

EFFETS PRÉCOCES D'UNE BRÈVE ÉLÉVATION DE LA TEMPÉRATURE TESTICULAIRE SUR LA SPERMATOGENÈSE DU BÉLIER

G.-M.-H. WAITES ⁽¹⁾, R. ORTAVANT

avec la collaboration technique de Agnès BURE et C. CORNU

*Station de Recherches sur la Physiologie de la Reproduction,
Centre de Recherches vétérinaires et zootechniques, 37 - Nouzilly
Institut national de la Recherche agronomique*

SOMMAIRE

Les effets précoces d'une brève élévation de la température testiculaire (40,5°C-41°C) sur la spermatogenèse ont été étudiés chez 19 béliers *Ile-de-France*. Des atteintes spécifiques de certaines cellules germinales ont pu être décelées : augmentation du nombre des prophases mitotiques des spermatogonies B₁ et B₂, disparition des spermatoocytes primaires pachytène à la fin du stade 7 et au début du stade 8 du cycle de l'épithélium séminifère, augmentation du nombre de figures de dégénérescence au cours des divisions méiotiques et de la spermiogenèse (stades 8 et 1).

INTRODUCTION

L'élévation de la température testiculaire par traitement local chez le Bélier est associée à une hypoxie du parenchyme sans augmentation compensatrice du débit sanguin dans le testicule (WAITES et SETCHELL, 1964 ; SETCHELL et *al.* 1966). Mais on ne connaît pas avec précision les stades cellulaires du cycle spermatogénétique perturbés parallèlement à ces modifications vasculaires et métaboliques bien que certaines inférences aient été tentées à partir de l'apparition des dégénérescences séminales (MOULÉ et WAITES, 1963). Chez le Rat des élévations de température entraînent des lésions spécifiques de l'épithélium séminifère (STEINBERGER et DIXON, 1959 ; CHOWDHURY et STEINBERGER, 1964). Néanmoins, des différences spécifiques dans la sensibilité cellulaire à la température peuvent exister. Aussi avons-nous étudié les changements cytologiques intervenant dans l'épithélium germinale après de courtes périodes d'élévation thermique dans les testicules de Bélier.

⁽¹⁾ Travail fait en 1965 grâce à une bourse du *Population Council*. Adresse actuelle : *Department of Physiology, The University of Sydney-SYDNEY N.S.W. Australia.*

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Dix-neuf béliers adultes de race *Ile-de-France* ont été utilisés pour ce travail au cours de l'été 1965. Ils ont été gardés dans un hangar ouvert, et nourris avec du fourrage vert et des aliments concentrés ; la température ambiante n'a jamais dépassé 28°C.

Cinq d'entre eux ont été utilisés pour étudier l'évolution comparée des températures testiculaire, sous-cutanée, scrotale et corporelle au cours du traitement thermique. Les béliers étaient alors placés dans une cage de contention en bois et soutenus par des harnais ; des aiguilles hypodermiques (diamètre extérieur 0,75 mm) contenant une thermistance à leur extrémité, étaient insérées dans le parenchyme testiculaire et sous la peau scrotale dans la région médio-postérieure. La température était enregistrée toutes les 2-5 minutes pendant la première heure de chauffage, puis toutes les 30 minutes au cours des deux heures suivantes et enfin toutes les 2-3 minutes après l'arrêt du chauffage jusqu'au retour à la température initiale. Douze autres béliers ont été utilisés pour les études cytologiques des effets du traitement thermique : dans ce cas, une seule aiguille hypodermique avec thermistance était insérée dans la peau scrotale. Enfin deux béliers ont servi de témoins.

Le scrotum de douze autres béliers était immergé dans de l'eau circulant à 40,5-41,5°C et la température ajustée de façon que les enregistrements obtenus sous la peau scrotale soient compris entre 40,0°C et 40,5°C. Cette température était atteinte environ 20 minutes après le début du traitement (fig. 1). La température de l'eau était maintenue constante jusqu'à 180 minutes après le début du chauffage. Le scrotum des deux béliers témoins était immergé dans de l'eau circulant à 33°C environ, température testiculaire normale (MOULE et KNAPP, 1950 ; WAITES et MOULE, 1961), pendant 180 minutes après insertion des mêmes aiguilles hypodermiques avec thermistances. Le traitement a toujours été réalisé avant 13 heures.

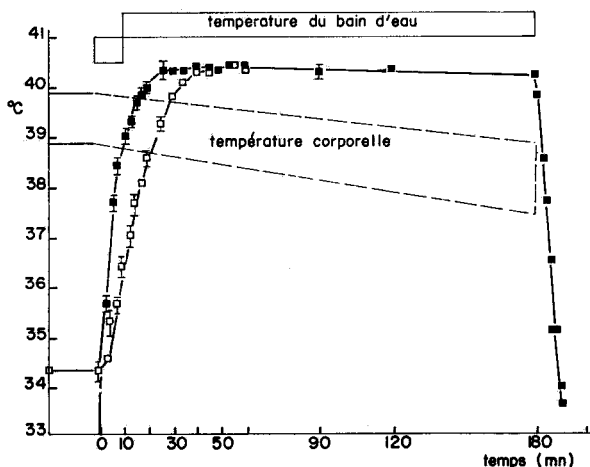


FIG. 1. — Évolution des températures testiculaire, scrotale et corporelle au cours du traitement thermique local du scrotum de béliers *Ile-de-France*

□ température testiculaire
■ température scrotale

Deux béliers expérimentaux ont été castrés à chacun des temps suivants : 12, 24, 48, 72, 96, 120 heures après le milieu du traitement thermique ; un bélier a été castré 12 heures et un autre 120 heures après le traitement témoin. Plusieurs prélèvements de chaque testicule ont été fixés dans l'alcool-formol-acide acétique (75/25/5) et dans le Bouin-Hollande pendant 1 jour et 3 semaines respectivement. Déshydratés, ils ont ensuite été inclus dans la paraffine ; les coupes (7 μ) ont été colorés par le réactif de Schiff selon la technique de Feulgen, puis avec du bleu Alcian.

Les noyaux des différents types de cellules germinales ont été comptés dans des coupes orthogonales de tubes séminifères (40 par testicule à chaque stade du cycle de l'épithélium séminifère défini selon ORTAVANT, 1958), chaque auteur contribuant également à toutes les numérations. Les nombres observés ont été corrigés d'après la taille nucléaire et l'épaisseur de la coupe (ABERCROMBIE, 1946).

RÉSULTATS

Les effets décrits résultent d'une élévation de la température testiculaire à 40-40,5°C pendant 140-150 minutes (fig. 1). Au cours de ce traitement, la température corporelle diminue régulièrement par suite de la polypnée provoquée par la stimulation des récepteurs thermiques dans la peau scrotale (WAITES, 1962). Au niveau des tubes séminifères, les principaux effets observés ont été l'altération du cycle mitotique des spermatogonies et la disparition des spermatocytes primaires au stade pachytène.

1. *Les spermatogonies*

Les différentes catégories de spermatogonies ne sont pas également thermosensibles.

Les spermatogonies A₂ et intermédiaires présentent un léger accroissement du nombre de noyaux en prophase 12-48 heures après le traitement thermique, mais cet accroissement n'est pas significatif. Par contre, le nombre de spermatogonies B en prophase augmente d'environ 4 fois dans les mêmes conditions. Le pic de fréquence des prophases de spermatogonies B₁ (stade 8 du cycle de l'épithélium séminifère) se produit 12-24 heures et celui des prophases de spermatogonies B₂ (stade 1) 24-48 heures après le traitement thermique (fig. 2 ; tabl. 1).

Toutes les sections de tubes séminifères ne sont pas également affectées : certaines coupes montrent de nombreuses spermatogonies en division (fig. 5) (jusqu'à 30 dans un cas) tandis que d'autres n'en contiennent aucune. Ces observations prouvent l'existence d'une synchronisation certaine des cycles cellulaires spermatogoniaux. Beaucoup des noyaux n'achèvent pas leur mitose, car le nombre de métaphases (fig. 6) ne s'accroît pas proportionnellement à celui du nombre de prophases. On observe d'ailleurs fréquemment des dégénérescences de noyaux de spermatogonies B₁ en prophase et en métaphase 24-48 heures après le traitement.

Cet effet du traitement thermique persiste pendant un certain temps puisque le nombre de noyaux de spermatogonies B₂ en prophase reste au-dessus des valeurs témoins chez 5 des 6 béliers examinés 72-120 heures après le traitement.

2. *Les spermatocytes*

Ici encore, tous les stades de la prophase méiotique ne sont pas également thermosensibles. La plupart des noyaux des spermatocytes I au stade pachytène (stade 8 du cycle de l'épithélium séminifère) sont pycnotiques 12 heures après le traitement thermique et presque tous ont disparu de l'épithélium séminifère des béliers examinés à ce stade après 48 heures (fig. 4).

On constate également cette disparition dans les tubes examinés au stade 1 du cycle 24-72 heures après le traitement thermique et 72-120 heures après celui-ci chez ceux examinés au stade 2. Ceci correspond à l'observation des noyaux pycnotiques des spermatocytes pachytène du stade 8, 12 heures après le chauffage. Par ailleurs, la réapparition d'autres noyaux pycnotiques au stade 8, 120 heures après le traitement, et l'apparition continue de tels noyaux au stade 1, semblent indiquer, soit

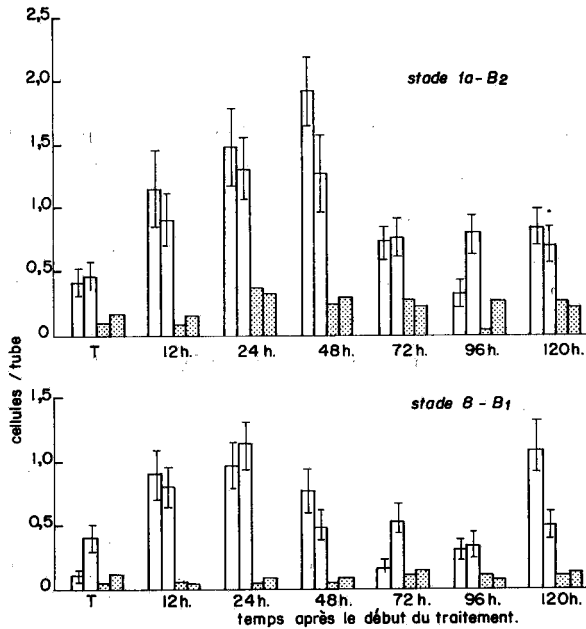


FIG. 2. — Influence d'un traitement thermique local sur le nombre de prophases et de métaphases spermatogoniales par coupe transversales de tube séminifères ($m \pm sm$; $n = 80$)

□ prophase
▨ métaphase

TABLEAU I

Nombre de spermatogonies au stade de la prophase mitotique par section transversale de tube séminifère (7μ d'épaisseur) après élévation de la température testiculaire chez le Bélier

Temps après traitement	Stade 2 (A ₁)	Stade 4 (A ₂)	Stade 6 (In.)	Stade 8 (B ₁)	Stade 1 (B ₂)
Témoins	0,052	0,233	0,251	0,250	0,438
12 heures ..	0,085	0,224	0,500	0,870	1,020
24 heures ..	0,102	0,308	0,380	1,043	1,388
48 heures ..	0,113	0,343	0,183	0,635	1,595
72 heures ..	0,087	0,313	0,215	0,360	0,735
96 heures ..	0,127	0,207	0,270	0,323	0,545
120 heures ..	0,057	0,151	0,185	0,790	0,775

Moyenne ($n = 160$; 2 béliers et 4 testicules) après correction (ABER-CROMBIE, 1946).

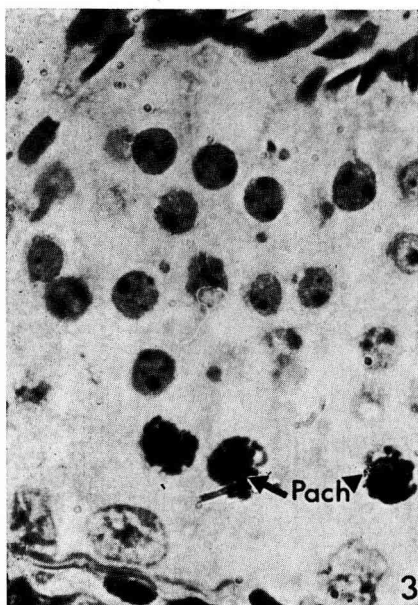


FIG. 3. — Stade 8 du cycle de l'épithélium séminifère: présence de quelques spermatocytes primaires pachytène (Pach.) (Bélier normal)

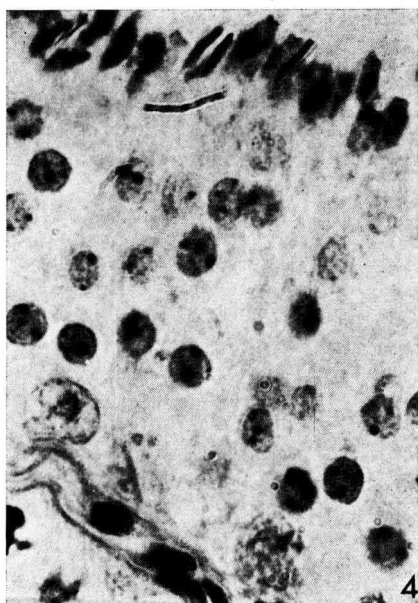


FIG. 4. — Stade 8 du cycle de l'épithélium séminifère: les spermatocytes primaires pachytène ont disparu

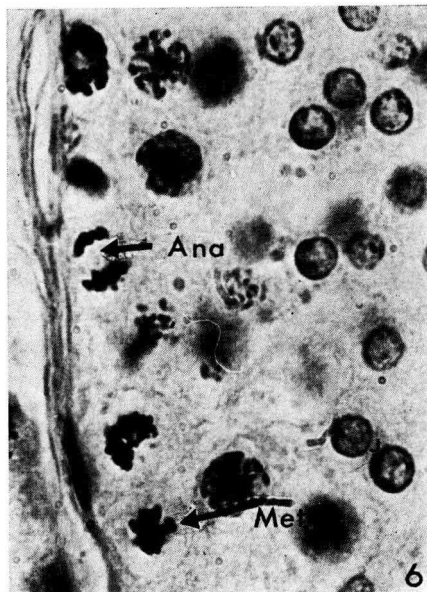
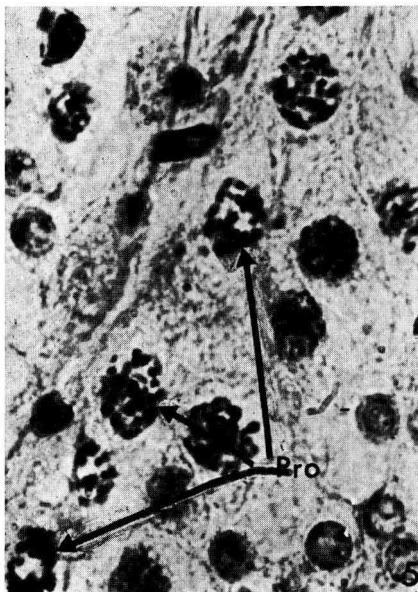


FIG. 5-6. — Stade 1 du cycle de l'épithélium séminifère: présence de nombreuses divisions spermatogoniales (prophase: Pro; métaphase: Met; anaphase: Ana)

FIG. 4-6. — Tubes séminifères de Bélier prélevés 24 heures après avoir été soumis à un traitement thermique local de courte durée

une certaine persistance de l'effet thermique, soit la manifestation d'une action ayant affecté des stades cellulaires précoces au cours du cycle spermatogénétique (lepto-tène-zygotène).

La dispersion des taux de disparition des spermatocytes indique l'existence de variations individuelles dans la sensibilité thermique de ces cellules germinales. Ceci est illustré par la comparaison du nombre de spermatocytes au stade pachytène trouvés aux stades 8 et 1 chez les 2 béliers castrés 24 heures après le traitement thermique (fig. 7).

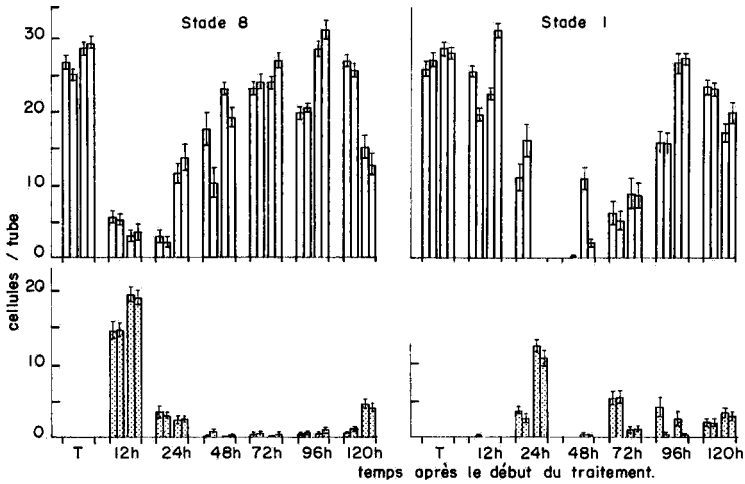


FIG. 7. — Un traitement thermique local de courte durée (3 heures) entraîne la disparition des spermatocytes primaires pachytène au stade 8, 12 et 24 heures après, celle-ci est observée au stade 1, 24 à 72 heures après le traitement

■ cellules normales
 ▨ cellules en dégénérescence

3. Autres modifications cellulaires dues au traitement thermique

On observe également l'apparition de figures anormales dans les deux divisions méiotiques 24 heures après le traitement. Ceci se traduit par une disparition partielle des spermatides à noyaux ronds dans les tubes séminifères, au stade 6, examinés 12-24 heures après le traitement. Cette diminution du nombre des spermatides à noyaux ronds peut être retrouvée au stade 8, 96-120 heures après le traitement. Elle s'ajoute à celle observée aux stades 8 et 1, 12-24 heures après chauffage, et qui résulte vraisemblablement d'une action directe du traitement sur ces spermatides.

DISCUSSION

Dans cette expérience, les testicules de Bélier ont été exposés à des températures qui peuvent se produire naturellement et dont on a montré antérieurement qu'elles modifient le métabolisme testiculaire et altèrent la production de sperme (DUTT, 1960 ; WAITES et SETCHELL, 1964). Comme STEINBERGER et DIXON (1959) l'ont déjà observé, certains stades de la spermatogenèse sont spécifiquement sensibles à des températures élevées.

Le nombre de spermatogonies B₁ et B₂, en prophase, augmente dans les tubes séminifères 12-48 heures après chauffage, suggérant soit le déclenchement de divisions mitotiques supplémentaires entraînant une synchronisation cellulaire, soit un blocage du déroulement normal de la mitose à la fin de la prophase. Tout semble indiquer que ces spermatogonies en division « disparaissent » pendant la transformation du stade prophase en stade métaphase. Cette étude ne montre pas clairement si les spermatogonies B encore en prophase à un taux élevé, 72-120 heures après traitement, se divisent normalement, et quel est le stimulus responsable de cette activité rémanente. Les spermatogonies intermédiaires et A ne sont pas affectées d'une façon significative.

Il se peut qu'une différence d'espèces existe dans la thermosensibilité des spermatogonies puisque celles du Rat ont été considérées comme relativement résistantes à la chaleur et non affectées par une température plus élevée appliquée pendant un temps plus court (CHOWDHURY et STEINBERGER, 1964). On sait que le débit sanguin testiculaire augmente avec la chaleur chez le Rat (GLOVER, 1966; WAITES, SETCHELL et FOWLER, données non publiées) mais non chez le Bélier (SETCHELL et *al.*, 1966). Cette hyperhémie peut protéger l'épithélium germinal du Rat des changements métaboliques qui ont été détectés dans le testicule du Bélier. Cette thermosensibilité croissante des spermatogonies de bélier depuis le type A jusqu'au type B, suit le modèle de sensibilité des spermatogonies de Souris aux faibles doses de rayons X (GUNSEL, 1949; OAKBERG, 1955*a* et *b*, 1959).

La brève période de chauffage appliquée dans cette expérience affecte une fraction seulement de la longue prophase méiotique du Bélier, comme cela se produit chez le Cobaye (YOUNG, 1927) et le Rat (CHOWDHURY et STEINBERGER, 1964). Les spermatoctes pachytène entrent dans cette période vulnérable vers la fin du stade 7-début du stade 8 et très peu survivent au traitement. Les noyaux pycnotiques et les débris nucléaires abondamment présents au stade 8, 12-24 heures après le traitement, sont rapidement éliminés de l'épithélium germinal, ce qui donne des tubes apparemment normaux mais où il manque une génération complète de cellules germinales de spermatoctes pachytène. Cette disparition se retrouve dans les stades successifs de l'épithélium germinal à des temps en rapport avec la vitesse de déroulement de la spermatogenèse chez le Bélier (ORTAVANT, 1959).

D'autres dégénérescences cellulaires affectent partiellement certaines populations de cellules germinales. Des figures méiotiques pycnotiques et anormales ont été trouvées 24 heures après chauffage; elles sont à l'origine de la diminution tardive du nombre des spermatides rondes.

Des dégénérescences se produisent naturellement dans les divisions de réduction d'autres espèces (Souris, OAKBERG, 1956; Rat, CLERMONT, 1962; Bélier, ORTAVANT, 1956; Taureau, ATTAL et COUROT, 1963). On pense généralement qu'elles représentent une présélection éliminant les anomalies chromosomiques.

La nature sélective du traitement thermique indique que des réactions thermosensibles ou limitées par l'oxygène sont présentes principalement dans les spermatogonies B et les spermatoctes pachytène à un stade précis de leur développement. Ces faits peuvent être en liaison avec l'observation de SIMARD et BERNHARD (1967), montrant l'existence d'une thermosensibilité du nucléole de certaines cellules conduisant à l'inhibition de la synthèse de l'ARN.

SUMMARY

EARLY CYTOLOGICAL CHANGES OBSERVED AFTER THE TESTIS
WAS SUBJECTED TO ELEVATED TEMPERATURE

The cytological effects of heating the testes of mature *Ile-de-France* rams into the range 40.0-40.5°C for 140-150 mn have been examined 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours later. Two major effects were observed.

1. B-type spermatogonia accumulated in the prophase stage of mitosis a four-fold increase was observed 24 hours (B₁) or 48 hours (B₂) later. These divisions did not continue beyond the metaphase stage. Intermediate and A₂-type spermatogonia were similarly but less markedly affected, but there was no effect on A₁-type spermatogonia.

2. Pachytene spermatocytes at late stage 7 and early stage 8 were almost totally destroyed by the heat-treatment.

3. Less complete effects were observed in the meiotic divisions and on round spermatids in stages 8 and 1.

The results are discussed in terms of species specificity of the spermatogonial response and the selective nature of the thermal treatment applied.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABERCROMBIE M., 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.*, **94**, 238-248.
- ATTAL J., COUROT M., 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogenèse chez le Taureau. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **3**, 219-241.
- CHOWDHURY A. K., STEINBERGER E., 1964. A quantitative study of the effect of heat on germinal epithelium of rat testes. *Amer. J. Anat.*, **115**, 509-524.
- CLERMONT Y., 1962. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat : A revised model for the renewal of spermatogonia. *Amer. J. Anat.*, **111**, 111-129.
- GLOVER T. D., 1966. The influence of temperature on flow of blood in the testis and scrotum of rats. *Proc. Roy. Soc. Med.*, **59**, 765-766.
- GUNSEL E., 1949. Zur Frage der Röntgenatrophie des Hodens. *Strahlentherapie* **80**, 467-474.
- MOULE G. R., KNAPP B., 1950. Observations on intratesticular temperatures of *Merino* rams. *Austr. J. Agric. Res.*, **1**, 456-464.
- MOULE G. R., WAITES G. M. H., 1963. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. *J. Reprod. Fert.*, **5**, 433-446.
- OAKBERG E. F., 1955 a. Sensitivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated in various stages of maturation in the mouse. *Radiation Res.*, **2**, 369-391.
- OAKBERG E. F., 1955 b. Degeneration of spermatogonia of the mouse following exposure to X-rays, and stages in the mitotic cycle at which cell death occurs. *J. Morphol.*, **97**, 39-54.
- OAKBERG E. F., 1956. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Amer. J. Anat.*, **29**, 391-413.
- OAKBERG E. F., 1959. Initial depletion and subsequent recovery of spermatogonia of the mouse after 20 r of gamma rays and 100, 300 and 600 r of X-rays. *Radiation Res.*, **11**, 700-719.
- ORTAVANT R., 1956. Action de la durée d'éclairement sur les processus spermatogénétiques chez le Bélier. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **150**, 471-479.
- ORTAVANT R., 1958. *Le cycle spermatogénétique chez le Bélier*. Thèse Faculté des Sciences. Paris.
- ORTAVANT R., 1959. Spermatogenesis and morphology of the spermatozoon dans *Reproduction in Domestic Animals*. Cole. H. H., Cupps P. T., New York, Academic Press. **2**, 1-50.
- SETCHELL B. P., WAITES G. M. H., THORBURN G. D., 1966. Blood flow in the testis of the conscious ram measured with Krypton 85 : effects of heat, catecholamines and acetylcholine. *Circulation Res.*, **18**, 755-765.
- SIMARD R., BERNHARD W., 1967. A heat sensitive cellular function located in the nucleolus. *J. Cell. Biol.*, **34**, 61-76.

- STEINBERGER E., DIXON W. J., 1959. Some observations in the effect of heat on the testicular germinal epithelium. *Fertil. Steril.*, **10**, 578-595.
- WAITES G. M. H., 1962. The effect of heating the scrotum of the ram on respiration and body temperature. *Quart. J. Exp. Physiol.*, **47**, 314-23.
- WAITES G. M. H., MOULE G. R., 1961. Relation of vascular heat exchange to temperature regulation in the testis of the ram. *J. Reprod. Ferti.*, **2**, 213-224.
- WAITES G. M. H., SETCHELL B. P., 1964. Effect of local heating on blood flow and metabolism in the testis of the conscious ram. *J. Reprod. Ferti.*, **8**, 339-349.
- YOUNG W. C., 1927. The influence of high temperature on the guinea pig testis. *J. Exp. Zool.*, **49** 459-499.
-