant sur l'organisation du cytoplasme, du noyau et sur la présence des vacuoles ou des citernes nucléaires. Le fait que les spermatogonies Ap soient identifiables avant les Ad incite à penser que les Ap pourraient donner naissance aux Ad. Or, chez le singe adulte, l'analyse statistique (Dang, 1970) et l'incorporation de la thymidine tritiée (Clermont et Antar, 1973) montrent que les Ap sont des cellules de renouvellement et les Ad des cellules souches de réserve. Ceci implique que les Ad puissent fournir des Ap en cas de nécessité mais pas l'inverse. Des expériences de marquage par la thymidine tritiée au cours de l'enfance et en fin de gestation devraient permettre de préciser les rapports évolutifs entre Ap et Ad selon la période du développement. A cet égard, il convient de préciser que dans les travaux antérieurs comme ici, Ap et Ad sont considérées comme deux types cellulaires différents. Ce point mérite d'être réexaminé car Ap et Ad sont morphologiquement très proches, elles apparaissent presque en même temps, il existe de nombreuses gonies d'aspect intermédiaire qui pourraient être des formes de transition, aussi bien chez le fœtus, l'enfant et l'adulte. En somme, un problème majeur se pose : Ap et Ad sont-elles vraiment deux types cellulaires différents ou plutôt deux formes, éventuellement réversibles, d'un même type cellulaire ? Ap étant la forme mitotiquement active, Ad la forme inactive.

Les différences entre Ap et Ad en ce qui concerne l'organisation de la chromatine, la structure des nucléoles et la richesse en granules périchromatiniens suggèrent d'autres différences d'activité. On sait par exemple que les granules périchromatiniens sont des formes de stockage de hn RNA et (ou) de r RNA et que leur nombre augmente lorsque leur processing ou leur transport est inhibé (Puvion et Moyne, 1981 ; Daskal, 1981). Des expériences de marquage par l'uri-

dine tritiée seraient utiles pour comparer l'activité de Ap et Ad et mieux comprendre leur rôle dans le processus de peuplement du testicule.

Reçu en novembre 1981.

Accepté en avril 1982.

Remerciements. — Ce travail a été financé par les contrats 77.7.0671 et 80.70.0357 de la DGRST. L'auteur remercie Monsieur le Professeur C. Thibault pour ses conseils, les Drs Dang et Meusy-Dessolle qui ont fourni les singes, Monsieur Léglise pour la chirurgie, Monsieur Gouzy pour la photographie et Mme Asseline pour la frappe de ce texte.

Références

- BUSTOS-OBREGON E., COUROT M., FLÉCHON J. E., HOCHEREAU-de REVIERS M. T., HOLSTEIN A. F., 1975. Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man. *Andrologia*, **7**, 141-163.
- CAVICCHIA J. C., DYM M., 1978. Ultrastructural characteristics of monkey spermatogonia and preleptotene spermatocytes. *Biol. Reprod.*, **18**, 219-228.
- CHEMES H. E., FAWCETT D. W., DYM M., 1978. Unusual features of the nuclear envelope in human spermatogenic cells. *Anat. Rec.*, **192**, 493-512.
- CLARK J. M., EDDY E. M., 1975. Fine structural observations on the origin and association of primordial germ cells of the mouse. *Dev. Biol.*, **47**, 136-155.
- CLERMONT Y., 1969. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aetiops*). *Am. J. Anat.*, **126**, 57-72.
- CLERMONT Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals : seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.*, **52**, 198-236.
- CLERMONT Y., ANTAR M., 1973. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. *Am. J. Anat.*, **136**, 153-166.
- COUROT M., 1971. *Etablissement de la spermatogenèse chez l'agneau (Ovis aries). Etude expérimentale de son contrôle gonadotrope*. Th. Doct. Etat, Paris.
- DANG D. C., 1970. *Le cycle de l'épithélium séminifère du singe crabier (Macaca fascicularis)*. Th. Doct. 3^e cycle, Paris.
- DANG D. C., FOUQUET J. P., 1979. Differentiation of the fetal gonad of *Macaca fascicularis* with special reference to the testis. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **19**, 1197-1209.
- DASKAL Y., 1981. Perichromatin granules. In BUSCH H., *The cell nucleus*, **VIII**, 117-137. Acad. Press, New York.
- DYM M., CAVICCHIA J. C., 1978. Functional morphology of the testis. *Biol. Reprod.*, **18**, 1-15.
- DYM M., FAWCETT D. W., 1971. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol. Reprod.*, **4**, 195-215.
- EDDY E. M., 1974. Fine structural observations on the form and distribution of nuage in germ cells of the rat. *Anat. Rec.*, **178**, 731-758.
- FOUQUET J. P., DANG D. C., 1980 a. A comparative study of the development of the fetal testis and ovary in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **20**, 1439-1459.
- FOUQUET J. P., DANG D. C., 1980 b. Vacuoles intranucléaires dans les cellules germinales fœtales du macaque crabier. *Biol. cell.*, **38**, 153-156.
- FUKUDA T., HEDINGER C., GROSCURTH P., 1975. Ultrastructure of developing germ cells in the fetal human testis. *Cell Tiss. Res.*, **161**, 55-70.
- GONDOS B., 1977. Testicular development. In JOHNSON A. D., GOMES W. R., *The testis*, **IV**, 1-37. Acad. Press, New York.

- GONDOS B., CONNER L. A., 1973. Ultrastructure of developing germ cells in the fetal rabbit testis. *Amer. J. Anat.*, **136**, 23-43.
- GONDOS B., HOBEL C. J., 1971. Ultrastructure of germ cell development in the human fetal testis. *Z. Zellforsch.*, **119**, 1-20.
- GONDOS B., RENSTON R., CONNER L. A., 1973. Ultrastructure of germ cells and Sertoli cells in the postnatal rabbit testis. *Amer. J. Anat.*, **136**, 427-440.
- MAUGER A., CLERMONT Y., 1974. Ultrastructure des gonocytes et des spermatogonies du jeune rat. *Arch. Anat. microsc. Morphol. exp.*, **63**, 133-146.
- ORTAVANT R., COUROT M., HOCHEREAU-de REVIERS M. T., 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In COLE H. H., CUPPS P. T., *Reproduction in domestic animals*, 3rd Ed., 203-227. Acad. Press, New York.
- PELLINIEMI L. J., 1976. Ultrastructure of the indifferent gonad in male and female pig embryos. *Tiss. Cell*, **8**, 163-174.
- PUVION E., MOYNE G., 1981. *In situ* localization of RNA structures. In BUSCH H., *The cell nucleus*, **VIII**, 59-115. Acad. Press, New York.
- ROWLEY M. J., BERLIN J. D., HELLER C. G., 1971. The ultrastructure of four types of human spermatogonia. *Z. Zellforsch.*, **112**, 139-157.
- RUSSELL L., 1977. Membranous structures within nuclei of spermatocytes in the adult male rat. *Biol. Reprod.*, **17**, 184-191.
- VENABLE J. H., COGGESHALL R., 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **25**, 407-408.
- VITALE R., FAWCETT D. W., DYM M., 1973. The normal development of the blood-testis barrier and the effect of clomiphene and estrogen treatment. *Anat. Rec.*, **176**, 333-344.
- WARTENBERG H., 1981. Differentiation and development of the testis. In BURGER H., DE KRET-SER D., *The testis*, 39-80. Raven Press, New York.
- WARTENBERG H., HOLSTEIN A.-F., VOSSMEYER J., 1971. Zur Cytologie des pränatalen Gonaden entwicklung beim Menschen. II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Cytogenese von gonocyten and fetalen Spermatogonien in Hoden. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, **134**, 165-185.
-