Etudes sur les gamones.

par B. Rybak.

F. R. Lillie [1] a donné le nom de *fertilisine* à ce qui, dans l'eau de mer qui a contenu des ovules d'Oursins par exemple, 1°) attire les spermatozoïdes d'Oursins (chimiotactisme positif), 2°) les active (mouvements flagellaires accélérés) et 3°) les agglutine réversiblement (l'agrégation des spermatozoïdes cesse spontanément au bout d'un certain temps). Bien que Lillie ait déjà soupçonné la présence de deux substances dans cette eau de mer ovulaire, ce n'est que depuis les travaux de Kuhn, Hartmann et leurs collaborateurs [2] qu'on distingue systématiquement deux *gynogamones*, l'une responsable du tactisme et de l'activation, l'autre de l'agglutination réversible. Pour ces auteurs [3, 4], ces gynogamones, étudiées sur *Arbacia pustulosa*, seraient : l'échinochrome A libre ou combiné dans un symplexe ternaire (échinochrome-protéine-support annexe) comme gynogamone I (d'activation et de tactisme) et le support-annexe de nature inconnue comme gynogamone II (« agglutinine »): ce support-annexe jouerait le rôle non seulement d'agglutinine mais encore de cofacteur d'activation spermatique du complexe echinochrome-protéine inactif par lui-même, si bien que le symplexe ternaire serait efficace du triple point de vue de l'activation, du tactisme et de l'agglutination. Or :

1°) Tyler [5] n'a pu obtenir d'activation de spermatozoïdes d'Oursin avec de l'échinochrome cristallisé ; nous remarquerons toutefois que Kuhn et Wallenfels signalaient dans leur travail [3] que l'échinochrome cristallisé était 100 fois moins actif que l'échinochrome complexé de l'eau de mer ovulaire ;

2°) L'eau de mer ovulaire de *Paracentrotus lividus* (oursin dont les ovules ne possèdent pas d'échinochrome mais des caroténoïdes [6]) active, attire et agglutine les spermatozoïdes de cette variété d'Oursins;

3°) Pour Clowes et Bachman [7] la gynogamone I serait un alcool supérieur ; ils ont en effet pu obtenir une activation non spécifique des spermatozoïdes d'Etoiles de mer ou d'Oursins en utilisant le *distillat de l'eau de mer ovulaire* de ces animaux, activation reproductible avec les alcools propylique, allylique ou cinnamique ou encore par le propylène à très basses dilutions. Cornman [8] a vérifié sur *Arbacia* que par distillation de l'eau de mer ovulaire ou du dialysat de cette eau de mer ou encore du complexe échinochrome-protéine, on obtenait un facteur stimulant le sperme. Cornman pense également que ce facteur pourrait être un alcool et il dénie toute action à l'échinochrome.

En ce qui concerne les sécrétions d'origine spermatique, on connaît également deux androgamones; l'une agglutine irréversiblement les ovules et dans certaines conditions les spermatozoïdes, on sait depuis Hultin [9] qu'il s'agit d'une protéine basique (protamine ou histone), dans la systématique d'Hartmann ce sera l'androgamone I; l'autre lyse la gangue de l'ovule et permet la pénétration du spermatozoïde, c'est la hyaluronidase [10] [11] ou androgamone II, elle est localisée dans l'acrosome du spermatozoïde [12, 13].

Nous avons entrepris l'étude de ces substances en nous attachant particulièrement aux gynogamones du point de vue de leur nature chimique et de leur mode d'action et à l'androgamone I du point de

vue de son mode d'action. Les ré
travail ont été obtenus surtout ave
gion de Roscoff.

I. — GYN

Avant d'effectuer une quelconqu
paravant de localiser chimiquemen
pur. C'est donc l'extraction de la f
mier lieu. Nous entendons par ex
nous permettra de retirer de la ce
chée *avec le maximum de sélectivi*
chimique : les techniques de cytol
broyage, de chauffage ou de cong
cellule qui ont été utilisées par dif
des gamones particulièrement [14]
renseignent que peu ou pas du tout
recherchée; ces techniques sont d'a
nes — tout au moins les deux gynog
des substances qui diffusent norma
ces conditions, leur isolement peut
l'eau de mer ovulaire ou spermatiq

Extract

1) *A partir des ovules :*

Nous avons déjà indiqué [15] co
pellerons ici le texte de notre note:

Après avoir pris bien soin de reti
Oursins utilisés, les gonades femell
filtre Büchner recouvert d'une gaze.
rie de petits lavages à l'eau de mer
tions à 6000 tours/m pendant 5 mi
filtrée ou par une solution de ClNa
connaître le poids humide du matéri
tement et en agitant constamment 3-
N/2. On laisse 10-15 minutes en conta
re, puis on centrifuge à 6000 tours/m
le liquide surnageant que l'on met à
douce courante. Après ce temps, pou
dialyser 3 heures contre un grand
essais biologiques, on met les dialyse
pendant 3 heures également.

2) *A partir de l'eau de mer ovulair*

a) Localisation par voie ammoniqu
gnalé que la fertilisine était précipita
nous avons vérifié ce résultat en parta
Pour cela nous avons préparé une
avons préalablement vérifié qu'elle po
réversiblement les spermatozoïdes. Puis
on ajoute un volume d'une solution s
également refroidie. On obtient une p
la glacière 3 heures, centrifuge, repre
saturé de facon à obtenir une conc
0,75 de la saturation. On laisse repose
à + 4° C contre de l'eau de mer fréq

s gamones,

YBAK.

fertilisine à ce qui, dans l'eau de
ıs par exemple, 1°) attire les sper-
e positif), 2°) les active (mouve-
s agglutine réversiblement (l'agré-
ıntanément au bout d'un certain
pçonné la présence de deux sub-
'e, ce n'est que depuis les travaux
:ateurs [2] qu'on distingue systé-
ıe responsable du tactisme et de
réversible. Pour ces auteurs [3,
bacia pustulosa, seraient : l'échi-
n symplexe ternaire (échinochro-
gynogamone I (d'activation et de
:ure inconnue comme gynogamo-
ınexe jouerait le rôle non seule-
›facteur d'activation spermatique
inactif par lui-même, si bien que
u triple point de vue de l'activa-
n. Or :

vation de spermatozoïdes d'Our-
é ; nous remarquerons toutefois
dans leur travail [3] que l'échi-
noins actif que l'échinochrome

entrotus lividus (oursin dont les
ɔme mais des caroténoïdes [6])
zoïdes de cette variété d'Oursins;
a gynogamone I serait un alcool
r une activation non spécifique
ou d'Oursins en utilisant le *dis-*
animaux, activation reproducti-
lique ou cinnamique ou encore
ons. CORNMAN [8] a vérifié sur
de mer ovulaire ou du dialysat
plexe échinochrome-protéine, on
rme. CORNMAN pense également
et il dénie toute action à l'échi-

d'origine spermatique, on con-
l'une agglutine irréversiblement
: les spermatozoïdes, on sait de-
.éine basique (protamine ou his-
N ce sera l'androgamone I; l'au-
et la pénétration du spermato-
ou androgamone II, elle est lo-
›ide [12, 13].
s substances en nous attachant
ı point de vue de leur nature
à l'androgamone I du point de

vue de son mode d'action. Les résultats que nous présentons dans ce travail ont été obtenus surtout avec *Paracentrotus lividus* Lk de la région de Roscoff.

I. — GYNOGAMONES.

Avant d'effectuer une quelconque analyse chimique il convient auparavant de localiser chimiquement la substance et de l'obtenir à l'état pur. C'est donc l'extraction de la fertilisine qui nous occupera en premier lieu. Nous entendons par extraction l'utilisation d'un agent qui nous permettra de retirer de la cellule considérée la substance cherchée *avec le maximum de sélectivité*, cet agent ne peut donc être que chimique : les techniques de cytolyse par solutions hypotoniques, de broyage, de chauffage ou de congélation suivie d'éclatements de la cellule qui ont été utilisées par différents biologistes dans la question des gamones particulièrement [14] sont des procédés brutaux qui ne renseignent que peu ou pas du tout même sur la nature de la substance recherchée; ces techniques sont d'autant plus gratuites que les gamones — tout au moins les deux gynogamones et l'androgamone I — sont des substances qui diffusent normalement dans l'eau de mer et, dans ces conditions, leur isolement peut se réaliser facilement en traitant l'eau de mer ovulaire ou spermatique.

Extractions :

1) *A partir des ovules :*

Nous avons déjà indiqué [15] comment nous opérions. Nous rappellerons ici le texte de notre note:

Après avoir pris bien soin de retirer tout le liquide cœlomique des Oursins utilisés, les gonades femelles prélevées sont portées sur un filtre Büchner recouvert d'une gaze. On enlève les ovules par une série de petits lavages à l'eau de mer filtrée, puis on alterne centrifugations à 6000 tours/m pendant 5 minutes et lavages par eau de mer filtrée ou par une solution de ClNa isotonique. On pèse de façon à connaître le poids humide du matériel, soit x grammes. On ajoute lentement et en agitant constamment 3-4 x cm³ d'acide trichloracétique N/2. On laisse 10-15 minutes en contact à la température du laboratoire, puis on centrifuge à 6000 tours/m. pendant 5 minutes, on décante le liquide surnageant que l'on met à dialyser 3 heures contre de l'eau douce courante. Après ce temps, pour les essais chimiques, on met à dialyser 3 heures contre un grand volume d'eau distillée; pour les essais biologiques, on met les dialyseurs contre l'eau de mer courante pendant 3 heures également.

2) *A partir de l'eau de mer ovulaire :*

a) Localisation par voie ammonique : l'équipe allemande ayant signalé que la fertilisine était précipitable par le sulfate d'ammonium, nous avons vérifié ce résultat en partant de l'eau de mer ovulaire.

Pour cela nous avons préparé une eau de mer ovulaire et nous avons préalablement vérifié qu'elle possédait la propriété d'agglutiner réversiblement les spermatozoïdes. Puis après refroidissement à + 4° C on ajoute un volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium également refroidie. On obtient une précipitation faible. On laisse à la glacière 3 heures, centrifuge, reprend le surnageant par $SO_4(NH_4)_2$ saturé de façon à obtenir une concentration finale de ce sel de 0,75 de la saturation. On laisse reposer, centrifuge et met à dialyser à + 4° C contre de l'eau de mer fréquemment renouvelée. Après 16

heures et malgré la dilution due à l'adjonction du sulfate d'ammonium, le liquide agglutine réversiblement les spermatozoïdes. On reprend alors ce liquide et on l'amène à la saturation théorique en $SO_4(NH_4)_2$ (2 volumes d'une solution saturée de ce sel pour un volume d'eau de mer ovulaire traitée). On laisse reposer, centrifuge. On prélève le surnageant dont on fait deux parts.

— la première est mise à dialyser contre de l'eau de mer courante. Après 16 heures de dialyse, on obtient toujours les formations caractéristiques de la fertilisine avec les spermatozoïdes. On prélève alors 30 ml de ce liquide et on l'additionne d'un volume de $SO_4(NH_4)_2$ saturé. On obtient une légère opalescence. On laisse 4 heures à + 4° C. Puis on ajoute III gouttes d'acide sulfurique concentré. On agite et reporte à la glacière; après 6 heures on porte à dialyser contre de l'eau de mer courante : le surnageant agrège encore faiblement les spermatozoïdes de *P. lividus* (petits agrégats visibles à la loupe, labiles dans les 10-12 secondes);

— la seconde est gardée 24 heures à + 4° C. On obtient ainsi une nouvelle précipitation. On centrifuge et met à dialyser le surnageant contre de l'eau de mer courante pendant une nuit à 17° C : le dialysat est encore très légèrement actif sur les spermatozoïdes du point de vue de leur agrégation.

De ceci nous conclurons deux choses :

1) la fertilisine est encore active à des dilutions très grandes;

2) on doit tenir compte de la salinité de l'eau de mer (35 p. 1000) dans le relargage par le sulfate d'ammonium; nous pensons d'ailleurs qu'en règle générale en protéinologie il est absolument nécessaire de préciser la salinité et le pH du milieu dans lequel on effectue la précipitation ammonique (voir Cohn [16]). Dans notre cas précis nous allons d'ailleurs constater combien est insuffisante la seule indication du taux de saturation du sel relargant.

On part de nouveau d'une eau de mer ovulaire renfermant de la fertilisine et on la soumet préalablement à une dialyse de 24 heures *contre de l'eau bidistillée* (eau changée 3 fois); il ne se produit aucune précipitation dans le sac de dialyse ; II gouttes de ce dialysat opalescent + VI gouttes d'eau de mer donnent lieu à une agglutination réversible typique des spermatozoïdes (le dialysat brut amène des agglutinations *irréversibles*). Si on précipite par le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation on n'obtient qu'un faible précipité, par contre à la saturation en $SO_4(NH_4)_2$ on obtient un floculat blanc d'une certaine importance. On centrifuge et dialyse le surnageant pendant 24 heures contre de l'eau de mer. *Ce surnageant est inactif du point de vue de l'agrégation spermatique.* La fertilisine est donc effectivement précipitable par le sulfate d'ammonium.

b) Extraction trichloracétique :

En premier lieu, pour vérifier notre technique d'extraction à partir des ovules, nous avons ajouté à de l'eau de mer ovulaire de l'acide trichloracétique *en cristaux* jusqu'à N/2 de concentration finale. Nous avons laissé cette solution pendant 16 heures à 18° C en l'agitant de temps en temps. Après centrifugation et dialyse (10 heures) contre de l'eau de mer courante nous pûmes vérifier que le dialysat renfermait toujours la fertilisine. Dans d'autres expériences nous avons ajouté CCl3CO2H jusqu'à la concentration finale d'une molécule par litre ; après 24 heures de contact, centrifugation et dialyse contre de l'eau de mer, la fertilisine était encore présente dans le dialysat. Cette solution de fertilisine chauffée à l'ébullition pendant 50 minutes puis laissée en repos pendant 24 heures en l'agitant de temps en temps de fa-

çon qu'elle s'aère était encore
car elle indique que la fertilis
en présence de NaCl.

Nous avons ensuite extrait
On part d'une eau de mer ovu
testée, on la chauffe à l'ébull
duit des coagulats filamenteux
trifuge, laisse refroidir jusqu'à
précipite par 4-5 volumes d'étl
poser 15 minutes à la tempéra
précipité à l'éther (on peut le
à l'aide d'un agitateur dans le
le liquide surnageant renferm
est purifié de la façon suivante
sence d'un abrasif quelconque
nebleau) et d'une solution d'aci
alors pendant 30-60 minutes, c
ser contre de l'eau de mer cou
dialysat renferme de la fertilisi
de l'eau bidistillée jusqu'à pH
d'alcool ou d'acétone, laver le
le vide à P205.

Par cette technique nous av
convenable, néanmoins la prése
ganiques thermostables, précip
même temps que la fertilisine et
férable le procédé d'isolement
Or il était important de pouvoi
lisine obtenus directement à p
partir de l'eau de mer ovulair
point la technique suivante à la
tes les opérations se font à la te

On place les ovules dans une s
On agite lentement pendant 5 m
de la fertilisine, centrifuge, puis
d'acétone ou d'éthanol en agitan
nutes, centrifuge, reprend le préc
lyse contre de l'eau bidistillée ju
volumes d'acétone, laisse reposer
le précipité, le porte à la dess
phosphorique.

Remarque : Avec les sels trich
une précipitation au cours de la
partie du précipité se colle conti
la vitesse de dialyse d'où la néce
ment. La substance blanche, vis
de collodion ou précipitée est au
centrifugée du double point de
ne s'agit donc pas du support-ar

Quelques propriétés chimiques

On sait déjà que la fertilisine
par le sulfate d'ammonium à satu
substances obtenues directement
à partir des eaux ovulaires sont i
nique et lavage à l'éther, la fertilis
chouteux rappelant le gluten. Aprè
phe brillante et finement craquel

çon qu'elle s'aère était encore active. Cette propriété est intéressante car elle indique que la fertilisine ne coagule pas par la chaleur, même en présence de NaCl.

Nous avons ensuite extrait la fertilisine de la manière suivante : On part d'une eau de mer ovulaire dont l'activité a été préalablement testée, on la chauffe à l'ébullition pendant 10-15 minutes (il se produit des coagulats filamenteux d'importance variable), on filtre ou centrifuge, laisse refroidir jusqu'à stabilisation de la température puis on précipite par 4-5 volumes d'éthanol absolu ou d'acétone; on laisse reposer 15 minutes à la température du laboratoire, centrifuge, lave le précipité à l'éther (on peut le sécher à 50° C). On le dissout au mieux à l'aide d'un agitateur dans le minimum d'eau de mer, centrifuge : le liquide surnageant renferme de la fertilisine. Le résidu insoluble est purifié de la façon suivante : on le place dans un mortier en présence d'un abrasif quelconque (nous avons utilisé le sable de Fontainebleau) et d'une solution d'acide trichloracétique normal, on le broie alors pendant 30-60 minutes, centrifuge et met le surnageant à dialyser contre de l'eau de mer courante jusqu'à pH de l'eau de mer. Le dialysat renferme de la fertilisine. On peut également dialyser contre de l'eau bidistillée jusqu'à pH 7 et précipiter ensuite par 4-5 volumes d'alcool ou d'acétone, laver le précipité à l'éther et le sécher dans le vide à P205.

Par cette technique nous avions obtenu une fertilisine de pureté convenable, néanmoins la présence dans l'eau de mer de matières organiques thermostables, précipitables par l'éthanol ou l'acétone en même temps que la fertilisine et solubles dans CCl_3CO_2H N rendait préférable le procédé d'isolement de la fertilisine à partir des ovules. Or il était important de pouvoir comparer des échantillons de fertilisine obtenus directement à partir des ovules avec ceux obtenus à partir de l'eau de mer ovulaire. C'est pourquoi nous avons mis au point la technique suivante à laquelle nous nous sommes arrêté (toutes les opérations se font à la température du laboratoire).

On place les ovules dans une solution isotonique de NaCl (35,5 g./1). On agite lentement pendant 5 minutes de façon à faciliter la diffusion de la fertilisine, centrifuge, puis on ajoute au surnageant 4-5 volumes d'acétone ou d'éthanol en agitant constamment, laisse reposer 30 minutes, centrifuge, reprend le précipité par CCl_3CO_2H N, centrifuge, dialyse contre de l'eau bidistillée jusqu'à la neutralité, précipite par 4-5 volumes d'acétone, laisse reposer 30 minutes, centrifuge, lave à l'éther le précipité, le porte à la dessiccation dans le vide sulfurique ou phosphorique.

Remarque : Avec les sels trichloracétiques concentrés il se produit une précipitation au cours de la dialyse contre l'eau distillée : une partie du précipité se colle contre le sac de collodion ce qui ralentit la vitesse de dialyse d'où la nécessité de dialyser en agitant constamment. La substance blanche, visqueuse, collée sur les parois du sac de collodion ou précipitée est aussi active que la solution opalescente centrifugée du double point de vue gynogamone I-gynogamone II. Il ne s'agit donc pas du support-annexe des auteurs allemands.

Quelques propriétés chimiques :

On sait déjà que la fertilisine est thermostable et qu'elle précipite par le sulfate d'ammonium à saturation en milieu d'eau distillée. Les substances obtenues directement à partir des ovules ou indirectement à partir des eaux ovulaires sont identiques. Après précipitation acétonique et lavage à l'éther, la fertilisine se présente sous un aspect caoutchouteux rappelant le gluten. Après dessiccation c'est une masse amorphe brillante et finement craquelée, plus ou moins brunâtre, se dis-

solvant assez mal dans l'eau distillée ou l'eau de mer à froid donnant des solutions opalescentes blanches. Ses solutions aqueuses précipitent avec l'androgamone I, la thymohistone de veau. Elle donne une réaction du biuret légèrement positive, la réaction des hexoses est nette (Molisch), les réactions du glycogène et des stérols sont négatives. Elle est insoluble dans l'éthanol, l'acétone, l'éther, le toluène, le benzène, le dioxane, le formol à 35 p. 100, l'alcool amylique, le tétrachlorure de carbone, le sulfure de carbone. Elle renferme 10,27 p. 100 d'azote, nous n'y avons pas décelé de phosphore. Par chauffage en milieu acide elle donne lieu à un précipité biologiquement inactif.

Quelques propriétés biologiques :

La substance que nous avons obtenue active, attire et agglutine réversiblement les spermatozoïdes en eau de mer, c'est pourquoi nous avons constamment employé le terme général de fertilisine dans l'exposé que nous avons consacré à l'extraction. CORNMAN [8] avait déjà signalé qu'il était possible de séparer par dialyse la gynogamone I de la gynogamone II : la gynogamone I dialyse tandis que la gynogamone II *et une partie de la gynogamone I* restent dans le dialyseur. Or nous avons pu constater que *l'intensité de l'agglutination réversible était proportionnelle à l'activité flagellaire des spermatozoïdes utilisés.* C'est pourquoi nous allons être amené à examiner le mécanisme de l'activation flagellaire (*) et la nature chimique de la substance responsable de ce phénomène. Disons tout de suite qu'il n'y a pas de critères objectifs de la motilité spermatique, cependant la technique des trois gouttes classiquement utilisée permet d'établir des comparaisons (**).

L'activation flagellaire :

Cette activation peut emprunter bien des voies, d'où la multiplicité des agents pouvant jouer le rôle de gynogamone I. Nous allons examiner les différentes possibilités :

I) L'activation serait liée à un accroissement de la respiration spermatique qui indirectement, par accroissement général du métabolisme, accélérerait le mouvement flagellaire. Ce serait le mode d'action de

(*) Il convient de faire immédiatement le départ entre les différents types d'*activations* que l'on connaît dans le domaine des gamones et de la fécondation. Il existe en effet : 1°) l'*activation cytoplasmique de l'ovule* qui correspond au premier temps de la fécondation ou de la parthénogénèse, caractérisée dans les conditions normales, chez l'Oursin tout-au-moins, par la formation de la membrane de fécondation ; elle conduit à 2°) l'*activation nucléaire de l'ovule* qui est identique à 3°) l'*activation nucléaire spermatique* qui correspond à une dissociation des nucléoprotéines, dissociation qui paraît indispensable à la formation de l'aster spermatique après la pénétration du gamète mâle dans l'ovule ; 4°) l'*activation des mouvements des spermatozoïdes par prolongation du temps de battements flagellaires* ; 5°) l'*activation des mouvements des spermatozoïdes par augmentation du nombre de battements flagellaires de base.*

Remarquons que l'agglutination réversible s'effectue généralement *par les flagelles.*

(**) Cette technique consiste à placer au centre d'une lame porte-objet de microscopie une goutte de sperme concentré et frais, à gauche une goutte d'eau de mer et à droite une goutte d'eau de mer renfermant la substance à essayer ou inversement. On recouvre ces gouttes d'une lamelle et on observe à un grossissement moyen alternativement les frontières sperme-eau de mer et sperme-X. Avec une certaine habitude on distingue aisément les différences d'activité flagellaires. Cette technique est préférable à celle des capillaires qui est très délicate à réaliser.

l'échinochrome dans les expéri
avaient été vérifiées), étant d
mais ceux-ci ont eux-mêmes ét
nous-même supposé [18] qu'il
vation soient de nature respir
P. lividus sont des antioxygèr
complexe renferme du fer, d'où
des mécanismes respiratoires.

L'expérience suivante va nou
en tout cas un *facteur limitant*

On prépare une eau de mer
On la laisse de 16 à 24 heure
présence des ovules. Après ce t
les spermatozoïdes qui devienne
à une destruction de la fertili
une multiplication bactérienne
teurienne n'était prise pour la
de mer ovulaire. Cependant si
qu'on la dilue avec 6-10 volun
agglutinant typique réapparaît.
la technique de WINKLER-NICLO
l'eau de mer normale et *aucun*
ovulaire conservée. Il existe don
fertilisine puisse agir. De plus c
part l'activité des spermatozoïde
le phénomène de LILLIE (*), d'au
gène les spermatozoïdes ne sont
qu'on ne saurait comme l'a fait
une agglutinine du type sérique
rendait d'ailleurs impossible tou
même à une albumine).

Nous nous sommes alors demar
l'oxygène qui était responsable d
tiques obtenus par l'eau de mer
qu'une fois l'agglutination termi
ajoutant de l'eau de mer ovulaire
suivante nous avons encore pu de
pas dans le phénomène de désagr

Il est commode pour effectuer l
point de vue agrégation spermati
d'eau de mer ovulaire dans un ver
tes d'un sperme concentré et frai
mogénéisation complète : les agré
ou moins immédiatement après l'
au bout d'un temps plus ou moin
tion on ajoute une goutte de spe
homogénéise, l'agrégation se reforn
laire nous avons pu obtenir jusqu'
lisant à chaque fois un sperme fr
que ce sont les spermatozoïdes f
rience, qui n'avait jamais été effect
d'enseignements ; elle indique pa
l'agglutination spermatique n'est p
lisine mais à une modification de
les résultats de POPA [21] qui avait

(*) Remarquons toutefois que d'apr
pas nécessaire à la motilité des sperm

l'eau de mer à froid donnant
solutions aqueuses précipitent
de veau. Elle donne une ré-
réaction des hexoses est nette
les stérols sont négatives. Elle
éther, le toluène, le benzène,
amylique, le tétrachlorure de
rme 10,27 p. 100 d'azote, nous
chauffage en milieu acide elle
nt inactif.

active, attire et agglutine ré-
de mer, c'est pourquoi nous
néral de fertilisine dans l'ex-
tion. CORNMAN [8] avait déjà
par dialyse la gynogamone I
dialyse tandis que la gyno-
ne I restent dans le dialyseur.
é de l'agglutination réversible
e des spermatozoïdes utilisés.
à examiner le mécanisme de
himique de la substance res-
de suite qu'il n'y a pas de
ique, cependant la technique
permet d'établir des compa-

des voies, d'où la multiplicité
nogamone I. Nous allons exa-

sement de la respiration sper-
ment général du métabolisme,
e serait le mode d'action de

départ entre les différents types
ine des gamones et de la fécon-
ytoplasmique de l'ovule qui cor-
ou de la parthénogénèse, carac-
l'Oursin tout-au-moins, par la
; elle conduit à 2°) l'*activation*
'activation nucléaire spermatique
éoprotéines, dissociation qui pa-
r spermatique après la pénétra-
'activation des mouvements des
s de battements flagellaires ;
natozoïdes par augmentation du

e s'effectue généralement *par les*

centre d'une lame porte-objet de
é et frais, à gauche une goutte
e mer renfermant la substance à
ttes d'une lamelle et on observe
les frontières sperme-eau de mer
on distingue aisément les diffé-
ie est préférable à celle des ca-

l'échinochrome dans les expériences de l'équipe allemande (si celles-ci avaient été vérifiées), étant donné les résultats de FRIEDHEIM [17], mais ceux-ci ont eux-mêmes été contestés par TYLER [5]... Nous avons nous-même supposé [18] qu'il était possible que le tactisme et l'activation soient de nature respiratoire : les caroténoïdes ovulaires de *P. lividus* sont des antioxygènes, ils sont liés à une protéine et ce complexe renferme du fer, d'où la possibilité de leur intervention dans des mécanismes respiratoires.

L'expérience suivante va nous montrer que l'*oxygène du milieu* est en tout cas un *facteur limitant de l'agglutination spermatique :*

On prépare une eau de mer ovulaire et on vérifie qu'elle est active. On la laisse de 16 à 24 heures à la température du laboratoire en présence des ovules. Après ce temps on constate qu'*elle n'agrège plus les spermatozoïdes* qui deviennent immobiles. Ce fait peut être attribué à une destruction de la fertilisine par un enzyme quelconque ou à une multiplication bactérienne étant donné qu'aucune précaution pasteurienne n'était prise pour la confection et la conservation de l'eau de mer ovulaire. Cependant si on prélève 0,1 ml. de cette solution et qu'on la dilue avec 6-10 volumes d'eau de mer *fraîche* le *pouvoir agglutinant typique réapparaît.* Nous avons alors dosé l'oxygène selon la technique de WINKLER-NICLOUX : on trouvait 8,15 mg. d'O_2/1 dans l'eau de mer normale et *aucune trace d'oxygène dans l'eau de mer ovulaire conservée.* Il existe donc un *seuil* d'oxygénation pour que la fertilisine puisse agir. De plus ce résultat prouve deux choses : d'une part l'activité des spermatozoïdes est essentielle pour qu'ils donnent le phénomène de LILLIE (*), d'autre part le fait qu'en absence d'oxygène les spermatozoïdes ne sont pas agglutinés *statiquement* indique qu'on ne saurait comme l'a fait TYLER [20] comparer la fertilisine à une agglutinine du type sérique (son extractibilité par CCl_3CO_2H N rendait d'ailleurs impossible toute assimilation à une globuline ou même à une albumine).

Nous nous sommes alors demandé si ce n'était pas la disparition de l'oxygène qui était responsable de la rupture des agglutinats spermatiques obtenus par l'eau de mer ovulaire. Cependant on savait déjà qu'une fois l'agglutination terminée on ne pouvait la reproduire en ajoutant de l'eau de mer ovulaire fraîche. En effectuant l'expérience suivante nous avons encore pu démontrer que l'oxygène n'intervenait pas dans le phénomène de désagrégation :

Il est commode pour effectuer les expériences avec la fertilisine, du point de vue agrégation spermatique, de placer quelques 1/10 de ml. d'eau de mer ovulaire dans un verre de montre, d'y ajouter I à II gouttes d'un sperme concentré et frais et d'agiter rapidement jusqu'à homogénéisation complète : les agrégats spermatiques apparaissent plus ou moins immédiatement après l'arrêt de l'agitation et disparaissent au bout d'un temps plus ou moins long. Or *si après cette désagrégation on ajoute une goutte de sperme concentré et frais et que l'on homogénéise, l'agrégation se reforme.* Avec une même eau de mer ovulaire nous avons pu obtenir jusqu'à 6 agrégations consécutives en utilisant à chaque fois un sperme frais. Il est vraisemblable d'admettre que ce sont les spermatozoïdes frais qui s'agglutinent. Cette expérience, qui n'avait jamais été effectuée malgré sa simplicité, est pleine d'enseignements ; elle indique particulièrement que la cessation de l'agglutination spermatique n'est pas due à la destruction de la fertilisine mais à une modification des spermatozoïdes, ce qui confirme les résultats de POPA [21] qui avait constaté une modification morpho-

(*) Remarquons toutefois que d'après McLEOD [19] l'oxygène ne serait pas nécessaire à la motilité des spermatozoïdes humains.

logique des spermatozoïdes soumis à l'action de l'eau de mer ovulaire et elle montre qu'il n'est pas utile de faire intervenir une quelconque « fertilisine univalente » [22] dans les questions de désagrégation spermatique.

2) On sait que les protéines basiques spermatiques sont capables d'agglutiner les spermatozoïdes dont elles sont issues. Ces auto-agglutinats irréversibles apparaissent au bout de quelques secondes après la dispersion du sperme concentré (prélevé dans les testicules) dans de l'eau de mer normale ; ce sont de minces agrégats localisés à la surface de l'eau. Certains auteurs ont admis une relation entre l'activité du sperme et sa faculté d'auto-agglutination ; cette relation est évidente s'il s'agit de l'activation nucléaire, les travaux de POLLISTER et MIRSKY [23] dont nous aurons l'occasion de reparler indiquent nettement que l'extraction des nucléoprotéines à acide desoxyribonucléique sous l'influence des solutions salines s'effectue conjointement à leur dissociation, or les protéines basiques ainsi libérées sont agglutinantes. Remarquons que cette auto-agglutination ne porte pas sur tous les spermatozoïdes d'une même suspension spermatique, cependant dans la mesure où on inhibera ce phénomène l'activité totale de la suspension spermatique considérée sera accrue puisqu'elle sera conservée.

On peut précisément inhiber l'auto-agglutination en ajoutant des substances à point isoélectrique acide qui auront tendance à se combiner avec les protéines basiques spermatiques. On savait déjà que le sérum concentré (de cheval par exemple) inhibait les mouvements des spermatozoïdes mais qu'après dilution il avait au contraire tendance à prolonger leur motilité, cependant la présence d'enzymes — particulièrement de lécithase et de phosphatase — dans le sérum empêchent de conclure sur le mode d'action réel de ce milieu complexe. Nous avons toutefois reconnu que l'ovalbumine et la céphaline prolongeaient la motilité des spermatozoïdes.

On conçoit que la fertilisine elle-même, qui a un point isoélectrique acide, possède cette affinité envers l'androgamone I (*). Cependant nous avons constaté qu'après leur agglutination par la fertilisine les spermatozoïdes étaient *moins* mobiles que des spermatozoïdes en eau de mer normale après un même temps ; mais le problème est ici différent : la fertilisine possède sa propriété d'isoélectrique acide à côté d'autres propriétés biologiques plus importantes et particulièrement la faculté de l'eau de mer ovulaire de produire des modifications morphologiques sur les spermatozoïdes (POPA, *loc. cit.*) paraît être en relation avec la dépression des mouvements flagellaires.

3) Enfin l'activation flagellaire proprement dite (augmentation du nombre de battements dans une unité de temps) (**) peut porter sur le système flagellaire lui-même. Or les résultats de ENGELHARDT et collaborateurs [24], IVANOV et collaborateurs [25], MCLEOD [19], MANN [26], HARVEY et ANDERSON [27] sur le métabolisme et la structure des spermatozoïdes et particulièrement du système flagellaire permettent, avec certaines réserves, de comparer ces fibres contractiles à celles d'un muscle rudimentaire. On doit donc éventuellement pouvoir accélérer les mouvements flagellaires en activant un des systèmes responsables du mouvement normal du flagelle. Or CORNMAN, dans son intéressant travail, avait suggéré que le tactisme et l'activation constatés

(*) Le pouvoir anti-fertilisine des protéines basiques constituant l'androgamone I relève de la formation de complexes hétéropolaires entre ces substances, complexes dont l'insolubilité est fonction de la salinité et du pH.

(**) Insistons encore sur ce que cette « mesure » a de subjectif.

avec l'échinochrome (techniq
KUHN-HARTMANN pouvaient êtr
le tube à échinochrome, il ava
[28] et COHN [29] que l'augme
accélérait les mouvements spe
tré [24] que la motilité des spe
transformations de l'acide ad
ment on sait que l'optimum d'a
mer de Roscoff est aux environ
les résultats de CORNMAN, GRA
sur la motilité spermatique en
par augmentation de l'alcalinit

Disons avant toute chose c
le chlorure de magnésium mob
et de Vertébrés ; de plus CORN
solution de NaCl les spermatoz
nables » par la fertilisine, ce qu
tus. Par contre nous avons pu
spermatozoïdes n'était pas affec
tion renfermant 35 p. 1000 de Na
rent » alors rapidement (arrêt t
alors recherché si l'adjonction
lisine dans de l'eau à 35 p. 1000
des spermatozoïdes. Toutes nos
résultats identiques : les souill
des ions ou d'autres substance
l'animal sont en effet toujours
d'un grand nombre d'expérienc
Cl_2Ca lève effectivement l'inhib
calinité favorise son action) (*)
Cl_2Ca (à 20 g./l. d'eau de mer
flagellaires et diminue de plus
faits nous paraissent indiquer :

1°) que, ce que nous avions
facteur paraissant nécessaire à
matozoïdes par la fertilisine, c
présenter quelque intérêt étant
gynogamones dans nos préparat

2°) que le calcium représente
tant de l'activité de la fertilisin

Tous ces résultats sont intére
blable d'admettre que ce soit le
tilisent donc constituent la gyno
CLOWES et BACHMAN puis CORN
de mer ovulaire activait les sp
expériences en distillant de l'ea
un appareil de distillation pou
conduite comme pour un dosage
de l'eau de mer normale ; on ar
avait doublé. Dans ces conditio
pas les spermatozoïdes mais il
heures d'aération du distillat. C
que avec 4 volumes d'eau de me
effectivement le mouvement flag

(*) Fertilisine en solution aqueus
pH 8.

avec l'échinochrome (technique des tubes capillaires) par l'équipe KUHN-HARTMANN pouvaient être dus à une alcalinité plus élevée dans le tube à échinochrome, il avait en effet remarqué à la suite de GRAY [28] et COHN [29] que l'augmentation de l'alcalinité de l'eau de mer accélérait les mouvements spermatiques. De plus ENGELHARDT a montré [24] que la motilité des spermatozoïdes dépendait directement des transformations de l'acide adénosinetriphosphorique (ATP). Précisément on sait que l'optimum d'activité de l'ATPase est à pH 9 (l'eau de mer de Roscoff est aux environs de pH 8), ce qui nous paraît expliquer les résultats de CORNMAN, GRAY et COHN. Nous avons donc pensé agir sur la motilité spermatique en activant l'ATPase non plus cette fois par augmentation de l'alcalinité mais à l'aide d'ions comme Ca^{++}.

Disons avant toute chose que GELLHORN [30] avait montré que le chlorure de magnésium mobilisait les spermatozoïdes d'Invertébrés et de Vertébrés ; de plus CORNMAN avait encore constaté que dans une solution de NaCl les spermatozoïdes d'*Arbacia* n'étaient pas « agglutinables » par la fertilisine, ce que nous avons confirmé sur *Paracentrotus*. Par contre nous avons pu observer que l'auto-agglutination des spermatozoïdes n'était pas affectée lorsqu'on les plaçait dans une solution renfermant 35 p. 1000 de NaCl, mais que les spermatozoïdes « meurent » alors rapidement (arrêt total de leurs mouvements). Nous avons alors recherché si l'adjonction d'ions divalents à une solution de fertilisine dans de l'eau à 35 p. 1000 en NaCl levait l'inhibition d'agrégation des spermatozoïdes. Toutes nos expériences ne nous ont pas donné des résultats identiques : les souillures des gamètes mâles ou femelles par des ions ou d'autres substances lors de leur extraction du corps de l'animal sont en effet toujours à craindre, cependant de l'ensemble d'un grand nombre d'expériences nous pensons pouvoir conclure que Cl_2Ca lève effectivement l'inhibition (l'augmentation conjointe de l'alcalinité favorise son action) (*). Nous avons en tout cas constaté que Cl_2Ca (à 20 g./l. d'eau de mer) active sensiblement les mouvements flagellaires et diminue de plus le temps de latence d'agrégation. Ces faits nous paraissent indiquer :

1°) que, ce que nous avions déjà vu, l'activité spermatique est un facteur paraissant nécessaire à l'agglutination temporaire des spermatozoïdes par la fertilisine, constatation qui ne peut manquer de présenter quelque intérêt étant donné la présence simultanée des deux gynogamones dans nos préparations de fertilisine hautement purifiée ;

2°) que le calcium représenterait un nouveau type de facteur limitant de l'activité de la fertilisine.

Tous ces résultats sont intéressants en soi mais il est peu vaisemblable d'admettre que ce soit le calcium ou la fertilisine qui se volatilisent donc constituent la gynogamone I. On se souvient en effet que CLOWES et BACHMAN puis CORNMAN ont affirmé que le distillat d'eau de mer ovulaire activait les spermatozoïdes. Nous avons repris ces expériences en distillant de l'eau de mer ovulaire de *P. lividus* dans un appareil de distillation pour micro-Kjeldahl et l'opération était conduite comme pour un dosage d'azote. On recevait le distillat dans de l'eau de mer normale ; on arrêtait la distillation lorsque le volume avait doublé. Dans ces conditions non seulement le distillat n'active pas les spermatozoïdes mais il les immobilise, même après plusieurs heures d'aération du distillat. Cependant si on dilue ce distillat toxique avec 4 volumes d'eau de mer normale, le nouveau milieu *accélère* effectivement le mouvement flagellaire. En règle générale pour cons-

(*) Fertilisine en solution aqueuse à 30 p. 1000 NaCl + 5,5 p. 1000 $CaCl_2$; pH 8.

tater une activation il faut ramener le volume du distillat au moins au volume du distillant. Mais l'activation a lieu encore après des dilutions considérables : CLOWES et BACHMAN ont obtenu des activations spermatiques avec des alcools à des dilutions dépassant le 1/100.000.000 ! Cette extrême activité nous a fait éliminer l'oxygène comme agent activateur possible dans les expériences de distillation.

Dans un court exposé précédent [18] nous avions surtout souligné l'analogie que l'on pouvait établir entre les gamones et les toxines bactériennes et singulièrement entre la fertilisine et l'antigène O des bactéries à Gram négatif. On sait qu'*in vitro* ces substances attirent les polynucléaires mais qu'*in vivo* au contraire elles inhibent leur diapédèse par un mécanisme indirect [31]. C'est dans cet esprit que, parallèlement à nos recherches sur le tactisme spermatique, nous avions ébauché avec Madeleine MARREC une étude du tactisme lymphocytaire chez les Invertébrés [32]. Nous devions terminer quelques expériences et les rédiger lorsqu'un accident mis tragiquement fin à la vie de Madeleine MARREC. Elle aurait cependant pu constater le rôle lymphotactique positif de l'antigène O du bacille typhique O 901 et du polysaccharide correspondant. Ainsi paraissait se préciser l'analogie, et celle-ci était d'autant plus plausible que la localisation cellulaire de ces deux types de substances est la même, c'est-à-dire périphérique, et qu'elles sont extractibles par l'acide trichloracétique, ceci étant peut-être la conséquence de cela. D'autre part LOISEL [33] avait montré que l'ovule d'Oursin renfermait une toxalbumine et nous en étions alors à l'analyse chimique de la fertilisine que nous considérions déjà comme un mucinoïde, or des substances apparentées comme la mucine sont connues pour avoir la propriété d'abaisser la résistance des animaux aux infections [34]. Mais cette même analyse chimique nous révélait des différences importantes entre fertilisine et antigène O (portant sur l'azote, le phosphore essentiellement). Cependant partant de ces considérations analogiques nous avons ainsi été amené à soupçonner la présence dans la fertilisine d'une fraction lipidique ou plus exactement d'un produit de dégradation de lipides, ce qui était vraisemblable à la suite des résultats de GLASER [35] relatifs à la présence d'une lipase dans les produits de sécrétions ovulaires.

Nous avons alors repris des expériences de distillation de l'eau de mer ovulaire et nous avons constaté que *le produit volatil est basique.* Voici le protocole d'une expérience :

On place 3,740 grammes (poids humide) d'ovule ovariens mûrs et frais en présence de 100 ml. d'eau de mer normale (milieu *alcalin*) ; on laisse en contact 30 minutes en agitant de temps en temps, puis on centrifuge à fond de façon à obtenir une eau de mer ovulaire absolument dépourvue de cellules ou de fragments de gangues. On vérifie son pouvoir gamonal et met à distiller dans un appareil de Kjeldahl 20 ml. de cette préparation. Nous recueillons le distillat dans un indicateur de pH comme pour un dosage d'ammoniaque et nous dosons avec un acide sulfurique N/84 : nous avons trouvé une libération de produits basiques correspondant à 0,09 ml. de cet acide (*). Si la préparation-mère est laissée une nuit au repos à 18° C puis distillée, on trouve une libération de base de 4 à 5 fois plus importante que la veille. Faut-il attribuer ce fait à la présence d'une lipase ou d'un autre système enzymatique ? Faut-il le relier à la toxicité pour les spermatozoïdes des eaux de mer ovulaires conservées ? Des expériences en cours nous le dirons.

(*) On obtient des résultats similaires avec une solution de fertilisine purifiée en eau de mer.

Quoiqu'il en soit, des témoi
de mer normale ou une soluti
n'ont pas livré de bases volati
suspension de spermatozoïdes
O 901 ou encore de céphaline,
tion de bases, mais, tandis que
ration était brusque et massiv
mentionnées elle était faible m
long, ce qui laisse supposer q
d'une hydrolyse alors qu'elles
l'eau de mer ovulaire. Remarqu
exemple (20 mg. suspendus d
recueilli dans 1 ml. d'eau de
dilué 45 fois avec de l'eau de
que moins intensément que le

Le distillat d'eau de mer ov
investigations, chauffé en prés
de triméthylamine, cependant e
tion concentrée de sel de Rein
tion d'un reineckate ; recueilli
lieu à la formation d'un précip
s'agisse d'ammoniaque. La nat
venant de la fertilisine reste à
montré que la substance se tro
la substance présente dans l'e
suite de ces résultats le flagell
ment avoir un comportement tr
culaire et nous avions posé con
quent réagir avec les substance
les méthylamines. etc. LARDY,
expériences avaient cependant
accélérer la mise en mouvement
didyme de Bovidées, mais il n'y
en mouvement et l'accélération
surtout entre spermatozoïdes d
façon nous n'avions pas à notr
nous proposons d'ailleurs d'étud
tre nous possédions de l'*adréna*

0,5-1mg./ml. de cette hormon
autoxydation rapide due à l'alcal
vement flagellaire spermatique ;
tence d'agglutination par la fertil

Ces résultats constituent une n
vité flagellaire dans l'agrégation
matozoïdes à l'allure d'un véritab
spermatozoïdes placés dans une
immobiles.

II. — AN

Pour HARTMANN [37] cette gam
d'une protéine basique agglutina
tains spermatozoïdes d'une suspe
nation peut porter sur l'ensembl
tion de concentration), aurait p
condant en immobilisant les ga
loin d'être claire mais d'autre p

ıme du distillat au moins au
lieu encore après des dilu-
ʌN ont obtenu des activa-
des dilutions dépassant le
ıs a fait éliminer l'oxygène
expériences de distillation.
ous avions surtout souligné
les gamones et les toxines
rtilisine et l'antigène O des
ıitro ces substances attirent
:aire elles inhibent leur dia-
'est dans cet esprit que, pa-
ıe spermatique, nous avions
ıde du tactisme lymphocy-
ɔns terminer quelques expé-
ıis tragiquement fin à la vie
nt pu constater le rôle lym-
ıcille typhique O 901 et du
issait se préciser l'analogie,
ue la localisation cellulaire
ıe; c'est-à-dire périphérique,
trichloracétique, ceci étant
part LOISEL [33] avait mon-
xalbumine et nous en étions
ıine que nous considérions
nces apparentées comme la
ıété d'abaisser la résistance
ıtte même analyse chimique
ɜs entre fertilisine et anti-
essentiellement). Cependant
nous avons ainsi été amené
ine d'une fraction lipidique
radation de lipides, ce qui
ts de GLASER [35] relatifs à
ɜ de sécrétions ovulaires.
s de distillation de l'eau de
e produit volatil est basique.

e) d'ovule ovariens mûrs et
r normale (milieu *alcalin*) ;
nt de temps en temps, puis
ıne eau de mer ovulaire ab-
agments de gangues. On vé-
ɜr dans un appareil de Kjel-
cueillons le distillat dans un
ɜ d'ammoniaque et nous do-
ɜ avons trouvé une libération
9 ml. de cet acide (*). Si la
repos à 18° C puis distillée,
5 fois plus importante que
ésence d'une lipase ou d'un
ɜlier à la toxicité pour les
ɜ conservées ? Des expérien-

ɜc une solution de fertilisine

Quoiqu'il en soit, des témoins de distillation réalisés avec de l'eau de mer normale ou une solution de thymohistone dans l'eau de mer n'ont pas livré de bases volatiles ; par contre, par distillation d'une suspension de spermatozoïdes ou d'antigène O du bacille typhique O 901 ou encore de céphaline, nous avons également obtenu la libération de bases, mais, tandis que dans le cas de la fertilisine cette libération était brusque et massive, dans le cas des substances ci-dessus mentionnées elle était faible mais étalée sur un temps beaucoup plus long, ce qui laisse supposer que la ou les bases volatiles provenaient d'une hydrolyse alors qu'elles doivent être plus ou moins libres dans l'eau de mer ovulaire. Remarquons que dans le cas de la céphaline par exemple (20 mg. suspendus dans 5 ml. d'eau de mer) le distillat recueilli dans 1 ml. d'eau de mer jusqu'à volume final de 2,5 ml. et dilué 45 fois avec de l'eau de mer activait les spermatozoïdes, quoique moins intensément que le distillat de fertilisine.

Le distillat d'eau de mer ovulaire, sur lequel ont surtout porté nos investigations, chauffé en présence de soude donnait bien une odeur de triméthylamine, cependant en recueillant le distillat dans une solution concentrée de sel de Reinecke nous n'avons pu obtenir la formation d'un reineckate ; recueilli dans le réactif de Nessler il donnait lieu à la formation d'un précipité jaune, il ne semble donc pas qu'il s'agisse d'ammoniaque. La nature chimique de la base volatile provenant de la fertilisine reste à préciser et d'ailleurs il n'est pas démontré que la substance se trouvant dans le distillat soit identique à la substance présente dans l'eau de mer ovulaire ; cependant à la suite de ces résultats le flagelle spermatique nous paraissait décidément avoir un comportement très comparable à celui d'une fibre musculaire et nous avions posé comme hypothèse qu'il devait par conséquent réagir avec les substances myodynamiques comme la choline, les méthylamines. etc. LARDY, HANSEN et PHILLIPS [36] dans leurs expériences avaient cependant montré que l'acétylcholine ne pouvait accélérer la mise en mouvement de spermatozoïdes provenant de l'épididyme de Bovidées, mais il n'y a pas *a priori* d'identité entre la mise en mouvement et l'accélération du mouvement de spermatozoïdes et surtout entre spermatozoïdes de Vertébrés et d'Invertébrés. De toute façon nous n'avions pas à notre disposition ces produits (que nous nous proposons d'ailleurs d'étudier dans un proche avenir) ; par contre nous possédions de l'*adrénaline cristallisée :*

0,5-1mg./ml. de cette hormone dans l'eau de mer (faible solubilité, autoxydation rapide due à l'alcalinité) active considérablement le mouvement flagellaire spermatique ; de plus elle diminue le temps de latence d'agglutination par la fertilisine et renforce son action.

Ces résultats constituent une nouvelle démonstration du rôle de l'activité flagellaire dans l'agrégation spermatique. Cette activation des spermatozoïdes à l'allure d'un véritable *choc*, en effet après 4-5 minutes les spermatozoïdes placés dans une eau de mer adrénalinique deviennent immobiles.

II. — ANDROGAMONE I.

Pour HARTMANN [37] cette gamone, dont nous rappellerons qu'il s'agit d'une protéine basique agglutinant irréversiblement les ovules et certains spermatozoïdes d'une suspension spermatique (cette auto-agglutination peut porter sur l'ensemble des spermatozoïdes, c'est une question de concentration), aurait pour rôle de prolonger le pouvoir fécondant en immobilisant les gamètes mâles. Une telle conception est loin d'être claire mais d'autre part nous ne pensons pas qu'il faille

chercher dans l'agglutination des ovules l'explication du mode d'action de cette substance ; en effet la fécondation peut se réaliser avec succès en plaçant *un* ovule en présence d'*un* spermatozoïde, dès lors on voit mal le rôle de l'agglutinine spermatique. Or,

1° D'après LOEB [38] la fécondation, qui soulignons-le est un type d'induction mitotique, serait le résultat d'une lyse périphérique de l'ovule par une substance spermatique (on sait aujourd'hui qu'il s'agit de la hyaluronidase) suivie d'une *rectification* c'est-à-dire d'une inhibition de cette lyse par une substance que LOEB supposait liée au spermatozoïde ; si on ne rectifie pas l'ovule activé, la lyse ébauchée à la périphérie s'étend à l'ensemble du gamète femelle d'où l'avortement de la régulation (cette rectification était réalisée dans les parthénogénèses de LOEB à l'aide de solutions hypertoniques) ;

2° KUPELWIESER [39] a montré le premier qu'on pouvait obtenir la formation d'une membrane en plongeant des ovules vierges de *Strongylocentrotus purpuratus* ou *S. franciscanus* dans du sperme concentré ou dans des filtrats de sperme de deux variétés de Chiton et que, si l'on traitait ensuite ces ovules avec de l'eau de mer hypertonique selon LOEB, ils se développaient ;

3° B. T. ROBERTSON [40], en 1912, a extrait par HCl N/10 du spermatozoïde d'Oursin une substance agglutinant les ovules et induisant la formation d'une membrane. Or l'extraction des protéines basiques s'effectue précisément par les acides minéraux fort dilués [41] et HULTIN en 1946 [9] a extrait l'antifertilisine spermatique par ce procédé. De plus ROBERTSON, dans ce même travail signalait qu'il était possible d'obtenir un développement parthénogénétique partiel des ovules d'Oursin en les plongeant dans une eau de mer renfermant son extrait chlorhydrique de spermatozoïdes d'Oursin puis en les portant dans une eau de mer iso- ou hypertonique ;

4° L'apparition des asters, spermatique et ovulaire dans la fécondation ou uniquement ovulaire dans la parthénogénèse, se traduit systématiquement par une augmentation de la viscosité du cytoplasme de l'œuf [42] ;

5° Le suc nucléaire participe directement à la formation de la figure achromatique [43] or il est très riche en protéines basiques ; de plus la perméabilité de l'œuf croît après l'activation cytoplasmique [44] or POLLISTER et MIRSKY [23] ont montré que sous l'influence d'une forte concentration saline les nucléoprotéines du noyau spermatique de Truite étaient dissociées, partiellement extraites, avec *gonflement nucléaire* et apparition de formations chromosomiennes. Cette découverte est importante car elle tend à montrer entre autres que la prophase est conditionnée par la salinité.

Partant de ces considérations nous avons pensé que:

a) La propriété d'androgamone I des protéines basiques spermatiques (agglutination interovulaire) ne devait être qu'une propriété *fortuite* de ces substances et que leur propriété réelle devait être d'intervenir non sur l'ovule mais sur le zygote, autrement dit non pas *avant* la pénétration du spermatozoïde mais *après;*

b) Qu'elles devaient alors réagir avec des substances cytoplasmiques ovulaires à point isoélectrique acide et participer ainsi à la rectification de la fécondation et à la formation de la figure achromatique ;

c) Comme TYLER a pu extraire d'ovules d'Oursin une substance qui nous paraît être une protéine basique étant donné les propriétés décrites par TYLER [20], la rectification de la parthénogénèse serait également supportée par des protéines basiques du noyau ovulaire, l'acti-

vation du noyau étant liée à u
consécutives au premier temps
augmentation de la perméabilit
Nous avons constaté que les
tes par HCl N/10 donnaient lie
bles avec les protéines cytoplas
mortier en présence de NaCl 0,
monique (à saturation) du sur
culot dans NaCl 0,14 M et dial
de ce type, véritables protéin
dans le cas d'autres protéines s
me *symplexes de coordination.*
de avec la thymohistone de Ve
chlorure) et différentes fractio
— Avec les euglobulines, obt
contre de l'eau bidistillée, la th
solubles uniquement dans la s
[46] ou la solution de BANGA
— Avec des albumines crista
tenues par fractionnement am
mohistone donne également de
tion d'EDSALL.

Il y a donc toute une gamme
gamme de *solubilités,* telle que,
sont d'autant moins solubles q
tant plus polymérisée. Or la clu
basique, est une protéine fibre
trice dans la formation de la
leurs certainement formée par
protéiques : ses mouvements sc
ATPase, en tout cas PASTEELS y
d'acide ribonucléique ; mais c
telle figure, c'est sa propriété d
qui nous paraît liée à la format
Les résultats de MIRSKY [49]
rappelons les faits : MIRSKY a
sédait 82-85 p. 100 de ses prot
dis que l'œuf fécondé n'en po
mêmes conditions, il en a déd
Or à cette « dénaturation » ne
—SH, mais surtout nous ne pe
dénaturation en se fondant uni
on se reporte maintenant à n
de complexes protéiques, on c
taine quantité de protéines cyt
née avec des protéines nuclé
solubles, il y ait moins de pro
les protéines basiques possè
GREENSTEIN et JENRETTE [50] c
naturait certaines protéines, n
protéines acides lors de leur ac

(*) Dans une note préliminaire
basiques nucléaires se fixaient à
plexes insolubles type CHARGAFF
erroné, des protéines cytoplasm
sous forme de cénapses lipoprotéi
des « symplexes de coordination
est possible qu'intervienne la pa

les l'explication du mode d'ac-
condation peut se réaliser avec
ce d'*un* spermatozoïde, dès lors
permatique. Or,

ı, qui soulignons-le est un type
tat d'une lyse périphérique de
(on sait aujourd'hui qu'il s'agit
ication c'est-à-dire d'une inhibi-
e LOEB supposait liée au sperma-
ctivé, la lyse ébauchée à la péri-
femelle d'où l'avortement de la
ısée dans les parthénogénèses de
s) ;

remier qu'on pouvait obtenir la
ınt des ovules vierges de *Stron-*
canus dans du sperme concentré
variétés de Chiton et que, si l'on
eau de mer hypertonique selon

extrait par HCl N/10 du sper-
lutinant les ovules et induisant
traction des protéines basiques
minéraux fort dilués [41] et
ilisine spermatique par ce pro-
ême travail signalait qu'il était
parthénogénétique partiel des
ıs une eau de mer renfermant
ıtozoïdes d'Oursin puis en les
hypertonique ;

que et ovulaire dans la féconda-
arthénogénèse, se traduit systé-
e la viscosité du cytoplasme de

ment à la formation de la figure
en protéines basiques ; de plus
ctivation cytoplasmique [44] or
que sous l'influence d'une forte
nes du noyau spermatique de
extraites, avec *gonflement nu-*
omosomiennes. Cette découverte
r entre autres que la prophase

avons pensé que:

es protéines basiques spermati-
evait être qu'une propriété *for-*
priété réelle devait être d'inter-
te, autrement dit non pas *avant*
après;

des substances cytoplasmiques
t participer ainsi à la rectifica-
de la figure achromatique ;

ules d'Oursin une substance qui
étant donné les propriétés dé-
le la parthénogénèse serait éga-
siques du noyau ovulaire, l'acti-

vation du noyau étant liée à une dissociation de ses nucléoprotéines consécutives au premier temps de la parthénogénèse qui conduit à une augmentation de la perméabilité.

Nous avons constaté que les protéines basiques spermatiques extraites par HCl N/10 donnaient lieu à la formation de complexes insolubles avec les protéines cytoplasmiques d'ovules extraits par broyage au mortier en présence de NaCl 0,14 M, centrifugation, précipitation ammonique (à saturation) du surnageant, centrifugation, dispersion du culot dans NaCl 0,14 M et dialyse contre NaCl 0,14 M. Des complexes de ce type, véritables protéinates de protéines, ont déjà été étudiés dans le cas d'autres protéines surtout par PRZYLECKI [45] qui les nomme *symplexes de coordination.* Nous avons entrepris ensuite une étude avec la thymohistone de Veau (extraite également à l'état d'hydrochlorure) et différentes fractions de protéines sériques :

— Avec les euglobulines, obtenues par dialyse du sérum de Cheval contre de l'eau bidistillée, la thymohistone donne lieu à des précipités solubles uniquement dans la solution d'EDSALL-BANGA-SZENT-GYORGYI [46] ou la solution de BANGA-SZENT-GYORGYI [46] ;

— Avec des albumines cristallisées ou des albumines amorphes obtenues par fractionnement ammonique du sérum de Cheval, la thymohistone donne également des précipités déjà solubles dans la solution d'EDSALL.

Il y a donc toute une gamme de ces complexes correspondant à une gamme de *solubilités,* telle que, *pour une même histone, ces complexes sont d'autant moins solubles que leur protéine « cénapsée » est d'autant plus polymérisée.* Or la clupéine, par exemple, qui est une protéine basique, est une protéine fibreuse [47] d'où son rôle possible de matrice dans la formation de la figure achromatique ; celle-ci est d'ailleurs certainement formée par d'autres substances que des complexes protéiques : ses mouvements sont peut-être soumis à un système ATP-ATPase, en tout cas PASTEELS y a reconnu récemment [48] la présence d'acide ribonucléique ; mais ce qui nous semble important dans une telle figure, c'est sa propriété de charpente, de *molécules de structure,* qui nous paraît liée à la formation de complexes protéiques (*).

Les résultats de MIRSKY [49] peuvent s'expliquer de la même façon ; rappelons les faits : MIRSKY a constaté que l'œuf vierge d'Oursin possédait 82-85 p. 100 de ses protéines solubles dans KCl M à pH 7,3 tandis que l'œuf fécondé n'en possédait plus que 69-72 p. 100 dans les mêmes conditions, il en a déduit que des protéines se dénaturaient. Or à cette « dénaturation » ne correspond pas de libération de groupes —SH, mais surtout nous ne pensons pas qu'on puisse conclure à une dénaturation en se fondant uniquement sur une perte de solubilité. Si on se reporte maintenant à nos expériences relatives à la formation de complexes protéiques, on conçoit qu'après la fécondation une certaine quantité de protéines cytoplasmiques (« acides ») s'étant combinée avec des protéines nucléaires pour donner des ensembles moins solubles, il y ait moins de protéines solubles dans KCl M. Cependant les protéines basiques possèdent des groupements guanidiques et GREENSTEIN et JENRETTE [50] ont montré que le cation guanidium dénaturait certaines protéines, mais si cette dénaturation possible des protéines acides lors de leur accouplement avec des protéines basiques

(*) Dans une note préliminaire [51] nous avions suggéré que les protéines basiques nucléaires se fixaient à des phospholipides pour donner des complexes insolubles type CHARGAFF [52]. Ce point de vue n'est peut-être pas erroné, des protéines cytoplasmiques, tout-au-moins, pouvant se trouver sous forme de cénapses lipoprotéiques type MACHEBŒUF et dans la formation des « symplexes de coordination » on ne sait rien du mode de liaison : il est possible qu'intervienne la partie lipidique.

demande certainement à être étudiée, nous ne pensons pas qu'elle représente le fond même du phénomène découvert par MIRSKY.

Nous consacrerons dans un prochain mémoire de caractère biologique une étude détaillée relative à nos résultats sur la parthénogénèse partielle réalisée à l'aide des protéines basiques.

ETUDE SÉROLOGIQUE.

C'est depuis MOXTER [53], METCHNIKOFF [54] et METALNIKOFF [55] que s'est posée la question des sérums anti-gamètes et plus spécialement anti-spermatozoïdes particulièrement au regard de propriétés spermotoxiques. A la suite de ces classiques, FITZGERALD [56], YAMAKAMI [57], LANDSTEINER et LEVINE [58], MUDD et MUDD [59], HENLE [60], HENLE, HENLE et CHAMBERS [61], TYLER [62], SNELL [63] et d'autres encore pour les spermatozoïdes, UHLENHUTH et WURM [64] et TYLER [62] pour les ovules ont été unanimes à montrer l'existence d'anticorps de différents types mais spécifiques à la suite d'injections de ces gamètes. Nous inspirant de la technique d'absorption de YAMAKAMI et LANDSTEINER-LEVINE nous avions nous-même recherché des anticorps anti-gamètes et anti-eaux de mer ovulaire ou spermatique de *P. lividus* en injectant ces substrats à des Lapins par voie intrapéritonéale puis intra-veineuse. Après surimmunisation, souvent mal tolérée par les animaux (surtout avec les spermatozoïdes), nous avions obtenu des sérums qui paraissaient posséder des anticorps spécifiques [18]. Or en réexaminant tant nos propres résultats que ceux de nos devanciers, nous nous aperçûmes que l'existence réelle d'anticorps n'était rien moins que prouvée .En effet, en ce qui concerne le pouvoir antigénique de l'ovule d'Oursin, nous avions déjà pu constater qu'il était extrêmement faible, ce qui est sans doute dû à la substance de type mucinique de sa gangue ; il en va de même avec l'eau de mer ovulaire qui par surcroît donne des précipités avec les sérums même normaux ; d'ailleurs, en ce qui concerne le faible pouvoir antigénique des substances muciniques, les travaux de ELLIOTT [65], GOODNER [66] et V. GODIN [67] étaient déjà explicites. Quant aux spermatozoïdes, la question est également douteuse surtout parce qu'ils possèdent des protéines basiques non antigéniques mais certainement anti-complémentaires [68] et donnant en général des réactions parasites avec les protéines sériques (précipités du type *symplexe de coordination*). La libération de ces protéines basiques étant sous la dépendance de la salinité du milieu, on obtient des résultats aberrants pour des variations relativement faibles de cette salinité et ce qui est pis, comme nous allons le voir au cours des résultats ci-dessous, *la dissociation des nucléoprotéines varie considérablement d'un sperme de* P. lividus *à un autre sperme de* P. lividus. Nous avons donc repris l'analyse sérologique.

Protocole :

On utilisait les gamètes mâles et femelles et les eaux de mer correspondantes de *Paracentrotus lividus*. On prenait soin d'effectuer 3-4 centrifugations à 6000 tours/m. pendant 10-15 minutes pour la confection des eaux de mer gamonales de façon à éliminer toute cellule ou débris de cellule et on vérifiait l'activité biologique — surtout pour l'eau de mer ovulaire — avant chaque injection ou chaque essai *in vitro*.

Le lapin n° 1 était inoculé avec les spermatozoïdes, soit ♂ ;

Le lapin n° 2 était inoculé avec l'eau de mer spermatique, soit ♂ m ;

Le lapin n° 3 était inoculé avec les ovules, soit ♀ ;

Le lapin n° 4 était inoculé avec l'eau de mer ovulaire, soit ♀ m ;

Les injections étaient pra
réaliser une série de 3 intra-p
musculaires (veine marginale
1 et parfois 2 injections de r
étaient alors saignés et leurs
nation et précipitation sans
la première injection, nous
par rapport à nos substrats.
les réactions plus sensibles,
d'agglutination et de précipi
à 37° C puis à 50° C. Une pr
ont tendance à s'agglutiner d
culièrement à 50° C pour le
trouve dans l'obligation de
ture de 17-20° C.

Résultats :

A. —

Technique générale pour l
de sérologie à collerette ; o
mer + 1/10 du volume en
II gouttes du sérum à essa
sont les dilutions *du sérum*
0.9 p. 100) ; les lectures sc
18° C.

N° 1 : aucune agglutinati
(dilutions allant de la conc
même aucune agglutination c
de la suspension spermatique
eau 10 fois physiologique +

N° 2 :
♂ m témoin.....
♂ m concentré.....
♂ m 1/10.....
♂ m 1/20.....
♂ m 1/50, 1/100 et 1,

N° 3 : aucune agglutinati
breux œufs lysés.

N° 4 :
♀ m témoin.....
♀ m concentré.....
♀ m 1/10.....
♀ m 1/20, 1/50,... 1/

B. —

Prise des substrats :0,25 ml.
maux.

N° 1 :
témoin sérum + eau
témoin ♂ + eau de m
♂ concentré.....
♂ 1/2.....
♂ 1/5.....
♂ 1/10, 1/20, ... 1/10

ne pensons pas qu'elle re-
ıvert par MIRSKY.
émoire de caractère biolo-
ésultats sur la parthénogé-
es basiques.

JE.

[54] et METALNIKOFF [55]
ti-gamètes et plus spéciale-
t au regard de propriétés
ıes, FITZGERALD [56], YAMA-
IUDD et MUDD [59], HENLE
TYLER [62], SNELL [63] et
UHLENHUTH et WURM [64]
ıimes à montrer l'existence
iques à la suite d'injections
ique d'absorption de YAMA-
nous-même recherché des
er ovulaire ou spermatique
des Lapins par voie intra-
immunisation, souvent mal
permatozoïdes), nous avions
éder des anticorps spécifi-
ppres résultats que ceux de
ıe l'existence réelle d'anti-
effet, en ce qui concerne le
nous avions déjà pu cons-
qui est sans doute dû à la
e ; il en va de même avec
nne des précipités avec les
qui concerne le faible pou-
ıes, les travaux de ELLIOTT
ıient déjà explicites. Quant
galement douteuse surtout
ques non antigéniques mais
et donnant en général des
riques (précipités du type
de ces protéines basiques
du milieu, on obtient des
elativement faibles de cette
ıllons le voir au cours des
nucléoprotéines varie con-
à un autre sperme de P.
sérologique.

les et les eaux de mer cor-
On prenait soin d'effectuer
lant 10-15 minutes pour la
de façon à éliminer toute
ıait l'activité biologique —
avant chaque injection ou

ermatozoïdes, soit ♂ ;
ı de mer spermatique, soit

ules, soit ♀ ;
de mer ovulaire, soit ♀ m ;

Les injections étaient pratiquées tous les 2-3 jours de façon à réaliser une série de 3 intra-péritonéales suivie d'une série de 3 intra-musculaires (veine marginale de l'oreille), repos de 5-6 jours puis 1 et parfois 2 injections de rappel par voie intra-veineuse. Les lapins étaient alors saignés et leurs sérums testés du point de vue agglutination et précipitation sans absorption préalable. Avant d'effectuer la première injection, nous avons étudié les sérums de nos lapins par rapport à nos substrats. En sérologie bactérienne, pour rendre les réactions plus sensibles, on a l'habitude de faire des lectures d'agglutination et de précipitation à la température du laboratoire, à 37° C puis à 50° C. Une première remarque s'impose : les gamètes ont tendance à s'agglutiner dès que l'on élève la température (particulièrement à 50° C pour les spermatozoïdes), c'est pourquoi on se trouve dans l'obligation de faire toutes les lectures à la température de 17-20° C.

Résultats :

A. — *Sérums normaux.*

Technique générale pour les sérums : on utilise de petits tubes de sérologie à collerette ; on place 0,5 ml. du substrat en eau de mer + 1/10 du volume en eau 10 fois physiologique (90 g./l) + II gouttes du sérum à essayer. Les dilutions données ci-dessous sont les dilutions *du sérum* (faites avec une solution de NaCl à 0.9 p. 100) ; les lectures sont faites après 12 heures de repos à 18° C.

N° 1 : aucune agglutination des spermatozoïdes qui sont morts (dilutions allant de la concentration initiale jusqu'au 1/400). De même aucune agglutination de type sérique avec le témoin 0.5 ml. de la suspension spermatique en eau de mer + 1/10 du volume en eau 10 fois physiologique + II gouttes d'eau de mer.

N° 2 :

♂ m témoin	O
♂ m concentré	+±
♂ m 1/10	±
♂ m 1/20	?
♂ m 1/50, 1/100 et 1/200	O

N° 3 : aucune agglutination (étude faite jusqu'au 1/200). Nombreux œufs lysés.

N° 4 :

♀ m témoin	légère opalescence
♀ m concentré	++++
♀ m 1/10	±
♀ m 1/20, 1/50,... 1/200	opalescence

B. — *Sérums anti-.*

Prise des substrats :0,25 ml. ; le reste comme pour les sérums normaux.

N° 1 :

témoin sérum + eau de mer	O
témoin ♂ + eau de mer	++++±
♂ concentré	+++
♂ 1/2	++±
♂ 1/5	++++
♂ 1/10, 1/20, ... 1/100	+

N° 2 :

témoin sérum + eau de mer..	O
témoin ♂ m + eau de mer.....	O
♂ m concentré.....	fin précipité
♂ m 1/2.....	faible précipité
♂ m 1/5,... 1/100.....	très faible opalescence

N° 3 : aucune agglutination (étude faite jusqu'au 1/100) ; nombreux œufs lysés.

N° 4 :

témoin eau de mer + sérum...	O
témoin eau de mer + ♀ m....	O
♀ m concentré.....	+++
♀ m 1/2.....	++
♀ m 1/5.....	+±
♀ m 1/10.....	+
♀ m 1/20.....	?
♀ m 1/50, 1/100.....	O

Les résultats ci-dessus se résument ainsi :

les spermatozoïdes seraient antigéniques ; ils donnent un phénomène de zone ; l'eau de mer spermatique n'est pas antigénique ; les ovules et l'eau de mer ne sont pas antigéniques.

Remarques.

1°) La salinité de l'eau de mer qui constitue le milieu dispersant des spermatozoïdes permet la dissociation des nucléoprotéines avec libération de protéines basiques auto-agglutinantes qui conduisent aux agglutinations des spermatozoïdes par l'« anti »-sérum ; on remarquera particulièrement la forte agglutination dans le témoin spermatozoïdes + eau de mer et l'agglutination nettement plus faible en présence de l'« anti »-sérum concentré. Ce dernier point nous paraît s'expliquer de la façon suivante : le sérum renferme des protéines à point isoélectrique acide qui ont une grande affinité pour les protéines basiques spermatiques d'où le *pouvoir tampon* du sérum vis-à-vis des auto-agglutinations spermatiques ; le phénomène de zone semble s'expliquer de la même manière étant donné que nous travaillons en diluant le sérum, donc en présence de concentrations variables (décroissantes) de protéines sériques ; au 1/5 on se trouverait à la limite de formation des protéinates et à une valeur élevée de la dissociation des nucléoprotéines. Toutefois la chute à partir du 1/10 s'explique mal, d'autant plus qu'il semble que, pour une dilution infinie du sérum, on devrait retrouver une agglutination aussi importante que dans le cas du témoin spermatozoïdes + eau de mer. Un autre fait demeure troublant : le sérum normal n'avait pas donné lieu à de tels phénomènes ; or : *en refaisant de nouvelles lectures avec les mêmes sérums et des spermatozoïdes provenant d'autres individus de* P. lividus *nous avons pu obtenir des agglutinations comparables tant avec le sérum normal qu'avec l'« anti »-sérum.* Ce fait est d'une extrême gravité car il montre que les spermatozoïdes d'une même espèce d'Oursin peuvent se comporter très différemment par rapport à leur dissociation nucléaire, d'où des réactions sérologiques complètement perturbées. D'ailleurs si on effectue les lectures en utilisant des spermatozoïdes qui cette fois sont *dispersés dans de l'eau physiologique (0,14 M NaCl) on ne peut trouver aucune agglutination spermatique* tant dans le témoin sper-

matozoïdes + eau physiolo
le sérum normal soit l'« a
tions par eau physiologique
fois physiologique dans ce
1/100) ; ceci est une confi
matique est due à une auto
nucléoprotéines. Les différe
le domaine des fluctuations

2°) Les résultats négat
étaient peut-être dus au fa
avaient été mis en contact
que de tels ovules sont féc
membrane de fécondation
doit se produire une mod
physico-chimique de la sur
sérums ayant été prépar
n'avaient pas été mises en
pouvait concevoir que l'
pourquoi nous avons refait
les soins possibles pour qu
ait pas de contamination p
cautions nous n'avons pu c
le sérum anti-ovule ni par

En conclusion, nos résu
nous permettent de dire qu
parasites qui gênent consid
la mesure où ces substance
ovules particulièrement no
anti-*P. lividus* qui agglutin
chinus miliaris au 1/12, il
d'espèce à moins qu'une
intervenue. Si on soumetta
les résultats de nos devanci
riences comme nous avons

La fertilisine purifiée qu
de vue de l'activation, du
(que nous nommons *agréga*
nes peuvent être séparées
qu'il y a non pas unicité d
à moins d'admettre qu'il e
gynogamone II, l'autre l'a
là une première expérienc
ficative que lorsque nous
volatile activatrice que no
lisine.

L'activation paraît être
festations de la fertilisine.

1) Le tactisme spermat
d'un champ d'activation,
où son activité flagellaire

(*) Cette discussion porter
(**) Si on place des sperm
fermant une substance activa
également distribuée, les spe
à une activation vectorialisée
sera uniquement une activati

n précipité
ıible précipité
·ès faible opalescence
squ'au 1/100) ; nombreux

)
)
+ + +
+ +
+ ±
+
)

:

; ils donnent un phéno-
n'est pas antigénique ;
tigéniques.

stitue le milieu dispersant
des nucléoprotéines avec
lutinantes qui conduisent
l'« anti »-sérum ; on re-
ation dans le témoin sper-
n nettement plus faible en
dernier point nous paraît
m renferme des protéines
ande affinité pour les pro-
oir tampon du sérum vis-
; le phénomène de zone
ètant donné que nous tra-
résence de concentrations
ques ; au 1/5 on se trou-
nates et à une valeur éle-
. Toutefois la chute à par-
qu'il semble que, pour une
ètrouver une agglutination
oin spermatozoïdes + eau
: le sérum normal n'avait
: *en refaisant de nouvelles*
spermatozoïdes provenant
ns pu obtenir des aggluti-
normal qu'avec l'« anti »-
:ar il montre que les sper-
peuvent se comporter très
iation nucléaire, d'où des
rturbées. D'ailleurs si on
rmatozoïdes qui cette fois
: *(0,14 M NaCl) on ne peut*
tant dans le témoin sper-

matozoïdes + eau physiologique que dans les tubes renfermant soit le sérum normal soit l'« anti »-sérum à différentes dilutions (dilutions par eau physiologique ; on n'ajoute évidemment pas d'eau 10 fois physiologique dans ce cas ; les lectures ont été faites jusqu'au 1/100) ; ceci est une confirmation du fait que l'agglutination spermatique est due à une auto-agglutination liée à une dissociation des nucléoprotéines. Les différences constatées anciennement sont dans le domaine des fluctuations.

2°) Les résultats négatifs obtenus avec l'anti-sérum ovulaire étaient peut-être dus au fait que les ovules utilisées dans les tests avaient été mis en contact avec le liquide cœlomique. On sait [69] que de tels ovules sont fécondables mais qu'ils ne forment pas de membrane de fécondation après la pénétration du spermatozoïde. Il doit se produire une modification chimique et en dernier ressort physico-chimique de la surface de l'ovule. Dans ces conditions, les sérums ayant été préparés avec des cellules qui en moyenne n'avaient pas été mises en contact avec le liquide cœlomique, on pouvait concevoir que l'anti-sérum ne fût pas réagissant. C'est pourquoi nous avons refait des essais sérologiques en prenant tous les soins possibles pour que, lors de l'extraction des ovules, il n'y ait pas de contamination par le liquide périviscéral. Malgré ces précautions nous n'avons pu constater d'agglutination des ovules ni par le sérum anti-ovule ni par le sérum anti-eau de mer ovulaire.

En conclusion, nos résultats de 1946 et ceux exposés ci-dessus nous permettent de dire que les gamètes donnent lieu à des réactions parasites qui gênent considérablement les lectures sérologiques dans la mesure où ces substances sont réellement antigéniques ; pour les ovules particulièrement nous avions pu obtenir en 1946 des sérums anti-*P. lividus* qui agglutinaient ♀ *P. lividus* au 1/40 et ♀ *Psammechinus miliaris* au 1/12, il est possible que là encore il y ait des cas d'espèce à moins qu'une élimination possible des gangues ne soit intervenue. Si on soumettait à un examen critique les techniques et les résultats de nos devanciers, on conclurait au sujet de leurs expériences comme nous avons conclu au sujet des nôtres.

Discussion (*).

La fertilisine purifiée que nous avons obtenue est active du point de vue de l'activation, du tactisme et de l'agglutination temporaire (que nous nommons *agrégation*), cependant le fait que les gynogamones peuvent être séparées par dialyse (Cornman) semble indiquer qu'il y a non pas unicité des gynogamones mais présence simultanée, à moins d'admettre qu'il existe deux gynogamones I, l'une liée à la gynogamone II, l'autre l'accompagnant seulement. Nous avons donc là une première expérience à réaliser qui ne sera pleinement significative que lorsque nous connaîtrons la nature chimique de la base volatile activatrice que nous avons décelée dans le distillat de fertilisine.

L'activation paraît être la cheville ouvrière de toutes les manifestations de la fertilisine. En effet.

1) Le tactisme spermatique doit être regardé comme le résultat d'un champ d'activation, le spermatozoïde se dirige vers la région où son activité flagellaire (et peut-être générale) est maximum (**);

(*) Cette discussion portera uniquement sur les gynogamones.

(**) Si on place des spermatozoïdes d'Oursin dans une eau de mer renfermant une substance activant le mouvement flagellaire, l'activation étant également distribuée, les spermatozoïdes ne seront évidemment pas soumis à une activation vectorialisée (selon une direction privilégiée) et le résultat sera uniquement une activation flagellaire sans tactisme.

remarquons d'ailleurs que ce gradient d'activation caractérisant le tactisme n'agit pas sur tous les spermatozoïdes, ce qui fait du tactisme un phénomène statistique, c'est pourquoi certains auteurs [70] ont pensé que l'œuf n'induisait aucun « appel » et que la rencontre ovule-spermatozoïde n'était due qu'au hasard, mais l'existence d'une substance chimiotactique d'origine ovulaire ne fait actuellement aucun doute.

2) Nous avons donné de nombreux exemples pour montrer que l'agrégation spermatique ne se réalisait qu'en fonction de l'activité des spermatozoïdes et *a fortiori* de leur activation (on remarquera à ce sujet que cette agrégation porte souvent sur les flagelles).

Nous avons donc : le tactisme lié à activation et l'agrégation liée à l'activité et aussi à l'activation (se reporter par exemple aux expériences avec l'adrénaline : cette hormone diminue le temps compris entre la fin de l'homogénéisation du milieu spermatozoïdes + fertilisine et le début de l'apparition des premiers agrégats spermatiques). L'activation est donc le dénominateur commun des actions de la fertilisine : dans le cas de l'activation et du tactisme, les facteurs se confondent ; dans celui de l'agrégation, l'activation ou seulement l'activité est semble-t-il facteur limitant (cofacteur).

Les résultats de O. Glaser sur l'existence d'une lipase dans les sécrétions ovulaires et ceux de Popa sur l'altération, dans l'eau de mer ovulaire, de la surface des spermatozoïdes, altération portant particulièrement sur les substances lipochromatiques, sont très concordants. Il reste à savoir si la fertilisine est elle-même lipolytique. Au sujet du rapprochement entre fertilisine et antigène O, on a vu qu'il nous avait été utile dans notre étude, cependant un tel rapprochement doit être abandonné, non seulement par suite des caractères chimiques et antigéniques, mais aussi par rapport à la *toxicité* : le Dr Delaunay, de l'Institut Pasteur de Paris, a bien voulu essayer un de nos échantillons de fertilisine pure sur des Cobayes (*) et il n'a pu constater aucune intoxication du type antigène O des Salmonellas. Nous pensons que si un quelconque rapprochement est possible entre fertilisine et substances bactériennes périphériques, on devrait plutôt l'effectuer avec le composé extrait par A. Andureau de *Moraxella Lwoffi* [71] ou encore avec la substance muqueuse de nos variants de *Phytomonas tumefaciens* [72]. Cependant, dans l'état actuel de notre connaissance de la fertilisine, une telle recherche d'analogies ne nous paraît plus profitable.

En ce qui concerne le mécanisme de l'activation flagellaire par action directe sur le système flagellaire, nous allons tout d'abord nous arrêter à l'activation par les sels.

Si l'on admet que l'intervention de ces substances se fait sur l'ATPase, les résultats de Gellhorn sur l'activation par $MgCl_2$ sont assez troublants : Lyubimova et Pevzner [73] confirmés par Dubois et Potter [74] ont montré que non seulement le magnésium n'avait pas d'effet activateur sur l'ATPase mais qu'au contraire cet ion bivalent était un inhibiteur. On doit cependant tenir compte là-dessus des remarques de Greville et Lehmann [75] pour qui cette action « narcotique » du magnésium ne porterait pas sur la cellule musculaire elle-même mais sur les points de jonction nerf-muscle. Cependant pour Bailey [76] l'ATPase musculaire cristallisée serait activée par Ca^{++}, Mn^{++}, mais non par Mg^{++}. Nous avons repris alors des expériences sur les spermatozoïdes de *P. lividus* : ceux-ci placés dans une eau ovulaire renfermant 20 g/1 de MgCl2 n'ont pas été activés, tout au-moins nettement, par contre à la même concentration ce sel con-

(*) Qu'il reçoive ici tous nos remerciements.

duit rapidement à la formation d
nageantes d'auto-agglutination ; m
agrégats spermatiques lorsqu'on
Il y a donc là un point litigieu
ment car il paraît présenter un c
effet indifférent aux résultats de
libération de groupes —SH dans
action d'ions bivalents selon l'or
$< Ba^{++} < Ca^{++}$ et d'autre part aux
mova [78], Ziff [79], Barron et
zyme à —SH de l'ATPase. Le prc
tion de concentration. Quoiqu'il
—SH dans l'ATPase nous retiend
l'adrénaline.
Pour le biologiste l'adrénaline
c'est un amino-acide benzénique t
que la propriété de l'adrénaline
assez remarquable car, le sperm
tème nerveux, on démontre que
conséquent *directement* sur la fil
On sait [79] que l'ATPase pa
à l'air est fortement réactivée p
me la cystéine, le glutathion et a
n'a pas été essayée, pourtant il
active dans ce cas bien que Heg
vé de variation dans le taux d'
de l'adrénaline sur le muscle de
quons que G. Townsend [82, 83]
tathion dans les œufs de *Nereis*
spermatozoïdes étaient activés pa
collaborateurs [84, 85] ont mont
tico- et malicodeshydrogénases a
line était un transporteur d'hyd
line agit sur le flagelle sperma
que réducteur.
En ce qui concerne la nature
quera que Kuhn et Wallenfels
bacia pustulosa par SO4(NH4)2 e
qu'en présence de 3,55 p. 100 de
viron de NaCl) nous n'avons pa
racentrotus lividus ; il est vrai
par Kuhn et Wallenfels indiqu
tre 30 et 34 p. 100 en SO4(NH4
p. 100, or nous n'avons pas étudi
trations en sulfate d'ammonium.
possible que l'échinodrome A in
zyme comme l'ATPase, si bien
qu'il doit y avoir autant de ferti
d'Oursins en particulier, ce ser
palement muciniques, comme l'a
selius et Vasseur [88].
Les résultats de Popa et les n

(*) Ball et Meyerhof [86] ont t
les spermatozoïdes d'*Arbacia punctul*
versité de Sidney, n'a pas trouvé d'a
Paracentrotus lividus que nous lui
plus dans les produits séminaux de

ıdient d'activation caractérisant le
permatozoïdes, ce qui fait du tac-
'est pourquoi certains auteurs [70]
ıcun « appel » et que la rencontre
ı'au hasard, mais l'existence d'une
ovulaire ne fait actuellement au-

ıreux exemples pour montrer que
alisait qu'en fonction de l'activité
e leur activation (on remarquera à
te souvent sur les flagelles).
lié à activation et l'agrégation liée
se reporter par exemple aux expé-
ıormone diminue le temps compris
du milieu spermatozoïdes + ferti-
ı des premiers agrégats spermati-
ıominateur commun des actions de
ivation et du tactisme, les facteurs
grégation, l'activation ou seulement
nitant (cofacteur).
'existence d'une lipase dans les sé-
sur l'altération, dans l'eau de mer
atozoïdes, altération portant parti-
pochromatiques, sont très concor-
lisine est elle-même lipolytique. Au
ilisine et antigène O, on a vu qu'il
tude, cependant un tel rapproche-
ıeulement par suite des caractères
ıussi par rapport à la *toxicité* : le
ır de Paris, a bien voulu essayer
ine pure sur des Cobayes (*) et il
tion du type antigène O des Sal-
un quelconque rapprochement est
ıces bactériennes périphériques, on
composé extrait par A. ANDUREAU
ıre avec la substance muqueuse de
faciens [72]. Cependant, dans l'état
la fertilisine, une telle recherche
rofitable.
sme de l'activation flagellaire par
ıgellaire, nous allons tout d'abord
s sels.
ɔn de ces substances se fait sur
RN sur l'activation par $MgCl_2$ sont
PEVZNER [73] confirmés par DUBOIS
on seulement le magnésium n'avait
mais qu'au contraire cet ion biva-
ɜpendant tenir compte là-dessus des
N [75] pour qui cette action « nar-
ɜrait pas sur la cellule musculaire
e jonction nerf-muscle. Cependant
laire cristallisée serait activée par
us avons repris alors des expérien-
lividus : ceux-ci placés dans une
e MgCl2 n'ont pas été activés, tout-
la même concentration ce sel con-

rciements.

duit rapidement à la formation d'une grande quantité de plages surnageantes d'auto-agglutination ; mais il n'active pas la formation des agrégats spermatiques lorsqu'on le place en présence de fertilisine.

Il y a donc là un point litigieux que nous reprendrons ultérieurement car il paraît présenter un certain intérêt. On ne peut rester en effet indifférent aux résultats de BURK [77] d'une part, relatifs à la libération de groupes —SH dans le cas de certaines protéines par action d'ions bivalents selon l'ordre d'activité croissant $Mg^{++} < Mn^{++} < Ba^{++} < Ca^{++}$ et d'autre part aux résultats de ENGELHARDT et LYUBIMOVA [78], ZIFF [79], BARRON et SINGER [80] sur la propriété d'enzyme à —SH de l'ATPase. Le problème porte peut-être sur une question de concentration. Quoiqu'il en soit la présence de ces groupes —SH dans l'ATPase nous retiendrons encore au sujet de l'action de l'adrénaline.

Pour le biologiste l'adrénaline est une hormone, pour le chimiste c'est un amino-acide benzénique très auto-oxydable. Disons avant tout que la propriété de l'adrénaline vis-à-vis du flagelle spermatique est assez remarquable car, le spermatozoïde ne possédant pas de système nerveux, on démontre que l'action de l'adrénaline porte par conséquent *directement* sur la fibre contractile.

On sait [79] que l'ATPase partiellement inactivée par exposition à l'air est fortement réactivée par des substances réductrices comme la cystéine, le glutathion et aussi l'acide ascorbique. L'adrénaline n'a pas été essayée, pourtant il nous paraît fort probable qu'elle est active dans ce cas bien que HEGNAUER et CORI [81] n'aient pas trouvé de variation dans le taux d'adénosine-triphosphate après action de l'adrénaline sur le muscle de Grenouille *en anaérobiose*. Remarquons que G. TOWNSEND [82, 83] a trouvé 0,03 à 0,04 p. 100 de glutathion dans les œufs de *Nereis limbata* et qu'elle a montré que les spermatozoïdes étaient activés par ce tripeptide. De plus GREEN et ses collaborateurs [84, 85] ont montré que l'adrénaline activait les lactico- et malicodeshydrogénases animales (*) et surtout que l'adrénaline était un transporteur d'hydrogène. Nous pensons que l'adrénaline agit sur le flagelle spermatique en activant l'ATPase en tant que réducteur.

En ce qui concerne la nature chimique de la fertilisine on remarquera que KUHN et WALLENFELS [4] précipitaient la fertilisine d'*Arbacia pustulosa* par SO4(NH4)2 en présence de 4 p. 100 de NaCl alors qu'en présence de 3,55 p. 100 de salinité totale (dont 2,35 p. 100 environ de NaCl) nous n'avons pas pu précipiter la fertilisine de *Paracentrotus lividus ;* il est vrai que la courbe de relargage donnée par KUHN et WALLENFELS indique un optimum de précipitabilité entre 30 et 34 p. 100 en SO4(NH4)2, avec une chute rapide pour 38 p. 100, or nous n'avons pas étudié la précipitabilité dans ces concentrations en sulfate d'ammonium. Mais il y a plus : il n'est pas impossible que l'échinodrome A intervienne par son redox sur un enzyme comme l'ATPase, si bien qu'on en arrive à cette conclusion qu'il doit y avoir autant de fertilisines différentes qu'il y a d'espèces d'Oursins en particulier, ce serait toutefois des substances principalement muciniques, comme l'avaient déjà supposé RUNNSTRÖM, TISELIUS et VASSEUR [88].

Les résultats de POPA et les nôtres sur la réversibilité de l'agglути-

(*) BALL et MEYERHOF [86] ont trouvé de la succinodeshydrogénase dans les spermatozoïdes d'*Arbacia punctulata*. Toutefois le Dr HUMPHREY, de l'Université de Sidney, n'a pas trouvé d'acide citrique dans les spermatozoïdes de *Paracentrotus lividus* que nous lui avions fournis. Il n'en a pas trouvé non plus dans les produits séminaux de *Scylliorhinus caniculus* [87].

nation spermatique obtenue à l'aide de la fertilisine indiquent clairement qu'elle est due à une altération des spermatozoïdes. Le calcium paraissant indispensable à l'activité de la fertilisine et le système ATP-ATPase libérant du phosphate pouvant se complexer au calcium de l'eau de mer ovulaire, nous avons toutefois recherché si la réversion de l'agglutination était sous la dépendance de cette possible intervention. L'expérience suivante montre que cette réversion est en fait indépendante de la formation éventuelle d'un phosphate de calcium.

On effectue une agrégation de spermatozoïdes de *P. lividus* en verre de montre comme il a déjà été indiqué. Lorsque cette agrégation a complètement cessé on ajoute $CaCl_2$ à 20 g./l : il ne se produit aucune réagrégation quelle que soit la concentration. Il en va de même avec $MgCl_2$, un mélange de ribonucléotides de Levure à 0,5-1 mg./ml ou encore de l'acide adénylique de Levure aux mêmes concentration 8 (p 8).

Résumé

1) Nous avons particulièrement étudié les gynogamones (fertilisine) du point de vue chimique, biochimique et sérologique et l'androgamone I du point de vue biochimique chez *Paracentrotus lividus*.

2) On a extrait et purifié la fertilisine à partir des ovules et à partir d'eaux ovulaires.

3) On donne quelques résultats sur la nature chimique de la fertilisine (il s'agirait principalement d'un mucinoïde) ainsi que certaines propriétés biologiques nouvelles.

4) On étudie l'activation des spermatozoïdes par rapport à différentes possibilités ; on a obtenu une base volatile à partir de la fertilisine pouvant jouer le rôle de gynogamone I. Son étude chimique est en cours.

5) On indique le rôle activateur de l'adrénaline sur les mouvements flagellaires spermatiques.

6) On apporte des résultats chimiques concernant le rôle de rectificatrice de la fécondation de l'androgamone I (protéine basique) et sa participation probable dans la constitution de la figure achromatique. La perte de solubilité de protéines ovulaires après la fécondation, attribuée par Mirsky à une dénaturation, est assignée à la formation de complexes protéines basiques nucléaires-protéines acides cytoplasmiques.

7) L'étude sérologique des gamètes mâles et femelles et des eaux de mer correspondantes a été reprise. On conclut que la technique sérologique est en fait inopérante pour différentes raisons qui sont exposées.

8) On discute la plupart de ces points.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à MM. F. Gros et U. Rambech qui n'ont pas hésité à venir travailler pendant les vacances de 1948 au Laboratoire de Roscoff en apportant leur amicale collaboration technique.

(*Station biologique de Roscoff et Institut Pasteur de Paris*).

BIBLIOGRAPHIE.

1. Problems of fertilization. University of Chicago Press. 1923.
2. *Naturwiss.*, 1939, 27, 433.
3. *Naturwiss.*, 1940, 28, 144.

4. *Ber. d. d. chem. Ges.*, 1940, **73**, 458.
5. *Proc. Nat. Ac. Sc. Washington*, 193
6. Lederer (E.). — *Bull. Soc. Chim.*
7. *J. Biol. Chem.*, 1921, **46**, 31.
8. *Biol. Bull.*, 1941, **80**, 202.
9. *Arkiv. för kemi*, 1947, 24 B, 6.
10. Duran-Reynals (F.). — *C. R. Soc. I*
11. Swyer (G. I. M.). — *Bioch. J.*, 194
12. Parat (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 193
13. Wintrebert (P.). — *C. R. Soc. Bio*
14. Frank (J. A.). — *Biol. Bull.*, 1939,
15. Rybak (B.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1947
16. *Physiol. Rev.*, 1925, **5**, 349.
17. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 505.
18. Rybak (B.). — *Bull. Soc. Chim. biol*
19. *Am. J. Phys.*, 1942, **138**, 512.
20. *Proc. Nat. Ac. Sc. Washington*, 194
21. *Biol. Bull.*, 1927, **52**, 238.
22. Tyler (A.). — *Biol. Bull.*, 1941, 8
23. *J. Gen. Phys.*, 1946, **30**, 101.
24. Voir par exemple : *Bull. Ac. Sc. U.*
25. Voir par exemple : *Nature*, 1946, 15
26. Voir par exemple : *Bioch. J.*, 1945,
27. *Biol. Bull.*, 1943, **85**, 151.
28. *Quart. J. Microsc. Sc.*, 1915, **51**, 119.
29. *Biol. Bull.*, 1918, **34**, 167.
30. *Arch. mikros. Anat. u. Entwicklung*
31. Voir par exemple : Delaunay (A.) 73, 555 et 565.
32. Rybak (B.) et Marrec (M.). — *C. R.*
33. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, **55**, 1329.
34. Consulter par exemple la revue réc 1948, **12**, 149.
35. *Biol. Bull.*, 1921, **41**, 63.
36. *Arch. Biochem.*, 1945, **6**, 41.
37. *Naturwiss.*, 1940, **28**, 807.
38. La fécondation chimique, trad. fr.,
39. *Biol. Zentralbl.*, 1906, **26**, 744.
40. *Arch. f. Entw. Mech.*, 1913, **35**, 64.
41. Kossel (A.). — Protamine und Hist Gesamtgebiet der Biochemie. Leip
42. Heilbrunn (L. V.). — *Arch. f. Entw.*
43. Dalcq (A.). — Les bases physiologiq thénogénèse. Paris, 1928.
44. Nombreux travaux ; une étude part Stewart (D. R.) et Jacobs (M. A.).
45. *Proc. Roy. Soc. Sc. B.*, 1939, **127**, 26.
46. *Enzymologia*, 1940, **9**, 97.
47. Astbury (W. T.) et Bell (F. O.). — **6**, 109.
48. *Experientia*, 1948, **4**, 150.
49. *Science N.Y.*, 1936, **84**, 2180.
50. *Cold Spring Harbor Symp.*, 1941, **9**, 2
51. Rybak (B.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1948,
52. *J. Biol. Chem.*, 1938, **125**, 661.
53. *Deutsch. med. Woch.*, 1900, n° 4.
54. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, **14**, 1.
55. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, **14**, 577.
56. *Ann. Inst. Pasteur*, 1910, **24**, 973.
57. *J. of Immunol.*, 1926, **12**, 185.
58. *J. of Immunol.*, 1926, **12**, 415.
59. *J. of Immunol.*, 1929, **17**, 39.
60. *J. of Immunol.*, 1938, **34**, 325.
61. *J. Exp. Med.*, 1938, **68**, 335.
62. *The Collect. Net.*, 1946, **18**, n° 2.
63. *Science N.Y.*, 1944, **160**, 272.

le de la fertilisine indiquent clai-
ation des spermatozoïdes. Le cal-
activité de la fertilisine et le sys-
osphate pouvant se complexer au
nous avons toutefois recherché si
t sous la dépendance de cette pos-
ivante montre que cette réversion
mation éventuelle d'un phosphate

spermatozoïdes de *P. lividus* en
été indiqué. Lorsque cette agréga-
te CaCl2 à 20 g./1 : il ne se pro-
ue soit la concentration. Il en va
e de ribonucléotides de Levure à
adénylique de Levure aux mêmes

UMÉ

étudié les gynogamones (fertilisi-
chimique et sérologique et l'andro-
nique chez *Paracentrotus lividus*.
lisine à partir des ovules et à par-

sur la nature chimique de la ferti-
d'un mucinoïde) ainsi que certai-
es.
ermatozoïdes par rapport à diffé-
une base volatile à partir de la
e gynogamone I. Son étude chimi-

de l'adrénaline sur les mouvements

niques concernant le rôle de recti-
drogamone I (protéine basique) et
constitution de la figure achroma-
protéines ovulaires après la féconne dénaturation, est assignée à la
basiques nucléaires-protéines aci-

ètes mâles et femelles et des eaux
orise. On conclut que la technique
pour différentes raisons qui sont

s points.
ères remerciements à MM. F. Gros
sité à venir travailler pendant les
le Roscoff en apportant leur amica-

f et Institut Pasteur de Paris).

RAPHIE.

sity of Chicago Press. 1923.

4. *Ber. d. d. chem. Ges.*, 1940, **73**, 458.
5. *Proc. Nat. Ac. Sc. Washington*, 1939, **25**, 527.
6. Lederer (E.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, **20**, 567.
7. *J. Biol. Chem.*, 1921, **46**, 31.
8. *Biol. Bull.*, 1941, **80**, 202.
9. *Arkiv. för kemi*, 1947, 24 B, 6.
10. Duran-Reynals (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 6.
11. Swyer (G. I. M.). — *Bioch. J.*, 1941, **41**, 413.
12. Parat (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **112**, 1131.
13. Wintrebert (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1636.
14. Frank (J. A.). — *Biol. Bull.*, 1939, **76**, 190.
15. Rybak (B.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **225**, 701.
16. *Physiol. Rev.*, 1925, **5**, 349.
17. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 505.
18. Rybak (B.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1947, **29**, 329.
19. *Am. J. Phys.*, 1942, **138**, 512.
20. *Proc. Nat. Ac. Sc. Washington*, 1940, **26**, 249.
21. *Biol. Bull.*, 1927, **52**, 238.
22. Tyler (A.). — *Biol. Bull.*, 1941, **81**, 190.
23. *J. Gen. Phys.*, 1946, **30**, 101.
24. Voir par exemple : *Bull. Ac. Sc. U.R.S.S.*, 1945, n° 2, 182.
25. Voir par exemple : *Nature*, 1946, **158**, 624.
26. Voir par exemple : *Bioch. J.*, 1945, **39**, 458.
27. *Biol. Bull.*, 1943, **85**, 151.
28. *Quart. J. Microsc. Sc.*, 1915, **51**, 119.
29. *Biol. Bull.*, 1918, **34**, 167.
30. *Arch. mikros. Anat. u. Entwicklungsmech.*, 1924, **101**, 437.
31. Voir par exemple : Delaunay (A.) et coll. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 555 et 565.
32. Rybak (B.) et Marrec (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **224**, 971.
33. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, **55**, 1329.
34. Consulter par exemple la revue récente de Olitzki (L.). — *Bact. Rev.*, 1948, **12**, 149.
35. *Biol. Bull.*, 1921, **41**, 63.
36. *Arch. Biochem.*, 1945, **6**, 41.
37. *Naturwiss.*, 1940, **28**, 807.
38. La fécondation chimique, trad. fr., Paris, 1911.
39. *Biol. Zentralbl.*, 1906, **26**, 744.
40. *Arch. f. Entw. Mech.*, 1913, **35**, 64.
41. Kossel (A.). — Protamine und Histone. Einzeldarstellungen aus dem Gesamtgebiet der Biochemie. Leipzig-Wien, 1929.
42. Heilbrunn (L. V.). — *Arch. f. Entw. Mech.*, 1925, **104**, 313.
43. Dalcq (A.). — Les bases physiologiques de la fécondation et de la parthénogénèse. Paris, 1928.
44. Nombreux travaux ; une étude particulièrement originale est celle de Stewart (D. R.) et Jacobs (M. A.). — *J. Cell. Comp. Phys.*, 1932, **1**, 82.
45. *Proc. Roy. Soc. Sc. B.*, 1939, **127**, 26.
46. *Enzymologia*, 1940, **9**, 97.
47. Astbury (W. T.) et Bell (F. O.). — *Cold Spring Harbor Symp.*, 1938, **6**, 109.
48. *Experientia*, 1948, **4**, 150.
49. *Science N.Y.*, 1936, **84**, 2180.
50. *Cold Spring Harbor Symp.*, 1941, **9**, 236.
51. Rybak (B.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1948, **226**, 1143.
52. *J. Biol. Chem.*, 1938, **125**, 661.
53. *Deutsch. med. Woch.*, 1900, n° 4.
54. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, **14**, 1.
55. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, **14**, 577.
56. *Ann. Inst. Pasteur*, 1910, **24**, 973.
57. *J. of Immunol.*, 1926, **12**, 185.
58. *J. of Immunol.*, 1926, **12**, 415.
59. *J. of Immunol.*, 1929, **17**, 39.
60. *J. of Immunol.*, 1938, **34**, 325.
61. *J. Exp. Med.*, 1938, **68**, 335.
62. *The Collect. Net.*, 1946, **18**, n° 2.
63. *Science N.Y.*, 1944, **160**, 272.

64. *Ztschr. f. Immunitätsf.*, 1939, **96**, 183.
65. *J. Inf. Dis.*, 1914, **15**, 501.
66. *J. Inf. Dis.*, 1925, **37**, 285.
67. *Ztschr. f. Immunitätsf.*, 1939, **96**, 320.
68. MUTSAARS (W.) et LISON (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 709.
69. EPHRUSSI (B.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1925, **180**, 775.
70. Voir par exemple : BULLER (A. H. R.). — *Quart. J. Micr. Sc.*, 1903, 46, ns, 145.
71. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 690.
72. RYBAK (B.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 1015.
73. *Biokhimiya*, 1941, **6**, 178.
74. *J. Biol. Chem.*, 1943, **150**, 185.
75. *Nature*, 1943, **152**, 81.
76. *Biochem. J.*, 1942, **36**, 121.
77. *J. of Physical Chem.*, 1943, **47**, 104.
78. *Biokhimiya*, 1941, **6**, 178.
79. *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 25.
80. *J. Biol. Chem.*, 1945, **157**, 221.
81. *J. Biol. Chem.*, 1934, **105**, 691.
82. *Biol. Bull.*, 1938, **75**, 364.
83. *Biol. Bull.*, 1939, **77**, 306.
84. GREEN (D. E.) et BROSTEAUX (J.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1489.
85. GREEN (D. E.) et RICHTER (D.). — *Biochem. J.*, 1937, **31**, 596.
86. *J. Biol. Chem.*, 1940, **134**, 483.
87. HUMPHREY (G. F.) et MANN (T.). — *Nature*, 1948, **161**, 352.
88. *Arkiv. f. Kemi, Min. o. Geol.*, 1942, **15** A, n° 16, 18 p.

DISCUSSION.

M. FAURÉ-FREMIET : A propos de la très intéressante analyse de l'action des gamones sur l'activation et l'orientation du mouvement des spermatozoïdes, j'évoquerai les recherches poursuivies dans mon laboratoire par H. MUGARD (Thèse Doctorat, mars 1948) sur les Infusoires Ciliés histiophages. Le mouvement ciliaire de ces derniers est orienté par la présence dans le milieu liquide d'un fragment de tissus en voie d'autolyse. L'analyse du phénomène montre qu'il s'agit d'une substance diffusant dans l'eau ; les protéines et les peptones, les acides aminés n'agissent pas ; les acides ribo- et désoxyribo-nucléiques agissent fortement ainsi que l'acide adénosine triphosphorique tandis que les nucléotides, nucléosides, bases puriques et pyrimidiques, sucres, n'agissent aucunement.

M. RYBAK : Dans le cas des gynogamones, nous avions également pensé à l'acide ribo-nucléique et surtout à l'A.T.P. ; cependant dès que nous avons eu effectué les dosages de phosphore ces substances ont été éliminées. Je voudrais attirer l'attention sur l'intérêt d'étudier les activations flagellaires ou ciliaires, on a ainsi semble-t-il un excellent matériel d'étude du système A.T.P.-ATPase (ENGELHARDT, MANN) particulièrement du point de vue pharmacodynamique.

Microdosage du mannitol dans

Contribution à l'étude d'une nouv fonctionnelle d

par Mlle Nicole

On utilise habituellement pour déter rénale ou « clearance » du mannitol, FINKELSTEIN N. et SMITH H.W. [6] qui les opérations suivantes : après destru la levure, le sang est déféqué par l'oxyd tol est alors oxydé par une quantité excès, l'excès d'acide periodique est e soude 0 005 N.

Nous nous proposons d'étudier ici un direct du mannitol qui a pu être mis grâce aux renseignements que nous a o Homer SMITH à qui nous adressons nos

Nous ne détaillerons pas ici la techni le sang et dans l'urine en vue de la d cette description ayant fait l'objet d'une d'autre part en collaboration avec Jean DUIZEND [14, 15].

PRINCIPE DE LA M

Le mannitol en solution est oxydé à suivant la réaction de MALAPRADE [1 à addition de chlorure stanneux [7, 8] e réaction est titré par l'acide chromotr naphtalène 3,6 disulfonique) en milieu s coloration pourpre en 1/2 heure à 100° loration est lue au photomètre de Meur reportant à la courbe d'étalonnage, on li en mannitol de l'urine ou du plasma an

TECHNIQUE.

Nous ne donnerons ici que l'indicatio dosage du mannitol en milieu aqueux. mination de la « clearance » telle que voyons aux notes publiées d'autre part [

Réactifs.

1) — Solution de sulfate de cadmium :
   3 SO_4Cd, 8 H_2O .....
   Solution N de SO_4H_2 .....
   Eau distillée q.s.p. .....
2) — Solution de soude : 1,1 N.