

## Rôles indirects des microtubules dans la morphogenèse nucléaire des spermatides

J.-L. COURTENS

avec la collaboration technique de Bernadette DELALEU

*Station de Physiologie de la Reproduction, I.N.R.A.,  
Nouzilly, 37380 Monnaie, France.*

---

**Summary.** *The indirect roles of microtubules in the nuclear morphogenesis of spermatids.*

The depolymerization of the microtubules of the spermatid manchette was effective for 4 to 5 h in rat, starting 30 min after one intratesticular injection of colcemid *in vivo*. The manchette built up again later was normal in old elongating spermatids but very oddly shaped in young elongating spermatids in which the nuclear shape was abnormal and the relations between the nucleus and the endoplasmic reticulum aberrant, *ie* destruction of the apparatus for nucleocytoplasmic exchange. From 24 to 96 h after the injection, a progressive shifting of the cellular associations indicated that young spermatids elongating at the time of injection did not differentiate further. This could result from the lack of two roles not played by the new manchette : the guiding effect of the intranuclear chromatin and the role of skeleton for the cytoplasmic apparatus devoted to nucleocytoplasmic exchange.

Step 14 to 16 spermatids were not modified by the removal of the manchette due to correct reformation of a typical manchette 4 to 5 h later. The associations of the microtubules and the nuclei and the speculative roles of the microtubules during spermiogenesis have been discussed.

---

### Introduction.

La morphogenèse des noyaux de spermatoïdes est sans doute l'événement le plus remarquable de la spermiogenèse. Chez la plupart des espèces, il est facile de constater que les modifications de forme et de dimension des noyaux de spermatides s'accompagnent d'une part d'une condensation de la chromatine, qui s'opère selon une chronologie et un mode spécifiques et d'autre part, de l'apposition, le long de l'enveloppe nucléaire, d'une série de microtubules. Ceux-ci sont soit isolés, soit réunis entre eux par des liens pour former une « manchette chromatique ». Des exceptions notables existent cependant : la chromatine des spermatozoïdes de crustacés décapodes n'est pas condensée (Chevaillier, 1967 ;

Vaugh et Thomson, 1972 ; Sellos et Legal, 1981) ; les spermatides de nombreux invertébrés et celles de la plupart des poissons sont dépourvues de manchette.

D'une manière classique, deux thèses s'opposent au sujet des forces capables de modeler le noyau des spermatides :

La première considère que la constitution d'un édifice macromoléculaire entre les nucléoprotéines et l'ADN est seule responsable de la morphogenèse nucléaire (Fawcett *et al.*, 1971). En effet, chez la plupart des espèces, une partie ou la totalité des histones est perdue pendant la spermiogenèse (Palau *et al.*, 1969 ; Vanhoutte-Durand *et al.*, 1977 ; Carroll et Ozaki, 1979 ; Sellos et Legall, 1981). Celles-ci sont remplacées soit directement par la ou les nucléoprotéines spécifiques des spermatozoïdes — protamines ou pseudo protamines — soit par des nucléoprotéines transitoires qui assurent un relai entre les histones et les protamines. Le remplacement direct a été décrit chez la Drosophile (Das *et al.*, 1964 a et b ; Kettaneh et Hartl, 1976), le Criquet (Bloch et Brack, 1964 ; Claypool et Bloch, 1967 ; Chevaillier et Gusse, 1975) et la Truite (Dixon, 1972 ; Dixon *et al.*, 1975 ; latrou et Dixon, 1978) ; le remplacement différé est la règle chez le Grillon (Kaye *et al.*, 1978), la Roussette (Gusse et Chevaillier, 1978), les Urodèles (Echardt et Rislely, 1978), la Souris (Mayer *et al.*, 1980), le Rat (Trostle *et al.*, 1980) et le Bélier (Loir et Lanneau, 1978). Le rôle morphogénétique des nucléoprotéines successives est maintenant démontré, puisqu'il existe une relation précise entre la présence d'une ou plusieurs nucléoprotéines et la forme générale du noyau à un instant de sa morphogenèse chez au moins six mammifères (Courtens et Loir, 1981 a), et qu'une évolution de l'ultrastructure des fibres de chromatine a été remarquée chez un Sélacien (Gusse et Chevaillier, 1980), la Souris (Kierszenbaum et Tres, 1975) et le Bélier (Loir et Courtens, 1979). Leur absence (Kettaneh et Hartl, 1976 ; Baccetti *et al.*, 1977) ou leur alkylation expérimentale (Courtens *et al.*, 1980) entraînent également des anomalies importantes des formes des noyaux.

La seconde thèse considère que la manchette joue un rôle mécanique contraignant le noyau à changer de forme. Elle semble satisfaisante chez les espèces où le noyau des spermatides se spiralise et où les microtubules de la manchette sont disposés dans le creux du pas de l'hélice (McIntosh et Porter, 1967). Malheureusement, chez le Pinson (Fawcett *et al.*, 1971) ou chez quelques vers annélides (Malecha, 1975), les microtubules sont situés au sommet du pas de l'hélice ; chez la plupart des espèces, la manchette, qui n'entoure pas totalement le noyau, ne peut pas jouer le rôle de moule externe qui lui est souvent assigné.

Est-ce à dire que la manchette n'a pas de rôle à jouer dans la morphogenèse nucléaire ? Ceci n'est pas évident quand on considère qu'elle n'est généralement présente que pendant la phase d'allongement des noyaux, ou lorsqu'on observe les relations qui s'établissent entre un microtubule extranucléaire et la chromatine (intranucléaire) immédiatement adjacente. De très nombreux auteurs ont remarqué — leurs écrits ou les microphotographies publiées l'attestent — que le degré de condensation de la chromatine des spermatides est différent au voisinage des microtubules. Au niveau le plus fin, c'est sans doute Stanley *et al.*, (1972), Tokuyasu (1974), et Bergström et Arnold (1974) qui ont montré le mieux cette relation chez la Drosophile et le Poulpe. Chez la Drosophile, les mutations T (I :

2H) 25 (20) y l 25/FM6 (Shoup, 1967) ; SD (Kettaneh et Hartl, 1976 ; Tokuyasu *et al.*, 1977) ; et ms (l) 6 S (Hablison *et al.*, 1977), qui touchent l'organisation des microtubules des spermatides, provoquent également des anomalies de la condensation nucléaires et un dérèglement du remplacement des histones somatiques par les nucléoprotéines spécifiques du spermatozoïde (Kettaneh et Hartl, 1976) chez le mutant SD. La dépolymérisation expérimentale *in vivo* des microtubules de la manchette par le colcémide entraîne les mêmes effets (Wilkinson *et al.*, 1974). Des conséquences comparables sont signalées chez la Souris présentant les mutations T : t (Dooher et Bennett, 1974 ; Hillman et Nadijcka, 1978).

Ces faits, associés à la découverte récente de liens unissant la chromatine intranucléaire à la manchette, au travers de l'enveloppe nucléaire, chez au moins trois mammifères (Courtens et Loir, 1981 b), laissent à penser que la manchette pourrait jouer un rôle « inducteur » (Shoup, 1967 ; Tokuyasu, 1974 ; Malecha, 1975) sur le noyau, soit comme guide, pour redistribuer le contenu nucléaire (Courtens et Loir, 1981 b), (la manchette serait alors équivalente à un demi-fuseau achromatique), soit en orchestrant les remplacements successifs de nucléoprotéines.

Cette dernière hypothèse, très plausible d'après les travaux de Kettaneh et Hartl (1976) et Wilkinson *et al.* (1974) chez la Drosophile, ne trouvait cependant pas de support matériel, jusqu'à la reconnaissance récente d'un « appareil » dévolu aux échanges nucléocytoplasmiques, constitué dans les spermatides de Bélier, Cheval et Verrat par le reticulum endoplasmique, l'enveloppe nucléaire et la manchette (Courtens, 1982 a).

Cet appareil est-il impliqué dans la morphogenèse nucléaire des spermatides ? La manchette joue-t-elle un rôle dans les remplacements de nucléoprotéines ? Nous avons tenté de répondre à ces questions en comparant l'ultrastructure des spermatides de Rats normaux à celle des spermatides de Rats traités par une injection intratesticulaire de colcémide suffisante pour dépolymériser les microtubules de la manchette.

La persistance éventuelle de l'appareil d'échanges nucléocytoplasmiques est recherchée par la technique qui la met le mieux en évidence : l'imprégnation des tissus par la méthode de Thiéry et Rambourg (1976). L'existence et la qualité du remplacement de quelques nucléoprotéines sont mises en évidence par la méthode de Courtens et Loir (1981 c), utilisant la coloration en bloc par l'acide phosphotungstique alcoolique. A titre de référence, les aspects normaux des spermatides de Rat après cette coloration sont ceux décrits par Courtens et Loir (1981 a et c), et la cinétique de dépolymérisation des microtubules est établie à partir des images ultrastructurales.

## Matériel et méthodes.

*Protocole expérimental.* — Afin de déterminer la dose optimale apte à dépolymériser toutes les manchettes présentes, des Rats de 6 à 8 mois reçoivent une injection intratesticulaire de 0,01 ml de tampon phosphate, 0,1 M, pH 7,4 contenant 0, 5, 10, 20, 100, 200 ou 400 µg de colcémide, puis sont castrés 30 min, 1 h, 2 h ... 8 h plus tard sous anesthésie générale à l'éther (4 animaux par

dose et par durée). La dose de 200 µg, jugée la meilleure, est appliquée dans les mêmes conditions à 22 Rats qui sont castrés 5 h (N = 4), 16 h (N = 4), 24 h (N = 4), 48 h (N = 4), 72 h (N = 4) et 96 h (N = 2) après l'injection.

*Ultrastructure.* — Les fragments de testicules fixés par du glutaraldéhyde 4 p. 100 dissous dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 pendant 1 h à 20 °C, puis 23 h à 4 °C, sont postfixés 1 h à 20 °C par 2 p. 100 de tétr oxyde d'osmium dissous dans du tampon phosphate 0,2 M. Après inclusion en Epon 812, les coupes ultrafines sont colorées à l'acétate d'uranyle aqueux puis au citrate de plomb.

*Imprégnation selon la technique de Thiéry et Rambourg (1976).* — Les pièces fixées pendant 1 h à 20 °C par 2 p. 100 de glutaraldéhyde dissous dans du tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2, sont lavées à l'eau distillée pendant 20 min avant d'être imprégnées par une solution aqueuse d'acétate d'uranyle 5 p. 100, pH 4,5, pendant 1 h à 37 °C. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, elles sont incubées dans le citrate mixte de cuivre et de plomb selon Thiéry et Rambourg (1976) pendant 1 h à 37 °C. Elles sont ensuite lavées à l'eau et déshydratées à l'alcool, sans aucune postfixation osmique, avant d'être incluses, polymérisées et coupées en tranches de 0,5 µm d'épaisseur.

*Imprégnation phosphotungstique.* — Après fixation par le glutaraldéhyde à 4 p. 100 dissous dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4, les pièces, lavées à l'eau distillée et déshydratées à l'alcool sont colorées en bloc à 20 °C pendant 16 h par un bain d'acide phosphotungstique (3 p. 100) dans l'éthanol absolu. Elles sont ensuite lavées 2 h dans l'éthanol absolu et incluses dans l'Epon 812. Les coupes ultrafines ne sont pas (sur)colorées avant l'observation.

*Les étapes de la spermiogenèse du Rat* sont celles décrites par Lalli et Clermont (1981).

## Résultats.

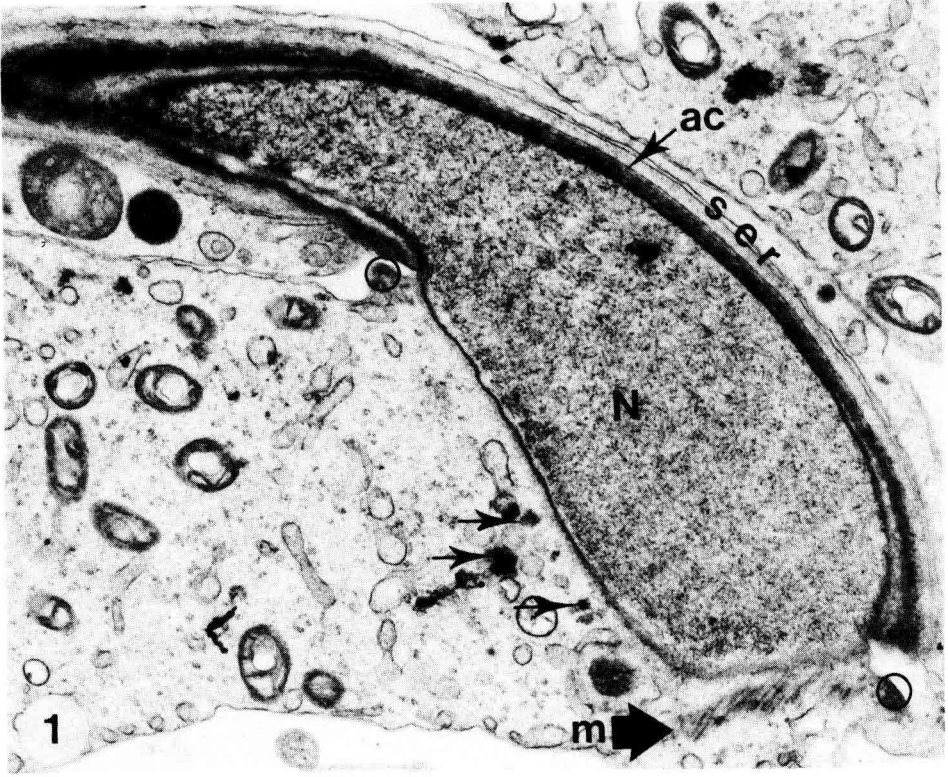
L'injection intratesticulaire de 0,01 ml de tampon phosphate ne modifie ni l'organisation habituelle des tubes séminifères, ni l'aspect des cellules de Sertoli ou celui des cellules germinales. L'ultrastructure des spermatides, leur colorabilité par l'acide phosphotungstique alcoolique ou par la technique de Thiéry et Rambourg (fig. 10) sont comparables à celles de Rats non traités.

Une dépolymérisation pratiquement complète des microtubules de la manchette de toutes les spermatides d'un testicule est obtenue constamment 5 h

FIG. 1. — 5 h après l'injection de 200 µg de colcémide, la manchette (m) de cette spermatide au stade 11 est fortement réduite. En lieu et place, des amas de substance opaque (flèches) sont alignés le long du noyau (N). L'acrosome (ac) fait face au manteau sertolien normal (ser). L'anneau nucléaire (encerclé) est présent. × 13 600.

FIG. 2. — Spermatide au stade 11, 24 h après l'injection. Comparer avec la figure 1. La manchette (m) est maintenant reformée, mais la forme du noyau (M) est très anormale. L'acrosome (ac) est toujours entouré du manteau sertolien (ser). × 5 500.

FIG. 3. — Spermatide au stade 16, d'aspect normal, 24 h après l'injection de colcémide. (ac) : acrosome. × 7 100.



après une injection de 200 µg de colcémide. Des doses 20 fois moindres entraînent parfois le même résultat, mais de manière inconstante d'un animal à l'autre. Par contre, la dose supérieure (400 µg) détruit les microtubules du manteau sertolien et favorise la désorganisation de l'épithélium séminifère. De nombreux îlots cellulaires sont alors observés, dérivant dans la lumière des tubes.

Bien qu'importante, la dose de 200 µg a été choisie, car elle entraîne une destruction rapide de la manchette, qui débute 30 min à 1 h après l'injection et se poursuit pendant 4 à 5 h sans modifier la morphologie du manteau sertolien.

Pendant cette période, des amas amorphes de substance opaque aux électrons sont observés en lieu et place des manchettes des spermatides en allongement (fig. 1). Les enveloppes nucléaires de ces cellules ne sont pas modifiées, pas plus que ne le sont les aspects de la chromatine ou les formes des noyaux, mais l'anneau nucléaire — ceinture qui réunit la manchette à la membrane plasmique, dans la région équatoriale des spermatides en allongement (Rattner et Brinkley, 1972) — disparaît de quelques spermatides en début d'allongement. La coloration des noyaux par l'acide phosphotungstique ne révèle pas de différence avec les témoins (fig. 4). Seules les anatomoses entre le réticulum endoplasmique et le feuillet externe de l'enveloppe nucléaire, qui sont nombreuses chez les témoins (fig. 10), voient leur nombre diminuer de façon dramatique dans chaque coupe de testicule traité par le colcémide.

Les manchettes se reforment et sont observées dans toutes les spermatides en allongement, 6 h et plus après l'injection. Elles sont normales dans les spermatides en fin d'allongement aux stades 14 et 15 ; mais sont très atypiques chez toutes les plus jeunes (du stade 9 au stade 13) (fig. 2). De 6 à 24 h après l'injection, beaucoup de cas de figures sont observés dans ces spermatides : Les microtubules forment parfois des colones indentées profondément dans des invaginations nucléaires (fig. 7-9), ou s'organisent en un disque centré autour du flagelle. Les

FIG. 4, 5, 6. — *Coloration en bloc par l'acide phosphotungstique alcoolique.*

FIG. 4. — *Spermatide au stade 12, 6 h après l'injection.* La manchette (m) se reforme. L'aspect et la colorabilité de la chromatine (N) sont comparables aux témoins (ser) : manteau sertolien. × 3 600.

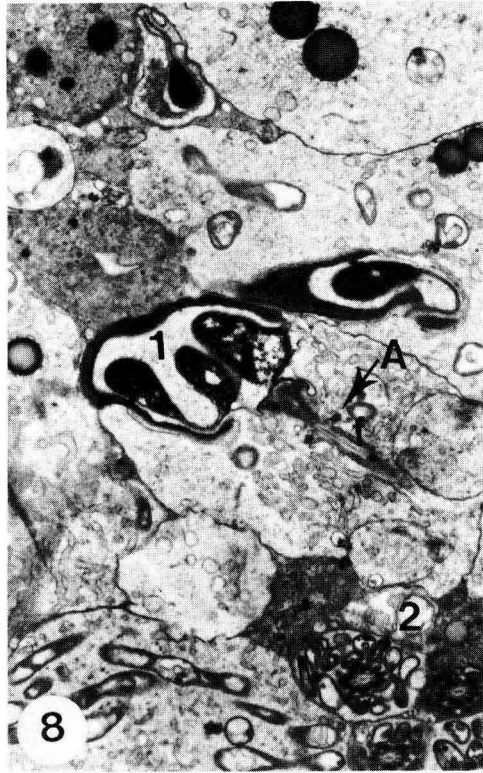
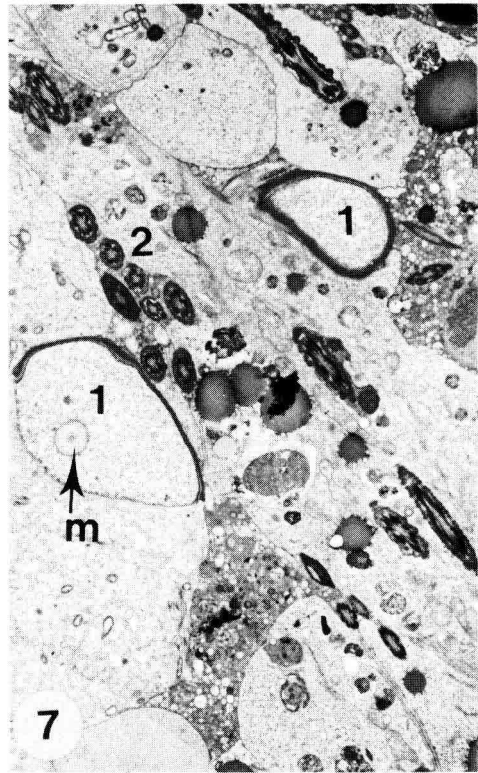
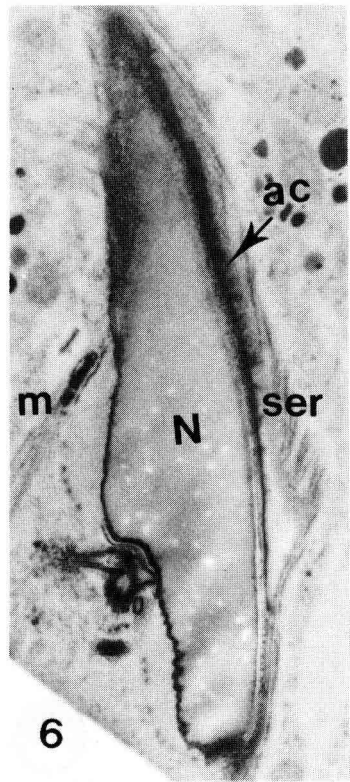
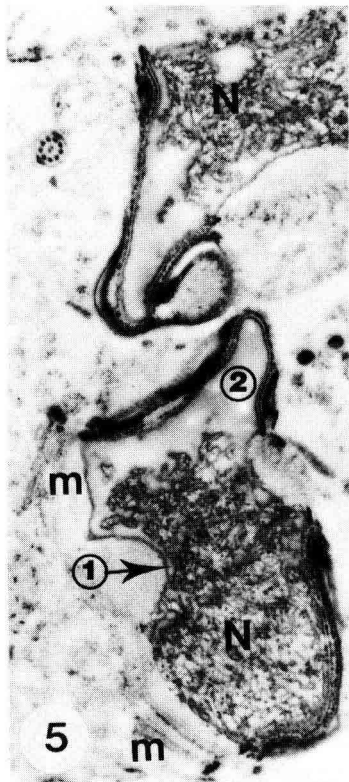
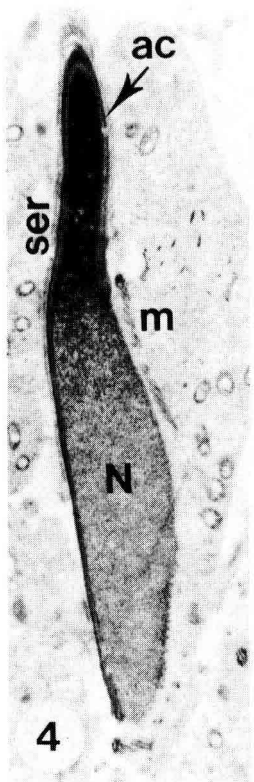
FIG. 5. — *Spermatide aux stades 13-14, 48 h après l'injection.* La manchette très courte (m) est présente près des noyaux difformes (N). La chromatine révèle 2 zones de texture et de colorabilité différentes : 1 : identique à celle des spermatides au stade 13 ; 2 : comparable à celles des spermatides aux stades 15 à 19 (comparer avec les figures 4 et 6). × 8 400.

FIG. 6. — *Spermatide en fin de stade 15, 24 h après l'injection.* La morphologie et la colorabilité cellulaire sont normales. (m) : manchette ; (N) : noyau ; (ac) : acrosome ; (ser) : manteau sertolien. × 5 700.

FIG. 7 et 8. — *Associations cellulaires anormales.*

FIG. 7. — *96 h après l'injection, des spermatides aux stades 11-12 (1) qui devraient normalement être les seules spermatides présentes dans un tube séminifère, sont associées avec des spermatides aux stades 16-19 (2), représentées dans la figure par leurs pièces intermédiaires.* × 2 100.

FIG. 8. — *48 h après le traitement, une spermatide aux stades 14-15 (1) dont le flagelle (f) entouré par l'annulus (A) n'est garni d'aucune mitochondrie, voisine avec des spermatides au stade 16 (2) dont les mitochondries entourent les flagelles.* L'aspect trilobé du noyau est anormal. × 4 500.



formes d'entonnoir irrégulier sont les plus nombreuses (fig. 2 et 5) et l'enveloppe nucléaire est toujours appliquée contre ces manchettes reconstituées. De fait, les formes nucléaires, complémentaires de celles des manchettes, sont également très anormales, au cours des stades 9 à 13 de la spermiogenèse (fig. 2, 5, 7, 9) et les anastomoses entre noyau et reticulum endoplasmique sont rares (fig. 9 et 11). Au contraire, elles sont présentes aux stades 14 et 15 (fig. 12). La colorabilité des noyaux par l'acide phosphotungstique reste comparable à celle des témoins (fig. 6).

La situation se complique 24 h et plus après l'injection, car les spermatozoïdes ronds qui ne possédaient pas de manchette au moment du traitement poursuivent leur différenciation normale et entrent en phase d'allongement. A 24 h, des spermatozoïdes aux stades 13 et 14 sont voisins de cellules aux stades 15 et 16 dans quelques tubes. Les spermatozoïdes aux stades 1 et 15 sont absents après 48 h et plus de traitement ; en même temps, de très nombreuses spermatozoïdes anormales, aux stades 13 et 14, puis 11 à 14, deviennent associées à des spermatozoïdes plus vieilles, aux stades 16 et 17, d'aspect normal (fig. 7 et 8). Le contenu cellulaire des tubes séminifères diffère également de celui des témoins par la présence de nombreuses cellules en mitose et en méiose qui dégénèrent, laissant des « trous » dans la succession des stades de la spermatogenèse. L'observation des stades cellulaires aberrants 48 à 96 h après l'injection montre clairement que les spermatozoïdes arrivées en début d'allongement (stades 9 à 14) au moment du traitement ne poursuivent pas leur différenciation, contrairement aux spermatozoïdes aux stades 15 et 16. Toutefois, beaucoup ne dégénèrent pas dans cette limite de temps, et la colorabilité de leurs noyaux par l'acide phosphotungstique évolue. Certains noyaux présentent à la fois les caractères de noyaux en élancement et les caractères de noyaux beaucoup plus vieux : une partie de leur chromatine fibreuse est fine et se colore bien par l'acide phosphotungstique, tandis que l'autre, compacte et peu colorable, réagit comme celle des noyaux normaux au-delà du stade 15 (fig. 5 et 6). Ce double aspect au sein d'un même noyau ne reflète pas un début de lyse de la chromatine compacte de vieux noyaux, mais bien une condensation

FIG. 9 à 12. — *Coloration en bloc selon la technique de Thiéry et Rambourg.*  
Toutes les colorations nucléaires sont comparables aux témoins de même stade.

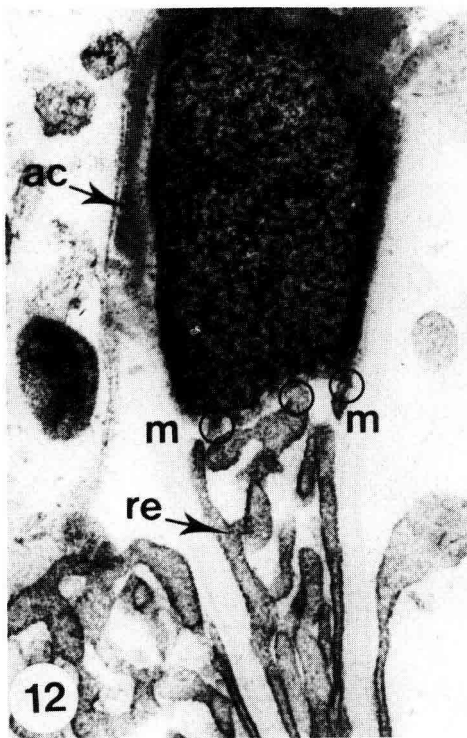
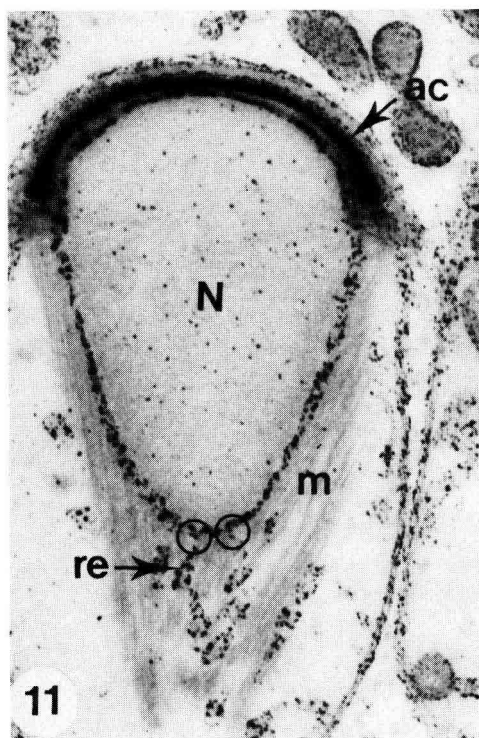
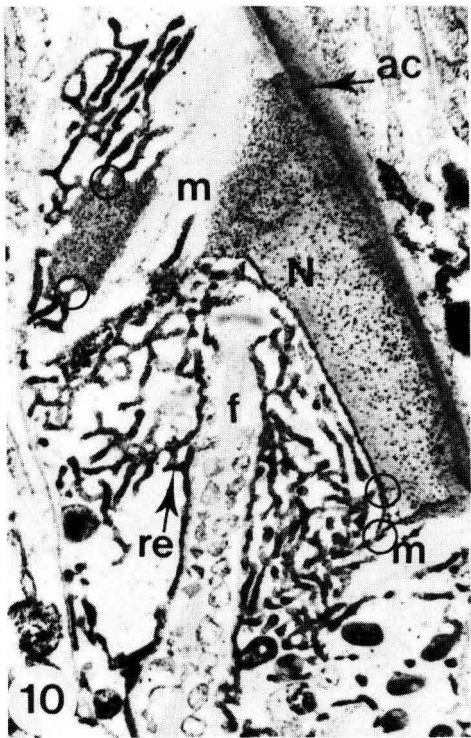
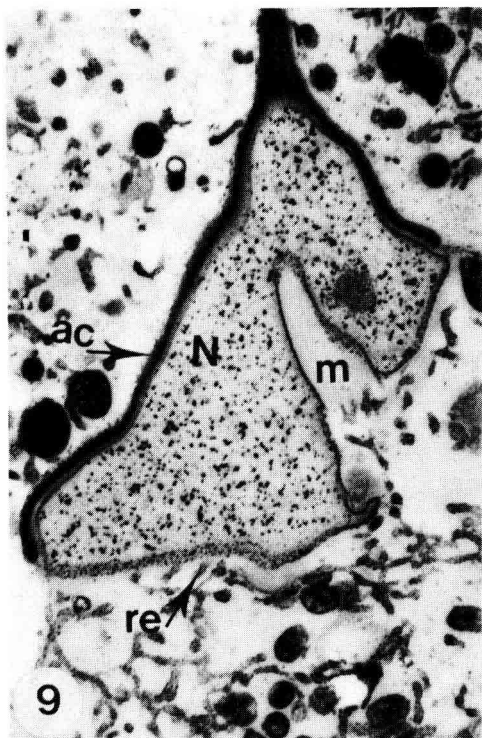
Fig. 9. — 24 h après l'injection de colcémide, cette spermatozoïde au stade 11 présente un noyau (N) déformé par une colonne de microtubules (m). L'acrosome (ac) est également déformé. Aucune continuité entre le noyau et le reticulum endoplasmique (re) n'apparaît (comparer avec la figure 10).  $\times 4\ 900$ .

FIG. 10. — Spermatozoïde au stade 11 ; témoin, 24 h après injection de tampon. Les anastomoses (entourées) entre le noyau (N) et le reticulum endoplasmique (re) sont nombreuses. (m) : manchette ; (ac) : acrosome ; (f) : flagelle.  $\times 5\ 000$ .

FIG. 11. — Seulement quelques anastomoses entre le reticulum endoplasmique (re) et le noyau (N) sont apparentes dans cette spermatozoïde au stade 13, dont la manchette (m) est reconstituée en forme d'entonnoir, 8 h après l'injection de colcémide.  $\times 11\ 000$ .

FIG. 12. — 8 h après l'injection de colcémide, la manchette (m), le reticulum endoplasmique (re) et ses relations avec le noyau (entourées), sont normales dans cette spermatozoïde au stades 14-15 (comparer avec la figure 11).  $\times 12\ 000$ .





précoce ; en effet, la présence d'une manchette autour de ces noyaux atteste de leur âge : il s'agit de spermatozoïdes aux stades 9 à 16 inclusivement.

La présence de vieilles spermatozoïdes normales 24 h et plus après l'injection indique que les spermatozoïdes qui avaient perdu leur manchette aux stades 15 et 16, évoluent sans handicap apparent après l'avoir reconstituée.

## Discussion.

L'action à court terme du colcémide sur la spermiogenèse a été étudiée par McKinnon *et al.* (1973) chez le Rat. Ces auteurs utilisent des doses 10 à 20 fois plus élevées que les nôtres, par voie intrapéritonéale, et obtiennent une ultrastructure de spermatozoïde similaire, au moins dans la limite de temps (24 h) et pour les seuls stades (9 à 11) étudiés. Chez la Souris, Wolosewick et Bryan (1977), ont recours à des doses plus faibles, *in vitro*, mais ne peuvent étudier une cinétique d'action très longue.

Pour une étude à plus long terme, le problème de la dose à injecter est crucial, car il convient d'éviter autant que possible les effets systémiques, et il est souhaitable d'obtenir une cinétique d'action comparable d'un animal à l'autre. C'est pourquoi nous avons utilisé la voie intratesticulaire, qui présente deux avantages : elle favorise un accès rapide à tous les tubes séminifères, et permet de réduire les doses à une concentration mieux tolérable. Elle présente cependant le risque éventuel d'entraîner une desquamation de l'épithélium séminifère ; dans les limites des volumes très faibles injectés présentement, les témoins ne révèlent ni modification particulière de l'organisation interne des tubes séminifères, ni changement notable de la spermiogenèse. La dose de 200 µg, en permettant aux jeunes spermatozoïdes de poursuivre leur développement normal et d'entrer en phase d'élongation, passées les premières 24 h, ne semble pas provoquer d'effet indésirable à moyen terme par des voies détournées. Elle ne modifie ni les contacts entre cellules de Sertoli et spermatozoïdes, ni la micro-architecture du manteau sertolien. Il est donc raisonnable d'envisager que son action, au niveau des spermatozoïdes, passe par la destruction temporaire des manchettes présentes.

Les images d'ultrastructure obtenues 1 à 5 h après l'injection traduisent une perte quasi totale de microtubules des spermatozoïdes, du stade 9 au stade 16, puis comme l'avaient observé McKinnon *et al.* (1973), la reformation d'une manchette anormale, en ce sens que les liens qui réunissent à nouveau les microtubules sont caractéristiques de manchette plus âgée. Dans nos conditions, ni les noyaux ni les manchettes reconstituées dans les spermatozoïdes aux stades 15 et 16 ne sont modifiés. Ceci signifie qu'à ces stades, la forme du noyau ne dépend pas de la présence de la manchette. Dans les cellules plus jeunes, cependant, les microtubules s'unissent entre eux et ainsi qu'à l'enveloppe nucléaire, par des liens, mais ils semblent croître dans des directions anarchiques. Les formes des cellules en début d'allongement, qui épousent et suivent ces directions, révèlent une plasticité étonnante des noyaux, des acrosomes et des manteaux sertoliens, où restent fichées les spermatozoïdes. Il semble donc que les noyaux plus jeunes soient déformables par la nouvelle manchette. Ceci implique que cette manchette soit rigide. Est-ce le cas normalement ? Les seules observations chez les mammifères

permettraient d'affirmer que oui, mais, chez les sauropsidiés (McIntosh et Porter, 1967) ou chez les monotrèmes (Carrick et Hugues, 1981), l'enroulement des microtubules autour du noyau en une hélice à pas variable en fonction du temps, implique une certaine souplesse. Car il semble peu probable qu'une même structure rigide puisse être d'abord courbe, puis devenir droite. Il est plus probable que les liens qui unissent les microtubules de la manchette entre eux la rigidifient. L'édification de la manchette serait alors comparable à un travail de vannerie, qui, partant d'éléments souples, aboutit à une structure plus rigide. L'apparition de ces liens, progressive dans la manchette de l'animal normal, ou brutale dans la manchette reconstituée après le colcémide (McKinnon *et al.*, 1973), permettrait d'expliquer les différences de comportement des noyaux dans ces deux cas. Ceci suppose toutefois que la manchette puisse exercer des contraintes sur le noyau.

Fawcett *et al.* (1971) ont démontré de manière convaincante que la manchette ne pouvait pas mouler le noyau. Cependant, en considérant les liens qui unissent (réellement) la manchette à l'enveloppe nucléaire (McKinnon et Abraham, 1972) et les liens qui unissent (également) la manchette à la chromatine (Courtens et Loir, 1981 b), on conçoit immédiatement que les microtubules extranucléaires puissent imposer des contraintes au contenu du noyau. La manchette devient alors comparable à la moitié d'un appareil mitotique, le long duquel s'organiserait la chromatine (Courtens et Loir, 1981 b). De nombreuses observations permettent de penser que cette hypothèse est fondée :

1. — MacGregor et Walker (1973) et Schmid et Krone (1976) ont montré qu'au cours de la spermiogenèse des urodèles et des oiseaux, les chromosomes se déplacent au sein du noyau comme au cours d'une anaphase.

2. — Les fibres de chromatine s'orientent le plus généralement parallèlement aux microtubules cytoplasmiques. Cette interaction est d'ailleurs encore plus évidente chez les espèces à manchette d'abord hélicoïdale, puis parallèle au noyau (oiseaux (McIntosh et Porter, 1967), monotrèmes (Carrick et Hugues, 1981), hirudinés (Malecha, 1975)), et elle atteint la perfection chez le poule (Bergström et Arnold, 1974). On peut expliquer cette évolution de plusieurs manières qui ne s'excluent pas :

- a) les fibres de chromatine attachées en un point X de l'enveloppe nucléaire et un point Y de la manchette, pourraient parcourir cette dernière pour s'allonger ;
- b) la manchette hélicoïdale pourrait « tourner » autour du noyau comme un écrou pour réaliser la même fonction ;
- c) les variations du pas de l'hélice pourraient également assurer la même fonction ;
- d) le déplacement des chromosomes le long d'une manchette hélicoïdale ou droite, est compatible avec tous les modèles précédents.

L'existence des liens entre la chromatine, l'enveloppe nucléaire et la manchette, est indispensable pour expliquer les déformations importantes de noyaux, lorsque les nouvelles manchettes apparaissent après le traitement au colcémide ; l'absence de déformation de noyaux des plus vieilles spermatozoïdes ne peut s'expliquer que si on considère l'évolution des relations entre manchette et noyau au cours de la spermiogenèse. Cette évolution peut se résumer à une succession

d'événements : 1) Prédifférenciation de l'enveloppe nucléaire. 2) Mise en place des microtubules sur des liens (qui pourraient être des « récepteurs ») à la surface du noyau. 3) Eventuellement, mise en place de l'anneau nucléaire et insertion des microtubules. 4) Multiplication et allongement des microtubules (Courtens et Loir, 1981 b).

Ces interactions itératives, réciproques et progressives entre noyau et microtubules pourraient, si on accepte l'hypothèse de déplacement intranucléaire des fibres de chromatine, et, en conséquence, le déplacement à la surface du noyau des « récepteurs » aux microtubules (les kinétochores ?), expliquer pourquoi les noyaux des spermatides en fin d'allongement ne sont plus modifiables par une nouvelle manchette, puisqu'ils sont déjà modifiés, et sont équivalents de ce fait au contre-moule de la manchette évoluée.

Cette hypothèse suppose que les noyaux les plus vieux soient également les plus stables, ce qui peut faire intervenir la mise en place de nouvelles nucléoprotéines et tout ou partie des échanges nucléocytoplasmiques. Si, comme le montre Courtens (1982 a), un des rôles de la manchette est d'aligner le reticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire pour mettre en place un appareil continu d'échanges nucléocytoplasmiques orientés, on conçoit que toute modification de cet appareil à un instant crucial de la différenciation nucléaire entraînerait des conséquences graves pour le noyau. La perte de nombreuses anastomoses entre le noyau et le reticulum endoplasmique observée ici après destruction de la manchette, révèle que ces relations peuvent jouer un rôle primordial dans la morphogénèse des noyaux, au moins en début d'allongement chez le Rat. Toutefois, aucune modification du contenu nucléaire n'est observée après les colorations par l'acide phosphotungstique alcoolique pendant les premières heures qui suivent le traitement. Ceci peut signifier que le remplacement de quelques nucléoprotéines ne peut s'effectuer qu'en présence d'un appareil d'échanges nucléocytoplasmiques intègre. Au contraire, l'arrivée de la protamine, caractérisée par sa faible colorabilité à l'acide phosphotungstique (Courtens et Loir, 1981) et son effet stabilisateur sur la chromatine, ne semblent pas dépendre de cet appareil, puisque des noyaux « jeunes », dont la différenciation semblait arrêtée, acquièrent quelques caractères cytochimiques de noyaux âgés après 48 heures de traitement, en absence d'anastomosomes entre le reticulum endoplasmique et le noyau. L'indépendance de la protamine vis-à-vis de l'appareil d'échange des nucléoprotéines était déjà suspectée chez le Verrat et le Sanglier (Courtens, 1982 a). La manchette jouerait donc un double rôle : celui de guide de la chromatine et celui de squelette favorisant des échanges orientés entre noyau et cytoplasme. Le déroulement correct et séquentiel de ces échanges favoriserait à son tour la stabilisation progressive des noyaux de spermatides.

On peut opposer à ce schéma, établi et vérifié partiellement chez quelques mammifères, l'absence de la manchette dans de nombreux groupes zoologiques. Une enquête rapide révèle toutefois que le noyau des spermatides est toujours relié à des microtubules : ceux du flagelle, ceux libres autour du noyau, ou ceux de la manchette. Ainsi, chez les éponges (Tuzet *et al.*, 1970), les gastéropodes prosobranches (Garreau de Loubresse, 1971), les acanthocéphales (Marchand et Mattei, 1976), les nématodes (Jamuar, 1966), les chaetognathes (Van Deurs,

1975), de nombreux poissons téléostéens (Stanley, 1969), et les scorpionidés (Jespersen et Hartwick, 1973 ; Phillips, 1974), seul le flagelle est en relation étroite avec le noyau, soit qu'il s'insère dans un canal intranucléaire plus ou moins profond, soit qu'il établisse un contact dans la zone latérale du noyau (Porte et Follenius, 1960 ; Boisson *et al.*, 1968 et 1969). Ces relations semblent avoir une influence sur la structure intranucléaire, puisque chez ces animaux les fibres de chromatine s'orientent parallèlement aux microtubules quand la longueur du contact entre flagelle et noyau est grande, et qu'elles s'orientent radialement quand le flagelle est simplement inséré dans une « fossette » comme chez le Saumon (Zirkin, 1975). Enfin, les premières zones de chromatine qui se condensent sont toujours celles qui sont adjacentes aux microtubules. Un cas remarquable est représenté chez *Albula vulpes* (poisson) où un pseudo-flagelle, issu du centriole proximal, s'applique le long de la courbure principale du noyau (Mattei et Mattei, 1973) et pourrait jouer le rôle de la manchette absente. Des systèmes mixtes groupant une manchette ou son équivalent microtubulaire, et un flagelle, existent chez les mollusques gastéropodes opisthobranches (Walker et McGregor, 1968), chez les prochordés (Tuzet *et al.*, 1972), chez quelques rares poissons (Boisson *et al.*, 1968), et chez les oiseaux colombiformes (Mattei *et al.*, 1972). Selon les étapes de la spermiogenèse, les fibres de chromatine s'orientent par rapport à l'un ou l'autre des systèmes, le second prenant parfois le relai du premier (Tuzet *et al.*, 1972). Dans les cas aussi remarquables que ceux des gastéropodes opisthobranches, il est difficile de déterminer lequel des systèmes microtubulaires joue le rôle principal, tant la formation temporelle et spatiale des hélices, nucléaire, flagellaire et microtubulaire, est intriquée (Kubo et Ishikawa, 1981).

Une relation précise entre la présence de tel type de système microtubulaire autour du noyau et celle de nucléoprotéines particulières ne peut être établie actuellement, faute de connaissance de la biochimie nucléaire chez beaucoup d'espèces. Toutefois, le modèle de relations entre microtubules et noyau que nous proposons chez les mammifères semble également applicable à beaucoup d'autres espèces (pour une revue plus exhaustive, voir Courtens, 1982 b). Il pourrait expliquer une forme de stérilité chez l'homme, qui se traduit dans les faits par l'absence de manchette dans les spermatides, et un noyau de spermatozoïde qui reste rond et contient de nucléoprotéines typiques de jeunes spermatozoïdes (Baccetti *et al.*, 1977).

Reçu en mars 1982.

Accepté en avril 1982.

## Références

- BACCETTI B., RENIERI T., ROSATI F., SELMI M. G., CASANOVA S., 1977. Further observations on the morphogenesis of the round headed human spermatozoa. *Andrologia*, **9**, 255-264.
- BERGSTRÖM B. H., ARNOLD J. M., 1974. Nonkinetochore association of chromatin and microtubules. A preliminary note. *J. Cell Biol.*, **62**, 917-920.

- BLOCH D. P., BRACK S. D., 1964. Evidence for the cytoplasmic synthesis of nuclear histones during spermiogenesis in the grasshopper *Chortophaga viridifasciata*. *J. Cell Biol.*, **22**, 327-340.
- BOISSON C., MATTEI X., MATTEI C., 1968. Le spermatozoïde de *Dactylopterus volitans*, Linné (Poisson Cephalacantidae), étudié au microscope électronique. *C. R. Soc. Biol.*, **3**, 820-823.
- BOISSON C., MATTEI X., MATTEI C., 1968. La spermiogenèse de *Rhinobatus cemiculus* Geof. St-Hilaire (Selacien Rhinobatidae). Etude au microscope électronique. *Bull. I.F.A.N.*, T. **XXX**, sér. A, n° 2, 659-690.
- BOISSON C., MATTEI X., MATTEI C., 1969. Mise en place et évolution du complexe centriolaire au cours de la spermiogenèse d'*Upeneus prayensis* c.v (Poisson mullidae). *J. Microscopie*, **8**, 103-113.
- CARRICK F. N., HUGUES R. L., 1981. Aspects of the structure and development of monotreme spermatozoa and their relevance to the evolution of mammalian sperm morphology. *Cell Tissue Res.*, **222**, 127-141.
- CARROLL A. G., OZAKI M., 1979. Changes in the histones of the sea urchin *Strongylocentrus purpuratus* at fertilization. *Exp. Cell Res.*, **119**, 307-315.
- CHEVAILLIER P. H., 1967. Mise en évidence et étude cytochimique d'une protéine basique extra-nucléaire dans les spermatozoïdes des crustacés décapodes. *J. Cell Biol.*, **32**, 547-556.
- CHEVAILLIER P., GUSSE M., 1975. Evolution de la composition chimique et de la structure fine de la chromatine au cours de la spermiogenèse du Criquet *Locusta migratoria*. *J. Microscopie Biol. cell.*, **23**, 153-164.
- CLAYPOOL C. J., BLOCH D. P., 1967. Synthesis of ribonucleic acid and histone change during spermatogenesis in the grasshopper *Chortophaga viridifasciata*. *Nature*, **215**, 966-967.
- COURTENS J. L., 1982 a. Some nucleocytoplasmic exchanges during spermiogenesis of boar, ram and stallion. *Gamete Res.*, **5**, 137-152.
- COURTENS J. L., 1982 b. Thèse Sci. nat. (en préparation).
- COURTENS J. L., AMIR D., DURAND J., 1980. Abnormal spermiogenesis in bulls treated with ethylene dibromide : an ultrastructural and ultracytochemical study. *J. Ultrastr. Res.*, **71**, 103-115.
- COURTENS J. L., LOIR M., 1981 a. A cytochemical study of nuclear changes in boar, goat, mouse, rat and stallion spermatids. *J. Ultrastr. Res.*, **74**, 327-340.
- COURTENS J. L., LOIR M., 1981 b. The spermatid manchette of mammals : formation and relations with the nuclear envelope and the chromatin. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **21**, 467-477.
- COURTENS J. L., LOIR M., 1981 c. Ultrastructural detection of basic nucleoproteins : alcoholic phosphotungstic acid does not bind to arginine residues. *J. Ultrastr. Res.*, **74**, 322-326.
- DAS C. C., KAUFMAN B. P., GAY H., 1964 a. Histone-protein transition in *Drosophila melanogaster*. I. Changes during spermatogenesis. *Exp. Cell Res.*, **35**, 507-514.
- DAS C. C., KAUFMANN B. P., GAY H., 1964 b. Autoradiographic evidence of synthesis of an arginine-rich histones during spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **204**, 1008-1009.
- DIXON G. H., 1972. The basic protein of trout testis chromatin. Aspects of their synthesis post-synthetic modifications and binding to DNA. *Acta endocrinol.*, **168**, 130-154.
- DIXON G. H., CANDIDO E. P. M., HONDA B. M., LOVIE A. J., MacLEOD A. R., SUNG M. T., 1975. The biological roles of post synthetic modifications of basic nuclear proteins. In « The structure and function of chromatin ». *Ciba Found. Symp.*, **28**, 229-258.
- DOOHER G. B., BENNETT D., 1974. Abnormal microtubular systems in mouse spermatids associated with a mutant gene at the T-locus. *J. Embryol. exp. Morph.*, **32**, 749-761.
- ECKARDT R. A., RISLEY M. S., 1978. Histone replacement during spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.*, **70**, 262 a.
- FAWCETT D. W., ANDERSON W., PHILLIPS D. M., 1971. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm-head. *Developmental Biol.*, **26**, 220-251.
- GARREAU de LOUBRESSE N., 1971. Spermiogenèse d'un gasteropode prosobranche : *Nerita senegalensis* ; évolution du canal intranucléaire. *J. Microscopie*, **12**, 425-440.
- GUSSE M., CHEVAILLIER Ph., 1978. Etude ultrastructurale et chimique de la chromatine au cours de la spermiogenèse de la Roussette *Scylliorhinus caniculus*. *Cytobiologie*, **16**, 421-443.
- GUSSE M., CHEVAILLIER Ph., 1980. Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatin. *J. Cell Biol.*, **87**, 280-284.

- HABLISON D. L., STANLEY H. P., BOWMAN J. T., 1977. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* : the effects of abnormal association of centrosome and nucleus in mutant ms(1)65<sup>1</sup>. *J. Ultrastr. Res.*, **60**, 221-234.
- HILLMAN N., NADIJCKA M., 1978. A comparative study of spermiogenesis in wild-type and T : t-bearing mice. *J. Embryol. exp. Morph.*, **44**, 243-261.
- IATROU K., DIXON G. H., 1978. Protamine messenger RNA : its life history during spermatogenesis in the rainbow trout. *Fed. Proc.*, **37**, 2526-2533.
- JAMUAR M. P., 1966. Studies of spermiogenesis in a nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Cell Biol.*, **31**, 381-396.
- JESPERSEN A., HARTWICK R., 1973. Fine structure of spermiogenesis in scorpions from the family Vejovidae. *J. Ultrastr. Res.*, **45**, 366-383.
- KAYE J. S., MacMASTER-KAYE R., MOSS S. B., 1978. Fractionation of cricket testis nuclei on gradients of colloidal silica for study of basic protein changes during spermiogenesis. *Exp. Cell Res.*, **117**, 245-252.
- KETTANEH N. P., HARTL D. L., 1976. Histone transition during spermiogenesis is absent in segregation distorter males of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **193**, 1020-1021.
- KIERSZENBAUM A. L., TRES L. L., 1975. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J. Cell Biol.*, **65**, 258-270.
- KUBO M., ISHIKAWA M., 1981. Organization of the acrosome and helical structures in sperm of the Aplysiid, *Aplysia kurodai* (Gastropoda, opisthobranchia). *Differentiation*, **20**, 131-140.
- LALLI M., CLERMONT Y., 1981. Structural changes of the head components of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Amer. J. Anat.*, **160**, 419-434.
- LOIR M., COURTENS J. L., 1979. Nuclear reorganization in ram spermatids. *J. Ultrastr. Res.*, **67**, 309-324.
- LOIR M., LANNEAU M., 1978. Partial characterization of ram spermatid basic nuclear proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **80**, 975-982.
- MacGREGOR H. C., WALKER M. H., 1973. The arrangement of chromosomes in nuclei of sperm from plethodontic salamanders. *Chromosoma*, **40**, 243-262.
- McINTOSH J. R., PORTER K. R., 1967. Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. *J. Cell Biol.*, **35**, 153-173.
- McKINNON E. A., ABRAHAM P. J., 1972. The manchette in stage 14 rat spermatids : a possible structural relationship with the redundant nuclear envelope. *Z. Zellforsch.*, **124**, 1-11.
- McKINNON E. A., ABRAHAM P. J., SVATEK A., 1973. Long link induction between the microtubules of the manchette in intermediate stages of spermiogenesis. *Z. Zellforsch.*, **136**, 447-460.
- MALECHA J., 1975. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse de *Piscicola geometra* L. (Hirudinee Rhynchobdelle). *J. Ultrastr. Res.*, **51**, 188-203.
- MARCHAND B., MATTEI X., 1976. La spermiogenèse des Acanthocéphales. L'appareil centriolaire et flagellaire au cours de la spermiogenèse d'*Illiosentis urcatus* var *africana* Golvan, 1956 (Paleacanthocephala, Rhadinorhynchidae). *J. Ultrastr. Res.*, **54**, 347-358.
- MATTEI C., MATTEI X., 1973. La spermiogenèse d'*Albula vulpes* (L. 1758) (Poisson Albulidae). Etude ultrastructurale. *Z. Zellforsch.*, **142**, 171-192.
- MATTEI C., MATTEI X., MANFREDI J. L., 1972. Electron microscope study of the spermiogenesis of *Streptopelia rosegrisea*. *J. submicrosc. Cytol.*, **4**, 57-73.
- MAYER J. F., CHANG T. S. K., ZIRKIN B. R., 1980. Amino acid incorporation into basic nucleoproteins of mouse spermatids and spermatozoa. *J. Cell Biol.*, **87**, 146 a.
- PALAU J., RUIZ-CARILLO A., SUBIRANA J. A., 1969. Histones from sperm of the sea urchin *Arbacia lixula*. *Eur. J. Biochem.*, **7**, 209-213.
- PHILLIPS D. M., 1974. Nuclear shaping in the absence of microtubules in scorpion spermatids. *J. Cell Biol.*, **62**, 911-917.
- PORTE A., FOLLENIUS E., 1960. La spermatogenèse chez *Lebistes reticulatus*. Etude au microscope électronique. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **85**, 82-89.
- RATTNER J. B., BRINKLEY B. R., 1972. Ultrastructure of mammalian spermiogenesis. III. The organization and morphogenesis of the manchette during rodent spermiogenesis. *J. Ultrastr. Res.*, **41**, 209-218.

- SCHMID M., KRONE W., 1976. The relationship of a specific chromosomal region to the development of the acrosome. *Chromosoma*, **56**, 327-347.
- SELLOS D., LEGAL Y., 1981. Changes in basic nuclear proteins during sperm maturation in *Palaemon Serratus* (Crustacea natantia). *Cell Differentiation*, **10**, 69-77.
- SHOUP J. R., 1967. Spermiogenesis in wild type and in a male sterile mutant of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.*, **32**, 663-675.
- STANLEY H. P., 1969. An electron microscope study of spermiogenesis in the teleost fish *Oligocottus maculosus*. *J. Ultrastr. Res.*, **27**, 230-243.
- STANLEY H. P., BOWMAN J. T., ROMRELL I. J., REED S. C., WILKINSON R. F., 1972. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastr. Res.*, **41**, 433-466.
- THIÉRY G., RAMBOURG A., 1976. A new staining technique for studying thick sections in the electron microscope. *J. Micros. Biol. cell.*, **26**, 103-106.
- TOKUYASU K. T., 1974. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. IV. Nuclear transformation. *J. Ultrastr. Res.*, **48**, 284-303.
- TOKUYASU K. T., PEACOCK W. J., HARDY R. W., 1977. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VII. Effects of segregation disorder (S.D.) chromosome. *J. Ultrastr. Res.*, **58**, 96-107.
- TROSTLE P. K., BROCK W. A., MEISTRICH M. L., 1980. Developmental related changes in rat testis histone composition analysed by acid urea, triton X-100, polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Cell Biol.*, **83**, 229 a.
- TUZET O., BOGORAZE D., LAFARGUE F., 1972. Recherches ultrastructurales sur la spermiogénèse de *Diplosoma listerianum* (Milne-Edwards, 1841) et *Lissoclinum pseudoleptoclinum* (Von Drasche, 1883) (Ascidies composées, aplousobranches). *Ann. Sci. nat. Zool. Paris*, 12<sup>e</sup> sér., Tome **XIV**, 177-190.
- TUZET O., GARONNE R., PAVANS de CECCATTY M., 1970. Observations ultrastructurales sur la spermatogénèse chez la démosponge *Aplysilla rosea* (Schylze) (dendroceratide) : une métaplasie exemplaire. *Ann. Sci. nat. Zool., Paris*, 12<sup>e</sup> sér., Tome **XII**, 27-50.
- VAN DEURS B., 1975. Chromatin condensation and nuclear elongation in the absence of microtubules in Chaetognath spermatids. *J. submicr. Cytol.*, **7**, 133-138.
- VANHOUTTE-DURAND G., MIZON J., SAUTIERE P., BISERTE G., 1977. Histones from gonads of the starfish *Asteria rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **57**, 121-126.
- VAUGHN J. C., THOMSON L. A., 1972. A kinetic study of DNA and basic protein metabolism during spermatogenesis in the sand crab, *Emerita analoga*. *J. Cell Biol.*, **52**, 322-327.
- WALKER M., MacGREGOR H. C., 1968. Spermatogenesis and the structure of the mature sperm in *Nucella lapillus* (L). *J. Cell Sci.*, **3**, 95-104.
- WILKINSON R. F., STANLEY H. P., BOWMAN J. T., 1974. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* : the effects of abnormal cytoplasmic microtubules population in mutant ms(3) IO R and its colcemid-induced phenocopy. *J. Ultrastr. Res.*, **48**, 242-258.
- WOLOSEWICK J. J., BRYAN J. H. D., 1977. Ultrastructural characterization of the manchette microtubules in the seminiferous epithelium of the mouse. *Am. J. Anat.*, **150**, 301-332.
- ZIRKIN B. R., 1975. The ultrastructure of nuclear differentiation during spermiogenesis in the salmon. *J. Ultrastr. Res.*, **50**, 174-184.
-