

LA CATALASE DANS LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.
FÉCONDATION ET ACTIVITÉ DE CATALASE DES ŒUFS DE
SALMO IRIDEUS, *D'ESOX LUCIUS*, *DE BARBUS PLEBEIUS* (*)

UBALDO SAMMARTINO

(Institut d'Anatomie et d'Embryologie comparées de la R. Université de Roma
dirigé par le Prof. G. COTRONEI)

(Avec 3 figg. d. l. t.)

RÉSUMÉ DE L'A.

État présent de la question. - La recherche de l'activité catalasique dans l'ontogénèse et de sa signification biologique a intéressé plusieurs expérimentateurs, mais les difficultés inhérentes à la méthode, au matériel, et aux conditions spéciales, très différentes, dans lesquelles ces recherches ont été faites, ont conduit à des résultats insuffisants et souvent même contradictoires.

Toutefois aujourd'hui, soit pour les plus profondes connaissances sur le décours de la scission fermentative du peroxyde d'hydrogène (SØRENSEN, MICHAELIS, PECHSTEIN, MORGULIS), soit, surtout, pour les recherches de WIELAND et THUNBERG, qui nous donnent une vision plus claire de l'importance physiologique de la catalase, nous ne croyons pas inopportune une étude plus rigoureuse sur le comportement de la catalase dans le développement embryonnaire, pour en tirer quelques données positives sur les modifications produites dans l'œuf par la fécondation.

Tout en nous bornant à traiter notre argument, nous ne pouvons pas manquer de rappeler quelques données bibliographiques qui se rapportent à l'étude de cette enzyme dans l'ontogénèse.

ROBERT avait déjà trouvé la catalase dans les arthropodes et précisément dans les œufs d'*Epeira diademata*. W. E. BURGE et E. L.

(*) *Arch. di Farmacol. spéc. e Sc. aff.*, LIX, 49-85, avec 3 figg. d. l. t., 1935. - Pour les Tableaux et pour la bibliographie on renvoie au travail *in extenso*.

BURGE, en expérimentant sur la *Leptinotarsa decemlineata*, coléoptère des colonies, ont trouvé que la catalase augmente de l'œuf non fécondé à l'œuf fécondé et de celui-ci à la larve, pour diminuer, ensuite, dans les coléoptères adultes.

J. BODINE parvint à des résultats complètement opposés en utilisant quelques insectes, comme, p. ex., la luciole et la *Chortophaga viridifasciata*. Dans ces insectes, l'activité de la catalase diminue avec l'âge et avec la croissance du corps, parallèlement à la diminution de l'échange. ZIEGER, sans présenter des données comparatives rigoureuses, rapporte que les œufs non mûrs de plusieurs lépidoptères et de plusieurs diptères contiennent une quantité de catalase supérieure à celle des œufs mûrs. Il ne parle pas de la question de l'œuf fécondé ou non fécondé.

Le même A., en expérimentant sur les œufs d'un nématode (*Ascaris megalocephala*) obtint une valeur de catalase = 13,770 pour les œufs qui n'étaient pas encore mûrs et une valeur = 450 pour les œufs mûrs. Quant aux échinodermes, JACOBY (1910) rapporte que les œufs d'*Arbacia* contiennent une protéase qui produirait gélatine et glyciltryptophane, mais seulement après leur fécondation. Puisqu'on a obtenu les mêmes résultats avec les œufs parthénogénétiques, il faut admettre que ces enzymes ne proviennent pas des spermatozoïdes. Quoique ces expér. ne se rapportent pas à la catalase, elles présentent un grand intérêt, parce qu'elles démontrent que, dans ce cas, on ne doit attribuer au spermatozoïde aucune fonction fondamentale d'apport, mais seulement celle d'un facteur, qui, selon NEEDHAM, écarte des effets inhibitoires et permet l'accès de quelques coenzymes. En 1903 KOBERT avait individualisé la catalase dans les œufs des échinodermes (*Arbacia equituberculata*).

Toujours parmi les échinodermes, LYON et TERRY auraient trouvé, au contraire, que les œufs non fécondés *semblent avoir une activité catalasique supérieure à celle des œufs fécondés*. À la suite d'expér. successives, LYON revient sur son opinion et affirme que les œufs de *Toxopneustes* et les œufs d'*Arbacia*, quelques minutes après leur fécondation, déterminent un développement d' O_2 plus considérable que celui produit par les œufs avant leur fécondation. L'augmentation du pouvoir catalasique commencerait 3 minutes après l'adjonction du spermatozoïde et atteindrait son acmé en 20 minutes.

Cet argument a été repris plus tard par S. AMBERG et M. L. WINTERITZ qui ont fait des recherches plus complètes (1911). Ces AA., en partant des recherches de WARBURG et de J. LOEB, qui ont démontré que la fécondation augmente la consommation d'O₂ dans les œufs d'oursin, de diverses variétés, se proposèrent de rechercher s'il existait un rapport constant entre les processus oxydants et la capacité des tissus de scinder le H₂O₂. En expérimentant sur des œufs fécondés et sur des œufs non fécondés d'oursin, tenus dans des suspensions ayant le même poids et la même dilution, ces AA. constatèrent que la fécondation détermine une augmentation de l'oxydation cellulaire (d'environ 4-6 fois), mais qu'elle n'occasionne aucune variation de l'activité catalasique. La rapidité de production d'O₂ dans les œufs était constante.

Nous citons encore les travaux de ZIEGER, STECHE et WAENTIG qui obtinrent, pour le *Strongylocentrotus lividus*, les valeurs catalasiques suivantes: œufs non mûrs, max. 23,073-14,807 min. et qui trouvèrent que les œufs mûrs étaient très inactifs.

En passant aux téléostéens, AMBERG et WINTERITZ trouvèrent la catalase dans les œufs de *Fundulus* et constatèrent que son activité augmente dans les œufs soumis à cytolyse. En 1924, en employant les œufs de *Salmo Fario*, et comme matériel la larve "in toto", PETTINELLI et nous mêmes, non avons pu déterminer les valeurs de la catalase pendant toute la période de développement de l'embryon. Nos recherches ont prouvé que le contenu, en enzyme, déterminé selon BURGE, augmente toujours, depuis le commencement de la fécondation jusqu'à la réabsorption du sac vitellin.

Aussi sur les œufs d'amphibies on a fait quelques recherches. En 1907 OSTWALD trouva, dans les spermatozoïdes de *Triton cristatus*, une quantité de catalase 3 fois plus grande que celle des œufs mûrs de même qu'une peroxydase, relevable moyennant la teinture de gaïac. Il trouva, en outre, qu'en mélangeant les extraits de spermatozoïdes et les extraits d'œufs, ce mélange présentait, 4 hh. après, une augmentation de 23% du contenu en catalase.

Dans les travaux de HALL et de BIALASCEWICZ nous trouvons des expér. plus étendues sur les embryons d'amphibies. BIALASCEWICZ se servit d'embryons de *Rana fusca*. En considérant le maximum et le minimum de la courbe qu'il a obtenue, il affirme que la vitesse de scission du H₂O₂ se maintient égale pendant le développement de l'em-

bryon. HERLITZKA aussi (1907) a étudié la catalase de la *Rana esculenta*. Selon cet A., la maturation des œufs provoquerait une augmentation d'activité.

Nous devons mentionner tout particulièrement les recherches de HALL sur l'embryon de *Bufo americanus*, par lesquelles cet A. a pu démontrer l'augmentation progressive de la catalase depuis la fécondation jusqu'à l'éclosion de l'embryon.

En comparant la courbe catalasique de HALL dans les amphibiens avec celle de SAMMARTINO et PETTINELLI dans les œufs de poissons, NEEDHAM est porté à relever que la courbe de HALL est essentiellement du même type que celle que nous avons obtenue dans nos expériences précédentes.

Du coup d'œil que nous avons jeté sur la littérature il résulte évident qu'il est encore impossible de s'orienter relativement à la fonction biologique de la catalase dans l'ontogénèse, soit parce que la plupart des travaux sont incomplets, soit parce qu'on ne tient aucun compte de ces problèmes essentiels: 1) quelle est l'influence de la fécondation sur l'action du ferment? 2) l'apport du spermatozoïde modifie-t-il les caractères biochimiques de l'œuf, en ce qui concerne l'action enzymatique de la catalase?

La recherche du comportement de cette enzyme dans l'ontogénèse acquiert le plus grand intérêt, d'autant plus que quelques AA., comme BURGE, ont cherché à donner une base solide à l'opinion de l'existence d'un rapport direct entre catalase et processus d'oxydation générale.

Selon BURGE, le contenu en catalase, dans les individus à peine nés, est moins considérable que dans la mère et il augmente rapidement dans les tissus après la naissance. Le ralentissement de l'échange dans les œufs non fécondés serait en rapport avec la petite quantité d'enzyme qui augmenterait après la fécondation. Ce fait porte BURGE à affirmer que l'augmentation des processus d'oxydation, après la fécondation, dépend de l'activité catalasique, parce que les œufs augmenteraient leur catalase sous l'impulsion du spermatozoïde.

Mais il est évident que peu des travaux cités répondent au problème principal; et ils ne sont pas confirmés par de nombreuses expériences. De là la nécessité de faire des recherches à partir du premier stade de la fécondation et de les étendre, éventuellement, à d'autres espèces animales.

Seulement ainsi, et seulement si l'on tient compte des divers processus de modifications physico-chimiques qui accompagnent le phénomène de la fécondation, on peut arriver à constater les modifications de l'activité catalasique.

Il m'a donc semblé intéressant reprendre les expér. sur cet argument, pour contribuer à la connaissance de l'influence de la fécondation sur le comportement de la catalase et, par réflexe, à celle du mécanisme de la fécondation.

Avec la reprise des études sur la valeur du spermatozoïde, d'abord comme facteur essentiel pour la division de l'œuf, ensuite comme apporteur de caractères héréditaires, on a fait beaucoup d'expériences pour vérifier son importance dans la physiologie de la fécondation.

Entre autres, les démonstrations de l'École de WARBURG sur les processus respiratoires, avant et après la fécondation, mettent à l'ordre du jour le problème des recherches des substances qui sont proposées à la réalisation de ces processus.

J'ai donc cru opportun de procéder à des recherches systématiques pour étudier la catalase qui, selon plusieurs AA., pourrait avoir une grande importance sur le mécanisme des oxydations de l'œuf mûr, fécondé ou non, et pour pouvoir connaître ce qui doit être attribué au spermatozoïde comme simple apporteur du ferment, sans me préoccuper, pour le moment, de la possibilité qu'il dégage, dans le germe en voie de développement, des énergies utiles à la formation du ferment même.

Méthode de recherche. — Pour la détermination de la catalase nous avons suivi la méthode de BURGE qui consiste dans la détermination du volume d' O_2 moléculaire qui se dégage en un intervalle de temps donné, d'une quantité déterminée de tissu, broyé homogènement et mis à réagir avec une sol. de H_2O_2 à concentration constante.

Cette méthode présente de nombreuses causes d'erreurs, qui échappent quelquefois à la plus scrupuleuse attention de l'expérimentateur.

La sol. de H_2O_2 doit être la même dans toutes les déterminations; des échantillons divers de H_2O_2 peuvent donner des résultats divers, avec des variations de 15 à 35 %. La différence des valeurs d' O_2 dégagé, que l'on obtient en employant des sol. diverses de H_2O_2 , dépend du préservatif acide qu'elles contiennent en quantité approximativement égale à 0,05 %, c'est-à-dire d'une inégalité de leur acidité.

La réaction du milieu a une importance remarquable sur la rapidité de réaction (EULER, SOERENSEN, MICHAELIS, MORGULIS, SAMMARTINO, ecc.).

Cela nous explique comme quoi, dans des conditions inégales, à des t° et à des concentrations diverses des ions H, les résultats doivent être divers, même dans une expér. identique. Même en tenant compte de la concentration des ions H des sol. de H_2O_2 et de leur optimum de concentration, on n'arrive pas à écarter les innombrables causes de perturbation et, par conséquent, d'erreur.

FALK, MAC GUIRE et BLOUNT constatèrent que, pour l'action optimum de la catalase, il n'existe pas une concentration de ions H bien définie. Selon SÆRENSSENS, elle dépend de la durée de la réaction. En effet, SÆRENSSENS trouva un pH optimum de 6,73 pour 320 minutes et un pH = 7,1 pour 40'.

D'autres (MEYER BODANSKI) trouvèrent, pour la catalase du sang, un optimum de pH = 7 pour 10', de pH = 8 pour 5' et de pH = 10 pour 2'!

RONA PETER et ARISTIA DABOVICANU, pour la catalase du foie, donnent un optimum de pH = 7 et une action encore efficace à pH = 11; STERN trouva, pour le foie de cheval, un pH de 5,4. BODANSKI put déduire, de nombreuses expér., que l'activité de l'enzyme était presque totalement inhibée par une concentration de ions H correspondant à un pH = 1 et légèrement inhibée à un pH = 2; que la vitesse de réaction augmente si l'acidité du H_2O_2 diminue et qu'elle est plus grande si la sol. est légèrement alcaline. Analoguement elle retarde à pH = 11.

MORGULIS a fait des études diligentes sur la scission fermentative du H_2O_2 . MORGULIS S., BEBER M., RABKIN J., en recherchant les effets de la t° sur la réaction de la catalase et des diverses concentrations en H des sol. de H_2O_2 , établirent, en un premier temps, que la destruction de la catalase, due au H_2O_2 , augmente avec la t° . Pour cela l'activité de la catalase a son optimum entre 0° et 10° C. Entre 30° et 40° la destruction de la catalase est rapide. Le coefficient de VANT'HOFF varie selon la t° et selon la concentration en H_2O_2 . Le facteur ARRHENIUS est proportionnel à la t° et à la concentration en H_2O_2 .

Successivement les mêmes AA. communiquèrent que la rapidité de destruction de l' H_2O_2 augmente, si la t° et la concentration des sol. dans l' H_2O_2 augmentent et qu'elle semble suivre la loi d'une réaction monomoléculaire. L'inactivation de la catalase, qui commence à 40° environ, est complète à 58°. Entre 55° et 60° elle suit la loi des réactions bimoléculaires. Au contraire, le refroidissement à 10° n'exerce aucune influence sur la catalase.

L'optimum d'activité pour la catalase du rein de bœuf est compris entre $\text{pH}=6$ et $\text{pH}=8$; l'extension de l'activité va de $\text{pH}=5$ à $\text{pH}=9$. La destruction de la catalase, causée par la t° , varie selon le pH ; elle atteint son maximum au pH le plus actif. L'effet de la t° est presque nul à $\text{pH}=4$; l'activité relative est plus grande aux t° élevées.

* *
*

La difficulté de réaliser toutes les conditions pour la détermination de l'activité catalasique nous explique comme quoi, encore aujourd'hui l'expérimentateur rencontre d'innombrables difficultés.

Mais si, d'un côté, la valeur du pH des sol. de H_2O_2 employées est nécessaire, re pour comprendre les valeurs réelles d'activité catalasique dans chaque cas expérimental, toutes les précautions qu'on doit prendre pour maintenir uniformes les conditions de t° , surtout lorsque la recherche exige une longue série de déterminations, ne sont pas moins nécessaires.,

À cause de la saison, nous n'avons pas pu travailler à la t° optimum de 2 C° (indiquée par les recherches de MORGULIS).

Nous n'avons pas cru opportun de reporter, chaque fois, les sol. de H_2O_2 au point neutre et cela en harmonie avec les recherches précédentes sur le *Sa'mo fario*, pendant lesquelles la sol. employée fut laissée à un $\text{pH} = 3,8$ pour éviter qu'elle pût se modifier, étant donné le temps assez long nécessaire pour les déterminations.

Mais si les valeurs de nos recherches doivent être rapportées à un pH de 3,8, assez bas, comme nous avons pu le constater dans la sol. de *Perhydrol Merck* que nous avons employée, ces valeurs, sans être intrinsèquement réelles, conservent leur signification parce qu'on peut les comparer.

Pour les motifs susdits nous avons voulu apporter quelques modifications à l'appareil de détermination.

Comme récipient nous avons employé deux bouteilles de Jéna, en verre neutre, de la capacité d'environ 250 cc, munies, à l'extrémité supérieure, d'un bon bouchon à l'émeri, terminé par un tube, moyennant lequel on les raccordait à 2 burettes d'HEMPEL, de la capacité de 100 cc.. Sur le côté des deux bouteilles était appliqué un gros robinet à l'émeri qui aboutissait à l'intérieur d'une cuvette de 5 cc.. Sur cette cuvette on posait une navette en papier parchemin, dans laquelle on avait préalablement pesé la substance à étudier.

Des expér. préliminaires démontrèrent que le papier parchemin ne scinde pas du tout le H_2O_2 , par secouement. Il présente donc un avantage relativement à la capsule en verre ou en porcelaine – employée par quelques AA. – mise à flotter sur la sol. de H_2O_2 dans l'attente que le secouement produisit le mélange.

Après avoir disposé les appareils, c'est-à-dire raccordé les communications entre les bouteilles de réaction, placées dans un agitateur de SPIEGELBERG, et les burettes d'HEMPEL, avant même de mettre en mouvement le dispositif, actionné par

un petit moteur électrique qu'on pouvait régler, on tournait contemporanément les robinets des deux cuvettes internes et on provoquait ainsi la chute de la navette sur le H_2O_2 qui était au fond des bouteilles. Quelquefois il fallait agiter, pendant plusieurs minutes, pour obtenir une sol. homogène. Naturellement, avant de provoquer la réaction, on avait soin d'attendre quelques minutes pour que, dans le système fermé, pût s'établir l'équilibre thermique. La lecture du niveau de l'eau dans les burettes d'HEMPEL n'était faite qu'à équilibre thermique obtenu. De nombreux contrôles nous ont démontré que les causes les plus graves d'erreur, dans ces déterminations, sont dues à de petits changements de t^0 , souvent diverse dans les deux appareils. Tant dans la saison hivernale que dans la saison estivale, il est nécessaire que les différentes parties de l'appareil ne soient jamais à contact direct avec les mains de l'expérimentateur et cela pour éviter des erreurs remarquables.

On agitait les 2 bouteilles moyennant un agitateur de SPIEGELBERG, à une moyenne de 120-140 tours par minute. Les cuvettes restaient à l'intérieur à une hauteur déjà prévue pour empêcher que l'onde liquide du H_2O_2 pût heurter contre leurs bords.

Comme terme de comparaison nous nous sommes servis des valeurs catalasiques déduites de la quantité d' O_2 développé par notre sol. de *Perhydrol* (1 cc = 10,0 d' O_2) en 10 minutes.

Mais, puisque nous nous sommes aperçus que souvent, à cause du retard dans la suspension homogène du matériel sous examen, le développement de l' O_2 retarde dans un des appareils, sans que ce fait constitue une diminution réelle d'activité, nous avons pris, comme valeurs catalasiques celles qui résultent de la quantité d' O_2 obtenu jusqu'à épuisement de la réaction (valeurs globales).

Expériences personnelles. — Les déterminations ont été faites sur les œufs de *Salmo irideus*, *Esox lucius*, *Barbus plebeius*. Le matériel nous a été gentiment fourni en partie par le "Stabilimento ittioenico", de Roma et, en partie, il nous est parvenu du lac de Vico et du fleuve Paglia (Orvieto).

La fécondation artificielle a été faite dans le même "Stabilimento ittioenico", ayant soin d'opérer sur une quantité d'œufs suffisante pour nos déterminations et provenant d'une seule femelle.

Le pourcentage des embryons qui se sont développés a été d'environ 100%.

Nous avons divisé ainsi nos expériences: avec une 1^{ière} série nous avons cherché à étudier le comportement des œufs mûrs, obtenus avec pression de l'ovaire et laissés dans le même liquide ovarique, comparativement aux œufs de la même femelle, obtenus de l'ovaire et mis immédiatement dans l'eau Marcia.

Successivement nous avons étudié le comportement de la catalase dans les œufs mûrs non fécondés et laissés dans l'eau Marcia comparativement à la catalase des mêmes œufs fécondés.

En 3^{ème} lieu nous nous sommes proposé de suivre, pendant plusieurs heures, le développement des œufs fécondés et de comparer leur activité catalasique avec celle d'une égale quantité d'œufs mûrs non fécondés et tenus dans l'eau Marcia. On en prenait en moyenne 20-

Tableau récapitulatif des valeurs catalasiques des œufs de *Salmo irideus*; cc d'O₂ moléculaire développé par 1 gr d'œufs et 50 cc de sol. de *Perhydrol* à 10 Vol.

Temp après la fécondation	Oeufs mûrs vierges non déposés dans l'eau	Oeufs mûrs vierges déposés dans l'eau Marcia	Oeufs fécondés et déposés dans l'eau Marcia	Facteur % entre œufs fécondés et œufs vierges, déposés dans l'eau
2	12,4	10,5	10,9	+ 103
4	—	10,5	10,7	+ 101
6	—	9,6	9,7	+ 101
8	—	10,1	10,5	+ 103
10	—	11,2	11,1	100
12	—	12,2	12,2	100

Tableau récapitulatif des valeurs catalasiques des œufs d'*Esox lucius*; cc d'O₂ moléculaire développé par 1 gr d'œufs et 50 de sol. de *Perhydrol* à 10 vol. O₂.

Temps écoulé depuis le commencement de la fécondation ou de la pression, ou de la déposition dans l'eau	Oeufs mûrs non fécondés et non déposés dans l'eau Marcia	Oeufs mûrs non fécondés et déposés dans l'eau Marcia	Oeufs mûrs fécondés et déposés dans l'eau Marcia	Facteur %
Minutes 48	20,8	17,4	—	— 119
hh. 2	—	15,2	15,0	— 101
hh. 4	—	14,8	14,6	— 101

25 des uns et des autres, soit environ 1 gr; on les essayait soigneusement avec un papier filtre lisse, spécial, et on les broyait rapidement dans un mortier en verre, jusqu'à obtenir une bouillie homogène.

ne. Ensuite, on en pesait exactement un gramme à la balance analytique, dans des navettes spéciales en papier, et toutes les deux heures on procédait à la détermination de la catalase.

Sans rapporter les nombreux tableaux des expér., nous donnons

Tableau récapitulatif des valeurs catalasiques des œufs de *Barbus plebeius*; cc d'O₂ développés par 1 gr de substance et 30 cc de sol. de *perhydrol*.

Temps écoulé depuis le commencement de la pression, ou depuis la déposition dans l'eau douce, ou depuis la fécondation	Oeufs mûrs non fécondés est non déposés dans l'eau Marcia	Oeufs mûrs non fécondés et déposés dans l'eau Marcia	Oeufs mûrs fécondés et déposés dans l'eau Marcia	Facteur %
hh. 0,40	50,0	20,4	—	— 245
hh. 1,45	—	19,6	20,0	+ 102
hh. 4,0	—	20,8	20,8	100
hh. 6,0	—	22,4	22,4	100
hh. 8,0	—	24,4	23,9	— 101

Activité catalasique et périodes de développement des œufs de *Salmo irideus*, *Esox lucius*, *Barbus plebeius*.

Espèce	cc d'O ₂ développé par 1 gr. d'œufs fécondés	Période intermède entre fécondation et r/absorption complète du vitellin	Observation
<i>Salmo irideus</i>	10,5	÷ 50 jours	
<i>Esox lucius</i>	19,2	÷ 7 "	
<i>Barbus plebeius</i>	19,6	÷ 7 "	

ici les résultats de quelques séries, en avertissant que ces résultats ont toujours été constants et que les œufs, pour chaque série, ont été fournis par la même femelle.

Considérations et conclusions. — Passons maintenant à l'examen détaillé des résultats des tableaux récapitulatifs. Ces résultats confirment clairement la démonstration que nous avons déjà donnée relativement au pouvoir de scission du H_2O_2 qui est plus grand pour les œufs sortis de l'oviducte et traités directement sans les déposer préalablement dans l'eau Marcia. En effet, nous avons trouvé des valeurs plus élevées d' O_2 dégagé des œufs vierges, non déposés dans l'eau, comparativement à celles fournies par les mêmes œufs déposés dans l'eau Marcia, et cela, non seulement en employant comme matériel à expériences les œufs de *Salmo irideus*, mais aussi en nous servant des œufs de *Barbus plebeius* et d'*Esox lucius*. Dans ces derniers surtout les différences sont très sensibles.

En d'autres termes l'activité catalasique des œufs vierges, déposés dans l'eau, est inférieure à celle que l'on constate dans les mêmes œufs non soumis au même traitement et non fécondés.

Pour comprendre ce comportement il est nécessaire de penser aux phénomènes physico-chimiques, qui se manifestent, au commencement de la fécondation, lorsque l'œuf est déposé dans son milieu naturel de vie et de reproduction (eau de mer, eau douce, etc.).

La sensible augmentation d'eau pendant la croissance, découverte par DAVENPORT (1897) et illustrée par SCHAPER (1902), et la connaissance des variations de la pression osmotique pendant les premières périodes de développement (BACKMANN et RUNNSTRÖM) nous ont conduits à une connaissance exacte de la grande importance de l'eau d'imbibition, de l'eau intra-cellulaire, indispensable au travail successif de développement et de croissance.

L'hypertonie initiale de l'œuf est la cause d'importantes modifications de la pression osmotique, pendant les premiers stades de développement de l'œuf à contact avec le milieu extérieur. Par ex., l'œuf de grenouille qui, dans l'ovaire, a un point de congélation (Δ) égal à celui de l'organisme qui l'a produit, présente une diminution brusque de la pression osmotique qui atteint environ $\frac{1}{10}$ de sa valeur initiale. Ensuite, au fur et à mesure que la division cellulaire reconstitue le nouvel organisme, elle reprend graduellement sa valeur presque égale à celle de l'organisme adulte.

Sérum de grenouille adulte	0°,465
Eau douce où les grenouilles déposent leurs œufs	0°,060

Oeufs ovariens	0°,480
Oeufs déposés et fécondés, mais non segmentés	0°,045
Larves de 20-25 jours de vie	0°,405

La chute qui se produit au moment de la fécondation n'est pas déterminée par une diminution des matières dissoutes, comme on peut le relever des dosages des résidus secs des œufs en voie de développement. Pour cela, en excluant les phénomènes possibles de condensation moléculaire ou d'adsorption de sels de la part des colloïdes de l'œuf, on doit conclure que la pression osmotique baisse par absorption d'eau du milieu extérieur.

Mais l'absorption d'eau du milieu extérieur, nécessaire pour rétablir l'équilibre entre la pression osmotique des œufs mûrs et le milieu hydrique, a lieu non seulement pour l'œuf fécondé ou qui va être fécondé.

Par des processus d'imbibition l'œuf hypertonique, même non fécondé, absorbe rapidement, du milieu extérieur, la quantité d'eau indispensable à son isotonicité.

Ce phénomène démontre la grande importance biologique de l'eau d'imbibition, qui est exigée par l'hypertonie de l'œuf et qui, à son tour, constitue un admirable facteur de prévention, car avec l'introduction de cet élément reste assurée la base physiologique aux nouvelles exigences de la division cellulaire. C'est-à-dire que la cellule-œuf, pour ce qui concerne l'eau intracellulaire de DAVENPORT, pourvoit avec ses propres moyens, indépendamment du stimulus dû au spermatozoïde. Sur la base de cette hydroperméabilité cellulaire, LILLIE R.S. a étudié les modifications de volume, dans le temps, des œufs fécondés et des œufs non fécondés d'*Arbacia* et de *Strongylocentrotus*; il a exprimé, avec une constante K de l'équation suivante, la valeur d'imbibition:

$$K = \frac{L}{t} \quad \text{Ln} \frac{V_{eq} - V_0}{V_{eq} - V_t} \quad \text{où}$$

V_0 , V_{eq} , V_t représentent respectivement le volume initial, le volume à équilibre établi et le volume au temps t .

Il est donc évident que la plus grande activité catalasique de l'œuf mûr, tout de suite après sa sortie de l'organisme maternel, comparativement à l'œuf même qui a subi les phénomènes d'imbibition, est

due exclusivement à la plus grande quantité de matériaux de l'œuf qui vient à se trouver dans l'unité de substance que nous avons examinée.

De plus la valeur de la capacité de décomposer le H_2O_2 acquiert une remarquable importance, même indirecte, pour la démonstration de l'hydroperméabilité.

En appliquant sa formule, LILLIE a trouvé que le volume de l'eau qui entre dans des œufs fécondés d'*Arbacia* en 3' est de $11 \times 10^5 \mu^3$ et de $3,6 \times 10^5 \mu^3$ dans les œufs vierges.

Si nous voulions admettre une différence identique entre les œufs fécondés et les œufs non fécondés, on ne s'expliquerait pas la grande différence des valeurs d' O_2 dans les œufs vierges de *Barbus plebeius* et d'*Esox lucius*, comparativement aux mêmes œufs vierges déposés dans l'eau. L'identité des valeurs, trouvées pour ces œufs et pour les œufs fécondés, ferait penser que l'augmentation de volume devrait être égale pour les œufs mûrs déposés dans l'eau et pour les œufs mûrs fécondés. Il s'agirait donc d'une augmentation vraiment apparente de l'activité catalasique des œufs ovariens mûrs, non déposés dans l'eau, et pour cela, sans eau d'imbibition qui sera absorbée, par contre, par l'œuf non fécondé, quand il viendra à contact avec le milieu hydrique extérieur.

L'équilibre établi entre pression osmotique de l'œuf hypertonique et pression osmotique de l'eau Marcia, l'unité de poids que nous avons choisie pour l'expérience ne nous donnera plus la même quantité de matériaux que dans les œufs ovariens, mais une quantité plus petite + une certaine quantité d'eau d'absorption. De là, la différence d'activité catalasique que nous avons constatée après la déposition des œufs dans l'eau.

D'après nos expér. nous ne croyons pas que l'œuf fécondé puisse absorber une plus grande quantité d'eau que l'œuf non fécondé; d'autre part, on ne peut pas résoudre cette question avec des expér. cytométriques comme celles de LILLIE, fondées sur l'hydroperméabilité des espèces marines ou fluviales. On pourra avoir une solution de cette question lorsqu'il sera possible d'effectuer des recherches pondérales rigoureuses avec la détermination contemporaine des cendres et de l'eau.

Si nous considérons les valeurs globales de l'activité catalasique des œufs des diverses espèces que nous avons étudiées, nous observons que cette activité varie au fur et à mesure que, des œufs ovariens de *Salmo irideus* (cc 12,4 de O_2), on procède vers l'*Esox lucius* (cc 20,8)

et vers le *Barbus plebeius* (cc 50 !). En mettant en rapport les valeurs de l'activité catalasique avec les temps de développement de l'œuf, dans les diverses espèces examinées, on constate une augmentation de la catalase, presque proportionnelle à la rapidité de ce développement même: plus lente dans le *Salmo irideus* (50 jours), rapide dans le *Esox lucius*, très rapide dans le *Barbus plebeius*, dans lequel, après 8 hh., on pouvait constater les premières formations du disque embryonnaire !

Mais ce parallélisme à part, c'est-à-dire que le contenu de catalase dépend des temps de développement de l'embryon, et, selon BURGE, est en rapport avec le métabolisme plus accentué, arrêtons nous à considérer les résultats que nous avons obtenus avec des œufs vier-

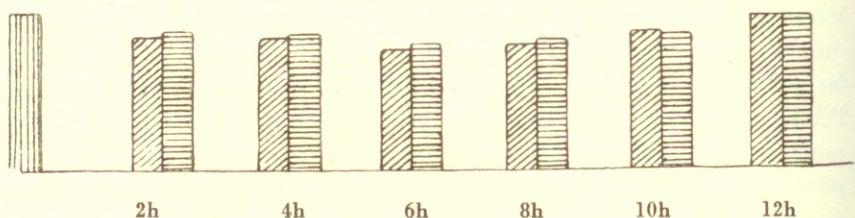


Fig. 1. — *Salmo irideus*

Exp. <i>Salmo irideus</i>	}		Vol. d'O ₂ dével. par 1 gr d'œufs ovariens.
			Vol. d'O ₂ dével. par 1 gr d'œufs ovariens, déposés dans l'eau Marcia.
			Vol. d'O ₂ dével. par 1 gr d'œufs fécondés et déposés dans l'eau Marcia.

ges déposés dans l'eau Marcia et les œufs de la même femelle fécondés dans l'eau Marcia.

Avec les résultats des tableaux récapitulatifs nous avons construit les graphiques 1, 2, 3 où, sur l'axe des abscisses, nous avons transcrit les temps de développement de l'œuf et, sur l'axe des ordonnées, la quantité d'O₂ développée, lorsqu'on met à réagir 1 gr d'œufs broyés sur une quantité constante de H₂O₂ à pH toujours égal.

De ces graphiques il résulte évident que le dégagement d'O₂ des œufs fécondés est égal à celui des mêmes œufs vierges déposés dans l'eau Marcia. La constance et la précision de chaque donnée, non seulement pour ce qui concerne les œufs de *Salmo irideus*, mais aussi pour les œufs d'*Esox lucius* et de *Barbus plebeius*, nous consentent

d'affirmer que le phénomène de la fécondation ne détermine aucune

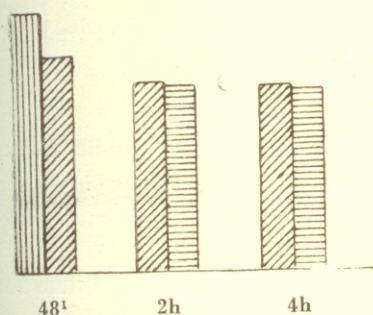


Fig. 2 — *Esox lucius*

modification de l'activité catalasique de l'œuf et d'en déduire, par conséquent, que le spermatozoïde n'exerce aucune action sur cette activité. Nous rappelons, à présent, la littérature, pour grouper les données expérimentales qui contribuent à la démonstration de cet énoncé, déjà entrevu par quelques AA. et démontré moyennant des expér. rigoureuses par d'autres. Nous rappelons que LYON et TERRY, expérimentant sur les œufs

des échinodermes, avaient trouvé que les œufs non fécondés avaient

une activité supérieure à celle des œufs fécondés. Plus tard LYON revenait sur l'argument et, se basant sur de nouvelles expér., il concluait "que les œufs fécondés présentent une augmentation du pouvoir catalasique qui commencerait 3 minutes après l'adjonction du spermatozoïde et atteindrait son acmé en 20 minutes,,. Il s'agirait donc d'une action très passagère et, selon nous, il n'est pas compréhensible pourquoi, après ce temps, cette augmentation de l'activité catalasique devrait disparaître. A moins qu'on ne veuille admettre une augmentation

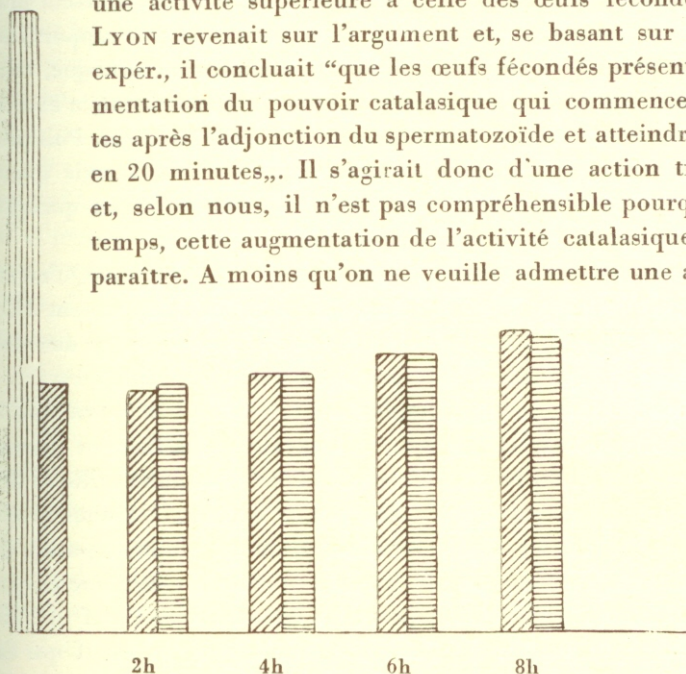


Fig. 3 — Expériences sur les œufs de *Barbus plebeius*

apparente de cette activité, due à une sensible perte d'eau de la part de l'œuf, perte qui dépendrait des échanges compliqués de l'œuf avec le mi-

<i>Esox lucius</i> . . .	{		Vol. d'O ₂ dévelop. par 1 gr d'œufs ovariens
<i>Barbus plebeius</i> . . .			Vol. d'O ₂ dévelop. par 1 gr d'œufs ovariens, déposés dans l'eau Marcia.
			Vol. d'O ₂ dévelop. par 1 gr d'œufs, fécondés et déposés dans l'eau Marcia.

lieu externe, tout de suite après sa fécondation.

Mais, avec cette hypothèse, aurait de la peine à se concilier l'extrême uniformité des données que nous ont fournies nos expériences sur les œufs non fécondés, expériences qui, souvent, ont été commencées 30-40 minutes après la fécondation.

Quoi qu'il en soit, nous trouvons un bon point d'appui dans les expér. d'AMBERG et WINTERNITZ qui les ont faites avec une technique rigoureuse. Ces AA. expérimentèrent sur les échinodermes, parce que des recherches précédentes de WARBURG avaient démontré que les œufs d'*Arbacia*, tout de suite après leur fécondation, subissent une augmentation des processus d'oxydation qui peut atteindre le rapport 1:6.

De l'ensemble de leurs expér. ces AA. purent conclure que, contrairement aux résultats obtenus par LYON, la fécondation n'exerce aucune influence sur l'activité catalasique des œufs d'oursin. Puisque, après leur fécondation, ces œufs consomment une plus grande quantité d'O₂, il n'est pas probable que l'activité catalasique ait quelque rapport direct avec les processus d'oxydation, en général.

En outre ces AA. démontrèrent deux faits intéressants: 1. - Qu'en effectuant ces recherches 12' après la fécondation, le développement d'O₂ restait parfaitement égal, tant dans les œufs non fécondés que dans les œufs fécondés: ce qui ne confirmait pas les recherches de LYON; 2^{de}. - Qu'à une concentration donnée, employée par les AA., le spermatozoïde démontra un pouvoir catalasique tellement bas qu'ils n'en tinrent aucun compte dans leurs recherches successives. L'examen critique des conclusions auxquelles sont arrivés AMBERG et WINTERNITZ nous révèle l'importance de la double démonstration qu'ils ont donnée, puisqu'ils mirent en relief la pauvreté, en catalase, de la cellule masculine et, par conséquent, l'impossibilité d'un apport de substance à l'œuf et l'absence de toute modification de l'activité catalasique de l'œuf qui est pourvu de cette propriété.

Nous arrivons au même résultat à la suite de nos expér. faites sur un matériel qui, sous divers points de vue, se prête mieux à de plus rigoureuses expér. quantitatives. Le fait d'avoir employé une sol.

de H_2O_2 à $pH=3,8$, au lieu de l'employer à réaction neutre, comme AMBERG et WINTERNITZ ont fait, ne peut nullement altérer les rapports qu'on a constatés respectivement dans les œufs fécondés et dans les œufs non fécondés.

Le caractère remarquablement acide de la sol. de H_2O_2 peut, comme il a été démontré (EULER, WINTERNITZ et MELOY, SAMMARTINO, etc.), nous donner des valeurs globales sûrement plus basses, mais il ne peut pas altérer le coefficient $\frac{O^2 \text{ œufs non fécondés}}{O^2 \text{ œufs fécondés}} = 1$ que nous avons à peu près obtenu.

On se demande alors ce qu'il y a eu de vrai dans les expér. de W. E. BURGE et E. L. BURGE, sur la *Leptinotarsa decemlineata* et précisément dans le fait que la catalase augmenterait de l'œuf non fécondé à l'œuf fécondé.

Nos recherches et celles des AA. qui avaient déjà constaté les mêmes faits dans des espèces diverses, acquièrent la valeur d'une contribution à la solution du problème qui concerne le mécanisme de modification de l'œuf à cause du spermatozoïde, et avant que le système devienne hétérogène. D'autant plus à cause de nos recherches actuelles qui sont les premières qui constatent les faits susexposés dus au spermatozoïde dans les vertébrés. Le problème prend un caractère général et pour cela, tout en nous réservant de retourner sur cet argument, nous avons entrepris l'étude de la catalase pendant les premières périodes du développement embryonnaire et nous en publierons prochainement les résultats.

En résumant les observations que nous avons faites dans nos expér. précédentes nous devons conclure que:

1) - Les œufs ovariens de *Salmo irideus*, d'*Esox lucius* et de *Barbus plebeius* présentent une plus grande activité catalasique que les mêmes œufs, fécondés ou non, déposés dans l'eau.

2) - L'augmentation de l'activité catalasique des œufs ovariens, comparativement aux mêmes œufs déposés préalablement dans l'eau Marcia et comparativement aux mêmes œufs fécondés, est une augmentation apparente due à la plus grande quantité de matériaux de l'œuf contenus dans notre unité de mesure (1 gr), relativement aux œufs qui ont subi, par imbibition, une remarquable augmentation de volume, due au milieu hydrique extérieur.

3) - Tout de suite après la fécondation, les œufs de *Salmo irideus*, d'*Esox lucius*, et de *Barbus plebeius* et, ensuite, jusqu'à l'apparition des premières traces de segmentation, révèlent constamment le même pouvoir catalasique (déduit de leur propriété de décomposer le H_2O_2) que les mêmes œufs non fécondés.

4) Dans les œufs de *Salmo irideus*, à développement plus lent, on remarque, à la 6^{ième} h. après la fécondation, le minimum d' O_2 développé, tout en restant inaltéré le rapport des valeurs entre œufs fécondés et œufs non fécondés.

5) Tant dans les œufs de *Salmo irideus* que dans les œufs de *Barbus plebeius*, pour lesquels il est possible de prolonger les déterminations jusqu'à la 12^{ième} et à la 8^{ième} h. après la fécondation, on observe que les valeurs de l' O_2 dégagé, plus basses, respectivement, dans la 6^{ième} et dans la 2^{ième} h., tendent à remonter à la fin de la période d'examen. Ces variations doivent, probablement, dépendre des modifications du contenu en eau d'imbibition, car elles se manifestent également dans les œufs ovariens non fécondés, déposés dans l'eau Marcia et dans les œufs fécondés.

6) - Dans les œufs d'*Esox lucius* et dans ceux du *Barbus plebeius*, qui ont un développement beaucoup plus rapide que les œufs de *Salmo irideus*, la capacité de scinder le O_2H_2 est plus élevée.

7) - Les œufs de *Barbus plebeius* présentent un contenu en catalase remarquable, comparativement aux œufs de *Salmo irideus* et d'*Esox lucius*.

8) - La pénétration du spermatozoïde, dans le processus de la fécondation, ne modifie nullement l'activité catalasique de l'œuf. Ces constatations, qu'on a faites pour la première fois sur les vertébrés, peuvent acquérir une valeur générale, si on les compare aux données obtenues expérimentant sur quelques invertébrés.
