

LA SPERMATOGENÈSE DE *POECILIA RETICULATA*

II. — LA PRODUCTION SPERMATOGÉNÉTIQUE

R. BILLARD

avec la collaboration technique de Claudine PUISSANT

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

SOMMAIRE

La production spermatogénétique de *Poecilia reticulata* est de 36 spermatozeugmes par jour soit environ 750 000 spermatozoïdes.

Dans cette espèce, le canal testiculaire apparaît comme un véritable organe de stockage des spermatozoïdes qui n'assure pas une élimination régulière des spermatozeugmes ce qui conduit à une grande hétérogénéité dans l'âge des spermatozoïdes et pose le problème du vieillissement des gamètes et de ses conséquences.

INTRODUCTION

Dans un travail précédent (BILLARD, 1969), nous avons montré que le testicule de *Poecilia reticulata* est constitué d'un certain nombre de tubules séminifères (246 ± 13) dans lesquels s'élaborent des spermatozeugmes qui se déversent dans un canal testiculaire interprété comme un organe de stockage des spermatozoïdes par LANGER (1913), VAUPEL (1929) et par DULZETTO (1933) chez *Gambusia*. Il y a en moyenne 7,8 cystes par tubule et la spermatogenèse dure 36 jours. Ces informations ont été complétées en vue de connaître la production spermatogénétique et la vitesse de transit des spermatozeugmes.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Le matériel biologique a été décrit précédemment (BILLARD, 1969).

Méthode de prélèvement des spermatozeugmes

Les mâles anesthésiés à l'aide de MS 222 sont immobilisés sur le dos et les spermatozeugmes, obtenus grâce à une légère pression abdominale, sont immédiatement recueillis dans une micropipette et refoulés sur lame de verre où ils peuvent être comptés ou bien préparés pour autoradiographie.

Techniques autoradiographiques

Des mâles de 100 à 200 mg reçoivent une injection intrapéritonéale de 0,5 à 1 μ Ci de thymidine méthyle tritiée CEA-France, lot 666, activité spécifique 5,4 Ci/mM. Les spermatozeugmes prélevés sur ces mâles, à des temps variables après l'injection, sont étalés sur lame, fixés à l'alcool à 95°, colorés par la réaction de Feulgen (hydrolyse par HCl, 8 mn à 58-60°C) et recouverts d'une émulsion pelliculable Kodak AR 10. L'exposition à 4°C dure 15 jours et la révélation est faite à l'amidol pendant 8 mn ; l'identification des spermatozeugmes marqués dans le canal testiculaire et le canal déférent est réalisée sur coupes de testicules de 20 μ , fixés au Bouin-Hollande. Dans tous les cas, seuls les spermatozeugmes fortement marqués, qui correspondent à une incorporation sur des spermatocytes leptotène, sont pris en considération.

Durée de transit des spermatozeugmes dans le testicule

Les durées minimum et maximum du transit sont mesurées par l'intervalle séparant l'injection de thymidine tritiée et l'arrivée des premiers et des derniers spermatozeugmes marqués dans l'éjaculat auquel on retranche 14 jours (intervalle leptotène-fin de la spermatogénèse).

La durée minimum est mesurée en considérant la fréquence des prélèvements selon le processus suivant : immédiatement après l'injection de thymidine tritiée, 4 lots de 2 mâles sont épuisés respectivement tous les 1, 2, 4 ou 8 jours jusqu'au 16^e jour ; ensuite, les prélèvements destinés à l'analyse autoradiographique sont faits tous les jours dans tous les cas.

La durée maximum du transit est mesurée sur mâles non épuisés et laissés en permanence en présence de femelles.

Mode de calcul de la production spermatogénétique

La production spermatogénétique exprimée en spermatozeugmes par jour est calculée par les formules suivantes :

Production spermatogénétique théorique, Pt :

$$Pt = \frac{T \times c}{d}$$

T = nombre de tubules dans le testicule

c = nombre de cystes par tubule

d = durée de la spermatogénèse

Production spermatogénétique réelle Pr (d'après ORTAVANT, 1958) :

$$Pr = \frac{M}{n} - \frac{R_1 - R_2}{n}$$

M = quantité totale de spermatozeugmes collectés pendant n jours

R₁ = réserves présentes dans les testicules au début de l'expérience

R₂ = réserves présentes dans le testicule en fin d'expérience.

Il n'est pas possible de déterminer R₁ et R₂ sur un même animal. Pour connaître la diminution des réserves, un lot homogène de 18 mâles adultes, isolés de femelles depuis 1 mois, est divisé en 2 groupes égaux. Sur le 1^{er} groupe, sacrifié immédiatement, R₁ est enregistré. Sur le 2^e groupe, des

épuisements périodiques, tous les jours au début, plus espacés ensuite, pendant 26 jours, permettent de connaître M, puis R_2 après sacrifice le 26^e jour.

R_1 et R_2 doivent être exprimés en spermatozeugmes, mais en raison de leur forme irrégulière ceux-ci ne peuvent être comptés sur coupes sériées. Cependant, d'après le comptage, à l'aide d'un hématimètre, de la quantité totale de spermatozoïdes présents dans le testicule après broyage par la technique de DOUNCE (1943) et la connaissance du nombre moyen de spermatozoïdes par spermatozeugme, il est possible de déterminer R_1 et R_2 .

RÉSULTATS

Réerves spermatogénétiques

L'évaluation des réserves, exposée dans le tableau 1, fait apparaître une diminution hautement significative du nombre de spermatozeugmes présents dans le testicule, après épuisement des mâles pendant 26 jours.

TABLEAU I

Réerves spermatogénétiques dans les testicules avant et après épuisement sexuel

Réerves	Nombre de mâles	Nombre moyen de spermatozeugmes dans le testicule	S ²	Test t
Mâles épuisés (pendant 26 j)	9	242,8 ± 56,8	807	} Différence hautement significative
Mâles témoins non épuisés	9	399,2 ± 71,2	1 270	

Production spermatogénétique

L'évolution de la production journalière brute pendant 26 jours est présentée dans la figure 1. La production quotidienne très élevée au début diminue entre le

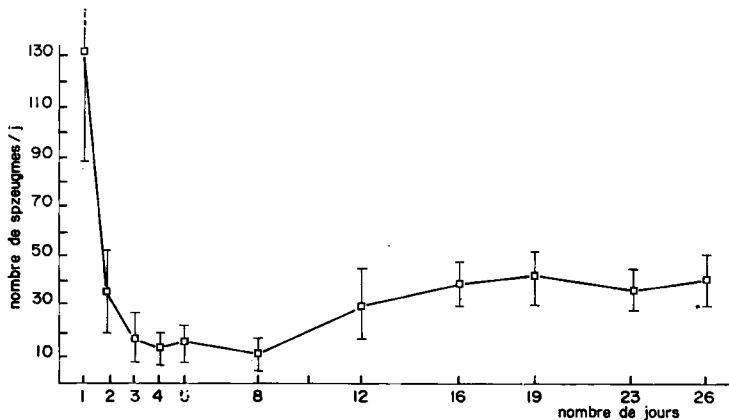


FIG. 1. — Évolution de la production journalière moyenne de spermatozeugmes

3^e et le 8^e jour, puis tend à se stabiliser à partir du 16^e jour. La production totale en 26 jours est de 1 100 spermatozeugmes.

La production spermatogénétique réelle peut être calculée :

$$Pr = \frac{1\ 100}{26} - \frac{399,2 - 242,8}{26} = 36 \text{ spermatozeugmes par jour.}$$

Durée du transit des spermatozeugmes dans le testicule

— Durée minimum du transit et variations liées à la fréquence des prélèvements.

Les résultats du tableau 2 montrent que l'augmentation du rythme des prélèvements diminue la durée du transit. La durée minimum du transit est 2 à 3 jours.

TABLEAU 2

Durée du transit des spermatozeugmes dans le testicule

Rythme du prélèvement des spermatozeugmes pendant 16 j après l'injection de thymidine tritiée en jours	Intervalle entre l'injection de thymidine et l'apparition des spermatozoïdes marqués dans l'éjaculat (jours)	Durée du transit (jours)
1	16-17	2 à 3
2	17	3
4	18	4
8	20	6

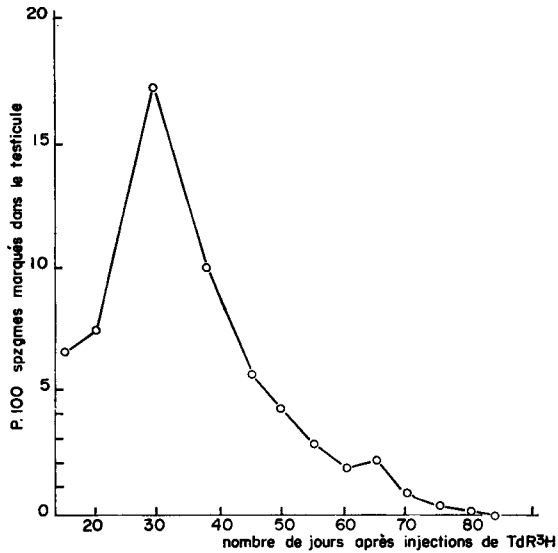


FIG. 2. — Évolution du pourcentage de spermatozeugmes marqués dans le canal testiculaire et le canal déférent après injection de thymidine tritiée

— Durée maximum du transit.

L'évolution du pourcentage de spermatozeugmes marqués dans le testicule (fig. 2) montre que la vague de marquage s'élimine très lentement. La durée maximum du transit est de l'ordre de 60 jours.

DISCUSSION

Production spermatogénétique

La production journalière réelle de 36 spermatozeugmes par jour peut être confrontée à la production théorique :

$$Pt = \frac{246 \times 7,8}{36} = 53 \text{ spermatozeugmes par jour.}$$

Il existe une différence considérable entre ces deux valeurs qui pourrait être imputable à des dégénérescences au cours du transit dans le testicule. Il n'est cependant pas possible d'identifier des images de dégénérescence de cystes dans le canal testiculaire. En outre, le nombre de tubules par testicule, sur lequel ce calcul est fondé, présente une grande variabilité et la production journalière réelle est également très variable (BRETON, 1968). L'hypothèse d'une dégénérescence des spermatozeugmes dans le canal testiculaire demande confirmation et la possibilité d'élimination des spermatozoïdes en dehors de l'accouplement n'est pas à écarter.

Sept cent cinquante milles spermatozoïdes sont produits par jour et par un organe pesant en moyenne 5 mg, soit $150 \cdot 10^6$ spermatozoïdes par g de testicule frais. Cette valeur est élevée par rapport aux productions des Mammifères domestiques : $12,2 \cdot 10^6$ chez le Bélier (ORTAVANT, 1958), $21,4$ et $25,6 \cdot 10^6$ chez le Lapin (ORGEBIN-CRIST 1968).

Durée de transit et âge des spermatozoïdes au moment de l'éjaculation

La vitesse de transit des spermatozeugmes augmente légèrement avec la fréquence des prélèvements. Une telle constatation a déjà été faite chez les Mammifères domestiques (AMIR et ORTAVANT, 1968, chez le Bélier ; ORGEBIN-CRIST, 1961, chez le Taureau ; KIRTON *et al.*, 1967, chez le Lapin).

La quantité de spermatozeugmes dans le réceptacle testiculaire est beaucoup plus élevée à 20°C qu'à 30°C et cela pourrait résulter d'une diminution du rendement de la spermatogenèse aux températures élevées. Or, ce rendement est le même à 20°C et à 30°C (BILLARD, 1968). On peut donc conclure que la vitesse de transit varie avec la température. Des spermatozoïdes peuvent encore être marqués dans le testicule 75 à 80 j. après l'injection de thymidine tritiée ; une durée analogue 70 j. a été observée chez *Pacilia sphénops* (De FELICE et RASCH, 1968). Une variation de 2 à 60 jours dans la durée du transit entraîne une hétérogénéité biologique des spermatozoïdes éjaculés et pose le problème de l'influence du vieillissement des sper-

matozoïdes sur la fécondation et le développement embryonnaire. Cependant, il faut rappeler que ces spermatozoïdes qui peuvent être déjà âgés au moment de l'éjaculation et qui seront ensuite appelés à survivre encore plusieurs mois dans l'ovaire (WINGE, 1937; JALABERT et BILLARD, 1969) n'entraînent pas de modifications dans la morphométrie et la croissance des descendants (PLOYE, 1969).

Reçu pour publication en décembre 1968.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Département de Protection sanitaire du Commissariat à l'Énergie atomique (L. E. R. A) qui nous a aimablement fourni la thymidine tritiée.

SUMMARY

THE SPERMATOGENESIS OF THE GUPPY (« POECILIA RETICULATA »)

II. THE PRODUCTION OF SPERMATOZOA

The testicular duct of the Guppy (*Poecilia reticulata*) functions as a storage organ for spermatozoa. After 18 males were exhausted daily for 26 days, 60 per cent of the spermatozoa stored in the testicular ducts were found to remain. The spermatogenetic yield estimated during this lapse of time was 36 spermatozeugmas per day, i. e. 750,000 spermatozoa per day, or 150 ± 10^6 spz. per g of living testicle.

There was a slight increase in transit speed depending upon the frequency of collections and the temperature. The shortest recorded duration of transit was 2-3 days, and the longest was 60 days. Consequently, the age of the spermatozoa of each ejaculate is most variable.

The testicular duct therefore appears to allow no regular emptying of spermatozeugmas which raises the problem of the ageing of spermatozoa and its influence on fertilization and growth of the embryo.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMIR D., ORTAVANT R., 1968. Influence de la fréquence des collectes sur la durée du transit des spermatozoïdes dans le canal épидидymaire du béliet. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **8**, 195-208.
- 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. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. I. Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**, 251-271.
- BRETON B., 1968. *Contribution à l'étude de l'isolement et du dosage des gonadotropines de poissons*. Thèse 3^e cycle, Lyon.
- DOUNCE A. L., 1943. Further studies on isolation cell nuclei of normal rat liver. *J. Biol. Chem.*, **151**, 221-233.
- DULZETTO F., 1933. La struttura del testicolo de *Gambusia Holbrookii* (GRD) e la sua evoluzione in rapporto con lo sviluppo del gonopodio. *Arch. Zool. Biol.*, **19**, 405-437.
- DE FELICE D., RASCH E. M., 1968. Chronology of spermatogenesis and spermiogenesis in Pœciliid fishes (abstract). *J. Cell. Biol.* **39**, 32a.
- JALABERT B., BILLARD R., 1969. Étude ultrastructurale du site de conservation des spermatozoïdes dans l'ovaire de *Poecilia reticulata* (Poisson téléostéen). *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**, 273-280.
- KIRTON K. T., DESJARDINS C., MAFS H. D., et al., 1967. Distribution of sperm in male rabbits after various ejaculations frequencies. *Anat. Rec.*, **158**, 287-292.
- LANGER W. F., 1913. Beiträge zur Morphologie der viviparen Cyprinodontiden. *Morph. Jahrb.*, **47**, 193-307.

- ORGBIN-CRIST M. C., 1961. Étude du transit épидидymaire des spermatozoïdes de taureau marqués à l'aide du ^{32}P . *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 117-120.
- ORGBIN-CRIST M. C., 1968. Gonadal and epididymal sperm reserves in the rabbit : estimation of the daily sperm production. *J. Reprod. Fert.*, **15**, 15-25.
- ORTAVANT R., 1958. *Le cycle spermatogénétique chez le Bélier*. Thèse Fac. Sci., Paris.
- PLOYE H., 1969. Sur la stabilité des portées successives chez *Lebistes reticulatus*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **9**, 83-87.
- SETCHELL B. P., 1957. Fluid secretion by the testis. *J. Reprod. Fert.*, **14**, 347-348.
- VAUPEL J. 1929. The spermatogenesis of *Lebistes reticulatus* *J. Morph.* **47**, 555-587.
- WINGE O., 1937. Succession of broods in *Lebistes*. *Nature*, **140**, 467.
-