

JIR 00224

Existence d'un complexe acrosomal chez les spermatozoïdes du cnidaire *Muggiaea kochi* (Siphonophore, Calycophore): différenciation et réaction acrosomale

D. Carré

E.R. 250 du CNRS, Station Zoologique, F-06230 Villefranche sur Mer, France

(Received 2 November 1983)

Existence of an acrosomal complex in the spermatozooids of the cnidarian *Muggiaea kochi* (Siphonophora, Calycophora): differentiation and acrosomal reaction

Summary

The present investigation of *Muggiaea kochi* (Siphonophore, Calycophore) describes for the first time an acrosomal complex in a cnidarian. The acrosomal reaction is always observed in spermatozoa swimming around the maturation pole of the egg where the fertilization takes place exclusively. After this reaction the spermatozoa exhibit an anterior process at the end of which the fusion with the egg membrane occurs. This acrosomal process has a long striated rod differentiated from the pericentriolar apparatus during spermiogenesis.

spermatozoa; acrosome; cnidarian

Résumé

Un complexe acrosomal est décrit pour la première fois chez un cnidaire: *Muggiaea kochi* (siphonophore, calycophore). La réaction acrosomale, observée uniquement chez des spermatozoïdes situés au voisinage du site de fécondation des oeufs, met en place, après l'exocytose d'une grande vésicule d'origine golgienne, un processus prolongeant le pôle antérieur du spermatozoïde et à l'extrémité duquel s'effectue la fusion avec la membrane ovulaire. Ce processus est soutenu par une racine striée différenciée par l'appareil péricentriolaire au cours de la spermatogénèse.

Introduction

L'acrosome est une vésicule d'origine golgienne souvent associée à des structures annexes dont la morphologie est modifiée dans les instants précédant la fécondation au cours de la réaction acrosomale. Il forme alors, chez la plupart des espèces étudiées, un tube prolongeant le pôle antérieur du noyau au contact duquel s'effectue la reconnaissance, la jonction puis la fusion des membranes du spermatozoïde et de l'oeuf.

Il est admis que les spermatozoïdes de certains embranchements ou groupes zoologiques font exception à ce schéma général, et sont dépourvus d'acrosome de façon primitive ou secondaire. Cela semblait la règle chez les spermatozoïdes de cnidaires où seules des petites vésicules qualifiées de proacrosomiques avaient été observées, chez certaines espèces, près du pôle antérieur du noyau [1-4].

Des observations en microscopie électronique sur les spermatozoïdes de *Muggiaea kochi* (siphonophore calycophore) [5] nous avaient permis d'envisager, contrairement aux idées admises, l'existence d'un complexe acrosomal caractérisé chez un cnidaire. Ce travail a pour but d'établir clairement la nature de ce complexe en suivant son devenir au moment de la fécondation.

Matériel et Méthodes

Les individus sexués (= eudoxies) de *Muggiaea kochi* proviennent de récoltes de plancton effectuées dans la rade de Villefranche-sur-Mer. Les spermatozoïdes ont été fixés après leur libération spontanée soit seuls, soit en présence d'oeufs. Une double fixation (glutaraldéhyde puis tétroxyde d'osmium) a été suivie d'une inclusion suivant la méthode de Spurr. Les coupes ultrafines contrastées par la méthode de Reynolds ont été observées sur un microscope électronique Hitachi HU12A.

Résultats

Rappel de l'ultrastructure des spermatozoïdes avant leur libération

Dans un précédent travail [5], nous avons décrit les spermatozoïdes de *Muggiaea kochi* avant leur libération des gonophores. On peut retenir trois caractères originaux par rapport aux autres spermatozoïdes de cnidaires connus:

Existence d'une symétrie bilatérale et non axiale.

Présence d'une grande vésicule d'origine golgienne logée dans la courbure du noyau.

Développement d'une longue racine striée qui réunit l'appareil péricentriolaire au pôle antérieur du noyau.

Des observations complémentaires sur les spermatozoïdes de plusieurs autres espèces nous permettent de considérer ces particularités comme typiques des spermatozoïdes de siphonophores.

Ultrastructure des spermatozoïdes après leur libération

Spermatozoïdes libres avant la réaction acrosomale

Les spermatozoïdes libérés en absence d'oeufs sont caractérisés par l'aspect très dense, laqué du noyau, dont l'enveloppe n'est plus discernable et, surtout, par la forme de la cellule sensiblement élargie dans la région médiane (Figs. 1 et 2). Cet élargissement correspond à l'augmentation en volume et en nombre de granules, réfringents en microscopie optique, denses en microscopie électronique, qui sont vraisemblablement des réserves lipidiques (pas de membrane périphérique) (Figs. 3,4), et surtout au gonflement de la vésicule d'origine golgienne. Cette vésicule optiquement vide dans la première phase de sa sécrétion contient à ce stade un matériel de structure hétérogène (Fig. 2). Simultanément, on suit la sécrétion par l'appareil de Golgi de petites vésicules dont certaines migrent le long de la partie terminale de la racine striée, où elles fusionnent formant un saccule étiré (Figs. 6, 7, 8).

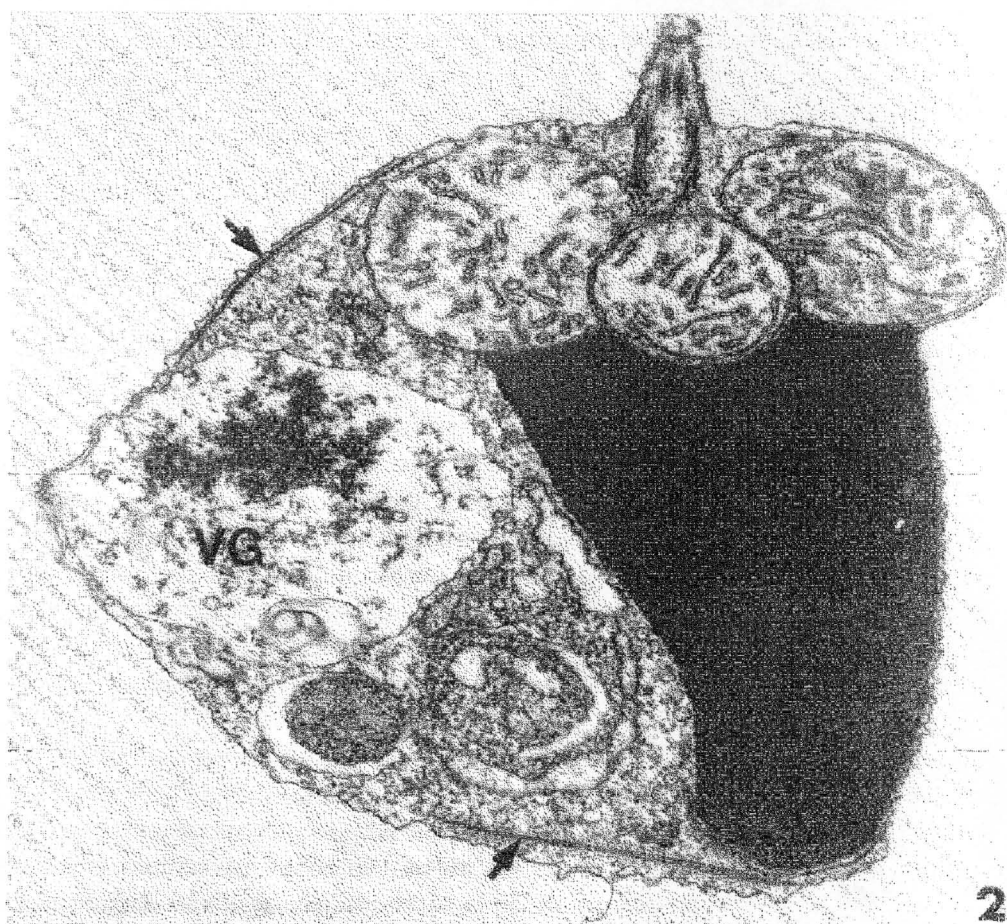
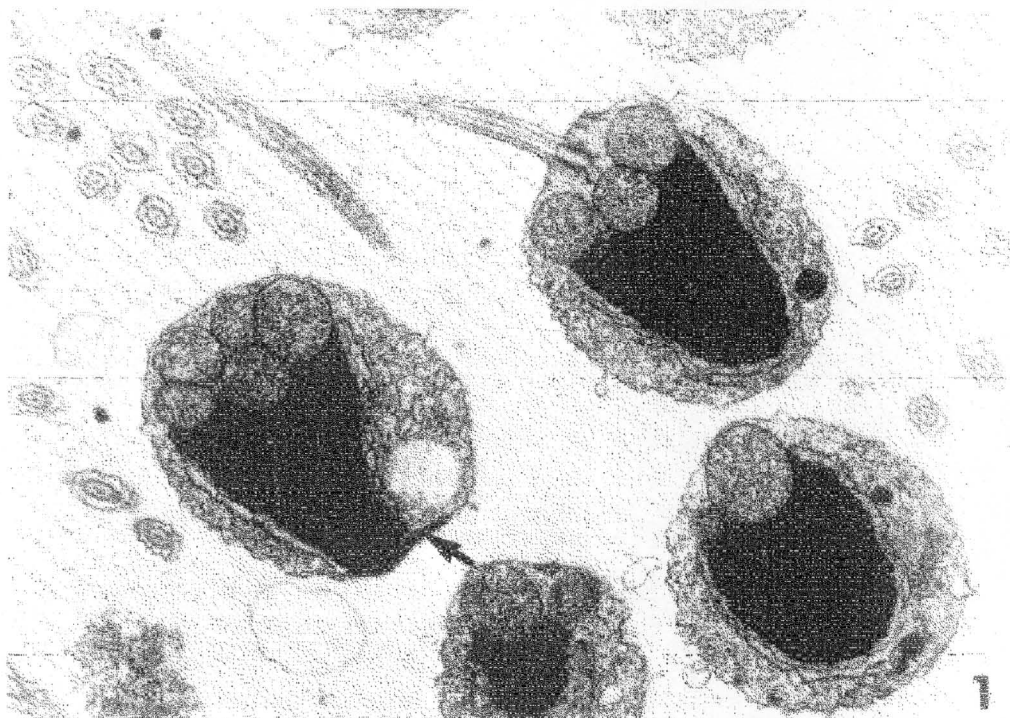
La racine striée est une lame de $0.35\ \mu\text{m}$ de largeur (Fig. 3). Elle présente des bandes sombres dans une matrice plus claire avec une périodicité de $250\ \text{\AA}$ (Fig. 7). Certaines photos (Fig. 13) permettent de discerner deux types de bandes sombres épaisses et minces. Aucune coupe de spermatozoïde libre n'a permis de suivre cette racine sur toute sa longueur. Nous avons observé au mieux son émergence de l'appareil péricentriolaire et, dans le prolongement, sa partie terminale appuyée contre le pôle antérieur du noyau (Figs. 2, 6, 7). Il peut donc y avoir dès ce stade une rupture de la baguette dans sa région médiane, ce qui expliquerait aussi qu'on ne l'observe pas systématiquement sur les coupes transversales. Le pôle antérieur du noyau est toujours coiffé par un saccule lisse qui semble être le seul vestige observable de l'enveloppe nucléaire (Figs. 2-6).

Réaction acrosomale

Il faut souligner le caractère exceptionnel de cette réaction. Seule l'observation de très nombreuses coupes, en particulier de coupes passant près du site prédéterminé de la fécondation [6] a permis d'en suivre les différentes étapes. Des études *in vivo* en contraste interférentiel confirment cette situation: le plus souvent, seulement quelques spermatozoïdes, parfois un seul, présentent un prolongement antérieur (Fig. 14). Ces spermatozoïdes ont toujours été observés au voisinage du site de fécondation. On peut donc supposer que l'inducteur de la réaction acrosomale est localisé ou libéré au niveau de ce site.

La microscopie électronique permet de distinguer 3 étapes dans cette réaction:

- (i) orientation de la partie terminale de la racine striée perpendiculairement à l'axe du noyau (Fig. 8);
- (ii) déhiscence de la grande vésicule d'origine golgienne (Fig. 4), accompagnée (dans le cas où cela ne se produirait pas plus tôt) par la rupture de la racine striée dans sa région médiane;
- (iii) mise en place d'un processus acrosomal prolongeant le pôle antérieur du noyau, et dont l'axe est formé par la partie terminale de la racine striée déployée (Fig. 9). La



nature acrosomale de ce tube est confirmée par l'observation de la fusion oeuf-spermatozoïde (Fig. 10).

Au terme de cette réaction, la morphologie du spermatozoïde est profondément modifiée. Les inclusions lipidiques initialement logées dans la courbure du noyau (Fig. 3) sont rejetées au voisinage des mitochondries (Fig. 9). Dans la région médiane les sécrétions golgiennes et l'appareil de Golgi ont disparu seul le noyau subsiste étroitement bordé par la membrane plasmique (Fig. 9). Au pôle antérieur, outre la mise en place du tube acrosomal, on note une modification constante du saccule coiffant le noyau qui se roule sur un de ses bords présentant en coupe la forme d'un crochet (Fig. 11).

Des tentatives pour induire expérimentalement la réaction acrosomale (augmentation du pH, eau de mer enrichie en calcium, ionophore A23187), ont toutes été négatives. Toutefois, sur deux montages de routine en eau de mer en principe

Fig. 1. Spermatozoïde libre de *Muggiaea kochi* avant la réaction acrosomale. Noter la densité du noyau, le contenu structuré de la grande vésicule d'origine golgienne et la présence d'un granule lipidique (L). $\times 12000$.

Fig. 2. Spermatozoïde libre avant la réaction acrosomale: la coupe passe dans le plan de la baguette striée qui émerge de l'appareil péricentriolaire et se termine contre le pôle antérieur du noyau. Noter la symétrie bilatérale induite par cette baguette et par la grande vésicule d'origine golgienne. $\times 28000$. VG = vésicule golgienne.

Fig. 3. Coupe transversale d'un spermatozoïde immature. $\times 24000$.

Fig. 4. Coupe oblique d'un spermatozoïde libre montrant l'exocytose de la grande vésicule d'origine golgienne. $\times 17000$.

Fig. 5. Coupe passant à proximité du site de fécondation d'un oeuf de *Muggiaea kochi* et montrant des plages de produits exocytosés au cours de la réaction acrosomale. $\times 10000$.

Figs. 6-8. Mise en place d'un saccule longeant la baguette striée par fusion de petites vésicules golgiennes chez des spermatozoïdes libres dans les instants précédant la réaction acrosomale. (6) $\times 46000$; (7) $\times 49000$; (8) $\times 58000$.

Fig. 9. Coupe longitudinale d'un spermatozoïde après la mise en place du processus acrosomal. Noter la disparition de tout le cytoplasme périnucléaire et de ses inclusions, et le rejet des granules lipidiques au pôle postérieur de la cellule. $\times 22000$.

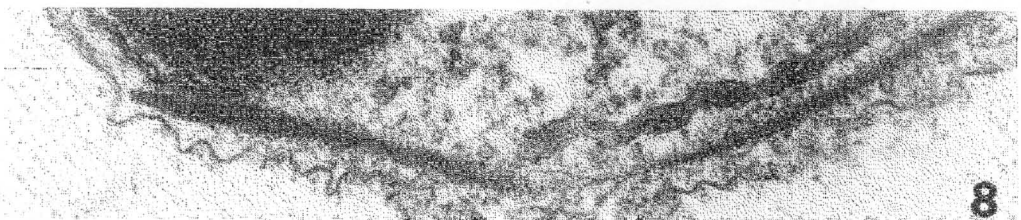
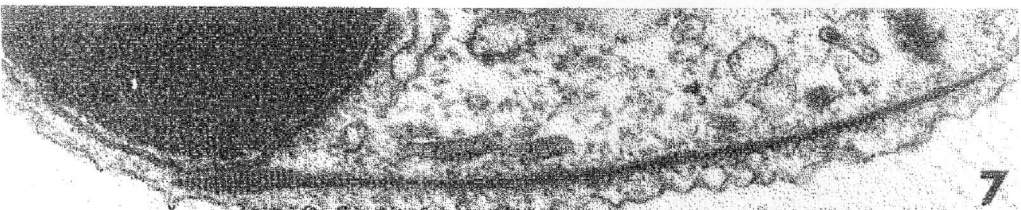
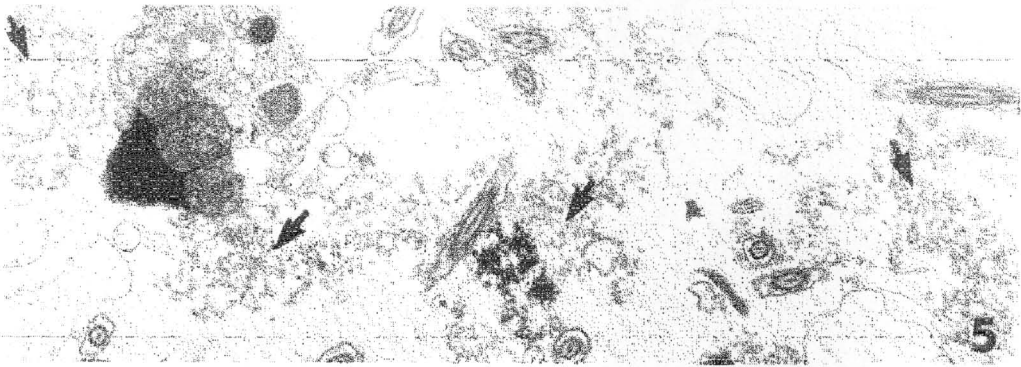
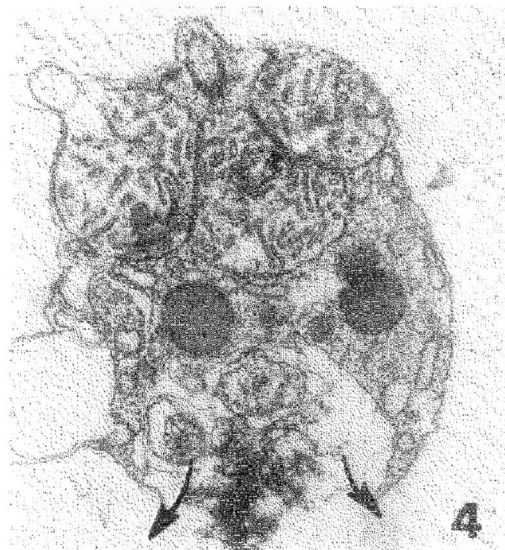
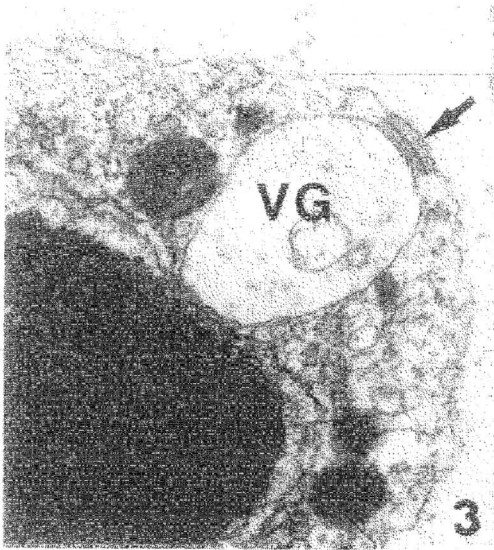
Fig. 10. Fusion oeuf-spermatozoïde. $\times 26500$.

Fig. 11. Détail de la partie basale du processus acrosomal montrant l'enroulement du saccule coiffant le noyau. $\times 70000$.

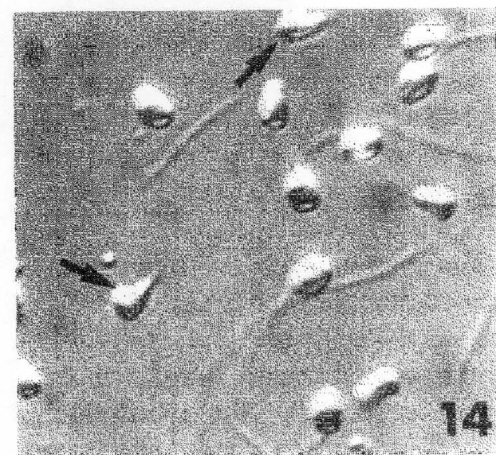
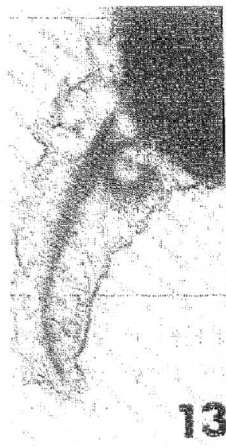
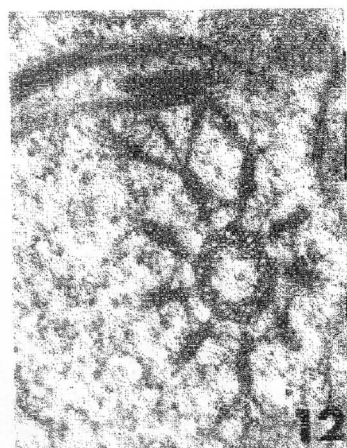
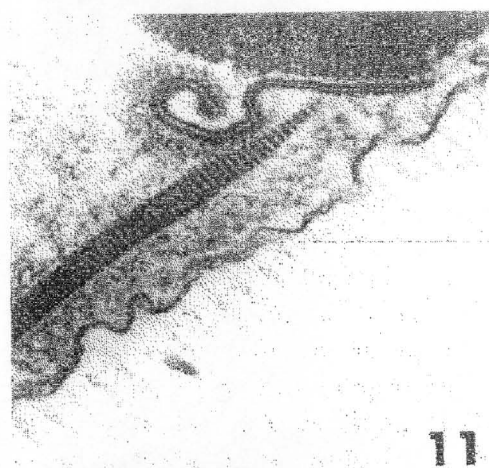
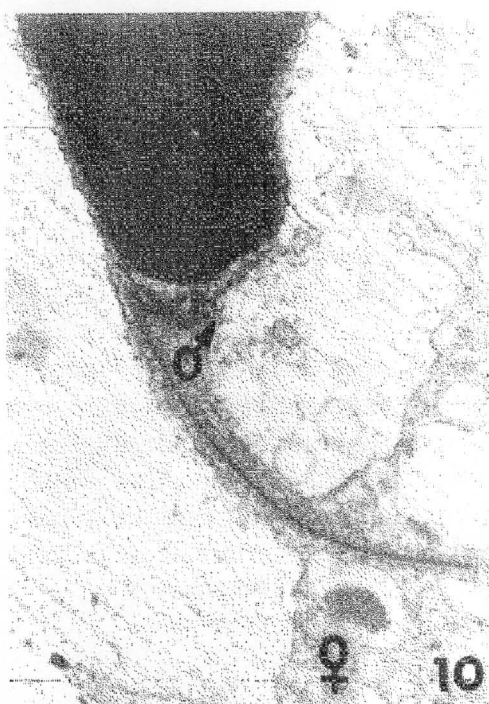
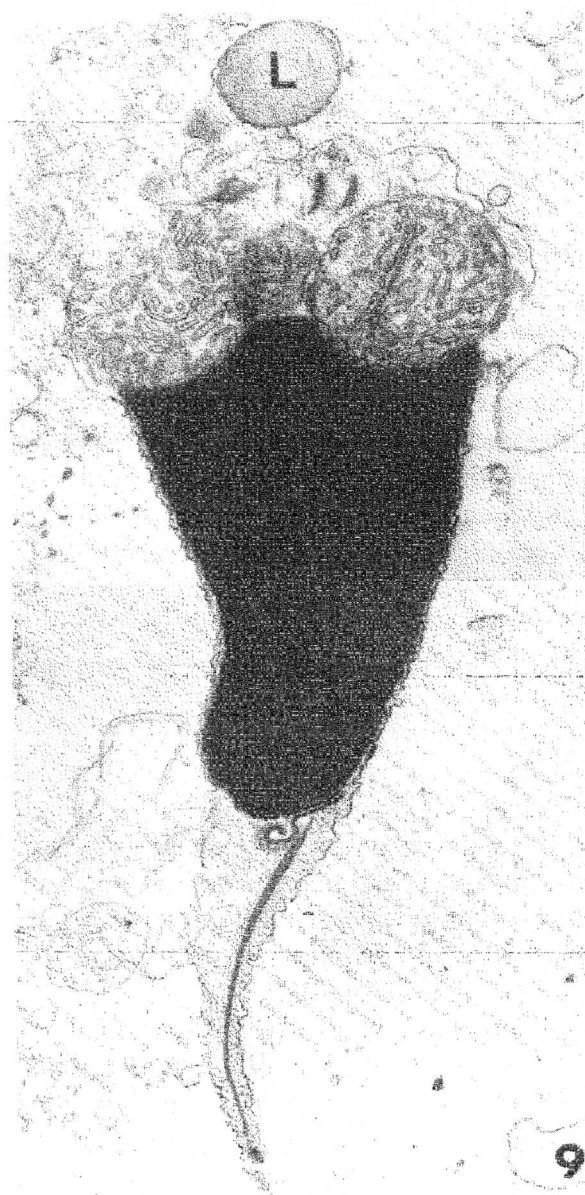
Fig. 12. Complexe péricentriolaire d'un spermatozoïde libre montrant l'émergence de la racine striée. $\times 40000$.

Fig. 13. Coupe oblique dans un processus acrosomal. Noter l'existence de stries sombres épaisses et minces. $\times 40000$.

Fig. 14. Spermatozoïdes de *Muggiaea kochi* in vivo avant et après la réaction acrosomale. $\times 1500$.



Figs. 3-8. For legend see page 99.



Figs. 9-14. For legend see page 99.

normale et en absence d'oeufs, nous avons observé la formation d'un tube acrosomal chez tous les spermatozoïdes.

Discussion et Conclusion

On entend généralement par acrosome une vésicule d'origine golgienne dont la paroi participe à la mise en place du processus acrosomal et dont le contenu parfois structuré (chez certains insectes, crustacés, etc.) lyse localement après sa libération, les enveloppes de l'oeuf pour ouvrir un passage au spermatozoïde.

Chez *Muggiaea kochi* il semble logique de désigner sous le terme d'acrosome non seulement la grande vésicule golgienne mais également le saccule qui borde la racine striée. En effet, si l'exocytose de la grande vésicule est une étape de la réaction acrosomale qui paraît essentielle par les produits qu'elle libère et pour le déploiement de la partie terminale de la racine striée, elle ne participe pas directement à la mise en place du processus dont la paroi semble formée à la fois par la membrane plasmique du spermatozoïde et par la membrane du long saccule golgien qui bordait la racine striée (Fig. 9). Il est difficile de préciser l'origine exacte du territoire membranaire qui coiffe l'extrémité du tube et qui est la seule région apte à fusionner avec la membrane de l'oeuf (Fig. 10), ou de façon accidentelle, avec un autre spermatozoïde.

Le rôle des produits exocytosés au cours de la réaction acrosomale reste énigmatique. A proximité du site prédéterminé de la fécondation on peut identifier le contenu d'une ou plusieurs vésicules acrosomales (Fig. 5). Les oeufs de siphonophores étant dépourvus de gangue et de chorion, il est possible que les produits libérés par cette exocytose décapent la fine membrane vitelline au niveau de ce site rendant ainsi possible localement, la fusion oeuf-spermatozoïde.

La partie terminale de la racine striée soutenant le processus acrosomal est homologable à un perforatorium dont la connexion initiale avec l'appareil péricentriolaire du flagelle est à souligner. Dans d'autres groupes zoologiques il a été établi que le perforatorium peut être formé, au moins partiellement, par des filaments d'actine (limule, échinodermes, etc). L'étude biochimique du perforatorium des spermatozoïdes de siphonophores reste à faire, mais les résultats de Kleve et Clark [7] chez un autre cnidaire permettent de penser qu'il doit s'agir d'une structure contractile. Ces auteurs ont en effet trouvé chez les spermatozoïdes d'*Hydractinia*, comme chez les siphonophores (Fig. 12), un complexe péricentriolaire d'où émerge un éperon strié, et ils ont montré la présence d'actine dans ce complexe. Nos observations *in vivo* chez *Muggiaea kochi* vont dans le même sens. Nous avons en effet noté des contractions de l'acrosome dans les secondes précédant la fécondation.

Les spermatozoïdes de tous les cnidaires étaient considérés comme des spermatozoïdes de type primitif caractérisés par une symétrie axiale et surtout par l'absence d'acrosome [2,8]. Toutefois, de petites vésicules situées au pôle antérieur du noyau et considérées comme des structures proacrosomales avaient été décrites chez certaines espèces. L'observation chez les spermatozoïdes de siphonophores d'un véritable complexe acrosomal et d'une symétrie bilatérale est à la fois surprenante et

intéressante. Elle permet de reposer la signification phylogénétique de la structure des spermatozoïdes. On peut se demander si l'absence d'acrosome observée effectivement chez de nombreuses espèces de cnidaires est primitive ou secondaire et, par exemple, s'il faut interpréter l'éperon strié d'*Hydractinia* comme un vestige de complexe acrosomal ou une tentative avortée d'acquisition d'un acrosome.

Remerciements

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur P. Tardent pour la lecture de ce manuscrit et ses remarques judicieuses, ainsi qu'au Professeur B. Afzelius pour m'avoir encouragée à entreprendre ce travail.

Bibliographie

- 1 Afzelius, B.A. and Franzén, A., The spermatozoon of the jellyfish *Nausithoe*. J. Ultrastruct. Res., 37 (1971) 186-199.
- 2 Baccetti, B. and Afzelius, B.A., The biology of the sperm cell, Monographs in Developmental Biology, Vol. 10. Karger, Basel-New York, 1976.
- 3 Hinsch, G.W. and Clark, W.H., Comparative fine structure of Cnidaria spermatozoa. Biol. Reprod., 8 (1973) 63-73.
- 4 Lyke, E.B. and Robson, E.A., Spermatogenesis in Anthozoa: differentiation of the spermatid. Cell Tiss. Res., 157 (1975) 185-205.
- 5 Carré, D., An ultrastructural study of spermiogenesis and the mature sperm in the siphonophore calyophore *Muggiaea kochi* (Cnidaria). Zoon, 7 (1979) 143-148.
- 6 Carré, D. and Sardet, C., Sperm chemotaxis in siphonophores, Biol. Cell., 40 (1981) 119-128.
- 7 Kleve, M.G. and Clark, W.H., Jr., Association of actin with sperm centrioles: isolation of centriolar complexes and immunofluorescent localization of actin. J. Cell Biol., 86 (1980) 87-95.
- 8 Franzén, A., On spermiogenesis morphology of the spermatozoon and biology of fertilization among invertebrates. Zool. Bidr. Upps., 31 (1956) 355-482.