

La spermatide, cette méconnue

J.P. DADOUNE

*Service d'Histologie, Biologie de la Reproduction et Cytogénétique, Hôpital Tenon,
4 rue de la Chine, 75020 Paris.*

RESUME

L'usage de la micro-insémination ovocytaire de spermatides rondes ou allongées, dans certains cas d'infertilité masculine, nécessite de reconsidérer la séquence des modifications morphologiques et fonctionnelles qui surviennent durant la spermiogenèse. Cet article a pour objet de passer en revue les acquisitions essentielles sur la morphogenèse des spermatides, l'expression du génome au cours de la différenciation des spermatozoïdes et les interactions cellulaires entre les spermatides elles-mêmes et entre les spermatides et les cellules de Sertoli. Il apparaît que les spermatides rondes et les spermatides allongées représentent deux classes de cellules structurellement et fonctionnellement différentes. Une interrogation demeure : sur quels critères peut-on affirmer qu'une spermatide ronde est fonctionnellement normale quand il y a arrêt ou altération de la spermiogenèse ?

Mots clés : *spermatides - micro-insémination ovocytaire.*

Les travaux les plus anciens, dont quelques uns datent de plus d'un siècle, attestent que la spermatide est loin d'être inconnue. Le terme est mentionné pour la première fois en 1885 dans une étude de von La Valette St Georges [58], et Branca, dès 1924, [8] a

décrit magistralement non seulement les différentes étapes de la transformation des spermatides mais aussi les anomalies de la spermiogenèse chez l'homme. Cependant, depuis une décennie, de nombreuses investigations fondées sur les techniques de la biologie cellulaire et moléculaire et du génie génétique ont mis en lumière, au delà des particularités structurales des spermatides, la complexité du fonctionnement cellulaire.

L'usage récent de l'injection intra-ovocytaire de spermatides rondes ou allongées dans certains cas d'infertilité masculine [22, 23, 47, 50, 51, 55] exige de reconsidérer, de manière approfondie, la séquence des modifications structurales et fonctionnelles qui surviennent au cours de la spermiogenèse.

MORPHOGENESE DES SPERMATIDES

Dans les conditions physiologiques, la transmission de génome paternel à l'ovocyte au moment de la fécondation nécessite le développement du système acrosomique, le remaniement du noyau et des structures périnucléaires, l'assemblage des structures flagellaires et la réorganisation topographique de la surface cellulaire.

La métamorphose des spermatides en spermatozoïdes est un processus lent qui dure environ 23 jours chez l'homme [27]. Les stades successifs de différenciation des spermatides, cellules haploïdes post-méiotiques, sont identifiables grâce à leurs

caractéristiques cytologiques et à leur localisation définie et constante dans les six stades du cycle de l'épithélium séminal [11]. Six types de spermatides ont été distingués en fonction de la forme du noyau, de l'aspect de la chromatine et de la morphologie générale de la cellule : Sa, Sb1 (spermatides rondes), Sb2, Sc (spermatides en élévation), Sd1, Sd2 (spermatides matures), [26, 27]. Quand la recherche de cellules germinales dans le testicule impose de recourir à la biopsie testiculaire, la technique d'apposition du fragment biopsique sur lame permet la reconnaissance rapide de chacun des types (Figure 1).

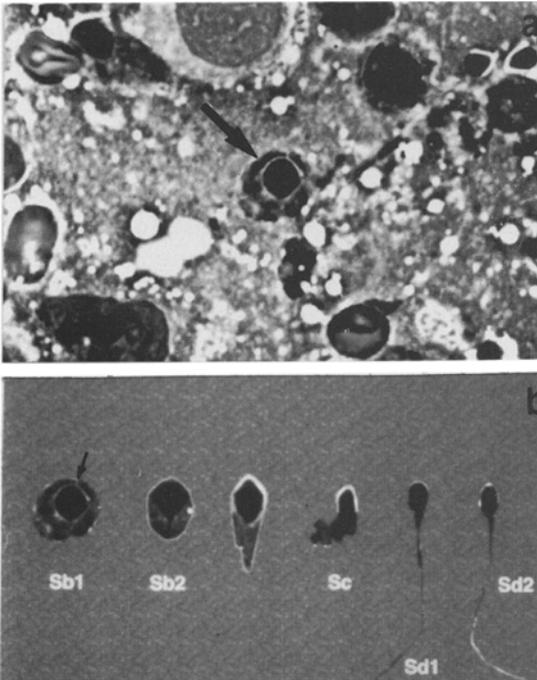


Figure 1 : Apposition de fragment de biopsie testiculaire fixée et colorée par la technique de Harris - Schorr : a) Mise en évidence d'une spermatide au stade Sb1 (\times) ; b) Le traitement par ordinateur de différents clichés représentant les stades successifs de la spermiogénèse a permis de reconstituer la séquence de cinq d'entre eux. Le stade Sa qui ne figure pas sur la photo renferme un noyau vésiculeux et clair, encore dépourvu de la cape acrosomique telle qu'elle apparaît au stade Sb1 (\times). Les spermatides rondes ont un diamètre moyen de 10 μ m.

1. Réorganisation du noyau

Les remaniements nucléaires, qui sont l'une des caractéristiques majeures de la spermiogénèse, ont conduit à regrouper les 8 stades identifiés au microscope électronique chez l'homme [28] en trois familles :

- les jeunes spermatides avec des noyaux ronds (stade 1 : phase de Golgi ; stade 2 : phase de la cape) ;
- les spermatides intermédiaires avec des noyaux en élévation (stades 3, 4, 5 : phase de l'acrosome) et ;
- les spermatides matures avec des noyaux condensés (stades 6, 7, 8 : phase de maturation).

a) Modifications de la forme nucléaire et de la texture de la chromatine

La cytométrie d'image appliquée à des micrographies électroniques, fournit des données objectives sur le modelage de la tête du spermatozoïde, l'état global de la condensation et la texture de la chromatine. Il apparaît que les paramètres morphométriques (surface, longueur, largeur, périmètre du noyau), diminuent du stade 2 au stade 8. D'autre part, la condensation de la chromatine débute dans la partie postérieure du noyau et reste prédominante dans cette région jusqu'à la fin de la spermiogénèse.

La représentation en nuages des populations de spermatides après analyse discriminante montre que le processus de maturation nucléaire est continu avec une tendance à l'homogénéisation des populations à partir du stade 5. Cependant, le stade 3/4 est un stade déterminant de la transformation nucléaire au cours de la spermiogénèse (Figure 2). Il correspond à d'importantes modifications de l'équipement en nucléoprotéines basiques associées à l'ADN [2].

b) Nucléoprotéines basiques (NPBs) des spermatides

Les changements structuraux de la chromatine sont concomitants des modifications biochimiques des nucléoprotéines basiques.

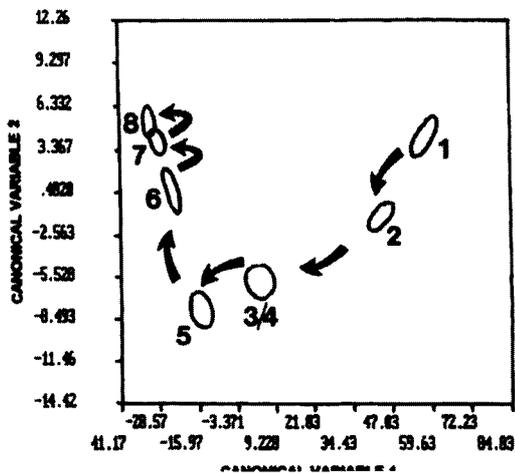


Figure 2 : Représentation de la séquence de différenciation des noyaux de spermatides humaines, du stade 1 au stade 8 de la spermiogenèse. L'analyse discriminante des populations cellulaires a été réalisée en exprimant un facteur discriminant 2 en fonction d'un facteur discriminant 1, chacun étant la combinaison possible de variables considérées comme les plus déterminantes. Noter l'apparition dans le plan factoriel des ellipses de confiance suivant la chronologie de la séquence biologique et la situation particulière du stade 3/4 (direction des stades 1-2 orthogonale à la direction des stades 5-8) [2].

Les histones de type somatique riches en résidus lysine et présentes dans les stades précoces de la spermiogenèse sont remplacées par des protéines de transition qui sont, à leur tour, déplacées par les protamines riches en résidus cystéine (double transition protéique) [24].

Les histones de type somatique (H1, H2A, H2 B, H3, H4) et la plupart de leurs variants testicule - spécifiques sont élaborés durant la prophase méiotique. Cependant, la synthèse de variants dans les spermatides rondes et en particulier de TH2 B, variant de l'histone H2B, a été établie chez le rat (54).

Les protéines de transition sont caractérisées par une basicité élevée en relation avec la quantité importante des résidus

lysine et histidine. Deux protéines de transition TP1 (54 acides aminés) et TP2 (137 acides aminés) ont été identifiées chez l'homme. Leurs séquences ont été déduites respectivement de l'ADNc de TP1 [31] et de l'ADNc de TP2 [45]. TP1 pourrait jouer un rôle dans la relaxation de la chromatine [53] alors que TP2 serait impliquée dans la condensation [4].

On distingue deux familles de protamines : P1 et P2. Les protéines des deux familles sont riches en arginine et en cystéine mais diffèrent par leur montant relatif en histidine et tyrosine. Parmi les quatre protamines humaines (HP1, HP2, HP3, HP4), HP1 représente la famille P1 et HP2, HP3 et HP4 appartiennent à la famille P2. P1 est constituée de 50 résidus avec un cœur central riche en arginine. Les protamines P2 sont constituées de 54 à 58 résidus. Elles diffèrent par leur portion N-terminale. Elles sont plus riches en histidine que P1 et contiennent des amas de 3 à 4 arginines régulièrement distribués le long de la molécule [3, 24]. Durant le transport du cytoplasme vers le noyau, les protamines sont phosphorylées. Ensuite, après leur liaison avec l'ADN, elles sont déphosphorylées [37]. L'interaction inter- et intra-protamines due à la formation de ponts disulfures entre les résidus cystéine favorise la compaction de l'ADN [59].

Le rôle fonctionnel de la stabilité de la chromatine reste hypothétique. Le noyau fortement compacté, et de ce fait rigide, faciliterait le passage des spermatozoïdes à travers les enveloppes péri-ovocytaires, lors de la fécondation. De nombreux travaux ont montré la relation entre l'état de condensation de la chromatine des spermatozoïdes éjaculés et la fertilité masculine. Ils ont été à l'origine de la mise au point de diverses méthodes d'évaluation de la qualité nucléaire dont certaines sont réalisées au cours de l'exploration de l'homme infécond [14].

c) Structure et devenir du nucléole

L'organisation ultrastructurale du nucléole dans les spermatides rondes de l'homme n'est pas conforme à celle observée dans les cellules somatiques, la cellule de Sertoli par exemple : il est dépourvu de centre fibrillaire clair. Pourtant, l'activité transcriptionnelle de cet organite est hautement probable, du fait de la détection de gènes ribosomiques dans les composants fibrillaires nucléolaires, après hybridation *in situ* avec des sondes d'ADN ribosomique [17].

Ultérieurement, dans les spermatides en élongation, le nucléole se fragmente avant de disparaître complètement. Il n'est pas exclu que du matériel en provenance des composants nucléolaires s'accumule dans les espaces nucléaires postérieurs avant d'être éliminé du noyau [15-17].

d) L'organisation des chromosomes

L'immunomarquage des protéines centromériques suivi de l'observation en microscopie confocale suggère un arrangement spécifique des chromosomes dans les spermatides rondes et intermédiaires chez le lapin [13]. A l'appui de cette hypothèse, une étude réalisée sur les noyaux décondensés des spermatozoïdes humains éjaculés a montré que les centromères des chromosomes non homologues constituent un chromocentre compact enfoui dans la profondeur du noyau alors que les régions télomériques sont localisées sur la face interne de la membrane nucléaire [63]. Une telle organisation des chromosomes pourrait être impliquée dans la formation du pronucleus mâle.

e) Membrane nucléaire

Au cours de la phase de maturation des spermatides, les complexes de pores nucléaires sont redistribués sur les replis postérieurs de la membrane nucléaire. Leur disparition sur le reste de l'enveloppe nucléaire coïncide avec la décroissance du métabolisme cellulaire et du trafic nucléo-

cytoplasmique. La périphérie du noyau est dépourvue de lame fibreuse. Cependant, la persistance de lamine B, qui est présente dans les cellules germinales préméiotiques et méiotiques, a été notée dans les spermatides rondes chez la souris, suggérant que la lamine B, joue un rôle dans la distribution des complexes des pores nucléaires et/ou la réorganisation de la chromatine [34].

2. Organites transitoires

La spermiogenèse est caractérisée par la présence d'organites transitoires dont le rôle est incertain et le devenir inconnu. L'un de ces organites, le corps chromatôïde, est localisé dans le cytoplasme des spermatides rondes, en contact étroit avec l'enveloppe nucléaire riche en complexes de pores. Il disparaît ensuite du cytoplasme des spermatides allongées. Le corps chromatôïde contient de l'actine, de l'ARN à demi-vie longue, des protéines basiques, des particules de ribonucléoprotéines ainsi que des polysaccharides [39] et des cations (magnésium, calcium) [7].

La manchette est un autre organite transitoire, visible dans les spermatides en élongation et disparaissant bien en avant la fin de la spermiogenèse. Elle est constituée de microtubules qui forment une sorte de demi-fuseau mitotique disposé autour de la région caudale du noyau. La manchette, reliée par un tractus filamentaire à l'enveloppe nucléaire et à la chromatine, pourrait exercer une contrainte externe sur la forme nucléaire, en glissant progressivement vers la base du noyau [2]. Une cytokératine, la Sak 57 ("Sperm Associated Keratin") d'un poids moléculaire de 57 kDa est associée aux microtubules et pourrait ainsi participer au déterminisme de la forme nucléaire. Après élongation du noyau de la spermatide, cette protéine migre le long de l'axonème pour contribuer à la formation des fibres denses [52]. D'autre part, une autre protéine spécifique Spnr ("Spermatid per-

inuclear RNA - binding protein") de 71 kDa, qui agirait sur le transport de l'ARN ou le contrôle traductionnel dans les spermatides, a été mise en évidence au niveau de la manchette chez la souris [46].

Les lamelles annelées sont au nombre des organites transitoires dont le rôle fonctionnel n'est pas élucidé. Formées de citernes fenêtrées de réticulum endoplasmique granulaire, elles persistent temporairement au voisinage des replis postérieurs de la membrane nucléaire, dans la région de jonction entre la tête et la queue du spermatozoïde.

3. Assemblage des structures flagellaires

Le développement du flagelle commence précocement au cours de la spermiogenèse. Les deux centrioles en forme de T et les microtubules constituant l'axonème sont visibles à la périphérie du cytoplasme des spermatides rondes. Le centriole proximal est une structure déterminante pour la première division du zygote. En effet, le centrosome du spermatozoïde constitué par le centriole proximal et les protéines associées (centrine, péricentrine) est à l'origine de la formation du spermastère. Les microtubules en provenance de l'ovocyte s'agrègent sur le centriole. Le pronucleus femelle est entraîné vers le centre du spermastère, probablement sous l'influence des protéines dynéine-like associées aux microtubules. Dans la zone d'apposition des deux pronucléi, le centrosome se divise puis le premier fuseau mitotique apparaît [36].

Après migration de l'ébauche flagellaire dans la fossette d'implantation, au pôle postérieur du noyau, les différentes portions du flagelle apparaissent de manière ordonnée. Au cours de la formation du flagelle, il faut également souligner la présence d'autres structures transitoires dont le rôle et la destinée sont inconnues : l'adjoint centriolaire annexé au centriole proximal, le corps associé au centriole distal, le corps associé à l'annulus, le corps fusiforme, dis-

posé autour de l'axonème à l'intérieur de la pièce intermédiaire.

EXPRESSION DU GÉNOME AU COURS DE LA SPERMIOGENÈSE

1. Gènes et protooncogènes

Trois classes de gènes sont exprimées au cours de la spermiogenèse :

- les gènes testicule-spécifiques dans les spermatides rondes ;
- les gènes codant pour des isotypes testicule - spécifiques dans les spermatocytes et les spermatides et
- des gènes dont l'expression est modifiée dans le testicule [60].

Les gènes testicule - spécifiques codant pour les protéines de transition et les protamines sont exprimés uniquement dans les spermatides rondes. Un certain nombre de gènes codant pour des protéines cytoplasmiques telles que les isoenzymes acrosomiques, les antigènes acrosomiques spermatozoïde - spécifiques, la phosphoglycérate kinase 2 et des isotypes de l'actine et de la tubuline sont aussi transcrits dans les cellules germinales haploïdes [25]. En outre, quelques produits de protooncogènes, tels *c-mos*, *pim-1*, deux protéine-kinases, et *Wnt1*, une protéine d'adhésivité cellulaire, sont exprimés séquentiellement au cours de la spermiogenèse [61].

2. Empreinte génomique parentale

L'empreinte génomique parentale se rapporte au fait qu'un phénotype contrôlé par un gène ou un groupe de gènes se manifeste en fonction de l'origine parentale du gène ou du groupe de gènes en question. L'hypothèse de l'empreinte génomique parentale suppose qu'elle soit réversible lorsqu'un allèle parental est transmis à un enfant de sexe opposé. En conséquence, se pose le moment de sa mise en place. La nature moléculaire exacte du marquage épigéné-

tique permettant la reconnaissance et la réversibilité de l'empreinte reste à identifier. La méthylation de l'ADN est-elle la cause ou l'effet de l'empreinte génomique parentale ? Généralement, l'allèle hypométhylé est exprimé alors que l'allèle méthylé est réprimé [40].

L'expression des gènes codant pour Igf2r ("Insulin-like growth factor 2 receptor") et H19, soumis à l'empreinte maternelle, et des gènes codant pour Igf2 ("Insulin growth factor 2") et Snrpn ("Small nuclear ribonucleoprotein N"), soumis à l'empreinte paternelle, est monoallélique dans la cellule de Sertoli, indiquant la présence de l'empreinte génomique parentale dans les cellules somatiques. En revanche, l'expression de ces gènes est biallélique et sexuellement indifférente dans les cellules germinales mâles chez l'adulte, ce qui traduirait l'effacement de l'empreinte dans les cellules de la lignée germinale, au moins jusqu'à un stade avancé de la spermiogenèse [49]. Un autre travail confirme que, dans le testicule, à partir du 17ème j.p.n., l'expression des gènes Igf2, Igf2r et H19, évaluée en fonction du taux des ARNms transcrits, est biallélique et sexuellement indifférente [57]. Il est à noter que le taux global de méthylation de l'ADN décroît dans les cellules méiotiques et les spermatides allongées alors qu'il augmente dans les spermatozoïdes au cours du transit épидидymaire [1].

3. Transcription

Les modalités de l'activité transcriptionnelle durant la spermiogenèse sont singulières. Elles sont de quatre types :

- synthèse et traduction des ARNms dans les cellules méiotiques avec stockage éventuel de protéines utilisées ultérieurement dans les spermatides ;
- synthèse et stockage des ARNms dans les cellules méiotiques et transmission de ces ARNms à demi-vie longue aux cellules post-méiotiques ;

- synthèse continue des ARNms dans les cellules méiotiques et post-méiotiques et ;
- synthèse des ARNms exclusivement dans les spermatides [5].

L'arrêt de l'activité transcriptionnelle dans les spermatides intermédiaires chez le rat coïncide avec la perte des régions hypersensibles à la DNase-I (DHRs) qui sont localisées dans les gènes transcriptionnellement ou potentiellement actifs [33]. Cependant, en dépit de l'arrêt de l'activité transcriptionnelle qui survient au début de la phase d'élongation nucléaire, des molécules d'ARN ont été détectées dans le noyau des spermatides en élongation ou matures et des spermatozoïdes, après incubation en présence du complexe RNase-or colloïdal [16]. Les données biochimiques ont confirmé la persistance d'ARN dans le noyau des spermatozoïdes épидидymaires [12].

4. Synthèse des protéines

Les modalités de l'activité transcriptionnelle conditionnent les modalités de la synthèse des protéines qui sont élaborées de manière séquentielle au cours de la spermatogenèse. Certaines protéines sont synthétisées durant toute la spermatogenèse, certaines ne le sont que dans les spermatocytes pachytènes et les spermatides, alors que d'autres sont produites exclusivement dans les spermatides rondes ou en élongation [25].

5. Deux exemples de l'expression du génome

Pour illustrer l'expression du génome dans les spermatides, deux variétés de protéines nucléaires ont été choisies : les nucléoprotéines basiques (NPBS) associées à l'ADN et le facteur de transcription CREM τ .

a) NPBS

Des gènes testicule-spécifiques, codant pour les protéines nucléaires spermatide-spécifiques, ne s'expriment que dans les sperma-

tides haploïdes. Les gènes codant pour les protamines (PRM1 et PRM2) [18] et TP2 (TNP2) [45] sont constitués chacun de deux exons et d'un intron. Ils sont étroitement associés sur un fragment d'ADN de 13 à 15 kb [21]. Les gènes PRM1 et PRM2 ont été localisés par hybridation in situ sur le bras court du chromosome 16 [56]. Le gène codant pour TP1 (TNP1), composé aussi de 2 exons et d'un intron a été localisé sur le bras long du chromosome 2 [32].

Les données acquises par les techniques d'hybridation in situ en microscopie photomicroscopique ont montré que, chez l'homme, les transcrits codant pour les protamines HP1, HP2 [19] et la protéine de transition TP2 [62] ne sont exprimés que dans les spermatides rondes et en élongation, localisées dans la région adluminaire de l'épithélium séminifère. L'étude ultrastructurale, réalisée avec des sondes d'ADNc codant pour HP1 et HP2 marquées à la digoxigénine couplée à l'or colloïdal a permis de mettre en évidence les sites subcellulaires des ARNms codant pour HP1 et HP2. Les particules d'or sont distribuées majoritairement dans le cytoplasme des jeunes spermatides humaines. Elles persistent dans le cytoplasme au début de la phase d'élongation pour disparaître ensuite complètement. Ainsi, les ARNms sont stockés dans le cytoplasme avant d'être traduits vers la fin de la spermiogenèse [48]. Cependant l'efficacité de la traduction des ARNms codant pour les protéines de transition et les protamines paraît dépendre de plusieurs types complémentaires de contrôle traductionnel. Ainsi, la protéine Spnr, mentionnée ci-dessus à propos de la manchette, a la capacité de se lier spécifiquement à l'extrémité 3' de l'ARNm codant pour la protamine P1, entraînant l'inhibition de l'initiation de la traduction, à l'extrémité 5' [9].

Les observations cytochimiques ultrastructurales ont suggéré que les protéines de transition apparaissent dans les spermatides intermédiaires humaines et ne sont

plus présentes dans les spermatides matures [15].

Diverses études immunocytochimiques à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre les protamines humaines [43, 44] ou d'anticorps monoclonaux dirigés contre la famille P2 ou les deux familles [30] ont établi que les protamines apparaissent et sont concentrées dans les noyaux des spermatides intermédiaires au stade 4-5. Elles ne sont pas accumulées dans le cytoplasme avant leur entrée dans le noyau.

Les modalités de remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogenèse chez l'homme ont été précisées après immunomarquage des histones H2B, H3 et des protamines. L'analyse ultrastructurale quantitative du marquage a indiqué que :

- les histones H2B et H3 ou leurs variants sont vraisemblablement synthétisés dans les spermatides rondes,
- le remplacement des histones par les protamines survient au début de la phase de maturation et,
- des histones persistent partiellement dans le noyau des spermatides matures et des spermatozoïdes [42].

b) CREM τ

Cette protéine nucléaire appartient à une famille de facteurs de transcription se liant à des séquences CRE ("cAMP responsive element"). Certains de ces facteurs sont activateurs (CREM τ , CREB), d'autres sont répresseurs (CREM α , β , γ). CREM τ est un régulateur de l'expression génique dans les cellules germinales haploïdes. Le transcrit est présent dans les spermatocytes et les spermatides alors que la protéine est localisée dans les spermatides [20].

Deux travaux expérimentaux récents ont démontré conjointement que l'inactivation du gène CREM chez la souris entraîne une

altération de la spermiogenèse, se traduisant par la disparition des spermatides allongées et des spermatozoïdes. En outre, certaines spermatides jeunes apparaissent multinucléées et desquament dans la lumière des tubes séminifères et de l'épididyme, suggérant la survenue d'apoptose dans les jeunes spermatides [6, 35]. L'analyse sur Northern blots avec des sondes testicule-spécifiques a révélé la disparition des ARNm codant en particulier pour la protéine de transition TP1 et les protamines [6].

INTERACTIONS CELLULAIRES

1. Spermatide - spermatide

Dans l'épithélium séminal, les spermatides ne sont pas des cellules isolées. Les cellules souches issues de la même génération restent unies les unes aux autres par des ponts cytoplasmiques jusqu'aux stades ultimes de la spermiogenèse. Ainsi ces communications intercellulaires sont de nature à moduler le fonctionnement de chacune des spermatides. A cet égard, il est intéressant de souligner que plusieurs études ont démontré le partage des transcrits codant pour la protamine P1 (souris) entre les spermatides qui se comportent de la sorte comme un véritable syncytium. En d'autres termes, des spermatides génétiquement différentes peuvent présenter un phénotype équivalent [10].

2. Cellule de Sertoli - spermatide

Le métabolisme des cellules de Sertoli et des spermatides est régulé par des interactions réciproques. Diverses substances élaborées par la cellule de Sertoli sont susceptibles d'agir sur le métabolisme et le développement des spermatides en élongation et matures (spermatides tardives) : liquide tubulaire, métabolites du glucose, lipides, glycoprotéines sulfatées, protéines de liaison aux vitamines, facteurs de croissance, ABP [29].

En retour, les spermatides ont la capacité d'influencer le fonctionnement des cellules de Sertoli. La production d'interleukine-1 dans les cellules de Sertoli est engendrée par les corps résiduels et les fragments cytoplasmiques en provenance des spermatides allongées. L'interleukine 1 α est lui-même un puissant inducteur de la sécrétion d'interleukine -6. D'autre part, dans d'autres conditions expérimentales, l'interleukine - 1 a stimulé la replication de l'ADN dans les spermatocytes I préleptotènes et les spermatogonies, alors que l'interleukine - 6 inhibe la réplication de l'ADN dans les spermatocytes I [41].

APTITUDE A ACTIVER L'OVOCYTE

On a identifié une protéine soluble du spermatozoïde, l'oscilline, d'un poids moléculaire de 33 kDa capable de déclencher les pulses calciques dans l'ovocyte lors de la fécondation. Un anticorps dirigé contre cette protéine a permis de mettre en évidence une localisation intracellulaire spécifique à la région équatoriale de la tête du spermatozoïde chez le hamster [38].

CONCLUSION

La revue des événements successifs qui se manifestent en cours de la spermiogenèse indique clairement que les spermatides rondes et les spermatides allongées représentent deux classes de cellules structurellement et fonctionnellement différentes. En conséquence, l'utilisation des spermatides rondes en fécondation assistée amène à soulever plusieurs questions :

- Quels sont le devenir et le rôle du nucléole transcriptionnellement actif dans l'ovocyte fécondé ?
- Existe-t-il une organisation spécifique des chromosomes dans les spermatides ?
- La structure de l'enveloppe nucléaire (persistance des complexes de pores

nucléaires) a-t-elle une incidence sur la formation du pronucleus mâle ?

- Quels sont le devenir et le rôle des organites transitoires (corps chromatoïde, manchette ...) ?
- Comment les structures centriolaires de la spermatide ronde contribuent-elles à la formation du spermaste ?
- A quel moment est mise en place la nouvelle empreinte génomique parentale ?
- Quelle est la destinée des ARNs stockés dans le noyau des spermatides matures. Ont-ils un rôle fonctionnel dans l'ovocyte fécondé ?
- Quels sont le rôle et le devenir des produits de certains gènes et des proto-oncogènes à expression séquentielle au cours de la spermiogenèse ?
- Le métabolisme de la spermatide isolée est-il similaire à celui des spermatides groupées au sein de l'épithélium séminal ?
- A quel stade de la spermiogenèse, le facteur activateur de l'ovocyte (oscilline) est-il élaboré ?
- Enfin, considérant qu'une mutation ou une délétion génique peut se traduire par un arrêt ou une altération de la spermiogenèse à un stade tardif, sur quels critères peut-on affirmer qu'une spermatide ronde est fonctionnellement normale ?

REFERENCES

1. ARIEL M., CEDAR H., MC. CARREY J. : Developmental changes in methylation of spermatogenesis. specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nature Gen.* 1994, 7, 59-63.
2. AUGER J., DADOUNE J.P. : Nuclear status of human sperm cells by transmission electron microscopy and image cytometry : Changes in nuclear shape and chromatin texture during spermiogenesis and epididymal transit. *Biol. Reprod.*, 1993, 49, 166-175.
3. BALHORN R. : Mammalian protamines : Structure and molecular interaction. In : *Molecular Biology of Chromosome Function* Adolph K.W., ed., Springer, New York, 1989, 366-395.
4. BASKARAN R., RAO M.R.S. : Interaction of spermatid specific protein TP2 with nucleic acids in vitro. A comparative study with TP1. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 21039-21047.
5. BELLVÉ A.R., O'BRIEN D.A. : The mammalian spermatozoon : Structure and temporal assembly. In : *Mechanism and control of animal fertilization*, Hartman J.F., ed. Academic Press, New York, 1983, p.p. 55-137.
6. BLENDY J.A., KAESTNER K.H., WEINBAUER G.F., NIESCHLAG E., SCHUTZ G. : Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature*, 1996, 380, 162-165.
7. BOUTINARD ROUELLE ROSSIER V., BIGGIOGERA M., FAKAN S. : Ultrastructure detection of calcium and magnesium in the chromatoid body of mouse spermatids by electron spectroscopic imaging and electron energy loss spectroscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1993, 41,1155-1162.
8. BRANCA A. : Les canalicules testiculaires et spermatogenèse de l'homme. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 1924, 62, 53-252.
9. BRAUN R.E. : KEESOOK L., SCHUMACHER J.M., FARDJARD M.A. : Molecular genetic analysis of mammalian spermatid differentiation. *Recent Progress in Hormone Research*, 1995, 50, 275-286.
10. CALDWELL K.A., HANDEL M.A. : Protamine transcript sharing among post-meiotic spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, 88, 2407-2411.
11. CLERMONT Y. : The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Amer. J. Anat.*, 1963, 112, 35-51.
12. CONCHA I.I., URZUA U., YANEZ A., SCHROEDER R., PESSOT C., BURZIO L.O. : U1 and U2 snRNA are localized in the sperm nucleus. *Exp. Cell. Res.*, 1993, 204, 378-381.
13. COURTENS J.L., BIGGIOGERA M., ROTHFIELD N.F., BURNIER M., FAKAN S. : Migration of centromere proteins in rabbit spermatids. *Molec., Reprod. Dev.*, 1992, 32, 369-377.
14. DADOUNE J.P. : The nuclear status of human sperm cells. *Micron*, 1995, 26, 323-345.
15. DADOUNE J.P. , ALFONSI M.F. : Ultrastructural and cytochemical changes of the head components of human spermatids and spermatozoa. *Gamete Res.*, 1986, 14, 33-46.
16. DADOUNE J.P., ALFONSI M.F., FAIN-MAUREL M.A. : Cytochemical variations in the nucleolus during spermiogenesis in man and monkey. *Cell. Tissue Res.*, 1991, 264, 167-173.

17. DADOUNE J.P., SIFFROI J.P., ALFONSI M.F. : Ultrastructure localization of rDNA and rRNA by in situ hybridization in the nucleolus of human spermatids. *Cell Tissue Res.*, 1994, 278, 611-616.
18. DOMENJOU L., NUSSBAUM G., ADHAM I.M., GREESKE G., ENGEL W. : Genomic sequences of human protamines whose genes, PRM1 and PRM2, are clustered. *Genomics*, 1990, 8, 127-133.
19. DOMENJOU L., KREMLING H., BURFEIND P., MAEIR W.M., ENGEL W. : On the expression of protamine genes in the testis of man and other mammals. *Andrologia*, 1991, 23, 333-337.
20. DELMAS V., VAN DER HOORN F., MELLSTRÖM B., JEGOU B., SASSONE-CORSI P. : Induction of CREM activator proteins in spermatid : Downstream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Molec. Endocrinol.*, 1993, 7, 2502-2513.
21. ENGEL W., KEIME S., KREMLING H., HAMEISTER H., SCHLÜTER G. : The Genes for protamines 1 and 2 (PRM1 and PRM2) and transition protein 2 (TNP2) are closely linked in the mammalian genome. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1992, 61, 158-159.
22. FISHEL S. : Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet*, 1995, 245, 1641-1642.
23. HANNAY T. : New Japanese IVF method finally made available in Japan. *Nature Med.*, 1995, 1, 289-290.
24. HECHT N.B. : Molecular biology of structural proteins of the mammalian testis. In : *Molecular Biology of Chromosome Function*. Adolph K.W., ed., Springer, New York, 1989, p.p. 396-420.
25. HECHT N.B. : Gene expression during spermiogenesis. In: *Cellular and Molecular Events in Spermiogenesis*, Hamilton, D.W. and Waites, G.M.H. eds, Cambridge University Press, 1990, p.p. 265-283.
26. HELLER C.G., CLERMONT Y. : Spermatogenesis in man : an estimate of its duration. *Science*, 1963, 140, 184-186.
27. HELLER C.G. , CLERMONT Y. : Kinetics of the germinal epithelium in man : *Rec., Prog., Horm. Res.*, 1964, 20, 545-575.
28. HOLSTEIN A.F., ROOSEN-RUNGE E.C. : *Atlas of Human Spermatogenesis*. Grosse-Verlag, Berlin, 1981.
29. JEGOU B., SYED V., SOURDAINE P., BYERS ST., GERARD N., VELLEZ DE LA CALLE J., PINEAU CH., GARNIER D.H., BAUCHI F. : The dialogue between late spermatids and Sertoli cells in vertebrates : A century research. In : *Nieschlag E., Habenicht U.F. eds, Spermatogenesis, Fertilization, Contraception*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992, p.p. 57-95.
30. LE LANNIC G., ARKHIS A., VENDRELY E., CHEVALLIER P., DADOUNE J.P. : Production, characterization, and immunocytochemical applications of monoclonal antibodies to human sperm protamines. *Molec. Reprod. Dev.*, 1993, 36, 106-112.
31. LUERSSEN H., HOYER-FENDER S., ENGEL W. : The nucleotide sequence of human transition protein 1 cDNA. *Nucleic Acids. Res.*, 1988, 16, 7723.
32. LUERSSEN H., MATTEI M.G., SCHRÖTER M., GRZESCHIK K.H., ADHAM I.M , ENGEL W. : Nucleotide sequence of the gene for human transition protein1 and its chromosomal localization on chromosome 2. *Genomics*, 1990, 8, 324-330.
33. MCPHERSON S.M., LONGO F.J. : Localization of DNase I-Hypersensitive regions during rat spermatogenesis : Stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Molec. Reprod. Dev.*, 1992, 31, 268-279.
34. MOSS S.B., BURNHAM B.L., BELLVÉ A.R. : The differential expression of lamin epitopes during mouse spermatogenesis. *Molec. Reprod. Dev.*, 1993, 34, 164-174.
35. NANTEL F., MONACO L., FOULKES N.S., MASQUILLIER D., LE MEUR M., HENRIKSEN K., DIERICH A., PARVINEM M., SASSONE-CORSI P. : Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM. mutant mice. *Nature*, 1996, 380, 159-162.
36. NAVARA CH. S., SIMERLY C., ZORAN S., SCHATTEN G. : The sperm centrosome during fertilization in mammals : Implications for fertility and reproduction. *Reprod. Fertil., Dev.*, 1995, 7, 747-754.
37. OLIVA R.F., DIXON G.H. : Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 1991, 40, 25-94.
38. PARRINGTON J., SWANN K., SHEVCHENKO V.I., SESAY A.K., LAI F.A. : Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble, sperm protein. *Nature*, 1996, 379, 364-368.
39. PARVINEN M., MALI P. : The chromatoid body in early spermatids : Its dependence on haploid gene expression and cytoplasmic microtubules. In : *Cellular and Molecular Events in Spermiogenesis*, Hamilton, D. W. Waites, G.M.H. eds, Cambridge University Press, Cambridge, 1990, p.p. 257-264.
40. PETERSON K., SAPIENZA C. : Imprinting the genome : Imprinted genes, imprinting genes and a hypothesis for their interaction. *Annu. Rev. Genet.*, 1993, 27, 7-31.
41. PIQUET-PELLOUCE C., GOMEZ E., CUDICINI C., STEPHAN J.P., DEJUCQ N., JEGOU B. : Cytokines and spermatogenesis. In : *Fertility and Sterility. A current overview. Proceedings of the 15 th World Congress on Fertility and Sterility*, Montpellier France. HEDON B., BRINGER J., MARES P., eds, The Parthenon Publishing Group, New-York, London, 1995, p.p. 249-255.

42. PRIGENT Y., MULLER S., DADOUNE J.P. : Immunoelectron distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis. *Molec. Human Reprod.* (sous presse).
43. ROUX CH., MATHIESON J., DADOUNE J.P. : Localisation immunocytoologique des protamines du groupe HP1 dans le testicule humain et le spermatozoïde éjaculé. *Bull. Assoc. Anat.*, 1987, 71, 65-69.
44. An antiserum against protamines for immunohistochemical studies of histone to protamine transition during human spermiogenesis. *J. Reprod. Fert.*, 1988, 82, 35-42.
45. SCHLÜTER G., KREMLING H., ENGEL W. : The gene for human transition protein 2: Nucleotide sequence, assignment to the protamine gene cluster, and evidence for its low expression. *Genomics*, 1992, 14, 377-383.
46. SCHUMACHER J.M., LEE K., EDELHOFF S., BRAUN R.E. : Spnr, a murine RNA binding protein that is localized to cytoplasmic microtubules. *J. Cell. Biol.*, 1995, 129, 1023-1032.
47. SCHOYSMAN R., LEJEUNE B., VAN ROOSEDAAL E., SEGAL L., VANDERZWALMEN P., NIJS M., VANDAMME B., BERTIN G. : La procréation médicalement assistée avec spermatozoïdes immatures : Impératifs cliniques et techniques chirurgicales. *Andrologie*, 1996, 6, n°4, 432-439
48. SIFFROI J.P., STRAUB B., ALFONSI M.F., DADOUNE J.P. : Ultrastructural localization of the mRNAs of protamines 1 and 2 in human spermatids. *Molec. Reprod. Dev.* (soumis pour publication).
49. SZABO P.E., MANN J.R. : Biallelic expression of imprinted genes in the mouse germ line : Implications for erasure, establishment, and mechanisms of genomic imprinting genes, 1995, 9, 1857-1868.
50. TESARIK J., MENDOZA C, TESTART J. : Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N. Eng. J. Med.*, 1995, 333, 525.
51. TESARIK J., ROLET F., BRAMI C., SEDBON E., THOREL J., TIBI C., THEBAULT A. : Spermátid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Human Reprod.*, 1996, 11, 780-783.
52. TRES J.L., KIERSZENBAUM A.L. : Sak 57, an acidic keratin initially present in the spermátid manchette before becoming a component of paraxonemal structures of the developing tail. *Molec. Reprod. Dev.* 1996, 44, 395-407.
53. UNNI E., MEISTRICH M.L. : Purification and characterization of the rat spermátid basic nuclear protein TP4. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 25359-25363.
54. UNNI E., ZHANG Y. KANGASNIEMI M., SAPERSTEIN W., MOSS S.B., MEISTRICH M.L. : Stage-specific distribution of the spermátid-specific histone 2B in the rat testis. *Biol. Reprod.*, 1995, 53, 820-826.
55. VANDERZWALMEM P., LEJEUNE B., NIJS M., SEGAL-BERTIN G., VANDAMME B., SCHOYSMAN R. : Fertilization of an oocyte microinseminated with a spermátid in an in vitro fertilization programme. *Human Reprod.*, 1995, 10, 502-503.
56. VIGUIÉ F., DOMENJOU D., ROUSSEAU-MERCK F., DADOUNE J.P., CHEVALLIER P. : Chromosomal localization of the human protamine genes, PRM1 et PRM2, to 16p13.3, by in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 1990, 85, 171-174.
57. VILLAR A.J., EDDY E.M., PEDERSEN R.A. : Developmental regulation of genomic imprinting during gametogenesis. *Develop. Biol.* 1995, 172, 264-271.
58. VON LA VALETTE, ST GEORGE A.J.H. : Spermatologische Beiträge. *Arch. Mikrosk. Anat.*, 1885, 25, 581-593.
59. WARD W.S., COFFEY D.S. : DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.*, 1991, 44, 569-574.
60. WILLISON K., ASHWORTH A. : Mammalian spermatogenic gene expression. *Trends Genet.* 1987, 3, 351-355.
61. WINER M.A., WOLGEMUTH D.J. : Patterns of expression and potential functions of proto-oncogenes during mammalian spermatogenesis. In: *Molecular Biology of the Male Reproductive System*, De Kretser D. ed, Academic Press, New York, 1993, p.p. 96-113.
62. WYKES S.M., NELSON J.E., VISSCHER D.W., DJAKIEW D., KRAWETZ S.A. : Coordinate expression of the PRM1, PRM2, and TNP2 multigene locus in human testis. *DNA Cell. Biol.*, 1995, 14, 155-161.
63. ZALENSKY A.O., BRENNEMAN J.W., ZALENSKAYA I.A., BRINKLEY B.R., BRADBURY E.M. : Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm chromosoma, 1993, 102, 509-518.

ABSTRACT

The spermátid, an unrecognized germ cell

J.P. DADOUNE

The use of microinsemination of round or elongated spermátids into oocytes, in certain cases of male infertility, requires re-examination of the sequence of morphological and functional changes that occur throughout sper-

miogenesis. This paper reviews essential findings on morphogenesis of spermatids, genome expression during sperm differentiation and cellular interactions between spermatids themselves and between spermatids and Sertoli cells. Round and elongated spermatids appear to represent two classes of structurally and functionally

different cells. One question remains : on what criteria can one claim that a round spermatid functions normally when spermiogenesis is blocked or impaired ?

Key words : spermatids, ovocyte microinsemination.