Série A, n° 2718
N° d'ordre :
3591

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Boris RYBAK

1re THÈSE. — Recherches sur la biologie des spermatozoides d'oursins.

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 20 octobre 1954 devant la Commission d'examen.

MM. GRASSÉ..... *Président.*
WURMSER..... } *Examinateurs.*
AUBEL..... }

PARIS
Editions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1957

FACULTÉ DES SCIENCES

Nom du Candidat : **RYBAK.**
Prénom : **Boris.**

Date de la soutenance : 20 octobre 1954.
Numéro d'ordre : 3591. *Série A*, 2718.

RYBAK (Boris). — Recherches sur la biologie des spermatozoïdes d'oursins. *Paris*, Ed. du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique, 1956. In-8°, 177 p., 23 fig.

Th. Sc. Nat. Paris, 1954. Série A, 2718, N° 3591.

RYBAK (Boris). — Recherches sur la biologie des spermatozoïdes d'oursins. *Paris*, Ed. du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique, 1956. In-8°, 177 p., 23 fig.

Th. Sc. Nat. Paris, 1954. Série A, 2718, N° 3591

RYBAK (Boris). — Recherches sur la biologie des spermatozoïdes d'oursins. *Paris*, Ed. du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique, 1956. In-8°, 177 p., 23 fig.

Th. Sc. Nat. Paris, 1954. Série A, 2718, N° 3591.

RYBAK (Boris). — Recherches sur la biologie des spermatozoïdes d'oursins *Paris*, Ed. du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique, 1956. In-8°, 177 p., 23 fig.

Th. Sc. Nat. Paris, 1954. Série A, 2718, N° 3591.

Série A, n° 2718
N° d'ordre :
3591

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Boris RYBAK

1re **THÈSE.** — Recherches sur la biologie des spermatozoïdes d'oursins.

2e **THÈSE.** — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 20 octobre 1954 devant la Commission d'examen.

MM. GRASSÉ..... *Président.*
WURMSER..... } *Examinateurs.*
AUBEL..... }

PARIS
Editions du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1957

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA.....	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
A. DENJOY	T	Théorie des Fonctions.
L. LUTAUD.....	T	Géogr. physique et Géol. dynamique.
E. DARMOIS.....	T	Enseignement de Physique.
Robert LÉVY.....	T	Physiologie comparée.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.
PAUTHENIER	T	Électrotechnique générale
DE BROGLIE.....	T	Théories physiques.
JOB	T	Chimie générale.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.
LAUGIER	T	Physiologie générale.
M. CURIE.....	T	Physique (P.C.B.).
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
G. DARMOIS.....	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
Jacques BOURCART.	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
AUBEL	T	Chimie biologique.
Mme JOLIOT-CURIE..	T	Phys. générale et Radioactivité.
PLANTEFOL	T	Botanique
CABANNES	T	Recherches physiques.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.
LHÉVOST	T	Chimie organique.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie.
FEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale.
P. AUGER.....	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
FIVETEAU	T	Géologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Mécanique générale.
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN.....	T	Biologie animale (P.C.B.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
P. DRACH.....	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique.
EPHRUSSI	T	Génétique.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.
RIVIÈRE	T	Géologie (P.C.B.)
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.)
LUCAS	T	Physique.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MAX MORAND.....		Physique.
SOLEILLET	T	Physique.
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
FROMAGEOT	T	Chimie biologique.
LAPORTE	T	Physique générale et Radio-activité.
JANET	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Biologie animale (P.C.B.)
EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.)
DE CUGNAC.....		Biologie végétale (P.C.B.)
Mlle CAUCHOIS.....	T	Chimie-Physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
AUDUBERT	T	Électrochimie.
L'HÉRITIER	T	Génétique.
GUIVET	T	Radioélectricité.
PONCIN	T	Mécanique des fluides.
THIRY	T	Mécanique appliquée.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Chimie-Physique.
WIEMANN	T	Chimie (M.P.C.).
JACQUINOT	T	Physique (P.C.B.).
VASSY		Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES		Théories physiques.
M. PRUVOST.....	T	Géologie.
AMIEL	T	Chimie (P.C.B.).
HOCART	T	Minéralogie.
J.-P. MATHIEU....	T	Physique (P.C.B.).
COUTEAUX		Biologie animale (P.C.B.)
MAY		Biologie animale (P.C.B.)
CHOQUET	T	Calcul différentiel
FELDMANN		Biologie (P.C.B.).
GUINIER	T	Physique (P.C.B.).
JOST	T	Biologie (P.C.B.).
FORTET		Calcul des probabilités
SCHWARTZ	T	Méthode mathémat. de la Physique.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation.
BRELOT	T	Calcul différentiel.
NORMANT	T	Chimie (P.C.B.).
BÉNARD		Chimie (P.C.B.).
BUVAT		Botanique (E.N.S.).
DUGUÉ		Statistiques mathématiques.
GELOSO		Chimie (P.C.B.).
SOULAIRAC		Psychophysiologie.
ULLICH		Physiologie végétale.
MARÉCHAL		Optique théorique et appliquée.

Secrétaire Général ..... CH. MONIER

Boris RYBAK
Chef de Travaux à la Faculté des Sciences de Bordeaux.

RECHERCHES SUR LA BIOLOGIE DES SPERMATOZOIDES D'OURSINS

(Avec 23 figures et 3 planches).

> On peut avoir trois principaux objets dans l'étude de la vérité : l'un, de la découvrir quand on la cherche ; l'autre de la démontrer quand on la possède ; le dernier de la discerner d'avec le faux quand on l'examine.
>
> PASCAL,
> *De l'esprit géométrique.*

AVANT-PROPOS

La fonction des spermatozoïdes est incontestablement leur pouvoir fécondant. Et si la propagation de l'espèce est la fonction de l'Etre vivant, on conçoit que la définition du pouvoir fécondant puisse être une préoccupation essentielle de la Biologie. Toutefois, l'Embryologie est d'accès difficile et tout naturellement on s'est porté vers les matériels les plus favorables pour chercher à l'investir de la façon la plus rigoureuse, c'est-à-dire par le truchement des sciences expérimentales exactes, la physique et la chimie. C'est ainsi que les Batraciens et les Echinodermes constituent les objets embryologiques par excellence, les Oursins étant particulièrement un matériel de choix par leur abondance (ce qui est d'un intérêt biochimique évident), par la structure de leurs gamètes (et surtout par le caractère oligolécithe des ovotides), par la facilité avec laquelle on obtient des fécondations artificielles et par leur mode de vie aquatique qui favorise l'expérimentation.

Or, le pouvoir fécondant des spermatozoïdes d'Oursins n'a jamais été défini avec précision. C'est l'objet de mon travail que d'examiner les causes de ce curieux état de choses et que de contribuer à la définition fonctionnelle de toute suspension spermatique d'Oursins non-incubateurs.

Dans la partie historique de mon ouvrage (695), j'ai cherché à conduire mon travail de compilation de la façon la plus complète et de la façon la plus objective, les appréciations que j'ai pu formuler ne devant constituer que des points de repère servant à diriger le lecteur. Cette analyse, dont la charpente est justifiée dans la partie expérimentale et la discussion, porte uniquement sur les spermatozoïdes d'Echinides ; des rapprochements avec les sperma-

tozoïdes d'autres Echinodermes ou d'autres Animaux sont faits, le cas échéant, dans la discussion surtout.

Dans la partie expérimentale je rapporte un ensemble de faits parmi les plus démonstratifs que j'aie pu découvrir au cours de mes recherches. Mon effort a porté particulièrement sur deux espèces d'Oursins dont les gisements sont souvent communs, ce qui rend les comparaisons particulièrement instructives. Les Animaux qui ont servi à mes travaux, et dont j'estime le nombre à environ 15.000 individus, appartiennent aux espèces :

1) *Arbacia lixula* Linné 1758 (= *A. pustulosa* Leske 1778 = *A. aequituberculata* Blainville 1834 ; synonymies d'après Koehler 1927).

Arbacia est de Gray 1855. L'espèce qui nous occupe a été placée d'abord dans le genre *Echinus* par Linné 1758.

2) *Paracentrotus lividus* Lamarck 1816.

Paracentrotus est de Mortensen 1903. L'espèce qui nous occupe a été placée d'abord dans le genre *Echinus* par Lamarck en 1816, puis dans le genre *Strongylocentrotus* par Brandt en 1835 et, enfin, dans le genre *Toxopneustes* par Agassis en 1841.

Je ne donne ici, comme pour *Arbacia lixula* du reste, que les synonymies principales. Je signale cependant que Bell (28) rapporte à *E. lividus* Lamarck *E. lithophagus* Leach 1812 : *litophagus* aurait ainsi la priorité sur *lividus*. Je ne puis que soumettre cette question aux taxonomistes.

Pour la systématique des Echinides, consulter particulièrement (3) (120) (149) (317) (318) (379) (440) (441).

Mes recherches ont d'abord été conduites à la Station biologique de Roscoff (campagnes de 1946 à 1949), puis à la Stazione zoologica de Naples (1950) grâce à une bourse d'échange franco-italienne du C. N. R. S., enfin au Laboratoire Arago de Banyuls-sur-Mer (1951-1953). Il m'a aussi été donné de faire un séjour au Kristineberg Zoologiska Station de Fiskebäcksill (1952) au cours d'un séjour en Suède que j'ai pu effectuer grâce à une bourse Wenner-Gren.

Ce n'est pas sans vicissitudes que mon travail a pu être mené à bien. De ces graves soucis, il me reste, en retour, le privilège d'avoir pu rencontrer des savants qui honorent notre époque tant par leur savoir que par leur humanité. Et parmi ceux-ci, je voudrais en premier lieu assurer M. le Professeur P. P. Grassé, Membre de l'Institut, de ma profonde gratitude pour tous les encouragements qu'il m'a donnés et pour toutes les bontés qu'il a eues à mon égard et je souhaite que le travail que je présente ici soit digne de la confiance qu'il m'a accordée ; qu'il veuille bien, en ce cas, en accepter l'hommage.

Ma reconnaissance va particulièrement au Professeur G. Petit qui m'a accueilli dans son Laboratoire pendant les « années terribles ». Le soutien moral et matériel qu'il m'a prodigué spontanément est une marque indélébile de sa bienveillance à laquelle je suis très sensible. C'est au Laboratoire Arago que j'ai eu la possibilité de méditer et d'approfondir les problèmes que je traite ici ; je ne saurais trop remercier M. le Professeur G. Petit et particulièrement pour les facilités de travail qu'il m'a accordées dans l'Institution qu'il dirige d'une façon si active et si éclairée.

Je me souviens qu'au moment le plus pénible de mes épreuves, M. le Pro-

fesseur E. Aubel ne m'a pas découragé de poursuivre mon chemin dans la recherche scientifique et je lui en suis vivement reconnaissant.

Je dois à M. le Professeur J. Runnström, Membre de l'Académie Royale des Sciences de Suède, qui m'a fait l'honneur de s'intéresser à mes travaux, de m'avoir permis de faire mes preuves. De mon séjour dans son Institut, où il m'a reçu avec une grande bienveillance, j'ai retiré le plus grand profit ; qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance. Que le Docteur T. Gustafson soit aussi assuré de mon estime et de mon affection.

Je garde un souvenir ému du Professeur Macheboeuf, Membre de l'Académie de Médecine, à certains travaux duquel j'ai été associé, et je rends hommage à la mémoire de ce Maître plein de sollicitude.

J'exprime tous mes remerciements à M. le Professeur P. Remy qui m'a assuré des conditions favorables à la rédaction de ce travail.

J'ai été très honoré de la présence de M. le Professeur R. Wurmser à mon Jury et je tiens à l'assurer de ma haute considération.

Que mes collègues et amis avec lesquels j'ai eu des échanges de vues instructifs, et notamment les Docteurs G. Humphrey, E. Vasseur et T. Hultin, soient remerciés en toute cordialité. Que le Docteur A. J. Woiwod du Welcome Physiological Laboratory de Beckenham (Kent) qui a bien voulu me faire des chromatographies et que le Docteur J. C. Dan de la Tokyo Metropolitan University (Japon) qui m'a autorisé très obligeamment à reproduire ses clichés électroniques (695), reçoivent mes plus chaleureux remerciements.

A la Direction, aux marins et au personnel scientifique et technique des Laboratoires de Roscoff, Kristineberg et Naples j'exprime mes remerciements ainsi qu'au personnel scientifique et technique du Laboratoire de Banyuls-sur-Mer. Le dévouement du personnel de ces Stations, qui n'est plus à souligner, m'a été d'un précieux secours pour la récolte du matériel biologique comme pour l'installation du laboratoire.

Je suis très reconnaissant à M. le Professeur M. Caullery, Membre de l'Institut, d'avoir bien voulu m'accorder l'hospitalité du *Bulletin biologique* pour la publication de ce travail dont les frais d'impression ont été pour la plus grande part couverts par une Bourse du Ministère de l'Education nationale.

A mes Parents et Beaux-Parents qui m'ont soutenu d'une façon inconditionnelle en toute circonstance je voudrais témoigner par ce travail de ma piété filiale. Que mon père et ma mère, ma femme et mon fils soient associés à la dédicace de cet ouvrage.

Dans toutes les sciences, dont les principes sont donnés intuitivement soit par l'intuition des sens (par l'expérience) soit par l'intuition sensible mais pure (par les concepts d'espace, de temps et de nombre), c'est-à-dire dans les sciences de la nature et les sciences mathématiques, *c'est la pratique qui fait la méthode ;* et en essayant, en inventant, après que la science a été portée à un certain degré de richesse et d'ordre, on voit clairement par quels procédés il faut avancer, pour qu'elle s'active et pour qu'elle brille plus pure, débarrassée des taches tant de l'erreur que de la confusion.

KANT,
Dissertation de 1770.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES GÉNÉRALES

Savoir bien distinguer ce qu'il y a de réel dans un sujet de ce que nous y mettons d'arbitraire en le considérant, reconnaître clairement les propriétés qui lui appartiennent et celles que nous lui prêtons, me paraît être le fondement de la vraie méthode de conduire son esprit dans les sciences.

BUFFON,
Histoire naturelle.
Premier Discours.

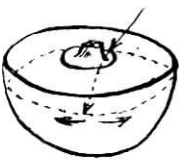
I. — Prélèvement des gamètes.

L'obtention de gamètes convenables est évidemment la condition *sine qua non* de la validité des résultats expérimentaux. Quoique d'une apparente simplicité ce problème reste résolu d'une façon très différente et souvent très imparfaite. Tout dépend d'ailleurs de la qualité et de la quantité des Animaux que l'on peut utiliser, et dans bien des Laboratoires ces exigences impliquent des modes de prélèvements qui ne sauraient être préconisés dans des conditions géographiques meilleures.

Les techniques mises en œuvre pour obtenir à temps voulu de grandes quantités de gamètes reviennent toutes soit à prélever les gonades soit à forcer la ponte. J'ai utilisé toutes les techniques en cours — sauf la technique électrique — et j'en passerai la revue critique en relevant les seuls éléments servant à situer le problème.

Ovariotomie et castration

C'est la technique la plus ancienne. Elle consiste généralement à ouvrir le test calcaire de l'animal selon une section le long de l'ambitus ou plus ou moins équatoriale (schéma ci-contre). Une fois la calotte orale retirée on peut soit arracher les gonades à l'aide d'une spatule en substance neutre soit procéder à une dissection fine ; on porte alors les ovaires et les testicules respectivement sur deux entonnoirs de Büchner recouverts d'une gaze et on laisse égoutter les produits génitaux. Il y a de nombreuses variantes (Sampson) (Just) (Bielig-Dohrn). Rothschild opère comme Gray non sans avoir, toutefois, apporté quelque perfectionnement (513) ; par exemple en ce qui concerne les spermatozoïdes : « Des testicules mûrs d'*E. esculentus* furent séchés avec du papier-filtre et pressés à travers une fine étamine de soie », le dispositif comportant un entonnoir muni d'un disque perforé.



Une technique de ce type présente un certain nombre d'inconvénients :

1° l'égouttage étant lent on ne peut obtenir que difficilement, à un moment donné, une grande quantité de sperme non dilué (nommé « dry sperm » par les auteurs de langue anglaise) ; généralement on facilite la sortie des gamètes par lessivage des gonades sur filtre avec un jet d'eau de mer ou d'une eau isotonique ;

2° les Oursins *P. lividus* et *A. lixula* ne présentant aucun caractère sexuel secondaire, il n'est pas possible de distinguer les mâles des femelles et en conséquence, si l'on est à court de matériel, ce procédé n'est pas recommandable, et il est d'autant plus précaire que le *sex ratio* est assez variable d'une pêche d'Oursins à une autre comme le montre à titre indicatif le tableau I où on lit horizontalement le nombre d'individus de chaque sexe récolté d'une espèce, ou des deux espèces, s'il y a lieu, *au cours d'une même*

Tableau I

Localité	Mois	Mode de pêche	*Paracentrotus lividus*		*Arbacia lixula*	
			♀	♂	♀	♂
Roscoff (baie de Morlaix)	Début juillet	Fauber	21 10 13 17	24 15 8 16		
Banyuls-sur-Mer (Fontaulé)	Fin août	A la main	11 26 14 3 14	11 14 19 17 7	8 11 11 26 8	17 8 3 23 12

pêche, dans une série de pêches consécutives (verticalement). On voit que la moyenne des prélèvements totaux donne 50 o/o de mâles et 50 o/o de femelles. Mais en gamétologie chimique d'Oursins c'est la *pêche* qui constitue *l'unité statistique pratique* car d'une part, les Animaux placés « en réserve » dans un aquarium évacuent généralement très vite leurs gamètes qui sont ainsi inutilisables et, parce que, d'autre part, on se trouve habituellement obligé de travailler avec un nombre relativement petit d'Animaux pour des raisons de commodité expérimentale.

Remarque. — Une statistique de cet ordre ne paraît pleinement valable que pour des pêches à la pièce qui se font exhaustivement à la main dans un périmètre donné d'une station de grand peuplement ; en effet, au cours d'un faubertage, surtout dans une région appauvrie en Oursins comme l'était Roscoff pendant les années 1946-1947-1948, il y a de nombreux facteurs aléatoires liés à la pêche elle-même qui peuvent intervenir dans le résultat final (lieu, état de la mer, présence de rochers...), autrement dit la mer, dans une pêche à l'aveuglette, n'est pas une urne idéale quand ses boules noires et blanches (les sexes des Oursins) sont rares, plus ou moins dispersées et souvent inaccessibles (mœurs lithophagiques des *P. lividus* de Bretagne). Ce problème statistique particulièrement compliqué ici rentre dans le cas de l'estimation de la fréquence d'un caractère K dans une population où l'effectif N est quelconque (mais petit), cas évoqué dans l'ouvrage de M. Lamotte (335, p. 199) et sur lequel Lamotte conclut que la méthode de calcul d'un intervalle de sécurité « exige... la connaissance de N ; or cet effectif est très généralement inconnu et on ne peut alors rien dire de précis au sujet d'un intervalle de sécurité, à moins de pouvoir admettre que N est grand » ;

3° la cavité générale de l'Oursin renferme des substances, plus ou moins toxiques pour les gamètes, dont l'essorage préalable des gonades n'assure pas l'élimination. On sait surtout depuis Lillie que le contact des ovules avec le liquide périviscéral empêche leur fécondation (voir aussi (Just) (Fuchs) (Ephrussi)) ; seuls Bielig et Dohrn ont avancé que le liquide périviscéral favorisait au contraire les fécondations. En attendant que cette dernière observation soit confirmée on peut penser que la propriété inhibitrice du liquide périviscéral est liée à la présence d'un système coagulant (617) (121) (306) (130) (351) (461), quoique d'autres actions puissent être mises en cause, car, même si on prend la précaution de laver et d'essorer les gonades, on n'est pas à l'abri de contaminations particulièrement moléculaires. C'est ainsi que dès 1882 (443) Mourson et Schlagdenhauffen signalaient la présence d'urée (0,01 o/oo) et d'une leucomaïne dans le liquide cavitaire de *P. lividus* (cependant Moore (433) (434) a pu montrer que la présence d'urée n'affecte pas la fécondation chez l'Oursin ce qui exclut cette substance de la catégorie des inhibiteurs éventuels). Mais d'autres propriétés chimiques et physico-chimiques seraient à considérer pour lesquelles je renvoie aux publications (269) (110) (25) (192). Enfin j'ai pu montrer avec T. Gustafson (549) l'existence de contaminations moléculaires dont l'origine a pu être déterminée dans des fragments de tissus somatiques : une eau de mer ovulaire préparée sans précautions spéciales à partir d'ovules ovariens présente une activité catalasique indépendante de l'activité gamonale et d'éventuelles lyses ovulaires ; cet enzyme pro-

vient de l'anse directe intestinale dont des fragments ont été arrachés au cours des ovariotomies brutales. Je n'ai pu déterminer si cette catalase est constitutive du tissu intestinal ou si elle est d'origine alimentaire mais sa concentration

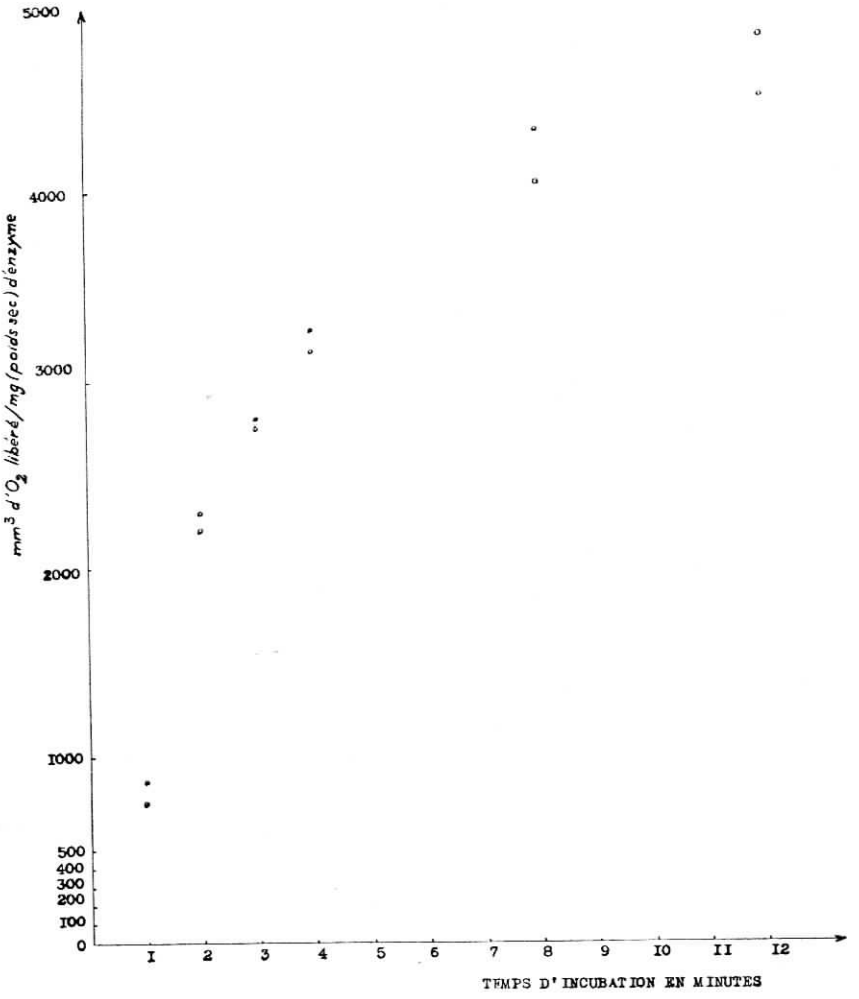


Fig I.

y est élevée et l'anse directe d'*Arbacia lixula* constitue donc une nouvelle source de catalase. J'ai cherché à l'extraire et à la concentrer, ma tentative de purification n'a pu aboutir à la cristallisation. J'ai opéré de la façon suivante :

On ouvre des *A. lixula* par une section le long de l'ambitus ce qui permet de découvrir l'anse directe, plate et plissée qui se reconnaît facilement

(pour la description du système digestif chez les Oursins réguliers, consulter (43) (120)); on lave les viscères avec de l'eau de mer filtrée et on arrache l'anse directe à l'aide de brucelles plates. Les fragments sont pesés frais et broyés pendant 5 minutes au mortier de porcelaine avec du sable de Fontainebleau lavé et 10 volumes d'acétone à 30 o/o que l'on ajoute lentement (il est avantageux de travailler au froid). Le broyat est laissé à diffuser pendant une heure en flacon bouché émeri lentement agité, après quoi on centrifuge à 5.000 tours/minute pendant 10 minutes ; le surnageant présente habituellement des bandes d'absorption nettes à 645-660 mμ et 485-500 mμ (lectures au photocolorimètre absolu B.-M.). Après dialyse en cellophane contre de l'eau douce courante on effectue des fractionnements ammoniques à froid en amenant à chaque fois les différentes fractions solubles au début d'opalescence. A l'état floculé on trouve au microscope des formations polygonales aplaties et irrégulières. La figure I montre la cinétique d'une préparation en eau distillée; titration à 0° C par la technique de Feinstein au perborate de sodium à 1,5 o/o (160) modifiée par iodométrie selon (549) (cf. 97).

D'autres contaminations chimiques des gamètes peuvent se produire, c'est ainsi que j'ai pu déceler une base volatile dans le liquide périviscéral (cf. chapitre III). Quant à la constitution ionique de ce liquide, elle est différente de celle de l'eau de mer (110) et cet état de choses peut retentir sur les fécondations ;

4° on risque que les spermatozoïdes testiculaires et les ovules ovariens ne soient pas tous dans le même état de maturité. Ce point a déjà été envisagé par de Meyer, Just, Doflein (139), Carter et il doit être considéré quelle que soit la période de maturité maximum des Oursins d'une région quelconque (consulter par exemple Lo Bianco (367) (368) (369) et Vasseur et Carlsen (652)). Enfin, non seulement le prélèvement des gamètes par gonadectomie est préjudiciable à l'homogénéité des lignées gamétiques, mais encore il affecte la pureté des suspensions comme il semble ressortir des travaux de Giard (188) (189), Caullery et Siedlecki (85), Caullery (83) (84), Russo (530) (531) (532) (533), Stott (586), Bielig et Dohrn, travaux qui montrent la variabilité des matières grasses, glycogène, etc., en fonction de la saison.

Tous ces faits impliquent qu'on ne saurait trop se méfier des gamètes provenant de gonadectomies.

Pontes forcées

1) *Technique chirurgicale.*

C'est ce que j'appellerai la *ponte par section* (sous-entendu : du test calcaire de l'animal) : lorsque les Oursins sont en période de pleine maturité (par exemple : juillet-août pour *A. lixula*, décembre-avril pour *P. lividus* à Banyuls-sur-Mer), la section latitudinale du test amène la ponte (la section du péristome paraît remonter à Geddes) (cf. 695). J'ai beaucoup utilisé ce moyen qui me paraît tout à fait recommandable, car dans une région riche en Oursins comme Banyuls-sur-Mer, la question de limitation de matériel ne se pose pas, de plus le procédé a l'avantage de procurer des gamètes sans agir

d'une façon artificielle sur les gonades. Il faut prendre la précaution de laver à l'eau douce courante les ciseaux qui servent à l'ouverture des animaux, pour éviter des contaminations, particulièrement de spermatozoïdes. La récupération des gamètes se fait facilement en posant les animaux du côté aboral sur des verres de Borrel ; on peut préalablement couper les piquants et essuyer le test (192).

2) *Technique physique.*

On a décrit un procédé qui consiste à obtenir la ponte à l'aide de décharges électriques d'une bobine d'induction (286) (254).

3) *Technique chimique.*

Quoique le procédé électrique paraisse élégant, il n'est pas encore répandu. La technique la plus couramment employée est celle qui fait usage de chlorure de potassium. Telle qu'on la pratique généralement à Woods Hole (629), cette technique, qui a été suggérée par Heilbrunn, revient à injecter une solution isotonique de KCl dans la cavité générale par piqûre dans le péristome après lavage du test. Cette technique au KCl ne possède aucun des inconvénients de la gonadectomie et elle a cet avantage sur la ponte par section d'éviter le sacrifice des animaux. Je l'ai largement utilisée aussi. Toutefois la question de savoir si elle permet l'obtention de suspensions de gamètes parfaitement homogènes du point de vue maturité ne peut recevoir de réponse sûre. Mais il semble que l'inconvénient essentiel de cette technique chimique soit la fréquente contamination des pontes par du KCl ; comme j'ai pu le constater, les spermatozoïdes — dont nous verrons les difficultés de lavage — ne peuvent souvent être mis que difficilement en mouvement après dilution dans de l'eau de mer, comme cela doit normalement se produire, cette paralysie doit être attribuée à la présence de KCl. Moyennant certaines précautions cette technique au KCl est à retenir, je lui préfère cependant la ponte par section.

Tous les stimuli mis en œuvre pour obtenir la ponte agissent au niveau de la musculature des gonades mise en évidence par M. Fox (169) : par excitation de ces muscles à l'aide d'un pinceau, Fox a pu obtenir une contraction des gonades amenant l'évacuation des gamètes par les gonophores ; les femelles possèdent une musculature plus puissante que les mâles. Fox signale aussi qu'après ponte, *P. lividus* reforme des ovotides en 9 jours à la température de 17°-19° C.

Remarque. — Un des problèmes les plus curieux de la biologie sexuelle des Oursins est la *ponte contagieuse*, c'est-à-dire le rejet simultané des gamètes mâles et femelles dans une même frayère. Fox (169), après Fol (167) (168) y a décelé un rythme lunaire ; il est possible, pourrait-on remarquer, que le rythme de ce phénomène soit d'origine interne, à savoir, une élaboration et une maturation des gamètes qui seraient cycliquement simultanées dans une même population. Je me suis toutefois demandé si la fertilisine n'était pas en cause comme cela a été signalé chez *Nereis* par Lillie (345) et aussi Townsend (606) (783) qui avait attribué cette action à la présence de

glutathion dans l'eau de mer ovulaire. J'ai injecté avec une seringue de l'eau de mer ovulaire d'*A. lixula* dans la cavité générale d'*A. lixula* adultes et j'ai constaté que les mâles, mieux que les femelles, pouvaient rejeter une quantité d'ailleurs faible de leurs gamètes, alors que des injections-témoins d'eau de mer n'ont jamais amené de pontes notables. Ce serait l'objet d'un travail particulier que de déterminer le rôle d'une telle action dans les pontes contagieuses (rôle de l'anneau nerveux aboral et du système aquifère madréporique) (Consulter aussi Ballard (15)).

II. — Lavage des gamètes.

Que les gamètes aient été obtenus de quelque façon que ce soit, il peut y avoir intérêt à écarter les substances qui ne sont pas liées aux seules cellules sexuelles. Pour les ovules la chose est aisée encore qu'il faille pour cela rejeter la centrifugation qui les endommage (ovalisation, déplacements de matériaux intra-ovulaires). J'ai constamment opéré, à la suite de Warburg particulièrement (674), en lavant les ovules par décantations successives avec des solutions isotoniques choisies dont certaines seront indiquées au cours des chapitres qui suivront. En ce qui concerne les spermatozoïdes le problème se complique de considérations théoriques et de difficultés pratiques.

a) *Considérations théoriques.* — Le sperme comprend des spermatozoïdes et un liquide séminal doué de nombreuses propriétés comme nous l'avons vu au cours de la partie historique (695) et, jusqu'à présent, on ne saurait trancher la question de savoir ce qui revient aux spermatozoïdes *à l'état pur* et ce qui revient au système spermatozoïdes-liquide séminal dans le pouvoir fécondant d'un sperme donné. Cette question est l'objet d'un des problèmes que j'ai examinés.

b) *Difficultés pratiques.* — Si l'on se pose le problème d'obtenir des spermatozoïdes *à l'état pur*, on se heurte au fait que les gamètes mâles ne décantent que très lentement et très imparfaitement de façon spontanée ce qui rend cet éventuel procédé inutilisable. Quant à la centrifugation elle est ici encore une technique trop brutale, j'en ai donné un exemple dans une Note préliminaire (540) en montrant qu'après centrifugation les spermatozoïdes d'*A. lixula* étaient agglutinables *irréversiblement* par la fertilisine correspondante tandis qu'une fraction aliquote non centrifugée de cette même suspension spermatique donnait des agglutinats typiques — réversibles — avec cette même préparation de fertilisine. Rothschild a aussi souligné quelque temps après (502) la nocivité de la centrifugation pour les spermatozoïdes d'Oursins ; j'en donnerai encore un exemple au cours du chapitre IV.

Dans ces conditions on en est réduit, pour le lavage des spermatozoïdes, à chercher ailleurs que dans les procédés de décantation spontanée ou forcée. J'ai pensé à la dialyse. C'est une technique que j'ai mise en œuvre au cours de nombreuses expériences qui visaient non seulement à l'obtention de spermatozoïdes purifiés et en pleine vitalité mais encore, et en relation avec le problème de la conservation de cette vitalité — la survie — à examiner les états de repos et d'inanition qui peuvent s'ensuivre et surtout, à poser et à illustrer les notions nouvelles, ne serait-ce que pour la spermiologie, de

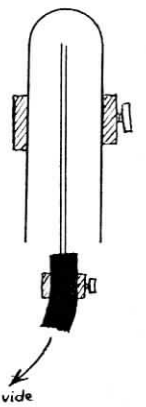
milieux ouverts et de *milieux renouvelés* (cf. chapitre V). Dans le cadre de la dialyse comme technique de « lavage », on doit constamment avoir présent à l'esprit que la dialyse n'éliminera pas les macromolécules et qu'en conséquence, du point de vue chimie de la purification des cellules, la technique restera imparfaite.

III. — Confection des dialyseurs.

1) *Préparation des sacs.*

Je me suis exclusivement servi de membranes de collodion. On trouvera dans l'ouvrage de M. Grabar (212) des indications nombreuses sur les membranes de ce type. Dans la grande majorité de mes expériences, les membranes sont des sacs digitiformes que je prépare de la façon suivante :

On utilise du collodion commercial à l'éther à 5 o/o (dans quelques essais j'ai préparé du collodion à partir de nitro-cellulose et d'un mélange éthanol-éther sulfurique). Comme moule on se sert d'un tube en Pyrex à fond bien rond et ne présentant aucune aspérité interne. Ce tube doit être soigneusement lavé (mélange sulfochromique ou détergent du type « Teepol »), déshydraté à l'aide d'éthanol absolu et séché dans un courant d'air. On dispose du collodion à l'intérieur du tube sur environ 1/5 de la hauteur de celui-ci et en évitant toute bulle au cours du transvasement ; puis on incline le tube de plus en plus vers son ouverture en lui imprimant un mouvement de rotation régulier jusqu'à ce que l'égouttage du collodion soit total. On retourne alors complètement le moule et on le roule alternativement entre les paumes des mains pendant quelques dizaines de secondes. On assure alors un séchage grossièrement régulier en plaçant pendant un temps fixe (1 minute par exemple) et à l'intérieur du moule, un tube branché sur le vide d'une trompe à eau selon le schéma ci-contre (dans ces conditions, le courant d'air ainsi créé permet une vitesse de dessiccation assez uniforme de l'orifice au fond du moule).



Pour décoller le sac du tube on commence par décoller le collodion de l'orifice à l'aide de mouvements du pouce. Ceci fait on remplit le moule d'eau douce en la faisant couler avec un débit faible le long de la paroi collodionnée, puis on décolle plus avant le sac en l'écartant délicatement du tube à l'aide de brucelles plates ; on fait couler de l'eau entre la paroi de verre et celle de collodion ainsi séparées. Le sac doit se démouler automatiquement. Ces sacs préparés à la température du laboratoire laissent passer les molécules hydrosolubles jusqu'à un poids moléculaire d'environ 2.000 comme je l'ai vérifié avec le clupéine (P. M. : 2.021 valeur classique d'après Waldschmidt-Leitz ; on ne peut cependant exclure qu'une interaction hétéropolaire protéine basique-nitrocellulose vienne perturber le résultat).

Pour conserver ces sacs, on les place dans de l'eau distillée Pyrex légèrement formolée, mais je conseille de les préparer extemporanément.

On peut utiliser les dialyseurs tels quels en les fermant avec un bracelet de caoutchouc ou un fil de gut, on doit alors les lester pour assurer leur immersion totale dans le liquide de dialyse (des fragments de baguette de verre plein conviennent très bien à cet effet). Mais il peut être préférable de les monter sur des manchons de façon à pouvoir faire des prélèvements plus commodément à l'intérieur du sac.

2) *Montage des sacs.*

Les manchons de différentes formes que j'ai utilisés étaient tous en verre Pyrex. Pour fixer le sac au manchon de façon à ce qu'il n'y ait aucune fuite à la jointure — ce que l'on vérifie en insufflant de l'air dans l'ensemble plongé extérieurement dans de l'eau — j'ai procédé de la façon suivante :

On place le sac encore humide sur environ 0,5-1 centimètre autour du manchon dont le diamètre doit être légèrement inférieur à celui du sac. A l'aide d'un tampon de coton imbibé d'éthanol absolu on applique le sac contre la paroi de verre en déshydratant convenablement les parties en contact. Puis, à l'aide d'un autre tampon de coton, imbibé cette fois d'éther sulfurique, on dissout légèrement le collodion appliqué au verre, ce qui a pour but de favoriser leur contact. Enfin on fait couler du collodion sur la partie ainsi préparée du sac, il faut pour cela faire tourner l'ensemble sac-manchon pour assurer une répartition circulaire uniforme du collodion de collage. On fait sécher en soufflant sur la soudure tout en continuant la rotation. Lorsque le collodion annulaire commence à sécher, on le comprime doucement entre les doigts jusqu'à séchage complet ; pour finir on rince sous un filet d'eau douce, on vérifie la tenue à la pression et, si on n'a pas un emploi immédiat du dialyseur ainsi préparé, on le plonge dans de l'eau de façon à empêcher la dessiccation du sac qui amènerait une baisse de sa porosité.

3) *Supports utilisés.*

Il existe de nombreux modèles de manchons. Le plus simple consiste en un tube de verre fermé par un bouchon de liège, de caoutchouc ou de coton ; je l'ai utilisé, mais l'avantage d'une légère surpression pour limiter l'endosmose m'a conduit à me servir, comme supports, de petites bouteilles dont le fond avait été retiré, la pression est alors simplement obtenue en se servant du bouchon de caoutchouc de fermeture comme piston (541). Enfin de façon à pouvoir être renseigné sur les variations de pression au cours des dialyses j'ai construit à l'Institut Wenner-Gren de Stockholm un dialyseur sous pression contrôlée (542) dont je reproduis ici l'aspect (planche I).

La calibration de l'appareil *sans membrane* se fait facilement en adaptant la technique de Krebs (cf. 638) préconisée pour les manomètres Warburg. Il faut pour cela enfoncer le piston de la seringue, muni de son agitateur, jusqu'à une valeur choisie, les robinets r_1 et r_2 étant ouverts, puis fermer ces robinets avant de plonger l'appareil dans l'eau du thermostat. Voici un

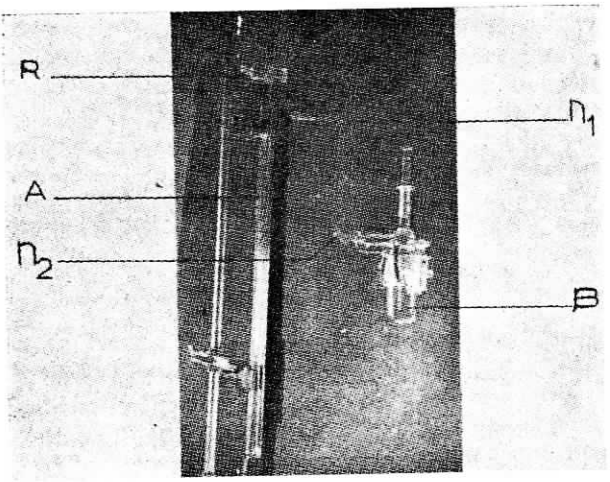


Fig. 1. — Vue d'ensemble de l'appareil monté.

A, manomètre à double coude (n_1 et n_2) ; R, robinet du manomètre ; B, dialyseur photographié sans sa membrane de collodion (il s'agit d'un prototype légèrement différent de celui représenté sur la figure 2).

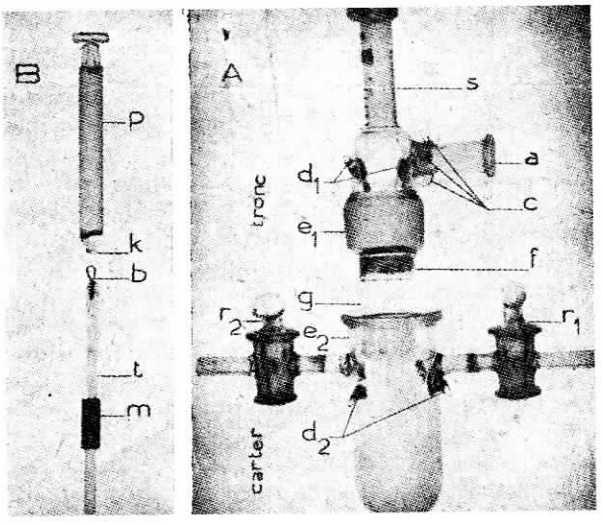


Fig. 2. — A. *Dialyseur.*

S, corps de la seringue graduée ; *a*, élément femelle du rodage fixant le tronc au manomètre ; *c*, 4 oreilles pour l'accrochage de ressorts reliant le tronc au manomètre ; d_1, d_2, 4 + 4 oreilles pour l'accrochage de ressorts reliant le tronc au carter ; e_1, e_2, joint rodé tronc-carter ; r_1, r_2, robinets d'arrivée et de départ du liquide circulant ; *f*, collerette de fixation du sac de collodion ; *g*, sac de collodion à l'éther fixé par collage au collodion.

B. *Dispositif de pression et d'agitation.* — *p*, piston de la seringue de corps *s* muni à sa base d'un crochet *k* permettant l'accrochage de l'agitateur *t* ; *t*, agitateur en battant de cloche muni d'une boucle d'accrochage *b* en fil de platine et d'un amortisseur en caoutchouc *m*.

exemple de calibration, les colonnes manométriques renfermant du mercure :

Soit $\theta = 26°5$ C (densité du mercure $\sim 13{,}531$), piston à une graduation x qui ne présente pas ici d'intérêt à être précisée. Lectures après 10 minutes de régulation thermique.

A) Avec 1 cm³ d'eau :

branche fermée à 30,0, branche ouverte : 29,7
» » 15,0, » » : 10,5.

B) Avec 11 cm³ d'eau (donc + 10 cm³) :

branche fermée à 30,0, branche ouverte : 29,7
» » 15,0, » » : 9,3

étant donné que le volume $= \dfrac{\text{volume d'eau ajouté en B} \times p_2}{p_2 - p_1}$

avec :

$$p_1 = h_1 - (30 - 15)$$

et :

$$p_2 = h_2 - (30 - 15)$$

il vient :

$$29{,}7 - 10{,}5 = 19{,}2 = h_1$$
$$h_1 - 15{,}0 = 4{,}2 = p_1$$

et :

$$29{,}7 - 9{,}3 = 20{,}4 = h_2$$
$$h_2 - 15{,}0 = 5{,}4 = p_2$$

alors :

$$\frac{10 \times 5{,}4}{5{,}4 - 4{,}2} = \frac{54}{1{,}2} = 4{,}5$$

et :

$$4{,}5 + 1 = 5{,}5$$

d'où volume du récipient vide $= 5{,}5 \times 13{,}531 \sim 74{,}42$ cm³

On pourrait de même calculer la constante du récipient, je ne m'y attarde pas, ceci n'étant qu'une application particulière de la technique générale de Krebs.

Par contre le problème se complique lorsqu'il s'agit de calibrer un récipient à parois fines et non rigides comme l'est l'ensemble membrane-tronc-manomètre. L'utilisation du mercure comme agent de remplissage n'est évidemment pas possible. Le procédé le plus simple et le plus pratique m'a paru être le suivant :

1) la seringue de compression étant graduée en centimètres cubes divisés en 1/10 (30 au sommet, 0 à la base) et les branches manométriques renfermant du mercure, on mesure le volume de l'appareil *sans membrane* selon la technique à l'eau comme il vient d'être dit, la base du piston affleurant à une graduation x de la seringue ;

2) on fixe le sac de collodion au tronc. R étant fermé et les colonnes mercurielles à une hauteur quelconque, on amène la base du piston à une gradua-

tion quelconque ; cette opération n'a pour but que de tendre convenablement la membrane de telle sorte qu'elle ne se déforme pas sensiblement sous l'action d'une pression de l'ordre de celle exercée par l'eau du carter (on peut remplir la membrane d'eau) ;

3) le carter *taré* est rempli à ras bord avec de l'eau bidistillée ; r_1 et r_2 étant ouverts on ajuste le carter sur le tronc sans l'attacher avec les ressorts mais en s'assurant, une fois l'excès d'eau éliminé et r_1 et r_2 fermés, qu'il n'y a pas d'espace gazeux entre le sac et le carter ; avec des tortillons de papier-filtre on élimine l'eau qui peut se trouver dans les branches externes de r_1 et r_2 ;

4) on retire le carter et collecte au mieux les gouttelettes d'eau fixées à l'extérieur du sac, on essuie extérieurement le carter avec du papier-filtre et on le pèse.

Le poids d'eau donne le volume d'eau contenu dans le carter; ce volume déduit du volume total de l'appareil donne le volume sac-tronc-manomètre limité à x ; pour des valeurs différentes de x on trouve immédiatement les volumes correspondants.

J'ai par ailleurs recherché des repères quantitatifs empiriques de volume et de pression en m'inspirant de la technique à l'eau de Krebs. Voici comment j'ai opéré :

On commence par déshydrater au mieux l'intérieur du sac de collodion en y introduisant un tortillon de papier-filtre fixé sur une baguette et en essorant rapidement le sac. On fixe l'ensemble tronc-membrane dépourvu du piston sur le manomètre. R étant ouvert et les colonnes manométriques étant placées à une valeur choisie, soit 15 :

1° placer un certain volume d'eau dans le sac, soit 2 cm³. Fermer R. Enfoncer l'ensemble piston-agitateur jusqu'à ce que la base du piston affleure une certaine valeur de l'échelle de la seringue, soit 25. Mettre en place le carter rempli d'eau, robinets r_1 et r_2 ouverts (les fermer dès que l'excès d'eau s'est échappé). Fixer les ressorts carter-tronc (tous les rodages doivent être rendus étanches, avec une graisse à base de silicone par exemple). Monter l'appareil sur le thermostat réglé à la température voulue, soit 30° C. Etablir l'équilibre thermique en agitant l'équipage pendant 10 minutes à 100-120 coups/minute. Ramener la colonne mercurielle de la branche manométrique fermée à sa valeur initiale, soit 15. Soit 18,8 la graduation de la branche manométrique ouverte à laquelle s'est fixée la colonne de mercure ;

2° démonter, c'est-à-dire : après avoir placé l'ensemble manométrique sur un portoir, retirer le carter, ouvrir R, retirer le piston muni de son agitateur, puis ramener à 15 les colonnes de mercure des deux branches manométriques ; fermer R, amener l'ensemble piston-agitateur à une autre graduation de l'échelle de la seringue, soit 15. Fixer le carter rempli d'eau et opérer comme précédemment. La colonne de la branche manométrique fermée étant ramenée à 15 à l'aide de la vis de pression, la colonne de la branche manométrique ouverte se trouve fixée à 19,4 ;

3° démonter, ajouter un volume d'eau dans le sac de collodion, soit 10 cm³ (volume final : 12 cm³), procéder comme auparavant en plaçant de nouveau le piston à la graduation 25. Lecture de la branche ouverte : 21,4 ;

4° démonter, opérer comme précédemment en plaçant cette fois-ci la base

du piston à la graduation 15 de l'échelle de la seringue. Lecture de la branche ouverte : 21,6.

Le graphique (fig. II) réunit les valeurs trouvées. On constate que le nombre de graduations manométriques dépend du volume d'eau et de la pression appliquée et qu'il n'est pas proportionnel. Il faut à ce sujet remarquer que le volume de liquide n'occupe pas tout l'espace de l'ensemble sac-tronc-manomètre ce qui fait que la compression porte uniquement sur le gaz, c'est-à-dire sur le fluide compressible, d'où :

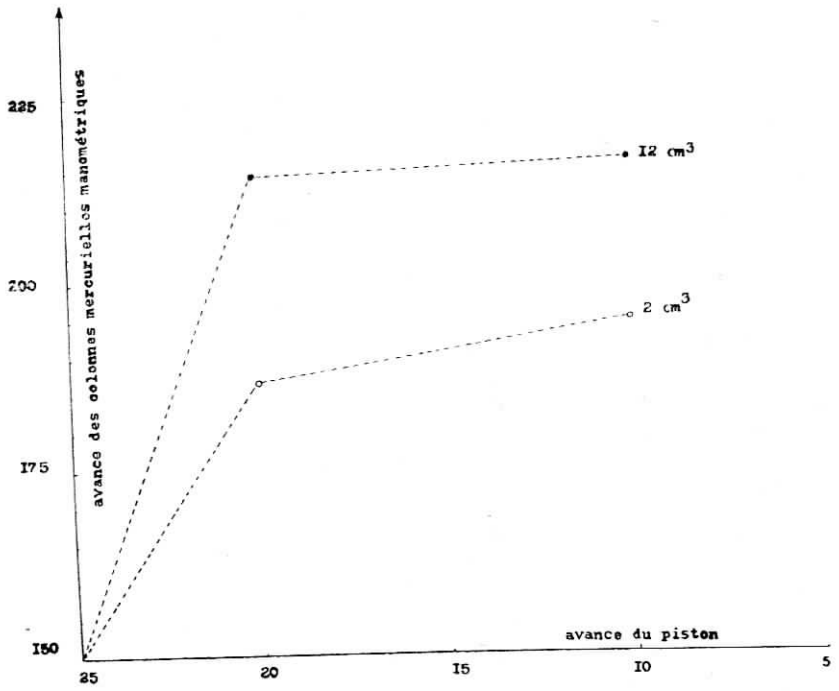


Fig. II.

quand $V_{liq.} \nearrow$, $V_{gaz} \searrow$, c'est comme si on comprimait le gaz d'un récipient plus petit, d'où, pour une pression fixe, le nombre de graduations manométriques croît assez vite avec $V_{liq.}$,

quand $p \nearrow$ pour $V_{liq.}$ fixe, la compressibilité du gaz intervient et le nombre de graduations manométriques croît moins vite.

N. B. — Au cours du fonctionnement, un appareil du même type, mais dont le sac de collodion est rempli du même liquide que le liquide circulant, un contrôle donc, est monté en amont par rapport au dialyseur proprement dit.

IV. — Pipetages.

En règle générale, qui ne doit souffrir aucune exception, il ne faut jamais souffler dans les pipettes lors des prélèvements des gamètes (vapeur d'eau, CO_2, vitesse d'écoulement modifiée).

a) *Ovules.* — Pour prélever une suspension ovulaire quantitativement il est nécessaire d'une prise à une autre d'homogénéiser le milieu pour que les différentes fractions aliquotes soient statistiquement égales entre elles. De plus il est préférable d'utiliser des pipettes *rapides* pour éviter des tassements cellulaires au cours de l'écoulement, ce qui amènerait une distribution irrégulière du nombre d'ovules obtenus surtout si on ne distribue qu'une fraction du volume total de la pipette (par exemple 1/10 de centimètre cube pour une pipette de 1 cm^3).

b) *Spermatozoïdes.* — Lorsqu'on opère avec des suspensions concentrées il n'est pas possible de définir un ménisque, aussi doit-il être de règle de jauger une suspension opaque à son niveau *supérieur* par rapport au trait choisi de la pipette calibrée. Mais pour des suspensions spermatiques diluées, l'existence d'un ménisque est nette et on doit alors jauger les suspensions translucides comme des suspensions transparentes, c'est-à-dire au point tangent : bas du ménisque — trait de la pipette. Cette différence dans la manière de déterminer le volume de suspensions spermatiques de turbidités différentes est une cause d'erreur systématique particulièrement sensible lorsque la pipette est de grande section. Pour les spermatozoïdes il faut utiliser des pipettes étroites et à écoulement lent de façon à assurer un drainage efficace au moment de l'écoulement.

Pour la répartition de très petites quantités de spermatozoïdes vivants, je ne peux conseiller l'emploi de micro-seringues type « Agla », car lorsque les spermatozoïdes d'Oursins sont privés d'oxygène pendant quelque temps, ils cessent de se mouvoir et, entre le début et la fin d'une distribution de cet ordre, les spermatozoïdes risquent de ne pas être dans un même état physiologique. J'ai par contre eu de bons résultats en utilisant des pipettes capillaires que je confectionnais avantageusement dans des branches de manomètres de Warburg détériorées en effilant leur partie inférieure. La calibration de ces pipettes se fait par pesée d'eau distillée.

V. — Respirométrie.

La respiration des spermatozoïdes d'Oursins a été mesurée à l'aide de l'appareil de Warburg par la méthode directe avec des récipients adéquats dont le volume oscillait autour de 15 cm^3. Les manomètres étaient calibrés par la méthode à l'eau de Krebs (cf. 638). Le coefficient de solubilité de l'oxygène dans 1 cm^3 d'eau de mer sous pression de 1 atmosphère a été choisi égal à 0,027 pour 30° C. Le remplissage du liquide de Brodie se faisait, une fois les caoutchoucs de pression en place, à l'aide d'une seringue munie d'une

aiguille fine qui était piquée dans le tuyau de caoutchouc. La routine des mesures consistait à placer 2/10 cm³ NaOH à 30 o/o dans le récipient central où on ajoutait une mèche d'absorption constituée par un tortillon de papier-filtre dont la taille était identique dans tous les récipients d'une même série d'expériences. Les lectures étaient généralement faites toutes les 5 minutes mais, dans la plupart des graphiques figurés ici, je n'ai représenté que les points singuliers : dilution et fin de l'essai ; les flèches verticales des graphiques indiquent le moment du renversement du contenu des diverticules. La vitesse d'agitation était de 100 coups/minute avec un déplacement alternatif de 4 centimètres au sommet des manomètres, ceci conformément aux indications de Rothschild (501) (502) pour les spermatozoïdes d'Oursins : c'est un optimum qui tient compte de deux exigences contraires, à savoir la vitesse d'oxygénation de la suspension et la fragilité mécanique des spermatozoïdes.

VI. — Azote total.

J'ai utilisé le micro-dosage selon Kjeldahl avec l'appareil de Parnas-Wagner. Le catalyseur de minéralisation était un mélange pulvérulent *ex tempore* de $CuSO_4$ et de KCl en parties égales. L'indicateur était le réactif de Tashiro préparé d'après les indications de Charlot (489) (490).

VII. — Phosphore organique et inorganique.

J'ai suivi la technique de Machebœuf-Delsal (cf. 378).

VIII. — Photomètres utilisés.

Spectrophotomètre Beckmann (B.) ; photocolorimètre absolu de Bonet-Maury (B.-M.) ; photomètre Klett (K.) ; photomètre Spekker (S.). Je me suis servi de cuves à faces parallèles de 1 centimètre d'épaisseur sauf avec le photomètre Spekker et celui de Klett qui fonctionnent avec des tubes calibrés différents.

IX. — Observation des agglutinats spermatiques.

1) *Macroscopiquement.* — On place dans un verre de montre ou mieux, dans un couvercle à fond plat de verre Borrel, 1-2 cm³ de la solution à tester et on ajoute soit une goutte de sperme non dilué (« dry sperm ») soit 1 cm³ de sperme dilué. On agite immédiatement le tout en s'appuyant sur la table et en faisant effectuer des mouvements circulaires courts au récipient.

L'homogénéisation ainsi obtenue rapidement (quelques secondes) précède généralement de peu la formation d'agglutinats avec la fertilisine. On chronomètre la durée des agglutinats à partir de l'instant correspondant au stade

« homogène » ; je discuterai au chapitre III la manière d'estimer la durée des agglutinats :

2) *Microscopiquement.* — On peut utiliser la technique des trois gouttes qui trouve sans doute son origine dans les travaux de JENNINGS (293) ; elle consiste à placer, au centre d'une lame porte-objet, une goutte de sperme dilué ou non ; d'un côté de cette goutte on dispose séparément une goutte d'eau de mer (témoin) et de l'autre, une goutte de la solution à tester. On recouvre d'une lamelle de façon à obtenir deux frontières grossièrement rectilignes eau de mer-sperme et sperme-solution donnée. On peut observer à l'immersion. Mais on peut opérer plus facilement en plaçant une goutte de sperme directement dans une goutte de solution à éprouver et on recouvre d'une lamelle. Je discuterai (chap. III) la validité de ces techniques microscopiques.

X. — Des critères servant à déterminer la concentration d'une suspension spermatique.

Pour des suspensions de cellules non proliférantes, comme c'est le cas pour les spermatozoïdes, la définition de la concentration constitue la base des études portant sur les variables biologiques ; son intérêt réside particulièrement en ce que la concentration représente une valeur fixe et il n'est pas besoin d'insister sur ce que la recherche de grandeurs stables caractérisant des systèmes vivants constitue la préoccupation essentielle de toute métrique biologique. J'ai examiné expérimentalement cette question ici pour les grandeurs de référence : poids sec, densité optique et azote total avec le sperme d'*A. lixula* (planche II), mais ces résultats sont applicables au sperme de *P. lividus* comme j'ai pu m'en assurer.

1) *Poids sec.*

De nombreux auteurs s'en sont remis à cette mesure pour évaluer la concentration spermatique, cependant ROTHSCHILD lui-même a, sans insister, mis en doute sa valeur (500) mais pour d'autres raisons que celles que je considérerai ; bien que ROTHSCHILD se soit servi de cette technique à diverses reprises pour des problèmes importants (501) il a écrit : « La mesure du poids sec du sperme est nettement inférieure aux mesures absorptiométriques comme méthode d'estimation du nombre de spermatozoïdes dans un échantillon. Au regard du temps exigé pour faire de telles mesures et de la difficulté de discriminer l'influence des spermatozoïdes et du plasma séminal, avec leurs différentes densités, dans le poids sec, cette méthode de compter les spermatozoïdes ne peut être recommandée » (500). Sans sous-estimer ces observations, je pense que les difficultés sont d'un ordre beaucoup plus chimique et qu'elles proviennent de la nature même du milieu marin puisque, du seul point de vue de la détermination gravimétrique de la teneur en sels de l'eau de mer, il est bien connu que le problème est délicat. En dehors de la carbonatation des bicarbonates au cours de la dessiccation on doit tenir compte d'autres per-

turbations qui exagèrent le poids de sels ; ces faits ont été reconnus depuis longtemps par les Océanographes et la question étant importante en spermiologie d'Oursins je crois utile de rappeler ce qu'en dit J. THOULET (601), p. 222 : « Procédé direct par détermination du total des sels conservés dans un poids connu d'eau de mer... On commence par introduire de 30 à 40 grammes d'eau dans un creuset de porcelaine épais préalablement taré et muni d'un couvercle fermant bien, on évapore au bain-marie. Si alors on se bornait à chauffer entre 150 et 180°, comme l'ont conseillé divers chimistes, on ne déshydraterait pas le sulfate de magnésie qui ne se sépare de ses dernières molécules d'eau qu'au-dessus de 200°, et d'autre part on sait que ce sel se décompose partiellement déjà à une température très inférieure à 200°. Il est donc nécessaire, lorsque l'eau est convenablement évaporée et les sels bien desséchés, de chauffer fortement le creuset fermé, pendant 5 minutes sur un brûleur de Bunsen. On laisse refroidir et on pèse. La proportion de magnésie mise en liberté par la décomposition du chlorure de magnésium se détermine alors par le procédé alcalimétrique connu... Il (TORNOË) trouve que, pour cette correction il suffit d'ajouter au poids du sel calciné 1,375 fois le poids de la magnésie libre, déterminé par titration. En procédant ainsi, M. TORNOË a trouvé que même après une calcination prolongée bien au delà qu'il est nécessaire pour obtenir un sel parfaitement exempt d'eau, aucune erreur sérieuse ne peut provenir de la volatilisation du chlorure de magnésium ou de la décomposition du sulfate de magnésie. Néanmoins M. DITTMAR pense que la méthode exagère quelque peu la quantité totale de sel. »

C'est le caractère laborieux de cette technique qui a fait rechercher une méthode de remplacement dont l'élégant dosage de la salinité par la chlorinité paraît être l'expression. Il est clair que la calcination ne peut être envisagée dans la mesure où on doit connaître une teneur en matière organique thermolabile. La gravimétrie directe des spermatozoïdes d'Oursins en eau de mer paraît donc être une mesure illusoire.

Toutefois si on ne dispose pas d'un matériel permettant d'opérer autrement que par volumétrie et gravimétrie, on peut, semble-t-il, *non pas mesurer*, mais évaluer l'ordre de grandeur de la concentration spermatique en opérant de la façon que je vais indiquer :

1) centrifuger à fond une fraction aliquote de la suspension spermatique et doser sur le surnageant la chlorinité à partir de laquelle on connaît la salinité à l'aide des tables de KNUDSEN (316) ;

2) prélever un volume connu du surnageant de centrifugation, le placer dans un récipient taré et porter dans une étuve à 100° C pendant 1 heure, après quoi laisser refroidir dans un dessiccateur à acide sulfurique branché sur le vide d'une trompe à eau ; peser ;

3) placer dans un récipient taré un volume connu d'une fraction *non centrifugée* de la suspension spermatique, porter à l'étuve à 100° C et opérer comme en 2) à partir de ce temps.

N. B. — L'hygroscopicité des sels pose un problème en ce qui concerne le « poids constant » ; j'ai choisi de prendre la valeur moyenne entre le poids « immédiat » et le poids « stabilisé ».

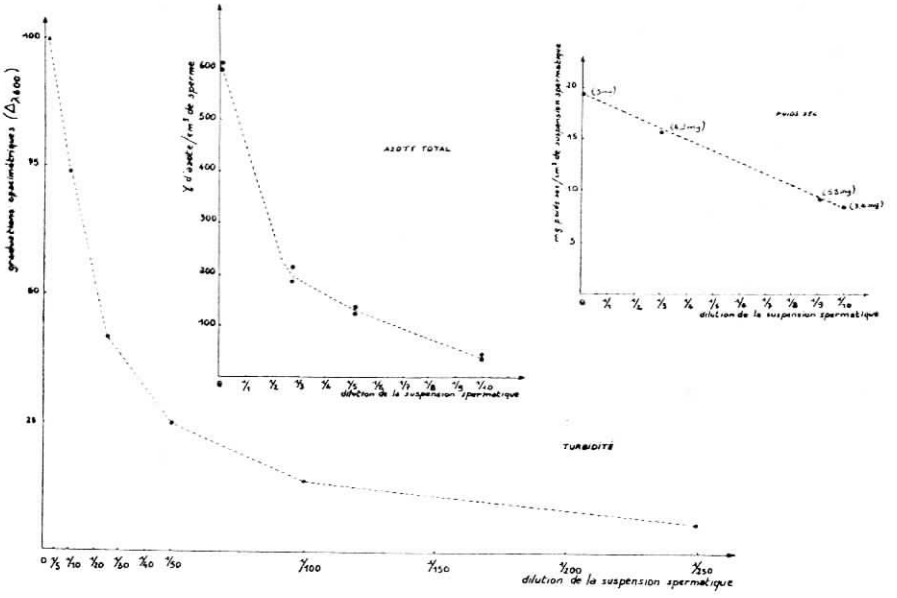


Planche II

Dans ces conditions :

a) en défalquant la valeur trouvée en 1) de celle trouvée en 2) on a l'erreur par excès inhérents à la gravimétrie ;

b) en défalquant la valeur trouvée en 1) de celle trouvée en 3) on a le poids sec du sperme ;

c) en combinant *a)* et *b)* on a la valeur du poids sec spermatique avec l'erreur de gravimétrie.

La planche II montre dans une des trois figures la courbe que l'on peut ainsi obtenir (la droite est déduite d'une salinité normale de 38 o/oo, les chiffres entre parenthèses indiquent l'erreur *minimum* d'une série de 3 déterminations). Comme on le voit la proportionnalité paraît satisfaisante mais j'insiste sur ce que ce procédé n'est qu'un pis-aller et on doit se garder d'accorder à ces valeurs une signification absolue qu'elles n'ont certainement pas. De plus, pour des suspensions spermatiques diluées, la gravimétrie est totalement inapplicable car les pesées deviennent trop aléatoires.

2) *Densité optique.*

La détermination de la concentration cellulaire par évaluation de l'opacité d'une suspension est un procédé rapide et satisfaisant, très utilisé particulièrement en bactériologie. Son application aux suspensions spermatiques ne

présente aucune difficulté, elle semble avoir été faite pour la première fois par Burbank (66). On doit cependant faire les remarques suivantes :

1) tenir compte éventuellement de la teinte plus ou moins jaunâtre ou rosée que peuvent présenter les suspensions spermatiques ;

2) pour les plus fortes concentrations on ne peut effectuer de lectures directes avec les photocolorimètres courants ; les dilutions exigées impliquent que les résultats seront des extrapolations.

N. B. — Au cours de mon travail un symbole du type $\Delta_{\lambda}^{1/50}{}_{600}$ signifiera : densité optique d'une suspension spermatique diluée au 1/50 par de l'eau de mer filtrée pour effectuer la mesure, détermination sur la longueur d'onde de 600 mμ (cette convention d'écriture est évidemment valable pour d'autres dilutions et d'autres longueurs d'onde).

3) *Azote total.*

Le micro-dosage Kjeldahl par sa précision est une technique tout à fait recommandable pour déterminer une valeur de référence de la concentration spermatique. Elle est seulement plus longue que la mesure de la densité optique mais son emploi n'est pas limité pour des fortes concentrations spermatiques car elle permet des mesures directes sur n'importe quelle suspension.

En conclusion. — La gravimétrie ne peut être retenue. Pour définir la concentration d'une suspension spermatique, j'ai utilisé au cours de mes recherches soit la teneur en azote total soit la densité optique (En coordonnées semi-logarithmiques, en portant $\log_{10}$ des opacités ou des teneurs en azote, on obtient une droite (cf. aussi (500)).

Par concentration spermatique, j'entends la concentration globale du sperme, c'est-à-dire l'ensemble de ce qui est propre aux cellules spermatiques et de ce qui est propre au liquide séminal. Je n'ai pas envisagé ici le comptage des spermatozoïdes à l'aide d'un hématimètre qui est un procédé précis mais très long et en conséquence moins pratique que les deux procédés dont j'ai fait usage.

Les 3 courbes de la planche II ont été obtenues à partir de la *même suspension* de spermatozoïdes d'*A. lixula*.

CHAPITRE II

DE L'EXTRACTION ET DE CERTAINS CARACTÈRES CHIMIQUES DE LA FERTILISINE

> Il y a de vieilles cathédrales qui, en dehors de leur destination sacrée, inspirent des sentiments de solennité et de crainte respectueuse. Le visiteur curieux lui-même parle de choses sérieuses, à voix basse, et comme chaque chuchotement se répercute sous la nef voûtée, l'écho semble apporter un message de mystère. Le labeur de générations d'architectes et d'artisans a été oublié, l'échafaudage élevé pour leurs travaux a depuis longtemps été retiré, leurs erreurs ont été effacées, ou sont cachées par la poussière des siècles. Voyant seulement la perfection du tout, nous sommes impressionnés comme par quelque entreprise surhumaine. Mais quelquefois nous entrons dans un tel édifice qui est encore en cours de construction ; alors le bruit des marteaux, la fumée de tabac, les gestes communs liant travailleur à travailleur, nous empêchent de comprendre que ces structures somptueuses ne sont là que pour donner, à l'effort humain ordinaire, une direction et un but.
>
> LEWIS et RANDALL,
> *Thermodynamique.*

Lorsque j'ai abordé le problème des gamones, en 1946, la fertilisine n'avait pas encore été isolée sous une forme définie, les travaux les plus avancés, ceux de KUHN et ses collaborateurs (328) (329) indiquaient non pas une extraction mais une *concentration*, par voie ammonique, de la fertilisine d'*A. lixula*. De plus, à cette époque, les conceptions de TYLER, inspirées de celles de F. R. LILLIE, retenaient l'attention car elles établissaient une relation suggestive entre le pouvoir agglutinant des gamones, surtout la fertilisine, et le pouvoir agglutinant des anticorps des Mammifères. C'était renouveler le concept de fécondation-immunité (voir 373 par exemple), suivant lequel, non seulement l'œuf d'Oursin devient immun pour les autres spermatozoïdes après la pénétration spermatique qui a assuré la fécondation, mais encore, avant même la fécondation, les relations d'ovules à spermatozoïdes sont de type antigène-anticorps, conception qui pouvait laisser entendre que les gamones agglutinantes étaient de nature globulinique.

Partant de considérations assez différentes (sur l'antigène somatique des bactéries Gram négatif (41)), j'ai pu extraire en 1947 la fertilisine de *Paracentrotus lividus* en me servant d'acide trichloracétique N/2. Ce n'est qu'à la

suite de ce travail que TYLER, sans d'ailleurs faire état de ma publication, a brusquement signalé au cours d'une mise au point (627), comme constituant un de ses résultats inédits, l'extraction de la fertilisine d'Oursins américains par l'acide acétique ! Il me semble qu'il n'est plus question aujourd'hui de rapprocher les gynogamones des anticorps globuliniques des Mammifères, car la conséquence immédiate de l'extraction trichloracétique était d'exclure la participation de toute fraction globulinique à l'activité de la fertilisine, et il ne sera plus fait ici d'allusion à ce point historique. Au cours de ce chapitre j'indiquerai les différentes techniques que j'ai mises au point pour isoler la fertilisine et j'y ajouterai des données inédites sur les propriétés chimiques de cette entité.

I. — Techniques d'extraction.

Ces techniques ont déjà fait l'objet de plusieurs communications de ma part (534) (538) (540). J'en rappelle ici les principaux temps, le matériel étant *P. lividus* et *A. lixula* et toutes les opérations se faisant à la température du laboratoire :

a) *A partir des ovules.* — Les ovules étant obtenus par pontes forcées (par KCl ou par section), ils sont lavés par décantation soit dans de l'eau de mer filtrée soit dans une solution isotonique de NaCl. Ils sont finalement centrifugés à 4.000-5.000 tours/minute pendant 10 minutes dans des pots de centrifugation tarés. Le poids frais du culot ovulaire est placé en présence de 10 parties de CCl_3CO_2H N/2. L'adjonction d'acide se fait par petites portions en agitant constamment. Le contact ovules-acide est poursuivi pendant 1 heure en le favorisant par de fréquentes agitations. Après ce temps on chasse les cadavres ovulaires par centrifugation ou filtration sur papier, le liquide résultant est mis à dialyser pendant 3 heures contre de l'eau douce courante puis contre le liquide choisi pour effectuer les essais (eau distillée, eau de mer, etc.).

Avec *P. lividus* l'extrait est opalescent blanc ; avec *A. lixula* il est rouge (présence d'échinochrome). La figure III représente les valeurs d'absorption (1/transmission) de différentes préparations de fertilisine d'*A. lixula* ; ces courbes ont été obtenues avec le spectrophotomètre Beckmann. La courbe I représente de la fertilisine colorée par l'échinochrome (produit d'extraction centrifugé) ; la courbe II représente de la fertilisine d'extraction trichloracétique après dialyse contre de l'eau douce (pH 7,2) et la courbe III, après dialyse contre de l'eau de mer (pH 8).

Pour éliminer l'échinochrome, j'effectue une série de dialyses contre de l'eau douce courante en ajoutant à l'intérieur du dialyseur toutes les 3 heures, 2-3 cm^3 d'acide trichloracétique N/2. Lorsque la préparation est décolorée elle ressemble à une préparation de fertilisine de *P. lividus* par son opalescence blanche. La teneur en azote total de la fertilisine de *P. lividus* est de 4,7 o/o, celle d'*A. lixula* de 4,81 o/o.

b) *A partir des eaux ovulaires.* — On peut soupçonner que l'acide trichloracétique en agissant sur les ovules, extrait non seulement la fertilisine mais encore d'autres produits acido-solubles, les plus à craindre étant des

polyosides ou des polypeptides non dialysables. C'est pourquoi j'ai cherché à obtenir des préparations en partant d'eaux dans lesquelles des ovules avaient séjourné. J'ai procédé ainsi :

Les ovules sont lavés par décantation à l'aide d'eau de mer filtrée ou d'une

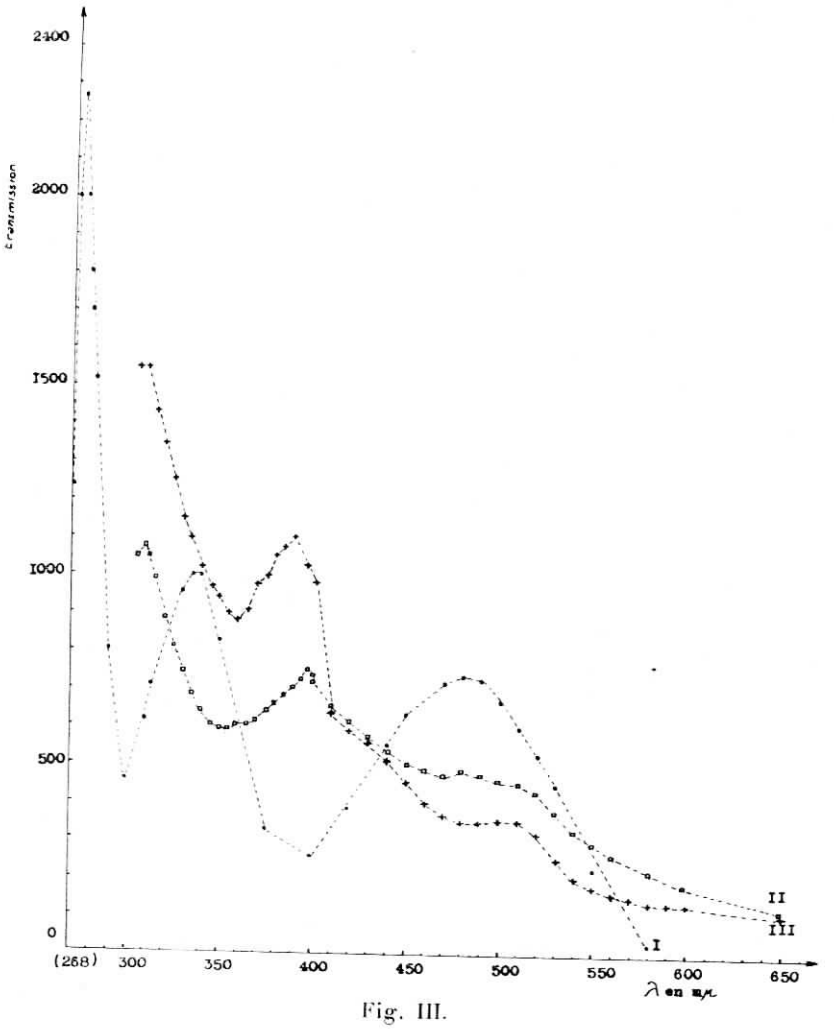


Fig. III.

solution isotonique de sels monovalents. La dernière eau de lavage est laissée en contact avec les ovules soumis à une légère agitation manuelle. On filtre sur papier ou on centrifuge. Le liquide privé d'ovules et provenant de *P. lividus* ou d'*A. lixula* est *incolore* ou dans certains cas légèrement rosé avec *A. lixula*. On vérifie l'activité gamonale en ajoutant, s'il y a lieu (solutions salines monovalentes), une petite quantité de Ca^{++} à la prise d'essai ; si l'épreuve est

positive on ajoute une partie de CCl_3CO_2H N/1 à ce liquide. On laisse en contact pendant 1 heure après quoi on centrifuge ou filtre sur papier et porte à dialyser contre de l'eau douce courante pendant 3 heures puis contre un liquide choisi (habituellement eau bidistillée ou eau de mer). Les propriétés biologiques et la teneur en azote total de ces préparations sont les mêmes que celles des préparations obtenues par extraction directe des ovules.

II. — Essais de purification et caractères chimiques.

L'acide trichloracétique fait perdre une partie de sa solubilité à la fertilisine, phénomène se traduisant par l'apparition d'une opalescence dans les solutions limpides ; à la température du laboratoire un contact prolongé (> 6 heures) de la fertilisine avec CCl_3CO_2H N/2 la dénature. Après dialyse contre de l'eau bidistillée la fertilisine d'extraction trichloracétique précipite quantitativement avec $(NH_4)2SO_4$ à saturation. Le floculat blanc obtenu se redissout dans l'eau bidistillée ou l'eau de mer où il est biologiquement actif du point de vue agglutinant tout au moins. La précipitation par 4-5 volumes d'éthanol absolu ou d'acétone dénature au contraire la fertilisine et d'autant plus rapidement que la température est plus élevée. Tous mes efforts pour cristalliser la fertilisine ont échoué et particulièrement ceux qui ont porté sur des eaux ovulaires fractionnées au sulfate d'ammonium sans traitement trichloracétique préalable.

La fertilisine étant une entité biologique, il est clair que toute tentative de purification est contingentée par la conservation des propriétés spécifiques. Or du point de vue chimique, malgré les grands progrès qui ont été faits dans la connaissance de la fertilisine, on ne peut encore se fonder sur ces connaissances pour trancher de la pureté. Ainsi en ce qui concerne certains critères physico-chimiques, Tyler (630), qui a été le seul à faire une étude électrophorétique sur des préparations de fertilisine purifiée, a trouvé qu'après extraction acétique le produit est homogène. On peut donc supposer que la fraction glycoprotéique est unique, ce qui est un point important, mais l'électrophorèse ne renseigne pas sur la présence d'une ou de plusieurs micro-molécules accolées au glycoprotéide, micro-molécules qui peuvent rendre compte de la propriété dynamogène de la fertilisine. Il reste donc que la fertilisine ne peut encore se définir que par son action biologique. C'est en partie l'objet de mon présent travail de trouver des *unités* permettant de situer biochimiquement cette entité biologique qu'est la fertilisine. Ce que l'on peut dire sur la pureté c'est que *la préparation la plus pure sera celle qui aura conservé toutes ses propriétés biologiques et pour laquelle tout nouvel essai de purification serait dénaturant.* C'est en somme une définition de la pureté *par défaut* qui peut être guidée par exemple par la teneur en azote total (ainsi pour *P. lividus*, de l'eau de mer ovulaire renfermait 10,27 o/o d'azote Kjeldahl, la fertilisine correspondante 4,8 o/o). Malheureusement même en se limitant à cette définition de la pureté, nous nous heurtons à notre ignorance de mesurer objectivement l'activité flagellaire spermatique. De plus si l'on considère que l'activité typique de la fertilisine ne peut s'exercer que lorsque les conditions de milieu sont favora-

bles *aux spermatozoïdes*, on conçoit que l'état des spermatozoïdes autant que l'état du milieu conditionnent toute définition biochimique de la fertilisine. C'est dire que ce n'est que lorsqu'on aura défini les conditions d'action de la fertilisine qu'on pourrait être à même de la définir dans sa « pureté ». En attendant d'examiner ces conditions d'action, je voudrais apporter ici quelques indications sur la chimie de mes préparations de fertilisine de *P. lividus* et d'*A. lixula*, indications qui sont l'expression de tentatives d'aller au delà de la *pureté* résultant de l'extraction trichloracétique.

A) *Thermostabilité.*

a) La fertilisine de *P. lividus* résiste à 50 minutes d'ébullition en milieu salin et légèrement alcalin (eau de mer) ou eau bidistillée. Celle d'*A. lixula* paraît plus thermolabile mais elle résiste encore bien à 30 minutes d'ébullition en eau de mer ou en eau bidistillée.

On peut illustrer ce qui vient d'être dit sur les conditions d'action de la fertilisine en relation avec sa nature chimique en considérant la thermostabilité :

1° une ébullition prolongée de la fertilisine en eau de mer amène une concentration des sels à laquelle les spermatozoïdes d'Oursins sont très sensibles et il faut évidemment prendre garde de ramener la solution bouillie à son volume initial *avec de l'eau privée de sels ;*

2° l'ébullition chasse les gaz, dont l'oxygène, et les spermatozoïdes d'Oursins ne sont pas mobiles dans les conditions courantes en absence d'oxygène.

Il faudrait donc se garder de conclure à l'inactivation thermique d'une substance comme la fertilisine sans s'être assuré auparavant que les conditions normales d'action sont conservées ; cette remarque est peut-être valable pour l'expérience de Tyler portant sur l'obtention de fertilisine « univalente » par chauffage.

b) Une hydrolyse de 1 heure par HCl 6 N clive la fertilisine en une fraction insoluble et en une fraction surnageante riche en sucres. Ces deux fractions sont biologiquement inactives.

c) Par hydrolyse acide plus poussée (70 heures dans HCl N/1) on sépare des acides aminés. Des chromatogrammes à deux dimensions ont été réalisés en utilisant dans une direction le butanol normal acétique et dans l'autre le phénol ; ces chromatogrammes ont été faits à partir de préparations de fertilisine de *P. lividus* que j'ai obtenues selon la variante suivante :

Des ovules obtenus par ponte KCl sont lavés par décantation avec une solution de NaCl isotonique ; après 4 lavages, la dernière eau est conservée 15 minutes en contact avec les ovules que l'on élimine alors par centrifugation. On porte à l'ébullition pendant 15 minutes le surnageant de centrifugation, on laisse refroidir jusqu'à la température de la pièce et on filtre sur papier. Le filtrat est précipité par 5 volumes d'éthanol à 95° (durée de la précipitation : 30 minutes à 4° C), on centrifuge, reprend le précipité par CCl_3CO_2H N/1 pendant 2 heures à la température du laboratoire. Puis on dialyse pendant 16 heures contre de l'eau douce courante puis pendant 5 heures à 5° C contre de l'eau distillée Pyrex. On vérifie que cette solution est très active du point de vue gamonal après en avoir amené une fraction à un

pH et une salinité convenables. Cette fertilisine en eau distillée est précipitée par 5 volumes d'éthanol à 95° et à 4° C, puis séchée à l'éther après centrifugation. 2 milligrammes de matériel sec livrent par hydrolyse chlorhydrique poussée environ 200 µg. d'azote α-aminé. Les acides aminés suivants ont pu être décelés :

acide aspartique,	thréonine,
acide glutamique,	tyrosine,
sérine,	alanine,
cystine,	méthionine et/ou valine,
lysine,	proline,
histidine,	leucine,
glycocolle,	isoleucine,
arginine,	phénylalanine.

(Dans les chromatographies de fertilisine de *S. purpuratus* publiées par Tyler (630), on peut relever la présence de l'acide α-amino-adipique et du tryptophane).

B) *Photostabilité.*

J'ai vérifié la photo-dénaturation de la fertilisine (perte du pouvoir agglutinant) en travaillant avec celle d'*A. lixula*. Voici les conditions d'une expérience type :

Lampe Gallois 660 watts, type KLW, 110 volts ;

Distance lame-surface liquide à irradier = 31 centimètres ;

Eau de mer ovulaire préparée par lavages par décantation d'ovules obtenus par voie chimique (solution incolore, limpide, biologiquement active). Placée en boîtes de Pétri (Pyrex) de 91 millimètres de diamètre ; épaisseur de la couche liquide : 12 millimètres = 25° C au temps zéro ;

Ventilation latérale pour refroidissement (ventilateur placé à 35 centimètres du bord des boîtes de Pétri) ;

Durée d'irradiation : 2 heures (θ finale = 32° C).

C) *La nature de l'agent activateur du mouvement flagellaire.*

On sait qu'il n'y a rien de concluant à ce sujet. Que la substance soit distincte de la glycoprotéine agglutinante n'a pas même été suffisamment démontré. J'ai examiné expérimentalement la question de la substance volatile et celle de l'échinochrome. Disons tout de suite que ni la fertilisine de *P. lividus* ni celle d'*A. lixula* ne renferment de phosphore et il ne semble pas que des substances phosphorylées énergétiquement riches puissent en conséquence être mises en cause.

1. *Substance volatile.* — Clowes et Bachman (102) ont pensé qu'il pouvait s'agir d'un alcool supérieur mais il subsiste un doute sur le mode de préparation de l'eau de mer : obtention à partir d'ovules ovariens ? Contamination par une substance de la cavité générale ? Sur ce dernier point je

rappellerai que dans mes premières préparations de fertilisine de *P. lividus* j'ai pu déceler une *base volatile* (538) ce qui paraît en bon accord avec KUHN et WALLENFELS (329) sur l'existence d'une substance basique dans les hydrolysats de leurs préparations de gynogamones d'*A. lixula*. Mais :

1° dans des préparations de fertilisine de *P. lividus* ou d'*A. lixula* obtenues à partir d'ovules pondus sous l'influence de KCl, je n'ai pu déceler de base volatile, par contre ;

2° la distillation du liquide de la cavité générale de *P. lividus* particulièrement livre souvent une substance basique (la présence de cette substance expliquerait peut-être les résultats de BIELIG et DOHRN (35) sur les rapports liquide cavitaire-fécondations) ;

3° mes préparations les plus purifiées de fertilisine de *P. lividus* et d'*A. lixula* sont ninhydrine-négatives, or NEUBERG (*Biochem. Ztschr.*, 1913, **56**, 500) et HARDING et MCLEAN (*J. Biol. Chem.*, 1916, **25**, 387) ont montré que les amines donnaient une réaction positive, quoique faible, avec ce réactif.

Par contre je peux confirmer avec *P. lividus* et *A. lixula*, l'ancienne observation de SCHÜCKING (561) de l'existence d'une substance aromatique *acide* dans les distillats d'eaux de mer ovulaires (Ex. : # 0,4 cm³ NaOH N/100 avec 15 cm³ d'eau de mer ovulaire d'*A. lixula* renfermant environ 13,2 γN♀ total/cm³).

En conclusion, l'existence d'un composé volatil dynamogène paraît assurée dans l'eau de mer ovulaire. Sa présence est encore incertaine dans la fertilisation purifiée.

2. *Echinochrome.* — En reprenant sur le même matériel les travaux de HARTMANN, KUHN et al. j'ai montré (704) qu'on pouvait éliminer l'échinochrome A de la fraction glycoprotéique sans affecter les propriétés biologiques de la fertilisine d'*A. lixula* extraite par voie trichloracétique à partir des ovules. A la suite de mon travail, BIELIG et DOHRN travaillant sur le même matériel ont confirmé que l'échinochrome était sans action. Je ferai valoir dans le chapitre IV une expérience caractéristique renforçant encore cette conclusion mais il convient d'examiner ici les arguments qui ont été avancés par différents auteurs (voir contribution historique) pour expliquer l'erreur de HARTMANN :

1° L'échinochrome forme effectivement un complexe insoluble avec Ca^{++}, dans l'eau de mer le colorant est donc insoluble quoiqu'il n'y ait pas de substance totalement insoluble et notamment à des concentrations de l'ordre de 1/2.500.000.000 (HARTMANN) ;

a) d'une part, la quantité de Ca^{++} complexée est faible et en conséquence, la motilité des spermatozoïdes ne doit pas être trop réduite par cette déficience calcique ;

b) d'autre part, l'augmentation du pH considérée par CORNMAN (113) ne paraît pas pouvoir être raisonnablement prise en considération.

2° La fertilisine provenant d'ovules d'*A. lixula* par extraction trichloracétique renferme une importante quantité d'échinochrome (cf. fig. III) *sans qu'il y ait précipitation en présence d'eau de mer* et tous les auteurs qui

ont travaillé avec des *Arbacia* ont pu constater que l'eau de mer ovulaire est souvent et plus au moins normalement, teintée en rouge sans que le colorant précipite, si bien que, contrairement à ce que pensait GLASER (198), ce n'est pas l'échinochrome qui stabilise la fertilisine mais la fertilisine qui stabilise l'échinochrome. Il faut donc admettre que l'échinochrome est combiné à la glycoprotéine par ses fonctions qui sont susceptibles de se combiner à Ca^{++}.

En conclusion il me semble que l'erreur de HARTMANN doit être imputée surtout aux techniques déficientes d'estimation de la motilité spermatique, techniques qui pèsent sur l'ensemble du problème des gamones.

CHAPITRE III

L'AGGLUTINATION SPERMATIQUE

> Il faut presque constamment avertir que lorsque nous accordons un si grand rôle aux Formes, on doit se garder de détourner ce que nous disons en l'appliquant aux Formes, auxquelles se sont accoutumées jusqu'à présent les pensées des hommes.
>
> BACON,
> *Novum organum.*

I. — Remarques sur la structure des spermatozoïdes d'Oursins.

J'examinerai principalement la structure du spermatozoïde non pas en tant que forme statistiquement normale et décrite dans cet aspect mais : *a*) comme système vivant, modifiable, et *b*) en tant qu'élément d'une population, c'est-à-dire d'un groupe hétérogène d'individus.

C'est ainsi que dans une même préparation spermatique on peut avoir des spermatozoïdes dans un état de maturité plus ou moins avancé. Or POPA n'a-t-il pas pris pour des « équilibrateurs » flagellaires des reliquats cytoplasmiques de spermatides? L'examen de nombreuses préparations spermatiques d'*A. lixula* à différentes périodes de l'année me permet de le penser.

Par ailleurs le flagelle paraît appendu à la base de la tête, ce qui est en accord avec les observations de PICTET. En effet avec des spermatozoïdes d'*A. lixula* obtenus par ponte chimique et dilués dans de l'eau de mer, j'ai pu voir nettement, après 20 heures de vieillissement entre lame et lamelle à 18° C, que les spermatozoïdes sont gonflés et montrent l'attache sous-nucléaire du flagelle avec le centriole postérieur (proximal?) comme l'indique le schéma ci-contre. Le tout apparaît avec un beau relief, sans coloration. Tous les spermatozoïdes ne sont pas dans le même état; il y a des zones à spermatozoïdes seulement gonflés (têtes arrondies et boules sur le flagelle), d'autres, à spermatozoïdes éclatés (flagelles libres), d'autres enfin renferment des spermatozoïdes intacts si bien que des expériences de ce type faites avec de la fertilisine en eau de mer à la place d'eau de mer ovulaire ne sont pas concluantes, il semble toutefois que le pourcentage des spermatozoïdes intacts soit alors plus élevé. Quant aux spermatozoïdes provenant de sperme non dilué dans de l'eau de mer (« dry sperm »), ils ne gonflent pas par vieillissement entre

lame et lamelle ce qui laisse supposer que ce n'est pas l'anaérobiose mais l'augmentation de la concentration ionique par dessiccation qui est responsable du gonflement. J'ai pu encore me confirmer dans cette opinion en procédant de la façon suivante :

3 cm³ d'une suspension de spermatozoïdes d'*A. lixula* dilués dans de l'eau de mer filtrée $\Delta_{\lambda}\ ^{1/50}_{600}$ (B.-M.) = 28 sont placés pendant 15 heures dans une des branches d'un tube Thunberg (forme en H) dans lequel on fait le vide avec une trompe à eau (jusqu'à début d'apparition de bulles à la surface de la masse liquide). Dans l'autre branche du tube en H on avait placé 5 cm³ d'hydrosulfite alcalin (à 10 o/o, pH # 10). Après ces 15 heures les spermatozoïdes sont peu ou pas gonflés, immobiles et non mobilisables par dilution dans de l'eau de mer fraîche (ceci constituant une observation annexe trouvant sa place dans le chapitre V). Des spermatozoïdes de la même suspension placés entre lame et lamelle de microscope pendant ces 15 heures sont gonflés, certains sont éclatés (θ = 24° C).

Avec des spermatozoïdes en eau de mer de *P. lividus*, par coloration au vert Janus à 0,1 o/o (en eau de mer), on peut suivre encore plus facilement les modifications, et on trouve après 6 heures à 18° C entre lame et lamelle, que presque toutes les têtes spermatiques sont sphériques, la pièce intermédiaire étant colorée en vert-bleu.

Une des transformations les plus intéressantes est sans doute celle qui porte sur la production du « corps latéral », lipidique selon Popa (470). J'ai pu vérifier *sur le vivant* l'existence de telles formations et il est très facile de suivre l'évolution de ce corps latéral en examinant une goutte de sperme à l'immersion. On peut constater que jusqu'à 6 o/o de spermatozoïdes — qu'ils soient de ponte ou testiculaires — montrent des formations dont les schémas groupés dans la figure IV représentent l'aspect (♂ dessinés sur le vivant).

Ces formations se déplacent vers l'apex céphalique sans toutefois l'atteindre et sans affecter sensiblement, semble-t-il, la motilité (en grandeur) des

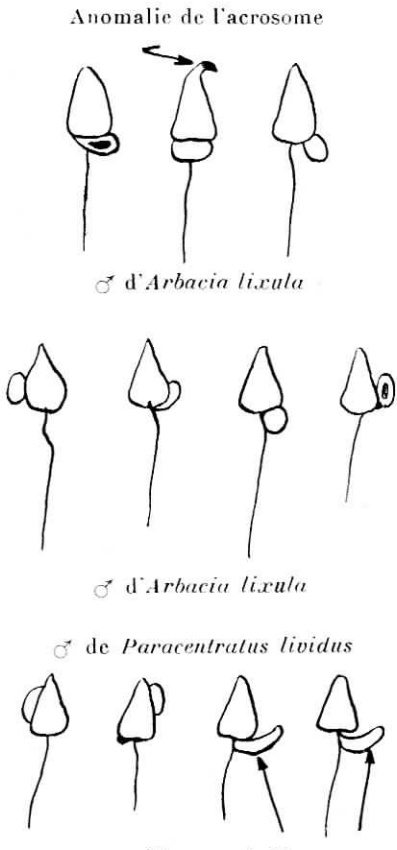
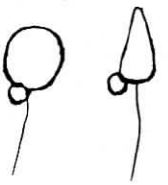


Fig. IV.

spermatozoïdes par comparaison avec les spermatozoïdes qui ne présentent pas de telles modifications.

L'observation est facilitée par le fait que les spermatozoïdes ont une attirance thigmotactique pour le verre et, une fois collés par la région acrosomiale, ils se laissent aisément observer. D'ailleurs sur des suspensions spermatiques non diluées, à spermatozoïdes immobiles donc, on peut également observer de ces corps latéraux après étalement sur lame en opérant comme pour un frottis de sang. Je ne peux donc confirmer sur ce point Popa pour qui ces formations n'apparaissent qu'en présence d'eau de mer ovulaire. Ces corps latéraux existent en plus grand nombre chez les spermatozoïdes soumis à l'action de la fertilisine (10-14 o/o des spermatozoïdes peuvent en montrer), il est possible également qu'ils soient plus faciles à discerner car en présence de fertilisine le thigmotactisme des spermatozoïdes est accentué, mais je le répète, il peuvent être vus dans de l'eau de mer ordinaire. Il paraît probable que l'agitation mécanique intense à laquelle sont soumis les spermatozoïdes au moment de leur dilution dans l'eau de mer, agitation accrue encore par la fertilisine, est responsable en totalité ou en partie de ces modifications morphologiques.

Sur un autre point je ne peux partager l'opinion de Popa. En effet Popa a avancé que les spermatozoïdes qui ont éliminé leur corps latéral ne gonflent pas (entre lame et lamelle ?). Or, j'ai pu trouver côte à côte des spermatozoïdes de la forme ci-contre après 5 heures de vieillissement entre lame et lamelle à 20° C.



Ces structures latérales se colorent comme la pièce intermédiaire par le vert de méthyle acétique (tête en vert, pièce intermédiaire en violet). Ce mélange colorant a tendance à altérer la morphologie du spermatozoïde et les observations doivent être conduites le plus rapidement possible.

N. B. — Lorsqu'on examine les planches de Retzius (483) on constate que chez l'Actinie *Tealia felina* le spermatozoïde présente normalement une pièce « intermédiaire » latérale ; chez le Tunicier *Oikopleura* la pièce intermédiaire spermatique est légèrement déportée sur le côté. Chez de nombreux spermatozoïdes, comme ceux de certains Poissons, bien décrits par Ballowitz (18) (20) la pièce intermédiaire est aussi plus ou moins latérale. Je pense que la situation variable de cet organite soulève de nombreux problèmes particulièrement relatifs à la motricité spermatique et qu'il serait utile d'examiner attentivement.

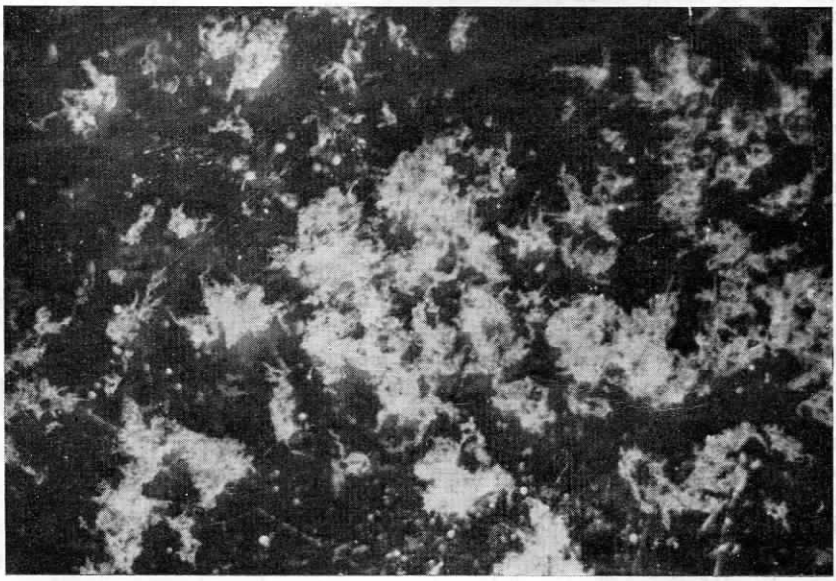
II. — Agglutinations irréversibles.

L'agglutination des spermatozoïdes, on le voit au cours de la partie historique (695), peut être le résultat d'actions diverses. J'ajouterai ici un certain nombre de faits à ce sujet :

C'est ainsi que les spermatozoïdes de *P. lividus* sont agglutinés irréversiblement par la *streptomycine* $-SO_4^{--}$ qui agit en eau distillée à partir de 500 γ/cm^3 ; en présence d'eau de mer (sans doute par suite de la force ionique)

la streptomycine n'agglutine pas. Je rapprocherai cette agglutination de celle que j'ai découverte avec Macheboeuf et Gros (230) (231) avec la streptomycine et les bactéries « rough » ou les bactéries Gram + ; on doit évidemment se garder de conclure, en se fondant sur cette simple corrélation, que la surface limitante des spermatozoïdes d'Oursins peut s'identifier à celle des bactéries dont je viens de faire état.

De même que la streptomycine, la *ribonucléase* (de point isoélectrique = 8,0), que j'ai préparée sous forme cristallisée d'après la technique de



Cliché 1 (G # 10).

Kunitz (*in : Methode der Fermentforsch.* (1941), 2, 1940), la ribonucléase à la concentration de 1 milligramme/cm³ d'eau distillée agglutine irréversiblement les spermatozoïdes de *P. lividus*, elle est également sans action agglutinante en eau de mer.

En eau distillée les spermatozoïdes d'Oursins ne sont pas agglutinés, ils forment des suspensions homogènes. Il est évident que l'eau distillée est un milieu anormal pour les spermatozoïdes d'Oursins, et on peut soupçonner, étant donnée la solubilité bien connue de l'acide désoxyribonucléique (minimum à 0,14 M NaCl) que le noyau spermatique se gonfle rapidement en libérant des composés nucléiques. Si bien qu'on ne saurait affirmer que seule la surface des spermatozoïdes soit en cause dans l'agglutination par la streptomycine ou la ribonucléase en eau distillée. Lillie aurait classé de telles actions dans la coagulation en masse. Toutefois il est certain que les spermatozoïdes peuvent présenter *en eau distillée* une dualité des charges électriques puisque j'ai pu obtenir l'*agglutination irréversible de spermatozoïdes frais*

de P. lividus *ou d'*A. lixula *par la fertilisine placée, par dialyse, en eau bidistillée* (cliché I).

Mais alors que les agglutinats streptomycine-spermatozoïdes peuvent être dissociés par augmentation de la force ionique (eau de mer), les agglutinats fertilisine (eau distillée)-spermatozoïdes ne paraissent pratiquement pas se dissocier en présence d'eau de mer.

Cette agglutination irréversible des spermatozoïdes par la fertilisine démontre qu'entre spermatozoïdes et fertilisine existent manifestement des *affinités chimiques* réelles et qu'en conséquence, l'hypothèse de Loeb selon laquelle, on s'en souvient (371), la formation des « clusters » serait le résultat d'un tactisme négatif des spermatozoïdes, ne rencontre pas l'appui de l'expérience. Il paraît maintenant incontestable que la formation des « clusters » est la conséquence d'une combinaison chimique et non d'une réaction biologique d'un tactisme.

J'ai de plus constaté qu'il était possible de *fixer* les « clusters » par l'eau distillée (certaines eaux douces conviennent aussi). Pour obtenir ce résultat voici comment j'opère :

Placer dans un verre de montre de l'eau de mer ovulaire ou de la fertilisine (d'extraction trichloracétique) en eau de mer. Ajouter les spermatozoïdes (dilués ou non), homogénéiser. Lorsque les agglutinats à spermatozoïdes très mobiles sont formés, à n'importe quel moment choisi par l'opérateur, on peut les fixer dans leur état macroscopique et immobiliser les spermatozoïdes en ajoutant environ 5 volumes d'eau distillée à la suspension spermatique.

La formation des essaims spermatiques s'avère donc comme une véritable agglutination dont les modalités particulières sont spécifiques de la nature même des cellules spermatiques. Le Tableau II indique les résultats que m'ont donnés des essais d'hétéro-agglutination spermatiques avec deux fertilisines spécifiquement différentes. La confrontation de ces résultats avec ceux qui concernent les mêmes combinaisons *mais faites en eau de mer* telles qu'elles seront rapportées dans le chapitre VII, montre que les réactions en eau distillée ne doivent pas être interprétées comme *forçant* la spécificité mais comme révélant des affinités.

Cette action de la fertilisine en eau distillée est importante à considérer d'un autre point de vue car on peut être appelé à examiner le rôle des ions sur l'activité des gynogamones. Ainsi, on sait qu'en solution isotonique de NaCl la fertilisine n'a pas d'action typique sur les spermatozoïdes, la présence de $CaCl_2$ lève cette inhibition : les spermatozoïdes sont agglutinés et activés. A cet égard on ne doit pas oublier (cf. historique (695)) que Ca^{++} possède une action activatrice et, comme j'ai pu particulièrement le constater, une action agglutinante propre : une solution à 1 o/o de $CaCl_2$ *en eau distillée* agglutine irréversiblement les spermatozoïdes de *P. lividus* et d'*A. lixula;* le phénomène me paraît être sous la dépendance de la formation de sels calciques insolubles pouvant être par exemple un phosphatidate de calcium.

Remarque : On sait aussi qu'en eau de mer ordinaire les spermatozoïdes d'Echinides forment des plages surnageantes d'auto-agglutination ; ces formations irréversibles, qui ne doivent pas être confondues avec des agglutinats de fertilisine lorsqu'elles se produisent en sa présence, n'ont pas reçu d'attribution exacte (antifertilisine ? (277)), il est possible qu'elles soient l'expression

TABLEAU II

Lectures après (en minutes)	Systèmes			
	F *A. l.* ♂ *A. l.*	F *A. l.* ♂ *P. l.*	F *P. l.* ♂ *A. l.*	F *P. l.* ♂ *P. l.*
5	++±	+	?	++
10	+++	++	+±	++

Légende : F = fertilisine ; *A. l.* = *A. lixula* ; *P. l.* = *P. lividus* ; θ = 20° C ; F *A. l.* # F *P. l.* # 0,021 mg. N total/cm³ (F *A. l.* décolorée) ; ♂ *A. l.* # ♂ *P. l.* # $\Delta\lambda_{470}^{1/50} = 400$ (Klett).

d'actions ioniques agissant sur des spermatozoïdes immatures ou surmatures. Le fait qu'elles soient étalées à la surface de l'eau semble indiquer que la tensio-activité n'est pas étrangère au phénomène, auquel cas les lipides spermatiques pourraient être en jeu. Ces amas peuvent constituer une cause d'erreur dans la technique de TYLER, et surtout de METZ, pour définir l'unité d'agglutination de la fertilisine.

Nous venons de voir une agglutination spermatique irréversible avec la fertilisine lorsque les conditions du milieu d'action sont anormales. Nous pouvons chercher à voir maintenant ce qu'il advient lorsque les conditions ioniques sont favorables mais lorsque les spermatozoïdes, cette fois, se trouvent dans des conditions pathologiques. J'ai trouvé qu'après au moins deux lavages par *centrifugation* (à 5.000 tours/minute pendant 10 minutes) les spermatozoïdes d'*A. lixula*, très endommagés, s'agglutinent *irréversiblement* en présence d'eau de mer ovulaire ou de fertilisine purifiée et placée en eau de mer. Ainsi, même dans les espèces où elle donne normalement des agglutinats spermatiques spontanément réversibles, la fertilisine n'agglutine pas toujours de cette façon qui a paru si originale, c'est-à-dire d'une façon spontanément réversible.

Une action également très particulière sur l'agglutination est celle du *froid*. C'est ainsi que j'ai constaté les faits suivants : soit d'une part de l'eau de mer ovulaire d'*A. lixula* refroidie jusqu'à 2° C et, d'autre part, une suspension concentrée et fraîchement pondue de spermatozoïdes d'*A. lixula*. Je refroidis la petite boîte de Pétri à réaction à 2° C puis j'y effectue le mélange sperme-eau de mer ovulaire, le fond de la boîte se trouvant dans un bain de glace fondante. Dans ces conditions le phénomène d'agglutination a encore lieu, mais au lieu de donner des essaims spermatiques ronds ou allongés mais arrondis, on obtient un véritable *réseau de filaments spermatiques*, un enchevêtrement du type collagène, massif, allongé. Conservé au froid ce système se désagglutine très mal.

Pour terminer cette rubrique, j'examinerai maintenant ce qui constitue non pas à proprement parler une agglutination mais une fixation spermatique, je veux dire le thigmotactisme des spermatozoïdes qu'il est peut-être préférable de nommer thigmoréaction, ce qui ne préjuge pas de son essence.

J'ai déjà publié le phénomène caractérisé par la fixation de spermatozoïdes autour de fragments de gangues ou autour d'ovules pourvues de gangues après que les spermatozoïdes ont été soumis à l'action de la fertilisine (539). Il semble y avoir deux explications possibles à ce phénomène :

1) tous les spermatozoïdes d'une même suspension ne sont pas agglutinés par la fertilisine en eau de mer ; on peut admettre que ce sont les spermatozoïdes non agglutinés qui se fixent sur les gangues et ce serait donc eux qui auraient les seules chances de féconder dans les conditions normales de la fécondation ; ceci est en bon accord avec ce fait que les spermatozoïdes désagglutinés ont perdu leur pouvoir fécondant (LILLIE) ;

2) les spermatozoïdes désagglutinés, dépourvus de la faculté de se réagglutiner auraient leurs affinités de « collage » non saturées. Pour cela on peut considérer :

1° que la gangue n'est pas constituée seulement par de la fertilisine et que la fertilisine y est seulement incluse ;

2° que la forte concentration du milieu gangue fait que la gélification favorise les réactions de simple collage (thigmoréaction).

Les caractéristiques des « solutions de gangues muqueuses » de VASSEUR et de mes préparations de fertilisine ne diffèrent pas assez sensiblement les unes des autres pour qu'il y ait des raisons valables de retenir l'hypothèse d'une dualité chimique. Il semble donc que ce soit une différence *physique* qui conditionne le comportement des spermatozoïdes vis-à-vis de la fertilisine, en solution ou sous forme de gel.

L'expérience suivante indique l'allure du phénomène de fixation après désagglutination :

On place des spermatozoïdes frais de *P. lividus* dans une solution de fertilisine ou dans de l'eau de mer ovulaire filtrée, soit S_1 ;

On a d'autre part préparé par centrifugation, précédée d'une légère agitation, une eau de mer ovulaire chargée de débris invisibles de gangues. On s'assure de leur présence en plaçant dans une fraction de cette préparation des spermatozoïdes frais qui s'accolent aux gangues et révèlent ainsi leur présence. De cette préparation on fait deux parts :

— l'une est conservée telle quelle, soit (*a*) ;

— l'autre est portée à l'ébullition pendant 6 minutes et filtrée pour éliminer le coagulum vraisemblablement constitué par les débris de gangues, soit (*b*).

On dilue (*a*) et (*b*) de moitié de façon à réoxygéner (*b*) et pour que les volumes soient égaux par ailleurs.

Lorsque les spermatozoïdes de S_1 sont totalement désagglutinés on en porte une fraction en présence de (*a*) et une autre en présence de (*b*). On constate que :

— en (*a*) il se produit une fixation spermatique importante et cette accumulation peut être nommée à la rigueur réagglutination. C'est la thigmoréaction. Aucune agglutination inter-spermatique de type fertilisine ne se produit en dehors des éléments figurés ovulaires ;

— en (*b*) la suspension spermatique, à spermatozoïdes mobiles, reste homogène.

Cependant que des contrôles en (*a*) et (*b*) faits avec des spermatozoïdes frais montrent, par la présence d'agglutinats typiques, que la fertilisine est présente tant en (*a*) qu'en (*b*); après désagglutination en (*a*) des spermatozoïdes restent fixés aux fragments de gangues.

III. — Désagglutination spontanée.

Le phénomène si particulier de la désagglutination spontanée peut rencontrer bien des explications. J'envisagerai ici les trois possibilités : physico-chimique, enzymatique et morphologique.

a) *Eventualité d'un processus physico-chimique.* — On doit considérer que la liaison fertilisine-spermatozoïdes est conditionnée par le milieu, j'en ai donné plusieurs exemples, ici et là (538). On a ainsi une chaîne schématique telle que :

désagglutination spontanée implique agglutination à spermatozoïdes mobiles impliquant à son tour les conditions de la motilité.

On ne saurait trop insister sur ce fait que l'action typique de la fertilisine est conditionnée par la motilité spermatique, sur ce que *les spermatozoïdes ne peuvent se désagglutiner que s'ils sont mobiles.* Nous aurons l'occasion d'aborder le problème de la proposition inverse mais nous pouvons remarquer dès à présent que cette condition de motilité éloigne ce phénomène de celui de la désagglutination virus grippal-hématies duquel, à diverses reprises (67) (68) (651) on a cherché à le rapprocher. C'est donc dans le métabolisme spermatique que l'on devrait rechercher la cause de la désagglutination. Supposons en conséquence que la contraction du flagelle spermatique soit liée principalement à l'activité du système acide adénosinetriphosphorique (ATP) -adénosinetriphosphatase (ATPase) comme il en est dans la contraction musculaire, du phosphate inorganique pourra être libéré qui tendra à inhiber l'ATPase. J'ai en effet pu constater que KH_2PO_4 à 100 γ P/cm^3 d'eau de mer, non seulement immobilise rapidement des spermatozoïdes mobiles, mais encore :

1° dès 50 γ P/cm^3 *augmente le temps de latence d'agglutination;* exemple :

a) 0,5 cm^3 eau de mer ovulaire de *P. lividus* + 0,4 cm^3 eau de mer normale + 0,1 cm^3 sperme testiculaire non dilué → agglutination typique 5 secondes après la fin de l'homogénéisation,

b) 0,5 cm^3 de la même eau de mer ovulaire + 0,4 cm^3 eau de mer phosphatée par 100 γ P/cm^3 de H_2KPO_4 + 0,1 cm^3 même sperme → agglutination après 89 secondes ;

2° *augmente la vitesse de désagglutination des spermatozoïdes formés en essaims ;* exemple :

Soit un système 2 cm^3 eau de mer ovulaire + 0,05 cm^3 (1 goutte) de sperme testiculaire concentré de *P. lividus.* Dès que l'agglutination a commencé on prélève simultanément 2 fois 0,5 cm^3 de la suspension spermatique et on place :

0,5 cm^3 en présence de 0,5 cm^3 d'eau de mer ordinaire,

0,5 cm³ en présence de 0,5 cm³ d'eau de mer phosphatée à 100 γ P/cm³.

On agite légèrement les verres de montre : la suspension agglutinée placée en présence de l'eau de mer phosphatée *se désagglutine immédiatement* (les spermatozoïdes restent mobiles), tandis que le témoin transvasé se désagglutine après 100 secondes et que le témoin non transvasé se désagglutine après 75 secondes. Il est possible que le phosphate agisse par abaissement du pH.

Avec une eau de mer ovulaire plus concentrée la désagglutination peut ne pas être immédiate en présence d'une même concentration de phosphate mais elle est toujours plus rapide que celle des témoins (par exemple : après 1 minute tandis que dans le témoin non transvasé elle se faisait après 3 minutes, avec le témoin transvasé elle se faisait après 4 mn. 30 sec.). Je n'ai pas trouvé l'explication des différences présentées par les témoins comme conséquence du transvasement par pipetage effectué exceptionnellement avec des pipettes rapides (distribuant 1 cm³/3 secondes).

Un fait intéressant est que les spermatozoïdes restent mobiles après désagglutination, mais leur motilité paraît plus faible. Dans le cas de l'eau de mer phosphatée il est plausible que le phosphate agisse sur la motilité spermatique en se combinant à Ca^{++}, cofacteur de la motilité (371) (538). Mais *je n'ai pu déceler de quantités significatives de phosphate libre dans une suspension désagglutinée de spermatozoïdes frais débarrassée de ses cellules par centrifugation.* Si la motricité est réellement sous la dépendance du système ATP-ATPase, il est possible que le phosphate libéré et qu'on ne retrouve pas dans le milieu soit recombiné par les spermatozoïdes selon un mécanisme enzymatique proche, par exemple, de celui étudié par Velick (657). Enfin le phosphore peut être libéré sous forme organique. Quoi qu'il en soit dans l'état actuel de nos connaissances on ne peut concevoir que la désagglutination soit la conséquence de l'activité ATPasique.

b) *Eventualité d'un processus enzymatique direct.* — Dans ce cas le processus enzymatique peut avoir 3 origines :

1) la fertilisine serait elle-même un enzyme qui agirait au niveau de structures spermatiques pour les détruire après s'y être combinée ; ce serait une généralisation des faits avancés par Glaser et Woodward ;

2) le spermatozoïde détruit la molécule de fertilisine ; c'est l'hypothèse de Tyler ;

3) le spermatozoïde se modifie par une action double, enzymatique et physico-chimique, une fois dilué dans l'eau de mer ordinaire ou ovulaire ; c'est la conception de Schucking-Popa que j'ai défendue (538).

J'ai examiné expérimentalement ces trois éventualités. Voyons la première que j'ai cherché à vérifier en fonction de l'activité lipolytique (Glaser) dans sa plus large acception :

1) *La fertilisine desmolase ?* Deux remarques sont à faire immédiatement :

a) des mesures seulement viscosimétriques d'une activité protéasique par exemple (387) ne sont pas univoques, une précipitation peut aussi amener une chute de la viscosité ;

b) l'extractibilité trichloracétique de la fertilisine ne peut laisser de doute quant à la conservation d'une quelconque activité enzymatique. On ne saurait toutefois se fier à un argument *a priori* en matière expérimentale et j'ai cherché à me rendre compte de la validité des expériences de Glaser.

1° *Activité lipasique.* — *En eau de mer*, la fertilisine de *P. lividus* d'extraction trichloracétique incubée pendant 1 heure à 37° C en présence d'huile d'olive ne libère pas d'acide par comparaison avec les témoins, ce que j'ai constaté par titrations avec NaOH alcoolique 0,2 N et de la thymolsulfone-phtaléine comme indicateur.

J'ai également utilisé la technique de Willstäter (cf. 587) : de la fertilisine d'extraction trichloracétique de *P. lividus* (en eau bidistillée) (1 cm^3 = 4,2 mg. poids sec) est diluée de moitié, soit F/2. A 10 cm^3 F/2 j'ajoute 2,5 cm^3 d'huile d'olive + 2 cm^3 de tampon ammonié (NH_4OH N/2) NH_4Cl N/2 → pH 8,9 à 30° C). J'ajoute $CaCl_2$ et de l'ovalbumine comme il est décrit dans la technique de Willstäter. Incubation : 1 heure à 32° C. Après quoi :

5 cm^3 F/2 + XII gouttes de thymolphtaléine → 2,6 cm^3 NaOH 0,2 N.

5 cm^3 témoin + XII gouttes de thymolphtaléine → 2,6 cm^3 NaOH 0,2 N.

Donc : aucune action décelable vis-à-vis de l'huile d'olive tout au moins.

2° *Activités lécithinasiques.* — J'ai alors recherché l'existence d'une éventuelle activité lécithinasique A de la fertilisine. J'ai procédé de 2 façons : 1) par action directe de la fertilisine de *P. lividus* sur des globules rouges de Bœuf lavés et suspendus dans de l'eau isotonique (7 grammes/litre) ; 2) par action indirecte sur les globules rouges de Bœuf d'un incubat fertilisine + jaune d'œuf de Poule fait à 40° C et aussi à 22° C. Je n'ai pu obtenir aucune action lytique et n'ai pu déceler aucune libération d'acide oléique.

L'activité lécithinasique B (lysolécithine → ester glycérophosphorique + acide stéarique) est également nulle.

3° *Activité estérasique.* — Quant à l'activité estérasique proprement dite, j'ai également cherché à la vérifier avec mes préparations, très actives du point de vue gamonal, de fertilisine d'extraction trichloracétique. J'ai pour cela mis en œuvre la technique de Knaffl-Lenz modifiée par Harrer et King (cf. 587). Le substrat était de l'éthyl-butyrate (2 cm^3) auquel j'ajoutais 0,25 cm^3 de bleu de bromothymol à 0,1 o/o d'eau bidistillée + eau bidistillée jusqu'à volume final de 5 cm^3 + 2 cm^3 de fertilisine d'extraction trichloracétique d'*A. lixula* en eau bidistillée (1 cm^3 = 12 milligrammes poids sec). Les différents témoins étaient constitués. La titration était faite avec NaOH 0,01 N après 30 minutes d'incubation à 21° C. Dans ces conditions je n'ai pu trouver aucune activité estérasique.

On ne peut retenir le travail de Glaser car il a assimilé l'activité de la « lipolysine » à l'activité de la fertilisine (fertilysine ?) alors qu'il a travaillé avec de l'eau de mer ovulaire qui constitue un milieu mal défini, d'autant plus mal que Glaser ne donne aucun détail technique de préparation de l'eau de mer ovulaire qu'il a utilisée (lyses ovulaires ?), comme il n'en donne pas plus pour ses dosages d'ailleurs.

Ma conclusion est que *la fertilisine ne possède aucune activité lipasique.*

J'ai toutefois recherché dans quelle mesure une modification de la surface, et principalement du revêtement, des spermatozoïdes pouvait interférer avec l'action de la fertilisine. On se souviendra à ce sujet des travaux de Popa (470) (472), de Marza (396) (397) et de ceux qui ont établi l'existence de *tégosomes*, Grassé et Tuzet (214) (215) (611) (612).

J'ai d'abord repris (cf. Just) l'examen de l'action du venin de Cobra sur les

spermatozoïdes. J'ai ainsi pu mettre en évidence que le venin de *Naja tripudians* (provenant de l'Institut Pasteur de Garches) *forme un précipité avec la fertilisine de P. lividus* lorsque l'un et l'autre de ces composés se trouvent en eau bidistillée. Cette propriété du venin de Cobra est peut-être due à la présence de ribonucléase. Quoi qu'il en soit si l'on place des spermatozoïdes frais de *P. lividus* dans de l'eau de mer renfermant 1 milligramme/cm³ de venin de *Naja tripudians* après 5 minutes de contact à 20° C, de la fertilisine ajoutée alors agglutine typiquement des spermatozoïdes. Si d'autre part on fait agir pendant 5 minutes sur la fertilisine le venin de *Naja* en eau de mer, celle-ci est encore capable de produire des essaims avec les spermatozoïdes spécifiques. Il ne semble donc pas qu'une légère transformation de la lécithine spermatique en lysolécithine inhibe l'activité de la fertilisine. J'ai alors étudié l'action d'une substance tensio-active, la sapamime M. S. :

1° à 0,1 o/o, cette substance (basique) agglutine irréversiblement en *eau de mer* les spermatozoïdes de *P. lividus*;

2° on fait une suspension en eau de mer de spermatozoïdes de *P. lividus* et de sapamime (0,01 o/o). Il se forme des agglutinats surnageants. Après 4-5 minutes, si on ajoute de la fertilisine, les spermatozoïdes qui sont mobiles, *ne s'agglutinent pas*; par contre, si on place alors dans cette suspension des spermatozoïdes frais ils s'agglutinent : il semble donc que l'action même peu prolongée d'un agent tensio-actif modifie les spermatozoïdes de telle sorte que la fertilisine ne peut agir sur eux ;

3° l'adjonction conjointe de sapamine à 0,01 o/o et de fertilisine à une suspension spermatique n'empêche pas l'action gynogamonale ;

4° après désagglutination de spermatozoïdes de *P. lividus* soumis à la fertilisine spécifique, l'adjonction de sapamime à 0,1 o/o en eau de mer les réagglutine irréversiblement. Donc l'action agglutinante de la sapamine ne peut se confondre avec celle de la fertilisine, ces substances doivent agir sur des points différents du spermatozoïde. La conception de Lœb selon laquelle ce serait une modification de la tensio-activité qui amènerait la formation des essaims spermatiques par la fertilisine, ne reçoit pas l'appui de ces expériences qui sont les seules à avoir été faites dans cet ordre d'idées :

2) *Destruction enzymatique de la fertilisine.* — Je n'insisterai pas sur l'hypothèse de Tyler que j'ai exposée (695) et dont j'ai montré que les bases étaient susceptibles de recevoir d'autres interprétations (cf. partie historique et *passim*); Tyler n'en a d'ailleurs pas donné d'autres arguments depuis. Je voudrais seulement faire remarquer que l'expérience viscosimétrique de Vasseur peut être également interprétée de toute autre façon qu'elle ne l'a été : (précipitation fertilisine-substrat spermatique, action tensio-active de l'alcool octylique) ainsi que Monroy et Tosi (430) d'une part et moi-même (543) d'autre part l'avons fait remarquer.

Il n'est pas impossible d'ailleurs que l'activité protéolytique des spermatozoïdes (287) (387) conduise *à la longue* à une destruction de la glycoprotéine gynogamonale, mais la démonstration directe n'en a pas été donnée. Enfin un certain nombre de faits maintenant bien établis conduisent à renforcer l'opinion selon laquelle la désagglutination est le résultat d'une modification des cellules spermatiques. Je passerai donc immédiatement à l'exposé de ces arguments.

3) *Modifications morphologiques des spermatozoïdes.* — Ces transformations structurales sont sans doute le résultat d'actions :

1) physico-chimiques où la force ionique doit particulièrement intervenir ;

2) enzymatiques, et en ce sens elles constituent une variante des éventualités d'ordre diastasique.

A mon sens, la glycoprotéine-fertilisine se fixe sur la surface du spermatozoïde et particulièrement sur une structure labile et c'est l'*ensemble* structure labile-fertilisine qui est détachée de chaque gamète mâle, assurant ainsi la désagglutination inter-spermatique.

Les faits sur lesquels on peut s'appuyer sont les suivants :

1° les résultats de Popa que j'ai confirmés ici même en ce qui concerne le « Nebenkern » ;

2° de la fertilisine fraîche ne réagglutine pas les spermatozoïdes d'une suspension fraîche spontanément désagglutinés (cf. historique, *passim*) (dans la conception de Tyler des fragments de fertilisine « univalente » bloquent à la surface du corps spermatique les places de fixation de la fertilisine « multivalente ») ;

3° si dans une suspension spermatique désagglutinée on ajoute des spermatozoïdes frais, ils se réagglutinent (538), avec une même préparation de fertilisine j'ai pu obtenir plusieurs réagglutinations successives. Rothschild examinant mon expérience (503) se demande si ce n'est pas un excès de fertilisine qui est responsable de ce phénomène. Cela ne fait pas de doute, il y a certainement un excès de fertilisine dans une expérience de ce type, sinon elle ne serait même pas possible, mais il est remarquable que dans une expérience d'agglutination, même simple, les spermatozoïdes d'une même suspension ne soient pas *tous* agglutinés par la fertilisine, même en présence d'un excès de cette substance ; le côté quantitatif du phénomène n'est donc pas seul en cause ;

4° enfin la preuve péremptoire d'une modification structurale des spermatozoïdes désagglutinés est donnée par le beau travail d'électromicrographie de J. C. Dan dont on trouvera la reproduction de clichés dans la partie historique de mon travail. J'attire également l'attention sur la présence d'une pièce intermédiaire déjetée sur le côté (cliché 4 reproduit et cliché 3 de la publication de J. C. Dan). Quant à la nature de la substance éliminée par l'acrosome on ne peut encore que la conjecturer. L'acrosome est une formation golgienne (52 à 56), à pouvoir sécréteur, je pense que ce doit être cette sécrétion qui se produit au cours de l'activation spermatique par la fertilisine.

IV. — Sur la définition d'une unité d'agglutination.

Le moment est maintenant venu d'envisager la définition d'une unité qui rendrait compte de la concentration d'une préparation de fertilisine, en fonction de son pouvoir agglutinant.

On sait qu'à la suite de Lillie et Just, Tyler pense pouvoir définir cette unité en se fondant sur la dilution extrême où une agglutination est encore visible. Cette définition appelle les plus expresses réserves :

1° Metz, on l'a vu (695), note la limite d'agglutination après examen au

microscope tandis que TYLER opère à l'œil nu. Mais que peut-on entendre par limite de formation des agglutinats? Si un agglutinat élémentaire est un ensemble de deux spermatozoïdes l'estimation est précaire ; elle l'est même si le nombre de spermatozoïdes excède 2 ; METZ s'en est bien rendu compte quand il nous informe que tout agglomérat spermatique peut laisser supposer qu'il est la conséquence d'une réaction avec la fertilisine. Dans un tel état de choses les plages d'auto-agglutination ne sont pas une moindre cause d'erreur ;

2° la pratique de cette unité n'est pas codifiée par ses utilisateurs : ni l'âge ni la concentration du sperme utilisé ne sont définis ;

3° la variabilité individuelle, saisonnière (maturité), géographique (salinité, température) des Oursins sont des facteurs aléatoires qui ne sont pas considérés par TYLER.

Ces contingences et ces indéterminations font qu'on ne saurait retenir cette unité dans des études conduites avec le minimum de rigueur. La détermination d'une unité réelle d'une substance quelconque se confond avec la détermination quantitative de son mode d'action, elle implique donc la connaissance de sa spécificité et une technique précise et reproductible. Dans le cas de la fertilisine nous avons cherché à aller le plus loin possible dans la voie d'une telle unité.

Une technique comme celle de KRAUSS (323) est déjà indépendante du temps et du lieu et elle est en ce sens recommandable. Mais le caractère intemporel d'un étalon n'est pas suffisant lorsqu'on cherche à rendre compte au mieux de l'action biologique à doser. Or si l'on examine l'ensemble des faits historiques et des faits nouveaux que j'ai exposés jusqu'à présent, on remarquera particulièrement que :

1° l'androgamone II qui est assimilée à une protéine basique, *non spécifique d'espèce* (245) (354), inhibe l'action de la fertilisine ; on peut donc considérer que l'androgamone II est la substance spermatique qui se combine normalement *in situ* avec la fertilisine selon une liaison hétéropolaire ;

2° la spécificité de l'agglutination spermatique par la fertilisine, qui n'est pas stricte dans le cadre de *P. lividus* et d'*A. lixula* en eau de mer, comme nous le verrons dans le détail au chapitre VII, peut être encore affaiblie si on opère comme je l'ai fait en eau distillée où le spermatozoïde se comporte comme un objet chimique.

En conséquence il paraît convenable de mettre à profit la combinaison fertilisine-androgamone II pour déterminer la concentration caractéristique de la fertilisine. C'est à quoi je me suis arrêté ; je donnerai ici la technique que j'ai élaborée et qui permet de définir si ce n'est une unité de fertilisine, du moins un repère de concentration.

Remarques. — 1) La non-spécificité de la combinaison fait qu'au lieu d'utiliser une solution de concentration connue de protéines basiques de provenance spécifique (spermatozoïdes de la même espèce que la fertilisine à titrer), on peut constituer un standard à l'aide de toute protéine basique (thymohistone de Veau, clupéine, salmine...). Ceci ne met pas en cause le phénomène de la spécificité biologique, d'ailleurs approchée, tel qu'il se manifeste avec la fertilisine et des cellules spermatiques *entières*, car cette spécificité paraît être le résultat de relations *stériques*, de caractère vraisemblablement physico-

chimique, constituant un exemple d' « écologie moléculaire » (au sens de l'embryologiste G. Weiss) : celle de la structure du revêtement spermatique et sans doute plus exactement celle de la région labile de combinaison.

2) L'unité telle que je vais en aborder la définition n'est qu'une *unité de concentration* et non une *unité de fonction*. Autrement dit toute molécule à point isoélectrique acide pourrait former un complexe insoluble avec des protéines basiques, comme il en irait avec une solution de *fertilisine dénaturée*, inactive sur les spermatozoïdes vivants. C'est pourquoi il est nécessaire de compléter le titrage, en contrôlant l'efficacité de la fertilisine à doser préalablement à toute titration F-A II. Pour cela on opère avec des spermatozoïdes spécifiques comme je l'ai indiqué dans le Chapitre premier (agglutinations) et en caractérisant cette suspension spermatique comme je le propose dans les chapitres suivants.

3) La combinaison utilisée peut être faite en eau de mer, mais il est préférable, pour accroître la sensibilité du dosage chimique d'opérer en eau bidistillée (cf. fig. V). De plus pour les mêmes raisons de sensibilité, pour l'eau de mer ovulaire (comme cela se rencontre constamment dans la routine d'une étude du pouvoir fécondant, ainsi que je le montrerai), je conseille de ne pas opérer directement sur elle mais après purification et abaissement de la solubilité ; à cet effet on procédera à l'aide d'acide trichloracétique comme cela est indiqué p. 24.

Méthodes. — On prépare extemporanément une solution de protéine basique, si on a à sa disposition quelque préparation commerciale pulvérulente. On détermine sa concentration en dosant l'azote Kjeldahl. Sinon on prépare des protéines basiques spermatiques d'après la technique de Hultin (278). Il est pratique de constituer une solution-stock et de déterminer une fois pour toute sa concentration en azote total. Certaines précautions sont alors à observer : les solutions doivent être conservées à l'abri de la lumière et au froid (+ 3° C) ; de plus, comme les protéines basiques fixent le gaz carbonique en perdant ainsi une partie de leur pouvoir de combinaison avec les macromolécules acides, il convient de stocker ces solutions standard dans des récipients dont le bouchon est muni d'une garde renfermant de la baryte. Ces récipients doivent être de petite taille (100 cm³ au maximum) de façon à limiter la carbonatation qui se produit au cours des prélèvements.

Après retour à la température de la pièce, on ajoute à un volume connu de cette solution de protéine basique une quantité déterminée de la solution de fertilisine. Après homogénéisation on porte à une température choisie ($30° C < \theta > 0° C$) pendant 30 minutes. Des témoins sont constitués. Les lectures opacimétriques se font avec un photocolorimètre.

Exemple : soit ($\theta = 30° C$) :

1) une préparation en eau bidistillée de fertilisine d'*A. lixula* décolorée par 4 dialyses successives en présence d'acide trichloracétique, soit F *A. l.* (1 cm³ = 0,0380 mg. N total) :

$$\Delta_{\lambda 470} = 30 \text{ (Klett)} ;$$

2) une préparation en eau bidistillée de protéines basiques spermatiques d'*A. lixula* soit Pb *A. l.* (1 cm³ = 21,7 γ N total) :

$$\Delta_{\lambda 470} = 9 \text{ (Klett)} ;$$

il vient :

$$\left.\begin{array}{l} 1{,}5\ \mathrm{cm}^3\ \mathrm{Pb}\ A.\ l. + 3{,}5\ \mathrm{cm}^3\ \mathrm{F}\ A.\ l. = 65 \\ 2\ \ \mathrm{cm}^3\ \mathrm{Pb}\ A.\ l. + 3\ \mathrm{cm}^3\ \ \mathrm{F}\ A.\ l. = 58 \\ 2{,}5\ \mathrm{cm}^3\ \mathrm{Pb}\ A.\ l. + 2{,}5\ \mathrm{cm}^3\ \mathrm{F}\ A.\ l. = 55 \end{array}\right\} \Delta_{\lambda 470(\mathrm{K.})}.$$

Au cours des pages à venir un symbole du type $\Delta_{\lambda 500\,(\mathrm{B.\,M.})}^{3\,\mathrm{Pb}\,+\,2\,\mathrm{F}} = 20$, signifiera : densité optique d'un mélange renfermant 3 cm³ d'une solution de protéines basiques + 2 cm³ de fertilisine purifiée par voie trichloracétique (éventuellement préparée à partir de l'eau de mer ovulaire, en abrégé : e. m. o.), lecture au photocolorimètre absolu Bonet-Maury sur la bande des 500 mμ, égale 20 (les différents blancs étant déduits). Sauf indication spéciale, la solution de protéines basiques dont je me suis servi dans les expériences rapportées ici provenait de spermatozoïdes d'*A. lixula* et renfermait 68,88 γN total/cm³.

V. — Sur le mécanisme de l'agglutination et de la désagglutination.

Marza (396) a décelé cytochimiquement des lécithines et des protéines basiques à la surface limitante de spermatozoïdes de Vertébrés. Chez les spermatozoïdes d'Oursins on a mis en évidence des composés lipidiques (470) (612) et on sait qu'il existe des protéines basiques qui n'ont cependant pas été localisées cytochimiquement ; il est vraisemblable que la majeure partie de ces protéines basiques provient du noyau mais on peut supposer qu'il en existe aussi à la périphérie du spermatozoïde. A l'appui de cela je ferai état d'une communication personnelle de T. Hultin : 1) en présence d'Amberlite JR 4 (Amberlite basique), les spermatozoïdes d'Oursins se fixent par leurs flagelles (en présence du même échangeur d'ions les ovules s'agglutinent) ; 2) en présence de terre à foulon (acide) les spermatozoïdes se fixent par leur apex céphalique (les ovules ne sont pas influencés).

De sorte qu'il me paraît possible de poser comme hypothèse que la fertilisine agglutine les spermatozoïdes en formant un complexe hétéropolaire ternaire : lécithines spermatiques — protéines basiques spermatiques — fertilisine. Cette hypothèse qui tient compte des faits connus considère en premier lieu que toutes les fonctions basiques des protéines basiques (Pb) ne seraient pas saturées par les fonctions acides des phosphatides (Ph) dans le complexe Pb-Ph que ces substances forment à la surface limitante des spermatozoïdes ou en certains points de cette enveloppe, de telle façon que la fertilisine (F) pourrait s'y fixer et assurer ainsi des ponts interspermatiques conditionnant l'agglutination. Je schématise cette conception de la manière suivante :

$$\begin{array}{ccccccccccc} a & b & c & d & e & f & & & & & \\ \ldots & \mathrm{Ph\text{-}Pb} & - & \mathrm{F} & - & \mathrm{Pb\text{-}Ph} & \ldots & \mathrm{Ph\text{-}Pb} & - & \mathrm{F} & - \ \mathrm{Pb\text{-}Ph} \ldots \\ & \underbrace{\qquad\qquad}_{\text{♂ 1}} & & & & \underbrace{\qquad\qquad\qquad\qquad}_{\text{♂ 2}} & & & & & \underbrace{\qquad\qquad}_{\text{♂ 3}} \end{array}$$

Les complexes phosphatides-protéines basiques ont été décrits dans d'autres cas par Przylecki (478) (479) (480) et Chargaff (88). Quant aux complexes hétéropolaires ternaires, Przylecki et ses collaborateurs en ont décrit plusieurs.

En considération des travaux de Popa et de Dan notamment, la désagglutination paraît devoir s'expliquer par un processus de sécrétion acrosomiale sans intervention enzymatique *directe* au niveau du complexe Ph-Pb-F. Mais une explication fondée sur une action directe au niveau du complexe ternaire est concevable, car, si cette partie du « Spitzenknopf » (Ballowitz) est particulièrement labile, les autres zones superficielles du spermatozoïde semblent montrer une certaine instabilité et l'ensemble de ces modifications, à l'intensité près, serait le résultat d'actions ioniques et enzymatiques directes sur le système Ph-Pb-F. La désagglutination serait, en cette conjecture, sous la dépendance :

— soit de protéases comme celles décrites par Jacoby et par Lundblad si l'action porte aux niveaux *b-c* ou *c-d* ;

— soit de la lécithase découverte par Runnström, Tiselius et Vasseur, agissant aux niveaux *a f* et libérant des complexes :

Ph modifié Pb-F-Pb-Ph modifié.

L'hypothèse d'une section aux niveaux *c-d* pourrait retomber dans l'hypothèse de Tyler ; nous avons déjà examiné les arguments qui s'opposaient à cette manière de voir. De toute façon dans le cas d'une action enzymatique directe sur des structures peu labiles il faut admettre une action rapide.

Lorsque j'ai cherché à démontrer l'existence *in vitro* d'un complexe Ph-Pb-F, je me suis heurté à la difficulté suivante :

Que l'on constitue en premier lieu le complexe binaire selon Pb-Ph ou qu'on le constitue selon Pb-F, il peut rester un excès de Pb en solution. Dans ces conditions l'adjonction du troisième composant (F ou Ph) amènerait un surplus de précipité sans qu'il soit ainsi prouvé que c'était des fonctions basiques libres de Pb qui l'avaient fixé. Autrement dit on ne sait pas si l'on a affaire à un complexe ternaire Ph-Pb-F ou à deux complexes binaires Pb-Ph et Pb-F qui coprécipitent dans des proportions variables. Si l'on examine les protocoles de Przylecki on note que cette éventualité n'a pas été envisagée. Ainsi dans le travail de Przylecki, Geidroyc et Rafalowska (480) les tableaux I et II font état de combinaisons entre la clupéine-SO_4^{--}, un acide nucléique et le glycogène. Les précipités ont été obtenus de la façon suivante : « Les substances dissoutes dans la solution de Ringer sont mélangées entre elles, le précipité obtenu est centrifugé et lavé à l'eau distillée, puis séché, pesé ; on détermine N et le glycogène selon Pflüger. » Les chiffres montrent effectivement des augmentations de poids et même, pour certaines concentrations des 3 corps, la présence de glycogène, mais rien n'indique qu'il y ait réellement combinaison ternaire et ceci pour les raisons que je viens d'invoquer.

De plus si on calcule la concentration des 3 corps de façon à ce que le pouvoir de combinaison héteropolaire de Pb soit juste suffisant :

a) si on ajoute séparément les deux composés à point isoélectrique acide, le premier ajouté saturera un certain nombre de molécules Pb et en laissera un certain nombre en solution ; c'est le cas précédent ;

b si on ajoute simultanément les deux composés à point isoélectrique

acide, on obtiendra un précipité renfermant les 3 corps mais ici encore on ne pourra affirmer s'il y a unicité ou mixture.

Mon étude photométrique à l'aide des 3 corps Pb, Ph, F va dans ce dernier sens et elle m'a permis en plus d'établir des courbes servant à la définition de l'unité d'agglutination (voir p. 42).

Les substrats sont :

1) une solution de fertilisine d'*A. lixula* extraite des ovules selon la technique à l'acide trichloracétique ; elle était décolorée par 3 dialyses successives.

Elle renfermait 17,2 γ N total/cm³ d'eau bidistillée :

$$(\Delta_{\lambda 470\ (\text{Klett})} = 25), \text{ soit F } A.\ l. ;$$

2) une solution de fertilisine de *P. lividus* d'extraction ovulaire, renfermant 7,92 γ N total/cm³ d'eau bidistillée :

$$(\Delta_{\lambda 470\ (\text{K.})} = 10), \text{ soit F } P.\ l. ;$$

3) une solution de protéines basiques de spermatozoïdes d'*A. lixula* extraites selon la technique de Hultin (1 cm³ de cette solution renfermait 21,7 γ N total, un indosable de P) :

$$\Delta_{\lambda 470\ (\text{K.})} = 9), \text{ soit Pb } A.\ l. ;$$

4) une solution de protéines basiques de spermatozoïdes de *P. lividus* extraites selon Hultin (1 cm³ de cette solution = 11,9 γ N total + un indosable de P) :

$$\Delta_{\lambda 470\ (\text{K.})} = 0), \text{ soit Pb } P.\ l. ;$$

5) une solution de phosphatides totaux de spermatozoïdes d'*A. lixula* que j'ai extraits de la façon suivante : 1) agitation de x grammes de spermatozoïdes non dilués obtenus par ponte chimique, avec 4 x grammes d'un mélange à parties égales d'éthanol absolu et d'éther sulfurique ($\theta = 20°$ C ; durée de contact : 47 heures) ; 2) décantation sur filtre et reprise des cadavres spermatiques par 2 x grammes d'éther sulfurique ($\theta = 20°$ C ; durée de contact : 44 heures) ; 3) réunion des fractions éther-alcool et éther et précipitation à 4° C par de l'acétone (durée de contact : 24 heures) ; 4) le précipité centrifugé est dispersé dans de l'eau bidistillée, on chasse l'acétone par une courte distillation sous pression réduite (1 cm³ renfermait 3,45 γ P organique $\Delta_{\lambda 470\ (\text{K.})} = 8$), soit Ph *A. l.* ;

6) une solution des phosphatides totaux de spermatozoïdes de *P. lividus* préparés comme les phosphatides d'*A. lixula* (1 cm³ = 5 γ P organique ; $\Delta_{\lambda 470\ (\text{K.})} = 35$), soit Ph *P. l.*

Avec les substrats F *A. l.*, Pb *A. l.*, Ph *A. l.*, j'ai obtenu les courbes rassemblées dans la figure V (photomètre Klett).

Si on tente d'obtenir la combinaison ternaire à partir d'un système Pb-Ph centrifugé on se heurte au moins à deux difficultés pratiques :

1° si on ne lave pas le précipité, il peut rester des traces de Pb adsorbé sur Pb-Ph au cours de la centrifugation,

2° si on lave, on risque que le lavage soit imparfait avec de l'eau distillée et un lavage avec une solution douée d'une certaine force ionique amènerait

la dissociation du sel Pb-Ph, ce qui se produirait aussi en cherchant à remettre Pb-Ph en solution homogène.

La non-spécificité est illustrée d'une part par la combinaison Ph(*A. l.* ou *P. l.*) avec Ca^{++} de l'eau de mer (Ex. 5 cm³ Ph *A. l.* sol.-mère de $\Delta\lambda_{470} = 200$ et renfermant 69 γ P org./cm³ + 1 cm³ eau de mer = 208) et d'autre part dans les

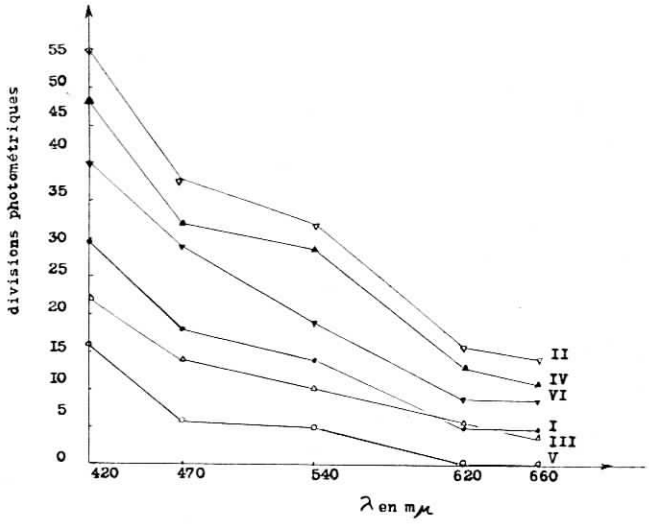


Fig. V.

La courbe I correspond à un système 0,5 cm³ Ph + 4,5 cm³ Pb + 1 cm³ H_2O dist.

La courbe II correspond à un système 0,5 cm³ Ph + 4,5 cm³ Pb + 1 cm³ F.

La courbe III correspond à un système 0,5 cm³ Ph + 4,5 cm³ Pb + 2 cm³ H_2O dist.

La courbe IV correspond à un système 0,5 cm³ Ph + 4,5 cm³ Pb + 1 cm³ F + 1 cm³ H_2O dist.

La courbe V correspond à un système 0,5 cm³ Ph + 4,5 cm³ Pb + 1 cm³ H_2O dist. + 1 cm³ eau de mer filtrée.

La courbe VI correspond à un système 0,5 cm³ Ph + 4,5 cm³ Pb + 1 cm³ F + 1 cm³ eau de mer filtrée.

intercombinaisons avec les substrats *A. l.* et *P. l.* : Ex. à λ 420 (Klett) et 20° C :

a) 0,5 cm³ Ph *A. l.* + 4,5 cm³ Pb *A. l.* = 24 (24 + 2 cm³ F *P. l.* = 31),

b) 2 cm³ Ph *P. l.* + 3 cm³ Pb *P. l.* = 83 (83 + 2 cm³ F *A. l.* = 180, soit *x*), 3,5 cm³ *x* + 2 cm³ eau de mer filtrée = 90 ; 3,5 cm³ *x* + 2 cm³ eau bidistillée = 105.

CHAPITRE IV

L'ACTIVITÉ FLAGELLAIRE

> Aucun corps ne peut posséder la vie active que lorsqu'une cause excitatrice de ses mouvements organiques agit en lui.
>
> LAMARCK,
> *Philosophie zoologique.*

I. — Conditions d'oxydo-réduction.

Quoique la motilité ne soit pas une caractéristique essentielle du gamète mâle (on en connaît qui sont normalement immobiles comme ceux des Termites (GRASSÉ)) il paraît fondé d'établir une relation entre le pouvoir fécondant et la motilité des spermatozoïdes lorsque ceux-ci sont normalement mobiles comme le sont ceux des Oursins. Nous verrons d'ailleurs de quelle motilité il s'agit exactement.

Comme tous les phénomènes vivants, la motilité dépend de 4 paramètres fondamentaux, propriétés physico-chimiques du milieu d'action, à savoir : μ, pH, 0, rH_2.

En ce qui concerne la force ionique, μ, je rappellerai seulement que Ca^{++} est un cofacteur essentiel de la motilité. Je n'ai pas examiné d'une façon systématique la question du pH pour laquelle on trouve d'ailleurs peu de données dans la littérature, mais j'ai pu vérifier que de l'eau de mer acide ($pH < 7$) ou trop alcaline ($pH > 10$) était défavorable pour la motricité des spermatozoïdes d'*A. lixula* et de *P. lividus* ; de plus l'augmentation de la concentration en H^+, consécutive au dégagement de CO_2 respiratoire, n'empêche pas l'agglutination spermatique par la fertilisine comme le montre mon expérience d'agglutination de spermatozoïdes frais dans une suspension désagglutinée de spermatozoïdes.

En ce qui concerne la température, je peux dire qu'entre 10 et 30° C la motilité des spermatozoïdes d'Oursins en eau de mer est conservée. Du point de vue rH 2 j'évoquerai en premier lieu mon hypothèse qui assimile le flagelle spermatique à un muscle rudimentaire (538), vue qui a reçu un appui des expériences de CRÉZÉ (118) faites avec des spermatozoïdes de Batraciens et du curare. On peut alors penser que le système ATP-ATPase entre en jeu pour les spermatozoïdes d'Oursins comme cela a été montré pour les spermatozoïdes de Mammifères (154) (285) et on sait que ce système enzymatique est activé par des rH 2 bas. Malheureusement sur le sperme d'Oursin *in vivo* il n'est pas

possible de mettre en évidence une activité ATPasique comme cela a été montré par Spikes (577) et comme je peux le confirmer avec des spermatozoïdes d'*A. lixula* en eau de mer obtenus par voie chimique ($\Delta\lambda_{600\,(B.M.)}^{1\,5^0} = 26$) : après incubation de 1 heure à 25° C en présence d'ATPNa en eau de mer (ajustement à pH 8 par de la soude) à 1 milligramme/cm³, je n'ai pu déceler de libération sensible de phosphate minéral. Cependant Wicklund (677) a trouvé que l'ATP active le mouvement spermatique et Spikes a pu déceler une activité ATPasique dans des *broyats* spermatiques (la technique d'obtention des broyats n'est d'ailleurs pas indiquée) Cette activité ATPasique soulève un certain nombre de problèmes :

1° on ne peut fonder un dosage biochimique de l'activité flagellaire sur un dosage de phosphore à partir d'une hydrolyse enzymatique de l'ATP ;

2° dans l'état présent de nos connaissances sur l'enzymologie des spermatozoïdes d'Oursins, il serait sans doute hasardeux de définir un phénomène caractérisant la vitalité spermatique en faisant une analyse *post mortem* des spermatozoïdes (broyage cellulaire).

Récapitulation. — 1) Les spermatozoïdes de *P. lividus* et d'*A. lixula* sont normalement aérobies et j'ai pu constater qu'avec une eau de mer ovulaire de *P. lividus* vieillie en présence d'ovules pendant plusieurs heures à la température du laboratoire (présence de caroténoïdes anti-oxygènes ?), les spermatozoïdes restaient immobiles et ne s'agglutinaient pas. Des dosages d'oxygène selon la technique de Winkler-Nicloux montraient l'absence de ce gaz dans cette eau ovulaire. L'adjonction d'eau de mer fraîche mobilisait les spermatozoïdes et permettait leur agglutination réversible (702) ;

2) la concentration en substances réductrices diminue en fonction du temps dans une suspension spermatique (711) ; j'ai précisé ce point de la façon suivante :

Soit : des spermatozoïdes testiculaires de *P. miliaris* (forme « Z », littorale, de Kristineberg $\Delta\lambda_{450\,(S.)} = 0{,}16 - 0{,}185$ (cuve de 2,5 mm. d'épaisseur), soit ♂ ord. (courbe inférieure) ;

— à une fraction aliquote de ces spermatozoïdes, j'ajoute du glutathion réduit, soit ♂ gl. (courbe supérieure).

(Salinité de l'eau de mer de fond 22 o/oo ; titration de l'activité réductrice par $KMnO_4$ N/500 en présence de 2 cm³ H_2SO_4 1,84 N ; $\theta = 17^0$ C). La figure VI indique l'allure des oxydations (auto-oxydations ?).

Cette variation de la concentration en substances réductrices explique peut-être en partie l'augmentation apparente de l'activité catalasique du sperme d'Oursin conservé (voir p. 70). Il est remarquable que la motilité décroît d'une façon grossièrement parallèle à cette diminution en substances réductrices titrables par manganimétrie (♂ ord.), mais il ne faudrait pas pour autant considérer qu'il y a relation de cause à effet car la motilité dépend de nombreux facteurs.

Je remarquerai encore à ce sujet que la fertilisine n'augmente pas l'activité catalasique du sperme d'*A. lixula*. Exemple :

$\theta = 28^0$ C, spermatozoïdes de ponte chimique $\Delta\lambda_{600\,(B.M.)}^{1/50} = 91{,}45^0$ Vernes, âge : 18 minutes, Perborate de sodium à 1,5 o/o ; durée d'incubation 5 minutes en tubes Pyrex de 22, arrêt de la réaction par H_2SO_4 2N (5 cm³)

Titration par $NA_2S_2O_3$ N/50 en présence de III gouttes d'amidon. Eau de mer ovulaire d'*A. lixula* renfermant # 31 γ N ♀ total/cm³ :

— 2 cm³ perborate + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ : 10,1 cm³ thiosulfate ;

— 2 cm³ perborate + 1 cm³ eau de mer ordinaire + 1 cm³ : 10,4 cm³ thiosulfate.

(Les agglutinats durent 4 minutes, les spermatozoïdes sont mobiles en présence de perborate) ;

3) l'adrénaline de 50 à 1.000 γ/cm³ active le mouvement flagellaire spermatique (mais de 500 à 1.000 γ/cm³ elle est rapidement toxique). Ses propriétés

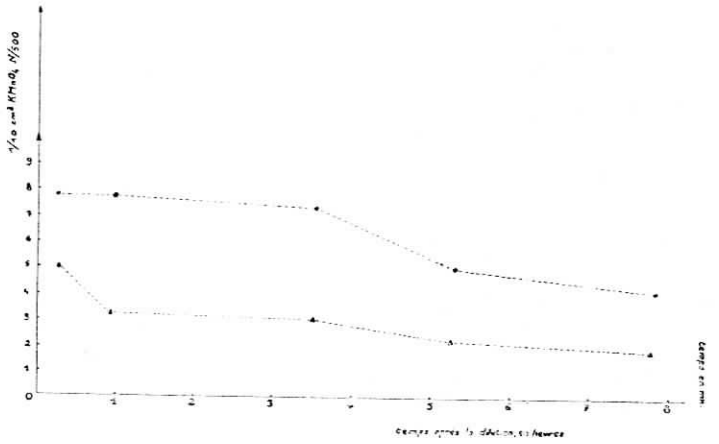
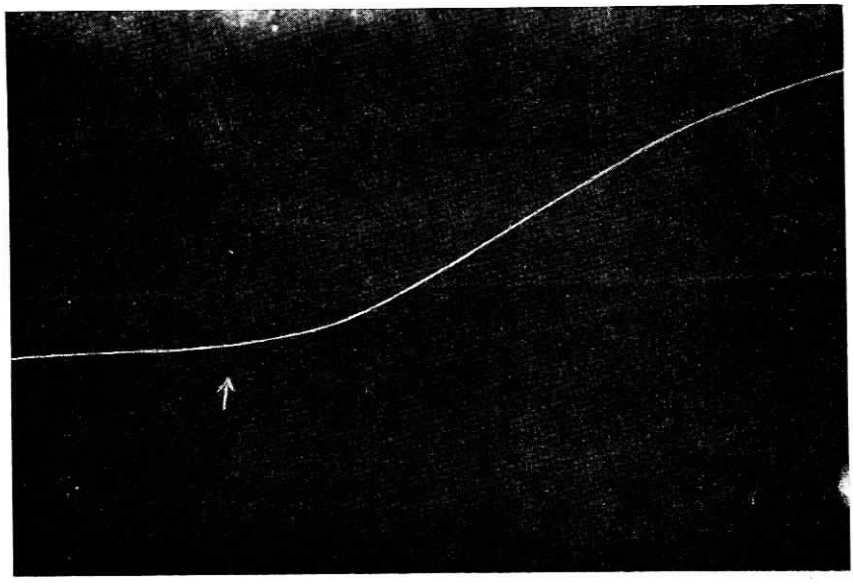


Fig. VI.

réductrices sont peut-être en cause. J'ai trouvé également que l'acétyl-choline à 200 γ/cm³ immobilise les spermatozoïdes d'*A. lixula* tandis qu'à 40 γ/cm³ elle paraît avoir un effet activateur (technique des trois gouttes).

Parallèlement à ces actions pharmacodynamiques j'ai examiné le rôle de l'échinochrome du point de vue oxydo-réduction. On sait (historique) que l'échinochrome, d'après CANNAN, à pH 7 et à 30° C a un $E'_0 = -0{,}228$ volt. Or la phénosafranine à pH 7 et 30° C a un $E'_0 = -0{,}242$ volt (cf. 690). La phénosafranine est rouge comme l'échinochrome (et en conséquence son éventuelle activité photodynamique est voisine) et elle possède de plus l'avantage de ne pas former de complexes insolubles avec Ca^{++}. Entre lame et lamelle une solution en eau de mer de $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 18{,}7/1.000$ paraît activer les spermatozoïdes d'*A. lixula*. Pour une concentration correspondant à $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 18{,}7/20$, la phénosafranine est toxique. En cherchant à pousser plus ou moins mon hypothèse du flagelle = muscle extrasomatique, j'ai examiné l'action de la phénosafranine sur l'utérus de Cobaye vierge. *Ce colorant amène une forte contraction de ce muscle lisse* comme le montre le tracé ci-contre. Les conditions d'enregistrement étaient les suivantes : $\theta = 38°$ C. solution de Tyrode (volume # 75 cm³), barbotage continu d'oxy-

gène. Poids humide du fragment d'utérus : 2,4 g. Phénosafranine en solution de Tyrode à 38° C. $\Delta_{7.600\,(B.\,M.)} = 20$ (nombre de centimètres cubes ajoutés : 2).



Plusieurs tentatives faites avec de l'eau de mer ovulaire d'*A. lixula* ou de *P. lividus* dialysée contre de l'eau physiologique (ClNa 7 o/o) ou du « Tyrode » n'ont donné aucun résultat de cet ordre sur l'utérus de Cobaye. De la fertilisine d'extraction ovulaire trichloracétique, dialysée contre de l'eau physiologique ou du « Tyrode » n'a pas manifesté d'action concluante sur ce muscle, que ce soit de la fertilisine de *P. lividus* ou d'*A. lixula* et que cette dernière soit colorée par l'échinochrome ou décolorée selon le procédé que j'ai indiqué (p. 24).

La post-hypophyse (Choay) s'est avérée toxique pour les spermatozoïdes d'*A. lixula* jusqu'à la concentration de 5/300 unité/cm³ d'eau de mer ; à 5/400 unité/cm³ d'eau de mer les spermatozoïdes sont faiblement mobiles. A 5/1.000 unité/cm³ d'eau de mer les spermatozoïdes paraissent activés (technique des trois gouttes).

II. — L'estimation de l'activité flagellaire.

Il est clair que la meilleure méthode pour mesurer l'activité flagellaire spermatique consisterait à en connaître le mécanisme enzymatique et à pouvoir le doser. Or les données biochimiques à ce sujet sont peu nombreuses et en attendant qu'un travail systématique soit fait à cet égard on en est réduit à faire usage d'estimations non causales. On a donc cherché à évaluer la motricité spermatique dans sa manifestation même et l'on a recours pour cela

à des méthodes physiques. D'ailleurs, tout dépend de l'usage que l'on veut faire de la mesure entreprise; c'est ainsi que dans certains cas il est possible de faire appel à des mesures physiologiques qui sont indirectes. Quels sont ces cas ?

1° Lorsqu'on cherche à estimer le pouvoir activateur *relatif* d'une préparation de fertilisine. Bien que la respiration spermatique ne soit pas seulement l'expression de l'activité flagellaire (et inversement), si on cherche à posséder des points de repère pour l'activation du métabolisme *global* on peut se servir d'une technique microrespirométrique comme celle de WARBURG.

2° Lorsqu'à partir de la connaissance de cette activation globale on cherche à conjecturer du pouvoir fécondant de la suspension spermatique en cause.

En somme on confond, par défaut, activité et vitalité. Il n'est pas illégitime de le faire dans le cas de suspensions normales comme celles qui servent à la pratique courante des fécondations : on a alors avantage à posséder une technique simple, rapide. J'en ai mis une au point que j'exposerai après avoir fait l'examen expérimental et critique des techniques physiques.

Les tubes capillaires.

Je les ai expérimentés souvent et, comme beaucoup d'autres chercheurs, j'ai abandonné leur emploi car il s'avérait par trop délicat, et par conséquent inconstant. Une des principales causes d'erreur consiste dans la difficulté d'obtenir des tubes capillaires de section constante. De plus lorsqu'on éprouve une substance comme la fertilisine qui, à côté de son pouvoir dynamogène est agglutinante, on se heurte à ce fait qu'il se forme des amas spermatiques près de l'orifice du tube capillaire, ce qui tend à *empêcher* le libre passage des spermatozoïdes non agglutinés. Je discuterai dans la dernière partie de mon travail les relations entre activation flagellaire et chimiotactisme positif.

La technique des trois gouttes.

Elle trouve vraisemblablement son origine dans la technique d'injection de JENNINGS. Telle qu'on la pratique généralement elle est très subjective, mais il est possible de l'objectiver en utilisant non plus des spermatozoïdes très mobiles (frais) mais des spermatozoïdes affaiblis par vieillissement. Dans ces conditions, c'est moins une activation qu'une réactivation qu'on observe et si, telle que, elle ne permet pas des mesures, elle permet en tout cas de réduire les chances d'erreur d'estimation quant au caractère réanimateur d'une substance *activatrice* (Dans la dernière partie on trouvera une discussion portant sur réanimation et activation). J'indiquerai ici une application de cette manière de faire : la fertilisine d'*A. lixula* extraite *de l'eau de mer ovulaire* de cet Oursin par l'acide trichloracétique, réactive les spermatozoïdes spécifiques, or elle est totalement incolore à l'examen au photomètre à degrés de Pulfrich. Par contre pour certaines préparations trichloracétiques obtenues *à partir d'ovules* et décolorées par plusieurs dialyses, la réactivation de spermatozoïdes spécifiques vieillis n'a pu être obtenue ; il est probable que ces préparations ont été dénaturées.

Techniques métriques.

Il n'y en a aucune adaptée aux spermatozoïdes d'Oursins. En ce qui concerne la mesure du mouvement flagellaire et ciliaire, je renvoie aux travaux (225) (141) avec bibliographie (380) (381) (382). Les techniques sont essentiellement cinématographiques ou stroboscopiques. Pour les spermatozoïdes, les travaux portent uniquement sur ceux d'Ostracodes, du Bélier, du Taureau et de l'Homme. La plus simple, la moins onéreuse et aussi la moins usitée est la technique stroboscopique proposée par GRAY (228, p. 487) et que DON RITCHIE a récemment (141) mise en œuvre pour estimer l'activité flagellaire des spermatozoïdes humains (Son principe revient à obtenir une superposition de la fréquence du battement flagellaire et de la fréquence d'illumination de la préparation spermatique, superposition amenant une impression d'immobilité). ROTHSCHILD a préconisé une mesure électrique, par impédance (495) (498) (499) ; la généralisation de cette technique ne peut se faire car, comme l'écrit ROTHSCHILD lui-même (507) : « La méthode électrique pour mesurer l'activité spermatique ne peut être appliquée aux spermatozoïdes humains car le nombre de spermatozoïdes par millilitre d'un éjaculat n'est pas suffisant pour amener la « formation en onde » observée dans le sperme de Taureau et de Bélier et de laquelle dépend la méthode. » Dans cette même note, ROTHSCHILD met en évidence les difficiles problèmes que soulève la mesure du mouvement flagellaire spermatique « principalement, écrit-il, parce que les méthodes photographiques ne sont pas directement applicables aux suspensions denses de sperme. Si les suspensions sont diluées suffisamment pour la photographie, les spermatozoïdes peuvent montrer des modifications pathologiques à moins que des substances protectrices, qui peuvent interférer avec les mesures, ne soient additionnées au milieu ». Et il ajoute : « Récemment, BOSELAAR et SPRONK ont exposé une nouvelle manière de mesurer ce qu'ils nomment la « motilité » et la concentration en spermatozoïdes. En dehors des objections faites à la méthode par les auteurs eux-mêmes, aucune estimation des vitesses spermatiques n'est donnée dans cet article » (cf. 50).

La technique de cinématographie rapide de LOWNDES a semble t-il donné des résultats intéressants (avec 60 clichés/seconde et un temps d'exposition de 1/8.000 seconde), cet auteur trouve en moyenne 6-12 battements avec différents Flagellés. ROTHSCHILD (506) fait deux objections à des techniques de cet ordre : « Premièrement, c'est extrêmement long ; deuxièmement, à moins que de grandes vitesses de filmage ne soient utilisées, il peut ne pas être possible d'identifier un spermatozoïde défini sur les clichés successifs. » Cette deuxième objection ne peut être retenue toutefois pour le travail de LOWNDES. Plus important, à mon avis, est le côté onéreux de la méthode, inconvénient que souligne aussi ROTHSCHILD. En somme, la stroboscopie et la cinématographie ultra-rapide paraissent pouvoir convenir. ROTHSCHILD a toutefois suggéré et mis en application une nouvelle méthode de mesure de la vélocité des spermatozoïdes de Taureau (507), cette méthode a l'avantage sur la cinématographie ordinaire d'être environ 50 fois plus rapide. La nouvelle technique est également cinématographique, mais c'est une cinématographie lente (vitesse

de prise de vues : 4-10 clichés/seconde) et les mesures sont donc indirectes, impliquant des calculs, fondés sur le principe de la probabilité après effet. Elle a été inspirée à ROTHSCHILD de la façon suivante : « Dans la revue de CHANDRA-SEKHAR sur les *Problèmes stochastiques en Physique et en Astronomie*, il existe p. 89 la note infrapaginale suivante : « FURTH compte systématiquement, toutes les cinq secondes... le nombre de piétons d'une rue encombrée. Il est amusant que par des comptages systématiques de cette sorte faits par FURTH, il soit possible actuellement de déterminer la vitesse moyenne d'un piéton. » Connaissant : 1) la vitesse de prise de vues ; 2) le nombre de spermatozoïdes à chaque cliché réunis dans un cercle de rayon connu, on détermine la vitesse moyenne des spermatozoïdes en appliquant l'expression :

$$c = 3.6169\, r/\tau \log_{10} (1 - \overline{\delta^2}/2\overline{n})$$

où : τ est le temps en secondes entre clichés ; n est le nombre moyen de spermatozoïdes dans le cercle ; δ^2 est la valeur moyenne des carrés des différences entre les nombres consécutifs. Je ferai remarquer que le terme $\delta^2/2n$ est de la même forme que $b^2/2k$ qui est l'expression du temps moyen pour que, dans l'étude du *mouvement brownien* selon FURTH précisément (voir (208)), une particule passe indifféremment d'une élongation $+ b$ ou $- b$ à partir d'un point d'une ligne origine équidistante de $+ b$ et $- b$; k est le coefficient de diffusion relié au carré moyen du déplacement particulaire dans le temps t (en secondes) par l'expression $\overline{x^2} = 2\, kt$.

ROTHSCHILD (507) pense que sa méthode « peut être appliquée à tout système d'organismes qui se meuvent dans des directions aléatoires, dans une, deux ou trois dimensions ». Je ferai trois remarques à ce sujet :

1° lorsque le problème consiste à mesurer la vitesse de spermatozoïdes *aérobies*, il se complique de ce fait qu'entre lame et lamelle la concentration en oxygène diminue rapidement, entraînant une diminution du mouvement jusqu'à son arrêt ; le résultat de la mesure repose alors en grande partie sur le volume de la goutte, sur la surface définie par la lamelle et sur le lieu d'observation (centre ou bordure de la préparation) ;

2° ROTHSCHILD décrit sa technique de la façon suivante (506) : « Du sperme de Taureau était dilué au 1/4 avec un tampon phosphate (0,6 g. KH_2PO_4 et 6 grammes Na_2HPO_4 dans 300 millilitres d'eau) contenant 5 milligrammes de fructose/millilitre. Une goutte de ce sperme dilué était placée sur une lame de microscope et une lamelle n° 1 (7/8 × 7/8 pouce) très doucement posée sur le sommet de la goutte. La dimension de la goutte était telle que, la lamelle étant mise sur son sommet, la goutte se répandait exactement jusqu'à la bordure du plus grand cercle qui pouvait être inscrit par la lamelle, sans qu'aucune pression soit appliquée. » Ce dernier point est important car on conçoit que ces spermatozoïdes nageant alors dans un plan sont particulièrement sensibles aux variations de pression. Or j'ai pesé un grand nombre de lamelles de microscopie provenant de mêmes boîtes commerciales et j'ai pu constater que le poids de chacune d'elles pouvait varier *du simple au double*. Voici mon protocole :

Lamelles rondes, $\varnothing = 20$ millimètres $\pm 50\ \mu$. Pression atmosphérique : 765-767 millimètres Hg. $\theta = 25°$ C $\pm$ 0°1 C. Les lamelles sont prélevées avec

des pinces à mâchoires en corne, essuyées superficiellement avec du papier dit « cleaning paper » et débarrassées de toute poussière en les plongeant successivement dans des bains d'eau bidistillée, d'éthanol absolu, d'éther sulfurique, de collodion à l'éther. Après séchage, la pellicule de collodion est retirée, avec des pinces fines, de la lamelle qui est alors pesée sur une balance au 1/100.

Remarque. — Une cause d'erreur dans la statistique pourrait se trouver dans la sélection inconsciente des lamelles liée à leur fragilité : les lamelles les plus légères étant les plus fragiles, au cours des manipulations, il y a plus de chance de les casser. Toutefois de tels accidents sont rares et, dans le tableau III qui relève une série de pesées faites dans l'ordre de présentation des lamelles dans leur emballage, les accidents ont été marqués d'un astérisque et, comme on peut le voir, les lamelles brisées étaient également pesées après en avoir rassemblé tous les débris.

TABLEAU III

(poids en grammes ; lecture verticale).

0,13066	0,13235	0,1480	0,16110	0,12100	0,16300
0,14554	0,14075	0,15275	0,12575	0,13940	0,13530
0,11033	0,12420	0,12995	0,16340	0,09485	0,18635
0,11818	0,13120	0,11610	0,14605	0,18645	0,1 450
0,11495	0,17965	0,11120 (*)	0,16810	0,12065	0,13370
0,16845	0,09978	0,14640	0,13920	0,15700	0,16430
0,10908	0,10060	0,15065	0,14655	0,13800	0,15001
0,10715	0,12020	0,15050	0,11190 (*)	0,13510	0,16630
0,10650	0,14430	0,14540	0,14002	0,15880	
	0,13210	0,14997	0,08630	0,11200	
			0,10440	0,1[illegible]275	
				0,15030	

Donc pour que cette cause d'erreur n'intervienne pas dans toute mesure rigoureuse il faut :

— soit que le milieu dans lequel évoluent les spermatozoïdes anaérobies ait une viscosité telle qu'ils soient insensibles à des variations de pression de l'ordre de celles qui sont calculables (P/mm² ou P/♂) à partir des chiffres gravimétriques ;

— soit que le poids de la lamelle utilisée ait été préalablement déterminé.

3° La technique est inutilisable lorsque les spermatozoïdes sont agglutinés, comme cela est le cas en présence de fertilisine.

III. — Types de mouvements.

Le point délicat de toute mesure de la motilité des spermatozoïdes d'Oursins dans les conditions ordinaires, est la sensibilité de ces cellules à l'anoxybiose. Lorsque, entre lame et lamelle et à température du laboratoire, on examine une suspension fraîche de ces spermatozoïdes (*A. lixula* ou *P. lividus*) on constate qu'au début, les spermatozoïdes libres progressent rectilinéairement ; puis, après un certain temps, qui dépend particulièrement

de la concentration spermatique, les mouvements prennent un caractère giratoire : les spermatozoïdes progressent selon des spirales, d'abord de rayons larges puis de plus en plus étroits ; enfin le mouvement, plus ou moins saccadé, devient vibratoire et alors le spermatozoïde ne se déplace presque plus. Lorsque ce mouvement oscillatoire sur place a cessé, je considère que le spermatozoïde est *en repos*. Ces mouvements paraissent universels pour les spermatozoïdes flagellés, et les indices de WALTON (cf. 176) pour les spermatozoïdes de Mammifères sont fondés sur la distinction de ces types de mouvement ; quant à MILOVANOV (cf. 176) il distingue 3 états pour les spermatozoïdes de Vertébrés : motilité, repos, mort. Nous verrons l'importance de la distinction entre ces deux derniers états pour les spermatozoïdes d'Oursins.

Remarques. — 1) Tous les spermatozoïdes d'une même suspension ne sont pas dans le même état cinétique. Ainsi, si la grande majorité se trouve en mouvements spiraux amples, on en trouve encore en mouvement rectilinéaire et d'autres sont immobiles ou peu mobiles.

2) Le repos des spermatozoïdes obtenu par « vieillissement » de courte durée entre lame et lamelle doit être distingué de l'affaiblissement obtenu par vieillissement prolongé en milieux oxygénés (voir plus loin).

Considérons maintenant que pour mesurer directement un mouvement rapide, on peut soit le saisir rapidement (cinématographie) soit le freiner d'une façon connue.

J'ai cherché à utiliser cette deuxième alternative avec les spermatozoïdes d'Oursins. Pour cela le freinage ne peut être que d'ordre physique car toute perturbation d'ordre chimique aurait des retentissements imprévisibles sur un matériel biochimiquement mal connu. J'ai pensé à me servir de milieux gélifiés de viscosité connue, on pouvait ainsi espérer pouvoir atteindre par calcul la force motrice des spermatozoïdes : il suffirait en principe de déterminer par tâtonnements le milieu ralentisseur limite, de viscosité définie, qui stoppe immédiatement la progression de la majorité des cellules considérées. Malheureusement, avec des spermatozoïdes d'Oursins, ni la gélose, ni la gélatine ne peuvent convenir car le calcium de l'eau de mer se fixe à la gélose — et on sait l'importance de cet ion dans la motilité spermatique — et l'activité protéasique des spermatozoïdes d'Oursins (JACOBY, LUNDBLAD) rend inutilisable le milieu gélatinisé.

Mes tentatives en ce sens n'ayant pas abouti j'ai toutefois utilisé des milieux gélifiés dans l'estimation de la vitesse des spermatozoïdes d'Oursins, non plus pour chercher à en ralentir le mouvement, mais afin d'assurer une compensation des pressions auxquelles sont soumis les spermatozoïdes entre lame et lamelle (matelas) et surtout pour obtenir un étalement régulier de la goutte spermatique de telle sorte que leurs mouvements se fassent réellement dans un plan. Je procède ainsi :

Sur une lame porte-objet on étale une couche mince d'une substance hydrophobe (silicone ou vaseline). Cet étalement se fait à l'aide d'un papier type « cleaning paper ». Avec une pipette distribuant des gouttes calibrées, on dépose par exemple 1/10 cm^3 du sol gélifié qui prend aussitôt sa sphéricité maximum. A l'aide d'une pipette capillaire, on dépose sur le sommet de cet hémisphère une microgoutte (par exemple 6,4 mm^3) de la suspension spermatique : sous l'influence des forces interfaciales cette microgoutte se répan-

dra au maximum. Aussitôt après on dépose 1/10 cm³ du sol d'agar sur cette couche laminaire et on presse simultanément sur le bouton-poussoir d'un chronomètre (soit t_0), puis on couvre ce sandwich d'une lamelle de poids connu. L'observation microscopique se fait d'une façon satisfaisante en utilisant la combinaison optique : oculaire micrométrique 7 × objectif 20. Pour les mouvements rectilinéaires on suit la progression des spermatozoïdes choisis au hasard le long de l'échelle micrométrique facilement déplaçable.

On constate qu'au stade *spirales courtes*, la tête de nombreux spermatozoïdes, fixés par la région distale de leur flagelle, suit un mouvement de rotation régulier, le cercle ainsi décrit n'a pas un diamètre supérieur à 35 μ avec une vitesse circonférentielle grossièrement constante ; la rotation se fait dans le sens trigonométrique.

Exemple de mensurations. — Soit :

Milieu gélifié : agar lavé à l'eau douce puis bidistillée et séché à 60° C. Concentration du gel : 0,5 o/o en eau de mer filtrée, avant filtration à chaud sur papier spécial dit « à gélose ». Sandwich : 1/10 cm³ inférieur-1/10 cm³ supérieur.

Spermatozoïdes frais d'*A. lixula* obtenus par ponte chirurgicale et dilués dans de l'eau de mer filtrée ($\Delta_{7500\ (B.\ M.)}^{1/50} = 30$) ; micro-goutte de 8 mm³.

Lamelle ronde de 20 millimètres de diamètre, $p = 0{,}15043$ g.

$\theta = 22{,}5°$ C. Observation continue au centre de la préparation. On observe :

à $t_0 + 30$ secondes, 100 μ sont parcourus rectilinéairement en : 140 tierces, 90 tierces, 60 tierces, 54 tierces, 30 tierces.

On note immédiatement la grande variabilité dans la vitesse de translation des spermatozoïdes, toutefois 30 et 50 tierces sont les valeurs que j'ai retrouvées le plus souvent :

à $t_0 + 5$ minutes : mouvements circulaires de 20 μ de diamètre affectant la majorité des spermatozoïdes ; vitesse de rotation : 2 tours/seconde soit environ 7,5 millimètres/minute, ce qui est une valeur différente de celle trouvée par Buller (65), mais les conditions exactes de l'expérience de Buller ne sont pas connues ;

à $t_0 + 10$ minutes : début du mouvement vibratoire très rapide (je n'ai pu compter le nombre de vibrations) ;

à $t_0 + 14$ minutes, on peut compter les vibrations des têtes spermatiques :

50	oscillations	doubles/	25	secondes
44	»	»	/26	»
50	»	»	/20	»
50	»	»	/40	»

soit environ 1,7 oscillation double/seconde :

à $t_0 + 20$ minutes, arrêt quasi général de tout mouvement.

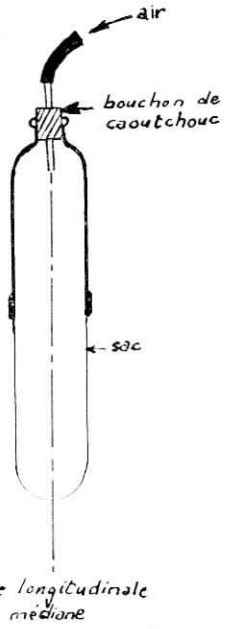
En présence d'eau de mer ovulaire de concentration $\Delta_{7500\ (B.\ M.)}^{2\ Pb\ +\ 3\ F} = 12{,}7$ (préparation montée sur la même lame porte-objet, à côté de la préparation en eau de mer ordinaire (handicap d'observation : 12 secondes)), je note :

1° Une vitesse rectilinéaire moyenne accrue que je n'ai pu mesurer avec suffisamment de certitude mais d'environ 10 o/o supérieure aux témoins ; 2° une prolongation de la durée de chacun des types cinétiques, par exemple au temps $t_0 + 10$ minutes (voir ci-dessus), les spermatozoïdes en eau de mer ovulaire étaient encore, pour la plupart, au stade *spirales étroites* prédominant (poids de la lamelle : 0,15125 g.). Les essaims spermatiques étaient peu nombreux et groupaient peu de spermatozoïdes.

Remarque. — Les mouvements spiral et circulaire dans le sens trigonométrique laissent entendre, comme l'avait déjà suggéré WINSLOW, que le spermatozoïde doit présenter un certain gauchissement structural. On peut se demander d'ailleurs si ce profil n'est pas acquis au cours de la natation en correspondance avec un déplacement, même faible, de la pièce intermédiaire amenant une déséquilibration de la cellule spermatique.

IV. — L'allélostasie.

On sait que GRAY a émis l'hypothèse que les spermatozoïdes devaient leur immobilité dans le sperme non dilué (« dry sperm ») à un empêchement spatial réciproque conséquence de leur concentration ; il n'y a eu aucune tentative pour vérifier cette hypothèse. Je rappelle que ROTHSCHILD a montré que lorsque la tension d'oxygène devenait suffisante, les spermatozoïdes du « dry sperm » devenaient mobiles et mes expériences sur la teneur en substances réductrices du sperme ((549) et *passim*) vont dans le même sens, laissant ainsi entendre que le potentiel d'oxydo-réduction du « dry sperm » doit être bas (cf. 59) et qu'il doit en être de même dans les testicules. J'ai toutefois tenté de voir ce qu'il en était de l'hypothèse de GRAY, l'allélostasie, que l'on peut considérer comme l'inverse de l'allélocatalyse (425) (181). Ma tentative revenait à concentrer des spermatozoïdes *mobiles* (donc dilués dans de l'eau de mer) et à voir si consécutivement à cette concentration se produisait la cessation des mouvements. On pouvait penser utilement à la centrifugation mais j'étais prévenu par de nombreuses expériences *(passim)* contre cette technique qui lèse les cellules en amenant particulièrement la séparation du flagelle du reste du corps spermatique. En cherchant alors dans une autre direction je me suis appliqué à mettre en œuvre l'*ultrafiltration*.



Le montage utilisé était le suivant (cf. schéma ci-contre) : on monte un sac de collodion sur une bouteille sans fond ; de façon continue on injecte de l'*air* par le goulot en se servant d'un petit pulseur électrique (type « Bel-Bul » pour aquarium). Pendant la durée de l'ultrafiltration on plonge le sac dans de l'eau de mer constamment renouvelée ; j'ai en effet remarqué qu'une ultrafiltration à l'air ne convenait pas : les spermatozoïdes résiduels ne sont pas réanimables (les sels de l'eau de mer cristallisent en dehors du sac en le hérissant de fines aiguilles).

Résultats. — Ils dépendent, semble-t-il, de la durée de l'ultrafiltration qui chasse l'eau de mer. Ainsi examinons deux expériences :

1° Spermatozoïdes d'*Arbacia lixula* (ponte par section pendant 16 minu-

tes) (10 pontes réunies), dilution par de l'eau de mer filtrée après 2 minutes (547 γ N ♂ total/cm³ λ soit t_0). Donne des essaims avec de l'eau de mer ovulaire spécifique d'une durée de 12 minutes (eau de mer ovulaire : $\Delta\lambda_{600\ (B.M.)}^{22\ Pb\ +\ 3} = 6{,}5$). Le test de fécondation pratiqué avec 1/10 cm³ ♂/10 cm³ ♀ de 20 minutes d'une suspension renfermant environ 10.500 ♀/cm³, donne 50 o/o de stades II (et IV) après 90 minutes. Volume des spermatozoïdes à ultrafiltrer : 10 cm³ ; 0 (eau de mer) : 23° C. Début de la compression : $t_0 + 27$ minutes $= t_x$. Arrêt $t_x + 18$ heures. Alors : masse sèche et brunâtre (oxydation ?) au fond du sac ; aucun spermatozoïde mobile. Je resuspends dans 10 cm³ d'eau de mer filtrée (il faut pour cela frotter le sac à l'extérieur entre le pouce et l'index en le remplissant de quantités lentement croissantes d'eau de mer jusqu'à 10 cm³) : beaucoup de spermatozoïdes sont réanimés, la plupart sont cependant immobiles. En présence de la même eau de mer ovulaire que 18 heures auparavant (conservée à 4° C) : agglutinats microscopiques et réanimation très faible.

Fécondation (23° C ; $t_x + 18$ h. 10 mn.) selon les rapports de concentration : 1/10 cm³ ♂/10 cm³ d'une suspension âgée de 20 minutes d'ovules renfermant environ 12.000 ♀/cm³. 1° Après 50 minutes on note l'existence de gros amas ovulaires constitués par des ovules à gangue précipitée (cliché II ; le cliché III montre l'aspect d'un ovule de ce type) avec spermatozoïdes périphériques. Ces amas ne disparaissent ni spontanément ni par agitation manuelle. Après 1 h. 20 mn. aucun œuf n'est clivé, les masses sperme-ovules subsistent (elles ne sont pas dissociées après 12 heures). Le témoin montre 90 o/o de stades II.

Cette précipitation des gangues ovulaires est du type androgamone II.

2° Spermatozoïdes d'*A. lixula* (ponte par section pendant 12 minutes ; 10 pontes réunies). Dilution par de l'eau de mer après 4 minutes, soit t_x. $\Delta\lambda_{600\ (B.M.}^{1\ 50} = 29{,}5$. Eau de mer ovulaire spécifique ($\Delta\lambda_{600\ (B.M.)}^{2\ Pb\ +\ 3F} = 39$ après action trichloracétique $= 4{,}2$ avec — e. m. o. —) donne des essaims spermatiques typiques immédiats de 45 secondes.

Fécondation ($t_x + 18$ minutes ; 24° C ; 1/10 cm³ ♂/9 cm³ ♀ d'une suspension renfermant environ 8.200 ♀/cm³). Après 1 h. 20 mn. : 97 o/o de stades II et IV. Volume des spermatozoïdes à comprimer : 10 cm³ ; $t_0 = t_x + 6$ minutes (eau de mer) $= 21°$ C.

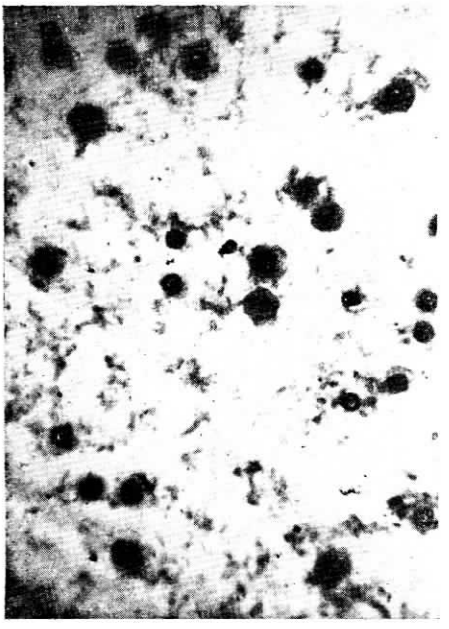
A $t_0 + 7$ h. 03 mn. : crème épaisse, spermatozoïdes très serrés mais *mobiles ;*

A $t_0 + 8$ h. 08 mn. : encore quelques spermatozoïdes mobiles ;

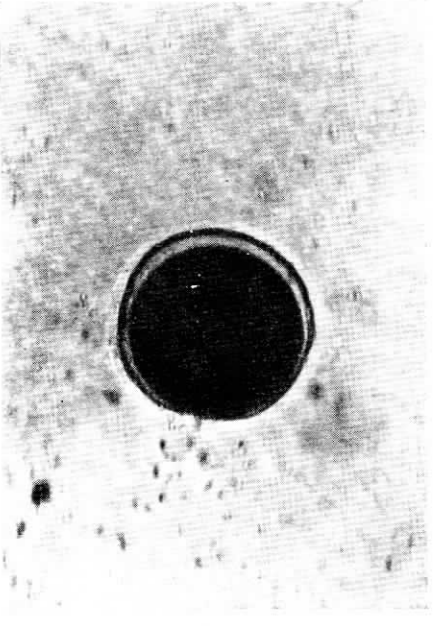
A $t_0 + 12$ h. 33 mn. : sous réserve des considérations sur la gravimétrie exposées dans le chapitre premier, humidité # 2,1 o/o. *Motilité nulle.* Action de l'eau de mer ovulaire du matin (24° C) : agrégats immédiats plus ou moins irréversibles.

A $t_0 + 12$ h. 43 mn. : dilution par l'eau de mer jusqu'à 10 cm³ amenant la *mobilisation de spermatozoïdes :* l'allure de ces mouvements est curieuse, il semble que des forces de rappel élastiques s'exercent sur les spermatozoïdes.

Fécondation ($t_0 + 12$ h. 45 mn. : 24° C ; 1 cm³ ♂/9 cm³ d'une suspension fraîche renfermant environ 10.000 ♀/cm³ immédiatement après l'adjonction du sperme le volume est amené à 20 cm³ par de l'eau de mer). Après 2 h. 30 mn. : # 85 o/o de stades II et IV. Après 7 h. 28 mn. : le développement est arrêté aux stades II et IV mais on trouve encore des spermatozoïdes mobiles dans la suspension spermatique comprimée, conservée au Bécher ouvert auprès des récipients de fécondations.



Cliché II (G # 10).



Cliché III.

Ce qui est remarquable dans cette dernière expérience c'est qu'il ne semble pas y avoir eu d'extraction importante d'androgamone II car je n'ai noté la présence d'aucune gangue précipitée et d'aucun amas ovulaire. Toutefois la viscosité du milieu paraissait élevée : forces de rappel, freinage rapide des courants cellulaires entre lame et lamelle. Cette viscosité est peut-être le fait d'une présence anormale d'acide désoxyribonucléique spermatique dans le milieu.

De l'ensemble de ces expériences, il ressort que :

— l'ultrafiltration poussée affecte l'intégrité des spermatozoïdes, réduite, elle paraît un bon moyen — voire le seul — pour reconcentrer le sperme dilué ;

— l'ultrafiltration par compression d'air pourrait apporter un argument en faveur de la théorie de l'allélostasie si l'augmentation de la viscosité du milieu redilué ne laissait pas supposer une réaction inter-spermatique non uniquement physique.

V. — La mesure indirecte de l'activité spermatique.

Nous aborderons maintenant l'examen des critères métaboliques du pouvoir fécondant qui sont liés à la quantité de spermatozoïdes vivants d'une suspension donnée, ce qui revient, pour des spermatozoïdes flagellés, à évaluer indirectement leur potentialité cinétique. J'ai pour cela utilisé la microrespirométrie selon Warburg et j'ai adapté aux spermatozoïdes d'Oursins un test qui donne des indications parallèles à celles de la respirométrie et qui, quoique moins précis, permet de rendre des services dans le problème qui nous occupe grâce à sa simplicité et à sa rapidité. Ce test est celui de la réductase qui est déjà utilisé en spermiologie de Mammifères (57) (592) (cf. 176).

Ainsi la respirométrie et l'activité réductasique constituent les deux critères que j'ai choisis comme coordonnées métaboliques du pouvoir fécondant. C'est à 5 critères cependant que je suis parvenu pour définir d'une façon nécessaire et suffisante un système spermatique, ils seront exposés et discutés dans le prochain chapitre. Je justifierai ici l'emploi des deux critères métaboliques.

1. *Respirométrie.* — Il n'y a pas toujours de relation entre la motilité spermatique des spermatozoïdes d'Oursins et leur intensité respiratoire, l'expérience de Rothschild et Tyler (637) en a administré la preuve. Mais on peut arguer que la fécondation chez les Oursins se fait normalement en aérobiose. Cependant là encore la relation n'a pas paru directe, Rothschild écrit à ce sujet (497) : « Une décroissance considérable dans l'utilisation d'oxygène peut prendre naissance sans que la motilité soit par là réduite. Robbie (1949) est venu à la même conclusion en observant l'action du cyanure sur la respiration et la mobilité des spermatozoïdes d'*A. punctulata*. L'utilisation d'oxygène n'est donc pas un indice sans équivoque de la mobilité. » Je suis en plein accord avec cette conclusion, toutefois il faut remarquer que *ce qui importe, au regard du pouvoir fécondant, c'est moins la valeur absolue et actuelle de la respiration et de la motilité des spermatozoïdes, qui est leur valeur potentielle, que leur valeur réalisée, relative au milieu dans lequel ils accomplissent leur fonction*, c'est-à-dire le

milieu ovulaire, c'est-à-dire encore, en présence de fertilisine. C'est je pense le point le plus important de toute la physiologie de la fécondation que de considérer les spermatozoïdes non seulement dans leur vie propre mais encore dans leur vie fonctionnelle dont la définition doit être quantitativement écologique. Je démontrerai ce point de vue au cours des 3 derniers chapitres de mon travail expérimental.

2. *Activité réductasique.* — Comme nous le verrons elle est parallèle à l'activité respiratoire et en conséquence passible des mêmes observations que cette activité respiratoire. En dehors de son emploi avec des spermatozoïdes de Mammifères, ROTHSCHILD a utilisé une fois la technique de THUNBERG avec des spermatozoïdes d'*E. esculentus* (657). J'entends par activité réductasique une activité enzymatique (l'action disparaît par chauffage) globale mobilisant des électrons (déshydrogénases de différents types) Pour la pratique de cette réaction, j'ai d'abord procédé en tubes Thunberg et après l'obtention d'un vide moyen (par une trompe à eau), mais j'ai finalement utilisé, sans adjonction d'agar, la technique simplifiée de FRIEDMAN et HOLLANDER (cf. 174) qui consiste à travailler avec des tubes à essais ouverts (tubes de 17) en Pyrex. En présence d'air le résultat obtenu paraît plus directement utilisable comme critère de pouvoir fécondant des spermatozoïdes d'Oursins qu'en son absence. Il faut évidemment utiliser des tubes de même taille (en hauteur et en section). Ma routine expérimentale consiste à placer d'abord 1 cm³ de la solution de bleu de méthylène (B. M.), généralement à 0,02 o/o en eau de mer filtrée, et à ajouter 1 cm³ de la suspension spermatique à éprouver en agitant constamment pendant l'adjonction cellulaire. Les tubes sont placés à une température définie et observés par transparence avec une lumière dont l'intensité, mesurée avec l'appareil « Arca », était de l'ordre de 175-300 lux. Un témoin constitué par 1 cm³ de la suspension spermatique utilisée + 1 cm³ d'eau de mer filtrée donne la teinte de décoloration. Cette décoloration est d'ailleurs partielle en opérant comme je viens de le décrire, il reste toujours une zone cylindrique surnageante bleue, dont l'épaisseur n'excède pas généralement 2 millimètres. Je note le début de la décoloration (au fond du tube : teinte grise) et la fin de la décoloration (équivalence de teinte dans la masse sous-annulaire bleue avec celle du témoin).

Limitations de la technique. — 1) Pour les suspensions spermatiques très diluées la correspondance avec la respirométrie ne peut se faire car la durée de décoloration est ou trop grande ou la décoloration nulle ;

2) la respiration et la motilité peuvent avoir cessé tandis que l'activité réductasique peut être conservée dans certaines conditions pathologiques (497) ;

3) en présence de substances colorées la technique n'est pas utilisable ;

4) quand il se produit de gros agglutinats spermatozoïdes-fertilisine, ceux-ci tombent au fond du tube, détruisent l'homogénéité de la suspension et rendent délicate l'interprétation du temps de décoloration.

Remarques. — 1) Ni l'eau de mer ovulaire ni la fertilisine purifiée d'*A. lixula* ou de *P. lividus* ne se sont trouvées posséder une activité réductrice vis-à-vis du bleu de méthylène en eau de mer ou en eau bidistillée de la concentration de 0,2 o/o à celle de 0,001 o/o ;

2) A 0,02 o/o en eau de mer, le bleu de méthylène ne gêne pas la formation des agglutinats typiques spermatozoïdes-fertilisine ; les spermatozoïdes restent

mobiles ce qui est en accord avec les observations de G. et T. Hertwig (271) qui montrent que ce colorant ne détruit pas le pouvoir fécondant ;

3) un autre critère métabolique aurait pu être mis en œuvre, celui de la catalase par exemple. Je l'ai pris en considération dans un assez grand nombre d'expériences mais j'ai préféré sérier les critères et m'en tenir aux activités respiratoires et réductasiques, qui sont fondamentales et liées, plutôt que de multiplier des indices qui ne trouvent pas une justification pratique certaine.

Applications. — A. — L'expérience exposée ici ne vise pas à établir une relation métabolique-pouvoir fécondant, elle constitue un exemple de *fiche signalétique* d'une suspension spermatique ; de plus elle traite de la question du rôle pro-respiratoire de l'échinochrome en relation avec ses propriétés gamonales (cf. historique).

Protocole. — 1) Spermatozoïdes d'*A. lixula* obtenus par ponte chimique (10 mâles) et lavés une fois par de l'eau de mer (centrifugation à 1.200 tours/minute

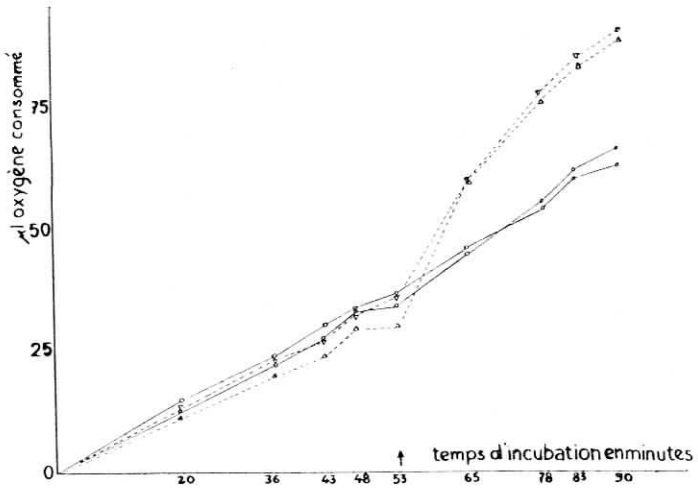


Fig. VII.

pendant 10 minutes : spermatozoïdes mobiles après re-suspension) ; suspension âgée de 112 minutes au début de l'expérience : $\Delta^{1'10}_{\lambda 470\,(K)} = 435$.

1 cm³ de cette suspension spermatique à l'âge de 420 minutes décolore 1 cm³ d'une solution de bleu de méthylène (0,02 o/o en eau de mer) + 1 cm³ d'eau de mer en 3 mn. 40 s. à 24° C tandis qu'elle le décolore en 2 mn. 55 s. en présence de 1 cm³ d'eau de mer ovulaire renfermant 16 γ N ♀ total/cm³ ; 1 cm³ de cette suspension spermatique libère 168 mm³ O_2 après 5 minutes d'incubation à 28° C en présence de 2 cm³ de perborate de sodium à 1,5 o/o, pH 8.

2) Substances mises en jeu :

— contrôles : eau de mer (1 cm³ renfermant 5,6 γ N total) ;

— fertilisine d'*A. lixula* extraite par l'acide trichloracétique N/2 et décolorée par 4 dialyses successives contre de l'eau douce (pH 7,3) puis de l'eau de mer courantes en présence d'acide trichloracétique (1 cm³ = 1.96 γ N ♀ total) ;

— fertilisine d'*A. lixula* provenant de la première extraction trichloracétique

(des ovules) et dialysée contre de l'eau douce puis contre de l'eau de mer courantes (1 cm³ = 3 γ N ♀ total : $\Delta_{\lambda 310\,(B.)} = 240$).

3) Conditions :
— température du thermostat : 25° C ;
— soude à 30 o/o : 3/10 cm³ ;
— gaz : air ;
— vitesse d'agitation : 100 cycles/minute.
La figure VII indique les résultats.

Ainsi, on ne peut noter de différences significatives (par rapport à l'azote) entre l'accroissement de la consommation d'oxygène des spermatozoïdes sous l'influence de la fertilisine spécifique très colorée et décolorée. Ceci montre que :

1° l'échinochrome n'a pas de rôle pro-respiratoire contrairement à ce que Friedheim avait avancé ; Lederer avait déjà classé délibérément (337) l'échinochrome dans les colorants sans fonction respiratoire ;

2° l'activation métabolique des spermatozoïdes d'*A. lixula* sous l'action de la fertilisine spécifique ne paraît pas devoir être attribuée à l'échinochrome.

Je souligne que cette démonstration n'a pu être apportée que grâce à l'emploi de mes préparations de fertilisine trichloracétique d'extraction ovulaire qui sont très riches en échinochrome *stable* et pouvant être aisément éliminé.

B. — *Action de milieux anormaux pour les spermatozoïdes sur leur activité réductasique :*

1) *Action de l'eau bidistillée* : soit ($\theta = 23°$ C) :

a) des spermatozoïdes d'*A. lixula* (ponte par section, 3 mâles) âgés de 300 minutes au moment des essais : $\Delta^{1\,5}_{\lambda 470\,(K.)} = 266$;

b) de la fertilisine décolorée d'*A. lixula* ($\Delta^{2\,Pb\,+\,3\,F}_{\lambda 470\,(K.)} = 154$) *en eau bidistillée* (donc agglutinant irréversiblement les spermatozoïdes d'*A. lixula* (cf. p. 34) ;

c) une solution de bleu de méthylène (B. M.) à 0,02 o/o en eau bidistillée :
Le système 1 cm³ B. M. + 1 cm³ H_2O bidist. + 1 cm³ ♂ est décoloré en 18 minutes.
Le système 1 cm³ B. M. + 1 cm³ fertilisine + 1 cm³ ♂ est décoloré en 22 minutes.
Le système 1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ est décoloré en 5 minutes.

2) *Action du liquide périviscéral* (ponte par KCl) ♂ âgés de 156 minutes au moment des essais ($\Delta^{1\,5}_{\lambda 470\,(K.)} = 71$) ;
eau de mer ovulaire de *P. lividus* ($\Delta^{2\,Pb\,+\,3\,F}_{\lambda 470\,(K.)} = 105$) ;
bleu de méthylène à 0,02 o/o en eau de mer ;
liquide cavitaire frais (< 15 minutes après l'extraction du corps de deux animaux (♂) par découpage du péristome) :
— 1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂, décoloration en 16 minutes ;
— 1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂, décoloration en 11 minutes ;
— 1 cm³ B. M. + 1 cm³ liquide périviscéral + 1 cm³ ♂, décoloration en 23 minutes.

C. — *Détermination de la purification trichloracétique de la fertilisine.*
Soit ($\theta = 24°$ C) ;

— des spermatozoïdes d'*A. lixula* (ponte par section) âgés de 190 minutes après dilution par de l'eau de mer et au moment des essais ($\Delta_{\lambda 470\,(K.)}^{1/10} = 325$) ;
— de l'eau de mer ovulaire d'*A. lixula* telle que 1 cm³ renferme 84 γ N ♀ total/cm³ ;
— de la fertilisine trichloracétique décolorée par 12 dialyses successives (la dernière contre de l'eau de mer) et telle que 1 cm³ renferme 7 γ N ♀ total/cm³ ;
— une solution de bleu de méthylène à 0,02 o/o en eau de mer.
On trouve que :
— 0,5 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ est décoloré en 10 minutes ;
— 0,5 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ est décoloré en 6 mn. 45 s. ;
— 0,5 cm³ B. M. + 1 cm³ fertilisine + 1 cm³ ♂ est décoloré en 6 mn. 30 s.

Donc : pour une vitesse de décoloration du même ordre, par rapport à la teneur en azote total, la fertilisine d'extraction trichloracétique était 12 fois plus active que l'eau de mer ovulaire *quant à l'activation de la propriété réductasique du sperme.*

TABLEAU V

Systèmes	Temps		
	$t_0 + 15$ minutes	$t_0 + 1$ h. 54 mn.	$t_0 + 2$ h. 41 mn.
Spermatozoïdes non lavés : ($\Delta_{\lambda 470\,(K.)}^{1/10} = 325$).	Réductase : 8 minutes, fertilisine : agglutinats de 80 secondes.	Réductase : 3 minutes, fertilisine : agglutinats de 85 secondes.	Réductase : 4 minutes, fertilisine : agglutinats de 48 secondes.
Spermatozoïdes lavés.	0 fois : *Id.*	1 fois : Réductase : 2 mn. 40 s., fertilisine : gros agglutinats de 120 secondes : ($\Delta_{\lambda 470}^{1/10} = 300$).	2 fois : Réductase : 3 mn. 50 s., fertilisine : agglutinats *irréversibles*, ♂ immobiles : ($\Delta_{\lambda 470}^{1/10} = 350$).

Systèmes	Temps		
	$t_0 + 3$ h. 22 mn.	$t_0 + 5$ h. 18 mn.	$t_0 + 7$ h. 22 mn.
Spermatozoïdes non lavés : ($\Delta_{\lambda 470\,(K.)}^{1/10} = 325$).	Réductase : 4 minutes, fertilisine : agglutinats de 50 secondes.	Réductase : 5 minutes, fertilisine : agglutinats de 40 secondes.	Réductase : 6 minutes, fertilisine : agglutinats de 20 secondes.
Spermatozoïdes lavés.	3 fois : Réductase : 8 minutes, fertilisine : agglutinats irréversibles. ($\Delta_{\lambda 470}^{1/10} = 270$).	4 fois : Réductase : 8 minutes, fertilisine : agglutinats irréversibles. ($\Delta_{\lambda 470}^{1/10} = 310$).	5 fois : Réductase : 23 minutes, fertilisine : agglutinats irréversibles. ($\Delta_{\lambda 470}^{1/10} = 298$).

D. — *Influence de la centrifugation et de l'ultrafiltration sur l'activité réductasique des spermatozoïdes.*

1) *Centrifugation.* — Spermatozoïdes d'*A. lixula* de ponte chimique, dilués par de l'eau de mer à t_0 ($\Delta\gamma_{\lambda 470\,(K.)}^{1/10} = 325$), 20 cm³ centrifugés à chaque fois ($\vartheta = 24°$ C) ;

— centrifugeuse électrique à attelage mobile (r (repos) = 17 centimètres) ; vitesse : 4.700 tours/minute ; durée de chaque centrifugation 15 minutes ;

— bleu de méthylène (B. M.) à 0,02 o/o en eau de mer.

Un lavage est constitué par une suite d'opérations telle que : centrifugation, décantation du surnageant, remise en suspension rapide dans de l'eau de mer en agitant légèrement avec un agitateur en verre Pyrex.

N. B. — La concentration spermatique n'est pas réajustée exactement à la valeur initiale de façon à effectuer les essais le plus tôt possible après la remise en suspension. La comparaison des vitesses de décoloration, des densités optiques et de l'agglutinabilité rend cependant l'ensemble de l'expérience suffisamment démonstrative. Le tableau V relève les résultats.

Conduite des tests ($\vartheta = 24°$ C) :

— Réductase : 0,5 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ ;

— agglutinabilité : 1 cm³ ♂ + 1 cm³ fertilisine d'*A. lixula* à 9,2 γ N ♀ total/cm³ :

— action du succinate de sodium 0,1 N (pH ≠ 8) ; à t_0 + 10 h. 09 mn.

1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ lavés 5 fois ($\Delta\gamma_{\lambda 470}^{1/10} = 298$) : 51 minutes ;

1 cm³ B. M. + 1 cm³ succinate + 1 cm³ ♂ lavés 5 fois ($\Delta\gamma_{\lambda 470}^{1/10} = 298$) 41 minutes.

Conclusions. — J'ai démontré ainsi que les centrifugations lèsent les spermatozoïdes. Il existe une succinodéshydrogénase mais je n'ai pu la mettre en évidence dans des spermatozoïdes intacts et frais.

2) *Ultra-filtration.* — Par exemple, avec la préparation spermatique qui a fait l'objet de l'étude de concentration par compression (p. 60), l'activité réductasique, à 23° C et à t_0 + 16 minutes (donc avant compression) était, pour un système : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o en eau de mer + 1 cm³ ♂, ce que montre le tableau VI.

TABLEAU VI

	Début de la décoloration	Fin de la décoloration
Tubes de 17 (étroits) . . .	95 secondes	210 secondes
Tubes de 19 (larges) . . .	150 secondes	270 secondes

Après 18 heures de compression, la durée de décoloration, dans les mêmes conditions qu'initialement, était indifféremment en tubes larges ou étroits : 23 minutes (début)-26 minutes (fin).

Conclusions. — L'ultra-filtration prolongée lèse donc les spermatozoïdes comme on avait pu le constater autrement (p. 60), et le test de la réductase est probant bien qu'en toute rigueur la remise en suspension de spermatozoïdes longuement ultra-filtrés ne donne pas des suspensions de même homogénéité que la suspension initiale.

De l'ensemble des expériences dont il a été fait état ici, on peut conclure que le test de la réductase est utilisable comme test de vitalité des spermatozoïdes d'Oursins.

CHAPITRE V

GÉRONTOMÉTRIE SPERMATIQUE

> La mort n'est donc pas inhérente à la vie et ne peut l'être puisqu'elle en est la négation. La vie est éternelle pour autant que les conditions favorables du milieu se maintiennent constantes. La mortalité d'un Métazoaire est un accident de culture, si l'on ose s'exprimer ainsi, due aux lentes altérations de son milieu interne. D'abord favorable à la prolifération des cellules aux stades embryonnaires, il s'intoxique lentement et précocement pendant la croissance, limite la prolifération des cellules qui se différencient et se spécialisent, ralentit progressivement leurs activités et finit par les suspendre, de telle sorte que l'organisme suit un cycle qui se répète inéluctablement, le conduit à la vieillesse puis à la mort inexorable. Dans une certaine mesure, les cellules germinales échappent à cette mortalité somatique.
>
> P. Brien,
> *La pérennité somatique.*

Depuis un siècle (1846) que les biologistes pratiquent des fécondations artificielles chez les Oursins, on ne s'est que peu inquiété de définir l'âge des suspensions spermatiques utilisées, qui constitue pourtant un des facteurs essentiels conditionnant le succès des fécondations. La cause en est sans doute dans ce fait que les embryologistes emploient « d'instinct » des suspensions fraîches, encore que cela ne soit généralement pas précisé. Il n'existe aucun travail préconisant l'utilisation d'indications métriques permettant de caractériser l'état des spermatozoïdes en relation avec leur pouvoir fécondant. Or il est urgent d'en venir là car le sperme est un système particulièrement labile, et il est urgent de le faire en toute rigueur puisque aussi bien les travaux de Goldforb ou de Lillie ne sont que semi-quantitatifs et d'ailleurs unilatéraux.

La labilité spermatique m'est apparue dans toute son ampleur lorsque l'activité catalasique a été suivie (549). Je reproduis figure VIII les courbes exprimant la cinétique de l'activité catalasique apparente de suspensions de spermatozoïdes d'*A. lixula* de concentrations et d'âges différents. L'activité catalasique a été dosée par la technique de Feinstein que j'ai modifiée avec T. Gustafson (549). Incubation à 27° C ; les chiffres placés en regard de chaque point indiquent l'âge en minutes, au moment du dosage de la suspension spermatique considérée, compté depuis la dilution par l'eau de mer. Les courbes Δ 19,5 et Δ 49,2 sont obtenues avec le même « dry sperm » de base.

On voit que chaque suspension spermatique est un cas d'espèce, il est important de remarquer que les spermatozoïdes sont obtenus et conservés en vases Borrel ouverts sans précaution aseptique. Ces résultats rendent douteuse la signification des calculs de Rothschild (501) qui conduisent à estimer le nombre de molécules de catalase par spermatozoïde.

Etant reconnu qu'il est fondamental de définir les coordonnées essentielles d'un système instable, pour les spermatozoïdes d'Oursins je propose de retenir les cinq critères de vitalité suivants :

— respirométrie,
— activité réductasique,
— motilité (examen microscopique entre lame et lamelle),
— sensibilité à la fertilisine,
— pouvoir fécondant (pourcentage d'œufs fécondés).

Remarques. — 1) Les deux premiers critères de vitalité ont été discutés

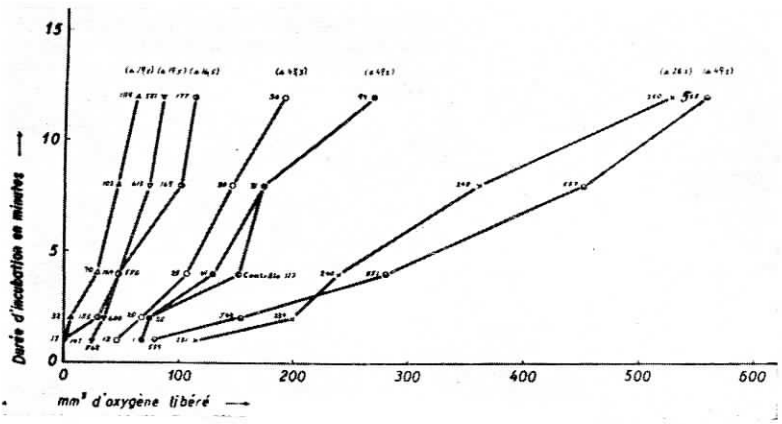


Fig. VIII.

dans le chapitre précédent, et je n'insisterai pas. Quant à la motilité elle doit être examinée à différents grossissements le plus rapidement possible après le recouvrement par la lamelle ; un examen généralement qualitatif suffit.

2) Le test (sensibilité à la fertilisine) porte à la fois sur l'agglutinabilité du sperme et sur sa mobilisation sous l'influence de la fertilisine, on doit donc procéder à des observations de durée d'agglutinats ainsi qu'à des observations microscopiques de motilité (pour ce dernier examen la technique des trois gouttes doit être appliquée). Le test de durée d'agglutination est valable ici puisque d'une part la concentration en fertilisine doit être déterminée par ailleurs (en azote total et en basophilie) et, amené à constater des variations considérables de la durée d'agglutination pour des spermatozoïdes d'une même suspension, il est nécessaire d'en faire état en quelque sorte à rebours.

3) Dans des études comme celles qui font l'objet de mon travail le test du pouvoir fécondant est un moyen et, en tant que moyen, je me suis appliqué à n'utiliser que des suspensions à nombre connu d'ovules *fraîchement pon-*

dus et lavés de façon à me trouver à l'abri des modifications temporelles ; en tant que fin, j'ai examiné aussi le comportement d'ovules d'âge divers en présence de spermatozoïdes frais ou âgés. Car dans la détermination du pouvoir fécondant entrent non seulement en considération l'état des spermatozoïdes, non seulement leur nouvelle activité en présence de fertilisine, mais encore l'état des ovules qu'ils vont rencontrer.

Ainsi Tyler estime la durée de survie des spermatozoïdes d'Oursin en se fondant sur la motilité de ceux-ci *dans* leurs suspensions et il spécule sur leur pouvoir fécondant à partir de cet état. Or, j'insiste sur ce point, *des spermatozoïdes peuvent être immobiles dans une suspension placée dans des récipients donnés et des spermatozoïdes aliquotes peuvent être mobiles dans d'autres récipients.* De plus, *des spermatozoïdes peuvent être immobiles dans plusieurs types de récipients et redevenir mobiles dans de l'eau de mer renfermant de la fertilisine (parfois même seulement dans de l'eau de mer).* Les faits exposés dans ce chapitre et dans le suivant le montreront.

Enfin Tyler procède à des fécondations-témoins sans indiquer l'âge des spermatozoïdes-témoins (nous supposerons qu'ils étaient fraîchement pondus) mais surtout, sans indiquer l'âge des ovules (âge depuis la ponte et âge depuis la mise en suspension dans l'eau de mer). Or pour des expériences de survie spermatique, dont certaines durent plusieurs dizaines d'heures on ne peut, comme je le montrerai, utiliser les mêmes ovules pour les tests de fécondation ; dès lors, dans ces contrôles, l'utilisation de différentes suspensions ovulaires fait que chacune ne proviendra pas des mêmes animaux, que chacune n'aura pas le même âge (à moins d'en être prévenu et de le spécifier), chacune n'aura pas la même concentration ovulaire et pas la même concentration en fertilisine. Toutes ces variables font que le comportement d'une même suspension spermatique à ses âges successifs ne sera pas le même, ce qui influera sur la valeur des pourcentages d'ovules fécondés. En conclusion comme on ne peut procéder qu'à l'aide de *témoins relatifs* il est nécessaire de connaître les variables essentielles et de les déterminer au moment du test ou à défaut, et en le spécifiant, avant ou après.

Technologie du tube a essai : la notion de milieu ouvert

Si on reprend le problème du récipient on suit une démarche qui est à peu près de l'allure suivante : pour contenir des fluides, on se sert de récipients de différentes formes et matières, et, s'ils se trouvent ouverts par un côté, c'est seulement pour pouvoir les remplir, c'est d'une évidence naïve ; cependant on ne s'inquiète généralement pas de la surface libre ainsi offerte au liquide. Si donc la forme du conditionnement relève surtout d'un souci pratique (par exemple récipient de Bécher, d'Erlenmeyer), le souci de l'échantillonnage fait surtout rechercher que l'échantillon ne se dissipe pas et en conséquence le récipient est construit de façon à pouvoir être le plus hermétique possible ; dans la mesure où il s'agit de stocker des solutions stables, le problème est ainsi bien résolu mais dès qu'il s'est agi de conserver des matières putrescibles le problème s'est compliqué et il a fallu que Pasteur indiquât les attributs

fondamentaux du récipient. On s'est aussi inquiété des substances photosensibles (obscurité ou verre coloré), des substances thermolabiles (utilisation du froid), on s'est inquiété des impuretés provenant de la dissolution du récipient (acide sulfurique et récipient en plomb, utilisation de verres neutres, paraffinage intérieur, récipients en matières plastiques). En définitive il semble que la préoccupation essentielle ait été le contenant, la manière de limiter spatialement un fluide en le plaçant à l'abri de l'évaporation, des fuites, au plus de la contamination microbienne. Or dès que l'on aborde l'étude de systèmes évoluant en milieu liquide (et les organismes vivants sont un bon exemple de tels systèmes), le problème du récipient se complique de la considération suivante :

Un système enzymatique est un système dynamique et c'est un système en milieu fondamentalement aqueux (on pourrait dire que la biochimie est un chapitre particulier de la chimie de l'eau) ; en conséquence à moins d'offrir à ce système un récipient fermé de très grandes dimensions doué d'une bonne agitation, le substrat ne tardera pas à s'épuiser d'une part par consommation et en libérant d'autre part des produits qui tendront à stopper la réaction enzyme-substrat. Dans des systèmes multi-enzymatiques où le produit d'une réaction devient le substrat d'une autre, pour conserver le système dans un état permanent, il faudra subvenir constamment à la fourniture du substrat primaire et assurer l'élimination des produits ultimes de l'économie enzymatique. Dans le cas des cellules le problème est du même ordre.

Donc pour adapter le récipient à un système dynamique, il convient de l'ouvrir non seulement, semble-t-il, vers le côté de la phase gazeuse mais encore et surtout vers celui de la phase liquide. Et pour l'ouvrir tout en le contenant, on disposera une membrane semi-perméable plongeant dans la phase aqueuse circulante ; c'est ce que j'ai réalisé avec le dialyseur sous pression contrôlée. Mais dans cet appareil la phase gazeuse est confinée. Pour parer à cet inconvénient j'ai supprimé toute phase gazeuse libre en plaçant les cellules dans des sacs de collodion fermés de façon à ne plus laisser place à un espace gazeux, ces sacs sont immergés dans le milieu choisi constamment renouvelé. Dans de telles conditions, l'aération du milieu se fait par l'oxygène dissous dans le liquide et l'élimination des produits du métabolisme s'effectue par dialyse sauf pour des produits macromoléculaires (PM $>$ 2.000).

Deux cas sont d'ailleurs à considérer :

1) La suspension cellulaire est mise en dialyse vraie, de sorte que les cellules survivent jusqu'à l'épuisement métabolique accéléré par l'élimination physico-chimique des substrats exogènes et endogènes. C'est le *milieu ouvert* qui conduit à l'*inanition* des cellules. Il s'agit bien d'une *inanition* et non d'un repos (« resting ») car les cellules ont acquis cet état zéro en suivant une activité réelle quoique décroissante et ceci plus ou moins brusquement, elles se sont *épuisées* et se trouvent dans un état pré-lytique ; l'état de repos existe aussi pour les spermatozoïdes, c'est celui qui est conditionné par le stockage en milieu fermé aéré, état qui sera également considéré dans mon travail ;

2) on peut au contraire *fournir* constamment les métabolites essentiels qui assureront la survie — dans le cas de cellules non proliférantes comme les spermatozoïdes — ou la multiplication. Il s'agit alors d'un *milieu renouvelé*. Dans le cas des spermatozoïdes il n'a été fait aucun travail de cet ordre et je

n'ai pu encore m'y consacrer car le problème revient à déterminer en premier lieu les facteurs essentiels du métabolisme spermatique, ce qui constitue en soi un travail monographique de longue durée.

En règle dans mes études en milieu ouvert le montage consistait :

En une paire de bonbonnes couplées de 12 litres de capacité chacune ; leurs bases étaient situées au-dessus du niveau des sacs de collodion immergés dans des récipients à double ouverture ; la pression était réglée à l'aide de vis de pression ; le débit était réglé par une bouteille à niveau ; l'eau de mer utilisée était filtrée sur papier Chardin ; les sacs de collodion renfermant les spermatozoïdes étaient placés à l'obscurité ou à une lumière ne dépassant jamais 150 lux (mesure faite au luxmètre « Arca »).

Mesure du vieillissement spermatique

Protocole I.

1) Spermatozoïdes d'*A. lixula* (ponte par section : 10 h. 15 mn. ; pontes de 14 mâles rassemblées). Dilution par de l'eau de mer filtrée à 10 h. 35 mn. $= t_0$; concentration : 703 γ N total/cm³, soit *SM* ;

On fait 2 dilutions : SM/4 et SM/10, soit en tout 3 préparations. On en fait 2 parts de chaque :

— une placée dans des flacons jaugés de 25 cm³ fermés par bouchons rodés siliconés, soit *clos* (cl.) ;

— une placée en sac de collodion sans phase gazeuse (sacs de 25 cm³ également), soit U.

Chaque série cl. et U est immergée dans un même bac $\theta = 24{,}5°$ C.

2) Eau de mer ovulaire d'*A. lixula* (1 cm³ = 0,0204 mg. N ♀ total).

3) Test de la réductase : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o en eau de mer + 1 cm³ ♂ ($\theta = 25°$ C). Quand 2 chiffres sont marqués, il s'agit pour le premier, du début de la décoloration, et pour le second de la fin. Quand il n'y a qu'un chiffre, celui-ci correspond à la décoloration achevée.

Les agglutinats ont été observés au grossissement 25.

Le tableau VI synthétise les résultats.

Annexes au tableau.

I. 14 h. 40 mn. 1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ $SM_{cl.}$: 180 secondes.
1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ $SM_{cl.}$: 140 secondes.

14 h. 48 mn. 1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ $SM/4_{cl.}$: 210 secondes.
1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ $SM/4_{cl.}$: 300 secondes.

14 h. 56 mn. 1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ $SM/10_{cl.}$: 14-19 minutes.
1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ $SM/10_{cl.}$: 17-23 minutes.

15 h. 30 mn. 1 cm³ B. M. + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ SM/4 U. : 270-300 secondes.
1 cm³ B. M. + 1 cm³ de mer ovulaire + 1 cm³ SM/4 U : 300-360 secondes.

II. Courbe respirométrique (faite à 18 h. 40 mn. avec l'appareil de Warburg selon la routine) servant de contrôle au test de la réductase (dans chaque

TABLEAU

			t_0	11 h. 25 mn.	12 h. 07 mn.	14 h. 07 mn.	14 h. 25 mn	15 h. 50 mn.	16 h. 00 mn.
	U	Sensibilité à l'agglutination par la fertilisine :	Temps de latence : 10 s.. gros amas « plus d'une heure » (1).	Amas de 60 s.				Petits amas avec 60 s. de latence, durée : 5 mn.	
SM		Réductase :	90 s.				75-90 s.		130 s.
	cl.	Sensibilité à l'agglutination par la fertilisine :	»						
		Réductase :	»		90 s.				
	U	Sensibilité à l'agglutination par la fertilisine :	Amas immédiats de 160 s (1).						Amas immédiats durant 120 s. (1).
SM/4		Réductase :	135-240 s.		215-300 s.				
	cl.	Sensibilité à l'agglutination par la fertilisine :	»	Amas de 150 s.				Amas immédiats, durée 80 s.	
		Réductase :	»	180 s.	180-270 s.				
	U	Sensibilité à l'agglutination par la fertilisine ·	Amas de 150 s.						
SM/10		Réductase :	350-540 s.						
	cl.	Sensibilité à l'agglutination par la fertilisine :	»	Amas de 150 s. (2)					
		Réductase :	»			600-700 s.			

(1) Le terme de l'agglutination est souvent difficile à saisir car il persiste des micro-amas il faut se fonder et de ceux sur lesquels il ne faut pas se fonder. Le cliché IV montre l'aspect de tels

(2) Ces amas de type « roues » de Sampson (553) semblent apparaître surtout avec des suspensions

VI

16 h. 25 mn.	17 h. 10 mn. 30 s.	18 h. 05 mn.	18 h. 53 mn.	19 h. 35 mn. 45 s.
	Gros amas de 3 mn.			Agglutination de 60 s.
	130 s.		140-180 s.	
	30 s. de latence, durée 30 mn.			Pratiquement pas d'agglutination.
	130 s.		180 s.	
		Petits amas immédiats de 60 s. : amas irréversibles.		Agglutination de 60 s.
	Petits amas de 53 s. (1).	Amas à auréoles (2) de 40 s.		
	235-400 s.			
Amas de 30 s.				Agglutination de 40 s. + amas irréversibles.
8-14 mn.				14-16 mn.
Amas de 15 s.				Agglutination de 20 s.
12-14 mn.			16-24 mn.	

Cliché IV
G # 100

indissociés après un temps très long et la difficulté réside dans l'estimation des amas sur lesquels
micro-amas.
spermatiques diluées.

récipient 1 cm³ de sperme ; dans chaque diverticule 1 cm³ d'eau de mer ou d'eau de mer ovulaire) $\theta = 31°$ C (fig. IX).

Faits nouveaux et conclusions. — L'activité réductasique et l'agglutinabilité décroissent avec le temps. Donc, on ne peut utiliser une unité de fertilisine fondée sur la durée d'agglutination voire sur la dilution limite d'agglutination, sans préciser l'âge des spermatozoïdes utilisés.

Remarques. — 1) En présence d'eau de mer ovulaire il y a dans certains cas inhibition du pouvoir réductasique et de la respiration des spermatozoïdes.

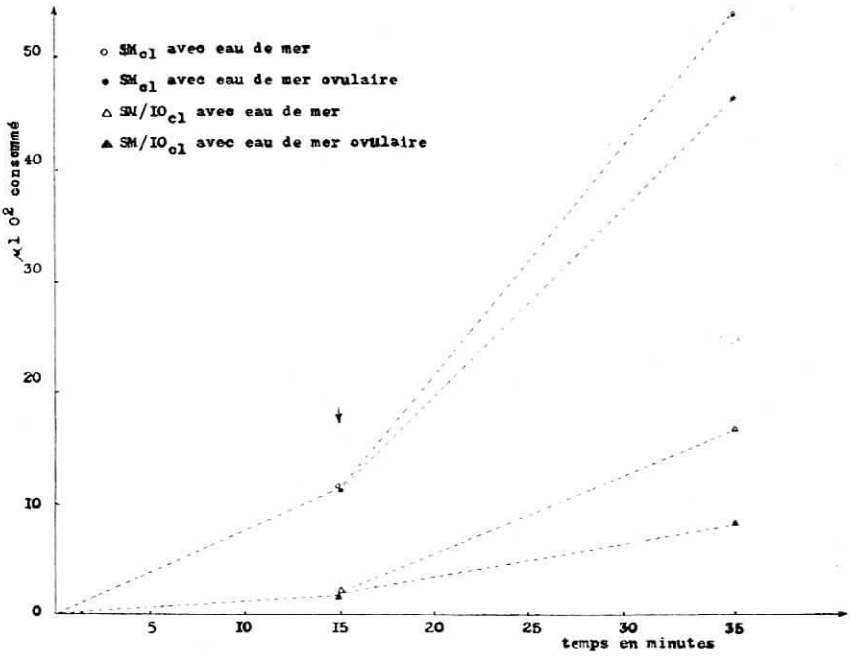


Fig. IX.

Cette observation rejoint celles d'Hayashi et de Spikes. Cette eau de mer ovulaire était très « forte ». Une expérience de fécondation faite avec SM, SM/4 et SM/10$_{cl}$ et U (à 20 heures) n'a donné aucun clivage, la concentration en azote total de l'eau environnant les ovules était peu différente de celle de l'eau de mer ovulaire utilisée dans les expériences rapportées dans le tableau.

2) Dans cette expérience relativement de courte durée les spermatozoïdes dilués placés en milieu ouvert (♂ U) marquent un léger avantage sur les spermatozoïdes placés en milieu clos (SM/10).

Protocole II.

1) Spermatozoïdes d'*A. lixula* (ponte par section). Dilution par de l'eau de mer 5 minutes après la fin des pontes (10 mâles) $= t_0$ ($\Delta^{1/50}_{\lambda 600\,(B.M.)} = 20{,}5$) ; $\theta = 23°$ C.

On fait deux parts de 25 cm³ :
1) l'une est placée en tubes de 22 fermés ;
2) l'autre dans le dialyseur sous pression contrôlée.
Motilité (à t_0) : +.
Réductase (1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂) (tableau VII).

TABLEAU VII

	t_0	t_0 + 1 heure	t_0 + 1 h. 35 mn.	t_0 + 5 h. 40 mn.
U	3 à 4 mn.	4 mn.	4 mn. 30 s.-5 mn. 30 s.	7 mn. (15 s.) 9 mn. (15 s.)
cl.	—	4 mn.	5-7 mn.	7-9 mn.

	t_0 + 7 heures	t_0 + 14 h. 30 mn.	t_0 + 18 h. 15 mn.	t_0 + 22 heures	t_0 + 27 heures
U	♂ immobiles 32 mn.	46-53 mn.	36-42 mn.	17-23 mn.	20-30 mn. odeur putride légère
cl.	± 31 mn. ; 50 o/o ♂ immobiles	29-35 mn.	29 mn. 30 s. et 36 mn. des ♂ immobiles, pas d'odeur putride nette.	17-23 mn.	10-16 mn.

Conclusion. — Un facteur important vient semble-t-il de faire son apparition ; *l'infection microbienne*, et vraisemblablement uniquement bactérienne. Il est possible que l'infection intervienne en partie dans les courbes de l'activité catalasique (augmentation de l'activité apparente par vieillissement, cf. p. 69) ; chez les spermatozoïdes de Mammifères, BLOM et CHRISTENSEN (40) ont trouvé que par vieillissement, les suspensions montrent une activité catalasique accrue attribuable à la prolifération bactérienne.

Protocole III.

Spermatozoïdes d'*A. lixula* obtenus par ponte chirurgicale (10 mâles ; durée des pontes 12 minutes) ; après 5 minutes, dilution par de l'eau de mer filtrée ($\Delta^{1/50}_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 29{,}5$) soit t_0.

Eau de mer ovulaire d'*A. lixula* « forte » : long contact eau de mer-ovules frais (2 heures à 24° C) avec un petit volume d'eau de mer (10 pontes ovulaires rassemblées et environ 25 cm³ d'eau de mer) ;

$\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)}$ { — 3 cm³ eau de mer ovulaire + 2 cm³ protéines basiques de sperme d'*A. lixula* stock (68,88 γ N total/cm³) : 10,3.
— Témoins : 5,5 ; d'où eau de mer ovulaire = 4,8.

Sensibilité des spermatozoïdes à cette eau de mer ovulaire (24° C ; t_0 + 28 minutes) : agglutinats typiques de 6 minutes, après quoi il reste encore de petits amas plus ou moins irréversibles.

Réductase (24° C : t_0 + 28 minutes) :
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ : 233 secondes.
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ : 293 secondes.
Contrôle avec eau de mer ovulaire « affaiblie » (« forte » (4,8) diluée 10 fois) ; 24° C ; t_0 + 40 minutes :
1 cm³ B. M. 0,02 + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ : 180 secondes.
1 cm³ B. M. 0,02 + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ : 210 secondes.

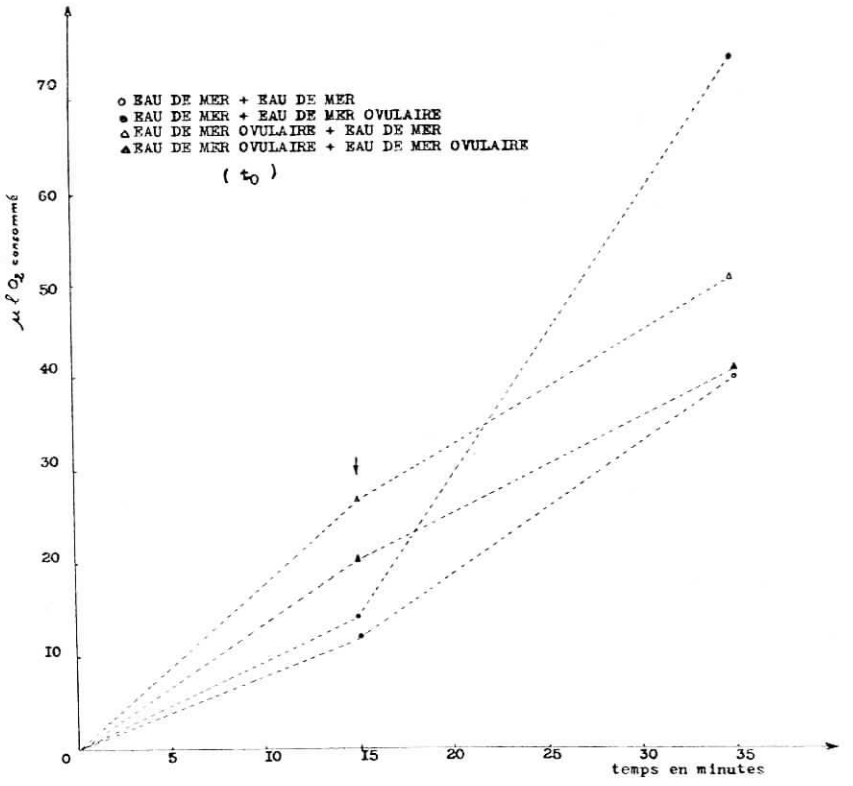


Fig. X.

Respirométrie. — La figure X synthétise les résultats d'une expérience faite à 22,5° C en présence de : 1 cm³ ♂ + 1 cm³ eau de mer ou eau de mer ovulaire (compartiment central + 2/10 cm³ NaOH à 30 o/o) + 1 cm³ eau de mer ou eau de mer ovulaire dans le diverticule, à l'instant initial t_0 + 1 h. 18 mn.

— La figure XI synthétise les résultats d'une expérience identique mais faite à l'instant t_0 + 7 h. 43 mn.

N. B. — L'adjonction primaire d'eau de mer ou d'eau de mer ovulaire à la suspension de spermatozoïdes placés dans le compartiment central était faite entre t_0 + 58 minutes et t_0 + 63 minutes. Pour la conservation des spermatozoïdes : 200 cm³ de la suspension intérieure en récipient de Borrel ouvert en verre de Bohème de diamètre intérieur = 24 millimètres ; 0 = 24° C.

Réductase à $t_0 + 7$ *h. 21 mn.* (*24° C*) :
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ # 8 minutes.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire (« forte ») + 1 cm³ 8 minutes.

Motilité (24° C) : très faible à $t_0 + 8$ h. 33 mn., la plupart des spermatozoïdes étant immobiles.

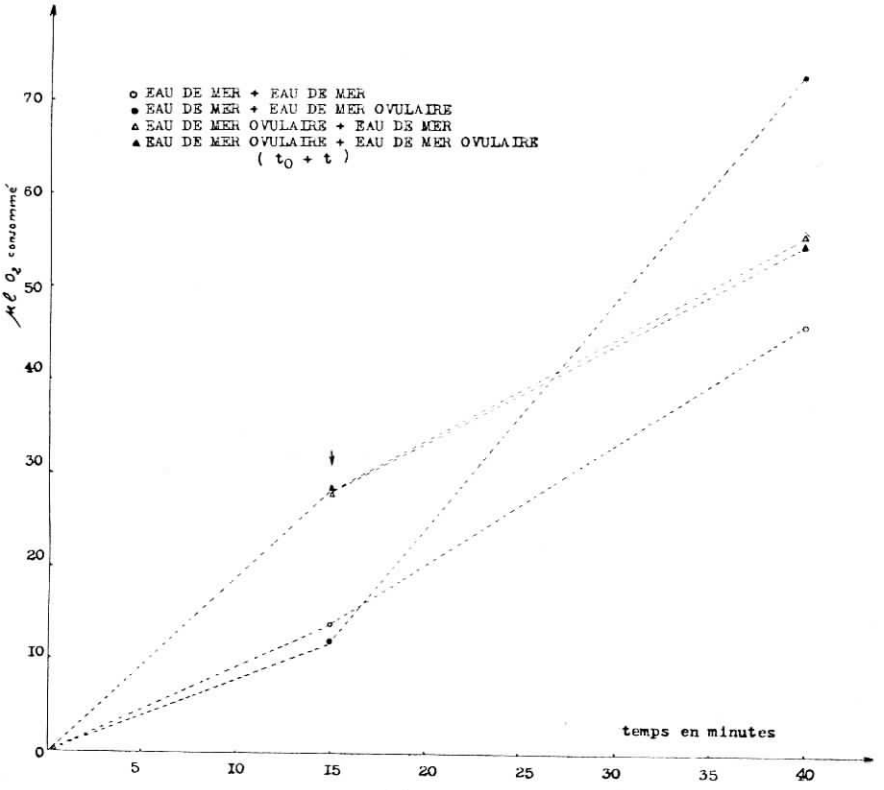


Fig. XI.

Action de l'eau de mer ovulaire « forte » ($t_0 + 7$ heures ; 24° C) : aucun agglutinat typique, amas diffus de spermatozoïdes immobiles.

Pouvoir fécondant ($t_0 + 8$ h. 06 mn. ; 24° C). Suspension ovulaire âgée de 3 heures renfermant environ 2.000 ♀ par centimètre cube (ponte par section) : 37 o/o de stades divers où prédominent LXIV, XVI, II.

Faits nouveaux et conclusions. — 1) La conservation diminue la vitalité spermatique ;

2) l'eau de mer ovulaire diminue l'activité réductasique des spermatozoïdes quand ceux-ci sont très frais ; il est possible qu'en ce cas l'agglutination prime sur l'activation et que cela tende à devenir l'inverse après vieillissement ;

3) l'effet de dilution n'existe pas pour des spermatozoïdes désagglutinés après l'action d'eau de mer ovulaire « forte » et ceci que la dilution soit faite avec de l'eau de mer ou avec de l'eau de mer ovulaire « forte » (l'effet de dilution se caractérise par des courbes dont la concavité est dirigée vers le haut) ;

4) le cas particulier de la dilution par de l'eau de mer ovulaire de spermatozoïdes désagglutinés (courbe 3) montre que les spermatozoïdes ne sont pas réactivables globalement par l'eau de mer ovulaire « forte » après une première action de celle-ci. Si l'effet de dilution secondaire (ROTHSCHILD) est le fait d'ions bivalents comme Cu^{++}, mes expériences s'accordent avec celles de TYLER qui considère que la fertilisine peut avoir un effet chélateur. Ceci tendrait de plus à montrer que l'activation du métabolisme respiratoire des spermatozoïdes, sous l'influence de l'eau de mer ovulaire, quand cette activation existe, serait une activation vraie non dépendante de l'effet de dilution. Cependant une autre interprétation pourrait considérer qu au contraire, la fertilisine ayant fixé des ions comme Cu^{++}, on aurait ainsi concentré les effets de ces ions sur des spermatozoïdes soumis à l'action de la fertilisine avec pour résultat l'accroissement du métabolisme respiratoire spermatique. Dans un tel état de chose, l'existence, dans la fertilisine, d'une substance activatrice indépendante de la glycoprotéine, existence qui n'a pas encore été prouvée dans les préparations de fertilisine hautement purifiée, se trouverait même douteuse. L'expérience *princeps* consisterait à examiner les actions respiratoires et dynamogènes d'une eau de mer ovulaire préparée avec de l'eau de mer artificielle privée de Cu^{++}, Zn^{++}, etc.

Protocole IV.

— Spermatozoïdes d'*A. lixula* (pontes réunies de 8 mâles, obtention par section du test, durée de la ponte 10 minutes) dilution immédiate par de l'eau de mer (630 γ N ♂ total/cm³) soit t_0.

Motilité : +

Réductase : t_0 + 5 minutes 25° C.

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ : 90-120 secondes.

On constitue deux lots de 25 cm³ chacun :

1) *clos* (éprouvette de 50 cm³ fermée par bouchon de verre rodé et siliconé), soit *cl* ;

2) *ouvert* (sac de collodion sans phase gazeuse), soit U qu'on place côte à côte dans de l'eau de mer courante ($\theta = 22°$ C à t_0 + 15 minutes).

Respirométrie (30° C : 1 cm³ de suspension spermatique dans le récipient central + 2/10 cm³ NaOH à 30 o/o et 1 cm³ d'eau de mer dans le diverticule).

La figure XII montre l'allure de la respiration spermatique à t_0 + 20 minutes.

A t_0 + 24 heures ($\theta = 25°$ C) :

Odeur : cl. : ? ; U = 0. Les spermatozoïdes de U se sont décantés, ceux de *cl.* ne l'ont été que très peu.

Motilité : cl. : nombreux spermatozoïdes très mobiles ;

U : spermatozoïdes mobiles en moins grand nombre.

Sensibilité à l'eau de mer ovulaire.

cl. : agglutinats irréversibles (cliché V) ;

U : pratiquement pas d'agglutinats.

Réductase (t_0 + 24 h. 10 mn. ; 25° C) :

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ cl. : 5 mn. 30 s.-7 mn.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ U : 11-14 minutes.

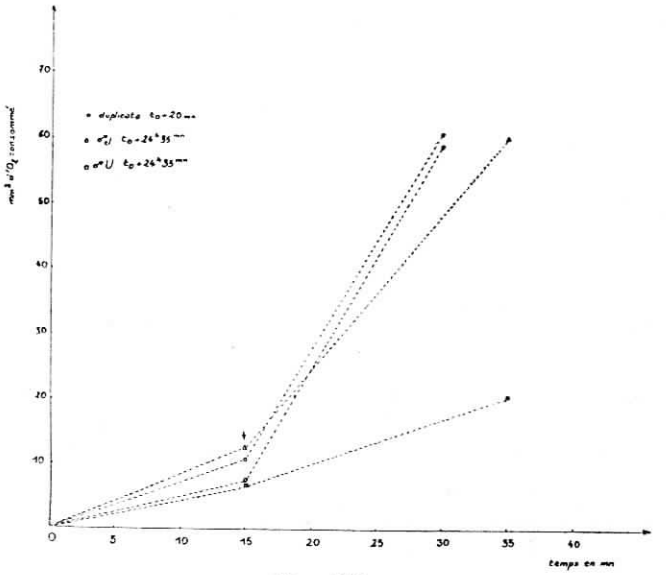
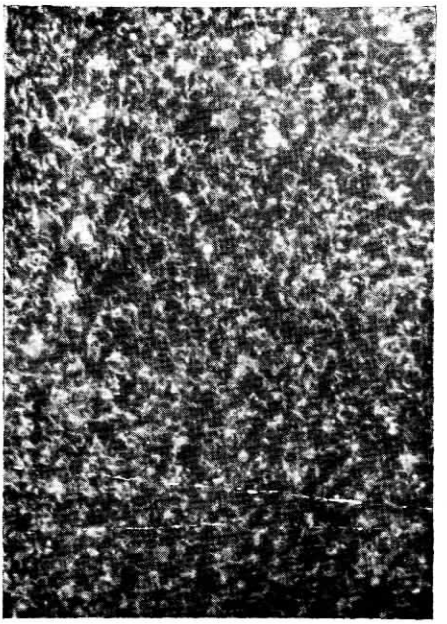


Fig. XII.



Cliché V (G # naturelle).

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ cl. : 8-10 minutes.
— 1 cm³ B. M 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ U : 30-40 minutes.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ cl. : 6 mn. 30 s.-9 mn.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ U : 30-40 minutes.

Respirométrie (30° C) ; selon routine à $t_0 + 24$ h. 35 mn. ce qui signifie comme toujours en ce cas : moment de la fermeture du robinet de communication avec l'extérieur après 10 minutes d'égalisation thermique (cf. fig. XII).

Fécondation (0 = 25° C) ; rapport de concentrations des gamètes 1 cm³ ♂/ 9 cm³ ♀ frais lavés d'une suspension renfermant 8.000 ♀ au centimètre cube) (tableau VIII).

TABLEAU VIII

$t_0 + 24$ h. 37 mn.	$t_0 + 25$ h. 15 mn.	$t_0 + 26$ h.	$t_0 + 26$ h. 18 mn.
♂ U × ♀	50 o/o d'œufs à gangues précipités du type figuré sur le cliché III	*id.*	*id.*
♂ cl. × ♀	0	Stades II et IV	± 42 o/o stades IV, VIII et XVI avec nombreux clivages irréguliers

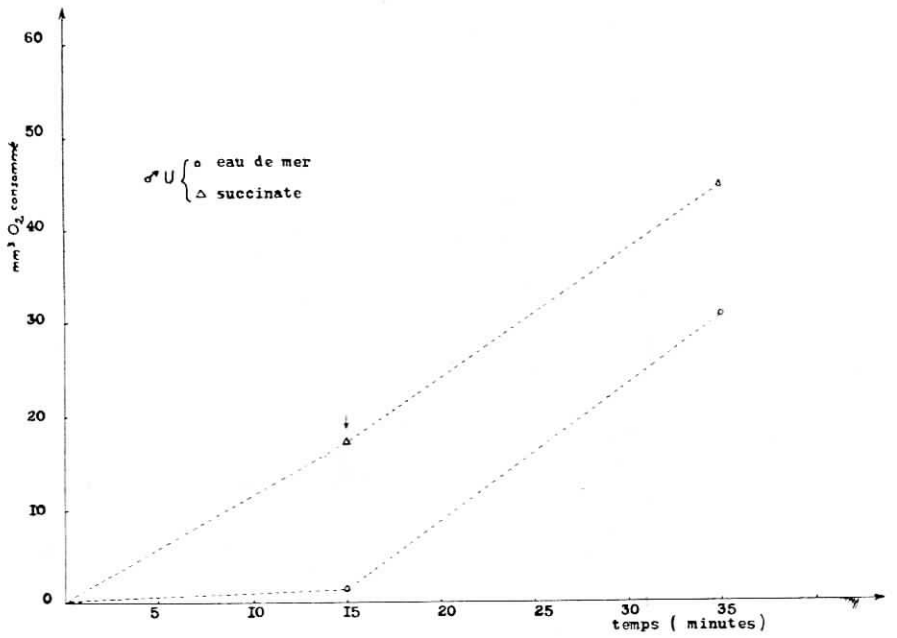


Fig. XIII.

Remarques. — D'autres essais contemporains m'ont montré que l'action des ♂ U est immédiate : *les œufs s'agglutinent entre eux et leurs gangues se révèlent.*

Essai de réanimation des ♂ U par le succinate :
1) *Réductase* (t_0 + 26 h. 05 mn. ; 25° C) :
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + cm³ ♂ U : 18 minutes.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ succinate de sodium à 1 o/o en eau de mer (pH 8) + 1 cm³ ♂ U : 17 minutes.
2) *Respirométrie* (t_0 + 26 h. 17 mn. avec ♂ U : 30° C ; 1 cm³ ♂ U + 1 cm³ eau de mer ou succinate Na 1 o/o en eau de mer pH 8 dans le récipient + 2/10 cm³ NaOH 30 o/o et 1 cm³ eau de mer dans le diverticule) (fig. XIII).
3) *Motilité* ♂ U + succinate de sodium de 0,5 à 0,1 o/o (concentration finale) en eau de mer pH 8 : aucune mobilisation.
Faits nouveaux et conclusions. — 1) Une dialyse de 24 heures sensibilise les spermatozoïdes. L'exhaustion des substrats conduit à la *lyse cellulaire* : la libération de l'androgamone II par les ♂ U, amenant la précipitation de la gangue ovulaire et l'agglutination subséquente des œufs, atteste la lésion des spermatozoïdes ;
2) le succinate agit sensiblement comme sur des spermatozoïdes centrifugés (cf. chapitre IV) le succinate paraît donc constituer un substrat normal du sperme d'*A. lixula.*
3) les ♂ U en présence de succinate ne montrent pas d'effet de dilution.

Protocole V.

— Spermatozoïdes d'*A. lixula* (ponte de 20 mâles par section latitudale des tests). Dilution par de l'eau de mer filtrée après 10 minutes (520 γ N ♂ total/cm³), soit t_x.

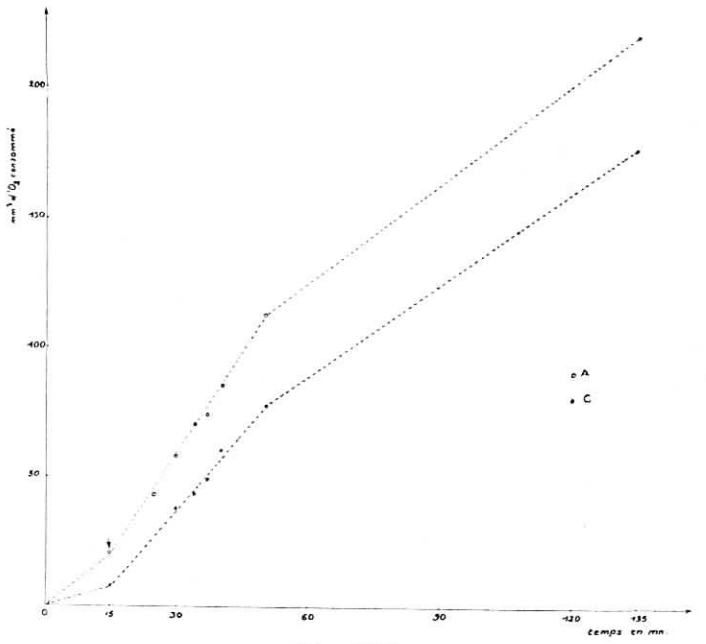


Fig. XIV.

40 cm³ de cette suspension-mère sont divisés en 4 lots :

A) 10 cm³ ♂ + 10 cm³ d'eau de mer filtrée en dialyseur (montage sac-support avec phase gazeuse : # 10 cm³).

B) 10 cm³ ♂ + 10 cm³ eau de mer filtrée en milieu clos (flacon de 25 cm³ bouché à l'émeri).

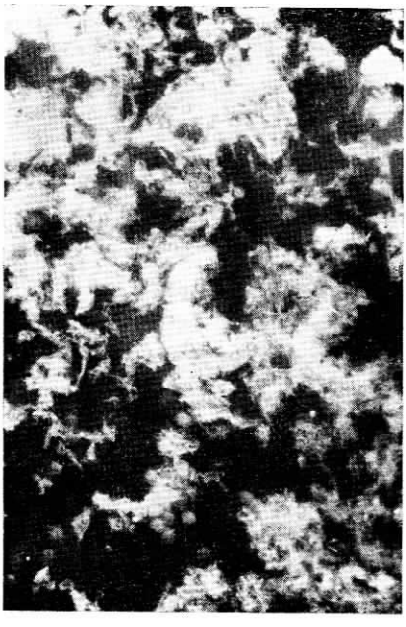
C) 10 cm³ ♂ + 10 cm³ eau de mer ovulaire d'*A. lixula* en dialyseur comme A.

D) 10 cm³ ♂ + 10 cm³ d'eau de mer ovulaire d'*A. lixula* en milieu clos (comme B).

A $t_x + 27$ minutes $= t_0$, on place A, B, C et D, dans des bacs à eau de mer courante ($\theta = 21°$ C).

— 1 cm³ d'eau de mer ovulaire = 0,0282 mg. N ♀ total (pour mémoire : 1 cm³ eau de mer = 0,0196 mg. N total).

Cliché VI



Cliché VII (G # 10).

Sensibilité des spermatozoïdes à l'eau de mer ovulaire ($\theta = 25°$ C ; $t_x + 7$ minutes) : agglutinats typiques de 2 minutes.

Motilité ($\theta = 25°$ C ; $t_x + 1$ h. 12 mn.) : effective partout.

Réductase ($\theta = 25°$ C ; $t_x + 1$ h. 19 mn.) :

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ A : 3-4 mn. 30 s.

— 1 cm³ B.M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ C (désagglutinés) ; 3 mn. 30 s. (4 mn. 30 s.-5 mn.)

Respirométrie ($\theta = 30°$ C ; $t_0 + 6$ minutes ; 1 cm³ ♂ + 2/10 cm³ NaOH 30 o/o, diverticule :

1 cm³ eau de mer filtrée) (fig. XIV).

Fécondation (0,1 cm³ ♂/1.800 ♀ frais/cm³ ; $t_0 + 23$ minutes) : environ 85 o/o de stades II après une heure avec A, B, C et D.

A $t_0 + 24$ heures : (25° C) :

Odeur putride : A = 0 mais B, C, D ±.

Motilité : nulle partout, avec un doute pour C.

Action de l'eau de mer ovulaire spécifique (t_0 + 24 h. 30 mn.) :

A : gros grumeaux, spermatozoïdes immobiles ;

B : agglutinats fusiformes et plus ou moins bouclés (cf. cliché VI), spermatozoïdes mobiles ;

C : gros amas spermatiques irréversibles, spermatozoïdes immobiles (cliché VII) ;

D : agglutinats très lents à se former (temps de latence 50 minutes), irréversibles, spermatozoïdes mobiles.

Remarque. — Si, dans des fractions aliquotes de C et de D respectivement, on ajoute des spermatozoïdes frais d'*A. lixula*, *on obtient des agglutinats typiques* à spermatozoïdes mobiles.

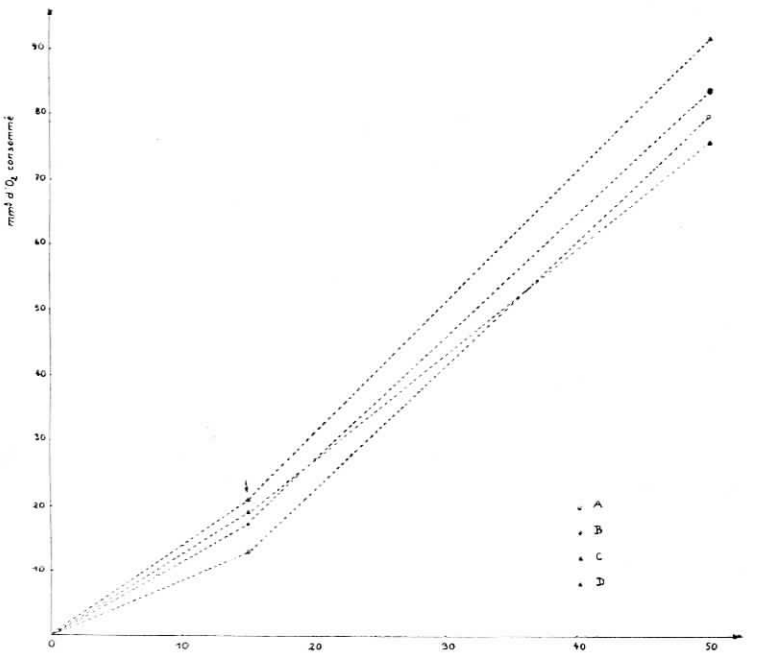


Fig. XV.

Réductase (t_0 + 24 h. 25 mn.) :

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ A : 9-12 minutes.

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ B : 9-13 mn. 30 s.

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ C : 7-10 minutes.

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ D : 13-16 mn. 30 s.

Respirométrie ($\theta = 30°$ C ; t_0 + 24 h. 45 mn. ; 1 cm³ ♂, 2/10 cm³ NaOH 30 o/o, 1 cm³ eau de mer filtrée dans chacun des 4 diverticules) (fig. XV).

Fécondation ($\theta = 25°$ C ; t_0 + 25 heures) selon : 2 cm³ ♂/2 cm³ d'une suspension ovulaire fraîche d'*A. lixula* amenée à 25 cm³ avant fécondation par de l'eau de mer filtrée, concentration finale : environ 2.500 ♀ par centimètre cube ; résultats lus après une heure :

A) des œufs englobés dans des amas spermatiques irréversibles à spermatozoïdes immobiles (absence de gangues précipitée) ; des spermatozoïdes libres mobiles ; pas plus de 0,5 o/o de stade II ;

B) *idem ;*

C) aspect général identique mais on ne trouve pas de spermatozoïdes libres. Aucun clivage ;

D) *idem ;*

E) (♂ frais) : 60 o/o de stades II, spermatozoïdes mobiles.

Remarques. — 1) a $t_0 + 26$ heures : présence de paramécies en A. Absence en B, C et D.

2) Je n'ai pu réanimer A et C en les plaçant en présence de liquide séminal (surnageant de centrifugation : 15 minutes à 9.000 tours par minute) provenant de sperme frais d'*A. lixula* dilué dans de l'eau de mer ($\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)}^{1/50} = 48$) ayant servi aux fécondations témoins.

Faits nouveaux et conclusions. — 1) Les spermatozoïdes placés sans précaution aseptique pendant 24 heures en milieu ouvert en présence d'eau de mer ovulaire se conservent le mieux du point de vue respiratoire et réductasique mais leur pouvoir fécondant disparaît ;

2) les spermatozoïdes conservés en milieu ouvert ou clos en présence d'eau de mer ovulaire peuvent se réagglutiner par de l'eau de mer ovulaire *mais cette agglutination est devenue irréversible ;* c'est là un nouvel exemple d'une agglutination irréversible obtenue par la fertilisine en eau de mer ;

3) les spermatozoïdes après conservation en milieu clos et en eau de mer s'agglutinent en formation bouclée ;

4) après agglutination par de l'eau de mer « moyenne » les spermatozoïdes peuvent être activés, du point de vue respiratoire, par cette même eau ovulaire ;

5) on est conduit à admettre que la conservation modifie les spermatozoïdes biochimiquement et morphologiquement tout au moins dans leur surface et que la fertilisine « moyenne » paraît être désorbée d'une façon enzymatique ou autre (ce qui n'est pas le cas avec la fertilisine « forte » (cf protocole III)) ;

6) l'influence du récipient se manifeste, on peut le nommer *effet flacon*.

CHAPITRE VI

LA CONSERVATION DES GAMÈTES PONDUS

> Oh ! qui me dira comment au travers de l'existence ma personne tout entière s'est conservée, et quelle chose m'a porté, inerte, plein de vie et chargé d'esprit, d'un bord à l'autre du néant ?
>
> VALÉRY, *A. B. C.*

Au cours du dernier chapitre, la conservation des gamètes a déjà été examinée mais l'absence de conditions aseptiques limitait cette conservation à quelques heures seulement, c'est tout au moins l'impression qui s'était dégagée de ces séries d'expériences que l'infection était un des principaux facteurs limitants. Cette contamination bactérienne met en cause l'ensemble des résultats des anciens auteurs sur la survie des spermatozoïdes d'Oursins, à l'exception toutefois des travaux de FISCHER ; pour le sperme âgé elle met également en cause la validité des tests respirométrique et réductasique tels que je les ai proposés et appliqués jusqu'ici. Cependant du point de vue du pouvoir fécondant ces derniers tests ne sauraient être suffisants comme je l'ai déjà indiqué. Dans ces conditions on pourrait considérer que lorsque les tests métriques métaboliques cessent d'être applicables la prise en considération des tests biologiques peut apporter à défaut des points de repère. Mais une suppléance par des tests biologiques ne permet pas la définition d'une suspension spermatique âgée. Or un des problèmes que je me suis proposés était de définir d'une façon rigoureuse ce qu'on pourrait appeler le vieillissement absolu des spermatozoïdes d'Oursins, c'est-à-dire l'évolution temporelle des cellules spermatiques indépendamment d'une compétition avec des cellules bactériennes donc indépendamment des dégradations antibiotiques. Pour cela on peut penser utiliser le froid, mais alors les spermatozoïdes eux-mêmes ne se trouvent pas dans des *conditions* de vie active et c'est ce problème de la vie fonctionnelle qui a le plus grand intérêt biologique. Pour atteindre cet objectif j'ai utilisé de la pénicilline et c'est donc le *vieillissement aseptique* qui sera expérimenté au cours de ce chapitre.

I. — La conservation des ovules.

Ce problème de la conservation aseptique des ovules pondus d'Oursins n'a jamais été traité, or il est très important à beaucoup d'égards de l'examiner ne serait-ce que pour définir les limites de ce qu'on nomme la « fraîcheur ». Le problème est ici facilité par la possibilité de laver avec rapidité les ovules sans les détériorer (technique par décantation).

Protocole 1.

A) *Spermatozoïdes d'*A. lixula :

1) *frais* utilisés pour l'expérience une heure après leur dilution par de l'eau de mer filtrée, pénicillinée à 100 u./cm³ ;

($\Delta\lambda_{600\ (B.\ M.)}^{1/50} = 60$) Pénicilline-G, sel de sodium ;

2) *conservés* 54 heures en milieu ouvert à 22,5° C (sac de collodion de 15 cm³ sans phase gazeuse, immersion dans de l'eau de mer filtrée, pénicillinée à 100 u./cm³, renouvelée constamment, débit : 100 cm³/335 secondes) ; $\Delta\lambda_{600\ (B.\ M.)}^{1/50} = 60$.

B) *Ovules d'*A. lixula :

1) *frais*, utilisés pour l'expérience une heure après leur premier contact avec de l'eau de mer filtrée, pénicillinée à 100 u./cm³ : trois lavages par décantation ; suspension finale pour la fécondation renfermant environ 6.700 ♀ par centimètre cube ; eau de mer ovulaire telle que $\Delta\lambda_{600\ (B.\ M.)}^{3\ Pb\ +\ 2\ F\ (trichl.)} = 21$ (témoins déduits comme toujours dans ce cas) ;

2) *conservés* 54 heures en milieu aéré à 22,5° C (verre Borrel de 50 millimètres de diamètre, 10 centimètres de haut) en présence d'eau de mer filtrée, pénicillinée à 100 u./cm³, renferment environ 7.000 ovules/cm³ eau de mer ovulaire telle que $\Delta\lambda_{600\ (B.\ M.)}^{3\ Pb\ +\ 2\ F\ (trichl.)} = 28$.

N. B. — Tous les gamètes ont été obtenus par ponte chirurgicale.

Fécondation en boîte de Petri de diamètre intérieur = 98 millimètres :

1 cm³ ♂ + 10 cm³ suspension ovulaire ($\theta = 23°$ C).

Le tableau IX résume les résultats obtenus après 1 h. 30 mn.

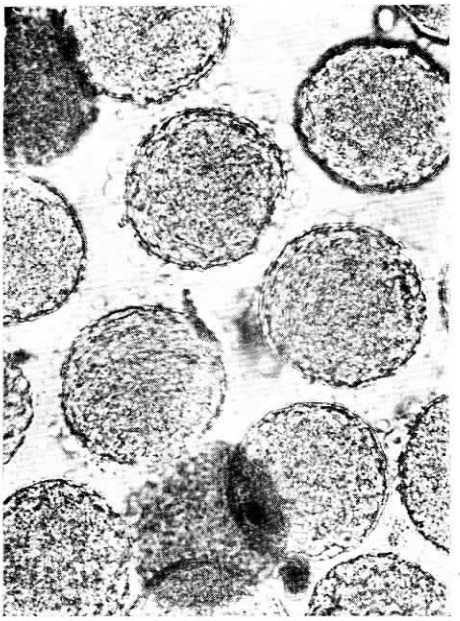
TABLEAU IX

♀ \ ♂	1	2
1	Moins de 60 o/o de stades II.	Moins de 10 o/o de stades II.
2	Pas de clivages, beaucoup d'œufs présentent des extrusions arrondies et transparentes du type : VIII.	Pas de clivages, nombreux amas œufs-spermatozoïdes, nombreux œufs présentant des extrusions du type : $♂_1/♀_2$.

Conclusions. — 1) Les ovules perdent leur fécondabilité plus vite que les spermatozoïdes leur pouvoir fécondant ;

2) la présence d'extrusions cytoplasmiques peut toutefois indiquer que de tels ovules sont pénétrables par les spermatozoïdes mais qu'ils ont perdu plus spécialement leur faculté de se cliver (érosion membranaire facilitant la polyspermie ?).

Annexe. — J'ai pu obtenir de telles extrusions en traitant (à 23° C) des ovotides d'Oursins par de l'eau de mer renfermant NaCl à 1/3 saturation (pendant 1 minute) ; l'adjonction de 1/5 d'éthanol à 95° (pendant 5 minutes)



Cliché VIII.

ne modifie pas l'aspect. Le cliché VIII montre le résultat de tels traitements sur des ovotides de *P. lividus*. L'interprétation que l'on peut suggérer est celle que Runnström (519) envisage pour la formation de la membrane de fécondation où intervient un gonflement de la membrane vitelline et des granules corticaux.

Protocole II.

Ont été utilisés : des ovules d'*A. lixula* pondus par section du test (temps t_0), lavés trois fois par décantation avec de l'eau de mer filtrée et pénicillinée à 100 u./cm³ ; la suspension finale renfermait environ 1.000 ♀/cm³.

Le tableau X indique les résultats obtenus à 21° C avec des suspensions pratiquement extemporanées de spermatozoïdes.

TABLEAU X

♂ *A. lixula*			♀ *A. lixula*		
Age en heure	Δ λ 600 mμ	Eau de mer ovulaire prélevée à l'instant de la fécondation $\Delta_{\lambda 600}$ 3 Pb + 2 e. m. o. (B. M.)	Age	o/o fécondations lecture après 3 heures	Remarques
1	75,6	4	1 heure	98 o/o Stades II, IV et VIII	
1	71	5	9 h. 40 mn.	95 o/o Stades II et IV	
1	80	7	23 h. 25 mn.	65 o/o Stades II, IV et VIII	On décante et ramène ensuite au volume qui était celui de 23 h. 25 mn. en se servant d'eau de mer fraîche filtrée, pénicillinée à 100 U./cm³.
1	63	2	23 h. 30 mn.	30 o/o Stades II à XXXII	
1	74	6	49 h. 30 mn.	40 o/o Stades II à XVI plus ou moins anormaux	
1	68	8	73 h.	12 o/o Stades II et IV	Changement standard de l'eau de contact (environ 1.300 ♀/cm³).
1	74	3	78 h.	4 o/o Stades II et irréguliers (III et VII)	

Conclusions. — 1) Avec des ovules d'*A. lixula*, en renouvelant l'eau de mer de contact rendue antibactérienne, la fécondabilité peut se conserver quelque temps mais elle est aléatoire en ce sens que le pourcentage de clivages est irrégulier et dépend, semble-t-il, de l'état des spermatozoïdes utilisés. En se plaçant dans mes conditions d'expériences il semble toutefois que pendant une durée d'une dizaine d'heures (depuis la ponte), une même suspension ovulaire peut être utilisée pour des recherches en biologie ;

2) on ne saurait tirer une relation claire liant la *fécondabilité* à la concentration de l'eau de mer ovulaire, constatation qui rejoint celle d'ELSTER sans doute. Il faut d'ailleurs remarquer que pour des durées de conservation excédant 24 heures on ne saurait dire dans quelle mesure la présence éventuelle de produits de lyses ovulaires ne vient pas perturber ces dosages particuliers que sont les fécondations ;

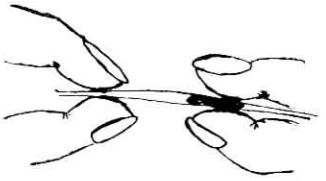
3) il ne faut pas perdre de vue dans l'interprétation de la sensibilité au vieillissement des ovules pondus en eau de mer que ceux d'Oursins suivent, tant qu'ils ne sont pas fécondés, un métabolisme constamment asphyxique.

II. — La conservation des spermatozoïdes pour microscopie.

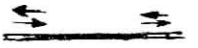
On sait qu'entre lame et lamelle les spermatozoïdes d'Oursins en eau de mer ne se conservent pas, ils gonflent après quelques heures à la température du laboratoire et toute morphologie finit par disparaître. L'usage des fixateurs rend de grands services mais ils peuvent conduire, comme l'acide acétique ou la chaleur (frottis) à des artefacts. J'ai cherché à conserver la morphologie des spermatozoïdes d'Oursins dilués dans de l'eau de mer en les collant

1) déposer une microgoutte sur la face collante de la cellophane adhésive ;

2) recouvrir d'une couche de cellophane adhésive, partie collante vers la goutte ;



3) presser doucement à l'endroit de la goutte ;



4) coller par déplacements longitudinaux (les spermatozoïdes s'immobisent immédiatement).

Fig. XVI.

entre deux épaisseurs d'une cellophane adhésive (type « Adertex »). J'ai constaté qu'après 15 jours à 20° C moyen la plupart des spermatozoïdes étaient encore intacts. En présence d'une goutte de Lugol, après un mois à 20° C, tous les spermatozoïdes sont intacts, voici comment j'opère (fig. XVI).

D'une façon plus générale, je me suis arrêté à cette technique pour la conservation des spermatozoïdes fixés et colorés car ces préparations présentent l'avantage d'être incassables, légères et peu encombrantes.

Pour l'observation on peut procéder de deux façons :

1) sur deux bords opposés de la préparation découpée à la dimension voulue, on colle deux étiquettes sur lesquelles on pourra inscrire les différentes indications relatives à l'objet microscopique ; on fixe la préparation sous le microscope en la plaçant sur une lame porte-objet et en la tenant appliquée par les étiquettes avec deux valets métalliques flexibles ;

2) on fixe sur une lame porte-objet un cadre en carton ouvert sur un côté et par lequel on glisse la cellophane qui se trouve ainsi, appliquée au verre (schéma fig. XVII). On peut observer à l'immersion.

N. B. — J'ai pu étendre ce procédé aux frottis d'hématies séchés à l'air. Mais je n'utilisais plus alors de cellophane adhésive, les étalements étaient faits sur pellicule de collodion, la préparation étant recouverte d'une autre pellicule et les deux pellicules étaient soudées sur leur tranche au collodion. Je pense qu'un tel procédé pourra être étendu à la confection de toute préparation de cytologie et d'histologie microscopique et que des montages de cette sorte pourront servir à la projection comme des photographies.

Le support est constitué par un fragment de film au triacétate de 1/4/100

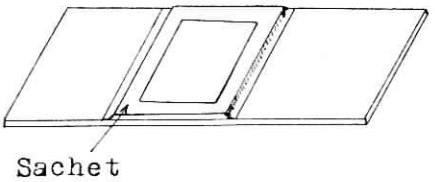


Fig. XVII.

et 16 millimètres, non substraté et non perforé; soudure au collodion à l'éther à 5 o/o (Je dois ce support à la Maison Kodak-Pathé à la Direction de laquelle j'adresse tous mes remerciements).

III. — Le vieillissement aseptique des spermatozoïdes.

Définissons d'abord quelques termes. En milieu renouvelé idéal, « milieu permanent », les spermatozoïdes ne vieilliraient pas dans la mesure où ils seraient à chaque instant identiques à eux-mêmes, les spermatozoïdes seraient *en survie* continue. Cette « immortalité » *physiologique* du germen reste à obtenir et l'ensemble de l'appareil et de son milieu constituerait une *spermathèque sensu stricto*.

Dans la mesure où les spermatozoïdes se modifient en *perdant* de leurs attributs structuraux et métaboliques, ils sont *en vieillissement*, c'est une survie à bilan négatif. Le problème que je me suis posé en premier lieu et qui se trouvera traité ici est de limiter les processus cataboliques en inhibant au mieux les agressions microbiennes. Dans un tout autre ordre d'idées Tyler et Rothschild (637) ont utilisé de la pénicilline à 10 u./cm³; cette concentration s'est toutefois avérée insuffisante pour des expériences de longue durée comme j'ai pu le constater à la suite d'essais préliminaires. Finalement j'ai choisi la concentration de 100 u./cm³ (j'ai d'ailleurs constaté qu'à 500 u./cm³ la pénicilline n'inhibe pas la motilité des spermatozoïdes d'*A. lixula*). La pénicilline que j'ai mise en œuvre était la forme G, sel de sodium (produits « Roussel » et « Spécia » indifféremment).

Protocole I.

— Spermatozoïdes d'*A. lixula* (ponte par section, 4 mâles ; durée de la ponte 5 minutes). Dilution par de l'eau de mer filtrée à 100 u./cm³ 3 minutes après soit t_0 ($\Delta\gamma^{1/50}_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 17$).

— Eau de mer ovulaire : $\Delta\gamma^{2\ Pb\ +\ 3\ F\ (trichl.)}_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 24$

Agglutinabilité (t_0 + 12 minutes ; 25° C) : identique en présence ou en absence de 100 u. de pénicilline par centimètre cube : petits agglutinats typiques de 35 secondes.

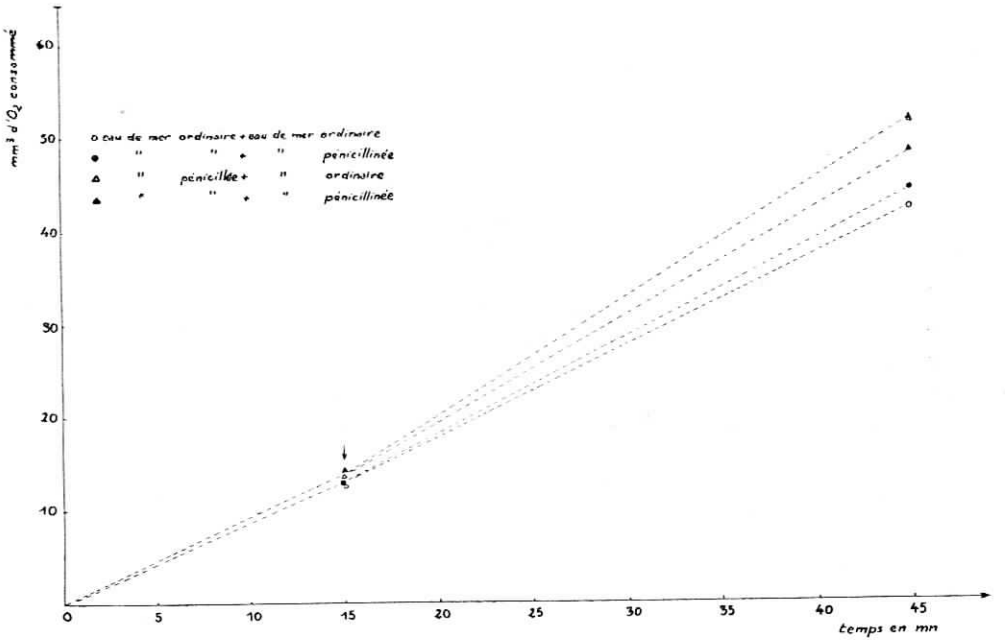


Fig. XVIII.

Réductase (t_0 + 14 minutes ; 25° C) :
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer filtrée ordinaire + 1 cm³ ♂ : 6 minutes.
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer filtrée renfermant 100 u. pénicilline/cm³ + 1 cm³ ♂ 5 mn. 45 s.-6 mn.

Respiromètre (t_0 + 23 minutes ; 22° C) ; eau de mer pénicillinée à 100 u /cm³ (fig. XVIII).

Pouvoir fécondant (1 cm³ ♂/9 cm³ ♀ frais à environ 4.700 ♀/cm³, dilué à 20 cm³ — volume final — par de l'eau de mer filtrée ; t_0 + 18 minutes ; 25° C).
Après 1,30 h. : *a*) dans la suspension en eau de mer filtrée ordinaire : 64 o/o des stades II, IV et VIII ;
b) dans la suspension en eau de mer filtrée pénicillinée : 73 o/o des stades II, IV, VIII.

Conclusions. — 1) A la concentration de 100 u./cm³ l'innocuité de la pénicilline pour les spermatozoïdes d'*A. lixula* est avérée ; ceci est en accord avec

ce que nous avons trouvé relativement au mode d'action de cet antibiotique (232) (233).

2) la pénicilline ne paraît pas métabolisée par les spermatozoïdes d'Oursins ; la légère augmentation de la respiration spermatique en sa présence ne paraît pas significative mais elle pourrait être la conséquence de la fixation d'ions par la pénicilline, comme on peut le concevoir après les travaux de PRATT et DUFRÉNOY (473) ;

3) la pénicilline paraît favoriser légèrement les clivages embryonnaires ; ceci pourrait être en rapport avec les propriétés auxiniques de la pénicilline telle qu'elle se manifeste sur les jeunes animaux.

N. B. — *Dans les pages à venir de ce chapitre lorsqu'il s'agira d'eau de mer (ordinaire) ou d'eau de mer ovulaire il sera sous-entendu, sauf contre-indication, que ces eaux de mer sont filtrées sur papier Joseph et pénicillinées à 100 u./cm³.*

Protocole II.

Spermatozoïdes d'*A. lixula* (12 mâles rassemblés, ponte par section pendant 18 minutes à 22° C ; dilution par de l'eau de mer après 30 minutes, soit t_0 ($\Delta_{\lambda 600\,(B.\,M.)}^{'/50} = 13,3$) ; motilité : +.

Eau de mer ovulaire d'*A. lixula* fraîchement préparée, donnant des agglutinats typiques de 45-60 secondes (à $t_0 + 40$ minutes) ; $\Delta_{\lambda 600\,(B.\,M.)}^{2\,Pb\,+\,3\,e.\,m.\,o.} = 2,5$ (blanc défalqué). Pour la conservation on la place à + 2° C.

Réductase ($t_0 + 2$ heures ; 22° C) :

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ } 15-17 minutes.

Respiration ($t_0 + 90$ minutes ; 22° C).

Les spermatozoïdes consomment 40 µl. O_2/h./cm³ en eau de mer et 52 µl. O_2/h./cm³ en eau de mer ovulaire.

On constitue 4 fractions, soit :

A) 10 cm³ ♂ + 10 cm³ eau de mer ; en sac de collodion sans phase gazeuse ;

B) 10 cm³ ♂ + 10 cm³ eau de mer ; en bouteille de 40 cm³ environ fermée par un bouchon de caoutchouc ;

C) comme A mais 10 cm³ d'eau de mer ovulaire remplacent les 10 cm³ eau de mer ;

D) comme B, avec la même remarque que C concernant le milieu de dilution.

Pouvoir fécondant ($t_0 + 28$ minutes ; 22° C ; 1 cm³ ♂/10 cm³ ♀ d'une suspension fraîche renfermant 9.000 ♀ cm³ et dont une fraction aliquote filtrée constitue l'eau de mer ovulaire employée dans ce protocole).

Après 2 h. 10 mn :

A : 77 o/o de stades II, IV et VIII ;
B : 76 o/o de stades II, IV et VIII ;
C : 86 o/o de stades II, IV et VIII ;
D : 80 o/o de stades II, IV et VIII.

On plonge A et B d'une part, C et D d'autre part dans un bain renouvelé d'eau de mer filtrée et pénicillinée à 100 u./cm³ ($t_0 + 11$ minutes ; θ (bain) = 20° C) ; débit ≠ 1 litre/45 minutes.

Après 27 heures :

— Aucune odeur suspecte nulle part.

Motilité :

A : activité intense ;
B : comme A mais plus faiblement en quantité et en qualité ;
C : comme A ;
D : aucune motilité.

Réductase (27 heures + 23 minutes ; 22° C) :
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ A : 13-18 minutes.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ B : 21-25 mn. 30 s.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ C : 12 mn. 30 s.-18 mn.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ D : 54 mn. 30 s.-73 mn.
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire de la veille + 1 cm³ ♂ A : 16 mn. 50 s.-21 mn. 30 s.
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire de la veille + 1 cm³ ♂ B : 24 mn. 20 s.-20 mn. 20 s. (les spermatozoïdes décantent).
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire de la veille + 1 cm³ ♂ C : 23 mn. 30 s.-32 mn. 30 s. (décoloration seulement sur environ 1 centimètre au fond des tubes).
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire de la veille + 1 cm³ ♂ D : 105-180 minutes.

Respiration (27 heures + 20 minutes ; 22° C) :
A consomme 28 µl. O_2/h /cm³ ;
B consomme 25 µl. O_2/h./cm³ ;
C consomme 34 µl. O_2/h./cm³ ;
D consomme 22 µl. O_2/h./cm³.

Action de l'eau de mer ovulaire (27 heures + 13 minutes ; 22° C) :
A : agglutinats typiques de 17 secondes après 10 secondes de latence + plages spermatiques plus ou moins irréversibles ;
B : filamentation lente plus ou moins irréversible ;
C et D : O.

Témoin (♂ de 1 heure) : agglutinats typiques de 60 secondes.

Fécondation (27 heures + 10 minutes ; 22° C ; 1 cm³ ♂/10 cm³ ♀ d'une suspension fraîche à environ 3.000 ♀/cm³). Après 1 h. 30 mn. :
A : 40 o/o de stades II,
B : 25 o/o de stades II,
C : 17 o/o de stades II et IV,
D : 3 o/o de stades II,
Témoin : 66 o/o stades II.

J'ai examiné la question de la distribution ionique (effet Gibbs-Donnan). *La chlorinité* en A et C (titrage par la technique de Mohr) correspondait à une salinité de 37,39 pour A et de 37,94 pour C (dosages sur 2 cm³ de surnageant après centrifugation des suspensions spermatiques à 10.000 tours par minute pendant 10 minutes).

Par ailleurs, *la teneur en phosphates libres* était de :
1,5 γ P/cm³ dans A,
1,3 γ P/cm³ dans B,
6 γ P/cm³ dans C,
7 γ P/cm³ en D
(dosages sur 1 cm³ de surnageant de centrifugation).

Conclusions. — 1) Pour des conservations de durée relativement courte (ici 27 heures), le milieu ouvert pénicilliné est le plus favorable pour la conservation des spermatozoïdes ;

2) la présence d'eau de mer ovulaire paraît favoriser encore cette conservation ce qui va dans le même sens que certaines expériences de Wicklund ; mais, étant donné que pour la fonction fécondante, les spermatozoïdes d'Oursins se trouvent normalement en présence d'eau de mer ovulaire, la conservation en eau de mer ovulaire est défavorable (cf. réductase, fécondations). Ces expériences ne permettent évidemment pas de conclure avec certitude, étant faites après des temps très longs, sur la perte éventuelle plus ou moins poussée du pouvoir fécondant des spermatozoïdes ayant subi une agglutination préalable par la fertilisine ;

3) dans d'autres expériences du type exposé dans ce protocole, une contamination par des protistes (Ciliés) pouvait se révéler au cours de la conservation. Il est possible que cette prolifération soit la conséquence d'un développement bactérien plus ou moins intense, conséquence d'une destruction (thermique ?) de la pénicilline. Il est évident que dans de tels cas les critères métaboliques cessant d'être valables et, quoique des fécondations soient encore possibles, de telles suspensions spermatiques contaminées doivent être rejetées ;

4) selon l'âge de la suspension spermatique, la présence d'un supplément de fertilisine favorise ou inhibe le pouvoir fécondant, les concentrations en spermatozoïdes et en fertilisine étant fixes.

Protocole III.

— Spermatozoïdes de *P. lividus* (sperme de 25 mâles obtenu par dissection des testicules). Dilution après 30 minutes (t_0) avec de l'eau de mer ; $\Delta\lambda^{1/50}_{600\,(B.\,M.)} = 36$; motilité : +.

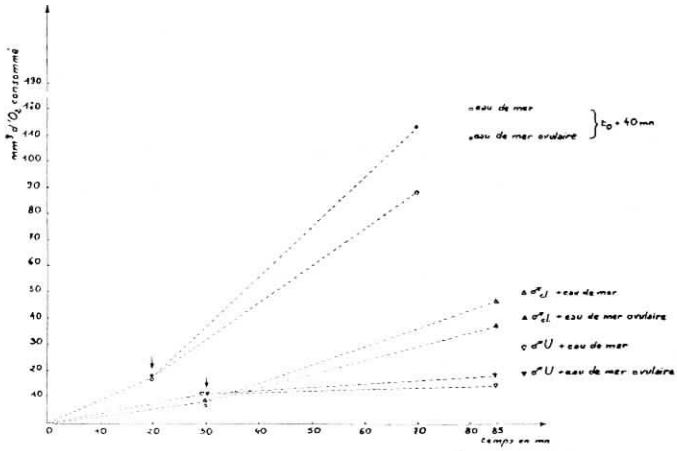


Fig. XIX.

— Eau de mer ovulaire de *P. lividus* ; $\Delta_{\lambda600\,(B.\,M.)}^{2\,Pb\,+\,3\,F\,(e.\,m.\,o.)} = 42$ (eau de mer ovulaire de base très opalescente $\Delta_{\lambda600} = 23$).

Réductase (t_0 + 22 minutes ; $\theta = 17°$ C) :

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ } # 4 mn. 30 s. -
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ } 8 mn.

Pouvoir fécondant (t_0 + 20 minutes ; $\theta = 17°$C ; 1 cm³ ♂ + 5 cm³ eau de mer + 5 cm³ d'une suspension ovulaire renfermant environ 6.000 ♀/cm³). Après 1 h. 30 mn. : environ 100 o/o de stades II.

Respiration (t_0 + 40 minutes ; $\theta = 16°$ C) (fig. XIX).

A t_0 + 5 minutes deux parts de ces spermatozoïdes étaient constituées.

— Fractions de 15 cm³ placées en sacs de dialyse sans phase gazeuse (θ (eau de mer) = 17° C) ; débit de l'eau de mer : 100 cm³/270 secondes ; il s'agit d'eau de mer filtrée, pénicillinée à 100 u./cm³), soit U.

— Fractions de 15 cm³ placées en petits flacons bouchés hermétiquement avec le caoutchouc d'origine (il s'agissait de bouteilles de conditionnement de pénicilline : diamètre : 22 millimètres), *soit cl.* Parallèlement on laisse le restant de la suspension mère (soit 15 cm³) en verre de Borrel (verre de Bohême), de diamètre : 50 millimètres, soit « table ».

Après 30 heures (comptées à partir de t_0) des contrôles sont effectués (20° C) ;

Motilité : 1) *cl.* : 0 ; 2) U et « table » : plusieurs spermatozoïdes mobiles.

Odeur : 1 *cl.* : sulfureuse ; 2) U et « table » pas d'odeur spéciale.

Réductase (t_0 + 30 h. 08 mn.) :

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ cl. : 60-75 minutes.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ U : 37-45 minutes.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire (conservée depuis la veille) à 20° C + 1 cm³ ♂ cl. : 34-43 minutes.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire (conservée depuis la veille) à + 20° C + 1 cm³ ♂ U : 18-21 mn. 30 s.

A titre indicatif :

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire (conservée depuis la veille) à + 20° C + 1 cm³ « table » : 9-10 mn. 30 s.

Respiration (t_0 + 30 h. 20 mn. ; 0 = 16° C) (fig. XIX) (partie inférieure).

Pouvoir fécondant (t_0 + 30 h. 13 mn. ; 0 = 20° C).

1 cm³ ♂/5 cm³ eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ + 5 cm³ d'une suspension ovulaire d'une heure renfermant environ 5.300 ♀/cm³. Après 90 minutes :

cl → 75 o/o de stades II et IV + agglutinats diffus de spermatozoïdes.

U → 100 o/o de stades II et IV + agglutinats spermatiques fusiformes (cf. cliché VI).

« Table » → 100 o/o de stades II et IV + petits agglutinats spermatiques plus ou moins irréversibles.

Chlorinité dans les sacs (dosage sur le surnageant de centrifugation) : Cl = 21,487 → salinité : 38,69 o/oo.

Conclusions. — 1) Le milieu ouvert largement du côté de la phase gazeuse (air) s'avère aussi favorable que le milieu ouvert entièrement (sacs) en ce qui concerne la conservation du pouvoir fécondant ; il est d'ailleurs supérieur en ce qui concerne la conservation de l'activité réductasique ce qui s'explique en considérant qu'en milieu dialysé les substrats se sont épuisés en partie par dialyse et en partie par consommation cellulaire, tandis qu'en milieu clos mais aéré la conservation des substrats est meilleure. Ceci confirme que le rôle du milieu ouvert est surtout de favoriser l'oxygénation du milieu et aussi d'éliminer les déchets biologiques (récipients-émonctoires) ;

2) les dosages de chlorinité montrent que l'effet Gibbs-Donnan est négligeable Il n'est toutefois pas impossible que par suite de la sensibilisation cellulaire consécutive à l'exhaustion des substrats, l'action ionique du milieu soit favorisée, amenant particulièrement la libération de l'anti-fertilisine.

Remarque. — On peut se demander si l'aération d'une suspension spermatique ne pourrait pas être obtenue d'une autre façon qu'en plaçant les spermatozoïdes dans un récipient à large ouverture et en faisant barboter soit de l'air soit de l'oxygène. J'ai fait de telles expériences et j'ai constaté que le barbotage de gaz était nuisible aux spermatozoïdes sans doute par suite de la fragilité mécanique de ces cellules.

On a vu par ailleurs (p. 60) que la pression d'air en sac de collodion amenait une concentration de la suspension spermatique qui y était soumise.

J'ai d'ailleurs pu constater qu'il en était généralement de même lorsqu'on mettait en service le dialyseur sous pression contrôlée comme l'indique le protocole IV.

Protocole IV.

— Spermatozoïdes d'*A. tixula* (1 cm³ = 370 % N ♂ total).

Volume de la suspension mise en expérience : 12 cm³ (ce qui remplit tout l'espace membranaire du dialyseur de capacité dialyseur-manomètre à la division 150 de la branche fermée : 35,2 cm³).

Piston à 15 ; agitation : 80 oscillations doubles/minute ; agitateur interne en

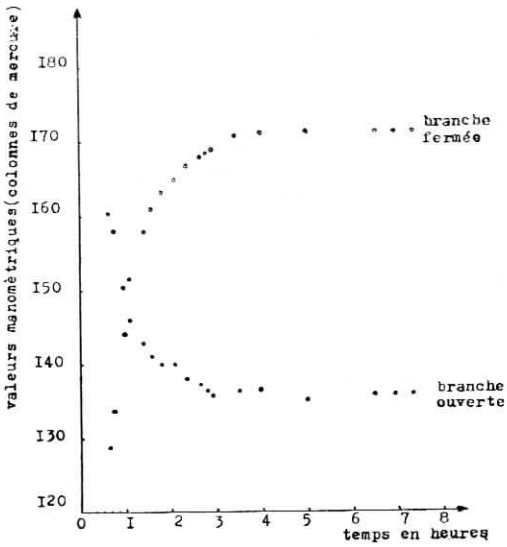


Fig. XX.

battant de cloche de 2 millimètres de diamètre. θ = 30° C. Colonnes manométriques de mercure. Débit d'eau de mer pénicillinée à 100 u./cm³ = 100 cm³/168 secondes.

La figure XX montre la dépression continue correspondant notamment à une diminution de volume de la suspension spermatique jusqu'à volume # 10,8 cm³.

Remarques. — Par compressions successives on peut réduire en quelques heures le volume de la suspension jusqu'à 10 fois en conservant la motilité des spermatozoïdes, la figure XXI montre l'allure de telles décompressions successives. Pour faire une telle expérience, le gaz était injecté par le corps de la seringue, un bouchon de caoutchouc remplaçant le piston, le tuyau d'adduction gazeuse était muni, près du corps de la seringue, d'un robinet qui était fermé lorsque le manomètre indiquait une certaine pression. La décompression est bien due principalement à une baisse du volume liquide comme l'indiquent les mesures de volume faites avant et après compression ; de plus le sac étant initialement entièrement rempli par la suspension ce

n'était pas une fuite gazeuse membranaire qui pouvait être mise en cause au moins au début; enfin, l'expérience en présence d'azote montre que cette décompression est indépendante de l'activité respiratoire des spermatozoïdes (j'ai d'ailleurs pu obtenir une telle décompression avec des solutions d'ovalbumine qui se trouvaient ainsi concentrées).

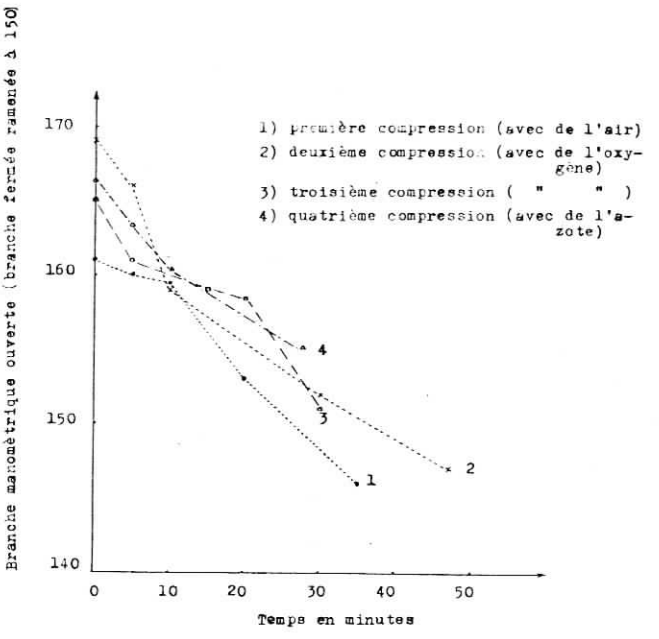


Fig. XXI.

Ce sont des expériences de ce type qui m'ont conduit à l'ultra-filtration pour tenter de démontrer la théorie de l'allélostasie de GRAY (p. 59). Ces remarques étant faites revenons au protocole IV :

Réductase (t_0 + 5 minutes ; 25,5° C) :
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ : 3-5 minutes.
Sensibilité à l'eau de mer ovulaire (t_0 + 41 minutes ; 25,5° C ; 1 cm³ ♂/2 cm³ e. m. o. ; 1 cm³ e. m. o. = 21 γ N ♀ total) : 3 mn. 23 s. d'agglutinats.
Début de la dialyse (circulation d'eau de mer pénicillinée) : t_0 + 15 minutes ; soit (1).
Parallèlement on constitue :
— Un témoin en espace clos (flacon rodé de 25 cm³) 12 cm³, soit (2).
— Un témoin en sac de collodion (sans surpression) placé contre de l'eau de mer ordinaire courante, soit (3).
— Un témoin en verre de Borrel ouvert (Φ = 52 millimètres), soit (4).
Après 31 heures :
(1) *Motilité :* + (nombreux spermatozoïdes) ; 1 cm³ = 400 γ N ♀ total ; pas d'odeurs putrides.
Réductase (31 heures + 30 minutes ; 25,5° C) :
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ : 17-22 minutes.

Sous l'action de l'eau de mer ovulaire de la veille (conservée à 2° C) : agglutinats typiques de 1 mn. 30 s. à spermatozoïdes très mobiles.

(2) *Motilité :* ± affectant peu de spermatozoïdes ; pas d'odeur putride.

Réductase (31 heures + 5 minutes ; 25.5° C) :

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ : 30-35 minutes (décoloration affectant la moitié inférieure seulement).

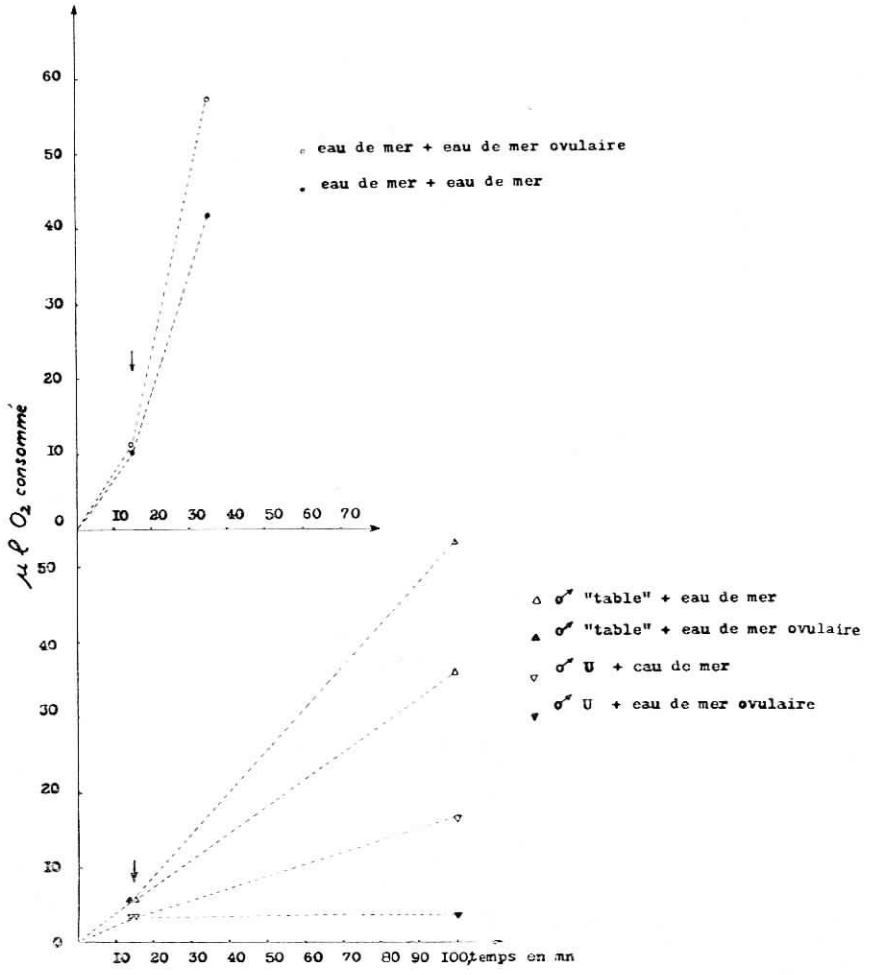


Fig. XXII.

Sous l'action de l'eau de mer ovulaire de la veille : gros amas de spermatozoïdes immobiles durant plus d'une heure (pratiquement irréversibles).

(3) *Motilité :* + légère odeur suspecte.

Réductase (31 heures + 1 h. 13 mn. ; 25,5° C) :

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ : 12-16 minutes.

Sous l'action de l'eau de mer ovulaire de la veille : formations spermatiques *en fuseaux bouclés* (cf. cliché VI) ; les spermatozoïdes libres sont immobiles.

(4) *Motilité :* + faible ; pas d'odeur anormale.
Réductase (31 heures + 2 heures ; 25,5° C) :
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ : 25-32 minutes.
Sous l'influence de l'eau de mer ovulaire de la veille : agglutinats typiques comme en (1).

Conclusions. — 1) Une forte surpression appliquée à l'intérieur d'un sac de dialyse amène une concentration des cellules qui ne paraissent pas affectées dans leur intégrité ;
2) dans des conditions non aseptiques (série (3)) l'utilisation du test de la réductase est équivoque.

Protocole V.

— Spermatozoïdes d'*A. lixula* (ponte par section de 20 mâles pendant 20 minutes à 25° C). Dilution par de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ après 10 minutes (soit t_0) ; $\Delta_{\gamma 600} = 60$.
Réductase (t_0 + 1 minute ; 25° C) ;
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ : 2 mn. 45 s.
— Eau de mer ovulaire d'*A. lixula* (ponte par section de 12 femelles pendant 20 minutes à 25° C). Après 3 lavages par décantation avec de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³, 1 cm³ → 18,17 N ♀ total.

Action sur les spermatozoïdes contemporains (t_0 + 70 minutes ; 25° C) : après 35 secondes de latence, agglutinats typiques de 8 minutes, d'abord ramifiés puis arrondis.
Réductase (t_0 + 135 minutes ; 25° C) :
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ : 4-5 mn. 30 s.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ : 3 mn. 35 s.-4 mn. 40 s.
Respirométrie (t_0 + 90 minutes ; 24° C). Utilisation de l'eau de mer ovulaire ci-dessus (fig. XXII) (partie supérieure).

Fécondation (t_0 + 130 minutes ; 25° C) 1 cm³ ♂/10 cm³ de suspension ovulaire d'âge t_0 + 130 minutes, renfermant environ 8.800 ♀/cm³ d'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³. Après 2 heures : 50 o/o de stades II, IV et VIII.
A t_0 + *20 minutes* = t_x, 2 parts de la suspension spermatique sont constituées :
1) une de 75 cm³ est placée en verre de Borrel de 53 millimètres de diamètre et de 10 centimètres de hauteur ($\theta = 25°$ C), soit « ♂ table » ;
2) une autre de 50 cm³ est placée en sac de collodion, sans phase gazeuse, plongeant dans de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ circulante (débit : 50 cm³/168 secondes ; $\theta = 25°$ C), soit « ♂ U ».

Remarques. — Les abréviations du tableau XI sont : 1/1, 1/1/1, e. m., e. m. o. Elles signifient :

1/1 : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂,
1/1/1 : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ (e. m.) ou eau de mer ovulaire filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ (e. m. o.) + 1 cm³ ♂.
Les courbes de la figure XXII parallélisent les résultats du tableau XI (partie supérieure : respiration à t_0 + 90 minutes ; partie inférieure : respiration à t_0 + 49 h. 45 mn.).

A $t_x + 49,15$ *h.* (25° C) :

Action de l'eau de mer ovulaire de t_0 :

« ♂ table » : agglutinats lents à se former mais à spermatozoïdes mobiles, disparaissent partiellement après 2 heures ;

« ♂ U » : petits agglutinats immédiats et persistants à spermatozoïdes immobiles.

Pouvoir fécondant (t_x + 49 h. 25 mn.) : 1 cm³ ♂/10 cm³ ♀ d'une suspension d'une heure renfermant environ 11.500 ♀/cm³ d'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³. Après 2 h. 30 mn. :

« ♂ table » : 20 o/o de stades IV, VIII et XVI.

« ♂ U » : 0 o/o (œufs à gangues précipitées du type du cliché II), témoins (♂ de 15 minutes, $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)}^{1/50} = 28$) : 60 o/o de stades IV, VIII et XVI.

Le tableau XI retrace l'évolution de ces suspensions spermatiques.

TABLEAU XI

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Réductase 1/1	t_0 + 1 mn. 2 mn. 45 s.	t_0 + 23 h. 40 mn. 5-6 mn. 15 s.	t_0 + 29 h. 30 mn. 5-7 mn. 15 s.	t_0 + 32 h. 25 mn. 5-7 mn. 15 s.	t_0 + 35 h. 5 mn. 45 s -8 mn. 10 s. 1/1/1 : e. m. 11-15 mn. 45 s. e. m. o. 6-12 mn.
e. m. o.	Latence : 35 s., durée : 8 mn.	Latence : 35 s., durée : 8 mn.	Latence : 30 s., durée : 8 mn.	Latence : 35 s., durée : 17 mn.	Latence : 25 s., durée : 24 mn.

	(6)	(7)	(8)	(9)
Réductase 1/1	t_0 + 47 h. « ♂ table » : 6-9 mn. « ♂ U » : 35-42 mn.	t_0 + 48 h. 10 mn. « ♂ table » : 1/1/1 e. m. o. : 8-10 mn. « ♂ U » : 1/1/1 e. m. o. : 55-60 mn.	t_0 + 58 h. 15 mn. « ♂ table » : 6-8 mn. 30 s.	t_0 + 70 h. 6-8 mn. 5 s.
e. m. o.	« ♂ table » : agglutinats persistants. « ♂ U » : agglutinats persistants, flocons petits et immobiles (1).	« ♂ table » : réanimation.	Agglutinats irréversibles (> 45 mn.) ♂ très mobiles.	

(1) J'ai constaté que les « ♂ U » ne sont pas remobilisables en présence des substrats suivants (pH # 8 ; 25° C) : malate de sodium, malonate de sodium, succinate de sodium, choline, acétylcholine, glutathion, ATPNa, phénosafranine à la concentration de 1 mg/cm³, ou d'un « cocktail » ATPNa 250 γ/cm³ + malate de sodium 250 γ/cm³ + succinate de sodium 250 γ/cm³ + glutathion 250 γ/cm³ ; l'héparine à 1 o/o ou le liquide séminal de ♂ *A. lixula* de moins d'une heure de $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)}^{1/50} = 20$ sont également sans action. Ces essais ont été faits selon la technique des 3 gouttes.

Conclusions. — 1) Les spermatozoïdes immobilisés par dialyse aseptique prolongée (> 48 heures) ont subi des modifications structurales caractérisées par la libération d'anti-fertilisine ; ils ne sont pas mobilisables sous l'influence de différents métabolites ;

2) il apparaît que *tant que l'eau de mer ovulaire réactive les spermatozoïdes ceux-ci peuvent conserver un certain pouvoir fécondant.* Ce caractère met incontestablement en évidence les relations fonctionnelles liant les spermatozoïdes à leurs conditions d'action.

Protocole VI.

— Spermatozoïdes d'*A. lixula* (pontes par section de 8 mâles pendant 12 minutes). Dilution par l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ après 30 minutes (soit t_0) ; $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 73{,}4$.

Eau de mer ovulaire d'*A. lixula* préparée avec de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ ($\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)}^{2\ Pb\ +\ e.\ m.\ o.} = 2{,}4$).

Donne des agglutinats typiques de 75 secondes avec les spermatozoïdes ci-dessous à 22° C et t_0 + 1 minute.

Activité réductasique (22° C ; t_0 + 4 minutes) :

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂
1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂.
} 7-10 minutes avec un léger retard avec l'eau de mer ovulaire.

Respiration (22° C ; t_0 + 36 minutes) : 78 µl/heure/cm³.

Pouvoir fécondant (t_0 + 61 minutes ; 22° C) = 1 cm³ ♂/10 cm³ d'une suspension ovulaire d'une heure renfermant 1.200 ♀/cm³. Après 1 h. 30 mn. : 73 o/o de stades II, IV et VIII.

A t_0 + *16 minutes* = t_x ; les spermatozoïdes sont répartis en 2 séries :

— 10 cm³ en petits flacons hermétiquement fermés par un bouchon de caoutchouc (je me suis servi de petites bouteilles servant au conditionnement de la pénicilline), soit A ;

— 10 cm³ en verre de Borrel de 50 millimètres de diamètre et 14 centimètres de hauteur, soit B.

Les séries A et B sont laissées à évoluer à la température de 28° C et sous un éclairement de 75 lux.

A t_x + *17 heures* (21° C) :

1) A : spermatozoïdes immobiles peu réactivables et ne donnant pas d'agglutinats typiques avec l'eau de mer ovulaire de t_0 ;

B : spermatozoïdes peu mobiles, mais fortement réactivables par l'eau de mer ovulaire, en donnant des essaims spermatiques à auréoles (du type décrit par Sampson : « roues rayonnées »). Une minute après le recouvrement par une lamelle de 0,10451 g. (examen selon la technique que j'ai décrite p. 58), ces spermatozoïdes en présence d'eau de mer ovulaire ont une vitesse moyenne de 100 µ/70 tierces en mouvement rectilinaire.

2) *Pouvoir fécondant* (t_x + 18 h. 20 mn. ; 1 cm³ ♂/10 cm³ d'une suspension ovulaire d'une heure renfermant environ 1.000 ♀/cm³) :

Après 2 h. 10 mn.	Après 5 heures
A : 42 o/o stades II, IV, VIII	45 o/o morulas
B : 51 o/o stades II, IV, VIII	50 o/o morulas

3) *activité réductasique* (t_x + 18 heures) :

A : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ : 23-(32-35 minutes).
B : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ : 8-(13-15 minutes).

A : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. + 1 cm³ ♂ : 27-35 minutes.
B : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + e. m. + 1 cm³ ♂ : 14-21 minutes.
A : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. + 1 cm³ ♂ : 22-27 minutes.
B : 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. + 1 cm³ ♂ : 10-15 minutes.

Conclusion. — La conservation aseptique des spermatozoïdes est défavorisée en milieu confiné, elle paraît se faire le mieux en récipients à larges ouvertures permettant une aération superficielle sans agitation de la suspension.

IV. — Durée extrême de conservation du pouvoir fécondant de spermatozoïdes non alimentés artificiellement.

L'état présent de nos connaissances sur la conservation des gamètes mâles tel qu'il ressort de mes études est le suivant :

a) l'existence de conditions aseptiques obtenues particulièrement par l'emploi d'un agent anti-bactérien, évidemment non toxique pour les spermatozoïdes d'Oursins, est nécessaire;

b) pour des durées de conservation de l'ordre de 24-30 heures, le milieu ouvert (sans fourniture de substrats) est avantageux ;

c) pour des durées supérieures à 30 heures, et sans fourniture de substrats, la conservation en récipients fermés du côté liquide et largement ouverts du côté atmosphérique est à préconiser;

d) le milieu hermétiquement clos est à rejeter.

Ceci posé, je donnerai maintenant le protocole d'une expérience faite en automne (septembre) à Banyuls-sur-Mer qui a établi le record de durée de survie des spermatozoïdes d'Oursins à température ordinaire avec des ♂ d'*A. lixula* dilués dans de l'eau de mer.

Protocole. — Soit donc :

1) *a* : spermatozoïdes d'*A. lixula* (ponte par section, 35 mâles) ; dilution par de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ après 45 minutes (t_0) : $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)}^{1/50} = 47$.

Réductase (t_0 + 3 h. 35 mn. ; 22° C) :

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ : 5 mn. 10 s.-7 mn. 20 s.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ : 3 mn. 50 s -5 mn. 30 s.

b : eau de mer ovulaire de 5 heures préparée avec de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ ; $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)}^{2\ Pb + 3\ e.\ m.\ o.} = 1$, les spermatozoïdes d'*A. lixula* (t_0 + 2 heures : nombreux agglutinats à auréoles disparaissant après 5 minutes).

Fécondation (t_0 + 3 heures; 22° C, 1 cm³ ♂/10 cm³ d'une suspension ovulaire de 2 heures contenant environ 5.000 ♀/cm³) ; après 1 h. 30 mn : 34 o/o des stades II et IV.

2) *a* : spermatozoïdes de *P. lividus* (80 cm³ sperme obtenu par dissection des testicules, 35 mâles) ; dilution par de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ après 35 minutes (soit t_0') $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)}^{1\ 50} = 47$.

Réductase (t_0 + 3 h. 35 mn. ; 22° C) :

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ : 22-28 minutes.

1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire + 1 cm³ ♂ : 15 mn. 10 s.-21 mn.

b : eau de mer ovulaire de 5 heures préparée avec de l'eau filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ ; $\Delta_{\lambda 600\,(B.\,M.)}^{2\,Pb+3\,e.\,m.\,o.} = 8{,}5$. Action sur les spermatozoïdes de *P. lividus* ($t'_0 + 2$ heures) : les spermatozoïdes d'épreuve (sénescents) étant pour la plupart immobiles avant adjonction de l'eau de mer ovulaire, il y a réactivation flagellaire et formation de micro-amas-(20-40 $\mu(\varphi)$ environ). Il n'y a aucune réactivation cinétique si à la place d'eau de mer ovulaire on dilue les spermatozoïdes dans de l'eau de mer ordinaire.

Fécondation ($t'_0 + 3$ heures ; 22° C ; 1 cm³ ♂/10 cm³ d'une suspension ovulaire de 2 heures, contenant environ 6.200 ♀/cm³) ; après 1 h. 30 mn. ; 20 o/o de stades II.

N. B. — Depuis t_0 pour *A. lixula* et t'_0 pour *P. lividus* les spermatozoïdes sont conservés sous un volume de 75 cm³ en verre Borrel de 50 millimètres de diamètre et de 14 centimètres de hauteur ; $\theta = 19°$ C ; éclairement ne dépassant pas 175 lux.

Après 24 heures :

La suspension de spermatozoïdes de *P. lividus* dégage une forte odeur purique, les spermatozoïdes sont très altérés étant immobiles et non réactivables en présence d'eau de mer ovulaire spécifique qui amène la formation d'amas spermatiques allongés.

La suspension de spermatozoïdes d'*A. lixula* ne présente pas d'odeur, de nombreux spermatozoïdes sont mobiles ; ils ne forment pas d'agglutinats typiques avec l'eau de mer ovulaire spécifique mais ils sont fortement réactivés.

Réductase (24 heures + 2 h. 30 mn. : 22° C) :

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ *P. l.* : 80-93 minutes.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire *P. l.* + 1 cm³ ♂ *P. l.* : 70-78 minutes.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer + 1 cm³ ♂ *A. l.* : 7 mn. 30 s.-10 mn. 30 s.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ eau de mer ovulaire *A. l.* + 1 cm³ ♂ *A. l.* : 5-7 mn. 45 s.

Fécondation (24 heures + 2 h. 50 mn. ; 22° C ; 1 cm³ ♂ (*P. l.* ou *A. l.*) renfermant environ 2.000 ♀/cm³ d'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ donne les résultats consignés dans le tableau XII.

TABLEAU XII

	Immédiatement	Après 2 heures
♂ *P. l.* × ♀ *P. l.*	Petits agrégats spermatiques	0 o/o de clivage. Gros amas spermatozoïdes-ovules
♂ *A. l.* × ♀ *A. l.*	Agglutinats fusiformes	70 o/o des stades II à XXXII ; spermatozoïdes mobiles

Remarque. — La suspension de spermatozoïdes de *P. lividus* n'a pas été autrement suivie, une vérification après 36 heures a montré que le catabolisme cellulaire continuait (tests : réductase, motilité, pouvoir fécondant).

La planche III synthétise les résultats obtenus avec la suspension d'*A. lixula* :

1) la famille de courbes de la partie supérieure de la figure représente le

temps de décoloration de 1 cm³ de bleu de méthylène, à 0,02 o/o d'eau de mer filtrée par 1 cm³ de suspension spermatique-mère placée en présence de 1 cm³ d'eau de mer ordinaire filtrée et pénicillinée à 100 u./cm³ ou de 1 cm³ d'eau de mer ovulaire-stock filtrée et pénicillinée à 100 u./cm³ (le calcul d'un Q_{RM} ne serait pas significatif ici, étant donné que la décoloration est

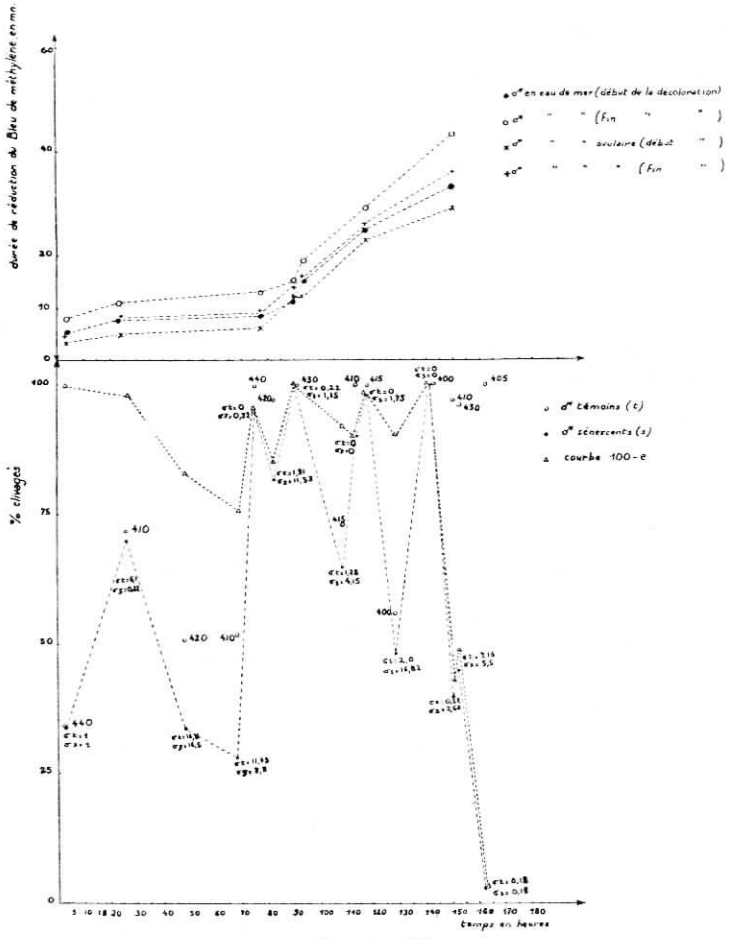


Planche III.

incomplète : persistance d'un anneau bleu surnageant ; mais on peut voir qu'il est remarquablement faible) ;

2) les fécondations qui ont servi à construire la courbe « ♂ sénescent » de la planche III ont été pratiquées de la façon suivante :

dans des couvercles de boîtes de Petri en pyrex de 10 centimètres de diamètre intérieur je place :

10 cm³ d'une suspension ovulaire d'*A. lixula* âgée d'une heure au plus et

contenant environ 12.500 ♀/cm³ (3 lavages par décantation avec de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ sont effectués préalablement en Bécher de 1 litre en pyrex ; durée du dernier contact eau de mer-ovules : 15 minutes à 22° C) ; on ajoute 1 cm³ de la suspension spermatique à tester.

Les suspensions spermatiques témoins étaient constituées à partir de pontes induites par section ; après dilution dans l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³, elles étaient âgées de moins de 30 minutes ; leurs concentrations étaient ajustées de telle sorte que $\Delta\lambda_{600}^{1/50}{}_{(B.M.)} = 45\text{-}50$. La valeur de chaque pourcentage de clivages constituant un des points expérimentaux de la figure inférieure est la moyenne de triplicata ; on trouvera portée au regard de chaque point de la courbe « ♂ sénescent » la valeur de l'écart-type tant pour les spermatozoïdes témoins (♂ *t*) que pour les spermatozoïdes conservés (♂ *s*). Les lectures des fécondations ont été généralement faites après 90 minutes et jamais après 300 minutes de culture à 22° C (obtention de stades II, IV, VIII). On peut constater combien sont considérables les fluctuations des pourcentages de clivages. Dans une telle expérience l'interprétation doit tenir compte de plusieurs remarques et tout d'abord il est évident que les valeurs absolues du nombre de clivages des spermatozoïdes sénescents ne sont pas significatives. Il faut nécessairement tenir compte du pourcentage de clivages obtenu avec les spermatozoïdes témoins. Or ces clivages témoins sont obtenus à *chaque fois* avec de nouvelles suspensions spermatiques ce qui fait que chaque expérience témoin est indépendante ; elle n'est reliée aux expériences avec les spermatozoïdes sénescents, à chaque fois, que par les suspensions ovulaires utilisées qui sont également renouvelées à chaque expérience (on a vu page 90 que les ovules ne se conservaient pas au delà de 24 heures dans les conditions aseptiques de mes expériences et en conséquence, on ne peut faire usage d'une même suspension ovulaire-stock parallèlement à la suspension spermatique sénescente). Dans ces conditions la courbe qui rend compte au mieux des pourcentages réels de clivages est celle qui combine les valeurs obtenues avec les spermatozoïdes sénescents et celle obtenue avec les spermatozoïdes témoins. Soit t le pourcentage de clivages obtenu avec une suspension spermatique témoin ; il vient : $100 - t =$ différence entre le pourcentage maximum de clivages dans des conditions d'idéalité moins le pourcentage obtenu ;

et s le pourcentage de clivages obtenu avec la suspension spermatique conservée ; il vient de même : $100 - s$; d'où :

$$(100 - t) - (100 - s) = t - s = e.$$

et $100 \pm e =$ o/o réel de clivages dans la suspension ovulaire fécondée par des spermatozoïdes conservés (histogramme de clivages), avec $+ e$ si $t < s$ (c'est une éventualité que je n'ai pas rencontrée mais qui est plausible) et $- e$ si $t > s$ (c'est le cas général).

Remarque. — Une odeur purique commence à se développer après 72 heures de conservation ; la motilité *in situ* des spermatozoïdes conservés est pratiquement nulle après 76 heures si la suspension n'est pas agitée comme cela se produit au cours des pipetages fréquents ou faits sans précaution (l'aération ainsi produite réanime de nombreux spermatozoïdes).

Discussion. — On peut se demander à quoi tiennent les fluctuations dans le pourcentage de clivages. Elles sont liées soit aux ovules soit aux spermatozoïdes et rien ne permet de calculer ce qui revient aux uns ou aux autres. C'est ici toutefois qu'un test métabolique comme celui de la réductase permet de trancher la question. En regard de chaque point correspondant aux clivages obtenus par les spermatozoïdes témoins, j'ai mentionné la durée en secondes de la décoloration du bleu de méthylène, dans les mêmes conditions qui ont été indiquées ci-dessus à propos des spermatozoïdes en conservation. On remarquera que ces valeurs sont très proches les unes des autres ; or si, par exemple, une suspension décolorant le bleu de méthylène en 410 secondes permet d'obtenir supposons 70 o/o de clivages et si, par ailleurs, une autre suspension réduisant le bleu de méthylène dans le même temps permet d'ob-

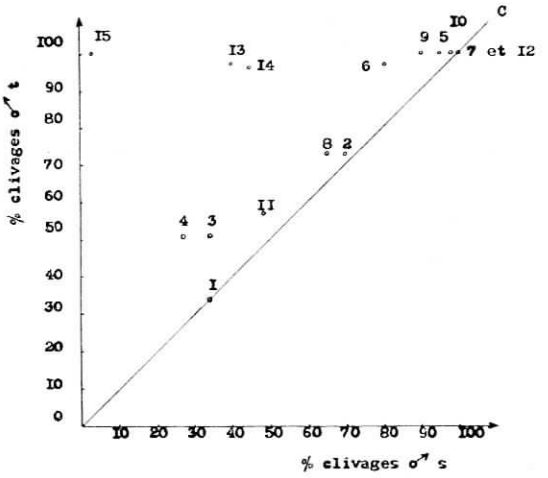


Fig. XXIII.

tenir 100 o/o de clivages, je dis que la différence est due à la fécondabilité, c'est-à-dire aux ovules. Dans l'expérience rapportée ici, je conclus que les fluctuations sont entièrement sous la dépendance de l'état des ovules.

La figure XXIII représente la courbe de corrélation qui fait bien ressortir les fluctuations.

Remarques. — 1) la confrontation des deux familles de courbes de la Planche III montre que l'activité réductasique du sperme concentré peut diminuer près de 4-5 fois sans affecter le pouvoir fécondant de ce sperme ;

2) à la 72e heure de conservation, moment où une lyse importante commençait à se manifester (odeur purique), le taux de clivages s'est élevé brusquement ; il peut s'agir d'une coïncidence mais il est également possible que les produits de la lyse spermatique favorisent soit les fécondations soit la vitalité des spermatozoïdes résiduels.

Conclusions. — 1) à une température inférieure à la température de destruction rapide de l'agent anti-bactérien utilisé (ici Spécilline-G, stable

pendant 7 jours à $\theta = 20^{\circ}$ C) des spermatozoïdes d'*A. lixula* gardent intégralement leur pouvoir fécondant pendant 120 heures ; après 152 heures, la moitié de leur pouvoir fécondant est encore conservée. De plus, la lyse (vraisemblablement autolyse) qui prend naissance au sein de la suspension d'une façon notable dès la 72e heure ne doit être complète qu'après 162 heures, donnée qui montre combien est hétérogène une suspension spermatique ;

2) comparativement des spermatozoïdes de *P. lividus* en début de maturité perdent rapidement ce pouvoir fécondant. Ce fait est important à souligner pour les questions d'hybridation ;

3) on peut se demander si dans les expériences de survie de Tyler (632) les agents chélateurs qu'il utilise n'agissent pas en grande partie en tant qu'agents anti-bactériens, la littérature offre en effet un assez grand nombre d'exemples de substances dites « antibiotiques » qui fixent les ions métalliques (5) (449) (455) et parmi ces substances se trouvent des chélateurs caractérisés (639) (voir par ailleurs (9)) ;

4) de plus dans le travail de Tyler (632) il est question de durée de « demi-vie », fondée sur la motilité à l'intérieur de la suspension spermatique conservée. Un tel fondement ne peut constituer un critère sûr comme mes expériences le prouvent car :

— la motilité *in situ* des spermatozoïdes est contingente (liée au récipient, à l'aération de manipulation...) ;

— *ce qui compte du point de vue fécondations ce n'est pas la motilité des spermatozoïdes au sein de leur suspension en eau de mer (ou même en eau de mer ovulaire) — où elle peut être nulle —, c'est la motilité après transfert en eau de mer ovulaire où l'équilibre agglutination-activation (ou réanimation) conditionne le pouvoir fécondant d'un sperme d'Oursin donné.*

V. — La conservation parabiotique des gamètes pondus.

On a vu que les ovules sont plus sensibles au vieillissement que les spermatozoïdes. Etant donnée l'existence de substances de fécondation pour la plupart solubles dans l'eau de mer, on peut se demander s'il n'est pas possible d'envisager une prolongation de la survie des gamètes en les plaçant dans des conditions telles qu'il y ait un constant renouvellement de certains de ces produits. J'ai donc procédé à des expériences de parabiose en utilisant des membranes de collodion ; ces expériences ont ceci de particulier qu'elles sont des parabioses spécifiques de cellules à cellules.

Le principe revenait à placer l'un dans l'autre deux sacs de collodion de taille différente, le sac interne étant évidemment le plus petit, chacun des sacs renfermant isolément un type de gamètes (mâles ou femelles). Les ovules décantent rapidement et il pouvait être avantageux d'agiter le montage « hermaphrodite » si je puis dire (ovotestis artificiel). Mais l'agitation s'est avérée ici encore dommageable et je l'ai abandonnée.

Dans mes expériences j'ai donc utilisé des sacs de dialyse statique remplis avec les gamètes de telle sorte qu'il n'y ait aucun espace gazeux à l'intérieur des sacs.

Voici le protocole des expériences-types portant sur 24 heures de conservation : soit deux séries :

I { ♀ sac interne / ♂ sac externe et II { ♀ sac externe / ♂ sac interne

1) spermatozoïdes d'*A. lixula* obtenus par pontes par section de 12 mâles ; $\Delta\lambda^{1/50}_{600\ (B.M.)} = 25$, après dilution par l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ ;

2) ovules d'*A. lixula* obtenus par pontes par section de 16 femelles ; environ 10.000 ♀/cm³ d'eau de mer filtrée et pénicillinée à 100 u./cm³.

Dimensions des sacs :

1) *sac interne* : diamètre = 16 millimètres, volume = 8 cm³, longueur efficace = 52 millimètres ;

2) *sac externe* : diamètre = 24 millimètres, volume = 30 cm³, longueur efficace = 65 millimètres.

Des témoins ♂ et ♀ en petits et grands sacs sont constitués.

Mise en dialyse contre de l'eau de mer courante ordinaire à 21° C.

Après 24 heures :

Morphologie. — 1) les spermatozoïdes en I et II sont mobiles,

2) les ovules de I et II ne montrent aucun clivage ce qui nous assure de l'étanchéité des sacs aux spermatozoïdes. Les ovules de II paraissent en meilleur état.

Réductase (24° C) :

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ ♂ I : 5-7 minutes

— 1 cm³ B. M. 0.02 o/o + 1 cm³ ♂ II : 7-10 minutes

(à titre indicatif, les témoins mis en dialyse simple en grands ou en petits sacs donnent : 8 mn.-11 mn. 40 s).

*Action de l'eau de mer ovulaire d'*A. lixula ($\Delta\lambda^{3\ Pb + 2\ e.\ m.\ o.}_{600\ (B.\ M.)} = 2{,}5$) ; essais selon : 1 cm³ e. m. o./1 cm³ ♂ :

I : gros essaims typiques durant 15 minutes (après quoi il reste encore des petits amas spermatiques) ;

II : pendant 6 minutes très petits agglutinats aux contours mal définis devenant filamenteux, comme on en rencontre avec des suspensions spermatiques en voie de lyse.

Détermination de l'état fonctionnel des gamètes (lectures après 1 h. 30 mn., à 24° C) :

1) *ovules* (10 cm³ ♀ + 1 cm³ ♂ de 35 minutes de $\Delta\lambda^{1\ 50}_{600\ (B.\ M.)} = 18$) :

I : 0 o/o de clivage.

II : 80 o/o de stades II, IV, VIII.

Témoins de dialyse simple : 2 o/o de stades II.

2) *Spermatozoïdes* (1 cm³ ♂ + 10 cm³ ♀ de 35 minutes lavés trois fois par décantation et renfermant 8.400 ♀/cm³) :

I : 50 o/o de stades II, IV, VIII (beaucoup d'œufs paraissent polyspermiques : clivage irrégulier), de nombreux œufs sont entourés d'une forte aura spermatique.

II : 35 o/o de stades II et IV, rares stades VIII.

Témoins de dialyse simple : 40 o/o de stades II et IV.

Conclusion. — La conservation en dialyse parabiotique paraît favorable à la survie tant des ovules que des spermatozoïdes dans la mesure où l'une ou l'autre de ces catégories de gamètes se trouve placée dans l'enveloppe semi-perméable externe. Il semble donc qu'ici encore ce soit l'oxygénation du milieu qui est le facteur favorable ; il paraît de plus vraisemblable qu'un ou plusieurs agents diffusants d'origine spermatique ou ovulaire jouent un rôle favorisant. Tout se passe comme si le sac interne était un milieu confiné.

CHAPITRE VII

COMPORTEMENT DIFFÉRENTIEL DES SPERMATOZOIDES

> Il ne faut pas multiplier les êtres sans nécessité.
>
> OCCAM.

Jusqu'ici j'ai en quelque sorte considéré les causes éventuelles de la stérilité spécifique chez les Oursins. J'examinerai maintenant le problème de la stérilité hybride. J'ai montré qu'il était fondamental de considérer dans les relations spermatozoïdes-ovules le comportement des gamètes mâles envers l'eau de mer *ovulaire*. L'agglutinat, du point de vue de l'éthologie des populations cellulaires libres, peut être considéré comme une *foule* (association temporaire résultant de stimuli physiques ou chimiques sur un groupe d'animaux (481) (482), et on a vu comment s'explicite cet attroupement cellulaire : c'est la conséquence d'une affinité chimique entre les spermatozoïdes et la fertilisine. Dans le devenir embryonnaire « le protoplasme ovulaire, écrit MORGAN (438), détermine les premiers stades du développement, plus tard seulement se révèle l'influence des chromosomes spermatiques » ; l'influence physiologique du spermatozoïde est toutefois primordiale et, comme elle dépend des corrélations fertilisine-sperme, on conçoit qu'une des causes de la stérilité hybride puisse résider dans l'inaptitude des spermatozoïdes à atteindre les ovules, puis à les pénétrer. Ce facteur de compatibilité permet donc de distinguer dans les causes de la stérilité ou de son inverse la fécondité : 1) une stérilité physiologique liée aux corrélations sperme-fertilisine, 2) une stérilité cytoplasmique liée aux relations cytoplasme ovulaire-spermatozoïde, 3) une stérilité nucléaire liée aux relations pronucleus femelle-pronucleus mâle qui, contrairement aux deux autres, peut être à manifestation plus ou moins tardive. Nous verrons au cours de ce chapitre si la notion de stérilité physiologique se définit bien comme je viens de le faire.

Par ailleurs, dans la structure sociologique d'une frayère d'Oursins on doit considérer : 1° que les gamètes mâles sont des cellules spontanément mobiles contrairement aux gamètes femelles ; 2° que le milieu est complexe, *a*) par son peuplement végétal et animal qui peut varier considérablement, *b*) par les fluctuations d'ordre physico-chimique du biotope marin : courants, variations locales d'ordre thermique, lumineux, gazeux, ionique, etc. Or, un phénomène remarquable se produit depuis quelques années dans la région de Banyuls-sur-Mer. En 1927, KOEHLER signale (318) *A. lixula* comme rare tandis que *P. lividus* était noté comme abondant. Aujourd'hui *A. lixula* se

trouve en quantités considérables et en certains points de la côte il a presque entièrement supplanté *P. lividus*. Je me suis proposé d'examiner en fonction de ce phénomène le comportement réciproque des gamètes de ces deux genres d'Oursins (on notera d'ailleurs que l'étude des croisements *A. lixula-P. lividus* revêt un intérêt particulier car ces croisements sont inter-génériques). Mon travail n'a au reste visé qu'à une écologie si je puis dire abstraite de la fécondation car, dans l'état de nos connaissances qualitatives du problème, il ne fallait pas chercher à reconstituer le milieu naturel possible de fécondation avant d'en établir des aspects quantitatifs restreints aux seules corrélations inter-gamétiques. Le problème faisant nécessairement intervenir les gamones, il convient d'avoir présent à l'esprit que dans une frayère unigénérique ou mixte, la concentration en fertilisine et en spermatozoïdes dépendra du nombre d'animaux matures placés dans un espace défini ; on se souviendra alors de ce qui a été dit *(passim)* au sujet des concentrations relatives sperme-fertilisine. Quant au facteur : âge spermatique, on peut considérer que normalement, lorsque les animaux sont groupés, un temps de latence court existe entre le moment des pontes et celui des fécondations.

Protocole I.

Soit à Banyuls-sur-Mer en septembre :

1) des spermatozoïdes de *P. lividus* (prélèvements testiculaires par dissection portant sur 37 mâles) d'âge t_0 (= 20 minutes) $\Delta^{1/50}_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 47$ après dilution par de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ ;

2) des spermatozoïdes d'*A. lixula* (section des tests de 12 mâles), d'âge t_0 ; $\Delta^{1/50}_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 51{,}5$ après dilution par de l'eau de mer filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ :

3) de l'eau de mer ovulaire de *P. lividus* et

4) de l'eau de mer ovulaire de *A. lixula*

obtenues l'une et l'autre à partir d'ovules d'âge t_0 lavés trois fois par décantation avec de l'eau de mer filtrée, pénicillinée à 100 u./cm³ et telles que l'on a les valeurs opacimétriques suivantes (à 23° C) :

$\Delta^{2\ Pb\ +\ 3\ e.\ m.\ o.\ A.\ l.}_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 6{,}8$ (blanc *A. l.* = 3) (déduit) ;

$\Delta^{2\ Pb\ +\ 3\ e.\ m.\ o.\ P.\ l.}_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 8{,}5$ (blanc *P. l.* = 8,3) (déduit).

Réductase spermatique (22° C ; t_0 + 5 heures) :

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. *A. l.* + 1 cm³ ♂ *A. l.* : 3 mn. 50 s.-5 mn. 30 s.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. *A. l.* + 1 cm³ ♂ *P. l.* : 22-28 minutes.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. *P. l.* + 1 cm³ ♂ *P. l.* : 15 mn. 10 s.-21 mn.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. *P. l.* + 1 cm³ ♂ *A. l.* : 7 mn.-9 mn. 45 s.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ + 1 cm³ ♂ *A. l.* : 5 mn. 10 s.-7 mn. 20 s.

— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. filtrée pénicillinée à 100 u./cm³ + 1 cm³ ♂ *P. l.* : 22-28 minutes.

Fécondation (t_0 + 4 heures ; 22° C) : dans chaque couvercle de boîte de Pétri, 1 cm³ ♂ *P. l.* ou ♂ *A. l.* + 5 cm³ d'eau de mer (e. m.) ou d'eau de mer ovulaire (e. m. o.) considérée — spécifié alors — (eau de mer de préparation filtrée et pénicillinée à 100 u./cm³ + 5 cm³ de suspension ovulaire d'âge t_0 + 4 heures et renfermant environ :

3.100 ♀/cm³ pour *P. lividus* (*P. l.*),

3.400 ♀/cm³ pour *A. lixula* (*A. l.*).

Le tableau XIII relève les observations (après 2 heures d'incubation ; 22° C).

TABLEAU XIII

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
♂ *P. l.* × ♀ *P. l.*	♂ *A. l.* × ♀ *A. l.*	♂ *P. l.* × ♀ *A. l.*	♂ *A. l.* × ♀ *P. l.*	♂ *P. l.* × ♀ *P. l.* + e. m. o. *P. l.*
42 o/o stades II et VI	28 o/o stades II et IV	3 stades II, 1 stade IV ; nombreux ♂ très mobiles	aucun clivage (tous les ♂ immobiles)	40 o/o stades II et IV

(6)	(7)	(8)	(9)		(10)	
♂ *A. l.* × ♀ *A. l.* + e. m. o. *A. l.*	♂ *P. l.* × ♀ *P. l.* + e. m. o. *A. l.*	♂ *A. l.* × ♀ *A. l.* + e. m. o. *P. l.*	1 ♂ *P. l.* × 5 ♀ *P. l.* + 5 ♀ *A. l.* *a)*	*b)*	1 ♂ *A. l.* × 5 ♀ *P. l.* + 5 ♀ *A. l.* *a)*	*b)*
4 o/o stades II et IV	27,5 o/o stades II, IV, et XIII	9 o/o stades II et IV	30 o/o stades II et IV	2 stades II	aucun clivage	35 o/o stades II et IV

N. B. — 1 et 5, par exemple, signifient d'une façon sous-entendue 1 et 5 cm^3.

Les hybrides ♂ *P. l.* × ♀ *A. l.* blastulent normalement mais ne peuvent gastruler. On constate alors la présence de gros amas spermatiques et, dans un cas comme celui d'une combinaison du type (9), des gastrulas *P. l.*-*P. l.* sont visibles simultanément.

Une combinaison inverse (type (4) ou (10 *a*)) ne donne aucun amas spermatique, aucun hybride, au moment où la combinaison *A. l.*-*A. l.* a atteint le stade gastrula.

Après 24 heures de conservation des spermatozoïdes en récipient de Borrel de 50 millimètres de diamètre × 10 centimètres de hauteur (9 = 22° C), je note :

♂ *P. l.* : forte odeur purique, aucun mouvement et les gamètes mâles ne sont pas réactivables par l'eau de mer ovulaire d'*A. lixula* ni par celle de *P. lividus* d'ailleurs (on obtient dans ce dernier cas des amas allongés à spermatozoïdes immobiles) ;

♂ *A. l.* : ne présentent aucune odeur anormale, un certain nombre est mobile ; les spermatozoïdes sont fortement réactivables *sans donner des agglutinats typiques avec l'eau* de mer ovulaire d'*A. lixula* ; aucune réactivation par de l'eau de mer ovulaire de *P. lividus*.

Réductase (24 heures + 2 heures; 22° C) :
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. *P. l.* + 1 cm³ ♂ *P. l.* : 70-78 minutes.
— 1 cm³ B.M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. *P. l.* + 1 cm³ ♂ *A. l.* : 9 mn.-11 mn. 30 s.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. *A. l.* + 1 cm³ ♂ *A. l.* : 5-7 mn. 45 s.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. o. *A. l.* + 1 cm³ ♂ *P. l.* : 75-82 minutes.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. + 1 cm³ ♂ *P. l.* : 80-93 minutes.
— 1 cm³ B. M. 0,02 o/o + 1 cm³ e. m. + 1 cm³ ♂ *A. l.* : 7 mn. 30 s.-10 mn. 30 s.
Fécondation (t_0 + 26,15 h.; 22° C; 1 cm³ ♂/5 cm³ eau de mer (e. m.) + 5 cm³ d'ovules d'une heure d'une suspension renfermant environ 2.000 ♀/cm³, tant pour *P. lividus* (*P. l.*) que pour *A. lixula* (*A. l.*) (tableau XIV).

TABLEAU XIV

	Immédiatement	Après 2 heures
♂ *P. l.* × ♀ *P. l.*	Petits agrégats spermatiques.	Aucun clivage. Gros amas spermatozoïdes-ovules où les ovules ont la gangue bien délimitée par les spermatozoïdes.
♂ *A. l.* × ♀ *A. l.*	Spermatozoïdes en amas fusiformes.	70 o/o de stades II à XXXII ; spermatozoïdes mobiles.
♂ *P. l.* × ♀ *A. l.*	Gros amas spermatozoïdes-œufs.	Aucun clivage. Très gros amas spermatozoïdes-œufs rendant la lecture difficile.
♂ *A. l.* × ♀ *P. l.*	Couronnes spermatiques péri-ovulaires denses.	Aucun clivage. Auréoles spermatiques péri-ovulaires épaisses.

Conclusions. — 1) en période de maturité commençante les spermatozoïdes (*P. lividus*) ont une grande fragilité à la conservation même en milieu aseptique ;

2) d'une façon plus générale, en ce qui concerne les expériences d'hybridations, il est important de remarquer que de telles expériences ne peuvent nécessairement être réalisables qu'*en périodes de chevauchement des maturités* de chaque espèce d'Oursin mise en jeu ; or, admettons qu'il y ait deux périodes de maturité pour *P. lividus* (automne et printemps) et deux également pour *A. lixula* (été et hiver) dans une station mixte donnée, il y aura quatre périodes de chevauchement telles que tantôt *P. lividus* sera en maturité finissante et *A. lixula* en maturité commençante, tantôt ce sera l'inverse, et il est possible que ces inversions cycliques influent sur l'éventualité des croisements dans un sens ou dans un autre avec une sélection du pouvoir d'hybridation, fonction de la saison. Une des perspectives de la conservation indéfinie des gamètes dans tous leurs attributs est d'annuler cette restriction saisonnière dans les études de génétique physiologique ;

3) on est conduit à distinguer l'existence de *gamètes forts* et de *gamètes faibles*. Ainsi dans l'exemple qui fait l'objet du présent protocole d'expériences, les *spermatozoïdes* de *P. lividus* sont les *gamètes faibles* tandis

que dans cette espèce les *ovules* sont les *gamètes forts*. Chez *A. lixula* c'est l'inverse. Ceci découle de l'examen des relations entre les gamètes (et leurs produits) sur le plan métabolique (réductase) et biologique (hybridation) les gamètes sont dits *forts* parce qu'ils ne s'hybrident pas ;

4) on en arrive ainsi à considérer une règle, qu'on peut nommer *règle physiologique d'hybridation*, que j'énonce ainsi : *l'indifférence ou l'activation des spermatozoïdes par l'eau de mer ovulaire hétérologue conditionne la compatibilité d'hybridation, l'inhibition conditionne l'incompatibilité* ;

5) le vieillissement fait perdre aux spermatozoïdes de *P. lividus* d'automne (Banyuls-sur-Mer) leur pouvoir de donner des blastulas hybrides avec les ovules d'*A. lixula* ;

6) l'eau de mer ovulaire complémentée (cas hétérologues) ou supplémentée (cas homologues) aux milieux de fécondation paraît diminuer le taux de fécondations homologues, ou tout au moins du résultat noté : le taux de clivages (des relations de concentrations interviennent peut-être) ; toutefois pour *A. lixula* (en fin de période de maturité) la présence d'eau de mer ovulaire hétérologue (de gamètes en début de période de maturité) paraît favoriser les clivages homologues (comparer 6 et 8, tableau XIII).

Protocole II.

Etant donné les travaux de Godlewski, on peut se demander si un antagonisme éventuel entre les spermes de *P. lividus* et d'*A. lixula* ne serait pas en partie responsable du résultat des hybridations. J'ai cherché à m'en assurer quoique d'une part, dans mes expériences d'hybridation, il n'y ait pas contact spermatique préalablement à l'adjonction des spermatozoïdes et que, d'autre part, si les spermes d'*A. lixula* et de *P. lividus* se neutralisaient mutuellement on ne concevrait pas facilement la possibilité de l'hybridation dans un sens et non dans un autre.

Soit donc des fécondations réalisées en automne à Banyuls-sur-Mer avec :
— 1 cm³ d'une suspension de spermatozoïdes de *P. lividus* âgés de 1 heure $\Delta\lambda_{600\,(B.\,M.)}^{1/50} = 35$ après dilution par de l'eau de mer filtrée, soit t_0 ;
— 1 cm³ d'une suspension de spermatozoïdes d'*A. lixula* âgés de 1 heure, $\Delta\lambda_{600\,(B.\,M.)}^{1/50} = 35$ après dilution par de l'eau de mer filtrée, soit t_0 ;
et :
— 4 cm³ d'une suspension d'ovules de *P. lividus* âgés de 1 heure (soit t_0) et renfermant environ 12.000 ♀/cm³ d'eau de mer filtrée ;
— 4 cm³ d'une suspension d'ovules d'*A. lixula* âgés de 1 heure (soit t_0) et renfermant environ 12.000 ♀/cm³ d'eau de mer filtrée ;
plus :
5 cm³ d'eau de mer filtrée dans chaque récipient d'expérience. L'eau de mer ovulaire d'*A. lixula* renfermait 11,4 γ N ♀ total/cm³ ; celle de *P. lividus* renfermait 8,97 γ N ♀ total/cm³.

Le tableau XV relate les différents résultats (l'adjonction des spermes différents était faite simultanément).

Fécondations effectuées à t_0 + 1 h. 30 mn. à 17° C.

TABLEAU XV

	Combinaisons	Observations Après 2 heures
(1)	♂ *A. l.* × ♀ *A. l.*	100 o/o de stades II.
(2)	♂ *P. l.* × ♀ *P. l.*	16 o/o de stades II ; 50 o/o après 4 heures.
(3)	♂ *A. l.* × ♀ *P. l.*	Aucun clivage, aucun agglutinat spermatique.
(4)	♂ *P. l.* × ♀ *A l.*	1 o/o de stades II + amas spermatiques (après 4 heures : 4 o/o de stades II).
(5)	(♂ *A. l.* 0,5 cm³ + ♂ *P. l.* 0,5 cm³) + ♀ *A. l.* 4 cm³	100 o/o de stades II.
(6)	(♂ *P. l.* 0,5 cm³ + ♂ *A. l.*) 0,5 cm³ + ♀ *P. l.* 4 cm³	12-15 o/o des stades II ; 50 o/o après 4 heures.
(7)	0,5 cm³ (♂ *A. l.* + ♂ *P. l.*) 0,5 cm³ + (♀ *A. l.* 2 cm³ + ♀ *P. l.* 2 cm³)	30-38 o/o des stades II avec *A. l.* (60 o/o après 5 heures). 10-12 o/o de stades II avec *P. l.*

La confrontation des expériences (1) (2) (5) et (6) nous indique qu'il n'y a pas inhibition du pouvoir fécondant ou de la fécondabilité liée à la présence de sperme étranger.

A t_0 + *3 heures*, avec les mêmes éléments spermatiques et ovulaires conservés en récipients de Bécher en pyrex de 100 cm³, on procède à de nouvelles inséminations. Le tableau XVI indique les résultats obtenus dans les mêmes conditions que précédemment.

Donc, on aboutit à la même conclusion que dans l'expérience précédente ; même après un vieillissement de courte durée des spermatozoïdes et des ovules : il n'y a pas antagonisme des spermes. On remarquera que dans les expériences qui ont fait jusqu'ici l'objet de ce protocole le rapport de la concentration spermatique à la concentration ovulaire est relativement proportionné. On peut se demander ce qu'il advient lorsque la concentration en ovules et celle en spermatozoïdes sont plus déséquilibrées relativement. J'ai donc procédé à des fécondations (à 19° C) en utilisant des spermatozoïdes d'*A. lixula* et de

TABLEAU XVI

	Combinaisons	Observations Après 3 h. 30 mn.
(1)	♂ *A. l.* × ♀ *A. l.*	96 o/o de stades II et IV.
(2)	♂ *P. l.* × ♀ *P. l.*	45 o/o de stades II et IV (nombreux clivages imparfaits et irréguliers).
(3)	(♂ *A. l.* + ♂ *P. l.*) + ♀ *A. l.*)	# 100 o/o de stades II...XVI.
(4)	(♂ *A. l.* + ♂ *P. l.*) + ♀ *P. l.*)	42 o/o de stades II...XVI.
(5)	(♂ *A. l.* + ♀ *P. l.*) + (♀ *A. l.* + ♂ *P. l.*)	52 o/o de stades II et IV avec *A. l.* 37 o/o de stades II et IV avec *P. l.*

P. lividus âgés de 1 heure et tels que les suspensions avaient des densités optiques :

♂ *A. l.*, $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 75{,}1$, après dilution dans de l'eau de mer filtrée ;
♂ *P. l.*, $\Delta_{\lambda 600\ (B.\ M.)} = 77{,}5$, après dilution dans de l'eau de mer filtrée.
Par ailleurs étaient constituées des suspensions ovulaires :
♀ *A. l.* renfermant environ 5.000 ♀/cm³ d'eau de mer filtrée ;
♀ *P. l.* renfermant environ 5.000 ♀/cm³ d'eau de mer filtrée.
Enfin les eaux de mer ovulaires au moment des fécondations renfermaient :
pour e. m. o. *A. l.* # 9,8 γ N ♀ total/cm³ d'eau de mer filtrée ;
pour e. m. o. *P. l.* # 6,98 γ N ♀ total/cm³ d'eau de mer filtrée.

Les volumes de chaque type de suspension dans chaque récipient étaient : 1 cm³ ♂ + 5 cm³ d'eau de mer + 5 cm³ ♀ et, dans le cas des mélanges les volumes étaient choisis de telle façon que les volumes de chaque type cellulaire étaient égaux et que le volume final était de 11 cm³. Le tableau XVII résume les résultats obtenus (les valeurs des indices sont des centimètres cubes) ; en les confrontant avec ceux des tableaux XIII, XV, XVI :

Conclusions. — 1) A une concentration relativement élevée les gamètes de *P. lividus* tendent à empêcher la fécondation d'*A. lixula* ;

2) les expériences de GODLEWSKI n'ont pas été faites dans des conditions aseptiques quoiqu'elles fussent de longue durée. Il en résulte qu'on ne saurait dire jusqu'à quel point des bactéries de contamination n'ont pas participé au phénomène de l'antagonisme réciproque des spermes d'espèces étrangères ; ce

TABLEAU XVII

Combinaisons	Lectures après 2,50 h.
♂ *A. l.* × ♀ *A. l.*	80 o/o de stades II et IV.
♂ *P. l.* × ♀ *P. l.*	73 o/o de stades II et IV (rares stades VIII).
(♂ *P. l.* 0,5 + ♂ *A. l.* 0,5) + ♀ *A. l.*	80 o/o de stades II et IV.
(♂ *P. l.* 0,5 + ♂ *A. l.* 0,5) + ♀ *P. l.*	80 o/o de stades II et IV.
(♂ *P. l.* 0,5 + ♂ *A. l.* 1,5) + (♀ *P. l.* 4 + ♀ *A. l.* 4)	84 o/o *A. l.* Stades II, IV et VIII. 90 o/o *P. l.*

phénomène est la conséquence d'une agglutination spermatique et il me paraît vraisemblable que c'est l'anti-fertilisine qui est ici en cause jouant le rôle de toxine hétérologue. La libération de l'anti-fertilisine, je l'ai montré à diverses reprises dans ce travail, est favorisée par la disparition des métabolites, or dans une population spermatique septique les micro-organismes pathogènes prélèvent pour leur croissance et leur multiplication des métabolites soit moléculaires (compétition trophique spermatozoïdes-agents septiques) soit même cellulaires (destruction spermatique) ; telles sont les causes qui raccourcissent la durée de survie du sperme contaminé par des germes contages ;

3) pour distinguer ce qui revient éventuellement aux spermatozoïdes de *P. lividus* d'une part et aux ovules de *P. lividus* dans le rôle de ces gamètes sur les croisements *A. lixula*-*A. lixula* d'un mélange avec *P. lividus* [tableau XV (1) (5)] on peut déjà remarquer que dans la combinaison (♂ *P. l.* + ♂ *A. l.*) + ♀ *A. l.*) il n'y a aucune inhibition nette dans le croisement spécifique. Cependant on pourrait objecter que la faculté de produire des hybrides ♂ *P. l.* × ♀ *A. l.* peut intervenir pour fausser l'interprétation en permettant aux ♂ *P. l.* de suppléer aux ♂ *A. l.* Pourtant ce que nous savons déjà de l'action de l'eau de mer ovulaire de *P. lividus* sur les spermatozoïdes d'*A. lixula* (p. 112) laisse entendre que ce sont les ovules, par les substances qui en diffusent, et non les spermatozoïdes de *P. lividus* qui sont responsables de l'action inhibitrice.

Pour chercher à démontrer ce point, on peut penser à suivre le développement ultérieur des embryons, jusqu'au stade pluteus ou seulement gastrula,

puisque les hybrides ♂ *P. l.* × ♀ *A. l.* ne gastrulent pas dans mes expériences, mais ce procédé est aléatoire, car même dans le cas des croisements spécifiques, il n'est pas rare qu'un certain nombre de jeunes embryons périclite avant la gastrulation.

Les procédés directs de démonstration consistent soit à examiner le comportement de combinaisons (♀ *A. l.* + ♀ *P. l.*) + ♂ *P. l.* et (♀ *A. l.* + ♀ *P. l.*) + ♂ *A. l.*, soit à examiner le comportement ♂ *P. l.* + e. m. o. *A. l.* et ♂ *A. l.* + e. m. o. *P. l.* Or que constate-t-on du point de vue réductasique dans ce dernier cas ?

L'eau de mer ovulaire de *P. lividus* (*P. l.*) diminue l'activité réductasique des spermatozoïdes d'*A. lixula* (*A. l.*) frais ou âgés de 24 heures (p. 112-114) tandis que l'eau de mer ovulaire d'*A. lixula* est sans effet sur des spermatozoïdes frais de *P. lividus* et dans mes expériences ce sont des spermatozoïdes frais qui ont été utilisés (*N. B.* : l'eau de mer ovulaire d'*A. l.* active le pouvoir réductasique des spermatozoïdes de *P. l.* âgés de 24 heures par rapport au pouvoir réductasique de ces spermatozoïdes en eau de mer (p. 114), mais cette action au niveau métabolique est insuffisante, car c'est la structure des spermatozoïdes qui est affectée — libération de déshydrogénases ? — puisque les croisements spécifiques eux-mêmes deviennent impossibles). Donc la règle de réactivation de l'activité réductasique de spermatozoïdes vieillis à l'aide d'eau de mer ovulaire (p. 103) ne serait valable que pour les croisements *spécifiques*).

Si par ailleurs on examine le comportement « morphologique » de spermatozoïdes d'espèce donnée envers une eau de mer ovulaire étrangère on constate ceci :

Soit :
— une eau de mer ovulaire de *P. lividus* (e. m. o. *P. l.*) de concentration C_1 ;
— une eau de mer ovulaire de *A. lixula* (e. m. o. *A. l.*) de concentration C_2. (avec $c_1 \neq c_2$), et
— une suspension de spermatozoïdes de *P. lividus* (♂ *P. l.*) de concentration k_1 ;
— une suspension de spermatozoïdes de *A. lixula* (♂ *A. l.*) de concentration k_2 (avec $k_1 \neq k_2$), on a (à 27° C) :
1) ♂ *P. l.* + e. m. o. *P. l.* : agglutinats typiques de 4 minutes (15 secondes de latence) ;
2) ♂ *A. l.* + e. m. o. *A. l.* : agglutinats en auréole de 1 minute ;
3) ♂ *P. l.* + e. m. o. *A. l.* : agglutinats en réseau ramifié à spermatozoïdes peu ou pas mobiles, mais les spermatozoïdes libres sont très mobiles ;
4) ♂ *A. l.* + e. m. o. *P. l.* : aucun agglutinat mais les spermatozoïdes sont immobilisés (comme englués), certains vibrent immobilisés sur place, d'autres se déplacent très difficilement sur de courtes distances ;
5) ♂ *P. l.* + e. m. o. *P. l.* : comme en 1). Si après désagglutination on fait :
a) + e. m. o. *P. l.* aucune réagglutination ne se produit,
b) + e. m. o. *A. l.* : formation d'agglutinats à spermatozoïdes immobiles (leur flagelle est rectiligne).

Cette expérience 5 *b*) est une hétéro-agglutination caractéristique qui revêt une grande importance pour la théorie de l'agglutination et de la désagglutination, elle montre que l'agglutination peut être la conséquence de fixation de fertilisine *sur des points différents* de la cellule spermatique, l'agglutination spontanément réversible affectant, semble-t-il, seulement la région acroso-

mienne, l'agglutination irréversible hétérologue portant vraisemblablement sur d'autres régions ;

6) ♂ *P. l.* + e. m. o. C_2 diluée au 1/5 par de l'eau de mer filtrée : agglutinats typiques de 3 minutes ;
7) ♂ *A. l.* + e. m. o. C_1 diluée au 1/5 par de l'eau de mer filtrée : aucun agglutinat mais *tous les spermatozoïdes sont mobiles.*
Donc :
a) l'eau de mer de *P. lividus* immobilise sans les agglutiner les spermatozoïdes d'*A. lixula si elle est concentrée*, elle paraît indifférente quand elle est diluée ;
b) ceci paraît expliquer le rôle de la concentration en ovules de *P. lividus* dans le résultat des fécondations d'*A. lixula* en mélanges : ♂ *P. l.* + ♀ *P. l.* + ♂ *A. l.* + ♀ *A. l.* (p. 16, 17) : aux fortes concentrations les ♀ *P. l.* inhibent les croisements spécifiques *A. l.* ;
8) ♂ *A. l.* + e. m. o. *P. l.* : comme en 4) mais si on ajoute des spermatozoïdes d'*A. lixula*, il se produit une agglutination typique montrant que la présence de spermatozoïdes de *P. lividus* n'empêche pas la combinaison fertilisine *A. l.*-spermatozoïdes *A. l.*

Remarques. — 1) Les spermatozoïdes d'*A. lixula* et de *P. lividus* forment des halos de collage autour des gangues des ovules d'*A. lixula* ; autour des gangues des ovules de *P. lividus* la couronne spermatique est beaucoup moins dense. Ceci montre particulièrement que l'adhérence des spermatozoïdes au gel de la gangue n'est pas un phénomène uniquement physique.
2) Je rappelle qu'en eau bidistillée les spermatozoïdes peuvent être agglutinés par la fertilisine spécifique ou hétérologue (p. 36) ; les différences d'intensité dans ces agglutinats peuvent être attribuées au poids moléculaire différent de la fertilisine d'*A. lixula* et de celle de *P. lividus*.

Réanimations. — Il est important de préciser les expériences du protocole I de ce chapitre concernant l'action croisée d'eaux de mer ovulaires sur des spermatozoïdes immobilisés, en examinant le cas d'un vieillissement de courte durée.
(1) Soit à Naples (mois de juin) :

1) des spermatozoïdes de *P. lividus* d'âge t_0 $\Delta\gamma^{1/10}_{\lambda_{170}\,(K.)} = 96$;
2) des spermatozoïdes d'*A. lixula* d'âge t_0 $\Delta\gamma^{1/10}_{\lambda_{170}\,(K.)} = 110$;
3) de l'eau de mer ovulaire de *P. lividus* renfermant 8,68 γ N ♀ total/cm³ ;
4) de l'eau de mer ovulaire de *A. lixula* renfermant 9,10 γ N ♀ total/cm³.
Réductase (t_0 + 1 heure 24° C), selon la combinaison : 1 cm³ d'eau de mer ou d'eau de mer ovulaire + 0,5 cm³ de bleu de méthylène à 0,02 o/o en eau de mer filtrée + 1 cm³ de sperme :

	♂ *A. lixula*	♂ *P. lividus*	(à t_0 + 5 heures)
Eau de mer . . .	18 minutes	18 minutes	48 minutes
Eau de mer ovulaire d'*A. lixula*. . .	11 minutes	32 minutes	48 minutes
Eau de mer ovulaire de *P. lividus* . .	14 minutes	16 minutes	33 minutes

Conclusions. — 1) On ne doit pas perdre de vue que pour l'interprétation des fécondations, en se fondant sur l'activité réductasique, ce n'est pas l'activité réductasique du sperme en eau de mer ordinaire qui compte (elle ne sert que de référence) mais l'activité réductasique du sperme en présence de l'eau de mer ovulaire correspondant aux ovules à féconder ; en conséquence la

colonne ♂ *A. lixula* peut s'interpréter comme une inhibition de la réductase spermatique par l'eau de mer ovulaire de *P. lividus*.

2) Cette inhibition est marquée dans le sens e. m. o. *A. l.* + ♂ *P. l.* mais disparaît après un court vieillissement ; l'examen microscopique montre que les spermatozoïdes frais sont agglutinés en filaments et rapidement immobilisés, tandis qu'après vieillissement des spermatozoïdes, l'action de l'eau de mer ovulaire hétérologue est devenue indifférente ; or à Naples c'est le croisement ♀ *P. l.* × ♂ *A. l.* qui réussit généralement (cf. 695). Avant de conclure à l'existence de races géographiques comme l'a fait Fischel il faudrait étudier systématiquement l'influence de la saison (période de maturité) comme j'y ai fait allusion dans le courant de ce chapitre.

II) Soit à Banyuls-sur-Mer (mois de septembre) :

— des spermatozoïdes de *P. l.* immobiles d'âge t_0 et de concentration c ;
— des spermatozoïdes de *A. l.* immobiles d'âge t_0 et de concentration c ;
— de l'eau de mer ovulaire de *P. l.* de concentration k ;
— de l'eau de mer ovulaire de *A. l.* de concentration k.

L'examen par la technique des trois gouttes donne les résultats suivants (0 = 21° C) ; observation immédiate (moins de 30 secondes après le recouvrement par la lamelle) ;

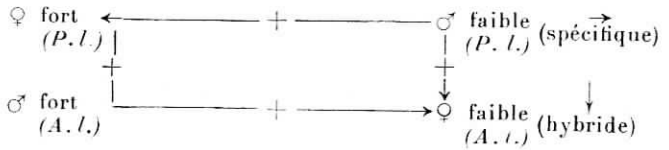
1) e. m. — ♂ *P. l.* — e. m. o. *P. l.* { côté e. m. ♂ immobiles ; côté e. m. o. ♂ mobiles, pas d'agglutinats.

2) e. m. — ♂ *A. l.* — e. m o. *A. l.* { côté e. m. ♂ mobiles, pas d'agglutinats ; côté e. m. o. ♂ peu mobiles, pas d'agglutinats immédiats.

3) e. m. o. *P. l.* — ♂ *A l.* — e. m. o. *A. l.* { côté e. m. o. *A. l.* ♂ très mobiles ; côté e. m. o. *P. l.* ♂ immobiles (quelques-uns vibrant sur place) plus ou moins groupés en amas allongés.

4) e. m. o. *P. l.* — ♂ *P. l.* — e. m. o. *A. l.* { côté e. m. o. *A. l.* ♂ mobiles, pas d'agglutinats ; côté e. m. o. *P. l.* ♂ mobiles, très petits agglutinats après 30 s.

Ce qui confirme les résultats du test de la réductase obtenus en automne à Banyuls-sur-Mer et qui *permet d'expliciter les hybridations*. En effet on conçoit qu'à forte concentration (comme il en va près des ovules) l'eau de mer ovulaire de *P. lividus* inhibant la propriété essentielle permettant l'approche de l'ovule — la motilité — la fécondation ne peut se produire. Par rapport à la notion de dominance et de récessivité physiologique, dans les hybridations d'Echinides, telle que je l'ai établie ici, il est possible de construire un schéma du type :



On voit que le croisement entre gamètes forts n'est pas possible. Cette *force* des gamètes dépend en grande partie des corrélations eau de mer ovulaire (fertilisine)-spermatozoïdes.

DISCUSSION

L'essentiel est de rendre correctes
les désignations.
CONFUCIUS.

I. — Des modalités de l'objet vivant.

Il vient naturellement à l'esprit que des êtres proliférants ont une naissance, une jeunesse, une maturité, une vieillesse, une mort, de même que l'on conçoit qu'un homme adulte dans sa vie domestique ait un comportement différent de celui du même individu dans sa vie professionnelle, car on découpe aisément les stades de l'histoire naturelle lorsque les modifications ont des repères évidents. Dans le cas des spermatozoïdes, et des spermatozoïdes d'Oursins plus spécialement, il ne semble pas qu'aucun auteur ait jamais clairement distingué les étapes de la vie de ces gamètes, et c'est certainement à cette négligence que l'on doit bien des confusions. Cependant l'existence normale de *modus vivendi* distincts ne saurait être contestée, j'en établirai le classement de la façon suivante :

1) une vie testiculaire,
2) une vie marine non fonctionnelle,
3) une vie marine fonctionnelle ou péri-ovulaire,
4) une vie ovulaire *sensu stricto*,
5) une vie intra-ovulaire ou zygotique :
a) d'abord cytoplasmique,
b) puis nucléaire.

A chacun de ces stades les spermatozoïdes sont dans des conditions différentes et telles qu'on peut dire sans exagération qu'un individu spermatique est dans chaque état un être différent. Ces *allomorphoses*, pour utiliser le mot d'E. PERRIER (463) repris par A. LABBÉ (334), ces allomorphoses successives des spermatozoïdes sont caractéri-ées :

1) *pour la vie testiculaire :* par l'hypoxybiose (voire l'anaérobiose), l'immobilité, etc. ;

2) *pour la vie non fonctionnelle :* par l'aérobiose, la motilité, etc., caractères qui dépendent notamment de la concentration et de l'âge spermatiques ;

3) *pour la vie péri-ovulaire :* par la respiration modifiée (généralement accrue), par la motilité modifiée (accrue puis abaissée), par l'agglutination (généralement spontanément réversible), etc., caractères qui dépendent aussi dans une large mesure de la concentration et de l'âge spermatiques, et en plus de la concentration de la fertilisine ;

4) *pour la vie ovulaire :* par la fixation irréversible à la gangue, par l'activation membranaire de l'ovotide, etc., caractères qui dépendent en grande partie de l'état de la surface de l'ovotide offerte aux spermatozoïdes ;

5) *pour la vie zygotique :* par la destruction de toute la morphologie typique des spermatozoïdes fécondants et par l'apparition de toutes les modifications cytologiquement et physiquement les mieux connues (retournement spermatique, apparition de l'aster spermatique, modifications de la viscosité du cytoplasme de l'œuf, etc.). Cette dégradation morphologique du spermatozoïde conduit à l'apparition des seuls chromosomes paternels à l'amphimixie et la subsistance de certains reliquats (centrosome, flagelle ? ...) dont la destination nous échappe encore. En ce qui concerne cependant le centrosome on peut admettre son auto-duplication au cours de la vie du nouvel individu (consulter par exemple (91) (94)).

Ainsi depuis la vie testiculaire jusqu'à la vie zygotique, il y a comme une sélection des éléments spermatiques quant à leur nombre et vraisemblablement aussi quant à leur qualité. Du point de vue général, on voit toute la valeur de la remarque de Dubosco et Grassé (146) selon laquelle : « C'est une gageure de prendre pour exemple d'adaptation des éléments dont quelques-uns seulement sur des millions ou des milliards remplissent leurs destinées. » Ceci se trouve particulièrement illustré dans le cas de la fécondation chez la Truite où la durée de la vie libre des spermatozoïdes est remarquablement courte (283) (682) (672) sauf, semble-t-il (142), à basse température. On voit ainsi que s'en tenir à l'étude des spermatozoïdes en tant que système indépendant des ovules est dépourvu de signification. C'est donc à une *écologie de la fécondation* que nous aboutissons et en spermiologie des Mammifères les travaux les plus récents (10) (11) (12) (87) (128) (129) mettent bien l'accent sur l'intervention fondamentale des sécrétions du tractus génital femelle dans le succès des fécondations, agissant pour cela en conditionnant la maturation physiologique des gamètes mâles. Toute étude sur la physiologie de la fécondation qui négligerait ces corrélations sperme-milieu de la fécondation est à rejeter, ma contribution expérimentale le démontre, je pense, suffisamment.

II. — Méthodologie.

S'il est donc nécessaire de prendre en considération les spermatozoïdes successivement dans leurs biologies anovulaires et dans leurs biologies ovulaires, il paraît insuffisant du point de vue méthodologique de s'en tenir là. On a pu voir en effet (695) que, même dans le cadre d'études tenant compte des relations sperme-fertilisine, des conceptions différentes se sont fait jour. J'ai pu montrer que souvent les résultats contradictoires s'expliquaient au terme d'un examen expérimental systématique du problème. De telles contradictions montrent que l'opinion prime souvent la démonstration. Cela tient à ce qu'un phénomène n'est pas pour autant défini quand il a fait l'objet d'une multitude d'observations, même quantitatives, si ces observations ne sont pas *sériées*. Autrement dit, selon les observateurs, différentes manières de préhension d'un phénomène ont cours. Cette dispersion des efforts et ce

subjectivisme épistémologique contribuent à propager des paralogismes. Or chaque phénomène biologique dépend d'un certain nombre de paramètres et parmi ceux-ci un nombre nécessaire et suffisant permet de le situer. On sait qu'il y a plusieurs façons de voir une droite dans l'espace : en la regardant dans son axe on n'en perçoit qu'un point, en la regardant suivant un certain angle on la voit droite mais de longueur variable suivant l'angle de l'observation. Pour l'observateur à perception punctiforme, entendre parler de droite pour l'objet qu'il considère n'a pas de sens. Par contre pour l'observateur à perception linéaire la vision d'une droite est réelle et la notion spéculative de point est facile à dégager ; cependant sa connaissance de la droite sera encore imparfaite s'il ne se déplace pas pour l'examiner dans ses différentes positions. La série de toutes les opérations d'observation exigée pour la connaissance complète de cette droite serait longue en opérant de la sorte et on possède le moyen de définir entièrement tout système de lignes, de surfaces, ou de volumes : ce moyen consiste à utiliser des axes de coordonnées sur lesquels, par les *projections* de la figure géométrique, celle-ci prend sa signification topographique et métrique. On peut d'ailleurs être amené à orienter le système de coordonnées lui-même en le définissant par rapport à un nouveau système de références qui le renfermera. Bref, la description d'un objet se fait par son *épure* qui permet de le reproduire dans toute sa fidélité. De même en Thermodynamique, Gibbs a introduit les *variables de position* (facteurs de position d'un élément du système, comme v) et les *variables de tension* (indiquant la propension à la variation de la variable de position, comme θ, p) ; la connaissance de ces variables permet d'établir l'équation caractéristique du système et définit celui-ci.

Pour nous représenter un objet biologique, il suffit en principe d'en faire l'épure. Mais ici nous ne pouvons atteindre d'emblée tous les éléments d'un phénomène donné. Nous en sommes donc réduit à rechercher des *critères caractéristiques* qui permettent de situer sans équivoque un phénomène donné de façon à pouvoir le reproduire, le retrouver ou en connaître les variations. C'est ainsi que j'ai proposé ici l'utilisation de 5 critères biologiques dans des conditions définies, et particulièrement aseptiques, pour une suspension de spermatozoïdes d'Oursins. Ces critères sont : motilité, activité réductasique, activité respiratoire, sensibilité à la fertilisine de concentration connue, pouvoir fécondant éprouvé avec des ovotides en état d'idéalité. Compte tenu de l'espèce en cause (x) à une saison donnée, de la concentration en gamètes mâles, de leur âge au moment du prélèvement, de leur âge depuis leur premier contact avec le milieu utilisé et considérant que les quatre conditions physico-chimiques : μ, pH, rH 2, θ, sont fixées, j'admets que mon système biologique σ_x est défini par la fonction liant ces 12 critères. En principe, connaissant toutes les variables moins une on doit pouvoir conjecturer de la valeur de la variable manquante. On voit l'intérêt de la méthode si par exemple, c'est le pouvoir fécondant qui n'est pas connu. Ainsi par l'emploi de ces 12 critères un système aussi labile qu'une suspension spermatique échappe au hasard. On a pu voir une application du principe défendu ici dans l'expérience de survie de 162 heures des spermatozoïdes d'*Arbacia lixula* (p. 104) où la discrimination de la variabilité ovulaire et spermatique a pu se faire

grâce au test de la réductase ; ceci conduit d'ailleurs à faire une remarque sur la biologie métrique telle qu'on la pratique habituellement.

La biométrie procède en se fondant sur des caractères généralement choisis au hasard et bien souvent l'ordonnance de ces mesures ne permet pas de situer *à coup sûr* le système considéré.

Il en va tout autrement en biologie qui considère les variables nécessaires et suffisantes. Cette biologie qui peut être dénommée *biologie descriptive* a pour but de permettre la représentation de tout phénomène vivant à l'aide de l'ensemble des caractères systématiques et à défaut du minimum de caractères significatifs. En somme cette biologie descriptive est *taxonomie biologique* car elle procède fondamentalement selon les mêmes méthodes que la systématique morphologique. Jusqu'à mon présent travail aucune recherche de spermiologie, et en particulier de spermiologie des Oursins, ne donne les critères *minima* qui permettent de connaître une suspension quelconque de spermatozoïdes. D'autres critères peuvent être ajoutés à ceux que j'ai proposés comme la qualité ionique du milieu, l'activité catalasique du sperme (cf. spermiologie de Mammifères (40) (592), l'état de la faune et de la flore parasites éventuelles, etc., mais dans tous les cas on devra justifier de *l'utilité* de l'introduction du nouveau critère.

Une des conditions essentielles de la valeur des critères est que le milieu biologique ne soit pas contaminé et spécialement par des facteurs septiques. En spermiologie des Vertébrés l'asepsie a d'ailleurs été reconnue pour des raisons biologiques (235) et la pratique de l'antisepsie s'est largement répandue en spermiologie de Mammifères grâce à l'emploi des antibiotiques (21) (591) (57) (162). Sans doute également certaines précautions anti-infectieuses ont dû être prises dans les expériences de Champy (86) qui a pu conserver plusieurs semaines, en faible motilité, des spermatozoïdes de *Rana esculenta* en les plaçant dans du plasma de Grenouille.

III. — Gamètes et mitose.

Dans les recherches relatées ici je n'ai fait que considérer la biologie extra-ovulaire du spermatozoïde. Dans des recherches que je n'ai pas consignées ici (296) (538) (541) (545) (297) j'ai cependant abordé le problème de la biologie zygotique du spermatozoïde qui en est la cytophysiologie. L'idée essentielle de ces travaux est que l'androgamone II (protéine basique) se combine d'une façon hétéropolaire avec les protéines à point isoélectrique acide du cytoplasme ovulaire, pour former une sorte de protéine de structure (24), et participer ainsi à la formation de l'aster puis ultérieurement du fuseau achromatique. Jahn (288), remarquant que la *c*-mitose doit répondre à certains comportements fondamentaux de nature physico-chimique, trouve dans mes recherches un appui à cette manière de voir. Par ailleurs Kopac (322) examinant mon hypothèse a constaté que cette conception s'accordait avec les travaux de Heilbrunn et Wilson (258) (259) (260) (261) (262) (263) (264) (cf. 311) qui montrent que l'héparine inhibe la formation du fuseau achromatique : par son point isoélectrique acide, l'héparine entrerait en compétition

avec les protéines cytoplasmiques ovulaires et empêcherait la gélification mitotique.

Il est remarquable que la fertilisine qui a tant de propriétés voisines de celles de l'héparine ne soit décelable dans le gamète femelle que tant que celui-ci n'est pas fécondé, *comme si elle participait à l'inertie de l'ovule*. Des travaux récents (451) (452) (8) ont d'ailleurs permis de caractériser des substances métachromatiques dans les ovules d'Echinodermes particulièrement ; ces substances peuvent agir comme antimitotiques. D'autre part l'échinochrome qui est un inhibiteur de certaines réactions enzymatiques (313) pourrait encore renforcer l'action de la glycoprotéine de la gangue pour empêcher la parthénogénèse naturelle de se produire chez les *Arbacia* (la vitamine K a été signalée au contraire comme agent parthénogénétique (239), ce qui éloignerait encore l'échinochrome de cette naphtoquinone).

De l'ensemble de ces considérations et des travaux modernes qui portent sur les modifications de la viscosité du cytoplasme ovulaire au moment de la fécondation (124) (423) (419) (426) (428) (518) (524) (603) se dégage une série de caractères communs donnant un regain d'intérêt à l'essentiel de la conception de Lœb d'une lyse ovulaire sous l'action du sperme suivie d'une rectification intra-ovulaire. Cet ensemble paraît surtout justifier la théorie de Delage (132) selon laquelle, on le sait, la mitose est la manifestation d'une série de liquéfactions et de coagulations.

IV. — La durée de la vie spermatique.

La règle que j'ai nommée *règle de Kölliker* (voir 695) formule qu'en eau de mer il y a une relation inverse entre la concentration spermatique et l'intensité du métabolisme et une relation directe entre la concentration des spermatozoïdes et la durée de leur survie. Nous allons examiner la signification de cette règle mais auparavant nous considérerons un aspect du problème de la concentration.

Ainsi, dans le cadre du problème du pouvoir fécondant la survie *fonctionnelle* peut dépendre de la concentration et de la *maturité* des spermatozoïdes considérés. En effet, en période de pré-maturité, il y a dans toute suspension spermatique un nombre plus élevé de spermatozoïdes non fécondants que de spermatozoïdes fécondants. Supposons qu'il y en ait 90 o/o. Dès lors dans une suspension concentrée la fécondation pourra être assurée par les 10 o/o de spermatozoïdes normaux et elle pourra l'être avec un succès total (100 o/o de clivages), car la fécondation des Oursins, dans une très large mesure, suit la loi du tout ou rien ; cela dépend de l'état des ovules. A une dilution limite, par contre, le nombre de spermatozoïdes fécondants sera devenu insuffisant pour assurer les fécondations bien que la concentration *totale* en éléments germinaux mâles soit encore élevée (forte opacité), la concentration en spermatozoïdes fonctionnels est devenue insuffisante ou nulle. Inversement, en période de maturité, on peut considérer que tous les spermatozoïdes d'une suspension sont fonctionnels et la dilution limite à laquelle les fécondations deviendront impossibles (1-3 spermatozoïdes : cf. Glaser, Lillie) ne dépendra que du nombre (et évidemment aussi de l'état) des spermatozoïdes pour un nombre donné

d'ovules, c'est-à-dire que le nombre total de spermatozoïdes sera devenu très petit (opacité faible, voire voisine de o). Dans ces conditions la sélection par sénescence expérimentale peut agir de deux façons. Dans le premier cas, les spermatozoïdes fonctionnels (robustes et bien conformés — ceux que GRAVE (217) appelait les plus vigoureux) pourront sans doute survivre d'autant mieux qu'ils profiteront des produits de la lyse des spermatozoïdes immatures qui leur fournira des matériaux nutritifs, donc d'autant mieux que la concentration spermatique globale sera plus grande. Dans le deuxième cas, la survie fonctionnelle dépendra de relations spermatozoïde à spermatozoïde où le milieu dispersant joue un rôle fondamental. Ces relations dont une explication a été tentée par GRAY (allélostasie) constituent un cas particulier de l'*effet de groupe* dont l'importance a été reconnue depuis longtemps (par BOHN par exemple) et cette notion doit permettre de conduire l'analyse en ce domaine. On se référera à ce sujet particulièrement aux travaux (289) (1) (133) (421) (680) (181) (463) qui portent sur les problèmes de la sociologie cellulaire.

En ce qui concerne maintenant la règle de KÖLLIKER, la seule explication rationnelle est, ce me semble, que *les spermatozoïdes d'Oursins sont dénués d'un pouvoir de synthèse leur permettant d'assurer leur vie libre* à partir des produits de leur métabolisme notamment. Autrement dit *la quantité de métabolites qui existe dans un sperme donné est une quantité finie* (cf. LILLIE et JUST (354)). GRAY écrit (227, p. 414) : « La survie des spermatozoïdes en suspension diluée est clairement associée avec la capacité ou l'incapacité des cellules d'obtenir de l'énergie à partir des sources externes. » Aussi l'adjonction de substrats doit-elle permettre de prolonger la survie des spermatozoïdes, « cellules » carencées, donc dépendantes. Elles dépendent en effet soit du testicule où elles mènent une vie latente soit du succès de la fécondation qui, si elle sauve l'ovule ainsi qu'on le dit couramment, sauve aussi le spermatozoïde. Un non-vieillissement impliquerait une resynthèse parallèle des *enzymes* qui s'*usent* rapidement.

D'un point de vue général, la vie somatique est possible sans vie germinale, l'inverse ne l'est normalement, dans certains cas (fécondations aquatiques), que pendant un laps de temps court, et d'autant plus court surtout que le métabolisme est plus actif dans le cas des gamètes mâles (exhaustion des substrats endo cellulaires et séminaux) et dans une certaine mesure (« asphyxie ») dans le cas de l'ovule à développement normal non parthénogénétique.

Les gamètes n'ont en général aucun pouvoir de synthèse spontané permettant une vie libre prolongée. En ce qui touche les gamètes mâles notamment on peut évoquer WEISMANN (675) qui rappelle, pour d'autres cas, le principe d'après lequel une vie active épuise plus rapidement les êtres qu'une vie ralentie, et il l'illustre en faisant des remarques sur la durée relative des vies larvaire et imaginale chez les Insectes et sur la durée proportionnelle des vies pré-pubérale et adulte ailleurs. Remarquons que les méthodes de sommeil et d' « hibernation » introduites en médecine humaine reposent sur de mêmes fondements. Le phénomène apparaît, semble-t-il, avec une particulière netteté dans le cas des gamètes mâles.

On peut d'ailleurs se demander si la crise sexuelle chez les Etres inférieurs n'est pas toujours conditionnée par l'apparition d'une carence nutritive

impliquant la conjonction de cellules dont les « sexes » (« mating type ») seraient définis par l'existence d'attributs métaboliques complémentaires, chaque élément (+ et —) apportant à l'autre un certain stock d'enzymes et de substrats d'utilisation immédiate ou plus ou moins différée; cette conjugaison provoquerait la formation d'enzymes constitutifs ainsi que celle d'enzymes adaptatifs caractéristiques de l'être somatique aux différents moments de sa vie (consulter (357) (408)). En somme la méiose serait caractérisée par une dégradation trophique. Quoi qu'il en soit de cette généralisation, dans le cas des spermatozoïdes d'Oursins la règle de Kölliker indique que *la survie des spermatozoïdes implique une vie parasitaire* qui les dégrade. Cette vie parasitaire est d'un type particulier car elle réduit le spermatozoïde à ce dont il est le vecteur : des unités douées de continuité génétique (94), unités dont celles de caractère nucléaire sont particulièrement bien connues. De ce seul point de vue nucleaire, le parasitisme paternel se poursuit au delà de la vie du zygote, dans l'embryon et dans l'adulte, exigeant comme un ultra-virus un foyer proliférant pour se multiplier lui-même, et se manifestant au cours de la vie de l'individu par l'induction des caractères paternels dont l'apparition se fait par l'intermédiaire de synthèses induites qualitatives et quantitatives d'éléments morphologiques et métaboliques. On connaît par ailleurs chez les Métazoaires, un cas où « la dégradation parasitaire peut aller jusqu'à la suppression complète du soma, en laissant subsister le germen, contenu dans l'hôte et sans séparation tégumentaire d'avec celui-ci *(Orchitosoma)* » (92) (94). *Orchitosoma parasiticum* évoque le devenir du spermatozoïde dans l'œuf où le gamète mâle se trouve frappé d'involution somatique (le soma du germen), où il y a passage d'un état morphologiquement très différencié (spermatozoïde fécondant) à un état morphologiquement élémentaire (génome). Dans cette transformation il y a eu perte de métabolisme mais non point de fonction car le pouvoir fécondant, fonction du spermatozoïde (fonction spécifique, ou : ce qu'il y a de spermatique dans le spermatozoïde) n'a fait que se poursuivre sous des états différents de la vie spermatique périovulaire à l'amphimixie. Nous en venons ainsi à examiner deux disciplines.

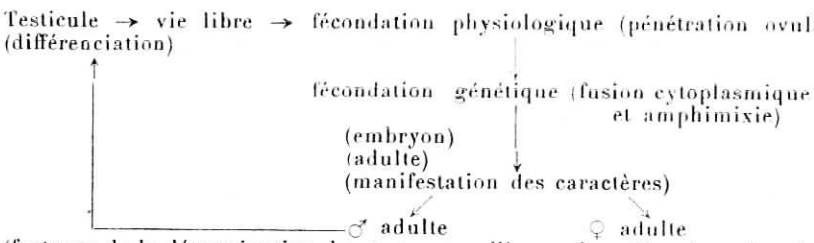
V. — Biologie et physiologie spermatiques.

L'objet de la physiologie est l'étude des fonctions des Etres vivants et on distingue : les fonctions de nutrition, les fonctions de relation, les fonctions de génération. A l'échelle du spermatozoïde, et en première approximation, correspondraient respectivement les métabolismes, l'activité motrice, le pouvoir fécondant. Mais pour une cellule aussi différenciée que le spermatozoïde la fonction, la spécialisation peut-on dire, c'est le seul pouvoir fécondant. Si en conséquence la notion de perte de fonctions (392) est considérée, cela ne va pas sans prêter à confusion et il est préférable, au mieux, de parler de perte de métabolismes, ce qui change bien des intuitions. Une telle attitude se trouve en accord avec celle de Claude Bernard qui écrivait (31) : « La fonction est quelque chose d'abstrait, qui n'est matériellement représentée dans aucune des propriétés élémentaires... Il y a une fonction vocale dans le larynx mais il

n'y a pas de propriétés vocales dans ces muscles. » La perte du pouvoir fécondant pour les spermatozoïdes dans des lignées à développement non parthénogénétique aboutirait à la disparition de ces lignées. Ainsi, se perdant, la fonction peut détruire l'organe, voire l'être, ce qui est en quelque sorte un vieil adage lamarckien. En conséquence la perte (ou le gain) d'une fonction est plus un événement actuel qu'un événement évolutif car comme nous le dit Ephrussi (156, p. 122) : « ... La dédifférenciation structurale se produit le plus rapidement là où la prolifération est la plus active, et, inversement, (que) l'exercice de l'activité fonctionnelle spécifique est consécutif à la suspension de la multiplication cellulaire active. » Ainsi, si les métabolismes intéressent la biochimie et si les fonctions intéressent la physiologie, ces deux disciplines étant *parties* de la Biologie ou science de la Vie, au plus peut-on dire qu'une évolution par perte de métabolismes est une évolution biochimique. Confondre biochimie et physiologie c'est confondre le législatif avec l'exécutif, avec tous les inconvénients autocratiques que cela représente ! Pour illustrer cette distinction considérons que la ménopause est une mort fonctionnelle qui précède généralement la mort réelle.

D'un autre côté le dimorphisme des cellules sexuelles apparaît très tôt dans l'échelle des Êtres (Sporozoaires (338, 339) : gamontes avec micro- et macro-gamètes des *Plasmodium*, fécondation chez les Algues calcaires (Tuzet). Donc la complexité morphologique n'est pas ici un critère d'évolution (cf. Coupin (114) dont le livre est remarquablement divisé) et si la fécondation est la conséquence d'une déficience métabolique, la dégradation biochimique ne peut être la jauge de la complexité morphologique.

La déficience trophique des gamètes et particulièrement des spermatozoïdes implique le parasitisme. En prenant l'exemple des spermatozoïdes d'Oursins j'ajouterai que *l'élément mâle est un parasite effectuant un cycle sur deux hôtes* selon le schéma :



(facteurs de la détermination du sexe, ce qu'il y a de mâle, dans le génome paternel : hétérorochromosome X [1]).

Or la biologie spermatique testiculaire passe par un stade particulier : la méiose. Dans ces conditions le gamète mâle n'est pas une cellule mais nucléairement une *demi-cellule* ce qui pourrait expliquer sa déficience trophique. Au cours de la gamétogénèse une fois la réduction chromatique assurée (par exemple passage du spermatocyte I au spermatocyte II), toute croissance devient impossible ; il n'y a plus que des processus d'organisation structurale,

[1] Oursins : *type Abraxas*, cf. (23) (238).

d'ornementation, et la cellule réduite est totalement dépendante métaboliquement de l'organisme qui l'a produite. Elle se différencie et cependant elle est parasitaire, elle est dès ce moment en perte de pouvoirs de synthèses, si ce n'est déjà entièrement dépourvue de facultés élaboratrices. Plus tard, dans l'œuf, elle se dédifférenciera, et elle se dégradera morphologiquement en perdant toute capacité métabolique propre.

Dans la fécondation isogame on peut admettre que chaque type sexuel apporte à l'autre les substrats ou les enzymes ou les fractions des uns et des autres. Dans la fécondation anisogame c'est l'ovule qui renferme l'équipement virtuel du développement, l'élément mâle n'est que le catalyseur primordial de l'embryogénèse. En bref tout élément gamétique non parthénogénétique est en soi incapable de toute synthèse qui conditionne la vie libre, ou tout au moins est-il oblitéré d'une façon ou d'une autre dans ce métabolisme de survie. Par rapport aux cellules somatiques c'est un élément ou carencé ou déficient. L'autonomie des lignées pathénogénétiques est un avantage évident et on conçoit mal que ce caractère sélectif n'ait pas prédominé.

Quoi qu'il en soit du côté évolutif, pour qu'un phylum subsiste il faut qu'il puisse se reproduire. Du point de vue expérimental nous pouvons chercher de deux manières à faire durer un phylum :

1) soit en conservant l'ensemble des attributs spécifiques c'est-à-dire l'être,

2) soit en conservant les attributs potentiels (gamètes).

Pour conserver les attributs potentiels on peut évidemment conserver l'être ; c'est ce que j'ai fait avec Gustafson (550) dans le cas de *Xenopus lævis* Daudin. Dans le cas des Invertébrés, et dans le cas des Oursins en particulier, je renvoie au chapitre VI de ce travail (dans d'autres cas consulter (179) (383 à 385). Dans l'état présent de mes travaux sur les spermatozoïdes d'Oursins on entrevoit la possibilité de conserver des gamètes à la température normale et indépendamment du géniteur.

VI. — La question du chimiotactisme spermatique.

Une première remarque concerne l'acrosome. Bowen (52) (53) (54) (55) a identifié l'acrosome à un système golgien. Or l'acrosome = complexe dictyosomique (golgien) + acrosome + centrosome (146), et Grassé (213), Duboscq et Grassé (146) ont démontré que le parabasal des Flagellés pouvait être assimilé à l'idiosome des spermatozoïdes. Chez *Polykrikos schwartzi* le parabasal est partie intégrante de la cinétide (93) (94). Dans ces conditions il serait intéressant d'établir dans quelle mesure l'idiosome participe à la motricité spermatique ; s'il en était ainsi l'idiosome prendrait une importance particulière dans toute la biologie du spermatozoïde.

On sait en effet que selon la conception de Bowen « l'acrosome est un produit de sécrétion dont la principale fonction est de mettre en route les réactions physico-chimiques de la fécondation » (53) (55). Ceci est corroboré par les belles recherches sur les propriétés enzymatiques de l'acrosome que nous devons à Wintrebert (684) (685) (686), Parat (458) (459) et Hibbard (273), travaux qui prennent une importance particulière dans l'état présent des recherches sur les androgamones des Oursins.

Le mouvement spermatique est d'ailleurs très singulier par la variabilité des formes qu'il affecte et il est remarquable que la vitesse de translation soit réduite à mesure que le mouvement devient hélicoïdal, or GRAY (228) vient tout récemment de montrer que le « spin » réduit la vitesse de natation des cellules aquatiques (on trouvera des éléments pour une connaissance plus approfondie du problème du mouvement dans (491) (404) (412) (326) (131)).

Les expériences classiques de PFEFFER sur le chimiotactisme positif des anthérozoïdes de Fougères pour l'acide L-malique (464) (465) et ceux de ses successeurs (504) (331) ont suscité un grand intérêt dans les problèmes de la fécondation. Chez la Grenouille MASSART a cependant nié l'existence d'un chimiotactisme (398) (399). Chez les *Fucacæ* la question est également débattue, nié par les uns (486) (45) le chimiotactisme est affirmé par d'autres (111). Chez la Grégarine *Stylorinchus oblongatus*, LÉGER (338) constate que « les spermatozoïdes se dirigent avec une merveilleuse précision vers la chambre femelle, sans doute sous l'action d'une substance attractive sécrétée par les œufs au moment de leur maturité ». DEWITZ chez *Blatta orientalis* (138) considère que les spermatozoïdes ne se dirigent pas au hasard vers les œufs mais qu'il existe des phénomènes qui conduisent les spermatozoïdes à la région micropylaire particulièrement. Chez les Oursins, le travail de DAKIN et FORDHAM (123) constitue la contribution la plus affirmative sur l'existence d'un chimiotactisme positif des spermatozoïdes pour la fertilisine. VASSEUR et HAGSTRÖM (653) ont également obtenu des résultats positifs dans ce cas. L'activation flagellaire des spermatozoïdes en présence de fertilisine est un fait généralement reconnu, et il venait ainsi à l'esprit que sous l'influence d'un gradient de concentration les spermatozoïdes sollicités se dirigeaient vers le point de plus haute concentration en substances activatrices, ce qui explicitait le tactisme ; si les spermatozoïdes étaient plongés dans une solution dont la concentration en substances activatrices était uniforme, l'activation sur place ou dans des directions aléatoires résultait seulement des actions dynamogènes (538), ROTHSCHILD (504) a examiné cette conception. Il suggère un exemple fondé sur l'idée d'un champ de concentration léthal : « Supposons que dans une goutte d'eau contenant des spermatozoïdes nous créons tout à coup une aire qui soit mortelle pour les spermatozoïdes. Pour les besoins de l'argument on considérera que la substance empoisonnée ne diffuse pas en dehors de l'aire léthale. Au commencement de l'expérience, les spermatozoïdes, nageant dans les directions aléatoires, sont uniformément distribués dans la goutte d'eau. Dès qu'un spermatozoïde pénètre la région léthale par malchance, il est tué, c'est-à-dire que son mouvement est ralenti et il reste sur place. Dans une telle course, donc, presque tous les spermatozoïdes s'accumulent dans une région où ils nagent plus lentement : en conséquence, ils seront dans de telles circonstances rappelés d'une région où ils sont stimulés à nager plus vivement. » Je remarquerai en premier lieu que cette façon de voir n'est pas originale, MORGAN cite (435) que JENNINGS a fait une expérience de cet ordre et j'ajouterai que ROBBINS avait fait de même avec les *Fucacæ*. D'autre part dans le cas de la fertilisine il n'est pas question que la substance ne diffuse pas et c'est précisément cette diffusion, qui implique un gradient de concentration décroissante de l'ovule au milieu extérieur, c'est l'existence de fortes et de faibles concentrations qui doit être prise en consi-

dération. Supposons que la fertilisine ne soit pas douée de pouvoir agglutinant mais qu'elle possède seulement sa propriété dynamogène, alors le problème se simplifie car l'existence d'un gradient de concentration confère à la substance activatrice un pouvoir chimiotactique positif. Ceci découle du principe du travail maximum de BERTHELOT dont je rappellerai l'énoncé classique : la transformation chimique qui se produit est toujours celle qui donne lieu au maximum de dégagement de chaleur (cf. 148). En conséquence, le chimiotactisme peut résulter soit d'une activation du mouvement soit de la fourniture d'un élément non nécessairement dynamogène mais favorable au métabolisme général du spermatozoïde. C'est ainsi sans doute que s'interprètent les résultats de ROTHSCHILD avec les anthérozoïdes de Fougères et de l'acide malique et d'après lesquelles cette substance ne paraît pas avoir d'action sur la vitesse des anthérozoïdes. Pour revenir à l'argument développé par ROTHSCHILD nous constaterons qu'il ne trouve pas l'appui des expériences de ROTHSCHILD lui-même car l'acide hydroxymaléique serait toxique pour les anthérozoïdes de Fougères tout en étant dépourvu du pouvoir d'accumuler les anthérozoïdes à son contact. Dans le cas de la fertilisine, en tenant compte du pouvoir agglutinant de cette substance, remarquons que ce n'est pas LŒB qui a été le seul ou le premier à présumer du rôle de la concentration, SCHUCKING l'avait déjà remarqué et pour lui à forte dilution la substance active des ovules attire les spermatozoïdes (consulter aussi GATENBY) ; pour LŒB aussi, à faible concentration, l'eau de mer ovulaire serait douée de chimiotactisme positif.

L'activité *a priori* paradoxale de la fertilisine paraît être qu'à faible concentration elle active le mouvement en augmentant la respiration et en possédant un certain pouvoir chimiotactique (cette propriété « servirait » à retenir les spermatozoïdes dans le champ ovulaire), tandis qu'à forte concentration (donc près des ovules) l'activation flagellaire peut être effective mais l'agglutination agit à l'encontre du chimiotactisme, comme pour empêcher la polyspermie dans le cas de suspensions spermatiques concentrées ; alors la respiration spermatique peut être abaissée par effet de groupe.

La règle de KÖLLIKER et la possibilité de conservation prolongée du « dry sperm » trouvent une explication thermodynamique : l'énergie interne du système reste constante (ou baisse peu par oxydation à l'air). La quantité de métabolites étant limitée, plus le métabolisme est élevé plus vite l'énergie interne diminue. Or dans une suspension peu concentrée en spermatozoïdes, le libre parcours moyen de chaque spermatozoïde est grand, d'où une accélération du mouvement et une chute rapide de la vitalité ; il en va autrement dans les suspensions concentrées où les conditions de vicinalité permettent « l'économie » des métabolismes. Or la fertilisine accroît la probabilité de rencontres spermatiques contribuant d'une part à diminuer le libre parcours moyen des spermatozoïdes ce qui, s'il n'y avait conjointement une activation flagellaire, amènerait une chute du métabolisme ; d'autre part cette action de la fertilisine favorise la rencontre spermatozoïde-ovule, point sur lequel je suis en plein accord avec BULLER (65), TCHAKHOTINE (595), ROTHSCHILD et SWANN (511). Toutefois si la fixation spermatique péri-ovulaire n'était qu'un phénomène physique, un thigmotactisme, comment concevoir que les spermatozoïdes ne se fixent pas sur des substrats gélifiés (gélose, gélatine) comme ils

le font sur les gangues? Il faut qu'il y ait une certaine spécificité pour cette fixation fonctionnelle ; c'est ce que nous montrent les observations de Lillie 351). Fischel (163), Stassano (580), Hultin (280), et celles que j'ai rapportées dans le chapitre VII : ces observations indiquent que la fixation spermatique sur des ovules hétérologues ne se produit sensiblement que si l'hybridation est possible dans ce sens. La fixation des spermatozoïdes sur la gangue ovulaire implique donc une chimie de la fixation.

On doit par ailleurs distinguer deux types de substances pouvant agir au niveau de l'activité cinétique des spermatozoïdes : 1) des catalyseurs ; 2) des substrats

Ainsi tantôt certaines substances activent le mouvement clonique (dynamique) tantôt certaines substances prolongent la motilité. A la première classe appartiennent les catalyseurs d'utilisation des substrats de la motricité, à la deuxième, appartiennent les substrats eux-mêmes. Certaines substances comme l'ATP pourraient avoir une double action ; on conçoit aussi que selon l'état présent du système spermatique — dépendant de sa vie antérieure — on peut ou non réanimer les spermatozoïdes par des catalyseurs ou par des métabolites. Si par exemple on dispose d'une suspension inanitiée par conservation en milieu ouvert et prise à un moment tel que les modifications irréversibles conduisant aux processus lytiques n'aient pas débuté, l'emploi de catalyseurs ne servirait à rien pour réanimer notablement les spermatozoïdes (il y aurait seulement une brusque activation cinétique courte, dépendant de la petite quantité de substrats résiduelle), par contre il doit être possible de prolonger la motilité par l'emploi de métabolites. C'est peut-être en partie pour cela que l'albumine ou la fertilisine peuvent prolonger la survie spermatique. Si on dispose par contre d'une suspension spermatique conservée en milieu seulement aéré, la concentration en oxygène sera suffisante pour assurer les combustions nécessaires normalement à la motricité. Dans ces conditions la mobilisation spermatique pourrait être obtenue par l'emploi de catalyseurs (Cu^{++}), mais il faut se garder d'une cause d'erreur provenant de l'aération de pipetage qui amène une réanimation motrice indépendante de toute autre condition.

La question du groupement spermatique dans une suspension concentrée en eau de mer est intéressante à examiner ; Rothschild et Swann ont tenté d'appliquer la théorie cinétique des gaz. Un tel traitement est approché car, en dehors même de toute substance agglutinante du type fertilisine, les chocs interspermatiques ne sont pas élastiques ce qui amène une perte de vitesse à chaque choc. En ce sens qu'un spermatozoïde isolé n'a pas une quantité suffisante de nourriture pour survivre longtemps, le groupe a un effet favorable sur la vie individuelle dans les conditions naturelles. Il y a donc une balance entre la compétition nutritive entre tous les spermatozoïdes et les exigences trophiques minimum de chaque individu. L'oxygénation et la fréquence des chocs interspermatiques paraissent être des facteurs essentiels de cette balance. Pour des suspensions diluées, par alimentation artificielle sans doute pourrait-on obvier à l'inconvénient de l'isolement (inconvénient au regard de la survie du spermatozoïde) ; ceci dans la mesure où le gamète isolé ne serait pas, par ailleurs, plus sensible aux variations ioniques que ne le sont les gamètes groupés.

En ce qui concerne le rôle souvent activateur sur la respiration que possède la fertilisine, il est remarquable que dans un autre cas, celui des leucocytes de Mammifères, un autre mucopolyoside — l'antigène somatique des bactéries gram-négatives (Salmonellas) — possède un pouvoir chimiotactique exigeant la présence de Ca^{++}. Cet appel leucocytaire est lié à l'augmentation de la respiration des leucocytes sous l'influence de l'antigène O (134) (336) (394). Que le chimiotactisme, ou seulement le mouvement flagellaire, soient des phénomènes universels dans la fécondation reste d'ailleurs à débattre car chez les Mammifères par exemple KIHLSTRÖM a pu montrer que les spermatozoïdes de Taureau privés de leur flagelle conservaient leur pouvoir fécondant, tant par l'existence de mouvements de la tête que par le péristaltisme du tractus génital femelle et on a décrit par ailleurs des spermatozoïdes mobiles stériles (565) (cf. aussi (660) (13)). Chez les Mammifères la motilité dépend pour beaucoup également de l'état de concentration cellulaire (39), diminuant rapidement par dilution (des protéines, le glycogène, le liquide séminal ont un effet protecteur). Chez ces animaux aussi les tests de la réductase et de la catalase sont utilisés (592) ; remarquons que l'utilisation de la réaction au formosan paraît impossible ici, BISHOP et MATHEWS (37) ayant montré que les sels de tétrazolium sont toxiques pour les spermatozoïdes.

Quant à la nature de l'agent activateur de l'eau de mer ovulaire des Oursins, la substance volatile acide de SCHÜCKING, que j'ai retrouvée, me paraît être un acide gras non saturé. Je me fonde pour cela sur les travaux de PAGE et de NAVEZ d'une part et sur ce que, d'autre part, l'action des oxydants comme l'iode (cf. (102)) fait perdre son pouvoir activateur à l'eau de mer ovulaire (voir aussi 30).

Ceci nous amène à considérer certains aspects de la biochimie comparative. Tout d'abord on tirera des renseignements très utiles en consultant le travail de HUMPHREY (202) qui porte sur les spermatozoïdes d'Huîtres. HUMPHREY écrivait à cet égard : « ... la relation entre le mouvement, la capacité respiratoire et le pouvoir de réduire les colorants comme le bleu de méthylène reste obscure. Il semble que la capacité respiratoire puisse être perdue la première, puis la motilité tandis que l'activité déshydrogénasique persiste ». Il serait particulièrement important de soumettre les spermatozoïdes d'Huîtres à une analyse du type de celle que j'ai mise au point pour les spermatozoïdes d'Oursins.

Par ailleurs l'immobilité des spermatozoïdes d'Oursins en solution isotonique de NaCl est un problème qui n'a reçu aucune explication. Je rappellerai à ce sujet les travaux de MEYERHOF (415), LŒB et WASTENEYS (375) et ceux de WARBURG (674) d'où il ressort qu'en solution de NaCl les oxydations intenses seraient responsables de la toxicité pour les ovules d'Oursins. Il semble qu'on retombe ici encore sur la question du rH_2. Cependant en ce qui concerne les gamètes mâles aérobies où le cytochrome paraît répandu (49), ni la cystéine, ni la β-mercaptoéthylamine ne protègent les spermatozoïdes de *Spisula* contre les effets nocifs des rayons X (dans le cas d'une inactivation du sperme de *Nereis* par le radium, PACKARD (456) trouve un effet principalement au niveau de la chromatine). La présence de composés réducteurs dans le sperme est cependant bien assurée maintenant, citons (395) (608) (549) et leur rôle dans la motricité paraît certain. Or si celle-ci dépend du système ATP-

ATpase (154) (285), comme ce système enzymatique est activé par les réducteurs, on peut s'attendre à ce que ces substances activent la motricité. La noradrénaline du sperme de Mammifère (27) a peut-être une action de ce type. Si on examine alors ce qu'il en est dans le cas des Protozoaires, on remarque que Meyerhof et Randall (416) ont trouvé que l'inhibition de la glycolyse au niveau de l'hexokinase peut être obtenue à l'aide d'adrénochrome ou d'*o*-naphtoquinone : ces substances inhibent la respiration, la glycolyse et la *motilité des Trypanosomes in vitro*. Il faut sans doute rattacher ceci au travail de S. S. Cohen (105) fait avec des spermatozoïdes de *Chætopterus*. Si l'échinochrome inhibait cette réaction (glucose + ATP $\xrightarrow{\text{hexokinase}}$ glucose-6-phosphate + ADP + Q), il serait intéressant de rechercher si l'insuline peut lever cette inhibition. Les quinones ont été signalées par ailleurs comme des inhibiteurs de la hyaluronidase (414) et il est possible que l'échinochrome agisse également ici, ce qu'il serait intéressant de vérifier au regard des problèmes de la fécondation chez les *Arbacidæ* en relation avec la façon par laquelle Monroy et Russo avaient tenté d'en poser des éléments D'ailleurs chez d'autres Animaux et particulièrement les Mammifères, le rôle des protéases (692) ou de l'amylase (276) (cf. aussi (388) (389)) reste encore à définir du point de vue de la biologie fonctionnelle des spermatozoïdes. Toujours est-il que le glutathion oxydé inactive la succino-déshydrogénase (274) et on conçoit ainsi comment le glutathion réduit peut prolonger la survie des spermatozoïdes d'Oursins. Il faudrait examiner ici l'action de l'alloxane sur la succino-déshydrogénase spermatique car Hopkins, Morgan et Lutwak-Mann (275) ont montré que cette substance empêchait la réactivation complète par GSH de la succino-déshydrogénase musculaire inactivée par GSSG. Il semble enfin que l'intervention vraisemblable d'enzymes à groupes thiols actifs (ATpase, succino-déshydrogénase) dans la motilité des spermatozoïdes, dont ceux des Oursins, trouve un appui dans certains travaux réalisés avec l'acétylcholine (605) ; cet ammonium quaternaire active l'ATpase musculaire tandis que la plupart des alcaloïdes (atropine, prostigmine...) sont sans action (le fait que la nicotine n'active pas le mouvement des spermatozoïdes d'Oursins (505) viendrait encore corroborer ce point) On peut remarquer d'ailleurs que le mouvement ciliaire des Protistes dépend de l'activité cholinestérasique (62) (563).

VII. — Sur la nature de l'action de la fertilisine.

La présence d'une agglutinine ovulaire dans l'eau de fécondation est un phénomène qui n'est pas exclusivement limité aux Oursins. On connaît des agglutinines ovulaires chez des Algues *(Chlamydomonas)* (341), chez *Nereis* (349) (302) (303) (350) où des actions androgamonales ont également été décelées (452) (453), chez *Chiton tuberculatus* (119), chez *Mactra* (409), chez d'autres Mollusques (613) (615) (400), chez des Ascidies (418) (439) (436) où il y aurait aussi une activité chimiotactique (418), chez des Astéries (406) (410) où la présence d'un adjuvant comme le blanc d'œuf de Poule est nécessaire à la mise en évidence de l'agglutination, chez la Lamproie (431) (432) (pour les Téléostéens (cf. 466) chez les Batraciens (32) (cf. 290) : présence de

fucose dans la gangue ovulaire)... Par ailleurs du sperme d'*Asterias* (46) ou de *Mytilus* (29) on a pu extraire des substances à action androgamonale (des protéines non fonctionnelles peuvent d'ailleurs agglutiner les ovules d'Oursins, comme la nécrosine (402) ; cette agglutination des œufs est un phénomène non caractéristique). Chez les Mammifères l'agglutination des spermatozoïdes (voir (358) par exemple) ou d'autres cellules (468) peut se faire sous certaines conditions dans le vagin. L'agglutination est d'ailleurs un phénomène très général de la matière vivante, depuis l'agglutination des bactéries ou d'autres microorganismes par des anticorps — ou par des substances non spécifiques comme il en va chez les Plantes (535) (537) (544) — jusqu'à l'agglutination des cellules dissociées d'Eponges (680) (178) en passant par les agglutinations pathologiques des globules rouges (34) (67). On ne saurait toutefois conclure de la généralité du phénomène à un mécanisme commun. Toujours est-il que l'agglutination revêt généralement un caractère néfaste pour les individus agglutinés ; ainsi dans le cas des spermatozoïdes placés dans de l'eau ovulaire, non seulement chez les Oursins des modifications structurales des gamètes ont été constatées mais encore elles l'ont été chez les Poissons par Rothelli et ses collaborateurs (492) (493) ; elles semblent correspondre à la baisse, voire à la disparition, du pouvoir fécondant des spermatozoïdes désagglutinés ; c'est ici encore un des caractères paradoxaux de la fertilisine. Dans les modifications morphologiques des spermatozoïdes le rôle de la surface limitante cellulaire semble être en cause. Dans le cas des spermatozoïdes de Mammifères, et indépendamment de toute agglutination, le rôle de cette surface limitante dans le pouvoir fécondant me paraît avoir été particulièrement bien mis en évidence par l'ingénieuse technique réflectométrique de Lindhal et ses collaborateurs (359) (360) (361) (362). Les agglutinats en réseaux, plus ou moins irréversibles, tels qu'ils ont été notés en présence de produits ovulaires dans certains cas particuliers (notamment l'hétéro-agglutination) par de Meyer et au cours de ma propre étude consignée ici, semblent être le résultat de la présence d'une quantité excessive d'antifertilisine soit ovulaire (de Meyer) soit spermatique (présent travail), quantité excessive par rapport à la fertilisine considérée. Ainsi une mutation généralisée qui porterait sur une synthèse anormalement élevée d'antifertilisine spermatique mettrait en cause le devenir du phylum qui a donné naissance à ce mutant. C'est un cas extrême. Mais normalement la balance des facilitations et des inhibitions semble *a priori* osciller d'une façon aléatoire ; on n'a pas été sans remarquer en effet, au cours de l'exposé des différentes expériences réalisées principalement avec les spermatozoïdes d'*Arbacia lixula*, que tantôt la fertilisine ou l'eau de mer ovulaire activait tantôt retardait les processus réductasiques et respiratoires du sperme. Ce comportement singulier peut être relevé également dans la littérature (256) (577) (645) mais il se trouve que chaque auteur a *toujours* trouvé soit une activation, soit une inhibition ! Il faut évidemment considérer les cas d'espèce éventuels, par exemple les spermatozoïdes d'*Echinocardium cordatum* sont agglutinables irréversiblement par la fertilisine homologue (641), mais dans le cas de spermatozoïdes mobiles ou activés dans leur mouvement en présence de fertilisine, il faut faire intervenir d'autres considérations ; ainsi en est-il pour *Arbacia lixula* et *Paracentrotus lividus* ainsi que pour *Lytechinus pictus* avec le sperme duquel

Spikes (577) a trouvé une inhibition des échanges respiratoires par la fertilisine spécifique et il a pu me confirmer (578) que les spermatozoïdes étaient bien mobiles dans ces conditions (voir aussi Hayashi avec *Arbacia punctulata* (255) (256)).

Deux remarques préalables sont à faire :

1) Dans leur milieu d'action les spermatozoïdes ne rencontrent jamais une solution de fertilisine purifiée mais toujours de l'eau de mer ovulaire et ce sera surtout, en conséquence, à partir des expériences faites avec de l'eau de mer ovulaire qu'il faudra chercher à conclure, les actions de la fertilisine purifiée, par voie trichloracétique par exemple, ne devant servir que pour le raisonnement comparatif.

2) La fécondation s'effectue normalement pendant la période de pleine maturité des gamètes d'une espèce donnée et c'est logiquement en fonction de cette condition restrictive que l'on doit étudier l'action de la fertilisine. Or dans la pratique expérimentale, en échinologie spécialement, on postule implicitement (voir cependant Carter (80)) que tous les gamètes utilisés sont dans un état de maturité parfaite, mais rien ne permet actuellement d'évaluer rigoureusement, en qualité et en quantité, cet état de maturité. Il serait urgent d'établir cette notion car l'action d'une substance donnée au niveau de cellules d'une même lignée, mais se trouvant à des stades différents (spermatides, spermatozoïdes...), est nécessairement différente. Comme cette caractéristique de maturité nous échappe, il faut chercher à l'éliminer du jeu expérimental. C'est ce que je me suis appliqué à faire en suivant le vieillissement d'une suspension spermatique car on peut supposer, ce faisant, que les vicissitudes des réactions métaboliques et fonctionnelles permettront de révéler le faciès de la population des seuls spermatozoïdes.

Ceci posé, examinons différentes données parmi celles que j'ai pu accumuler et à partir desquelles je m'efforcerai de dégager une relation réduisant la contradiction qui cache les propriétés de la fertilisine.

En considérant l'ensemble des résultats, il apparaît qu'on peut envisager le problème comme lié aux conditions intrinsèques du système sperme-eau de mer ovulaire dans des conditions dites normales de température, de pression, de pH... C'est donc vraisemblablement un problème de modalités d'action purement biologique. Pour chercher à en élucider les facteurs, j'examinerai d'abord ce que devient le comportement d'un sperme en conservation vis-à-vis de la fertilisine.

L'annexe du tableau VI (p. 73) permet de constater que pour une même préparation d'eau de mer ovulaire et une même préparation spermatique mais portée à des dilutions différentes, l'action inhibitrice ou activatrice de l'eau de mer ovulaire dépend du rapport des concentrations fertilisine-sperme. Il y a activation quand le rapport $\frac{\text{concentration en fertilisine}}{\text{concentration en sperme}}$ est petit, inhibition dans le cas contraire. Ceci pour des spermatozoïdes relativement frais. Le protocole de la page 103 et suivante permet de conclure de la même façon lorsque la concentration spermatique est telle que la concentration d'eau de mer ovulaire sur laquelle on la fait agir est nettement « faible ». Le protocole III (p. 77) montre, quant à lui, que sur des spermatozoïdes frais concentrés et avec de l'eau de mer ovulaire concentrée (même après une dilution

constituant l'eau de mer ovulaire « faible » du protocole), il y a inhibition ; mais après 7 h. 21 mn. de conservation, l'action de l'eau de mer ovulaire même « forte » est indifférente. Il y a donc également une relation fonction de l'âge du sperme et relativement indépendante des concentrations initiales.

Le protocole IV (p. 80) montre avec du sperme d'*Arbacia lixu'a* que la réactivation éventuelle dépend également du mode de conservation du sperme : il y a réactivation lorsque le sperme a été conservé 24 heures en milieu asphyxique et inactivation lorsque la conservation a eu lieu en sac de collodion (milieu ouvert) (Cette expérience ayant été faite en l'absence de pénicilline). En présence de pénicilline, avec du sperme de *Paracentrotus lividus*, l'eau de mer ovulaire de *Paracentrotus lividus* étant initialement indifférente sur l'activité réductasique, la réactivation par cette eau de mer ovulaire peut se faire après 30 heures, que le sperme soit conservé en milieu confiné ou en milieu ouvert.

Avec des spermatozoïdes dilués et de l'eau de mer ovulaire dépourvue initialement d'action sur l'activité réductasique, le vieillissement aseptique amène une sensibilisation des spermatozoïdes caractérisée par une diminution de l'activité réductasique (protocole VI, p. 103), les spermatozoïdes sont cependant réactivables par cette eau de mer ovulaire et le taux des fécondations est satisfaisant.

Des protocoles additionnels pourraient être encore publiés et particulièrement certains concernant la fertilisine d'extraction trichloracétique, ils iraient dans le même sens. De l'ensemble de ces résultats c'est moins une conclusion qu'une tentative d'unification que je proposerai maintenant. La relation semi-qualitative que j'ai pu établir est résumée dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII

Caractère de la fertilisine (ou concentration)	Concentration du sperme	Résultats métaboliques du mélange sperme-fertilisine avec	
		♂ frais	♂ âgés
1. forte	Dilué.	Inhibition	Inhibition ou indifférence.
2. »	Concentré.	Activation, inhibition ou indifférence.	Comme avec ♂ frais.
3. faible	Concentré.	Activation.	Réanimation ou indifférence.
4. »	Dilué.	Activation, inhibition ou indifférence.	Comme avec ♂ frais.

N. B. — L'indétermination des éventualités 2 et 4 provient de l'indétermination des termes faible et fort d'une part et dilué et concentré d'autre part.

Il serait tentant de considérer qu'il existe une relation inverse entre la force de l'agglutination et le pouvoir activateur (ou réactivateur) de la fertilisine et si de nombreuses expériences personnelles vont dans ce sens, un certain

nombre de cas litigieux m'empêche de conclure formellement à cet égard. Il faut cependant remarquer que la considération suivante vient renforcer cette conception : dans la mesure des échanges respiratoires, ce que l'on note c'est le résultat final d'échanges à des instants donnés, or dans des amas cellulaires la diffusion des gaz et la surface efficace des cellules se trouvent réduites et même s'il y a activation locale, plus ou moins passagère, par une substance, bivalente (agglutinante et activatrice), on a des chances d'enregistrer macroscopiquement une inhibition métabolique. En ce qui concerne le test réductasique on trouvera dans le paragraphe « limitations de la technique » (p. 63) les raisons qui font également penser à la contingence des mesures lorsque l'agglutination spermatique est très forte.

Ces considérations ne sont valables que pour les relations spécifiques, semble-t-il, et non pour les rapports hétérologues sperme-fertilisine (cf. chapitre VII).

Je me suis efforcé tout au long de mon travail de me placer sur un plan extra-téléologique, cependant la présence normale de fertilisine dans certains milieux de fécondation est incontestable et l'on est obligé d'en tenir compte tant du point du vue expérimental que du point de vue théorique. C'est pourquoi je m'efforcerai de préciser quatre points relatifs au problème très particulier de l'agglutination spermatique.

1. *Action de* Ca^{++}. — J'ai indiqué que l'addition d'ions de calcium à de l'eau de mer amène à certaines fortes concentrations l'agglutination des spermatozoïdes d'Oursins. Un phénomène de groupement précédé d'une vive agitation des Animaux a pu être également obtenu par mon élève Mlle G. Chéoux (98) dans le cas de *Gammarus locusta* L. lorsque l'eau de mer est sursalée par $CaCl_2$. Ce groupement paraît correspondre à une lutte contre l'hypertonie car les Animaux se placent de telle sorte que leurs pléopodes sont situés au centre des amas. D'autre part, ils manifestent en milieu hypercalcique (salinités allant de 48 à 58 o/oo) un net thigmotactisme : par exemple ils se fixent sur un agitateur de verre qu'on leur présente.

2. *Hétéro-agglutination*. — Pour Lillie l'agglutination d'un sperme par l'eau de mer ovulaire d'une autre espèce était le fait d'une hétéro-agglutinine (350). Pourtant Hartmann avait déjà bien remarqué que l'agglutinine n'avait pas une spécificité stricte (245). Mes expériences d'agglutination croisée *Arbacia lixula-Paracentrotus lividus* avec de la fertilisine trichloracétique me paraissent montrer que là encore, comme pour la désagglutination, ce que l'on croyait être une propriété de l'agglutinine, doit être attribué aux spermatozoïdes. Autrement dit, l'hétéro-agglutination qui est un fait pouvait recevoir deux explications :

1) elle est la conséquence de la présence de plusieurs agglutinines dans une eau de mer ovulaire donnée,

2) elle est la conséquence d'une susceptibilité étendue de spermatozoïdes d'espèces différentes à l'action d'une seule agglutinine.

Il semble assuré maintenant que l'hétéro-agglutination par une eau de mer ovulaire n'est pas une action d'hétéro-agglutinine mais la conséquence de l'hétéro-agglutinabilité. Cette susceptibilité différentielle des spermatozoïdes est l'expression d'une structure variable des spermatozoïdes d'une espèce à l'autre.

En somme on pourrait dire que la spécificité est l'adaptation d'une clé à une serrure mais ici cette serrure admet bien des passe-partout.

3. *Inagglutinabilité.* — Tous les ovules d'Echinodermes particulièrement ne livrent pas une agglutinine. « Chez l'Etoile de mer [et chez *Urechis*] l'eau de mer ovulaire montre une substance spécifique se combinant avec le sperme (fertilisine univalente qui est incapable de produire l'agglutination du sperme) » (617). Metz a trouvé que l'adjonction de glycocolle permettait l'agglutination dans le cas de *Patiria miniata*. Le mode d'action de cet amino-acide est obscur car Vasseur pense plutôt que c'est le nombre des groupements SO^{4--} de la glycoprotéine qui explique le pouvoir agglutinant d'une fertilisine donnée; en somme cette agglutination dépendrait de la taille de la molécule. Il est possible que le glycocolle démasque des parties du spermatozoïde qui ont de l'affinité pour la fertilisine, il serait intéressant à cet égard d'examiner le rôle de l'urée dans le cas de l'Astérie. Ceci nous amène à examiner d'autres propriétés du glycocolle. Giese et Well (190) ont montré que cet amino-acide protégeait les spermatozoïdes d'*Urechis caupo* contre les effets de la lumière. Le rôle favorisant de cet amino-acide dans la fécondation doit sans doute être en partie attribué aux propriétés physico-chimiques que Gellhorn (cf. 185) a examinées avec des spermatozoïdes de Batraciens. Quant à son action sur la motilité des spermatozoïdes d'Oursins en anaérobiose on doit la rapprocher de l'ancienne observation de Lipschitz et Hertwig (365) faite sur des spermatozoïdes de Grenouilles immobilisés par privation d'oxygène; l'addition de *m*-dinitrobenzène, donnant la *m* nitrophényl-hydroxylamine par fixation d'hydrogène, mobilise les spermatozoïdes.

4. *Agglutination chez les Protistes.* — La formation des agglutinats spermatiques sous l'influence de la fertilisine a toujours paru un phénomène très caractéristique de certains spermatozoïdes et elle l'est effectivement si on considère qu'il s'agit de gamètes, pendant leur vie fonctionnelle, et qu'elle est génétiquement en relation avec un produit femelle. Cependant le groupement cellulaire en essaim n'est pas un phénomène isolé dans le groupe des Protozoaires avec lesquels les spermatozoïdes (Sporozoaires, Métazoaires) ont des ressemblances, qu'on a considérées comme des convergences (6) mais qui sont sans doute des relations phylétiques (*Bodo* (94) (146) (213) (127)). C'est ainsi que depuis Prowasek (475) on connaît des agglutinats entre Flagellés. Ils ont été en particulier bien étudiés par Grassé (213) dans le cas des *Proteromonas* (qui habitent le rectum des Reptiles et des Batraciens). Ces amas se forment en solution de Ringer après une dizaine d'heures. « Souvent, écrit Grassé, la fixation se fait par l'intermédiaire d'une boule de mucus ou de gelée bactérienne, l'agglutination se fait par les extrémités postérieures » et « les Flagellés groupés de la sorte, conservent toute leur vitalité et ne manifestent aucune altération de leur structure. Leurs mouvements flagellaires étant très violents, ils paraissent faire effort pour se libérer et y parviennent assez souvent », l'agglomération est solidaire de l'ionisation du milieu. Dans la note infrapaginale page 368, Grassé fait remarquer que « l'existence des rosaces réalisées par l'intermédiaire des flagelles (*Herpetomonas Auct.*, *Janickiella grassii* Dub. et Gras.) montre bien que, dans quelques cas, cette substance (agglutinable) se localise aux fouets » ; on sait que l'éventualité de la fixation spermatique chez les Oursins par les flagelles a été rencontrée. Cette relation

biologique entre protozoaires parasites et spermatozoïdes paraît illustrer encore la conception de l'origine des Métazoaires fondée sur les gamètes flagellés et pose en tout cas une série de problèmes du plus haut intérêt (96) (127).

Remarque. — Il est intéressant de constater que la formation d'amas est un phénomène assez général chez les micro-organismes mobiles (376) (598) (594) (487) (448) (498) ; dans le cas par exemple de *Tetrahymena pyriformis*, Lœfer et Mefferd (376) ont constaté que la formation de ces amas était liée ici aussi à la motilité ainsi qu'à la concentration en organismes. La vitesse des *Tetrahymena pyriformis* est aussi plus grande dans les amas qu'elle ne l'est chez les individus isolés.

VIII. — Survie.

L'explication thermodynamique de la règle de Kölliker rend compte des propriétés activatrices des ions comme Cu^{++} ou Zn^{++} tout particulièrement au niveau de la respiration spermatique, et permettrait en conséquence d'expliciter le rôle des chélateurs. Cependant au sujet des expériences de Rothschild et Tuft d'une part et de Tyler (632) d'autre part on doit faire quelques remarques. Dans mes expériences de survie prolongée aussi bien en milieu ouvert qu'en milieu aéré aseptique ou non, la survie est assurée en absence de chélateurs d'ions et il semble que ce soit seulement l'exhaustion des substrats, l'intoxication du milieu, ou encore la contamination bactérienne qui étaient facteurs limitants de la survie. Il reste toutefois que ces remarques pourraient ne pas avoir toute la valeur que je chercherai à leur attribuer. D'un côté en effet, la pénicilline peut fixer des ions métalliques comme je l'ai déjà souligné et d'un autre côté la membrane de collodion peut agir de même lorsqu'il s'agit d'expériences en milieu ouvert. A cela je pense que les expériences de Fischer (164) répondent d'une façon satisfaisante, car Fischer n'a fait usage d'aucune substance antibactérienne, il a seulement suivi des règles pasteuriennes. Dans ces conditions ou les substances chélatrices utilisées par Tyler agissent effectivement en éliminant des ions toxiques pour les spermatozoïdes ou elles agissent comme substances antibactériennes ; je renvoie à cet égard aux travaux (5) (551) (187) (455) (473) (488) (602) (99) (639) (673) à partir desquels le lecteur pourra trouver des éléments d'appréciation. Je souligne particulièrement que Ryley (551) avec *Trypanosoma lewisi* a trouvé que les chélateurs comme le 2 : 2-dipyridyl et la 8-hydroxyquinoléine réduisent la respiration et la motilité. Il ne semble pas que Tyler ait pris garde à l'éventualité d'une action antibactérienne des chélateurs. Il est certain, en tout cas, que non seulement la force ionique doit être prise en considération en ce qui concerne les rapports gamètes-milieu mais encore la qualité ionique. A partir des données de Lyman et Fleming (393) la force ionique de l'eau de mer peut être considérée de 0,50 ; dans cette valeur les ions monovalents (« salting in » ?) entrent pour 0,23 et les ions bivalents (« salting out » ?) entrent pour 0,26. De ce seul point de vue quantitatif il peut déjà y avoir possibilités d'interférences (interviendraient dans l'explication de l'inactivité de la fertilisine en solution de ClNa isotonique ?) où la série d'Hoffmeister devrait être considérée. Le rôle de Ca^{++} qui a été reconnu bien des fois dans la biologie

des spermatozoïdes d'Oursins est particulièrement à retenir. Je rappellerai à ce sujet que Snellman et Erdös (572) ont trouvé que Ca^{++} modifie la charge de la myosine (il y a antagonisme Ca^{++} — K^{+}) et dans certaines conditions Ca^{++} peut solubiliser la myosine alors que cette protéine est insoluble en présence de K Cl (pH 5-6). On sait par ailleurs (voir (177) par exemple) que dans la coagulation de l'argile où interviennent des phénomènes de permutation (déplacement des bases) « pour une même terre et pour une même concentration de la suspension les cations bivalents ont toujours un pouvoir floculant supérieur à celui des cations monovalents ». Ca^{++} qui est lié à la motilité est aussi lié à l'agglutination spermatique par la fertilisine et, par son action au niveau du système cinétique, il est lié à la survie.

Dans le cas où il y aurait une action ionique qualitative des oligo-éléments de l'eau de mer, dans le cas donc où il y aurait action chélatrice effective avec certaines substances pour ces ions spermio-toxiques, on peut se demander comment agissent ces ions. Il serait intéressant d'examiner à ce sujet, si le 2 : 3-dimercaptopropanol, qui forme un « cycle très stable » avec « l'arsenic » (Peters), si le BAL donc a quelque action bénéfique sur la vie des spermatozoïdes. Par ailleurs on se souviendra que les sels de fer catalysent les oxydations de l'acide tartrique, de la lécithine, des composés thiolés (cystéine ..) comme ils favorisent la respiration de l'œuf d'Oursin (673) (674). En somme les ions comme Cu^{++} peuvent intervenir dans les résultats de Rothschild et Tuft et de Tyler comme catalyseurs d'oxydation. Mais une deuxième éventualité reste ouverte. Remarquons d'abord que les tests de la réductase ne permettent de déceler aucun effet de dilution. Par exemple, si on se rapporte au tableau VI (p. 74) on voit que plus grande est la dilution de la suspension spermatique, plus rapide est la perte du pouvoir réductasique, ce qui confirme que le test de la réductase est une épreuve de la vitalité spermatique. On peut alléguer pour expliquer cette absence de l'effet de dilution dans le test de la réductase que celui-ci est moins sensible que la respirométrie. Toutefois des différences de l'ordre de celles qui caractérisent l'effet de dilution ne peuvent que passer difficilement inaperçues, semble-t-il, et nous avons vu que le test de la réductase donnait des indications grossièrement parallèles par ailleurs à la respirométrie. Or l'effet de dilution décelé par dosage direct de CO_2 (Cohn) est caractérisé par une libération excédentaire de CO_2. Il ne faut pas perdre de vue que l'eau de mer renferme des bicarbonates libérant facilement CO_2 par action des acides. Or sans abstraire l'ion de son contexte moléculaire, au niveau des composés à groupement thiols — dont le sperme d'Oursin est riche —, les sels métalliques forment des mercaptides selon une réaction du type :

$$2RSH + CuCl_2 \rightarrow \begin{matrix} R-S \\ R-S \end{matrix}\!\!>\!Cu + 2HCl.$$

Si une telle réaction prenait naissance, la libération de l'acide chlorhydrique permettrait le déplacement de CO_2 qui ne serait pas alors respiratoire mais physico-chimique (voir Nelson (447)).

Par ailleurs en ce qui concerne le pouvoir dynamogène de la fertilisine on sait que Cu^{++} est sans action nocive nette (Lillie). Il est possible que des ions

comme Hg^{++}, Cu^{++}, Al^{+++}... se combinent avec des groupes carboxyl des amino-acides déplaçant ainsi le point isoélectrique de la glycoprotéine vers l'alcalinité (voir 604).

Il reste d'ailleurs que les oligo-éléments métalliques peuvent avoir plusieurs modes d'action et c'est ainsi qu'en rapport avec l'idiosome (golgien) spermatique, on remarquera que l'appareil de Golgi renferme de l'acide ascorbique pouvant constituer un système d'oxydo-réduction avec le glutathion (consulter Bourne (51), p. 134); le cuivre pourrait intervenir pour établir un système acide ascorbique-cuivre. Sur la vitalité des ovules consulter Courrier (115).

IX. — Sur le milieu ouvert.

On a vu que le milieu ouvert sans phase gazeuse activait la spermiolyse. Remarquons à ce sujet, que Fegler (159) a trouvé que l'oxydation du glutathion favorisait l'hémolyse spontanée et Harris (242) a constaté que la culture d'*E. coli* en milieu synthétique et en sac de collodion exige un potentiel d'oxydo-réduction bas (présence d'acide thioglycolique). Pour adapter le milieu ouvert à un milieu « permanent » dans le cas des spermatozoïdes d'Oursins notamment il faut connaître la vitesse de transit des substrats et celle des produits de la réaction. On conçoit que la vitesse de renouvellement sera d'autant plus élevée que la surface de séparation enzyme-milieu circulant sera plus grande pour un volume petit de la solution enzymatique, le rendement sera corrélativement le meilleur. L'action de surface dans la catalyse hétérogène (voir (552)) prend ainsi un caractère nouveau et l'existence de système membranaire dans les cellules (mitochondries; consulter aussi Young (693)) semble représenter ainsi une « invention » efficace dans l'économie cellulaire. L'existence d'un plateau dans la représentation graphique des réactions enzymatiques en milieu clos doit être en principe annulée ou tout au moins différée, en système enzymatique permanent (milieu renouvelé) fonctionnant avec substrats et produits de réaction dialysables.

X. — Terminologie.

1) L'androgamone dont la nature est le mieux caractérisée est l'anti-fertilisine (A II). Quant à l'existence d'une lysine (desmolase) fonctionnelle dans le spermatozoïde elle paraît hautement vraisemblable mais on ne possède aucune certitude ; il s'agirait soit de A I soit d'un complexe A I-A III.

Nous conviendrons de désigner par le terme de *fertilisine* l'entité biologique qui se trouve dans l'eau de mer ayant contenu des ovules (mûrs?) non lysés; c'est le complexe gynogamone I + gynogamone II (ceci en considérant que la gynogamone d'activation flagellaire existe réellement en tant qu'individualité chimique). Si le terme de fertilisine a perdu de son sens primitif donné par Lillie — qui y voyait une substance universellement répandue et totipotente pour la fécondation —, il n'en reste pas moins que son importance est grande chaque fois qu'elle est présente normalement dans un milieu de fécondation et on doit en conséquence prendre formellement son action en

considération. L'observation de Vasseur (648) sur l'existence de fertilisine dans des ovaires de femelles séniles ne permet pas de retenir le terme d'*ovuline* (voir 695). Toujours est-il que si l'observation de Vasseur se confirmait, la fertilisine, ce principe doué de bivalence biologique, si ce n'est de trivalence (chimiotactisme positif à basses concentrations), la fertilisine serait une véritable *hormone* sexuelle, caractéristique du tractus génital femelle de certains Animaux à fécondation aquatique.

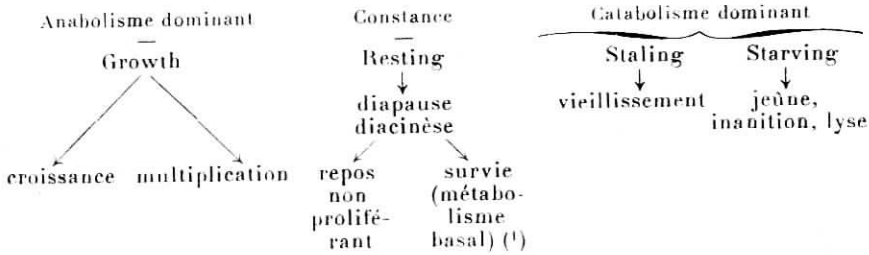
D'ailleurs la notion même de substances de fécondation, notamment dans le cas des femelles, doit être soumise à une révision. En effet peuvent être considérées comme substances de fécondation :

— les hormones sexuelles ou non sexuelles agissant sur le système neuro-musculaire génital des Mammifères,

— des substances comme l'arachnolysine (340), ou encore cette substance (chitinase du tractus génital femelle ?) qui libère le spermatozoïde de sa gangue chitineuse chez les Polyxènes (573), voire les corps qui peuvent intervenir chez certains Insectes où les spermatozoïdes sont injectés dans l'hémocœle des femelles (71) (72), et les produits des cellules amiboïdes (organes de Berlese) de l'organe de Ribaga chez certains Hémiptères (Cimex) qui activent les spermatozoïdes (116).

Toutes ces substances seraient autant de fertilisines.

2) La transcription que l'on peut donner de certains termes de diététique cellulaire très utilisés en langue anglaise découle des relations suivantes :



Pour cet état d'inanition très particulier que, brutalement (après 30 heures dans les conditions normales de température), montrent les spermatozoïdes en milieu ouvert, et caractérisé par la libération d'anti-fertilisine (lyse dépendant d'une exhaustion métabolique et physico-chimique des substrats), pour cet état découlant de la présence d'un septum hémiperméable entre les cellules et le milieu extérieur, je propose le terme d'*ethmolyse* (ἠθμός : filtre ; λύσις : qui libère).

3) Le gamète étant une demi-cellule, le terme d'*énergide* (Sachs, Chatton) paraît préférable à celui de cellule, pour désigner les éléments sexuels : ovule vierge (ovotide quand il est mûr) et spermatozoïde (l'œuf, ou zygote, étant l'ovule fécondé). L'énergide est en effet le terme qui définit tout complexe cytoplasme-noyau et qui ne préjuge pas en conséquence des potentialités de cette unité vivante.

(1) Le cas de survie en vie active (métabolisme entretenu), le cas du milieu renouvelé pour des êtres normalement non proliférants, n'a jamais été considéré.

CONCLUSIONS

Au terme de cette étude qui porte sur l'ensemble des caractéristiques des spermatozoïdes d'Oursins, je rassemblerai les conceptions essentielles qui s'en dégagent. Tout d'abord on ne saurait trop insister sur ce que la biologie des spermatozoïdes d'Oursins en eau de mer ordinaire n'en est pas la physiologie, elle n'en est qu'un témoin au sens expérimental. La physiologie, qui se définit dans le cadre de la fonction (ici le pouvoir fécondant), exige en effet que les spermatozoïdes soient examinés dans les conditions où ils accomplissent cette fonction, c'est-à-dire notamment en présence des substances du tractus génital femelle ou des ovules (ici, la fertilisine et aussi le CO_2 respiratoire ovulaire dont la quantité dépend de la concentration en ovules et du temps de contact ovules-eau de mer). Envisagées de la sorte, un certain nombre de contradictions portant sur les phénomènes de la fécondation chez les Oursins non incubateurs et dont on trouve la trace dans la littérature, ont pu être dissipées à la suite de mon analyse expérimentale. C'est ainsi que ce travail constitue la première étude sur les relations métaboliques inter-gamétiques dans les hybridations ; par ailleurs les relations entre agglutination spécifique et métabolisme ont pu être explicitées : en eau de mer, en effet, la fertilisine peut, par exemple, amener soit l'agglutination spontanément réversible des spermatozoïdes homologues, soit leur agglutination irréversible, soit aucune agglutination. De même les spermatozoïdes peuvent être immobiles au sein de leur suspension et être réactivables en présence d'eau de mer ovulaire. Toutes choses étant égales par ailleurs, tout dépend de la concentration en fertilisine, ou de la concentration en spermatozoïdes et surtout de l'âge de ces gamètes (d'une façon générale : de leur état). Partant alors de considérations fondées sur la distinction de biologies différentes des spermatozoïdes — correspondant aux différentes étapes de leur évolution, du testicule à l'amphimixie — j'ai proposé 12 critères nécessaires et suffisants permettant de définir une suspension quelconque de spermatozoïdes d'Oursins réguliers, et permettant en conséquence d'en conjecturer le faciès fonctionnel c'est-à-dire le pouvoir fécondant, objet principal de mes préoccupations dans ce travail.

D'autre part l'examen du devenir spermatique dans les conditions de leur utilisation au laboratoire m'a amené à introduire les notions de milieu ouvert et de milieu renouvelé en spermiologie d'Oursins. Cette conception est fondée sur la considération que les produits du métabolisme, toxiques, doivent être éliminés en même temps que des substrats doivent être amenés dans le milieu cellulaire pour permettre une survie *active* des spermatozoïdes dans les meilleures conditions. J'ai examiné expérimentalement en détail la première possibilité — le milieu ouvert —, et, pour des durées de survie de 30 heures celui-ci s'est avéré très sensiblement supérieur aux autres formes de conservation (en milieu plus ou moins clos).

J'ai désigné (cf. 695) par le nom de *règle de* Kölliker la relation qui lie

directement la durée de survie à la concentration spermatique et indirectement la concentration spermatique à l'intensité du métabolisme. Cette règle s'explique en considérant principalement que la quantité de substrats utilisables d'une suspension donnée de spermatozoïdes est une quantité finie et que le pouvoir de synthèse des spermatozoïdes est faible ou nul. Cette déficience trophique des gamètes implique leur vie parasitaire : le spermatozoïde est un parasite à deux hôtes, le testicule et l'ovule.

Des considérations énergétiques président donc à la vie des spermatozoïdes, mais des considérations morphologiques ne doivent pas être négligées dans les conditions expérimentales. En effet, chaque suspension spermatique est constituée par une population plus ou moins hétérogène (en fonction de la période de maturité) de spermatozoïdes fécondants voisinant avec des spermatozoïdes stériles (cette stérilité dépend soit d'une dystrophie soit de l'immaturité). Les mesures du métabolisme des spermatozoïdes sont ainsi plus ou moins entachées de l'erreur provenant du fait que les spermatozoïdes stériles ont aussi un métabolisme quoiqu'il ne compte pas dans le pouvoir fécondant. La discrimination peut être faite cependant en examinant l'allure de différents critères sériés au cours du vieillissement d'une suspension spermatique donnée. On sélectionne ainsi les spermatozoïdes fonctionnellement dominants qui profitent en plus, semble-t-il, du produit de la lyse des autres gamètes mâles de la suspension. C'est ainsi que j'ai pu obtenir la survie pendant 162 heures de spermatozoïdes d'*Arbacia lixula*, durée qui représente le maximum de survie que l'on ait pu atteindre jusqu'à présent avec des spermatozoïdes d'Oursins suspendus en eau de mer à température du laboratoire.

Du point de vue méthodologique l'utilisation de critères sériés pour la localisation d'un phénomène procède de la même attitude qui commande la systématique morphologique, elle permet de construire une taxonomie biologique qu'on peut nommer *biologie descriptive*.

RÉSUMÉ

L'objet essentiel de ce travail est de contribuer à définir le pouvoir fécondant. Je montre que les relations fertilisine-sperme sont fondamentales à considérer. Dans le cours de mes recherches expérimentales qui ont porté sur *Paracentrotus lividus* Lamarck et *Arbacia lixula* Linné, j'ai notamment pu :

1) isoler la fertilisine (par voie trichloracétique) à partir des ovules ou des eaux ovulaires de *P. lividus* et d'*A. lixula* (première extraction, démontrant le caractère non albuminique de la fraction macromoléculaire) ;

2) découvrir et isoler la catalase de l'anse directe du tractus digestif d'*A. lixula* ;

3) confirmer la mobilité du « Nebenkern » ;

4) mettre en évidence de nouveaux types d'agglutinations spermatiques, par la fertilisine : 1) en fuseaux bouclés, 2) irréversibles en eau distillée, 3) irréversibles après centrifugation du sperme et en eau de mer, 4) irréversibles sous l'action du froid et en eau de mer, 5) irréversibles après vieillissement des spermatozoïdes et en eau de mer ;

5) montrer que le poids sec ne peut rendre compte de la concentration d'une suspension de spermatozoïdes en eau de mer, ce qui met en cause la rigueur de nombreuses expériences d'auteurs divers ;

6) examiner différentes éventualités pour expliquer la désagglutination spontanée des spermatozoïdes soumis à l'action de la fertilisine et eau de mer : éventualité physico-chimique (spécialement l'action d'agents tensio-actifs), éventualité morphologique (à laquelle je me suis arrêté : la désagglutination est le fait d'une modification des spermatozoïdes) ;

7) apporter des éléments pour la définition d'une unité objective de concentration en fertilisine. Fondements : 1° néphélométrie de composés hétéropolaires fertilisine-protéines basiques, 2° durée des agglutinats ;

8) examiner sous certains aspects les quatre conditions physico-chimiques de l'activité flagellaire : force ionique, température, pH, rH_2, en considération d'une hypothèse que j'ai formulée selon laquelle on peut assimiler le flagelle à un système musculaire ;

9) tenter la première démonstration de la théorie de *l'allélostasie* (Gray) par ultra-filtration, ce qui a permis finalement de mettre au point une technique de concentration de spermatozoïdes *en vie active*, la seule qui existe jusqu'à présent ;

10) examiner la valeur des différentes techniques proposées pour estimer la vitesse des spermatozoïdes d'Oursins et mettre en œuvre un nouveau montage facile à utiliser, pour l'observation des spermatozoïdes en couche liquide « laminaire » permettant des chronométrages, les valeurs obtenues

sont de l'ordre de celles que donnent des techniques plus compliquées ou plus onéreuses ;

11) montrer que l'échinochrome des ovotides d'*A. lixula* ne paraît doué d'aucune activité ni dynamogène ni respiratoire sur les spermatozoïdes ; cette démonstration a pu être faite grâce à mes préparations de fertilisine d'extraction trichloracétique facilement décolorables selon une technique de dialyses successives que j'ai élaborée ;

12) proposer un test rapide de vitalité, nouveau pour les spermatozoïdes d'Oursins : celui de la *réductase* ; j'ai pu montrer qu'il suivait le test respirométrique et sa facilité d'exécution permet de conduire de nombreuses analyses sur des spermatozoïdes placés en diverses conditions : eau distillée, liquide périviscéral, après concentration par centrifugation ou ultra-filtration, en cours de vieillissement, etc. ;

13) suivre le vieillissement des spermatozoïdes à l'aide de cinq critères biologiques sériés : respirométrie, activité réductasique, motilité, sensibilité à la fertilisine (agglutination, activation ou réanimation), pouvoir fécondant ; ce qui a permis de démontrer l'extrême labilité des spermatozoïdes, labilité exigeant un contrôle chronométrique constant dans toute étude rigoureuse de leur biologie ; le temps s'avère ainsi comme le facteur primordial à considérer, faute de quoi les résultats énoncés sont indéterminés et finalement inutilisables. On peut estimer ainsi la difficulté de ces études où les exigences du « temps matériel » forcent à des manipulations très rapides et par ailleurs très nombreuses et l'on conçoit que ce genre d'études — si même leur nécessité avait été reconnue — ait pu jusqu'à présent rebuter les chercheurs, au détriment cependant de l'avancement rigoureux de la question ; je considère d'ailleurs que ma présente contribution n'est qu'une première étape vers une spermiologie hautement quantitative et que, si elle dissipe un certain nombre de confusions, elle pose plus de problèmes qu'elle n'en résout ;

14) montrer l'importance du récipient dans la conservation des gamètes (effet flacon) et proposer la notion de *milieu ouvert* et celle de *milieu renouvelé* avec ou sans phase gazeuse, utilisant notamment pour cela un nouveau dialyseur sous pression contrôlée ;

15) insister sur l'importance de travailler en milieu aseptique (utilisation de pénicilline) : le milieu ouvert (sans fourniture de substrats aux spermatozoïdes) est le plus favorable pendant 30 heures à la survie des spermatozoïdes ; au dessus de 30 heures c'est le récipient à large surface (aération sans agitation) qui s'avère le meilleur (en milieu ouvert les spermatozoïdes se lysent après 30 heures : libération d'anti-fertilisine) ; cette considération d'asepsie met en cause les résultats de Godlewski sur l'antagonisme des spermes d'espèces étrangères ;

16) obtenir la plus longue durée de survie de spermatozoïdes d'Oursins qu'on ait pu obtenir jusqu'à présent : 162 heures à 0 # 20° C ; j'ai ainsi pu montrer la valeur du test de la réductase qui a permis de déceler ce qui revenait aux spermatozoïdes et ce qui revenait aux ovules dans les fluctuations des taux de fécondations ;

17) montrer par conservation parabiotique (dialyse co-axiale sperme-ovules) que l'oxygénation paraît bien être un des facteurs essentiels de la survie ;

18) proposer de nouveaux procédés de microscopie utilisant en guise de

lame et de lamelle soit des films de collodion soit de la cellophane adhésive, celle-ci permettant une conservation relativement prolongée de spermatozoïdes d'Oursins provenant de suspensions en eau de mer et non fixés. Ces procédés ont l'avantage de livrer des préparations incassables, légères et peu encombrantes ;

19) obtenir des blastules hybrides ♂ *P. lividus* × ♀ *A. lixula* et montrer que les croisements ne paraissent possibles que dans la mesure où la fertilisine active les spermatozoïdes ou leur est indifférente (règle physiologique d'hybridation). Cette étude constitue la première contribution portant sur les relations métaboliques conditionnant l'hybridation chez les Oursins.

Ces résultats sont discutés en détail et ont permis de tirer des conclusions portant particulièrement sur la notion de force physiologique des gamètes, sur la possibilité de conjecturer du pouvoir fécondant à partir de critères sériés, sur la déficience trophique des gamètes des lignées non parthénogénétiques impliquant le parasitisme (pour les spermatozoïdes ; testicules et ovules avec une vie libre courte), sur la nature de l'action de la fertilisine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abercrombie (M.) et Winternitz (M. C.). — Observation on the social behaviour of cells in tissue culture. I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Ex. Cell. Res.* (1953), **5**, n° 1, 111.
2. Adler (H. C.) et Rasbech (N. O.). — Studies on the effect of antibiotics on the fertility of bull semen. 2 500 micrograms of dihydrostreptomycin sulfate per ml. of diluent with special reference to its application in bulls transmitting *Vibrio fetus* infection. *Nordisk Veterinaermed.* (1952), **4**, 605.
3. Agassiz (A.). — Revision of the Echini (1873), Univ. Press Cambridge, 764 pages.
4. Albert (A.). — Quantitative studies of the acidity of naturally occuring substances for traces metals. I. Amino-acids having groups. *Bioch. J.* (1950), **47**, 531.
5. — Avidity of terramycin and aureomycin for metallic cations. *Nature* (1953), **172**, 201.
6. Alexeieff (A.). — Comparaison entre la structure des spermatozoïdes et celle des Flagellés. *Arch. f. Protist.* (1924), **49**, 104.
7. Allee (W. C.) et Finkel (A. J.). — Factors affecting rate of cleavage in Arbacia; a preliminary study of homotypic extracts. *Anat. Rec.* (1939), **10**, 295.
8. Alsup (F. W.). — Photodynamic action in the eggs of *Nereis limbata*. *Biol. Bull.* (1939), **77**, n° 2, 324.
9. Alman (S. M.) et Crook (E. M.). — Activation of enzymes by chelating agents. *Nature* (1953), **171**, 76.
10. Austin (C. R.). — Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Austral. J. Sc. Res. Ser. B. Biol. Sc.* (1951), **4**, 569.
11. — The « capacitation » of the mammalian sperm. *Nature* (1952), **170**, 326.
12. — et Braden (A. W. H.). — Passage of the sperm and the penetration of the egg in mammals. *Nature* (1952), **170**, 919.
13. Balbiani (E.). — La fécondation chez les Vertébrés. *J. de Micrographie* (1879), **3**, 54 (I); 108 (II); 162 (III).
14. Ball (E. G.) et Cooper (O.). — Echinochrome, its absorption spectra pK's value; and concentration in the eggs amoebocytes and test of *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* (1949), **97**, 231.
15. Ballard (W. W.). — The mechanism for synchronous spawning in *Hydractinia* and *Pennaria*. *Biol. Bull.* (1942), **82**, 329.
16. Ballowitz (E.). — Untersuchungen über die Struktur der Spermatozoen zugleich ein Beitrag zur Lehre vom feinen Bau des kontraktilen Elements. Die Spermatozoen der Insekten (I. Coleoptere). *Ztschr. f. wiss. Zool.* (1890), **50**, 317.
17. — Untersuchungen über die Struktur der Spermatozoen. III. Fische, Amphibien und Reptilien. *Arch. f. mikrosk. Anat.* (1890), **36**, 225.
18. — Zur Kenntnis der Spermien des Herings. *Arch. f. Zellf.* (1917), **14**, 177.
19. — Ueber die Samenkörper der Forelle. *Arch. f. Zellf.* (1917), **14**, 184.
20. — Ueber die körnige Zusammensetzung des Verbindungsstücks der Samenkörper der Knochenfische. *Arch. f. Zellf.* (1917), **14**, 355.
21. — Die Spermien der Haarmücken, Bibionidae. Ein Beitrag zur Kenntnis der Samenkörper der Dipteren. *Arch. f. Zellf.* (1917), **14**, 359.
22. — Ueber die Samenkörper des Lachses. Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Spermien der Salmoniden. *Arch. f. Zellf.* (1917), **14**, 451.

23. Baltzer (F.). — Ueber die Herkunft der Idiochromosomen bei Seeigeln. *Sitzungber. Phys. Med. Gesellschaft*. Wurtzbourg (1913).
24. Banga (I.) et Szent-Györgyi (A.). — Strukturproteine. *Enzymologia* (1940), **9**, 111.
25. Barnes (H.) et Rothschild (Lord). — A note on the copper content of sea urchin semen and sea water. *J. exp. Biol.* (1950), **27**, n° 2, 123.
26. Barron (E. S. G.) et Goldinger (J. M.). — Effect of iodacetate and malonate on respiration of sea urchin sperm. *Proc. Soc. exp. Biol.* (1941), **48**, 570.
27. Beauvallet (M.) et Brochart (M.). — Présence de nor-adrénaline dans le sperme du taureau. *C. R. Soc. Biol.* (1949), **143**, 257.
28. Bell (F. J.). — Catalogue of the british Echinoderms in the British Museum. Londres, 1892, 202 pages.
29. Berg (W. E.). — Some effects of sperm extracts on the eggs of *Mytilus*. *Amer. Natur.* (1949), **83**, 221.
30. Bergstrom (S.) et Holman (R. L.). — Lipoxidase and the autoxidation of unsaturated fatty acids. *Adv. Enzym.* (1948), **8**, 425.
31. Bernard (Cl.). — Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux. Paris, 1878, Baillière, 404 pages.
32. Bernstein (G. S.). — Sperm agglutinins in the egg jelly of the frogs *Rana pipiens* Schieber and *Rana clamitans* Latreille. *Biol. Bull.* (1952), n° 2, **103**, 285.
33. Bertolini (F.). — Ricerche istologiche e sperimentali sulla digestione del Riccio di mare. *Pubb. Staz. Zool. Nap.* (1930), **10**, 51.
34. Bessis (M.), Bricka (M.), Breton-Gorius (J.) et Tabuis (J.). — Les formes myéliniques et l'agglutination des érythrocytes falciformes. *C. R. Acad. Sc.* (1953), **236**, 1208.
35. Bielig (H. J.) et Dohrn (P.). — Zur Frage der Wirkung von Echinochrom A und Gallerthüllensubstanz auf die Spermatozoen des Seeigels *Arbacia lixula* (*A. pustulosa*). *Ztschr. f. Naturf.* (1950), **5**, 316.
36. Binet (L.) et Weller (G.). — Le glutathion (1937). Paris, Hermann, 88 pages.
37. Bishop (D. W.) et Mathews (H. P.). — The significance of intravas pH in relation to sperm motility. *Science* (1952), **115**, 209.
38. — et Mathews (H. P.). — Inhibition of sperm motility by tetrazolium salts. *Science* (1952), **115**, 211.
39. Blackshaw (A. W.). — Motility of ram and bull spermatozoa in dilute suspension. *J. gen. Physiol.* (1953), **36**, 449.
40. Blom (E.) et Christensen (N. O.). — En modificeret Tybromol-Katalaserve som hed : der rutine indessige Undersgelse af Tyresperma. *Medl. Dansk Dyrl.* (1944), **27**, 537.
41. Boivin (A.) et Mesrobeanu (L.). — L'antigène « complet », constituant acido-soluble de l'endotoxine renfermée dans les formes S du bacille d'Aertrycke et du bacille de Gaertner. *C. R. Soc. Biol.* (1935), **118**, 614.
42. Bonner (J. T.). — Evidence for the formation of cell agregates by chemiotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. exp. Zool.* (1947), **106**, n° 1, 1.
43. Bonnet (A.). — Recherches sur l'appareil digestif et absorbant de quelques Echinides réguliers. *Ann. Inst. Océanogr.* (1925), **2**, 205.
44. — Recherches sur la constitution des plaques, la disposition des pores et l'obliquité des canaux ambulacraires chez les Echinides réguliers. *Ann. Inst. Océanogr.* (1925-1927), **3-4**, 243.
45. Bordet (J.). — Contribution à l'étude de l'irritabilité des spermatozoïdes chez les Fucacées. *Bull. Acad. Roy. Belgique* (1894), **27**, 3e série, 888.
46. Borei (H.). — Action on starfish eggs of basic protein extract from sperm. *Ark. f. Zool.* (1948), **40** B, n° 1, 6 pages.
47. — Promoted respiration in relation to morphological changes in clupein activated sea-urchin eggs. *Ark. f. Zool.* (1948), **40** A, n° 13, 13 pages.
48. — et Björklund (U.). — Effect of versene on sea-urchin eggs. *Exp. Cell Res.* (1953) **5**, n° 1, 216.

49. — et Metz (C. B.). — The cytochrome system of starfish sperm. *Biol. Bull.* (1951), **101**, 216.
50. Bosselar (C. A.) et Spronk (N.). — A physical method for determining of the motility and concentration of spermatozoa. *Nature* (1952), **169**, 18.
51. Bourne (G.). — Cytology and cell physiology. Oxford, 1942, 1re éd.
52. Bowen (R. H.). — On the idiosome, Golgi apparatus, and acrosome in the male germ-cells. *Anat. Rec.* (1942), **24**, 159.
53. — On the acrosome of the animal sperm. *Anat. Rec.* (1924), **28**, 1.
54. — On a possible relation between the Golgi apparatus and secretory products. *Am. J. Anat.* (1924), **33**, 197.
55. — Studies on the Golgi apparatus in gland cells. IV. A critique of the topography, structure and function of the Golgi apparatus glandular tissue. *Quart. J. micr. Sc.* (1926), **70**, 419.
56. — The Golgi apparatus. Its structure and functional significance. *Anat. Rec.* (1926), **32**, 151.
57. Brochart (M.) et Coulomb (J.). — Recherches sur la dilution et la conservation du sperme de Chien. *Bull. Acad. Vét. France* (1952), **25** (2), 59.
58. Brooks (M. M.). — Oxidation-reduction studies as a clue to the mechanism of fertilization of marine eggs. *Biol. Bull.* (1946), **91**, 212.
59. — The mechanism of fertilization of eggs. *Growth U. S. A.* (1946), **10**, 391.
60. Bryce (T. H.). — Maturation of the ovaries in *Echinus esculentus*. *Quart. J. micr. Sc.* (1903), **46**, 177.
61. Bugher (J. C.). — Characteristics of collodion membranes for ultrafiltration. *J. gen. Physiol.* (1953), **36**, 3, 431.
62. Bülbring (E.) et coll. — The presence of acetylcholine in *Trypanosoma Rhodiense* and its absence from *Plasmodium Gallina*. *Brit. J. Pharm.* (1949), **4**, 240.
63. Buller (A. H.). — The fertilization process in Echinoidea. *Rep. of the Brit. Assoc.* (1900), 70th meeting, 387.
64. — External phenomena of fertilization. *Quart. J. micr. Sc.* (1902), **46**, nº 181, 536.
65. — Is chemotaxis a factor in the fertilization of the eggs of animals? *Quart. J. micr. Sc.* (1903), **46**, 145.
66. Burbank (R. C.). — The quantitative standardization of sperm suspension by means of opacity. *Quart. J. micr. Sc.* (1935), **25**, nº 4, 393.
67. Burnet (F. M.). — The interaction of virus and cell surface. *Proc. Roy. Soc.* (1951), **138** B, 47.
68. —, McCrea (J. F.) et Anderson (S. G.). — Mucin as substrate of enzyme action by viruses of the mumps influenza group. *Nature* (1947), **160**, 404.
69. Campbell (R. C.), Hancock (J. L.) et Rothschild (Lord). — Counting live and dead Bull spermatozoa. *J. Exp. Biol.* (1953), **30**, nº 1, 44.
70. Cannan (R. K.). — Echinochrome. *Bioch. J.* (1927), **21**, 184.
71. Cabayon (J.). — Pénétration et dispersion des spermatozoïdes dans l'organisme des femelles de certains Hémiptères. *C. R. Acad. Sc.* (1946), **227**, 107.
72. — Les phénomènes particuliers qui accompagnent la fécondation chez certains Hémiptères Nabidæ. *Abstracts IXth Congresse Entomology*, Amsterdam (1951), IV, 1.
73. Carter (G. S.). — On the early development of the Echinoderm egg. *Proc. Camb. Phil. Soc.* (1924), **1**, nº 2, 84.
74. — On the early development of the Echinoderm egg. *Proc. Camb. Phil. Soc.* (1924), nº 2, 105.
75. — Thyroxine and the oxygen consumption of the spermatozoa of *Echinus miliaris*. *J. Exp. Biol.* (1930), **7**, 41.
76. — Iodine compounds and fertilization. The oxygen consumption of suspensions of sperm of *Echinus esculentus* and *Echinus miliaris*. *J. Exp. Biol.* (1931), **8**, 176.
77. — Iodine compounds and fertilization. III. The fertilizable life of the eggs of *Echinus esculentus* and *Echinus miliaris*. *J. Exp. Biol.* (1931), **8**, 194.
78. — Iodine compounds and fertilization. IV. Capacity for fertilization in washed

and unripe eggs of *Echinus esculentus* and *E. miliaris*. *J. Exp. Biol.* (1932), **9**, 238.

79. — Iodine compounds and fertilization. V. Agglutination and chemotaxis of the sperm. *J. Exp. Biol.* (1932), **9**, 248.

80. — Iodine compounds and fertilization. VI. Physiological properties of extracts of the ovaries and testes of *Echinus esculentus*. Part. I. *J. Exp. Biol.* (1932), **9**, 253.

81. — Iodine compounds and fertilization. VII. The nature of the egg secretion and the theory of fertilization. *J. Exp. Biol.* (1932), **9**, 264.

82. — Iodine compounds and fertilization. VIII. The effects of thyroxine and diiodothyroxine on the oxygen consomption of the sperm of the rabbit. *J. Exp. Biol.* (1932), **9**, 378.

83. Caullery (M.). — Structure et cycle annuel des glandes génitales des Oursins, en particulier de l'*Echinocardium cordatum* Pennent. *C. R. Assoc. Anatom.* (1911), **13**, 287.

84. — Sur la structure et le fonctionnement des gonades chez les Echinides. *Trav. Stat. zool. Wimereux. Glanures biol.* (1923), **9**, 21.

85. — et Siedlecki (M.). — Sur la résorption phagocytaire des produits génitaux inutilisés chez l'*Echinocardium cordatum* Penn. *C. R. Acad. Sc.* (1903), **137**, 496.

86. Champy (C. H.). — Conservation des spermatozoïdes en divers milieux. *C. R. Soc. Biol.* (1913), **74**, 72.

87. Chang (M. C.). — Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature* (1951), **168**, 697.

88. Chargaff (E.). — The protamine salts of phosphatides with remarks in the problem of lipoproteins. *J. Biol. Chem.* (1938), **125**, 661.

89. Charlot (G.). — Théorie et méthode nouvelle d'analyse qualitative. Masson, 1946, 2e éd.

90. — et Bezier (D.). — Méthodes modernes d'analyse quantitative minérale. Paris, 1945, Masson.

91. Chatton (E.). — Sur les connexions flagellaires des éléments flagellés. Centrosomes et mastigosomes. La cinétide, unité cinéto-flagellaire. Cinétides simples et cinétides composées. *C. R. Soc. Biol.* (1924), **91**, 577.

92. — *Orchitosoma parasiticum* n. g., n. sp., parasite à trois feuillets rudimentaires de *Paracalanus parvus* Cl. *C. R. Acad. Sc.* (1913), **157**, 142.

93. — Essai d'un schéma de l'énergide d'après une image objective et synthétique : le Dinoflagellé « *Polykrikos Schwartzi* » Bütschli. *Arch. Zool. Italiano* (1931), **16**, 169 (XIe Congrès international de Zoologie de Padoue, 1930).

94. — Titres et travaux scientifiques (1906-1937). Sète (1938). Sottano, éd., 405 pages.

95. — et Chatton (Mme). — L'action des facteurs externes sur la sexualité des Infusoires. Bactéries zygogènes et azygogènes. Zygose bactérienne et zygose saline. *C. R. Soc. Biol.* (1925), **93**, 675.

96. — et Grassé (P.-P.). — Le chondriome, le vacuome, les vésicules osmiophiles, le parabasal, les trichocystes et les chidocystes du Dinoflagellé « *Polykrikos Schwartzi* » Bütschli. *C. R. Soc. Biol.* (1929) **100**, 281.

97. Chauchard (P.). — Les facteurs de variation du pouvoir réducteur de l'eau de mer (Étude comparative de la teneur des eaux marines en matières organiques dissoutes). *Ann. Inst. Océanogr.* (1935), **15**, 329.

98. Chéoux (G.). — Contribution à l'écologie de *Gammarus locusta* (forme saumâtre). *Diplôme de Sc. nat.*, Paris, 1952.

99. Chikayoshi Matsudaira. — The catalytic activity of sea water. IV. Effect of added copper on the catalytic activity. *Tôhoku J. Agr. Res.* (1952), **3**, 135.

100. Cleland (K. W.). — Heavy metals fertilization and cleavage in the eggs of *Psammechinus miliaris*. *Exp. Cell Res.* (1953), **4**, 246.

101. Clerc (A.). — Ferments digestifs de quelques Echinodermes. *C. R. Soc. Biol.* (1904), **56**, 798.

102. Clowes (G. H. A.) et Bachman (E.). — A volatile sperm-stimulating substance derived from marine eggs. *J. Biol. Chem.* (1921), **46**, XXXI.
103. — et Smith (H. W.). — The influence of hydrogen ion concentration on the fertilization and growth of certain marine eggs. *Amer. J. Physiol.* (1933), **64**.
104. — et Walden (E. B.). — On specific sperm agglutination. *J. Biol. Chem.* (1925), **63**, 64.
105. Cohen (S. S.). — Studies on the distribution of the oxidative pathway of glucose-6-phosphate utilization. *Biol. Bull.* (1950, **99**, 369.
106. Cohn (E. J.). — The relation between the hydrogen ion concentration of sperm suspensions and their fertilizing power. *Anat. Rec.* (1917), **11**, 530.
107. — Studies in the physiology of spermatozoa. *Biol. Bull.* (1918), **34**, 167.
108. — et Edsall (J. T.). — Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions. New York, Rheinhold Publ.
109. Cohnheim (O.). — Versuche über Resorption, Verdauung und Stoffwechsel von Echinodermen. *Ztschr. f. Physiol. Chem.* (1901), **33**, 9.
110. Cole (W. H.). — The composition of fluids and sera of some marine animals and of the sea water in which they live. *J. gen. Physiol.* (1940), **23**, 575.
111. Cook (A. H.), Elvidge (J. A.) et Heilbron (J.). — Fertilization including chemotactic phenomena in the Fucacae. *Proc. Roy. Soc. B.* (1948), **135**, 293.
112. Cornman (I.). — Echinochrom as the sperm activating agent in egg water. *Biol. Bull.* (1940), **79**, 365.
113. — Sperm activation by Arbacia egg extracts, with special relation to Echinochrome. *Biol. Bull.* (1941), **80**, 202.
114. Coupin (H.). — La fécondation chez les animaux et chez les végétaux. Paris, 1934, Baillière, éd., 203 pages.
115. Courrier (R.). — Perméabilisation expérimentale de l'œuf vierge d'Oursin. *C. R. Acad. Sc.* (1924), **178**, 597.
116. Cragg (F. W.). — Further observations on the reproductive system of *Cimex* with special reference to the behaviour of the spermatozoa. *Ind. J. Med. Res.* (1920), **8**, n° 1, cité par R. Poisson, « Ordre des Hétéroptères », *in Traité Zoologie* Grassé, p. 1657, **10** (1951).
117. Crane (R. K.) et Keltch (A. K.). — Dinitrocresol and phosphate stimulation of the oxygen consomption of a cell-free oxidative system obtained from sea-urchin eggs. *J. Gen. Physiol.* (1948), **32**, 503.
118. Crézé (J.). — Paralysie des spermatozoïdes de Batraciens par le curare et les curarisants de synthèse. *C. R. Soc. Biol.* (1949), **143**, 46.
119. Crozier (W. J.). — An observation in the « cluster-formation » of the sperma of Chiton. *Am. Nat.* (1922), **56**, 479.
120. Cuénot (L.). — Anatomie, éthologie et systématique des Échinodermes. *Traité de Zoologie*, Paris (1948), XI, 1.
121. — Études morphologiques sur les Échinodermes. *Arch. Biol.* (1891), **11**, 680 pages.
122. — Notes sur les Échinodermes. *Zool. Anz.* (1892), **15**, 121.
123. Dakin (W. J.) et Fordham (M. G. S.). — The chemotaxis of spermatozoa and its questionned occurence in the animal kingdom. *Brit. J. Exp. Biol.* (1924), **1**, 183.
124. Dalcq (A.). — Les bases physiologiques de la fécondation. Paris (1928). Press. Univ. Fr., 274 pages.
125. Dan (J. C.). — Sperm entrance in Echinoderms, observed with the phase contract microscope. *Biol. Bull.* (1950), **99**, 399.
126. — Studies on the acrosome I. Reaction to egg-water and other stimuli. *Biol. Bull.* (1952), **103**, 54.
127. Dangeard (P. A.). — Étude comparative de la zoospore et du spermatozoïde. *Le Botaniste* (1901), 7e série, 6e fasc., 4 pages.
128. Dauzier (C.). — Recherches sur les facteurs de la remontée des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles. Étude chez la Brebis (col de l'utérus). *C. R. Soc. Biol.* (1953), **147**, 1556.
129. —, Thibault (C.) et Wintenberger (G.). — La fécondation *in vitro* de l'œuf de Lapine. *C. R. Ac. Sc.* (1954), **218**, 844.

130. Davidson (E.). — Clotting of the perivisceral fluid of the sand dollar *Echinarachnius parma*. *Biol. Bull.* (1953), **105**, n° 3, 372.

131. Deflandre (G.). — Observations sur les mouvements propres, pistes et vitesses de déplacement de quelques Protistes. *Ann. Protistol.* (1929), **2**, fasc. 1, 1.

132. Delage (Y.) et Goldschmidt (M.). — Le tanin et le sucre dans la parthénogenèse des Oursins. *Bull. Inst. Océan.* (1915), n° 306.

133. Delaporte (B.) et Delaporte (P.-J.). — Étude statistique des facteurs de croissance liés à la proximité des bactéries entre elles. *VIe Congrès Int. Micro.*, Rome (1953). Riassunti delli communicazioni, vol. **1**, 49.

134. Delaunay (A.). — Recherches des constituants bactériens responsables de l'appel leucocytaire. *Ann. Inst. Pasteur* (1942), **68**, 72.

135. Derbès (A.). — Observations sur le mécanisme et les phénomènes qui accompagnent la formation de l'embryon chez l'Oursin comestible. *Ann. Sc. Nat.* (1847), **8**, 80.

136. — et Solier (A. J. J.). — Mémoire sur quelques points de la physiologie des Algues. *C. R. Acad. Sc.*, Suppl. 1 (1856), 120 pages.

137. Dewitz (J.). — Ueber die Vereinigung der Spermatozoen mit dem Ei. *Arch. f. gesamte Physiol.* (1885), **37**, 219.

138. — Ueber Gesetzmässigkeit in der Ortsveränderung der Spermatozoen und in der Vereinigung derselben mit dem Ei. *Pflügers Archiv.* (1886), **38**, 358.

139. Doflein (F.). — Karyokinese des Spermakerns. *Arch. f. mikrosk. Anat.* (1897), **50**, 189.

140. Dohrn (P.) et Monroy (A.). — Analysis of the *in vitro* reaction between jelly-coat and a cytoplasmic component (antifertilizin) of sea urchin eggs. *Experientia* (1952), **8**, 189.

141. Don Ritchie. — The frequency of beat of sperm tail. *Science* (1950), **111**, 172.

142. Dorier (A.). — Sur la conservation de la laitance de quelques Salmonidés. *C. R. Acad. Sc.* (1951), **232**, 1142.

143. Drago (U.). — Nuove ricerche sull' « attrazione » delle cellule sexuali. *Arch. f. Entw. Mech.* (1908), **26**, 448.

144. Drzewina (A.) et Bohn (G.). — Effets tardifs de la dilution du sperme sur le développement de l'œuf d'Oursin. *C. R. Acad. Sc.* (1923), **177**, 79.

145. Dubois (R.). — Sur la spermase et l'ovulase. *C. R. Soc. Biol.* (1900), **52**.

146. Duboscq (O.) et Grassé (P.-P.). — L'appareil parabasal des Flagellés. *Arch. Zool. exp. et gén.* (1933), **73**, n° 3, 381.

147. Duclaux (J.). — Traité de chimie physique appliquée à la biologie, t. II. Paris (1938), Hermann, 462 pages.

148. Duhem (P.). — Thermodynamique et chimie. Paris (1910), Hermann, 565 pages.

149. Duncan (P. M.). — A revision of the genera and great groups of the echinoidea. *J. Linnean Soc.* (1889), **23**, 34 pages.

150. Dungern (E. von). — Die Ursachen der Specietät bei der Befruchtung. *Zbl. f. Physiol.* (1901), **15**, 1.

151. — Neue Versuche zur Physiologie der Befruchtung. *Ztschr. f. Allg. Physiol.* (1902), **1**, 34.

152. Dustin (A. P.). — A propos de quelques substances inhibant le décollement de la membrane de fécondation chez *Strongylocentrotus lividus*. *C. R. Soc. Biol.* (1919), **82**, 940.

153. Elster (H. J.). — Ueber die Rolle der Eisekrete bei der Befruchtung der Echinoïdeen. *Verhandl. deutschen zool. Ges.* (1936), **33**, 168. Consulter aussi : *Arch. f. Entw. Mech.* (1935), **133**, 1.

154. Engelhardt (V. A.). — L'acide phosphorique et les fonctions de la cellule. *Bull. Acad. Sc. U. R. S. S.* (1945), n° 2, 182.

155. Ephrussi (B.). — Sur la membrane de fécondation de l'œuf d'Oursin (*Paracentrotus lividus* L.). Action du liquide cœlomique. *C. R. Acad. Sc.* (1925), **180**, 775.

156. — La culture des tissus. Paris, 1932, Gauthier-Villars, éd.

157. Euler (H. von), Myrbäck (K.) et Myrbäck (S.). — Zur Bestimmung der Katalase in Pflanzenmaterial. *Ztschr. f. physiol. Chem.* (1930).

158. Evans (T. C.). — Effects of hydrogen peroxide produced in the medium by radiation on spermatozoa of *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* (1947), **92**, 99.
159. Fegler (G.). — Relationship between reduced glutathione content and spontaneous haemolysis in shed blood. *Nature* (1952), **170**, 624.
160. Feinstein (R. N.). — Perborate as substrate in a new assay of catalase. *J. Biol. Chem.* (1949), **180**, 1197.
161. Field (G. W.). — On the morphology and physiology of the Echinoderm spermatozoön. *J. of Morph.* (1895), **11**, n° 2, 235.
162. Fink (A.). — Ueber die Lebensfähigkeit menschlicher Spermatozoen *in vitro*. *Klin. Med. Österr.* (1953), **8**, n° 3, 115.
163. Fischel (A.). — Ueber Bastardierungsversuche bei Echinodermen. *Arch. f. Entw. Mech.* (1906), **22**, 498.
164. Fischer (M. H.). — How long does (Arbacia) sperm live in sea water? *Am. J. Physiol.* (1903), **8**, 430.
165. Fischer (M.) et Ostwald (W.). — Zur physikalisch-chemischen Theorie der Befruchtung. *Pflügers Arch.* (1905), **106**, 229.
166. Fleming (A.). — Motilité et cils de *Proteus vulgaris*. *Ann. Inst. Pasteur* (1950), **79**, n° 5, 604.
167. Fol (H.). — Recherches sur la fécondation et le changement de l'hénogénie chez divers animaux. Genève (1879), 309 pages.
168. — Sur le commencement de l'hénogénie chez divers animaux. *J. de Micrographie* (1879), **3**, 519.
169. Fox (H. M.). — The spawning of Echinoids. *Proc. Cambr. Phil. Soc.* (1924), **1**, n° 2, 71.
170. Frank (J. A.). — Some properties of sperm extracts and their relationship to the fertilization reaction in *Arbacia pustulosa*. *Biol. Bull.* (1939), **76**, 190.
171. Franke (W.). — Zur Autoxydation der ungesättigten Fettsäuren. II. Die Wirkung der Carotenoide. *Hoppe Seylers Ztschr. f. Phys. Chem.* (1932), **212**, 234.
172. Fredette (V.) et Vinet (G.). — Production en sac de cellophane de toxines tétaniques renfermant au moins 600 000 doses mortelles (Cobaye) par millilitre. *Canada J. med. Sc.* (1952), **30**, 155.
173. Friedheim (E. A. H.). — Sur deux ferments respiratoires accessoires d'origine animale. *C. R. Soc. Biol.* (1932), **111**, 505 et *in Arch. sc. phys. et nat.* (1932), **14**, 179.
174. Friedman (U.) et Hollander (A.). — *J. Lab. Clin. Med.* (1942), **28**, 353 (Cité *in* Umbreit, p. 128).
175. Fuchs (H. M.). — Studies in the physiology of fertilization. I. On the conditions of self-fertilization in *Ciona*. *J. Genetics* (1914), **4**, 215.
176. Galien (L.) et Roux (P.). — L'insémination artificielle chez les animaux domestiques. Paris (1948), Pres. univ., X, 266 pages.
177. Gallay (R.). — La coagulation de l'argile et les phénomènes de permutation et d'hydratation. *Helv. Chim. Acta* (1924), VII, n° 4, 41.
178. Galtsoff (P. S.). — Heteroagglutination of dissociated sponge cells. *Biol. Bull.* (1929), **57**, 250.
179. — Physiology of reproduction of *Ostrea virginica*. II. Stimulation of spawning in the female oyster. *Biol. Bull.* (1938), **75**, 286.
180. Garman (H.) et Colton (B. P.). — Some notes on the development of *Arbacia punctulata* L. *Studies biol. Lab. J. Hopkins Univ.* (1882), **2**, n° 2, 247.
181. Garrod (L. P.). — Allelocatalysis. *J. Path. and Bact.* (1936), **42**, 535.
182. Gatenby (J. B.). — Chemotaxis of spermatozoa and its questioned occurence in the animal kingdom. *Nature* (1924), **113**, 275.
183. Gavrilescu (N.). — The iodine method for the determination of glutathione. *Bioch. J.* (1931), **25**, n° 4, 1190.
184. Gellhorn (E.). — Physiologische Untersuchungen an Spermatozoen und Eiern. Ein Beitrag zum Befruchtungsproblem. Samelreferat. *Arch. f. mikr. Anat. u. Entw. Mech.* (1924), **101**, 437.
185. — Befruchtungsstudien. IV. Ueber den Einfluss von Nichtelektrolyten auf die Permeabilität der Spermatozoen. *Pflügers Arch.* (1924), **206**, 250.

186. Gemmil (J. F.). — On the vitality of the ova and spermatozoa of certain animals. *J. Anat. and Physiol.* (1900), **34**, 163.
187. Gero (E.). — Inhibiteurs de l'oxydation catalytique de l'acide *l*-ascorbique. Le rôle des complexes cuivreux. *C. R. Acad. Sc.* (1952), **236**, 541.
188. Giard (A.). — Sur la fécondation des Échinodermes. *C. R. Acad. Sc.* (1877), **85**, 408.
189. — Sur une fonction nouvelle des glandes génitales des Oursins. *C. R. Acad. Sc.* (1877), **85**, 858.
190. Giese (A. C.) et Wells (P. H.). — Protection effect of glycine on sperm exposed to light. *Science* (1952), **115**, 239, 6.
191. Giroud (A.) et Rakoto-Ratsimamanga (A.). — Distribution de la vitamine C chez les Invertébrés. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1936), **18**, 375.
192. Glaser (O.). — A qualitative analysis of the egg-secretion and extracts of *Arbacia* and *Asterias*. *Biol. Bull.* (1914), **26**, 367.
193. — On auto-parthenogenesis in *Arbacia* and *Asterias*. *Biol. Bull.* (1914), **26**, 387.
194. — An analysis of the egg-extractives of *Arbacia* and *Asterias*. *Science* (1914), **39**.
195. — Can a single spermatozoon initiate development in *Arbacia*? *Biol. Bull.* (1915), **28**, 149.
196. — Fertilization and egg-secretion. *Biol. Bull.* (1921), **41**, 63.
197. — Note on the pigment of Arbacia egg-secretion. *Biol. Bull.* (1921), **41**, 256.
198. — The duality of egg-secretion. *Am. Nat.* (1921), **55**, 368.
199. — The hydrolysis of higher fats in egg-secretion. *Biol. Bull.* (1922), **43**, 68.
200. — Note on the synthesis of ethyl-butyrate in egg-secretion. *Science* (1922), **55**, 486.
201. — Copper, enzymes and fertilization. *Biol. Bull.* (1923), **44**, 79.
202. Glaser (R.) et Lederer (E.). — Échinochrome et spinochrome; dérivés méthylés; distribution; pigments associés. *C. R. Acad. Sc.* (1939), **208**, 1939.
203. Godlewski (E.). — Die Hybridisation der Echinidenfamilie. *Bull. Acad. Sc.*, Cracovie (1905).
204. — Untersuchungen über die Bastardierung der Echiniden und Crinoidenfamilie. *Arch. f. Entw. Mech.* (1906), **20**, 579.
205. — Studien über die Entwicklungserregung. Kombination der heterogenen Befruchtung mit der künstlichen Parthenogenese. II. Antagonismus der Einwirking des Spermas von verschiedenen Tierklassen. *Arch. f. Entw. Mech.* (1912), **33**, 196.
206. — L'inhibition réciproque de l'aptitude à féconder de spermes d'espèces éloignées comme conséquence de l'agglutination des spermatozoïdes. *Arch. de Biol.* (1926), **36**, 311.
207. — Nouvelles recherches sur l'hétéro-agglutination des spermatozoïdes et sur l'action d'extraits de cellules sexuelles d'espèces étrangères. *Arch. de Biol.* (1934), **45**, fasc. 4, 735.
208. Goldfarb (A. J.). — Variability of germ cells of sea-urchin. *Proc. Nat. Acad. Sc.* (1917), **3**, 241.
209. — Variation of normal germ cells. Studies on agglutination. *Biol. Bull.* (1929), **57**, n° 6, 333.
210. — Changes in agglutination of ageing germ cells. *Biol. Bull.* (1929), **57**, 350.
211. — Factors that change agglutinability of ageing sperm. *Biol. Bull.* (1929), **57**, 389.
212. Grabar (P.). — L'ultrafiltration fractionnée et son emploi dans l'étude de substances biologiques. Paris, 1943, Hermann, 43-142.
213. Grassé (P.-P.). — Contribution à l'étude des flagellés parasites. *Arch. Zool. exp.* (1926), **65**, 345.
214. — et Tuzet (O.). — Origine et nature du prétendu squelette céphalique des spermies. *C. R. Acad. Sc.* (1929), **188**, 883.
215. — Les tégosomes dans la spermatogenèse des Mollusques prosobranches et leurs rapports avec le noyau. *C. R. Acad. Sc.* (1929), **189**, 341.
216. Grave (B. H.). — Vitality of the gametes of *Cumingia tellinoides*. *Biol. Bull.* (1928), **54**, 351.

217. — Further studies on the longevity and swimming ability of spermatozoa. *Biol. Bull.* (1934), **66**, 513.
218. — et Dawning (R. C.). — The longevity and swimming ability of spermatozoa. *J. Exp. Zool.* (1928), **51**, 383.
219. — et Oliphant (J. F.). — The longevity of unfertilized gametes. *Biol. Bull.* (1930), **59**, 233.
220. Gray (J.). — Note on the relation of spermatozoa to electrolytes and its bearing on the problem of fertilization. *Quart. J. Micr. Sc.* (1915), **61**, 450.
221. — The relation of spermatozoa to certain electrolytes. II. *Proc. Roy. Soc. B.* (1920), **91**, 147.
222. — The effect of dilution on the activity of spermatozoa. *J. Exp. Biol.* (1928), **5**, 337.
223. — The senescence of spermatozoa. *J. Exp. Biol.* (1928), **5**, 345.
224. — The effect of egg-secretions on the activity of spermatozoa. *J. Exp. Biol.* (1928), **5**, 362.
225. — Ciliary movement. Cambridge Univ. Press (1928). 162 pages.
226. — The senescence of spermatozoa. II. *J. exp. Biol.* (1931), **8**, 202.
227. — A text-book of experimental cytology (1931). Cambridge Univ. Press, 516 pages.
228. — Undulatory propulsion. *Quart. J. Micr. Sc.*, Centenaire (1953), **94**, 351.
229. Green (D. E.) et Richter (D.). — Adrenaline and adrenochrome. *Biochem. J.* (1937), **31**, 596.
230. Gros (F.), Macheboeuf (M.), Lacaille (P.) et Rybak (B.). — Agglutination de certaines bactéries par la streptomycine. *C. R. Acad. Sc.* (1949), **228**, 718.
231. —, Macheboeuf (M.), Rybak (B.) et Lacaille (P.). — Action de la streptomycine sur les bactéries non proliférantes. I. Agglutination des bactéries par la streptomycine. *Ann. Inst. Pasteur* (1949), **77**, 246.
232. — et Rybak (B.). — Action de la pénicilline et de la streptomycine sur le catabolisme de l'acide ribonucléique. *Helv. Chim. Acta* (1948), **31**, fasc. 6, 1855.
233. —, Rybak (B.), Macheboeuf (M.) et Rambech (U.). — Action de la pénicilline et de la streptomycine sur la dépolymérisation de l'acide ribonucléique par la ribonucléodépolymérase cristallisée. *C. R. Acad. Sc.* (1948), **223**, 1550.
234. Grumbach (F.), Rybak (B.) et Gros (F.). — Sur la streptomycinase entérococcique. *C. R. Acad. Sc.* (1949), **228**, 872.
235. Guiltscher (A.) et Schiller (I.). — Sur l'antagonisme provoqué. Bactéries et spermatozoïdes. *C. R. Soc. Biol.* (1928), **98**, 1121.
236. Günther (G.). — Ueber Spermiengifte. Ein Beitrag zur Kenntnis der Protoplasmagifte. *Arch. f. gesamte Physiol.* (1907), **118**, 551.
237. Guye (E.). — L'évolution physico-chimique. Paris, 1942, Hermann, 308 pages.
238. Guyénot (E.). — L'hérédité. Paris, 1942, 3e édition, p. 110.
239. Halaban (A.). — Vitamin K as a protoplasmic coagulant and parthenogenetic agent. *Biol. Bull.* (1949), **97**, 240.
240. Hara (R.). — Precipitation reactions of some metallic complex salts towards proteins. *J. Pharm. Soc. Japan* (1952), **72**, 748.
241. Harding (C. V.) et Harding (D.). — Cross fertilization with the sperm of *Arbacia lixula*. *Exp. Cell Res.* (1952), **3**, n° 2, 475.
242. Harris (A. H.). — Expériences d'inhibition de la croissance bactérienne *in vitro* au moyen de sacs de collodion. *J. Bact.* (1943), **45**, 147.
243. Hartmann (M.). — Les fondements de la fécondation et de la sexualité des plantes et des animaux. I. Les gamones d'Oursin. *Naturwiss.* (1940), **28**, 807. (Titre traduit).
244. — Les substances de fécondation (Gamones) des Oursins. *Forsch. u. Fortschr.* (1941), 119. (Titre traduit).
245. — Untersuchungen über die Gamone von Metazoen (Spez. dem Seeigel *Arbacia pustulosa* und der Regenbogenforelle *Salmo irideus*). Colloques de l'*Union int. Sc. Biol*, série B, *Symposium de Milan* (1948), p. 26.
246. —, Kuhn (R.), Schartau (O.) et Wallenfels (K.). — Ueber die Wechselwirkung von Gyno- und Androgamonen bei der Befruchtung der Eier des Seeigels. *Naturwiss.*, (1940), **28**, 144.

247. —, Medem (Graf F. von), Kuhn (R.) et Bielig (H. J.). — Ueber die Gynogamone der Regenbogenforelle. *Naturwiss.* (1947), **35**, 25-26.
248. —, Schartau (O.), Kuhn (R.) et Wallenfels (K.). — Ueber die Sexualstoffe der Seeigel. *Naturwiss.* (1939), **27**, 433.
249. — et Schartau (O.). — Untersuchungen über die Befruchtungsstoffe der Seeigel. I. *Ber. über wiss. Biol.* (1940), **54**, 61. Résumé *in Biol. Zbl.* (1939), **59**, 571.
250. —, Schartau (O.) et Wallenfels (K.). — Untersuchungen über die Befruchtungsstoffe der Seeigel. II. Gyno- und Androgamone des Seeigels *Arbacia pustulosa*. *Biol. Zbl.* (1940), **60**, 398.
251. Hartog (M.). — The true nature of the « madreporic systems » of *Echinodermata*, with remarks on Nephridia. *Ann. and Magaz. Nat. Hist.*, 4 novembre 1887, p. 321.
252. Harvey (E. B.). — The effect of lack of oxygen on sea urchin eggs. *Biol. Bull.* (1927), **52**, n° 3, 147.
253. — The effect of lack of oxygen on the sperm and unfertilized eggs of *Arbacia punctulata* and on fertilization. *Biol. Bull.* (1930), **58**, 288.
254. — Electrical method of determining the sex of sea urchin. *Nature* (1954), **173**, 86.
255. Hayashi (T.). — Dilution medium and survival of the spermatozoa of *Arbacia punctulata*. I. Effect of the medium on fertilizing power. *Biol. Bull.* (1945), **89**, 162.
256. — Dilution medium and survival of the spermatozoa of *Arbacia punctulata*. II. Effect of the medium on the respiration. *Biol. Bull.* (1946), **90**, 177.
257. Heilbrunn (L. V.). — Studies in artificial parthenogenesis. V. The anormalous action of mercuric chloride. *Biol. Bull.* (1925), **44**, 261.
258. —, Chaet (A. B.), Dunn (A.) et Wilson (W. L.). — A further study of the mitotic inhibition in starfish extracts. *Biol. Bull.* (1952), **103**, n° 2, 303.
259. — et Wilson (W. L.). — The effect of heparin in cell division. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1949), **70**, 179.
260. — Cell division in relation to protoplasmic clotting. *Biol. Bull.* (1949, **97**, 242.
261. — Effect of bacterial polysaccharide on cell division. *Science* (1950), **112**, 56.
262. —, Wilson (W. L.) et Harding (D.). — The effect of tissue extracts on cell division. *Biol. Bull.* (1950), **99**, n° 2, 340.
263. — The action of tissue extracts on cell division. *J. Nat. Cancer Inst.* (1951), **11**, 1287.
264. —, Wilson (W. L.) et Lippman (M.). — Antimitotic substances present in ovaries. *Biol. Bull.* (1953), **105**, 375.
265. Heim (R.). — La reproduction chez les Plantes. Paris, 1939, A. Colin, 222 pages.
266. Henri (V.). — Observations sur les contractions du siphon intestinal des Oursins. *C. R. Soc. Biol.* (1903), **55**, 1246.
267. — Études de Physiologie comparée. IV. Étude des ferments digestifs de quelques Invertébrés. *C. R. Soc. Biol.* (1903), **55**, 1317.
268. — Étude des ferments digestifs de quelques Invertébrés. *C. R. Acad. Sc.* (1903), **137**, 763.
269. — et Lalou (S.). — Régulation osmotique du liquide interne chez les Oursins. *C. R. Soc. Biol.* (1904), **55**, 1242.
270. Herlant (M.). — Recherches sur l'antagonisme de deux spermes provenant d'espèces éloignées. *Anat. Anz.* (1912), **42**, 563.
271. Hertwig (G.) et Hertwig (T.). — Beeinflussung der männlichen Keimzellen durch chemische Stoffe. *Arch. f. mikr. Anat.* (1913), **83**, 4, p. 267.
272. — Experimentelle Untersuchungen über die Bedingungen der Bastardbefruchtung. *Jenaische Ztschr. f. Naturwiss.* (1886), **19**, 121.
273. Hibbard (H.). — Contribution à l'étude de l'ovogenèse, de la fécondation et de l'histogenèse chez *Discoglossus pictus* Otth. *Arch. de Biol.* (1928), **38**, 249.
274. Hopkins (F. G.) et Morgan (E. J.). — The influence of thiol-groups in the activity of dehydrogenase. *Biochem. J.* (1938), **32**, 611.
275. —, Morgan (E. J.) et Lutwak-Mann (C.). — The influence of thiol groups

in the activity of dehydrogenase. II with an addendum on the location of dehydrogenase in muscle. *Biochem. J.* (1938), **32**, 1829.

276. Hultin (E.) et Lundblad (G.). — Degradation of starch, hydroxiethyl cellulose ether and chitosan by enzymes in spermatozoa and sperm fluid from *Psammechinus* and *Modiola*. *Exp. Cell Res.* (1952), **3**, n° 2, 427.

277. Hultin (T.). — On the question of sperm-antifertilizin. *Publ. Staz. Zool. Napoli.* (1947), **21**, fasc. 11, 153.

278. — Some physiological effects of basic sperm proteins. *Arkiv f. Kemi* (1947), **24** B, n° 12.

279. — Species specificity in fertilization reaction. I. The role of the vitelline membrane of sea-urchin eggs in species specificity. *Arkiv f. Zool.* (1948, **40** A, n° 12.

280. — Species specificity in fertilization. II. Influence of certain factors on the cross-fertilization capacity of *Arbacia lixula* (L.). *Arkiv f. Zool.* (1948), **40** A, n° 20.

281. — Agglutination of sea urchin eggs by nucleoproteins. *Arkiv f. Kemi* (1949), **1**, n° 49.

282. Humphrey (G. F.). — The metabolism of Oyster spermatozoa. *Aust. J. Exp. Biol. and Med. Sc.* (1950), **28**, 1.

283. Huxley (J. S.). — The maladaptations of trout spermatozoa to fresh water. *Nature* (1930), **126**, 494.

284. Immers (J.). — On the heparin-like effect of fertilizin from sea urchin eggs on blood coagulation and the modifying action of basic proteins and cephalin on the effect. *Arkiv f. Kemi* (1949), **42** A, n° 6.

285. Ivanov (I. I.), Kassavina (B. S.) et Fomenko (L. D.). — Adenosine triphosphate in mammalian spermatozoa. *Nature* (1946), **158**, 624.

286. Iwata (S.). — A method of determining the sex of sea-urchins and of obtaining eggs by electric stimulation. *Annot. Zool. Japon.* (1950), **23**, 39.

287. Jacoby (M.). — Ueber das Verhalten der sperma- und Eierenzyma bei der Befruchtung und ersten Entwicklung. *Biochem. Ztschr.* (1910), **26** 336.

288. Jahn (U.). — Induktion verschiedener Polyploidiegrade bei *Rana temporaria* mit Hilfe von Kolchizin und Sulfanilamid. *Ztschr. f. mikr. anat. Forschung.* (1952), **58**, n° 1, 37.

289. Jahn (T. L.). — Studies on the physiology of the euglenoid flagellate. I. The relations of the density of population to the growth rate of *Euglena*. *Biol. Bull.* (1929), **57**, 81.

290. James (S. P.). — An examination of frog jelly. *Biochem. J.* (1951), **49**, n° 4, 54.

291. Janet (Ch.) et Cuénot (L.). — Note sur les orifices génitaux multiples, sur l'extension des pores madréporiques hors du madréporite et sur la terminologie de l'appareil apical chez les Oursins. *Bull. Soc. géol. France* (1891), **19**, 3e série, 295.

292. Jaques (L. B.). — The reaction of heparin with protein and complex bases. *Bioch. J.* (1943), **37**, 187.

293. Jennings (H. S.). — Behaviour of the lower organisms. Columbia Univ. Press. (1906), n° 10.

294. Jensen (A. B.). — Activation of unfertilized sea-urchin eggs by trypsin. *Nature* (1948), **162**, 931.

295. — Some observations on the action of trypsin on sea urchin. *Exp. Cell Res.* (1953), **5**, 60.

296. Joly (M.) et Rybak (B.). — Biréfringence d'écoulement de complexes protéiques. Données préliminaires. *C. R. Acad. Sc.* (1950), **230**, 1214.

297. — et Rybak (B.). — Recherches sur la constitution du fuseau achromatique. II. Études rhéologiques de quelques modèles protéiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1950), **32**, n°s 11-12, 894.

298. Jones (R. F.) et Baker (H. G.). — Formation of aggregations of *Glaucoma pyriformis* Kahl by means of phenanthraquinone and other substances. *Nature* (1936), **157**, 554.

299. Joyet-Lavergne (P.). — La physico-chimie de la sexualité. *Protoplasma-Monographien* (1931), 457 pages.
300. — Sur le rôle du cytoplasme du gamète mâle dans le phénomène de la fécondation. *C. R. Acad. Sc.* (1936), **202**, 1707.
301. Just (E.). — The morphology of the normal fertilization in *Platynereis megalops*. *J. of Morph.* (1915), **26**, 217.
302. — Initiation of development in *Nereis*. *Biol. Bull.* (1915), **28**, 1.
303. — An experimental analysis of fertilization in *Platynereis megalops*. *Biol. Bull.* (1915), **28**, 93.
304. — The fertilization reaction in *Echinarachnius parma*. II. The role of fertilizin in straight and cross fertilization. *Biol. Bull.* (1919), **36**, 12.
305. — Initiation of development in the eggs of *Arbacia*. I. Effect of hypertonic sea water in producing membrane separating cleavage and top-swimming plutei. *Biol. Bull.* (1922), **43**, 384.
306. — Initiation of development in the egg of *Arbacia*. III. The effect of *Arbacia* blood on the fertilization reaction. *Biol. Bull.* (1922), **43**, 411.
307. — The fertilization reaction in *Echinarachnius parma*. VII. The inhibitory action of blood. *Biol. Bull.* (1923), **44**, 10.
308. — Initiation of development in *Arbacia*. VI. The effect of sea-water precipitates with special reference to the nature of lipolysin. *Biol. Bull.* (1929), **57**, 422.
309. — The fertilization reaction in eggs of *Paracentrotus* and *Echinus*. *Biol. Bull.* (1929), **57**, 326.
310. Kato (K.). — Experimental studies on the agglutinability of mammalian spermatozoa with special reference to its bearing upon fertilization. *Mem. Fac. Sc. Agr. Taihoku Imp. Univ.* (1936), **13**, 1.
311. Kazal (A.), Spicer (D. S.) et Grahinsky (R. A.). — Anticoagulant polysaccharides sulfats. *Fed. Proc.* (1950), **9**, 188.
312. Keltch (A. K.), Strittmatter (C. F.), Walters (C. P.) et Clowes (G. H. A.). — Oxidation phosphorylation by a cell-free particulate enzyme system from unfertilized *Arbacia eggs*. *Biol. Bull.* (1949), **97**, 242.
313. — Oxidative phosphorylation by a cell-free particulate system from unfertilized *Arbacia* eggs. *J. Gen. Physiol.* (1950), **33**, 547.
314. Kihlström (J. E.). — On the movements of isolated sperm heads in bull semen. *Arkiv f. Zool.* (1952), **4**, n° 5, 141.
315. Kindred (J. E.). — Phagocytes and clotting with perivisceral fluid of *Arbacia*. *Biol. Bull.* (1921), **41**, 144.
316. Knudsen (M.). — Hydrographical tables. Copenhague, 1901.
317. Köhler (R.). — Anomalies, irrégularités et déformations du test chez les Échinides. *Ann. Inst. Océan.* (1924-1925), **1-2**, 159.
318. — Les Échinodermes des mers d'Europe. Paris, 1927, 2 vol. Doin, éd.
319. Kölliker (A.). — Physiologische Studien über die Samenflüssigkeit. *Ztschr. f. wiss. Zool.* (1856), **7**, 201.
320. Koltzoff (N.). — Ueber das Skelett des tierischen Spermiums. *Biol. Zbl.* (1903), **26**.
321. — Studien über die Gestalt der Zelle. II. Untersuchungen über das Kopfskelett des tierischen Spermiums. *Arch. f. Zellforsch.* (1909), **2**, 1.
322. Kopac (M. J.). — Physical properties of protoplasma. *Ann. Rev. Physiol.* (1950), **12**, 7.
323. Krauss (M.). — A mucin clot reaction with sea-urchin fertilizin. *Biol. Bull.* (1949), **96**, n° 1, 74.
324. — Lytic agents of the sperm of some marine animals. I. The egg membrane lysin from sperm of the giant keyhole limpet *Megathura crenulata*. *J. Exp. Zool.* (1950), **114**, 239.
325. — Lytic agents of the sperm of some marine animals. II. Extraction of a hetero-egg membrane lysin from sea-urchin sperm. *J. Exp. Zool.* (1950), **114**, n° 2, 279.
326. Krijgsman (B. J.). — Beiträge zum Problem der Geisselbewegung. *Arch. f. Protist.* (1925), **52**, 478.
327. Kuhn (R.) et Wallenfels (K.). — Ueber die chemische Natur des Stoffes, den

die Eier des Seeigels (*Arbacia pustulosa*) absondern, um die Spermatozoen anzulocken. *Ber. d. deutschen chem. Ges.* (1939), **72** B, 1407.
328. — Echinochrome als prosthetische Gruppen hochmolekularer Symplexe in den Eiern von *Arbacia pustulosa*. *B. d. deutschen chem. Ges.* (1940), **73**, 458.
329. — Ueber die Stachelfarbstoffe von *Arbacia*. *Ber. d. deutschen chem. Ges.* (1941), **74**, 1954.
330. — Dehydro-echinochrom. *Ber. d. deutschen chem. Ges.* (1942), **75**, 407.
331. Kusano (S.). — Studies on the chemotactic and other related reactions of the swarm spores of Myxomycetes. *Tokyo Imp. Univ. Agr. Res.* (1909), **2**, 1.
332. Labbé (A.). — Le rôle de l'alcalinité de l'eau de mer dans les fécondations hétérogènes. *C. R. Acad. Sc.* (1922), **174**, 1199.
333. — L'activation du spermatozoïde dans les fécondations hétérogènes. *C. R. Acad. Sc.* (1922), **174**, 1297.
334. — Introduction à l'étude des milieux marins hyperalcalins. *Arch. Zool. exp. et gén.* (1924), **62**, 401.
335. Lamotte (M.). — Introduction à la biologie quantitative. Paris, 1948, Masson, 369 pages.
336. Lebrun-Pagès (J.) et Robineaux (R.). — Nouvelles recherches sur le tactisme leucocytaire. Tactisme et oxydations cellulaires. *Ann. Inst. Pasteur* (1950), **79**, 416.
337. Leberer (E.). — Les pigments des Invertébrés (à l'exception des pigments respiratoires). *Biol. Rev.* (1940), **15**, 273.
338. Léger (L.). — La reproduction sexuée chez les *Stylorinchus*. *Arch. f. Protist.* (1904), **3**, 303.
339. — et Duboscq (O.). — *Stenococcidium intermedium* Lég. et Dub. et la systématique des Sporozoaires. *Arch. Zool. exp.* (1910), **5**, 187.
340. Lévy (R.). — Relations entre l'arachniolysine et les organes génitaux femelles des Araignées (Épeirides). *C. R. Acad. Sc.* (1912), **154**, 77.
341. Lewin (R. A.). — Studies on the flagella of algae. I. General observations on *Chlamydomonas mœwusii* Gerloff. *Biol. Bull.* (1952), n° 1, 74.
342. Lichtenstein (S.). — Agglutination bei Algen Hefen und Flagellaten. Zur Frage des Mechanismus der Zellreaktion. *Sitz. Ber. Akad. Wiss. Berlin. Physik.* (1922), p. 127.
343. Lillie (F. R.). — The production of sperm iso-agglutination by ova. *Science*, N. S. (1912), **36**, 527.
344. — The mechanism of fertilization. *Science*, N. S. (1913), **38**, n° 980, 524.
345. — Studies of fertilization. V. The behavior of the spermatozoa of Nereis and *Arbacia* with special reference to egg-extract. *J. Exp. Zool.* (1913), **14**, 515.
346. — Studies of fertilization. VI. The mechanism of fertilization in *Arbacia*. *J. Exp. Zool.* (1914), **16**, n° 4, 523.
347. — The fertilizing power of sperm dilutions of *Arbacia*. *Proc. Nat. Acad. Sc.* (1915), **1**, 156.
348. — Studies on fertilization. VII. Analysis of variations in the fertilizing power of sperm suspension of *Arbacia*. *Biol. Bull.* (1915), **28**, 229.
349. — History of the fertilization problem. *Science* (1916), **43**.
350. — Problems of fertilization. Chicago, 1919.
351. — Studies on fertilization. VIII. On the measure of specificity in fertilization between two associated species of the sea-urchin genus *Strongylocentrotus*. *Biol. Bull.* (1921), **40**, 1.
352. — Studies of fertilization. IX. On the question of superposition of fertilization on parthenogenesis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biol. Bull.* (1921), **40**, 23.
353. — Studies of fertilization. X. The effects of copper salts on the fertilization reactions in *Arbacia* and a comparison of mercury effects. *Biol. Bull.* (1921), **41**, 125.
354. — et Just (E. E.). — Fertilization in General cytology (E. V. Cowdry). Univ. Chicago Press (1924), p. 451.
355. — et Hinrichs (M.). — Activation of starfish and sea-urchin eggs by photodynamic action. *Anat. Rec.* (1923), **26**, 370.

356. — et Just (E. E.). — Breeding habits of the *Heteronereis* form of *Nereis limbata* at Woods Hole, Mass. *Biol. Bull.* (1913), **24**, n° 3, 147.
357. Lindegreen (C. C.). — Genetics of the fungi. *Ann. Rev. Micr.* (1948), **2**, 47.
358. Lindhal (P. E.) et Kihlström (J. P.). — On ripening and agglutination in Bull spermatozoa. *IIId Int. Cong. Physiol. Path. Anim. Repr. Art. Insem.*, p. 70.
359. — Alterations in specific gravity during the ripening of bull spermatozoa. *J. of Dairy Sc.* (1952), **35**, n° 5, 393.
360. —, Kilström (J. E.) et Ström (B.). — On the relationship between fertility and lightreflecting power in bull spermatozoa. *J. Agr. Sc.* (1951), **42**, 184.
361. — On changes in the lipoid surface layer of the ripening bull spermatozoa. *Arkiv f. Zool.* (1952), **3**, n° 2, 137.
362. — Further studies on light reflection in bull spermatozoa. *Arkiv. f. Zool.* (1952), série 2, **4**, n° 14, 303.
363. Lindquist (W.). — Cell surface constituants and yeast flocculation. *Nature* (1952), **170**, 544.
364. Lindvall (S.) et Carsjö (A.). — On protein fractions in sea urchin eggs and their changes upon fertilization. *Arkiv f. Kemi* (1950), **2**, n° 13, 293.
365. Lipschitz (W.) et Hertwig (G.). — Erhaltung der Funktionen aerober Zellen bei Ersatz des freien Sauerstoffs durch chemischgebundenen « Pseudo-anoxybiose ». Versuche an Spermatozoen. *Pflügers Arch.* (1921), **191**, 51.
366. Lison (L.). — Études sur la métachromasie. Colorants métachromatiques et substances chromotropes. *Arch. de Biol.* (1935), **46**, 599.
367. Lo Bianco (S.). — Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturita normale degli animali del Golfo di Napoli. *Mitt. Zool. Stat. Neapel.* (1888), **8**, 440.
368. — Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturita normale degli animali del Golfo di Napoli. *Mitt. Zool. Stat. Neapel.* (1899), **13**, 448.
369. — Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturita normale degli animali dea Golfo di Napoli. *Mitt. Zool. Stat. Neapel.* (1909), **19**, 513.
370. Loeb (J.). — La fécondation chimique (Parthénogenèse artificielle). Paris, 1911, Mercure de France (trad. A. Drzewina).
371. — Cluster-formation of spermatozoa caused by specific substances from eggs. *J. Exp. Zool.* (1914), **17**, 123.
372. — On the nature of the conditions which determine or prevent the entrance of the spermatozoa into the egg. *Am. Nat.* (1915), **49**, 257.
373. — Fécondation et phagocytose. *Ann. Inst. Pasteur* (1917), **31**, 437.
374. — Forced movements, tropisms and animal conduct. J. B. Lippincott, New York, 1918.
375. — et Wasteneys (H.). — Warum hemmt Natriumcyanid die Giftwirkung einer Chlornatriumlösung für das Seeigelei. *Bioch. Ztschr.* (1910), **28**, 340.
376. Loefer (J. B.) et Mefferd (R. B. Jr.). — Concurring pattern formation by freeswimming microorganisms. *Am. Nat.* (1952), **86**, 325.
377. Loew (O.). — Die Chemotaxis der Spermatozoa im weiblichen Genitaltract. *Sitzber. Kön. Akad. Wiss. Math. Natw. Kl. Wien.* (1902), **111** et (1903), **112**.
378. Loiseleur (J.). — Techniques de Laboratoire. Paris, 1947.
379. Loven (S.). — On the species of Echinoidea described by Linneeus in his work. *K. Svenska vet. Akad. Hand.*, Stockholm (1887), **13**, IV, n° 5, 185 pages.
380. Lowndes (A. G.). — The twin polygraph and strobograph. *Nature* (1935), **135**, 1006.
381. — Flagella movement. *Nature* (1936), **138**, 210.
382. — On flagella movement in unicellular organisms. *Proc. Zool. Soc. London*, sér. A. (1941), **111**, 111.
383. Lubet (P.). — Sur l'émission des gamètes chez *Chlamys varia* L. (Moll. Lamellibr.). *C. R. Acad. Sc.* (1951), **233**, 1680.
384. — Quelques remarques sur le sexe des Pectinacés (Moll. Lamellibr.). *C. R. Acad. Sc.* (1953), **236**, 129.
385. — Sur les modalités de l'éjaculation et de la ponte chez *Chlamys varia* L. (Moll. Lamellibr.). *C. R. Acad. Sc.* (1953), **236**, 235.

386. Lundblad (G.). — Proteolytic activity in eggs and sperms from sea-urchin. *Nature* (1949), **163**, 643.
387. — Proteolytic activity in sea urchin gametes. I. Activity in untreated extracts. *Exp. Cell Res.* (1950), **1**, n° 2, 264.
388. — et Monroy (A.). — Mucopolysaccharase activity of sea urchin sperms. *Arkiv f. Kemi* (1950), **2**, n° 19, 343.
389. — et Hultin (E.). — Amylase in bull spermatozoa. *Exp. Cell Res.* (1952), **3**, n° 2, 506.
390. Lundquist (F.). — Aspects of biochemistry of human semen. *Acta Physiol. Scand.* (1949), **19**, suppl. 66, 108 pages.
391. — Studies on the Biochemistry of human semen. IV. Amino acids and proteolytic enzymes. *Acta Physiol. Scand.* (1952), **25**, fasc. 2-3, 178.
392. Lwoff (A.). — L'évolution physiologique. Étude des pertes de fonctions chez les microorganismes. Paris (1943), Hermann, éd., 308 pages.
393. Lyman (J.) et Fleming (R. H.). — Composition of sea-water. *J. Mar. Res.* (1940), **3**, 134.
394. McCutcheon (M.). — Chemotaxis in leukocytes. *Physiol. Rev.* (1946), **26**, n° 3, 319.
395. McLeod (J.). — Sulfhydryl groups in relation to the metabolism and motility of human spermatozoa. *J. Gen. Physiol.* (1951), **34**, 705.
396. Marza (V. D.). — Histochimie du spermatozoïde. *C. R. Soc. Biol.* (1930), **104**, 514.
397. — Structure et histochimie du spermatozoïde. *Bull. Hist. appl.* (1931), **8**, 85.
398. Massart (J.). — Sur l'irritabilité des spermatozoïdes de la Grenouille. *Bull. Ac. Roy. Sc. Belgique* (1888), **15**, 3e série, n° 5, 750.
399. — Sur la pénétration des spermatozoïdes dans l'œuf de la Grenouille. *Bull. Ac. Roy. Sc. Belgique* (1889), **18**, 3e série, n° 8, 215.
400. Medem (F. von). — Beiträge zur Frage der Befruchtungsstoffe bei marinen Mollusken. *Biol. Zbl.* (1942), **62**, 431.
401. Meltzer (M.). — Some observations on the effects of agitation upon *Arbacia* eggs. *Am. J. Physiol.* (1903), **9**, 25.
402. Menkin (V.) et Pirovane (L. A.). — The effect of necrosin on the cleavage for fertilized sea urchin ova. *Biol. Bull.* (1949), **97**, 244.
403. Merthon (H.). — Lebensuntersuchungen an den Zwitterdrüsen der Lungeschnecken. Ein Beitrag zur Protoplasma- und Spermienbewegung. *Ztschr. f. Zellen- u. Gewebelehre* (1924), **1**, 671.
404. — Die Bewegungen der Samenzellen und ihr kinetisches Zentrum. *Ztschr. f. Zellforschung* (1927), **5**, 629.
405. Metz (C. B.). — The inactivation of fertilizin and its conversion to the « univalent » form by X-rays and ultraviolet light. *Biol. Bull.* (1942), **82**, n° 3, 446.
406. — The agglutination of starfish sperm by fertilizin. *Biol. Bull.* (1945), **89**, 94.
407. — Agglutination of sea-urchin eggs and sperm by basic proteins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1949), **70**, 422.
408. — et Butterfield (W.). — Action of various enzymes on the mating type substances of *Paramecium calkensi*. *Biol. Bull.* (1951), **101**, 99.
409. — et Donovan (J. E.). — Fertilizin from the eggs of the clam, *Mactra solidissima*. *Biol. Bull.* (1949), **97**, 257.
410. — Adjuvant action of amino-acids and peptides in fertilizin agglutination of starfish sperm. *Science* (1950), **112**, n° 2921, 755.
411. — Specific fertilizin agglutination of dead sperm. *Biol. Bull.* (1951), **101**, 202.
412. Meyer (H.). — Untersuchungen über einige Flagellaten. *Rev. Suisse Zool.* (1897), **5**, 43.
413. Meyer (J. de). — Observations et expériences relatives à l'action exercée par des extraits d'œufs et d'autres substances sur les spermatozoïdes. *Arch. de Biol.* (1911), **26**, 65.
414. Meyer (K.), Ragan (C.) et Weinshelbaum (H.). — Inhibition of hyaluronidase by hydroquinones and quinones. *Fed. Proc.* (1948), **7**, n° 1, 173.
415. Meyerhof (O.). — Die Atmung der Seeigeleier (*Strongylocentrotus lividus*) in reinen Chlornatriumlösungen. *Bioch. Ztschr.* (1911), **33**, 291.

416. — et RANDALL (L. O.). — The inhibitory effects of adrenochrome on cell metabolism. *Arch. Biochem. U. S. A.* (1948), **17**, 171.
417. MILLOT (M.) et JACOBSON (F. W.). — Phenolases in the Echinoid, *Diadema antillorum* Philippi. *Nature* (1951), **168**, 878.
418. MINGANTI (A.). — Esperienze sulle fertilizine nelle Ascidie. *Pubb. Staz. Zool. Napoli* (1951), **23**, 58.
419. MIRSKY (A. E.). — Protein coagulation as a result of fertilization. *Science* (1936), **84**, 333.
420. MIURA (Y.). — Effect of some antibiotics on the cleavage of *Arbacia* eggs. *Biol. Bull.* (1953), **105**, n° 2, 378.
421. MOMENT (G. B.) — A theory of growth limitation. *Am. Nat.* (1953), **87**, n° 834, 139.
422. MONNÉ (L.). — The action of narcotics and of hydrating and dehydrating agents on the structure of the cytoplasm. *Arkiv f. Zool.* (1947), **39** A, n° 7.
423. — Structural changes of the cell resulting from clotting and liquefaction. *Arkiv f. Zool.* (1949), **1**, n° 9, 101.
424. — et HARDE (S.). — On the cortical granules of the sea urchin egg. *Arkiv f. Zool.* (1951), n° 31, 487.
425. MONOD (J.). — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Paris, 1942, Hermann, 210 pages.
426. MONROY (A.). — A preliminary electrophoretic analysis of proteins and proteins fractions in sea-urchin eggs and their changes on fertilization. *Exp. Cell Res.* (1950), **1**, n° 1, 92.
427. — et RUFFO (A.). — Hyaluronidase in sea-urchin sperm. *Nature* (1947), 159-603.
428. — et RUNNSTRÖM (J.). — Further studies on the action of a cytoplasmic component on jelly coat and membrane formation in *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* (1950), **99**, 339.
429. — A cytoplasmic fraction acting on the surface layers of the *Arbacia punctulata* eggs. *Exp. Cell Res.* (1952), **3**, n° 1, 10.
430. — et TOSI (L.). — A note on the jelly-coat-sperm interaction in sea urchin. *Experientia* (1952), **8**, 393.
431. MONTALENTI (G.). — Ulteriori osservazioni sui gamoni della Lampreda (*Lampetra fluviatilis*). *Pubb. Staz. Zool. Napoli* (1949), **22**, 6.
432. — et SCHARTAU (O.). — Ricerche sulle reazioni della fecondazione, e sulla presenza dei gamoni nella Lampreda (*Lampetra fluviatilis* L.). *Pubb. Staz. Zool. Napoli* (1941), **19**, 48.
433. MOORE (A. R.). — The function of the fertilization membrane in the development of the larva of the sea urchin. *Science* (1929), **70**, 360.
434. — Fertilization and developing without membrane formation in the egg of the sea-urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Protoplasma* (1930), **9**, 9.
435. MORGAN (T. H.). — Experimental zoology. New York, 1907. Mac Millan, éd., 454 pages, Chap. XI.
436. — Self-fertility in *Ciona* in relation to cross-fertility. *J. Exp. Zool.* (1924), **40**, 301.
437. — Dilution of sperm suspension in relation to cross-fertilization in *Ciona*. *J. Exp. Zool.* (1924), **40**, 307.
438. — Embryologie et Génétique. Paris, 1936, Gallimard, éd., p. 170. Trad. J. ROSTAND.
439. — The genetic and the physiological problems of self-sterility in *Ciona*. IV. Some biological aspects of fertilization. *J. Exp. Zool.* (1939), **80**, 55.
440. MORTENSEN (Th.). — Die Echiniden des Mittelmeeres. *Mitt. Zool. Staz. Neapel.* (1913), **21**, 1.
441. — Development and larval forms of Echinoderms. Copenhague (1921), Carlsberg fund.
442. MOSS (F.). — The influence of oxygen tension on respiration and cytochrome a_2 formation of « *Escherichia coli* ». *Austr. J. exp. Biol. and Sc.* (1952), **30**, 531.
443. MOURSON (J.) et SCHLAGDENHAUFFEN (F.). — Nouvelles recherches chimiques et physiologiques sur quelques liquides organiques. Eau des Oursins, eau des

kystes hydatiques et des cysticerques, liquide amniotique. *C. R. Ac. Sc.* (1882), **95**, 791.

444. Mutsaars (W.) et Lison (L.). — Recherches concernant l'alexine. III. Action des esters sulfuriques polysacharidiques. Effet antagoniste des colorants basiques. *Ann. Inst. Pasteur* (1948), **74**, 40.

445. Navez (A. E.). — Fatty acid compounds in the unfertilized eggs of *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* (1939), **77**, 323.

446. Neave (S. A.). — Nomenclator Zoologicus. Londres, 1939.

447. Nelson (L.). — Sulfhydryl inhibitions and a seminal fluid factor in sperm respiration. *Biol. Bull.* (1949), **97**, n° 2, 259.

448. Nettleton (R. M. Jr.), Meffert (R. B. Jr.) et Loeffer (J. B.). — Pattern formation in concentrated particulate suspensions. *Am. Nat.* (1953), **87**, 117.

449. Newton (B. A.). — Reversal of the antibacterial activity of polymyxin B by non-toxic divalent cations. *Biochem. J.* (1953), **55**, n° 1, 10.

450. Nomura (S.). — On the agglutinating substance of the egg of the starfish, *Artemia pectinifera*. *Rep. Tohoku Imp. Univ.* (Biol.) (1924), **1**, 83.

451. Osterhout (W. J. V.). — Relative solubility of the components of the *Nereis* egg. *Biol. Bull.* (1950), **99**, n° 2, 362.

452. — Behavior of jelly in eggs of *Nereis limbata*. *Biol. Bull.* (1951), **101**, 226.

453. — Detergent action of sperm extract in *Nereis limbata*. *Biol. Bull.* (1951), **101**, 226.

454. — Activation of eggs of *Nereis limbata* by a surface active extract of dead sperm. *Biol. Bull.* (1952), **103**, 305.

455. Oxford (A. E.). — A colorimetric method, based on metallic complex formation, for the detection of aureomycin in presence of amino-acids and proteins. *Nature* (1953), 395.

456. Packard (C.). — The effect of radium radiations on the fertilization of *Nereis*. *J. Exp. Zool.* (1914), **16**, 85.

457. Page (I. H.). — The oils of the sea-urchin and star fish eggs. *Biol. Bull.* (1927), **52**, 164.

458. Parat (M.). — Nomenclature, genèse, structure et fonction de quelques éléments cytoplasmiques des cellules sexuelles mâles. *C. R. Soc. Biol.* (1933), **112**, 1131.

459. — L'acrosome du spermatozoïde dans la fécondation et la parthénogenèse expérimentale. *C. R. Soc. Biol.* (1933), **112**, 1134.

460. Paspaleff (G.). — Ueber Protoplasmareifung bei Seeigeleiern. *Pubb. Staz. Zool. Napoli* (1927), **8**, 1.

461. Pequegnat (W. E.). — Inhibition of fertilization in Arbacia by blood extracts. *Biol. Bull.* (1948), **95**, 69.

462. Perrier (E.). — Recherches sur l'appareil circulatoire des Oursins. *Arch. Zool. exp.* (1875), **4**, 605.

463. — Les colonies animales, 1898, 2e édition.

464. Pfeffer (W.). — Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. *Unters. Bot. Inst. Tübingen* (1884), **1**, 363.

465. — Ueber chemotaktische Bewegungen von Bacterien, Flagellaten und Volvocineen. *Unters. Bot. Inst. Tübingen* (1888), **2**, 582.

466. Philippi (E.). — Fortpflanzungsgeschichte der viviparen Teleostier *Glaridichtys januarius* und *Glaridichtys decem-maculatus*. *Zool. Jahrb.* (1909), **27** 1.

467. Pictet (C.). — Recherches sur la spermatogenèse chez quelques Invertébrés de la Méditerranée. *Mitt. Zool. Staz. Neapel.* (1891) **10**, 92.

468. Pierce (A. E.). — Demonstration of an agglutination to *Trichomonas fœtus* in vaginal mucus. *Nature* (1946), **158**, n° 4010, 343.

469. Polge (C.) et Rowson (L. E. A.). — Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79° C. *Nature* (1952), **169**, 626.

470. Popa (G. T.). — The distribution of substances in the spermatozoon (*Arbacia and Nereis*). *Biol. Bull.* (1927), **52**, 238.

471. — et Marza (V.). — Variations de la gaine lipoïdique des spermatozoïdes et quelques particularités structurales de ces cellules. *C. R. Soc. Biol.* (1929), **101**, 1186.

472. — Biologie des spermatozoïdes. *Arch. Roum. Pathol. Expér.* (1931), **4**, nos 3-4, 303.
473. Pratt (R.) et Dufrénoy (J.). — VI. The influence of cobalt on the optimal bacteriostatic concentration of penicillin. *J. Bact.* (1948), **55**, 727.
474. Prouho (H.). — Recherches sur le *Dorocidaris papillata* et quelques autres Échinides de la Méditerranée. *Arch. Zool. exp.* (1887), **5**, 2e série, 213.
475. Prowasek (S.). — Untersuchungen über einige parasitische Flagellaten. *Arb. K. Gesundheitsamt* (1904), **21**, 1.
476. Pruvot (G.). — Essai sur les fonds et la faune de la Manche occidentale (côtes de Bretagne) comparés à ceux du Golfe du Lion. *Arch. Zool. exp.* (1897), **5**, 511.
477. — Coup d'œil sur la distribution générale des Invertébrés dans la région de Banyuls (Golfe du Lion). *Arch. Zool. exp.* (1897), **5**, 629.
478. Przylecki (S. J.). — L'état des biocolloïdes dans la matière vivante (Conf.). *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1938).
479. — Protein symplexes. *Proc. Roy. Soc.* (1939), **127**, 26.
480. —, Giedroyc (W.) et Rafalowska (H.). — Sur l'état du glycogène à l'intérieur de la cellule. I. Sur un symplexe à 3 composantes de la clupéine, de l'acide nucléique, du glycogène ou de la dextrine. *Biochem. Ztschr.* (1935), **280**, 286 (Titre traduit).
481. Rabaud (E.). — Phénomène social et sociétés animales. Paris, 1937, Alcan, éd., 321 pages.
482. — L'instinct et le comportement animal. 2 vol., Paris, 1949, A. Colin, éd., 224 et 208 pages.
483. Retzius (G.). — Zur Kenntnis der Spermien der Echinodermen. *Biol. Unters.* (1910), **15**, 55.
484. Ries (E.). — Die Verteilung von Vitamin C, Glutathion, Benzidin, Peroxydase, Phenolase (Iodophenolblauoxydase) und Leukomethylenblau-oxydoreduktase während der frühen Embryonalentwicklung verschiedener wirbelloser Tiere. *Pubb. Staz. Zool. Napoli* (1937) **16**, 364.
485. — Kinematographie der Befruchtung und Zelltheilung. *Arch. f. mikr. Anat.* (1909), **74**, 1.
486. Robbins (W. J.). — Notes on the physiology of *Fucus* spermatozoids. *Biol. Bull.* (1916), **30**, n° 2, 125.
487. — Pattern formed by motile *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. *Bull. Tor. Bot. Club* (1952), **79**, 107.
488. Roche (J.). — Récentes acquisitions sur le rôle des métaux dans la structure et dans l'activité des enzymes à constituant métallique dissociable. Paris, 1946, Hermann.
489. — Nguyen-Van Thoai et Glahn (P. E.). — Sur la L. aminoacidoxydase de nombreux Invertébrés marins. *Experientia* (1952), **8**, 428.
490. Roggers (C. G.) et Cole (K. S.). — Heat production by the eggs of *Arbacia punctulata* during fertilization and early cleavage. *Biol. Bull.* (1924), **49**, n° 5, 338.
491. Rose (M.). — La question des tropismes. Paris, 1929, Presses Universitaires, 469 pages.
492. Rötheli (A.) et Roth (H.). — Elektronenoptische Untersuchungen an Salmonidenspermien. *Rev. Suisse Zool.* (1950), **57**, n° 15, 503.
493. — et Medem (F. von). — Elektronenoptische Untersuchungen der Strukturveränderungen agglutinierter Fischspermien. *Exp. Cell Res.* (1950), **1**, n° 1, 115.
494. Rothschild (Lord). — The physiology of *Echinus esculentus* spermatozoa. *J. exp. Biol.* (1948), **25**, n° 1, 15.
495. — The activity of ram spermatozoa. *J. exp. Biol.* (1947), **25**, 219.
496. — The physiology of sea-urchin spermatozoa. Lack of movement in semen. *J. exp. Biol.* (1948), **25**, 344.
497. — The physiology of sea-urchin spermatozoa. Senescence and the dilution effect. *J. exp. Biol.* (1948), **25**, 353.
498. — Measurement of sperm activity before artificial insemination. *Nature* (1949), **163**, 358.

499. — Electrical measurement of bull sperm activity. The effect of small electric currents on fertilizing capacity. *J. agr. Sc.* (1949), **39**, 294.
500. — Counting spermatozoa. *J. exp. Biol.* (1950), **26**, 388.
501. — The physiology of sea-urchin spermatozoa. Catalase. *J. exp. Biol.* (1950), **26**, 396.
502. — The respiration of sea-urchin spermatozoa. *J. exp. Biol.* (1950), **27**, nos 3 et 4, 420.
503. — Sea-urchin spermatozoa. *Biol. Rev.* (1951), **26**, n° 1, 1-25.
504. — The behavior of spermatozoa in the neighborhood of eggs. *Int. Rev. Cytol. U. S. A.* (1952), **1**, 257.
505. — The fertilization reaction in the sea-urchin. The induction of polyspermy by nicotine. *J. exp. Biol.* (1952), **30**, 57.
506. — A new method of measuring the activity of spermatozoa. *J. exp. Biol.* (1955), **30**, 178.
507. — A new method of measuring sperm speed. *Nature* (1953), **171**, 512.
508. — et Cleland (K. W.). — The physiology of sea-urchin spermatozoa. The nature and location of the endogenous substrate. *J. exp. Biol.* (1952), **29**, 66.
509. — et Mann (T.). — Carbohydrate and adenosine-triphosphate in sea-urchin semen. *Nature* (1950), **166**, 781.
510. — et Swann (M. M.). — The fertilization reaction in the sea-urchin egg. A propagated response to sperm attachment. *J. exp. Biol.* (1949), **26**, 164.
511. — The fertilization reaction in the sea-urchin. The probability of a successful sperm-egg collision. *J. exp. Biol.* (1951), **28**, 403.
512. — The fertilization reaction in the sea-urchin. The block to polyspermy. *J. exp. Biol.* (1952), **29**, 469.
513. — et Tuft (P. H.). — The physiology of sea-urchin spermatozoa. The dilution effect in relation to copper and zinc. *J. exp. Biol.* (1950), **27**, 59.
514. Rouch (J.). — Traité d'Océanographie physique. Paris, 1946, Payot, éd., 349 pages.
515. Runnström (J.). — Influence du cuivre sur le développement de l'œuf d'*Arbacia* et remarques sur le problème de l'activation du développement (titre traduit). *Protoplasma* (1939), **32**, 366.
516. — Zur Physiologie der Entwicklungserregung des Seeigeleies. *Scientia* (1942), **71**, 149.
517. — A survey of studies pertaining to the mechanism of activation in the sea-urchin egg. *Proc. 6th Int. Congress Cyt.* (1948), Stockholm.
518. — The mechanism of fertilization in metazoa. *Adv. Enzym.* (1949), **2**, 241.
519. — Some results and views concerning the mechanism of initiation of development in the sea urchin egg. *Pubb. Staz. Zool. Napoli* (1949), **21**, 9.
520. — Analysis of the modifying effect of dissolved jelly coat substance on the formation of the fertilization membrane in eggs of *Echinocardium cordatum*. *Exp. Cell Res.* (1950), **1**, n° 2, 304.
521. — et Krisza (C.). — On the influence of ATP on the fertilization and segmentation of the sea-urchin egg, *Strongylocentrotus lividus*. *Exp. Cell Res.* (1950), **1**, n° 3, 497.
522. — et Lindvall (S.). — The effect of some agents upon the reaction of *Echinocardium* spermatozoa towards egg-water. *Arkiv f. Zool.* (1946), **38** A, n° 10.
523. — et Tiselius (A.). — Gamones from the sperm of sea-urchin and salmon. *Nature* (1944), **153**, 285.
524. — Monné (L.) et Broman (L.). — On some properties of the surface layers in the sea-urchin egg and their changes upon activation. *Arkiv f. Zool.* (1943), **53** A, n° 3.
525. — et Wicklund (E.). — Studies on the surface layers and the formation of the fertilization membrane in sea-urchin eggs. *J. Colloid Sc.* (1946), **1**, n° **5**, 421.
526. — et Monroy (A.). — The effect of egg extract on the surface of sea-urchin eggs and spermatozoa. *Arkiv f. Kemi* (1950), **2**, n° 28, 405.
527. — Tiselius (A.) et Vasseur (E.). — Zur Kenntnis der Gamonwirkungen bei

Psammechinus miliaris und *Echinocardium cordatum*. *Arkiv f. Kem. Min. Geol.* (1942), **15** A, n° 16.
528. — et Lindvall (S.). — The action of androgamone III on the sea-urchin egg. *Arkiv f. Zool.* (1945), **36** A, n° 22.
529. — et Wicklund (E.). — Formation mechanism of the fertilization membrane in the sea-urchin egg. *Arkiv f. Zool.* (1950), **1**, n° 13.
530. Russo (G.). — Le cellule nutrici del testicolo degli Echini. *Bollett. Ac. Gioenia di Sci. nat.* (1907), **94**, 34.
531. — La secrezione nell'ovaria ed il significato del follicolo e della pellicida nell'uovo degli Echinidi. *Atti Acad. Gioenia di Sci. nat.* (1911), sér. 5, IV, X, 12 pages.
532. — Ricerche sulla costituzione chimica delle ghiandole genitali. I. Gli aminoacidi del testiculo di *Strongylocentrotus lividus* in diversi periodi del ciclo funzionale delle organo. *Archivio Sc. Biol.* (1926), **8**, 161.
533. — II. Gli aminoacidi dell ovario di *Strongylocentrotus lividus* in diversi periodi del ciclo funzionale dell organo. *Archivio Sc. biol.* (1926), **8**, 293.
534. Rybak (B.). — Extraction de la fertilisine. *C. R. Acad. Sc.* (1947), **225**, 701.
535. — L'immunité dans le crown-gall. *Ann. Inst. Pasteur* (1948), **75**, 351.
536. — La rectification de la fécondation et de la mitose. *C. R. Acad. Sc.* (1948), **226**, 1145.
537. — L'immunité dans le crown-gall. II. Précisions et mécanisme fondamental. *Ann. Inst. Pasteur* (1949), **77**, 688.
538. — Études sur les gamones. *Bull. Soc. Chim. biol.* (1949), **31**, 464.
539. — Agglutination spermatique de type fertilisine et agglutination spermatique de type gangue. *C. R. Acad. Sc.* (1949), **229**, 598.
540. — Sur la fertilisine d'*Arbacia pustulosa*. *C. R. Acad. Sc.* (1950), **231**, 482.
541. — Recherches sur la constitution du fuseau achromatique. I. Études chimiques de quelques modèles protéiques. *Bull. Soc. Chim. biol.* (1950), **32**, 703.
542. — Un dialyseur sous pression contrôlée. *C. R. Acad. Sc.* (1952), **235**, 617.
543. — Quelques aspects du problème des gamones. Lecture donnée le 12 février 1952 à l'Institut Wenner-Gren de Stockholm.
544. — L'immunité acquise dans le crown-gall. *Rev. Belge Path. Med. exp.* (1954); avec une préface du Professeur C. Arnaudi.
545. — et Bricka (M.). — Clichés électroniques de structures protéiques hétéropolaires provenant de sols dotés de biréfringence d'écoulement. *Experientia* (1952), **8**, n° 7, 265.
546. — et Gros (F.). — Quelques propriétés basiques de la streptomycine. *Experientia* (1948), **4**, n° 10, 396.
547. —, Gros (F.) et Grumbach (F.). — Remarques sur le mode d'action de la streptomycine. *Ann. Inst. Pasteur* (1949), **77**, 148.
548. —, Grumbach (F.) et Gros (F.). — Étude sur quelques inhibitions de l'action de la streptomycine. *Ann. Inst. Pasteur* (1949), **77**, 237.
549. — et Gustafson (T.). — Notes sur l'activité catalasique des gamètes d'Oursins. *Arkiv f. Zool.* (1952), **3**, n° 17, 189.
550. — et Gustafson (T.). — Fécondation artificielle de *Xenopus lævis* sans sacrifice du géniteur mâle. *Experientia* (1953), **9**, n° 1, 25.
551. Ryley (J. F.). — Carbohydrate metabolism in Protozoa and metal binding substances. *Nature* (1953), **171**, 747.
552. Sabatier (P.). — La catalyse en Chimie organique. Paris, 1920, 2e édition, 388 pages.
553. Sampson (M. M.). — Iso-agglutination and hetero-agglutination of spermatozoa. *Biol. Bull.* (1922), **43**, 267.
554. — The parthenogenetic effect of sperm filtrates, concentrated sperm suspensions, and serum of chitons on the ova of the sea-urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. *Biol. Bull.* (1926), **50**, 202.
555. — Sperm filtrates and dialysates. Their action on ova of the same species. *Biol. Bull.* (1926), **50**, 301.
556. Schechter (V.). — Bacteria in relation to longevity of egg cells. *Biol. Bull.* (1938), **75**, 375.

557. Scheuring (L.). — Biologische und physiologische Untersuchungen an Forellensperma. Publ. du *Bayerische Versuchsanstalt f. Fisch.* München (1924), 181.
558. — Biologische und physiologische Untersuchungen an Salmonidensperma. *Verhandl. d. d. zool. Ges.* (1925) 30e Réunion, Iéna, p. 94.
559. Schlenk (W. Jr.). — Spermatozoenbewegung und Wasserstoffionenkoncentration. Versuche mit dem Sperma der Regenbogenforelle. *Bioch. Ztschr.* (1933), **265**, 29.
560. — et Kahmann (H.). — Die chemische Zusammensetzung des Spermaliquors und ihre physiologische Bedeutung. Untersuchungen am Forellensperma. *Bioch. Ztschr.* (1938), **295**, 283.
561. Schücking (A.). — Zur Physiologie der Befruchtung, Parthenogenese und Entwicklung. *Pflügers Arch.* (1903), **97**, 58.
562. — Zur Erwiderung auf die Bemerkungen von E. von Dungern. *Pflügers Arch.* (1903), **99**, 634.
563. Seaman (G. R.) et Houllman (R. K.). — Enzymes systems in *Tetrahymena geleii*. S. H. Acetylcholinesterase activity. Its relation to motility of the organism and to coordinated ciliary action in general. *J. Cell. Comp. Physiol.* (1951), **37**, n° 2, 309.
564. Seligman (A. M.) et Rutenburg (A. M.). — The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science* (1951), **113**, n° 2934, 317.
565. Seymour (F. J.). — Sterile motile spermatozoa. *J. Am. Med. Ass.* (1939), **112**, 1817.
566. Shaffer (B. M.). — Aggregation in cellular slime moulds : *in vitro* isolation of acrasin. *Nature* (1953), **171**, 975.
567. Shaffner (C. S.). — Longevity of fowl spermatozoa in frozen conditions. *Science* (1942), **96**, 337.
568. Shapiro (H.). — The extracellular release of echinochrome. *J. Gen. Physiol.* (1946), **29** n° 5, 267.
569. Shearer (C.). — On the oxidation processes of the Echinoderm egg during fertilization. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* (1922), **93**, 213.
570. — On the heat production and oxidation processes of the Echinoderm egg during fertilization and early development. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* (1922), **93**, 410.
571. Smithies (O.). — A dynamic osmometer for accurate measurements on small quantities of material; osmotic pressures of isoelectric B-lactoglobulin solutions. *Biochem. J.* (1953), **55**, n° 1, 57.
572. Snellman (O.) et Erdös (T.). — Effect of calcium ions on the charge of myosin. *Nature* (1948), **161**, 526.
573. Sokoloff (J.). — Ueber die Spermatogenese bei Polyxenus sp. *Zool. Anzeiger* (1914), **44**, 558.
574. Southwick (W. E.). — Activity-preventing and egg-sea-water neutralizing substances from spermatozoa of *Echinometra subangularis*. *Biol. Bull.* (1939), **77**, 147.
575. — The « agglutination » phenomenon with spermatozoa of *Chiton tuberculatus*. *Biol. Bull.* (1939), **77**, 157.
576. Spikes (J. D.). — The prezone phenomenon in sperm agglutination. *Biol. Bull.* (1949), **97**, 93.
577. — Metabolism of sea urchin sperm. *Am. Nat.* (1949), **83**, 285.
578. — Communication personnelle.
579. Starr (I. Jr.). — Effect of variations in oxygen tension on the toxicity of sodium chlorid isotonic to sea water. *Biol. Bull.* (1921), **40**, 134.
580. Stassano (E.). — Contribuzione alla fisiologia degli spermatozoidi. *Zool. Anz.* (1883), **6**, 393.
581. Sterne (M.). — Production of toxins by Clostridia grown in cellophan sacs. *IIe Congrès Int. Micro.*, Rome (sept. 1953). *Riassunti delli Communicazioni*. Vol. II, p. 593.
582. Steudel (H.). — Zur Histochemie der Spermatozoen. I. *Ztschr. f. physiol. Chem.* (1911), **72**, 305.

583. — Zur Histochemie der Spermatozoen. II. *Ztschr. f. physiol. Chem.* (1911), **73**, 471.
584. — Zur Histochemie der Spermatozoen. III. *Ztschr. f. physiol. Chem.* (1913), **83**, 72.
585. — Zur Histochemie der Spermatozoen. IV. Ueber die chemische Zusammensetzung der Spermatozoen des Maifisches. *Ztschr. f. physiol. Chem.* (1921), **114**, 160.
586. Stott (F. C.). — The spawning of *Echinus esculentus* and some changes in gonad composition. *J. exp. Biol.* (1931), **8**, 133.
587. Summer (J. B.) et Somers (G. F.). — Chemistry and methods of enzymes. New York, 1943 Acad. Press, 365 pages.
588. Svedberg (T.) et Brohult (S.). — Splitting of protein molecules by ultra-violet light and X-rays. *Nature* (1939), **143**, 938.
589. Swann (M. M.). — Protoplasmic structure and mitosis. I. The birefringence of the metaphase spindle and asters of the living sea-urchin egg. *J. Exp. Biol.* (1951), **28**, n° 4, 417.
590. — Protoplasmic structure and mitosis. II. The nature and cause of birefringence changes in the sea-urchin egg at anaphase. *J. Exp. Biol.* (1951), n° 4, 434.
591. Sykes (J. G.) et Mixner (J. P.). — Toxicity to bull-spermatozoa of various salts, braids and lots of penicillin, streptomycin, aureomycin and chloromycetin. *J. Dairy Sc.* (1951), **34**, n° 4, 342.
592. Szumonovski (P.) et Brochart (M.). — Études sur la longévité et la variation du sperme non dilué de Taureau au cours de la conservation. *Rec. Méd. Vét. École Alfort* (1947), **123**, 337.
593. Tanzi (B.). — Phenomena in the gelatinous membrane and fertilization of the egg of *Arbacia lixula*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* (1949), **25**, 817.
594. Taylor (G.). — Analysis of the swimming of microscopic organisms. *Proc. Roy. Soc. Ser. A.* (1951), **209**, 447.
595. Tchakhotine (S.). — Le rôle physiologique de l'enveloppe gélatineuse de l'œuf d'Oursin. *C. R. Soc. Biol.* (1921), **84**, 830.
596. — Conservation et transport des produits sexuels vivants des Échinodermes. *C. R. Soc. Biol.* (1935), **119**, 830.
597. Tennent (D. H.). — The photodynamic action of dyes on the eggs of the sea urchin. *Lytechinus variegatus*. *Carnegie Inst. Washington Publ.* (1942), n° 539, 153 pages.
598. Teodoresco (E. C.) et Angelescu (E.). — Origin of the reversal of certain surface structures of algae-zoospores. *Kolloid-Ztschr.* (1941), **97**, 216.
599. Theel (H.). — On the development of *Echinocyanus pusillus* (O. F. Müller). *Roy. Soc. Sc.*, Uppsala, février 1892.
600. — On amœbocytes and other coelomic corpuscules in the perivisceral cavity of Echinoderms. *Arkiv f. Zool.* (1921), **13**, n° 25.
601. Thoulet (J.). — Océanographie statique. Paris, 1890, 492 pages, p. 222.
602. Thunberg (F.). — The effect of cobalt and some other heavy metals on certain dehydrogenases. I. Cobalt. *K. Fysiograf. Sällskapet Lund Förhandl.* (1950), **20**, 80.
603. Tirelli (M.). — Regolazione viscosa impedita della fecondazione e aumento viscoso seguito da sviluppo in uova di *Arbacia æquituberculata* (Blainv.) (considerazioni sulla struttura chemico-fisica della cellula). *Pubb. St. Zool. Napoli* (1930), **10**, 197.
604. Toltsouhov (A. V.). — The effect of preliminary treatment (fixing fluids) on staining properties of the tissues. *Stain Techn.* (1928), **3**, 49.
605. Torda (C.) et Wolff (H. G.). — Effect of acetylcholine, caffeine and alkaloids on activity of muscle adenosinetriphosphatase. *Fed. Proc.* (1948), **7**, n° 1, 125.
606. Townsend (G.). — The spawning reaction of *Nereis limbata* with emphasis upon chemical stimulation. *Biol. Bull.* (1938), **75**, 363.
607. — Physiological assays concerning the nature of fertilizine. *Biol. Bull.* (1938), **75**, 364.

608. — Evidence of role of sulfhydryl groups in phenomena of fertilization. *Anat. Rec.* (1939), **75**, suppl. 37.
609. — The effect of glutathion on sensitivity of Arbacia germ cells to X-rays considered from the viewpoint of child's gradient theory. *Anat. Rec.*, **75**, suppl. 1, 37.
610. — On the nature of the material elaborated by fertilizable *Nereis* eggs inducing spawning of the male. *Biol. Bull.* (1939), **77**, 306.
611. Tuzet (O.). — Sur la spermatogenèse de l'Oursin *Paracentrotus lividus* L. *C. R. Soc. Biol.* (1932), **109**, 696.
612. — Le spermatozoïde dans la série animale. *Rev. Suisse Zool.* (1950), **57**, fasc. suppl. n° 1.
613. Tyler (A.). — Extraction of an egg-membrane-lysin from sperm of the giant Keyhole Limpet (*Megathura crenulata*). *Proc. Nat. Acad. Sc.* (1939), **25**, 317.
614. — Crystalline echinochrome and spinochrome : their failure to stimulate the respiration of eggs and of sperm of *Strongylocentrotus*. *Proc. Nat. Acad. Sc.* (1939), **25**, 523.
615. — Sperm agglutination in the Keyhole Limpet *Megathura crenulata*. *Biol. Bull.* (1940), **78**, 159.
616. — Agglutination of sea-urchin eggs by means of a substance extracted from the eggs. *Proc. Nat. Acad. Sc.* (1940), **26**, n° 4, 249.
617. — The role of fertilizine in the fertilization of eggs of the sea-urchin and other animals. *Biol. Bull.* (1941), **81**, 190.
618. — Specific interacting substances of eggs and sperm. *West. J. Surg. Obst. and Gyn.* (1942), **50**, 126.
619. — A complement-release reaction; the neutralization of the anticomplementary action of sea-urchin fertilizin by antifertilizin. *Proc. Nat. Ac. Sc.* (1942), **28**, 391.
620. — Natural heteroagglutinins in the body-fluids and seminal fluids of various invertebrates. *Biol. Bull.* (1946), **90**, 213.
621. — Loss of fertilizing power of sea-urchin and urchin sperm treated with « univalent » antibodies antifertilizin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. U. S. A.* (1946), **62**, 197.
622. — Egg and sperm extracts and fertilization. *The Collecting Net* (1946), **18**, n° 2.
623. — On natural auto-antibodies as evidenced by antivenin in serum and liver extract of the Gila monster. *Proc. Nat. Acad. Sc.* (1946), **32**, n° 7, 195.
624. — Inhibition of fertilization in sea-urchin by means of univalent antibodies vs. antifertilizin. *Biol. Bull.* (1946), **91**, 210.
625. — An auto-antibody concept of cell structure, growth and differentiation. *VIth Growth symposium* (1947), p. 7.
626. — On the chemistry of the fertilizin of the sea-urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Anat. Rec.*, U. S. A. (1948), **101**, 658.
627. — Fertilization and Immunity. *Physiol. Rev.* (1948), **28**, n° 2, 180.
628. — Serological aspects of fertilization. *The Collecting Net* (1949), **19**, n° 1, 6.
629. — A simple, non-injurious method for inducing repeated spawning of sea-urchins and sand-dollars. *The Collecting Net* (1949), **19**, n° 1, 19.
630. — Properties of fertilizin and related substances of eggs and sperm of marine animals. *Am. Nat.* (1949), **133**, 195.
631. — Extension of the functional life span of spermatozoa by amino acids and peptides. *Biol. Bull.* (1950), **99**, 324.
632. — Prolongation of life-span of sea-urchin spermatozoa, and improvement of the fertilization reaction, by treatment of spermatozoa and eggs with metal-chelating agents (amino-acids versene, DEDTC, cupron). *Biol. Bull.* (1953), **104**, 224.
633. — et Atkinson (E.). — Prolongation of the fertilizing capacity of sea-urchin spermatozoa by amino-acids. *Science* (1950), **112**, n° 2922, 783.
634. — et Fox (S. W.). —Sperm agglutination in the Keyhole limpet and the sea-urchin. *Science* (1939), **90**, 516.

635. — Evidence on the protein nature of the sperm agglutinins of the Keyhole limpet and the sea-urchin. *Biol. Bull.* (1940), **79**, 153.
636. — et O'Melveny (K.). — Le rôle de l'antifertilisine dans la fécondation des œufs d'Oursin. *Biol. Bull.* (1941), **81** 364 (titre traduit).
637. — et Rothschild (Lord). — Metabolism of sea-urchin spermatozoa and induced anerobic motility in solutions of amino-acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1951), **76**, 52.
638. Umbreit (W. W.), Burris (R. H.) et Stauffer (J. F.). — Manometric techniques and related methods for study of tissue metabolism. Bergess Publ. Minneapolis, 4th Printing 1948, 203 pages.
639. Uri (J.) et Szabo (G.). — Inhibition of the growth of dermatophytes by 8-hydroxyquinoleine. *Acta Physiol. Acad. Sc. Hung.* (1952), **3**, 425.
640. Vasseur (E.). — The sulphuric acid content of the egg coat of *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Arkiv Kemi* (1947), **25** B, n° 6.
641. — The spermatozoon of the sea-urchin *Echinocardium cordatum* Penn. *Arkiv Zool.* (1947), **40** B, n° 3.
642. — A spectrophotometric study on the orcinol reaction with carbohydrates. *Acta chem. Scand.* (1948), **2**, 693.
643. — Chemical studies on the jelly coat of the sea-urching egg. *Acta chem. Scand.* (1948), **2**, 900.
644. — Effect of calcium ions on the agglutination in *Strongylocentrotus droebachiensis Müll. Arkiv Kemi* (1949, **1**, n° 14, 105.
645. — Effect of sea-urchin egg jelly coat solution and calcium ions on the oxygen uptake of sea-urchin sperm. *Arkiv Kemi* (1949), **1**, n° 46, 693.
646. — L-galactose in the jelly coat of *Echinus esculentus* eggs. *Acta Chem. Scand.* (1950), **4**, 1144.
647. — Demonstration of a jelly-splitting enzyme at the surface of the sea-urchin spermatozoon. *Exp. Cell Res.* (1951), **2**, n° 1, 144.
648. — *Strongylocentrotus pallidus* (G. O. Sears) and *S. droebachiensis* (O. F. Müller) distinguished by means of sperm-agglutination with egg-water and ordinary morphological characters. *Acta Borealia. A. Scientia* (1951), n° 2.
649. — Geographic variation in the Norwegian sea-urchins, *Strongylocentrotus droebachiensis* and *S. pallidus*. *Evolution* (1952), **6**, n° 1, 87.
650. — Periodate oxidation of the jelly coat substance of *Echinocardium cordatum*. *Acta Chem. Scand.* (1952), **6**, 376.
651. — The chemistry and physiology of the jelly coat of the sea-urchin egg. *Thèse*, Stockholm, 1952.
652. — et Carlsen (I.). — Sexual maturity of the sea-urchin *Brissopsis lyrifera* (Forbes) in the Gullmar Fjord. *Arkiv Zool.* (1948), **41** A, n° 16.
653. — et Hagström (B.). — On the gamones of some sea-urchins from the swedish West coast. *Arkiv Zool.* (1946), **37** A, n° 17.
654. — et Immers (J.). — Genus specificity of the carbohydrate component in the sea-urchin egg jelly coat as revealed by paper chromatography. *Arkiv Kemi* (1949), **1**, n° 6, 39.
655. — Hexosamine in the sea-urchin egg jelly coat : a misinterpretation of the method of Elson and Morgan. *Arkiv Kemi* (1949), **1**, n° 29, 253.
656. —, Wicklund (F.) et Runnström (J.). — Respiration and fertilizin capacity of sea-urchin sperm in presence of serum albumin and jelly coat solution. *Biol. Bull.* (1950), **99**, 324.
657. Velick (S. F.). — Phosphate binding and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction. *J. Biol. Chem.* (1953), n° 2, **203**, 545.
658. Vernon (H. M.). — The effect of staleness of the sexual cells on the development of Echinoids. *Proc. Roy. Soc. B.* (1899), **65**, 350.
659. — Cross fertilization among Echinoids. *Arch. f. Ent. Mech.* (1900), **9**, 464.
660. Vimeux (J.). — Tropisme et progression des spermatozoïdes. *C. R. Soc. Biol.* (1953), **147**, 13-14, 1214.
661. Vlès (F.). — Variations de l'indice de réfraction de l'œuf d'Oursin en division. *C. R. Soc. Biol.* (1921), **85**, 494.
662. — et Dragoiu (J.). — Sur la pression osmotique d'arrêt de la division cellulaire. *C. R. Acad. Sc.* (1921), **172**, 1127.

663. — et Nouel (S.). — Notes sur quelques propriétés physico-chimiques des produits sexuels de l'Oursin. *Arch. Zool. exp.* (1921), **1**, 301.
664. — et Vellinger (E.). — Recherches sur le pigment de l'œuf d'*Arbacia* envisagé comme indicateur de pH intracellulaire. *Arch. Phys. Biol.* (1928), **6**, n° 4, 239 et *Bull. Inst. Océanog.* (1928), n° 513.
665. Wallenfels (K.). — Komplexverbindungen von Echinochrom und verwandten Oxynaphtoquinonen. *Ber. d. d. chem. Ges.* (1941), **74**, 1598.
666. — Der Farbstoff der roten Blutzellen des Seeigels, *Arbacia pustulosa*. *Ber. d. d. chem. Ges.* (1943), **76**, 323.
667. — Intervention après la communication de A. Monroy au *Colloque de l'Union Internationale des Sciences biologiques*. Milan (juin 1948), série B, n° 3, p. 52.
668. — et Gauhe (A.). — Ueber die Dehydrierung von Echinochrom und anderen 2.3-Dioxynaphtochinonen durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyde. *Ber. d. d. chem. Ges.* (1942), **75**, 413.
669. — Synthese von Echinochrome A. *Ber. d. d. chem. Ges.* (1943), **76**, 325.
670. — et Mohle (W.). — Die Reduktions-Oxydationspotentiale der Naphtochinone. *Ber. d. d. chem. Ges.* (1943), **76**, 924.
671. Walton (A.). — Studies on the physiology of reproduction. I. The flocculation of sperm-suspensions in relation to surface charge. *Brit. J. exp. Biol.* (1924), **2**, 13.
672. — The maladaptation of Trout spermatozoa to fresh water. *Nature* (1930), **126**, 564.
673. Warburg (O.). — Le rôle du fer dans la respiration de l'œuf d'Oursin. Remarques sur quelques oxydations activées par le fer (titre traduit). *Ztschr. f. physiol. Chem.* (1914), **92**, 231.
674. — Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs. I et II. Paris (1926), Alcan. Trad. E. Aubel et L. Genevois, 233 et 217 pages.
675. Weismann (A.). — Essais sur l'hérédité et la sélection naturelle. Trad. Paris, 1892, Reinwald, éd., 541 pages.
676. Wicklund (E.). — The action of clupein on the infertilized sea-urchin eggs and its influence on the fertilization o these eggs. *Arkiv f. Zool.* (1947), **40** A, n° 5.
677. — On the effect of albumin, ATP, trypsin, chymotrypsin, glucose and fructose on the activity of spermatozoa of sea-urchins. *Arkiv f. Zool.* (1949), **42** A, n° 11.
678. — et Gustafson (T.). — The effect of glycine on the membrane formation in the eggs of the sea-urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Arkiv f. Zool.* (1949), **42** A, n° 12.
679. — et Johnsson (L.). — On the effect of jelly-coat solution on the activity spermatozoa of sea urchins. *Arkiv f. Zool.* (1951), sér. 2, **2**, n° 10, 559.
680. Wilson (H. V.). — On some phenomena of coalescence and regeneration in Sponges. *J. exp. Zool.* (1907), **5**, n° 2, 245.
681. Wilson (W. L.) et Heilbrunn (L. V.). — Colloidal changes during aging of the Chaetopterus egg. *Biol. Bull.* (1953), **105**, n° 2, 388.
682. Winge (O.) et Ditlevsen (E.). — On some attempts to control sex determination by treatment of sperm in trout (*Salmo trutta*). *C. R. Lab. Carlsberg* (1937), **22**, 121.
683. Winslow (G. M.). — Note on circular swimming of sand-dollar spermatozoa. *Science* (1903), **17**, 153.
684. Wintrebert (P.). — La digestion de l'enveloppe tubaire interne de l'œuf par des ferments issus des spermatozoïdes et de l'ovule, chez *Discoglossus pictus* Otth. *C. R. Acad. Sc.* (1925), **188**, 97.
685. — Phénomènes d'attraction réciproque des gamètes de captation et de réception des spermatozoïdes par l'ovule chez *Discoglossus pictus* Otth. *C. R. Sc. Biol.* (1930), **105**, 520.
686. — La fonction enzymatique de l'acrosome spermien du Discoglosse. *C. R. Soc. Biol.* (1933), **112**, 1636.
687. Woodruff (L. L.). — The effect of excretion products of Infusoria on the

same and on different species, with special reference to the protozoan sequence in infusions. *J. exp. Zool.* (1913), **14**, 575.

688. Woodward (A. F.). — Studies on the physiological significance of certain precipitates from the egg secretions of *Arbacia* and *Asterias*. *J. exp. Zool.* (1918), **26**, 459.

689. — Note on the nature and source of « Purple X ». *Biol. Bull.* (1915), **29**, 136.

690. Wurmser (R.). — Oxydations et réductions. Paris (1900), Presses Universitaires, 381 pages.

691. Wyatt (G. R.). — The quantitative analysis of deoxypentose nucleic acids. *Biochem. J.* (1950), **47**, 7.

692. Yamane (J.). — The proteolytic action of Mammalian Spermatozoa and its bearing upon the second maturation division of ova. *Cytologia*, Tokyo (1930), **1**, 394.

693. Young (J. Z.). — Intracellular membranes. *Quart. J. micr. Sc.* (1953), **94**, 399.

694. Zöllner (N.) et Fellig (J.). — Nature of the inhibition of ribonuclease by heparin. *Ann. J. Physiol.* (1953), **173** (2), 223.

ADDENDUM

695. Rybak (B.). — Contribution à l'histoire de la spermiologie des Oursins. *Biol. méd.* (1955), **44**, n° 7, 774.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS 1

CHAPITRE PREMIER. — Techniques générales 4

I. Prélèvement des gamètes. 4
Ovariotomie et castration 5
Pontes forcées 8

1) Technique chirurgicale 8
2) Technique physique 9
3) Technique chimique 9

II. Lavage des gamètes 10
III. Confection des dialyseurs 11

1) Préparation des sacs 11
2) Montage des sacs. 12
3) Supports utilisés. 12

IV. Pipetages 17
V. Respirométrie 17
VI. Azote total 18
VII. Phosphore organique et inorganique 18
VIII. Photomètres utilisés 18
IX. Observation des agglutinats spermatiques 18
X. Des critères servant à déterminer la concentration d'une suspension spermatique 19

1) Poids sec 19
2) Densité optique 21
3) Azote total. 22

CHAPITRE II. — De l'extraction et de certains caractères chimiques de la fertilisine. 23

I. Techniques d'extraction 24
II. Essais de purification et caractères chimiques 26

CHAPITRE III. — L'agglutination spermatique 31

I. Remarques sur la structure des spermatozoïdes d'Oursins . . 31
II. Agglutinations irréversibles 33
III. Désagglutination spontanée. 38
IV. Sur la définition d'une unité d'agglutination 42
V. Sur le mécanisme de l'agglutination et de la désagglutination. 45

Pages

CHAPITRE IV. — L'activité flagellaire 48

I. Conditions d'oxydo-réduction 48
II. L'estimation de l'activité flagellaire 52

Les tubes capillaires 53
La technique des trois gouttes 53
Techniques métriques 54

III. Types de mouvements 56
IV. L'allélostasie 59
V. La mesure indirecte de l'activité spermatique 62

CHAPITRE V. — Gérontométrie spermatique 69

Technologie du tube à essai : la notion de milieu ouvert 71
Mesure du vieillissement spermatique 73

CHAPITRE VI. — La conservation des gamètes pondus 87

I. La conservation des ovules 87
II. La conservation des spermatozoïdes pour microscopie. . . . 91
III. Le vieillissement aseptique des spermatozoïdes. 92
IV. Durée extrême de conservation du pouvoir fécondant de spermatozoïdes non alimentés artificiellement. 104
V. La conservation parabiotique des gamètes pondus. 109

CHAPITRE VII. — Comportement différentiel des spermatozoïdes 111

DISCUSSION 122

I. Des modalités de l'objet vivant 122
II. Méthodologie 123
III. Gamètes et mitose. 125
IV. La durée de la vie spermatique 126
V. Biologie et physiologie spermatique 128
VI. La question du chimiotactisme spermatique. 130
VII. Sur la nature de l'action de la fertilisine. 135
VIII. Survie 141
IX. Sur le milieu ouvert. 143
X. Terminologie 143

CONCLUSIONS 145

RÉSUMÉ 147

BIBLIOGRAPHIE 150

TABLE DES MATIÈRES. 177

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Contribution à l'histoire de la biologie des spermatozoïdes d'oursins.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 15 octobre 1954.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH.

DÉPÔT LÉGAL : 1957, 1er TRIMESTRE, N° D'ORDRE 1.
IMPRIMERIE BARNÉOUD S. A. (31.0566 . LAVAL. — N° 3468. — 1-1957.