

A PROPOS DE L'ACTION SPÉCIFIQUE DES PRINCIPAUX CATIONS DE L'EAU DE MER SUR LA PHYSIOLOGIE DES GAMÈTES

Par A. DALCQ, L. DESCLIN, L. DE WALSCHE et J. PASTEELS

Parmi les agents chimiques capables d'agir sur l'activité de l'œuf ou du spermatozoïde, les cations mono- et bivalents présents dans l'eau de mer (Na' , K' , Mg'' , Ca'') occupent une position privilégiée en raison de la probabilité de leur rôle physiologique. Aussi nombre d'embryologistes ont-ils étudié leurs effets à des points de vue divers. Citons tout d'abord les recherches classiques de C. HERBST (1904) ⁽¹⁾, sur les substances inorganiques nécessaires au développement de l'œuf fécondé d'Oursin, et celles plus récentes et en quelque sorte complémentaires de J. RUNNSTRÖM (1925) ⁽²⁾, sur les conséquences cytologiques et morphologiques de la privation de potassium. Dans la longue série d'investigations qu'a suscitées la parthénogénèse expérimentale, les sels de ces divers cations ont été employés un grand nombre de fois (J. LOEB, Y. DELAGE, K. KOSTANECKI, J. SCOTT, R. HOVASSE, A. DALCQ, etc.) et ont souvent permis de déclancher l'activation. Depuis que l'on a saisi la nécessité d'analyser dans ses moindres détails la physiologie des gamètes, on a insisté sur l'action de certains cations sur l'entrée en maturation de l'oocyte de premier ordre [Sv. HÖRSTADIUS, 1923 ⁽³⁾, A. DALCQ, 1924 ⁽⁴⁾] et sur la dépolarisation physiologique de l'œuf en maturation. Leur rôle dans la fécondation n'a pas fait l'objet d'une étude méthodique, mais nous devons cependant rappeler que J. LOEB (1914) ⁽⁵⁾ a signalé que le calcium peut favoriser la fécondation de l'œuf d'Oursin par du sperme d'Astérie. Si disparates que soient ces documents, ils indiquent clairement qu'il y a là une voie fructueuse pour attaquer les problèmes fondamentaux de la physiologie des gamètes, et ne peuvent qu'inciter à recueillir tout fait nouveau, en vue d'une synthèse future. Tel est le but de cette modeste contribution. Au cours de séjours que nous avons faits durant cet été à la Station zoologique de Wimereux ⁽⁶⁾,

⁽¹⁾ ARCHIV. F. ENTWM., XVII.

⁽²⁾ PUBL. STATION ZOOL. NAPLES, VI.

⁽³⁾ ARCHIV. F. ENTWM., II C.

⁽⁴⁾ ARCHIVES DE BIOLOGIE, XXXIV.

⁽⁵⁾ ARCHIV. F. ENTWM., XI.

⁽⁶⁾ Nous tenons à remercier M. le Professeur M. CAULLERY, directeur de la Station, pour l'accueil cordial qu'ils nous a réservé dans son laboratoire, et son assistant, M. R.

nous avons recherché en commun les espèces de cette région de la côte boulonnaise qui se prêteraient le mieux à des recherches d'embryologie expérimentale. Au cours de multiples essais de fécondation artificielle, nous avons constaté dans deux cas une action spécifique de cations. L'un de ces cas concerne la mobilité des spermatozoïdes d'un ver marin, *Eulalia viridis*; l'autre, moins original, se rapporte à l'entrée en maturation de l'œuf de la Pholade, *Barnea candida*. Nous nous bornerons à les exposer à titre préliminaire, en réservant l'interprétation définitive de ces phénomènes que nous espérons avoir l'occasion d'analyser de façon plus approfondie.

* * *

En juin, juillet et août, *Eulalia viridis* se trouve dans un état de maturité sexuelle imparfaite. Les femelles contiennent des oocytes de premier ordre déjà libres, mais de taille très inégale et qui, placés dans l'eau de mer, montrent tout au plus un début de flétrissement de la vésicule germinative. Les mâles fournissent par dilacération une laitance assez abondante, dans laquelle flottent des cystes de spermatogonies et de spermatocytes, des groupes de spermatides en voie d'histogénèse et des spermatozoïdes accomplis, libres ou parfois encore adhérents par la tête. Dans l'eau de mer, ces spermatozoïdes restent longtemps immobiles; petit à petit, quelques-uns se mettent à frétiller et chez certains individus on obtient au bout d'une heure environ une culture agitée de mouvements rapides. L'activité des spermatozoïdes morphologiquement mûrs n'est pas plus grande en présence d'œufs de la même espèce ou d'eau de mer ayant contenu des œufs. Quelle que soit la manière dont on essaie de la réaliser, la fécondation artificielle échoue. Croyant — à tort d'ailleurs — que l'immobilité des spermatozoïdes était la cause de cet échec, nous avons cherché le moyen de rendre plus rapide et plus général l'éveil des spermatozoïdes. L'alcalinisation de l'eau de mer, dont l'effet sur l'activité des spermatozoïdes est bien établi par les travaux de J. GRAY (1915) ⁽¹⁾ et E. COHN (1918) ⁽²⁾, nous donna de légers succès, mais inconstants, ce qui s'expliquera par la suite. Des essais pratiqués avec les milieux les plus divers attirèrent notre attention sur les solutions contenant un excès de Mg et montrèrent que la condition suffisante pour déterminer en quelques minutes une mobilisation

WEILL, pour le zèle infatigable avec lequel il nous a aidés dans nos tentatives. C'est à leurs communes suggestions que nous sommes redevables d'avoir fixé notre attention sur les deux espèces dont il sera surtout question dans cette note.

(1) QUART. J. MICR. SCI. N. S., LXI.

(2) BIOL. BULL., XXXIV.

active de la quasi-totalité des spermies mûres (et même souvent des spermatides encore groupées et dont le flagelle commence seulement à se développer) est la présence simultanée, dans l'eau de mer, d'un léger excès d'ions Mg^{++} et OH^- . Cette condition est réalisée de la manière la plus simple par addition à un flacon d'eau de mer (200 cc.) de 0 gr. 50 d'oxyde de magnésie hydraté chimiquement pur, dont la solubilité est extrêmement faible, mais suffisante cependant pour se traduire par une élévation sensible du pH (qui passe de 8.2 à 8.6-8) et surtout par un effet très net sur la mobilisation des spermatozoïdes. Il est facile de démontrer que l'alcalinisation seule n'est pas en cause, et que le Mg exerce là un effet spécifique qui ne peut être atteint ni par Na, ni par K, ni par Ca. On place dans un tube *a*, en verre neutre Pyrex, 15 cc. d'eau de mer saturée d'hydrate de Mg + X gouttes de rouge de Crésol Clarke à 0.02 p. c. Cette concentration de rouge de crésol n'a, nous nous en sommes assuré d'autre part, aucun effet immédiat sur la mobilité des spermatozoïdes. Dans quatre autres tubes à essai Pyrex on place 15 cc. d'eau de mer normale, X gouttes du même indicateur, puis on ajoute respectivement à trois d'entre eux la quantité de Na (OH) $\frac{N}{10}$, de K (OH) $\frac{N}{10}$ ou d'eau de chaux diluée, suffisante pour que ces solutions *b*, *c*, *d* prennent la même teinte rose que le tube *a*; le cinquième tube, non alcalinisé, servira de témoin. On a donc ainsi quatre solutions d'alcalinité égale, mais de teneur différente en ions Na, K, Mg et Ca :

- a*) Eau de mer : + Mg (OH)₂ + X gouttes rouge crésol;
- b*) Eau de mer : + Na (OH) + X gouttes rouge crésol;
- c*) Eau de mer : + K (OH) + X gouttes rouge crésol;
- d*) Eau de mer : + Ca (OH)₂ + X gouttes rouge crésol;
- e*) Eau de mer normale : + X gouttes rouge crésol.

Une goutte de chacune de ces solutions est alors déposée sur un couvercle de salière et l'on y dissocie un petit nodule de laitance prélevée sur un gros mâle d'Eulalie. Les préparations sont retournées sur des salières et ces gouttes pendantes sont examinées à intervalle régulier. Dans une de ces expériences : après cinq minutes, *a*, *b*, *c*, *d*, *e* sont encore immobiles; après vingt-cinq minutes, dans *a* un certain nombre de spermatozoïdes nagent librement, beaucoup d'autres frétilent sur place, aucun mouvement dans *b*, *c*, *d*, *e*; après une heure, *a* montre un mouvement un peu plus actif, *b* présente une activité très légère, *c*, *d*, *e* sont totalement inertes. Le degré de réussite de l'expérience peut varier suivant les individus. Les mâles petits et grêles — les plus jeunes, selon

toute vraisemblance — ne donnent que des insuccès. Au contraire, les mâles de grande taille, gorgés de laitance, peuvent fournir dans l'eau de mer additionnée d'oxyde de magnésie hydraté des cultures qui montrent le grouillement intense caractéristique du sperme mûr. Néanmoins, la fécondation échoue toujours; nous en ignorons la cause.

En résumé, chez *Eulalia viridis*, à mesure que les spermatozoïdes approchent de l'état de maturité physiologique parfaite, ils tendent à entrer en mouvement au contact de l'eau de mer. Cette réaction peut être accélérée par l'addition à l'eau de mer d'oxyde de magnésie hydraté, poudre insoluble qui rend l'eau de mer légèrement hyperalcaline et hypermagnésienne. En milieu de même hyperalcalinité, un léger excès de Na contribue aussi, mais à un degré moindre, à éveiller les mouvements des spermatozoïdes. A pH égal, même en milieu hyperalcalin, K et Ca sont sans effet.

L'action du Mg peut donc être considérée comme spécifique par rapport aux autres cations de l'eau de mer. Elle exige un temps de contact assez prolongé, de 15 à 30 minutes, variable selon les individus.

Il n'est guère possible de se prononcer actuellement sur le mécanisme de cette action. On peut suggérer que la tension superficielle du flagelle est affectée par le Mg et que les battements périodiques sont ainsi déclenchés. On peut rappeler aussi que d'après les observations de J. SPEK sur *Actinosphaerium* (1921) ⁽¹⁾, Mg occupe une place à part dans les effets des sels sur le protoplasme, ce qui semble tenir à ce qu'il agit différemment sur l'état colloïdal des albuminoïdes et des lipoïdes. De plus, tenant compte de récentes recherches sur la perméabilité de cellules animales ou végétales qui tendent à admettre, dans certains cas, une perméation plutôt moléculaire qu'ionique (J. OSTERHOUT, R. S. LILLIE, etc.), on devrait considérer aussi l'action éventuelle de molécules non dissociées d'hydrate de Mg, ce qui expliquerait l'intervention simultanée de Mg et OH.

Une autre question se pose encore : dans quelle mesure le phénomène observé est-il physiologique? Ce qui se passe *in vitro* dans nos expériences reproduit-il le processus normal par lequel les spermatozoïdes d'*Eulalia* deviennent capables de se mouvoir à un moment donné? Strictement, nous ne pouvons l'affirmer, mais on peut cependant concevoir que ce qui manque au spermatozoïde morphologiquement mûr pour entrer en activité est une certaine « imprégnation » par des ions de l'eau de mer, notamment le Mg, et que ces ions ne parviennent que

(1) *Acta zoologica*, II.

peu à peu dans le liquide coelomique. S'il en est ainsi, on peut chercher à mobiliser les spermatozoïdes dans le corps même de l'animal, en soumettant celui-ci à une concentration suffisante de $MgCl_2$. Effectivement, si l'on plonge les mâles d'*Eulalia* dans une solution de $MgCl_2$ isotonique à l'eau de mer, ou dans un mélange à parties égales d'eau de mer et de ce sel, on obtient des résultats si pas absolument démonstratifs, du moins encourageants. Dans ces milieux les animaux sont, fait bien connu, profondément anesthésiés. Bien qu'ils puissent encore se réveiller si on les reporte dans l'eau de mer, au bout de douze heures l'épithélium intestinal a subi de profondes altérations. Mais la laitance est intacte et dans beaucoup de cas nous avons constaté, immédiatement après le prélèvement chez des animaux longuement anesthésiés, une activité nette des spermatozoïdes. Nous n'avons pu, toutefois, obtenir ainsi le grouillement intense qui témoigne d'une réussite complète. Sans doute aurait-il fallu faire intervenir l'alcalinité, mais nous avons dû y renoncer faute de temps et de matériel.

C'est la première fois, à notre connaissance, que l'on signale une action spécifique d'un cation sur la mise en marche des battements du flagelle spermatique. Il ne serait cependant pas impossible que le fait ait un certain degré de généralité. C'est ainsi que chez *Echinocardium cordatum*, où les spermatozoïdes recueillis en juillet sont encore actifs bien que la période de reproduction soit dépassée (M. CAULLERY, 1924) ⁽¹⁾, nous avons pu noter que, des cinq solutions citées plus haut, la solution *a*, alcaline et magnésienne, exagère considérablement la rapidité des mouvements ⁽²⁾. La même solution *a* provoque également la mobilisation des spermatozoïdes ou renferme leur activité chez *Lepidonotus squamatus*, *Phaseolosoma vulgare*, un Néréidien non identifié, *Barnea candida*. Nous n'avons toutefois pas, dans ces quatre cas, fait la comparaison avec les solutions *b*, *c*, *d* et ne pouvons donc certifier qu'il s'agit d'un effet spécifique du Mg ⁽³⁾.

* * *

Les observations précédentes indiquent que l'éveil des spermatozoïdes

(¹) *Glanules biologiques du laboratoire de Wimereux.*

(²) L'appréciation de la rapidité des mouvements n'est pas aussi subjective qu'on pourrait le croire. La présence, dans le sperme, de particules étrangères animées par choc de déplacements plus ou moins rapides, permet une évaluation assez précise. Nous nous sommes, de plus, soumis à un contrôle mutuel dans tous les cas douteux.

(³) Depuis la rédaction de cette note, nous avons eu sous les yeux des travaux déjà anciens de B. RAWITZ (*Versuche ueber Ephebogenesis*, ARCH. F. ENTWM., XI et XII, 1901), où l'auteur signale avoir mobilisé les spermatozoïdes non mûrs d'*Holothuria tubulosa* à

d'*Eulalia viridis* se produit par une action spécifique de cation qui n'est pas sans analogie avec celle que l'un de nous a mise en évidence pour l'entrée en maturation de l'œuf d'*Asterias glacialis*. Seulement, tandis que c'est le magnésium qui agit dans le premier cas, c'est le calcium dans le second. Il est intéressant de rapprocher de ces deux phénomènes le déclenchement artificiel de la maturation de l'œuf de Pholade (*Barnea candida*), qui obéit, lui, au potassium.

Cet œuf est pondu à l'état d'oocyte de premier ordre encore au repos. A de rares exceptions près, il reste indéfiniment dans cet état lorsqu'on le place dans l'eau de mer normale. Mis en présence de sperme frais, il est fécondé et au bout de dix à quinze minutes la vésicule germinative se flétrit et la maturation commence ⁽¹⁾.

Nous avons cherché à déterminer l'entrée en maturation en dehors de la fécondation.

Dans une première expérience, les œufs vierges d'une même femelle sont répartis entre les solutions suivantes :

- a) Eau de mer;
- b) Eau de mer : 42 cc. + NaCl 2 1/2 M 8 cc.;
- c) Eau de mer : 42 cc. + KCl 2 1/2 M 8 cc.

Après une demi-heure, dans *a* les vésicules germinatives sont intactes, dans *b*, 50 p. c. sont flétries, dans *c*, 100 p. c. Ce résultat indique à la fois une action favorable de l'hypertonie — que nous n'avons pas analysée de plus près — et un effet particulier de K qui a retenu notre attention. Bientôt nous constatons qu'il suffit de placer des œufs vierges pendant trois minutes dans le mélange : eau de mer 48 cc. + KCl (isotonique et isoélectrique à l'eau de mer) 2 cc., pour observer, après retour à l'eau de mer, le flétrissement plus ou moins général de la vésicule germinative. Il est aisé de montrer que cet effet est spécifique au K.

Répartissons les œufs vierges d'une même ponte entre les solutions suivantes :

- 1° Eau de mer : 48 cc. + NaCl (isoélectrique et isotonique à l'eau de mer) 2 cc.;
- 2° Eau de mer : 48 cc. + KCl (isoélectrique et isotonique à l'eau de mer) 2 cc.;

l'aide d'un mélange de chlorure de Mg avec un peu de borax et de phosphate calcique. Il s'agit vraisemblablement du même processus.

⁽¹⁾ Pour obtenir des œufs ou du sperme en culture pure abondante et bien propre, il suffit d'écarter brusquement les valves, en déchirant le manteau, puis de masser légèrement le pied. Quelques minutes plus tard, les individus mûrs émettent par l'un des siphons, à jet continu, les produits génitaux.

3° Eau de mer : 48 cc. + MgCl_2 (isoélectrique et isotonique à l'eau de mer) 2 cc.;

4° Eau de mer : 48 cc. + CaCl_2 (isoélectrique et isotonique à l'eau de mer) 2 cc.;

5° Eau de mer.

Après sept minutes de séjour dans les solutions 1, 2, 3, 4, on décante et l'on ajoute un excès d'eau de mer normale. Au bout de 20 minutes toutes les vésicules germinatives sont flétries dans 2, aucune dans les autres lots. Le résultat est le même si l'on emploie des solution hypotoniques.

On voit déjà par ces exemples combien ces œufs sont sensibles à la présence (même temporaire) d'un léger excès d'ions K. Si l'on introduit dans l'eau de mer 4 p. c. de KCl (isotonique et isoélectrique), on obtient au bout de 20 minutes (un peu plus tardivement que par la fécondation) le flétrissement de presque toutes les vésicules germinatives. Le résultat est sensiblement le même si les œufs ne séjournent que quelques minutes dans la solution.

Afin d'examiner ce qui se passe aux concentrations inférieures à 4 p. c., nous avons préparé deux séries de solutions contenant 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 et 4.5 cc. de KCl (isotonique et isoélectrique) pour 99.5, 99, ... 95.5 cc. d'eau de mer. Dans chacune des séries ont été répartis les œufs de deux femelles A et B ⁽¹⁾. Des échantillons des divers lots ont été fixés au formol : pour A, après 30 et 80 minutes (A'); pour B, après 25 et 75 minutes (B'). Les numérations faites ultérieurement ont donné les chiffres suivants :

—	Concentration en Kcl. (Pour cent.)	Œufs comptés.	Œufs en maturation.	Pour cent.	Remarques.
Série A, 30' . . .	4.5	539	504	93.7	Conservation défectueuse.
	4	509	487	95.6	
	3.5	517	451	87.2	
	3	359	243	67.6	
	2.5	512	341	66.6	
	2	554	262	47.3	
	1.5	501	100	19.9	
	1.0	538	36	10.4	
	0.5	543	41	7.6	

(1) Les dilutions indiquées tiennent compte de l'eau de mer ajoutée avec les œufs.

—	Concentra- tion en Kcl. (Pour cent.)	Œufs comptés.	Œufs en maturation.	Pour cent.	Remarques.
Série A', 80' . . .	4.5	506	481	95	(Échantillon perdu).
	4	...	...	...	
	3.5	501	499	99.6	
	3	531	527	99.3	
	2.5	521	483	91.7	
	2	544	411	75.5	
	1.5	496	278	56	
	1	532	117	21.9	
	0.5	519	50	9.6	Conservation défec- tueuse.
Série B, 25' . . .	4.5	500	449	89.8	
	4	504	370	73.4	
	3.5	510	292	57.25	
	3	593	392	53.4	
	2.5	549	176	32	
	2	523	83	15.8	
	1.5	553	52	9.4	
	1	519	35	6.8	Série B', 75' . . .
	4.5	541	499	92.4	
	4	420	385	91.7	
	3.5	521	418	80.2	
	3	567	378	65.7	
	2.5	517	236	45.8	
	2	573	121	21.1	
	1.5	506	63	12.4	
	1	500	42	8.5	

Si l'on dispose ces résultats en un graphique (fig. 1), en portant en abscisses le pour cent de KCl ajouté à l'eau de mer et en ordonnées le pour cent d'œufs entrés en maturation, on voit que les points (abstraction faite de deux d'entre eux où la numération était rendue difficile par une conservation défectueuse) se disposent en tracés régulièrement ascendants. Pour les courbes A et A', la dernière partie (en pointillés) s'abaisse légèrement. Il est probable que ce cas est fortuit et qu'il n'y a pas, comme on pourrait le croire, un optimum entre les concentrations de 3 et 4 p. c. Nous avons, au contraire, constaté de nombreuses fois que dans toute concentration supérieure à 4 p. c., même dans KCl pur, tous les oocytes entrent en maturation. Les données apportées ici ne doivent être considérées que comme une première approximation. Elles indiquent que ce phénomène serait susceptible d'une étude quantitative plus précise qui ne manquerait pas d'intérêt. Pour le moment, bornons-nous à constater que le pour cent de maturations paraît être

proportionnel à la concentration et s'élève progressivement avec le temps. Ces relations jettent une certaine lumière sur le mécanisme physico-chimique du phénomène. A ce point de vue, deux éventualités doivent être envisagées : ou bien le potassium agit sur la membrane plasmatique de l'œuf en augmentant simplement sa perméabilité, ou bien il pénètre dans le protoplasme et exerce son effet par interaction (d'ordre physique ou chimique) avec ses constituants. Le premier cas-

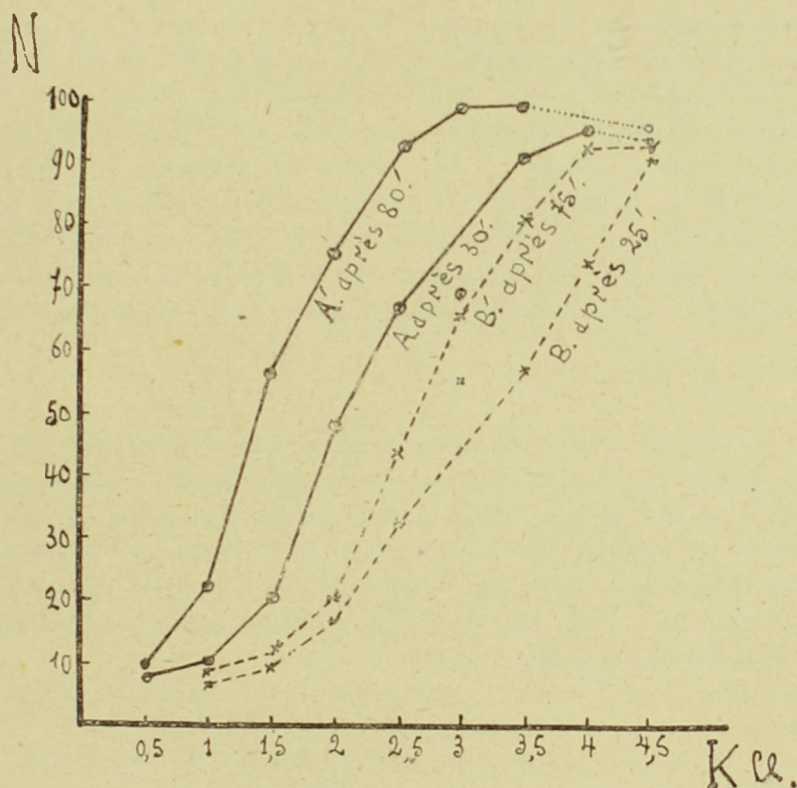


Fig. 1.

nous paraît improbable, en raison, tout d'abord, de la spécificité même de l'action; s'il s'agissait simplement de perméabilisation, NaCl devrait agir dans le même sens, si pas de manière aussi marquée, et nous avons constaté qu'il n'en est rien; de plus, en forçant la dose de KCl, on atteindrait rapidement des concentrations cytolytiques. Le caractère progressif de la réaction, en fonction de la concentration et du temps, plaide au contraire en faveur de la pénétration et de la liaison de KCl avec les colloïdes ovulaires, pénétration qui peut d'ailleurs être favorisée par un certain degré d'imbibition ou de ramollissement de la

membrane, suivant les vues de J. SPEK (1921). On pourrait se demander si le rôle spécifique de K ne tient pas alors à sa position particulière dans la série de HOFMEISTER ($K < Na < Li < Ca$) pour l'effet flocculant ou précipitant de ces cations. Il s'agirait ainsi d'une action d'ordre plutôt physique. Mais si l'on réfléchit au fait que chez *Asterias glacialis* et chez *Pomatoceros* (S. HÖRSTADIUS, 1923) ⁽¹⁾ c'est au contraire le Ca qui déclenche le même processus, on est enclin à croire qu'il s'agit plutôt d'un effet de la spécificité chimique; un mécanisme purement physique devrait être comparable chez des espèces différentes, un processus chimique peut au contraire reposer sur des éléments différents, en raison des différences mêmes entre les plasmes spécifiques.

Il resterait d'ailleurs à examiner, pour l'œuf de Pholade comme pour le spermatozoïde d'*Eulalia*, si cette action du potassium est ou non physiologique, si ce cation intervient dans le flétrissement de la vésicule germinative après la fécondation. Nous n'avons pu jusqu'à présent aborder cette question, qui éclairerait peut-être le mécanisme d'une des plus curieuses « manifestations dynamiques » de la fécondation.

* * *

Tout en attirant à nouveau l'attention sur l'importance des cations de l'eau de mer pour la physiologie des gamètes, ces deux observations montrent une fois de plus qu'il faut se garder d'attribuer à l'un ou l'autre de ces éléments, par une sorte de fétichisme, une importance excessive. Ces cations n'ont par eux-mêmes, ni l'un ni l'autre, aucune vertu mystérieuse. Ils ne font que déclencher les mécanismes élaborés par le protoplasme de chaque espèce.

(Université de Bruxelles.
Laboratoire d'Embryologie de l'Institut
d'Anatomie R. Warocqué.)

⁽¹⁾ Loc. cit.