

50 376  
1972  
143

50376  
1972  
143

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE DE TROISIEME CYCLE

BIOLOGIE CELLULAIRE

présentée par

JEAN-PIERRE VILAIN

EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES ELECTRIQUES MEMBRANAIRES AU  
COURS DE LA MATURATION DES OVOCYTES ET DE LA SEGMENTATION  
CHEZ *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle)



soutenue le 27 juin 1972  
devant la commission d'examen

MM.	M. DURCHON	Président
	A. CAPURON	Rapporteur
	P. GUILBAULT	Examineur
Mme	N. LE DOUARIN	Invitée

AVANT-PROPOS

Je saisis ici l'occasion de remercier Monsieur le Professeur P. GUILBAULT qui a suivi ce travail avec beaucoup d'intérêt et m'a fait bénéficier de ses connaissances en matière d'Electrophysiologie. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour sa bienveillance à mon égard.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur A. CAPURON dont j'ai suivi l'Enseignement, et auprès duquel j'ai toujours trouvé une audience bienveillante. Je lui suis reconnaissant de la confiance qu'il m'a témoignée et je le remercie des conseils qu'il m'a prodigués.

Je voudrais exprimer à Monsieur le Professeur M. DURCHON ma profonde gratitude pour l'Enseignement qu'il m'a donné et pour l'intérêt qu'il daigne témoigner en acceptant d'examiner ce travail.

Madame le Professeur N. LE DOUARIN me fait le grand honneur de juger ce travail en acceptant de participer à mon jury de thèse. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de mon profond respect.

Mes remerciements vont également à Madame Y. MOUNIER. Je lui suis avant tout redevable de ma formation de chercheur. Qu'elle veuille bien croire à ma profonde reconnaissance.

Je ne saurais oublier ce que je dois aux personnes, qui à des titres divers, ont contribué à l'élaboration de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon amicale reconnaissance.

# SOMMAIRE

## SOMMAIRE

INTRODUCTION..... p. 1

### HISTORIQUE

I - Caractéristiques électriques membranaires des ovocytes..... p. 3

1) Potentiel de "membrane"

2) Résistance et capacité membranaires

II - Influence des modifications des concentrations ioniques  
externes sur le potentiel de membrane des ovocytes..... p. 7

III - Caractéristiques électriques membranaires des oeufs  
fécondés et segmentés..... p. 10

IV - Couplage électrique des cellules au cours de la segmen-  
tation..... p. 12

### TECHNIQUES

I - Obtention des ovocytes et des oeufs. Préparation utilisée.. p. 14

II - Méthode d'enregistrement..... p. 16

III - Solutions utilisées..... p. 18

A - Solution "normale"

B - Solutions modifiées

a) Modifications de la concentration en ions  $K^+$

b) Modifications de la concentration en ions  $Na^+$

c) Modifications de la concentration en chlore

d) Modifications de la concentration en calcium

c) Modifications de la concentration potassique

### RESULTATS

#### CHAPITRE I

I - Constantes électriques des ovocytes..... p. 26

1) Potentiel de "membrane" des ovocytes

- 2) Résistance de membrane
- 3) Capacité membranaire

II - Etude des contributions ioniques à la genèse du P.M. des ovocytes..... p. 39

- 1) Influence de la concentration potassique externe sur le P.M.
- 2) Influence de la concentration sodique externe sur le P.M.
- 3) Effets des modifications de la concentration potassique externe en absence de sodium sur le P.M. des ovocytes mûrs
- 4) Influence de la concentration externe en chlore et en calcium sur le P.M.
- 5) Action du 2-4 dinitrophénol sur le P.M.

CHAPITRE II

Caractéristiques électriques membranaires des oeufs fécondés... p. 62

- 1) Mise en évidence du potentiel à travers la membrane vitelline et la membrane cytoplasmique
- 2) Variation du potentiel de "membrane" au cours de la segmentation
- 3) Résistance et capacité membranaires des oeufs fécondés et segmentés
- 4) Résistance effective à travers le plan de clivage

DISCUSSION - CONCLUSION

I - Potentiel de membrane des ovocytes. Rôle des ions..... p. 80

II - Caractéristiques électriques membranaires des oeufs fécondés et segmentés..... p. 85

- 1) Oeufs fécondés insegmentés
- 2) Oeufs segmentés

BIBLIOGRAPHIE..... p. 90

# INTRODUCTION

Le maintien de la composition ionique d'un milieu intracellulaire différent du liquide extracellulaire est un des caractères essentiels de toutes les cellules animales vivantes. En effet, d'une manière générale, la concentration des ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) est faible, celle des ions potassium ( $\text{K}^+$ ) est élevée à l'intérieur des cellules tandis que le rapport de concentration de ces ions est inverse dans le milieu extracellulaire. Ces deux milieux, intra- et extracellulaires, sont séparés par une membrane dont la composition et l'épaisseur varient suivant les cellules.

Ainsi, il existe une différence de potentiel de part et d'autre de cette membrane, c'est-à-dire entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Cette différence de potentiel est appelée potentiel de membrane (P.M.). Il peut être dû, selon les cellules considérées, à l'existence de forces passives déplaçant les ions, dont la résultante est nulle ; dans ce cas, le potentiel est régi par un équilibre de DONNAN. Lorsque la résultante n'est pas nulle, le P.M. correspond, alors, à un potentiel de pile de diffusion pouvant être déterminé par l'équation de GOLDMAN (1943) qui fait intervenir outre les concentrations intra- et extracellulaires des ions, la perméabilité de la membrane à chacun de ceux-ci. Enfin, le potentiel peut être dû à des forces passives et des forces moléculaires mises en jeu par le métabolisme cellulaire.

Formées d'une couche lipidique isolante, pouvant s'opposer ou au contraire faciliter le passage des ions, les membranes biologiques peuvent être assimilées, d'un point de vue physique, à un condensateur électrique ( $c_m$ ) imparfait présentant, par conséquent, une fuite, et à une résistance ( $r_m$ ) en parallèle.

Les recherches réalisées sur les membranes des ovocytes et des oeufs ont permis de mettre en évidence les caractéristiques électriques passives de ces membranes, comparables à celles des cellules nerveuses, musculaires ou sécrétrices dont le fonctionnement est maintenant bien connu. Les travaux

effectués sur les oeufs d'Echinodermes, de Téléostéens et d'Amphibiens (HASAMA, 1934 ; PETERFI et ROTHSCHILD, 1935 ; SCHEER et coll., 1954 ; TYLER et coll., 1955 ; KAO, 1956 ; MAENO et coll., 1956) montrent que les systèmes membranaires de ces oeufs sont caractérisés électriquement par un potentiel de membrane, une résistance et une capacité bien déterminés. En ce qui concerne les Amphibiens, les études électrophysiologiques, fragmentaires et incomplètes, portent essentiellement sur les ovocytes et les oeufs des Anoures. De plus, les ovocytes des Urodèles se distinguent de ceux des Anoures par l'absence de granules corticaux et la fécondation selon PASTEELS (1961) n'apporte aucun changement dans la structure des membranes secondaires des oeufs des Urodèles.

Le but de ce travail a été de déterminer l'évolution des constantes électriques du complexe membranaire des ovocytes et du cortex des oeufs d'un Amphibien Urodèle : Pleurodeles waltlii jusqu'au stade de la morula.

Dans une première partie, notre étude porte sur l'évolution du potentiel de "membrane" (P.M.) de la résistance ( $r_m$ ) et de la capacité ( $c_m$ ) du complexe membranaire de l'ovocyte. Ces caractéristiques électriques sont mesurées sur des ovocytes de différentes tailles dans des "conditions normales" c'est-à-dire lorsque les ovocytes baignent dans une solution de référence dont la concentration ionique connue permet une survie satisfaisante. En déterminant ensuite les caractéristiques électriques dans des "conditions anormales", c'est-à-dire lorsque les ovocytes baignent dans la solution de référence dont la composition ionique est modifiée, nous avons observé la variation du P.M. résultant des changements de la perméabilité ionique du complexe membranaire.

La seconde partie de ce travail concerne les caractéristiques électriques des oeufs fécondés et segmentés ; la variation de ces caractéristiques : P.M.,  $r_m$ ,  $c_m$ , permet d'entrevoir les modifications de la perméabilité du cortex après la fécondation et pendant la segmentation. Cette étude essaie de montrer, en outre, le rôle éventuel des nouvelles membranes dans les échanges ioniques intercellulaires.

# HISTORIQUE

## I - CARACTERISTIQUES ELECTRIQUES MEMBRANAIRES DES OVOCYTES

### 1) Potentiel de "membrane"

L'existence d'une différence de potentiel (P.M.) entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire a été mise en évidence sur des ovocytes d'Invertébrés et de Vertébrés.

En 1955, LUNDBERG trouve sur les oeufs non fécondés de Psammechinus un potentiel transmembranaire qui n'excède pas 5 à 10 mV. Parfois un potentiel de 40 mV est recueilli, mais cet auteur ne fournit aucune explication quant à l'existence de ces potentiels plus élevés. Le milieu intracellulaire des oeufs de Psammechinus est électropositif par rapport au milieu extérieur.

Par contre, TYLER et coll. (1956), travaillant sur les ovocytes d'un autre Echinoderme du genre Asterias, obtiennent des valeurs de potentiel s'échelonnant de - 10 à - 50 mV, la moyenne se situant entre - 20 et - 30 mV. Le signe négatif indique, dans ce cas, que le milieu intraovocytaire est électro-négatif par rapport au milieu externe. Ces mêmes auteurs notent, que dès la pénétration de la microélectrode dans les ovocytes d'Asterias, le potentiel atteint une valeur de - 60 mV instantanément, puis diminue jusqu'à une valeur stable. La valeur instantanée pourrait refléter, selon TYLER et coll., la véritable différence de potentiel de part et d'autre de la membrane de l'ovocyte.

En ce qui concerne les poissons, HORI (1958) mesure un potentiel de membrane sur les ovocytes matures d'un Téléostéen du genre Oryzias. Lorsque la microélectrode est implantée à la surface du chorion, un potentiel de - 30 mV se développe, la pénétration dans le chorion s'accompagne d'un potentiel positif de 5 à 10 mV. Quand la région corticale est atteinte, le potentiel est alors égal à + 30 mV puis se stabilise à + 25 mV.

Par contre, KAO (1956) ne décèle aucune différence de potentiel à travers la membrane plasmique et le chorion des oeufs inactivés d'un autre

Téléostéen : Fundulus heteroclitus.

C'est à propos des ovocytes des Amphibiens que l'on trouve les études électrophysiologiques les plus complètes et les plus détaillées. Citons, en particulier, celles de MAENO (1959) sur les ovocytes du crapaud Bufo bufo et celles de KANNO et LOEWENSTEIN (1963) sur les ovocytes de Xenopus laevis. Ces auteurs confirment la présence d'un potentiel intracellulaire et montrent que le P.M. diffère largement selon le degré de maturité des ovocytes. MAENO (1959) souligne qu'il est difficile de traverser, à l'aide de la microélectrode, la membrane ovocytaire de Bufo. Il se forme une invagination sous la pointe de la microélectrode, puis la pénétration fait apparaître brusquement un potentiel variant de - 40 mV à - 70 mV selon les ovocytes. Une implantation trop vigoureuse, se traduisant par une pénétration "en force" de la microélectrode, ne permet d'enregistrer initialement qu'un faible potentiel de membrane d'ailleurs instable qui, secondairement, augmente pendant quelques minutes jusqu'à atteindre les valeurs mentionnées précédemment.

Des valeurs identiques sont retrouvées par MORRILL et WATSON (1966) sur les ovocytes de la grenouille Rana pipiens. Ces derniers recueillent un P.M. moyen de - 63 mV lorsque les mesures sont effectuées avec des microélectrodes de 3 à 6  $\mu$  de diamètre à la pointe. Avec des microélectrodes plus fines (1  $\mu$  de diamètre) un potentiel nettement inférieur, égal à - 37 mV ( $\sigma = \pm 2$ ) peut être enregistré. A partir de coupes histologiques, MORRILL et WATSON (1966) montrent que la pointe de l'électrode fine a pu atteindre le noyau, soit une profondeur de pénétration de 0,6 mm. Ainsi, selon eux, la différence de potentiel entre le noyau et le cytoplasme serait donc de + 25 mV. Cependant, LOEWENSTEIN et KANNO (1963) n'enregistrent aucune variation du P.M. entre le noyau et le cytoplasme des ovocytes de Xenopus et de Triturus.

La maturation des ovocytes de Xénope s'accompagne, selon KANNO et LOEWENSTEIN (1963) d'une augmentation de l'amplitude du P.M. Les auteurs

relèvent des valeurs de potentiel variant de - 5 à - 35 mV. Cette variation du P.M. est fonction du diamètre des ovocytes : aux plus grandes cellules correspondent les potentiels les plus élevés.

## 2) Résistance et capacité membranaires des ovocytes

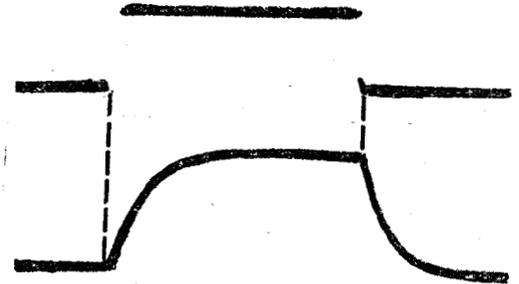
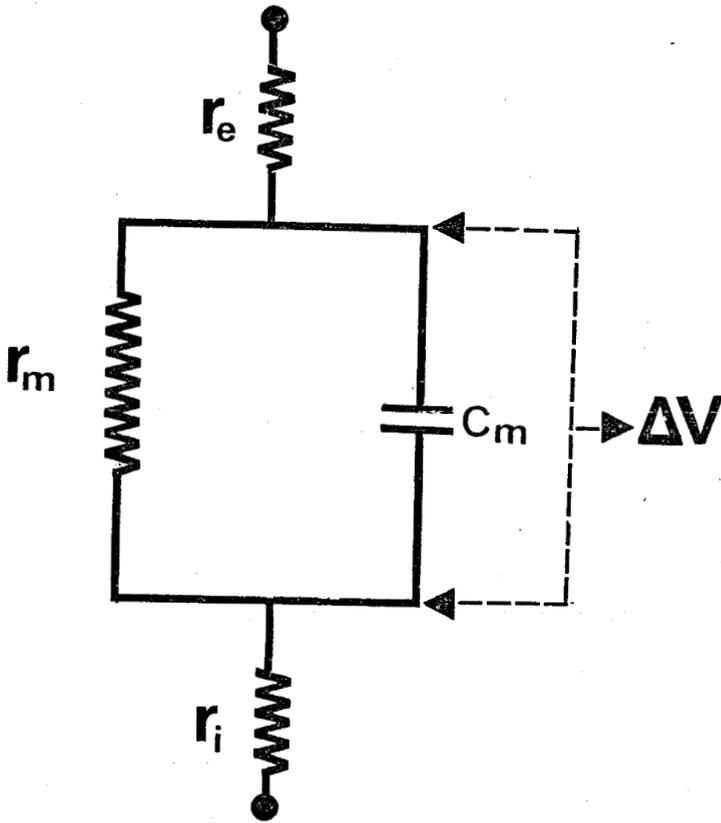
La détermination de la résistance électrique et de la capacité membranaire requiert l'application de courants constants de faible intensité, généralement rectangulaires, à travers le système membranaire des ovocytes. Ces courants, dont le temps de passage est connu, déterminent une différence de potentiel stable dictée par la loi d'Ohm ( $\Delta V = r_m i_m$ ) où  $r_m$  désigne la résistance de l'élément membranaire et  $i_m$  l'intensité du courant traversant cette résistance.

La différence de potentiel, ainsi produite, s'ajoute algébriquement au potentiel de membrane. C'est l'amplitude de la différence de potentiel (figure 1) qui rend compte de la valeur de la résistance membranaire. Nous remarquons que la surface membranaire présente une résistance  $r_m$  pour un ovocyte déterminé (ou  $R_m$  : résistance membranaire par unité de surface = résistance spécifique). C'est cette résistance qui est capable de s'opposer au passage des substances ou au contraire de les faciliter. Elle explique dans une certaine mesure l'existence des perméabilités ioniques spécifiques.

En général, un courant s'établissant instantanément produit une variation de potentiel qui croît exponentiellement en fonction du temps jusqu'à un niveau constant. Pour expliquer ce fait, il faut faire appel à une autre caractéristique des membranes : la capacité électrique  $C_m$  en parallèle avec la résistance  $R_m$

KAO (1956) évalue la résistance spécifique moyenne des oeufs non activés de Fundulus à  $3450 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , valeur comparable à celle trouvée par TYLER et coll. (1956) sur des ovocytes d'Asterias soit  $3100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Les valeurs des

milieu extracellulaire



milieu intracellulaire

Figure 1 - Circuit électrique représentant les propriétés physiques passives d'un élément du complexe membranaire de l'ovocyte.

$r_e, r_i$  : résistances extra- et intracellulaires  
 $r_m, c_m$  : résistance et capacité membranaires.



capacités membranaires spécifiques déduites de ces résistances spécifiques sont respectivement de l'ordre de  $0,62 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  et  $0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

Il semble que la résistance membranaire des ovocytes immatures de Bufo soit beaucoup plus élevée que les valeurs citées précédemment. En effet, MAENO (1959) évalue la résistance à  $25 \text{K}\Omega \cdot \text{cm}^2$  et la capacité membranaire est comprise entre 6 et  $11 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Par ailleurs, KANNO et LOEWENSTEIN (1963) signalent que la  $R_m$  des ovocytes de Xénope augmente avec l'accroissement du diamètre des ovocytes. Ils calculent une capacité de  $5,4 \pm 0,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  et estiment que cette valeur est indépendante du diamètre des oeufs. Signalons que des études plus anciennes de COLE et GUTTMAN (1942) concernant les ovocytes de grenouille donnent une résistance de l'ordre de  $170 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Cette faible valeur est vraisemblablement liée au choix de la fréquence du courant sinusoïdal utilisée par les auteurs.

Comme nous allons le voir maintenant, l'étude des modifications des concentrations ioniques du liquide physiologique baignant les oeufs, montrent que le complexe membranaire des ovocytes répond particulièrement à l'action de ces différents milieux.

## II - INFLUENCE DES MODIFICATIONS DES CONCENTRATIONS IONIQUES EXTERNES SUR LE POTENTIEL DE MEMBRANE DES OVOCYTES

La mise en évidence d'une différence de potentiel entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire, permet de supposer que le système membranaire de l'ovocyte est doué de processus de perméabilité vis-à-vis des substances et, en particulier, des ions. Il n'existe à ce sujet que très peu de travaux, et ne seront mentionnées principalement que les études de MAENO (1959) portant sur les effets des modifications des concentrations en ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{++}$ , présents dans le liquide physiologique, sur le potentiel de membrane

des ovocytes immatures de Bufo bufo. Le potentiel de ces ovocytes placés dans un milieu Ringer, varie comme nous l'avons signalé entre - 70 mV et - 40 mV.

En ce qui concerne l'influence de la concentration du sodium externe  $[Na^+]_e$  sur les mouvements des ions  $Na^+$ , MAENO signale que la modification de leur concentration n'entraîne pas de variation du potentiel de membrane, que les ovocytes aient un P.M. initial de - 70 mV ou - 40 mV.

Pour ce qui est de la perméabilité du système membranaire ovocytaire aux ions  $K^+$ , l'ensemble des résultats indique que cette perméabilité est importante. Les effets de la variation de la concentration potassique externe sur le potentiel de membrane sont, selon MAENO (1959), similaires à ceux déjà observés sur le nerf et le muscle conformément aux travaux de HODGKIN et HUXLEY (1952), HODGKIN et HOROWICZ (1959, 1960), HUTTER et NOBLE (1960) et ADRIAN (1960). En effet, il existe une relation linéaire entre l'amplitude du potentiel de membrane et le logarithme de la concentration potassique externe conforme à l'équation de Nernst :

$$V = \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{[K]_e}{[K]_i}$$

(volts)

équation dans laquelle

- V : traduit l'amplitude du P.M. enregistré
- R : constante des gaz parfaits
- T : la température absolue
- n : la valence de l'ion considéré
- F : la valeur du Faraday
- $[K]_e$ ,  $[K]_i$  : la concentration des ions  $K^+$  respectivement à l'extérieur et à l'intérieur de l'ovocyte.

La valence n étant égale à l'unité et la température à 20° C, la formule devient en passant du logarithme népérien au logarithme décimal :

$$V_{(mV)} = 58 \log \frac{[K]_e}{[K]_i}$$

Cependant, dans le cas des ovocytes immatures de Bufo, cette équation n'est applicable que pour une concentration potassique supérieure à 5 mM/l, bien que la pente ne soit que de 35 mV au lieu de 58 mV lorsque  $[K]_e$  est multipliée par un facteur 10. Cette pente inférieure à celle prévue par l'équation de Nernst laisse supposer qu'**au moins** un ion ou plus intervient par ses mouvements dans le maintien du potentiel de membrane.

Pour MAENO, le cortex ovocytaire de Bufo est également perméable aux ions  $Ca^{++}$  ; en effet, la variation de la concentration calcique, et donc le gradient de concentration, influe remarquablement sur la valeur du P.M. des ovocytes mais seulement lorsque  $[Ca^{++}]_e$  est comprise entre 0,1 et 1 mM/l, celle du Ringer utilisé pour les ovocytes du crapaud étant de 1 mM/l. Lorsque le milieu est légèrement enrichi en calcium, un ovocyte dont le P.M. initial est de - 60 mV passe à une valeur de - 65 mV.

Cette influence de la modification de  $[Ca^{++}]_e$  est en effet remarquable puisque depuis JENERICK et GERARD (1953), WEIDMAN (1955) et FRANKENHAEUSER (1957) on sait que les ions  $Ca^{++}$  ont un effet nul sur le potentiel de repos du nerf et du muscle. Si l'on en croit MAENO, le potentiel de membrane des ovocytes immatures de Bufo bufo pourrait résulter des effets conjugués des ions  $K^+$  et  $Ca^{++}$ , les autres ions présents dans le liquide physiologique n'ayant aucun rôle.

Des études plus récentes (DICK et MAC LAUGHLIN, 1969) faisant état de mesures d'activités et de concentrations de potassium et de sodium dans les ovocytes de Bufo permettent de penser que les ions  $Na^+$  et  $K^+$ , par leurs mouvements, joueraient un rôle dans le maintien du P.M. Les concentrations intracellulaires de  $K^+$  et  $Na^+$  sont mesurées au photomètre de flamme, leur activité calculée à partir de l'équation qui régit le potentiel d'une microélectrode de

verre dont la pointe est sélectivement perméable à un ion, en l'occurrence au  $\text{Na}^+$  ou au  $\text{K}^+$ . L'expérience montre, en effet, qu'en contact avec des solutions salines comme le Ringer, par exemple, ou avec des milieux intracellulaires, la différence de potentiel mesurée entre l'électrode sensible à  $\text{K}^+$  ou à  $\text{Na}^+$  et l'électrode impolarisable plongée dans la solution dont on veut connaître l'activité des ions, est une fonction linéaire des concentrations.

En ce qui concerne le potassium, son activité ( $a_{\text{K}}$ ) mesurée dans de telles conditions est de 82 mM/l. La concentration potassique intraovocytaire  $[\text{K}^+]$  serait, selon les auteurs précédemment cités, de 113 mM/l ; ces valeurs permettent de calculer le rapport  $\frac{a_{\text{K}}}{[\text{K}^+]}$ . La valeur de ce rapport est de 0,73 et ne diffère pas sensiblement de celle mesurée dans le Ringer normal soit 0,75. Ces résultats permettent de supposer que les ions  $\text{K}^+$  intracellulaires sont libres.

Par contre, l'activité des ions  $\text{Na}^+$  ( $a_{\text{Na}}$ ) serait de 9,3 mM/l et la concentration sodique interne  $[\text{Na}^+]$  de 25,8 mM/l. Le rapport  $\frac{a_{\text{Na}}}{[\text{Na}^+]}$  de 0,36 n'est égal qu'à la moitié de la valeur calculée pour le liquide physiologique. Ainsi la moitié du sodium interne serait selon DICK et MAC LAUGHLIN (1969) à l'état combiné dans le cytoplasme ovocytaire de Bufo bufo.

### III - CARACTERISTIQUES ELECTRIQUES MEMBRANAIRES DES OEUFES FECONDES ET SEGMENTES

Les variations des paramètres électriques membranaires, durant la segmentation des oeufs, ont été peu étudiées. Seules, des études fragmentaires ont été entreprises sur les oeufs des Amphibiens et de quelques Echinodermes.

L'accroissement de la surface membranaire de l'oeuf de grenouille, résultant de la segmentation, s'accompagne, selon WOODWARD (1968) d'une augmentation de la capacité membranaire et d'une diminution de la résistance. Par ailleurs, il est montré que le potentiel de membrane varie avec les modifications

des caractéristiques des perméabilités provoquées par la croissance active des nouvelles membranes démontrée par ZOTIN (1964) et WADDINGTON (1952).

De plus, MORRILL et WATSON (1966) puis WOODWARD (1968) montrent que l'amplitude du potentiel de membrane des oeufs de Rana pipiens augmente avec les divisions.

Sur les oeufs de Triturus, ITO et HORI (1966) rapportent que le potentiel de membrane de la cellule fécondée insegmentée est de - 5 mV (l'intérieur étant électronégatif par rapport à l'extérieur), l'amplitude du P.M. passe à - 62 mV pour les cellules de la morula. En outre, ITO et HORI soulignent qu'il n'existe pas un gradient de potentiel électrique le long de l'axe polaire des oeufs fécondés des Amphibiens. Ce résultat est contraire à celui donné par DORFMAN (1934) qui conclut à une différence de la valeur du P.M. enregistrée soit dans l'hémisphère animal, soit dans l'hémisphère végétatif.

Pour ce qui est de la résistance membranaire des oeufs de Triturus, elle diminue dès la première division (ITO et HORI, 1966 ; WOODWARD, 1968) alors qu'à l'inverse la capacité membranaire reste inchangée, sa valeur étant de 0,7 à 1  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

Ainsi, l'augmentation de la surface membranaire, comme tend à le montrer la baisse de la résistance au cours du développement des oeufs ne modifie pas la capacité membranaire contrairement à ce qu'il est permis de supposer

Cependant, en inhibant l'apparition des sillons de division (WOODWARD 1968), notamment lorsque les oeufs sont placés dans des solutions isotoniques ou hypertoniques de liquide de Ringer, l'augmentation de la capacité membranaire devient importante. Ainsi, en immergeant les oeufs de Rana dans le liquide de Ringer, WOODWARD (1968) observe que la constriction du premier sillon de division paraît normale pendant quelques minutes puis se relâche : la surface

de l'oeuf redevenant parfaitement lisse. Dans de telles conditions, il enregistre une augmentation de  $C_m$ , si bien qu'il conclut que la disparition du sillon de division entraîne la suppression d'une capacité parasite en série avec la capacité membranaire.

Dans les conditions normales, l'existence de cette capacité parasite expliquerait la constance de la valeur  $C_m$  au cours de la segmentation associée à la diminution de la résistance.

#### IV - COUPLAGE ELECTRIQUE DES CELLULES AU COURS DE LA SEGMENTATION

L'étude électrophysiologique de certains tissus adultes met en évidence l'existence de zones de contact intercellulaires de faibles résistances électriques permettant ainsi des échanges ioniques entre cellules voisines. Ainsi des jonctions spécialisées ont été trouvées entre les cellules de la vessie de crapaud (LOEWENSTEIN, 1965), entre les cellules de foie de Mammifères (PENN, 1966), les cellules de la peau d'Amphibiens (LOEWENSTEIN et PENN, 1967).

De telles jonctions intercellulaires sont identifiées dans les tissus embryonnaires, en particulier, entre les blastomères.

La technique électrophysiologique, permettant la mise en évidence de ces jonctions, consiste à adjoindre une troisième microélectrode aux deux microélectrodes conventionnelles déjà utilisées (voir "Techniques"). Par cet artifice, la variation de potentiel, produite par le passage d'un courant à travers le cortex de l'oeuf appliqué par une microélectrode, peut être enregistrée simultanément dans la même cellule et dans un blastomère voisin.

Ainsi, ASHMAN, KANNO et LOEWENSTEIN (1964) sont les premiers à mesurer la résistance électrique à travers le plan de clivage d'une cellule en division. Ils observent, dans ces conditions, une augmentation progressive

de la résistance à travers le plan de segmentation de la première division cellulaire des oeufs d'un Echinoderme du genre Asterias.

Lors des premiers stades, les blastomères ne sont pas couplés électriquement, ce qui se traduit par la non dérivation d'une fraction du courant appliqué à travers la membrane. Ce n'est qu'après quelques divisions que la résistance à travers les plans de clivage devient très faible, c'est-à-dire au stade 32 cellules (5e division) (TUPPER, SAUNDERS et EDWARDS, 1970).

A l'inverse, sur les oeufs de Téléostéens Fundulus heteroclitus, d'après BENNETT et TRINKAUS (1968) un couplage électrique entre deux blastomères se produirait dès la première division (2 cellules). Par ailleurs, ITO et HORI (1966) montrent que les cellules sont étroitement couplées dès les premières divisions jusqu'à la morula.

En accord avec ces derniers auteurs, ITO et LOEWENSTEIN démontrent que les cellules de la morula de Triturus pyrrhogaster sont en état d'échanges ioniques **étroits** entre elles, les surfaces de membrane de contact étant beaucoup plus perméables que la membrane en relation avec le milieu extérieur. En dissociant mécaniquement les blastomères de la morula, les membranes de contact des cellules isolées **ne** présentent plus de perméabilité distincte du reste de la membrane : la membrane entière du blastomère isolé devenant peu perméable aux ions. Lorsque les cellules sont réassociées, elles forment à nouveau un système de membrane fonctionnel différencié et <sup>de</sup> acquièrent ce fait une perméabilité plus forte que le reste de la membrane.

# TECHNIQUES

## I - OBTENTION DES OVOCYTES ET DES OEUFS. PREPARATION UTILISEE

Les ovocytes et les oeufs utilisés pour nos expérimentations proviennent d'un Amphibien Urodèle : Pleurodeles waltlii.

D'une manière générale, les ovocytes des Amphibiens sont entourés d'un ensemble de membranes qui se modifie au cours du développement.

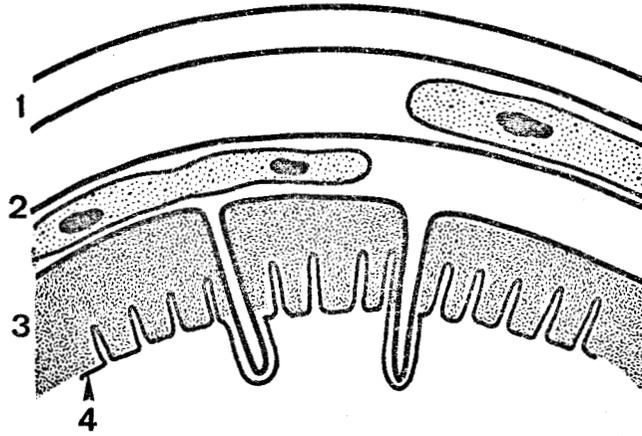
Dans l'ovaire, les ovocytes sont limités à la périphérie par la membrane cytoplasmique ou plasmalemma qui envoie des microvilli dans la zona radiata. Plus à l'extérieur, les cellules folliculaires couvrent la zona radiata et forment des macrovilli qui viennent s'évaginer jusque dans le plasmalemma ; l'ensemble est délimité par l'épithélium de l'ovaire (WARTENBERG et SCHMIDT, 1961). Alors que les ovocytes jeunes des Urodèles (Figure 2) présentent, comme ceux des Anoures, des microvillosités accrochées dans la membrane vitelline, par contre, la situation est différente pour les ovocytes mûrs : les microvillosités sont complètement dégagées de la membrane vitelline et baignent dans l'espace périvitellin (PASTEELS, 1961).

La fécondation chez les Anoures fait apparaître une nouvelle membrane : la membrane de fécondation encore appelée chorion.

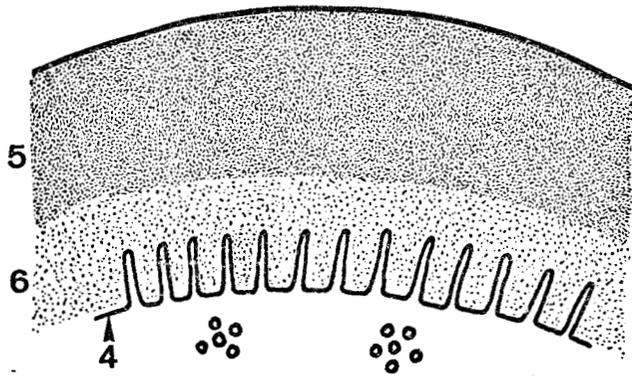
Chez les Urodèles, la fécondation n'apporte aucun changement, on peut en conclure comme PASTEELS (1961) que "le soulèvement de la membrane sans intervention de granules corticaux s'opère dans l'ovocyte vierge".

Les ovocytes sont prélevés directement dans l'ovaire après ouverture de la cavité abdominale de la femelle, ils sont isolés et équilibrés dans le liquide de STEINBERG. Les oeufs fécondés, récoltés quelques heures après la ponte, sont extraits de leur gangue. Les stades de segmentation utilisés sont ceux de la table GALLIEN et DUROCHER (1957).

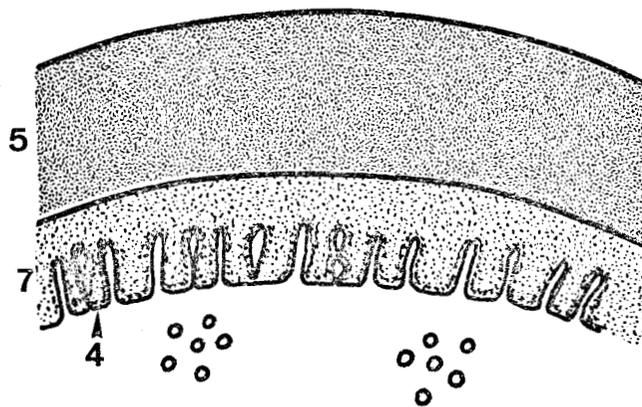
Les préparations sont placées dans une cuve expérimentale (Figure 3) remplie de liquide de Steinberg. Le volume de la cuve est suffisamment grand par rapport au volume des ovocytes ou des oeufs pour permettre l'étude



ovocyte  
jeune



ovocyte  
mûr



oeuf  
fécondé

de certaines caractéristiques membranaires. La solution est constamment renouvelée afin d'assurer une bonne inhibition de la préparation ainsi qu'un maintien rigoureux des concentrations ioniques extracellulaires.

Toutes les expériences sont réalisées à la température ambiante (20-22° C) sur des ovocytes parfaitement sphériques dont le diamètre est compris entre 400 et 1400  $\mu$ .

## II - METHODE D'ENREGISTREMENT

Les oeufs, testés à différents stades de leur développement sont placés sur un drain de 400  $\mu$  de diamètre, leur maintien étant assuré par une pression négative de quelques millimètres d'eau (Figure 3) (Schéma du montage).

Les caractéristiques membranaires étudiées sont :

- le potentiel de membrane P.M.
- la résistance membranaire spécifique  $R_m$
- la capacité membranaire  $C_m$ .

Leurs mesures sont réalisées grâce à l'utilisation de deux micro-électrodes de verre remplies d'une solution de KCl 3 M ; l'une permet l'enregistrement du P.M., l'autre l'application de courants polarisants à la membrane. Le diamètre à la pointe de chaque microélectrode est de 0,5  $\mu$  ; seules les microélectrodes dont la résistance est comprise entre 7 et 20 M $\Omega$  sont retenues pour l'expérimentation. L'enregistrement du potentiel de membrane est réalisé entre une microélectrode piquée dans l'ovocyte et une électrode diffuse constituée par un pont de KCl 3 M gélosé placé dans la solution. Ces deux électrodes sont connectées à des électrodes au calomel permettant la suppression des potentiels de jonction, elles mêmes sont reliées à un changeur d'impédance. Cet appareil permet d'adapter la résistance élevée du circuit comprenant celle de la microélectrode et celle de la membrane à

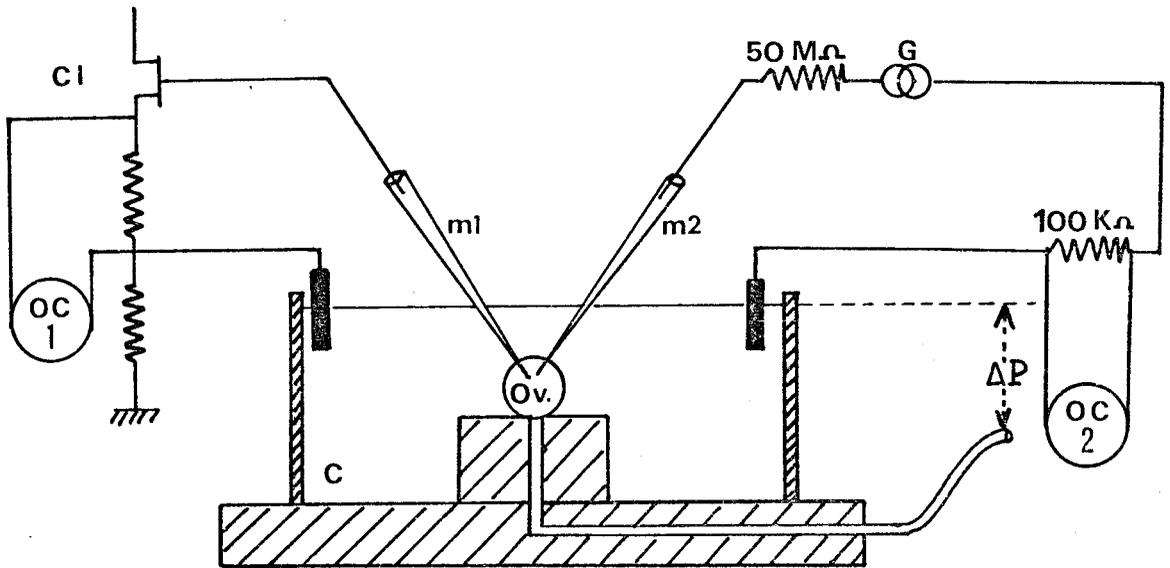


Figure 3 - Schéma du montage utilisé pour l'enregistrement du potentiel de membrane des ovocytes et des oeufs.

- $m_1$  : microélectrode d'enregistrement
- $m_2$  : microélectrode de stimulation
- Ov : ovocyte
- C : cuve
- G : générateur de courant constant
- CI : changeur d'impédance
- OC<sub>1</sub> : première voie de l'oscilloscope
- OC<sub>2</sub> : deuxième voie de l'oscilloscope



l'impédance d'entrée de l'amplificateur de l'oscilloscope.

L'enregistrement des variations de potentiel provoquées par l'application de courants rectangulaires rendant compte de la valeur de la résistance de membrane de l'oeuf, est effectué grâce au montage présenté à la figure 3 (p. 17). L'application des courants polarisants est réalisée à l'aide de la deuxième microélectrode implantée dans l'ovocyte à des distances variables de la première microélectrode. Le courant est mesuré à travers une résistance en série de 100 K $\Omega$ . Les courants utilisés sont de l'ordre de  $10^{-8}$  A, leur durée est de 3 secondes pour les ovocytes, de 0,5 à 1 seconde pour les oeufs fécondés.

Pour la détermination de la résistance à travers le plan de clivage des oeufs, nous n'avons pas utilisé 3 microélectrodes comme ITO et HORI (1966), puis ITO et LOEWENSTEIN (1969), mais nous avons simplement placé deux électrodes soit dans le même blastomère, soit dans deux blastomères différents de façon à éviter au maximum les risques de shunt compte tenu de la forte résistance membranaire.

### III - SOLUTIONS UTILISEES

#### A - Solution "normale"

La solution, considérée comme "normale" et permettant la survie des ovocytes et un développement normal des oeufs, est constituée par le milieu de Steinberg modifié. Sa composition est la suivante :

- NaCl	58 mM/l
- KCl	0,67 mM/l
- Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,34 mM/l
- MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,82 mM/l
- CO <sub>3</sub> H Na	2,4 mM/l (au lieu du Tris-HCl)

Le pH de cette solution est égal à 7,4. Le milieu correspond approximativement au liquide physiologique de Ringer dilué de 50 p. 100.

B - Solutions modifiées

Afin de déterminer la participation des ions dans le maintien du potentiel de membrane des ovocytes, nous avons modifié la concentration de l'un ou plusieurs ions entrant dans la composition du milieu de référence défini précédemment.

a) Modifications de la concentration en ions  $K^+$

- Milieu dépourvu en  $K^+$

L'absence des ions  $K^+$  est réalisée en supprimant la quantité de KCl de la solution externe. Le chlorure de potassium est remplacé millimole à millimole par du chlorhydrate de choline de façon à maintenir la concentration de  $Cl^-$  à sa valeur normale (Tableau 1).

Milieux	KCl en mM/l	Chlorhydrate de choline
Solution normale	0,67	-
$K_e \times 0 = 0$ mEq/l	0	0,67

Tableau 1 - Milieu hypopotassique.

$K_e$  : concentration potassique externe normale = 0,67 mEq/l.

Tous les autres sels ( $NaCl$ ,  $Ca(NO_3)_4 \cdot H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,

$CO_3H Na$ ) sont maintenus à leur concentration normale.

- Milieux enrichis en  $K^+$  : Tableau 2

L'apport en ions  $K^+$  est effectué par addition de sulfate de potassium à la solution normale, en tenant compte du fait qu'une mM de  $K_2SO_4$  apporte deux mEq de  $K^+$ .

Milieux	KCl mM/1	$SO_4 K_2$ mM/1
Solution normale	0,67	0
Milieux hyper K		
$K_e \times 2 = 1,34$ mEq/1	0,67	0,33
$K_e \times 3 = 2,01$ mEq/1	0,67	0,67
$K_e \times 4 = 2,68$ mEq/1	0,67	1,01
$K_e \times 6 = 4,02$ mEq/1	0,67	1,67
$K_e \times 10 = 6,70$ mEq/1	0,67	3,01
$K_e \times 20 = 13,40$ mEq/1	0,67	6,36

Tableau 2 - Composition des milieux hyperpotassiques utilisés.

$K_e$  = Concentration potassique externe normale = 0,67 mEq/l.

Tous les autres sels sont maintenus à leur concentration normale.

L'utilisation du  $SO_4 K_2$  entraîne corrélativement une augmentation de la quantité de millimoles par rapport à la solution de référence ; il n'a cependant pas été tenu compte de cette augmentation car elle ~~reste~~ est très faible (au maximum 10 p. 100 correspondant aux milieu  $K_e \times 20$ ). SIGLER et JANACEK (1971) expérimentant sur les ovocytes de Rana temporaria montrent que le potentiel membranaire varie de 6 mV lorsque la pression osmotique de la solution de

référence augmente de 30 p. 100. Ainsi dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de 10 p. 100 introduit, comme cela a été vérifié, une variation de potentiel maximale de 2 mV.

b) Modifications de la concentration en sodium

- Milieux hyposodiques (Tableau 3)

La réduction ou l'absence des ions  $\text{Na}^+$  est provoquée par la suppression d'une partie ou de la totalité du NaCl ; la concentration en chlore étant rétablie par un apport convenable de chlorhydrate de choline.

Milieux	NaCl mM/l	Chlorhydrate de choline
Solution normale	58	0
Milieux hypo Na :		
$\text{Na}_e \times 0,4 = 23,2 \text{ mEq/l}$	23,2	34,8
$\text{Na}_e \times 0 = 0 \text{ mEq/l}$	0	58

Tableau 3 - Composition des milieux hyposodiques utilisés.

$\text{Na}_e$  : concentration sodique externe normale : 58 mEq/l.

Tous les autres sels ( $\text{KCl}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2 \text{ H Na}$ ) sont maintenus à leur concentration normale.

- Milieux hypersodiques (Tableau 4)

L'excès de  $\text{Na}^+$  est apporté sous forme de sulfate de sodium.

Milieux	Na Cl mM/1	$\text{SO}_4 \text{Na}_2$ mM/1
Solution normale	58	
Milieux hyper Na		
$\text{Na}_e \times 1,5 = 87 \text{ mEq/l}$	58	14,5
$\text{Na}_e \times 2 = 116 \text{ mEq/l}$	58	29

Tableau 4 - Composition des milieux hypersodiques utilisés.

$\text{Na}_e$  : Concentration sodique externe normale : 58 mEq/l.

Tous les autres sels ( $\text{KCl}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_3 \text{H Na}$ ) sont maintenus à leur concentration normale.

c) Modification de la concentration externe en chlore

Un seul milieu a été utilisé, correspondant à la suppression totale des ions  $\text{Cl}^-$  dans la solution externe. L'ion  $\text{Cl}^-$  est remplacé par l'ion  $\text{SO}_4^{--}$  et la pression osmotique est réajustée à l'aide de saccharose.

d) Modifications de la concentration en calcium

Le milieu dépourvu en ions  $\text{Ca}^{++}$  est réalisé en supprimant simplement le nitrate de calcium de la solution normale. Pour obtenir un milieu hypercalcique du chlorure de calcium a été additionné à la solution de référence (Tableau 5).

Milieux	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O mM/l	Ca Cl <sub>2</sub> mM/l
Solution normale	0,33	-
Ca <sub>e</sub> x 0 = 0 mEq/l	-	-
Ca <sub>e</sub> x 20 = 13,12 mEq/l	0,33	6,27

Tableau 5 - Modifications de la concentration calcique du milieu externe.

Ca<sub>e</sub> : concentration calcique externe de la solution normale :  
0,33 mEq/l.

Tous les **autres sels** (Na Cl, KCl, Mg SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, CO<sub>3</sub> H Na)  
sont maintenus à leur concentration normale.

e) Modifications de la concentration potassique (Tableau 6)

Les milieux hyper**potassiques** sont réalisés comme cela a déjà  
été indiqué précédemment (Tableau 2) par addition de sulfate de potassium.

L'absence totale de sodium est compensée par l'apport de  
chlorhydrate de choline.

Milieux	Na Cl mM/1	Chlorhydrate de choline mM/1	KCl mM/1	SO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> mM/1
Solution normale	58	-	0,67	-
Milieu hypo K				
K <sub>e</sub> x 0 = 0 mEq/l	-	58,67	-	-
Milieu hyper K				
K <sub>e</sub> x 2 = 1,34 mEq/l	-	58	0,67	0,33
K <sub>e</sub> x 3 = 2,01 mEq/l	-	58	0,67	0,67
K <sub>e</sub> x 4 = 2,68 mEq/l	-	58	0,67	1,01
K <sub>e</sub> x 6 = 4,02 mEq/l	-	58	0,67	1,67
K <sub>e</sub> x 10 = 6,70 mEq/l	-	58	0,67	3,01
K <sub>e</sub> x 20 = 13,40 mEq/l	-	58	0,67	6,36

Tableau 6 - Milieux hyperpotassiques et hypopotassiques en absence d'ions Na<sup>+</sup> dans la solution externe.

Tous les autres sels (Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, Mg SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, CO<sub>3</sub> H Na) sont **maintenus** à leur concentration normale.



# RESULTATS

## CHAPITRE I

### I - CONSTANTES ELECTRIQUES DES OVOCYTES

- 1) Potentiel de "membrane" des ovocytes
- 2) Résistance de "membrane"
- 3) Capacité membranaire

### II - ETUDE DES CONTRIBUTIONS IONIQUES A LA GENESE DU P.M. DES OVOCYTES

- 1) Influence de la concentration potassique externe sur le P.M.
- 2) Influence de la concentration sodique externe sur le P.M.
- 3) Effets des modifications de la concentration potassique externe en absence de sodium sur le P.M. des ovocytes mûrs.
- 4) Influence de la concentration externe en chlore et en calcium sur le P.M.
- 5) Action du 2-4 dinitrophénol sur le P.M. des ovocytes mûrs.

## I - CONSTANTES ELECTRIQUES DES OVOCYTES

### 1) Potentiel de "membrane" des ovocytes

La membrane cellulaire des ovocytes des Amphibiens comme celle de beaucoup d'oeufs, constitue une structure très élastique. Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre précédent (voir chapitre "Technique"), le complexe membranaire des ovocytes de Pleurodèle est constitué de l'intérieur vers l'extérieur : du plasmalemma, de la zona radiata, des cellules folliculaires et de l'épithélium interne de l'ovaire. De ce fait, cet ensemble constitue un obstacle à la pénétration de la microélectrode : en effet, lorsqu'on tente de pénétrer la surface ovocytaire, celle-ci <sup>se</sup> déforme sous l'électrode. Dans ce cas, la résistance à la pointe de la microélectrode augmente considérablement et il apparaît un potentiel qui peut être confondu avec le potentiel intracellulaire. Cependant, ce potentiel diffère de celui de la membrane ovocytaire par le fait qu'il se développe graduellement et qu'il est de signe positif.

Pour que la pénétration se réalise dans de bonnes conditions, il est nécessaire d'utiliser des microélectrodes dont la pointe soit très fine ( $0,5 \mu$ ) et dont l'angle de pénétration soit quasi-perpendiculaire à la surface cellulaire.

Dès que la pointe de la microélectrode atteint la surface cellulaire, il se produit une petite dépression accompagnée d'une variation de potentiel de  $-10 \text{ mV}$  à  $-15 \text{ mV}$  (figure 4), elle correspondrait, selon certains auteurs (KANNO et LOEWENSTEIN, 1963) à l'insertion de la microélectrode dans l'espace compris entre l'épithélium interne et la membrane ovocytaire.

La pénétration dans le cytoplasme s'accompagne d'une brusque chute de potentiel, celui-ci se stabilisant en quelques minutes à une valeur comprise entre  $-30 \text{ mV}$  et  $-70 \text{ mV}$  (figure 4). En outre, le niveau du P.M.

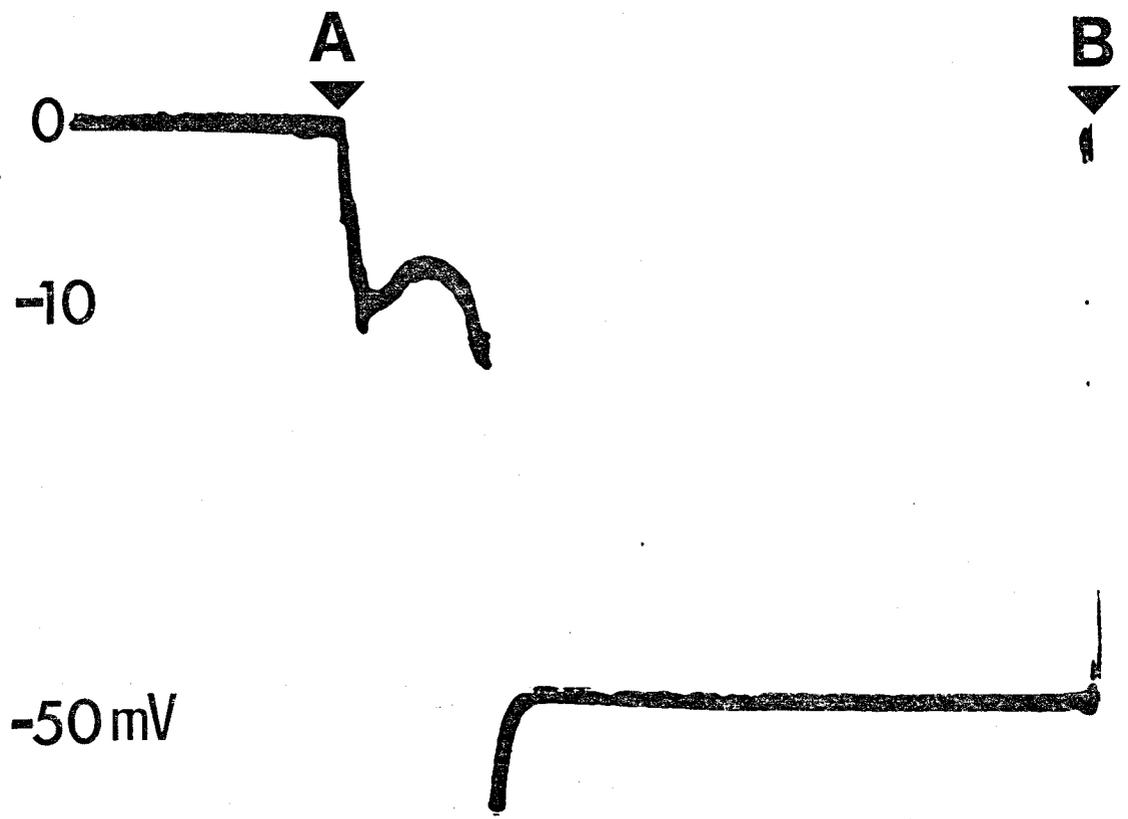


Figure 4 - Evolution du P.M. lors de la pénétration de la microélectrode dans l'ovocyte.

- A. pénétration de la microélectrode ;
- B. retrait de la microélectrode.



atteint dépend du diamètre des ovocytes, comme l'atteste la figure 5.

En d'autres termes, le potentiel de membrane dépend de l'état de maturité des cellules dans la mesure où il est montré que le diamètre constitue un critère du degré de maturité (WISCHNITZER, 1966). De plus, ce potentiel ne dépend pas du lieu où est implantée la microélectrode, indiquant, semble-t-il, que la membrane cellulaire est électriquement homogène.

A l'appui de cette hypothèse, signalons que des ovocytes de grande taille caractérisés par une hétérogénéité de pigmentation entre le pôle animal et le pôle végétatif, ne présentent aucune différence significative entre les valeurs du P.M. enregistrées dans l'hémisphère animal et dans l'hémisphère végétatif (Tableau 7) (VILAIN, CAPURON et GUILBAULT, 1971).

Hémisphères	P.M. mV	Nombre d'ovocytes testés
Animal	62,13 ± 10,47	30
Végétatif	61,72 ± 10,98	22

Tableau 7 - Valeurs moyennes du P.M. des ovocytes matures enregistrées dans l'hémisphère animal et dans l'hémisphère végétatif.

Il faut enfin remarquer que pour ces ovocytes matures, les valeurs de P.M. sont très dispersées ; cette dispersion des valeurs semble montrer que ces cellules de diamètre égal sont à un stade de maturité différent. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus sur les ovocytes de Bufo bufo par MAENO (1959), par MORRILL et WATSON (1966) sur les ovocytes de Rana pipiens et par KANNO et LOEWENSTEIN (1963) sur les ovocytes de Xenopus laevis, bien

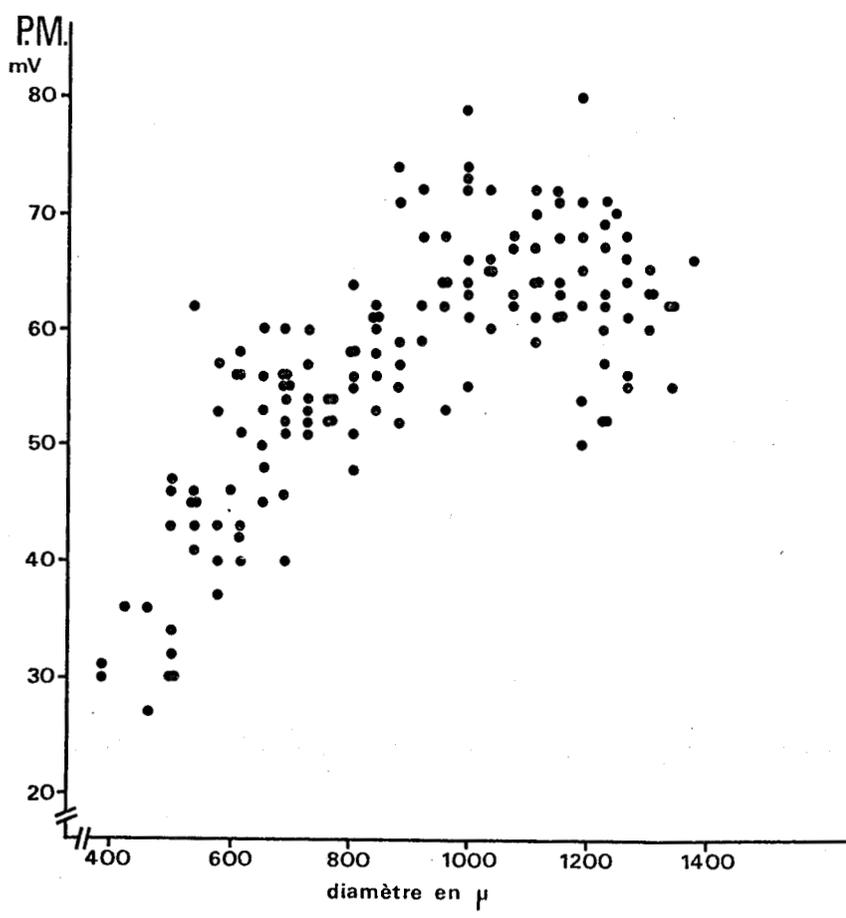


Figure 5 - Amplitude du P.M. en fonction du diamètre des ovocytes.



que chez ce dernier animal les valeurs du P.M. mesurées soient plus faibles. Il n'a pas été observé de diminution progressive du P.M. au cours du temps à l'inverse de ce qui se produit sur les ovocytes de Bufo comme le souligne MAENO en 1959.

## 2) Résistance de membrane

La valeur de la résistance membranaire ( $r_m$ ) de l'ovocyte est déterminée par la pente  $\frac{dV}{dI}$  des courbes voltage - courant. Le tracé de la figure 6 donne un exemple de la variation de potentiel en fonction du temps, lors de l'application d'un échelon de courant rectangulaire à travers le cortex de l'ovocyte. Cette variation étant une fonction exponentielle, montre que la membrane est constituée, d'un point de vue électrique, d'une résistance et d'une capacité en parallèle. Dans de telles conditions, connaissant le courant  $i_m$ , le calcul de la  $r_m$  est effectué à partir de la variation de potentiel lorsque celle-ci a atteint un niveau stable (plateau). Ainsi, la figure 6 montre la relation voltage - courant d'un ovocyte dont la membrane ne présente pas de propriétés de rectification : c'est-à-dire que la  $r_m$  est indépendante de la polarisation membranaire contrairement à ce qui se produit au niveau d'une diode et au niveau de nombreuses structures excitables. La courbe reste linéaire pour de fortes variations de courant.

Les propriétés électriques passives du système membranaire de l'ovocyte peuvent donc être représentées par le schéma électrique ci-après. Comme l'indique le schéma de la figure 7, les caractéristiques quantitatives de l'ovocyte sont déterminées par les constantes suivantes :

- la résistance électrique du système membranaire ( $r_m$ )
- la capacité membranaire  $c_m$
- la force électromotrice  $fem$ .

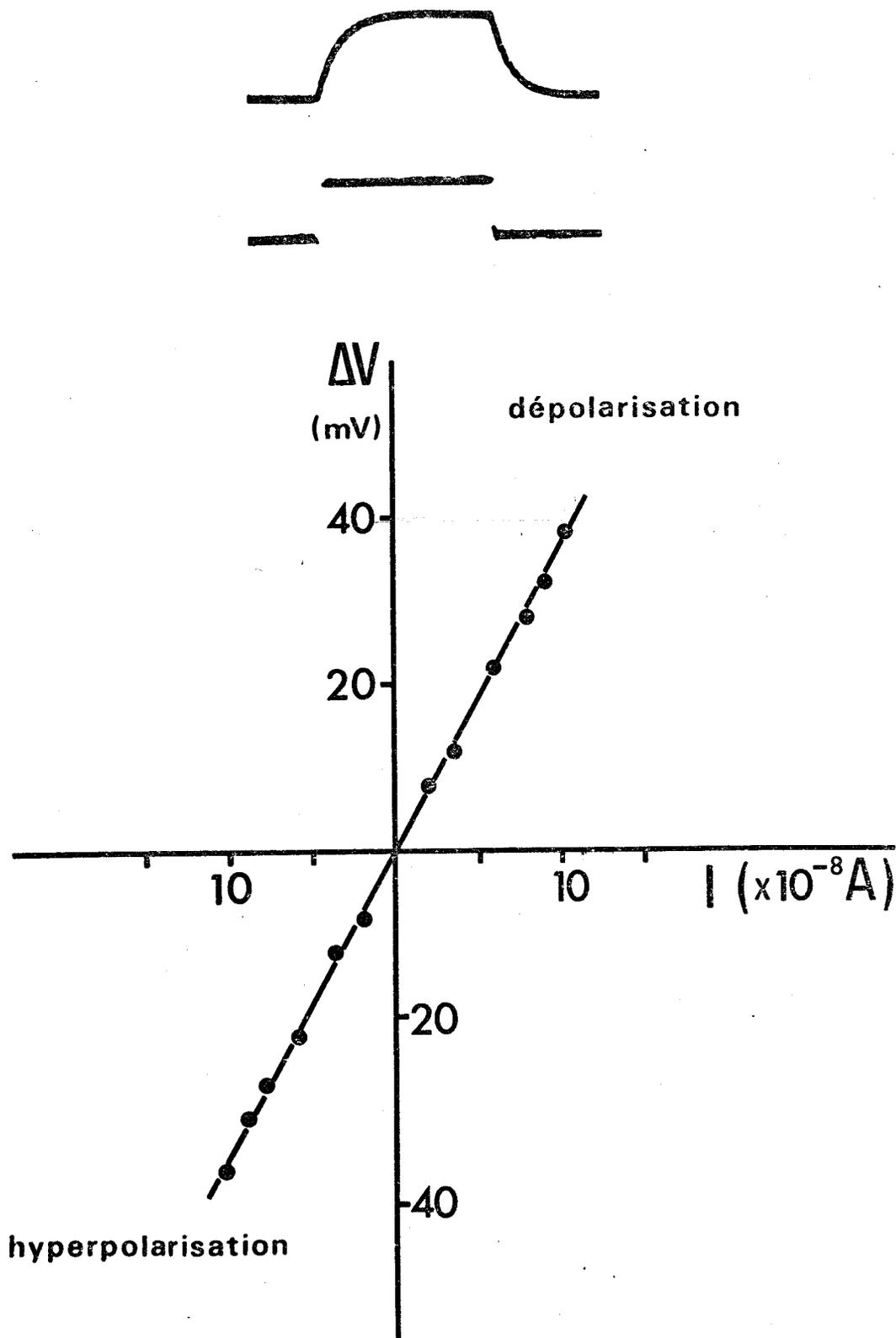


Figure 6 - En haut : Enregistrement de la variation de potentiel pendant l'application d'un courant.  
En bas : Relation voltage - courant d'un ovocyte (P.M. - 63 mV ; diamètre 1150  $\mu$ ).



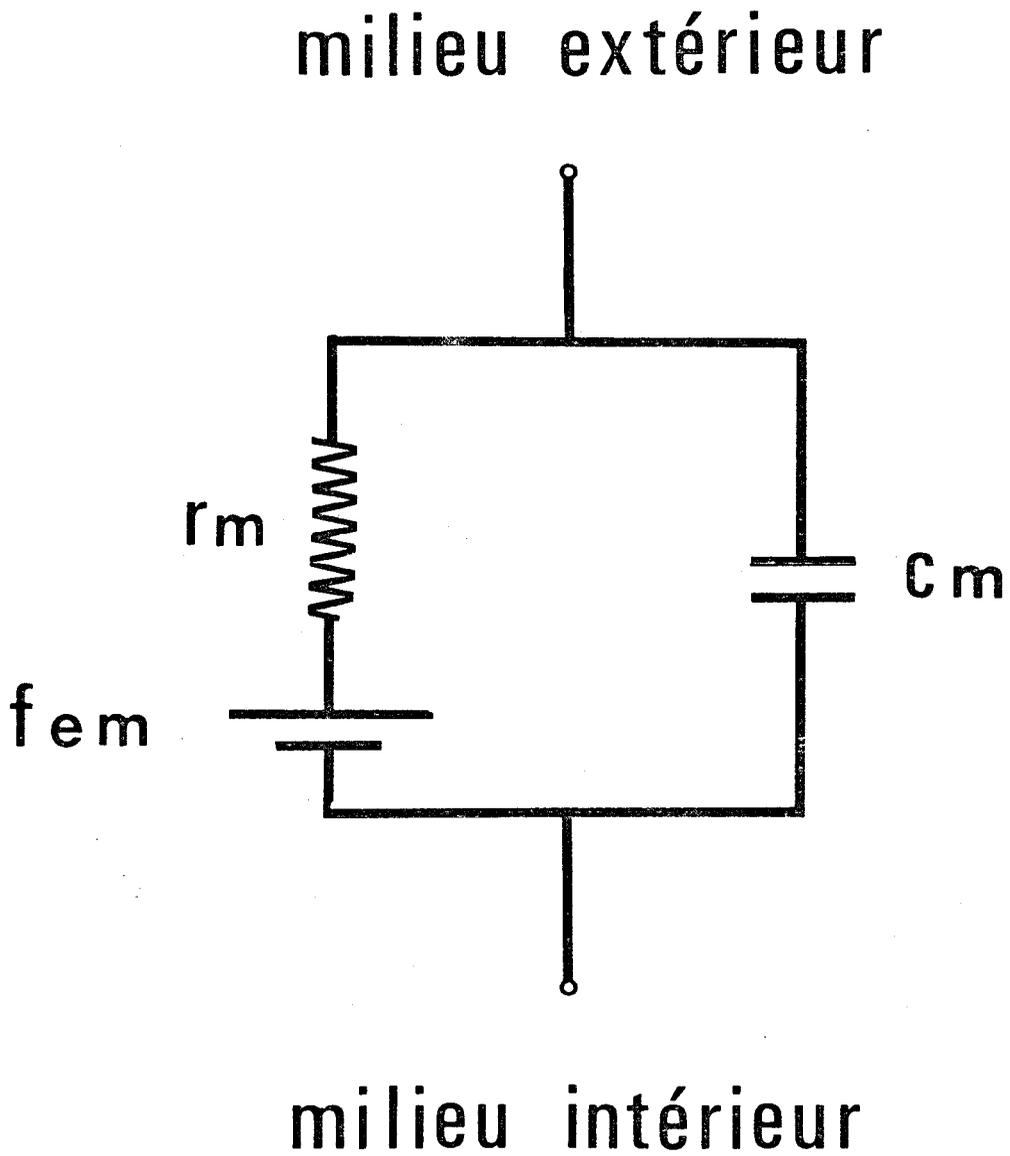


Figure 7 - Schéma électrique du complexe membranaire de l'ovocyte.

- $r_m$  : résistance effective
- $c_m$  : capacité
- fem : force électromotrice membranaire.



La résistivité du liquide intracellulaire est faible car le milieu interne est en effet très conducteur. Ainsi, LOEWENSTEIN et KANNO (1963) l'évaluent à 50  $\Omega$ .cm pour le cytoplasme des ovocytes de Triturus. Quant au liquide extracellulaire, sa résistivité étant très faible, et le volume conducteur entourant la préparation étant grand, sa résistance peut être négligée.

La variation de potentiel qui résulte de l'application d'un courant dépolarisant ou hyperpolarisant rend donc bien compte de la résistance transversale  $r_m$ . Connaissant le diamètre d'un ovocyte, la résistance membranaire effective ( $r_m$ ) est convertie, en la multipliant par la surface membranaire de la cellule en une résistance spécifique  $R_m$  exprimée généralement en  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>.

Les valeurs de  $R_m$  ainsi calculées sont en moyenne de l'ordre de 3000  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> pour les petits ovocytes et de 15.000  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> pour des ovocytes de grand diamètre. Ces résultats sont comparables à ceux donnés par MAENO (1959) sur les ovocytes de Bufo bufo : la  $R_m$  est en moyenne de 25.000  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>. Il faut signaler, cependant, que la résistance effective mesurée dans nos conditions expérimentales, englobe la résistance de la membrane ovocytaire et la résistance de l'épithélium interne de l'ovaire. KANNO et LOEWENSTEIN (1963) estiment la valeur de la résistance de l'épithélium ovarien à moins de 2,5 p. 100 de la résistance totale des ovocytes de Xenopus laevis. L'existence de l'épithélium interne de l'ovaire ne semble donc pas entraîner une erreur importante dans la mesure de la  $R_m$ .

Enfin, la résistance spécifique ( $R_m$ ) dépend, comme pour le P.M., de la taille des ovocytes (figure 8). La corrélation entre le logarithme décimal de la  $R_m$  et le diamètre des ovocytes est très significative ( $r = 0,90$ ). Le fait que le P.M. et le logarithme décimal de la  $R_m$  dépendent tous deux du diamètre, met en évidence une relation entre le P.M et log.  $R_m$  (figure 9), la

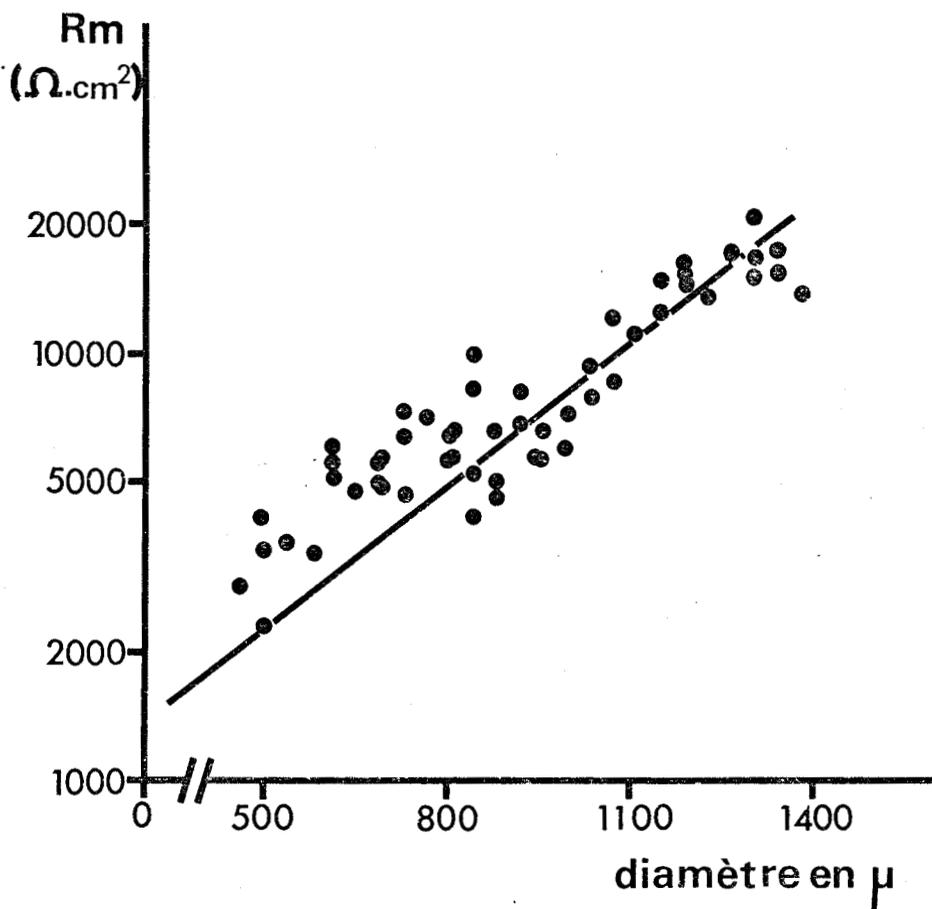


Figure 8 - Relation entre le log de  $R_m$  et le diamètre des ovocytes.

— droite de régression  $y = 0,00081 x + 3,13$  ( $r = 0,90$ ).



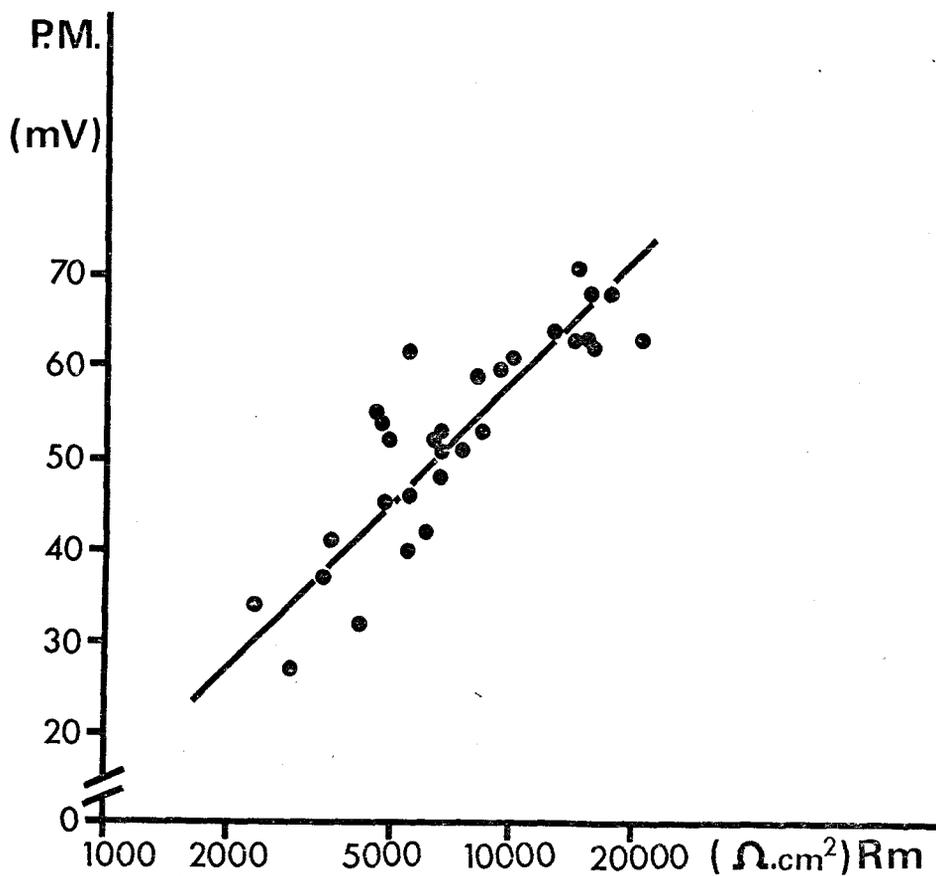


Figure 9 - Relation entre le P.M. et log de  $R_m$ .

— droite de régression  $y = 45,8 x - 124,6$  ( $r = 0,93$ ).



corrélation entre ces deux paramètres étant très significative ( $r = 0,93$ ). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par KANNO et LOEWENSTEIN (1963) sur les ovocytes de Xénope.

### 3) Capacité membranaire

L'enregistrement présenté figure 6 a montré qu'un courant s'établissant instantanément produit initialement une variation de potentiel variant exponentiellement au cours du temps, pour secondairement, atteindre un niveau constant. Pour expliquer ce fait, il faut faire appel, comme cela a déjà été précisé à une autre caractéristique de la membrane : sa capacité électrique.

Les membranes cellulaires sont formées d'une double couche lipidique qui constitue des éléments de très forte résistivité donc mauvais conducteurs. Elles séparent deux milieux qui sont à l'inverse bons conducteurs : le milieu extérieur et le milieu intracellulaire. Cette double couche constitue les armatures d'un condensateur et la forme de la variation de potentiel provoquée par un échelon de courant appliqué à la membrane, peut donc s'expliquer par la constitution physique de la membrane des ovocytes comprenant à la fois une résistance et une capacité.

Nous savons que dans un circuit R.C (résistance et capacité en parallèle) la constante de temps  $\tau$  est égale au produit  $R \times C$ .

Ainsi, pour le système membranaire de l'ovocyte :

$$\tau_m = R_m \times C_m$$

$\tau_m$  : constante de temps membranaire

$R_m$  : résistance spécifique membranaire

$C_m$  : capacité spécifique membranaire.

L'évaluation de la constante  $\tau$  peut être faite d'après la relation exprimant la variation du potentiel au cours du temps dans le cas d'une sphère donc

de l'ovocyte soit :

$$V = V_0 (1 - e^{-\frac{t}{\tau}})$$

-  $V_0$  : correspond à l'amplitude maximale de la variation de potentiel lors de l'application d'un courant durable à travers la membrane

-  $V$  : correspond à l'amplitude de la variation de potentiel au temps

$t$ . Quand  $t = \tau$ , l'équation devient :

$$V = V_0 (1 - e^{-1})$$

d'où

$$V = 0,63 V_0$$

On peut alors déterminer graphiquement (figure 10) la constante de temps  $\tau_m$  correspondant au temps mis par  $V$  pour atteindre 63 p. 100 de la valeur  $V_0$ .

Les mesures de  $\tau$  sont de l'ordre de 40 ms à 80 ms comme l'indiquent les valeurs données au tableau 8.

Diamètre en $\mu$	P.M. mV	$R_m$ $\Omega\text{cm}^2$	$\tau_m$ $\text{s} \times 10^{-3}$	$C_m$ $\text{F} \times 10^{-6}/\text{cm}^2$
844	53	8400	74	8,8
885	52	6555	42	6,1
923	59	8320	40	4,8
960	53	6720	46	6,8
1188	62	16104	87,5	5,4

Tableau 8 - Constantes électriques des ovocytes de Pleurodèle.

Ces valeurs permettent de calculer  $C_m$  connaissant  $R_m$ . Les valeurs de  $C_m$  déduites selon cette méthode se situent entre 4,8 et 8,8  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Sur les ovocytes de Bufo bufo, MAENO (1959) obtient une  $C_m$  comprise entre 6 et 11  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , quant à KANNO et LOEWENSTEIN (1963), ils calculent une valeur moyenne de  $5,4 \pm 0,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  pour les ovocytes de Triturus. Ces résultats sont donc proches de ceux que nous avons obtenus.

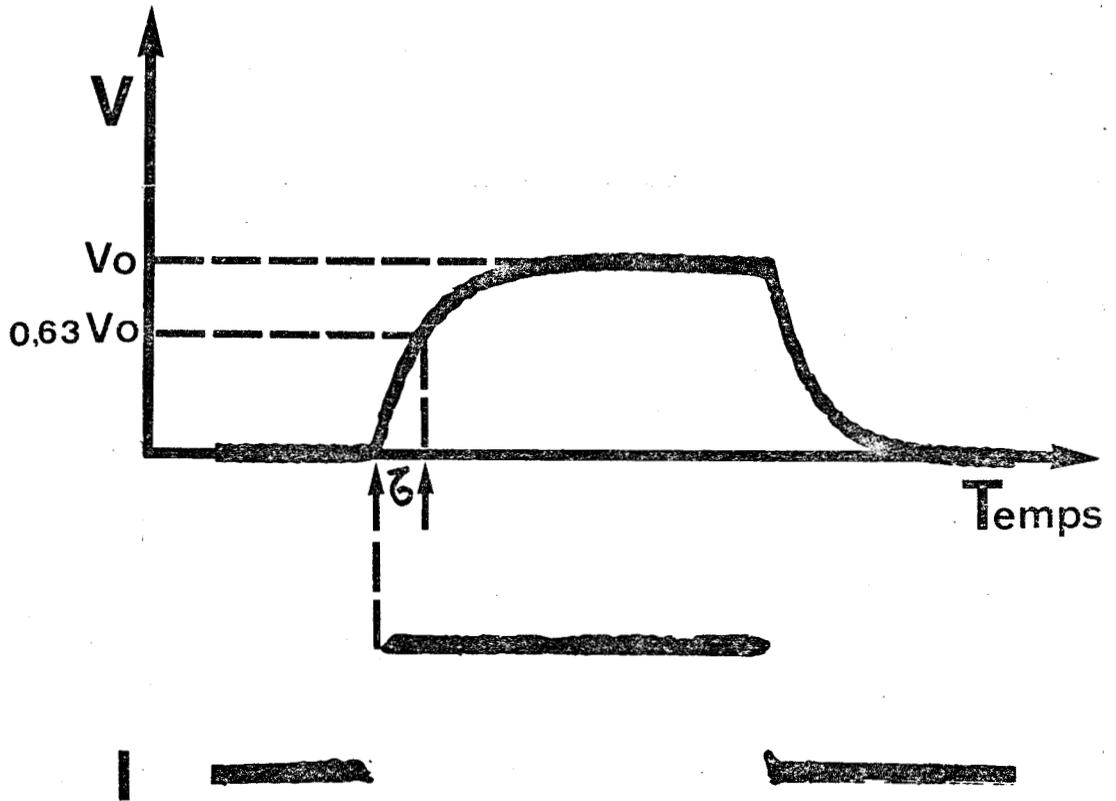


Figure 10 - Détermination graphique de la constante de temps membranaire.



## Conclusion

L'analyse de la variation du P.M. et de la résistance membranaire en fonction du diamètre des ovocytes de Pleurodèle montre que la maturation de ces cellules est associée à une augmentation de la valeur du potentiel et de la résistance. Les variations des paramètres électriques traduisent, semble-t-il, une évolution de la perméabilité ionique membranaire des ovocytes.

Ainsi, l'évolution précise des caractéristiques électriques passives et, particulièrement du P.M. et de la  $R_m$ , témoins des modifications de la perméabilité ionique membranaire globale, va permettre de déterminer, grâce à l'étude des effets des milieux de concentration ionique anormale, notamment en ions  $K^+$  et  $Na^+$ , les changements de la perméabilité ionique au cours de la maturation des ovocytes.

## II - ETUDE DES CONTRIBUTIONS IONIQUES A LA GENESE DU P.M. DES OVOCYTES

Comme cela a déjà été souligné à plusieurs reprises, l'ovocyte est entouré intimement par l'épithélium interne de l'ovaire. Il était donc nécessaire de connaître le rôle éventuel de l'épithélium ovarien dans les échanges avec le milieu extérieur.

Pour 18 ovocytes dont les diamètres sont compris entre 800 et 1300  $\mu$  nous avons pu dégager les formations périovocytaires (figure 11) et ainsi calculer la valeur moyenne du potentiel intracellulaire.

La seule difficulté réside dans le fait que la paroi cellulaire ne doit pas être lésée au cours de la dissection. En effet, un léger traumatisme provoqué à la surface cellulaire n'apparaît qu'au bout de quelques heures sous la forme d'une modification de la pigmentation associée à une baisse corrélative de l'amplitude du potentiel de membrane.

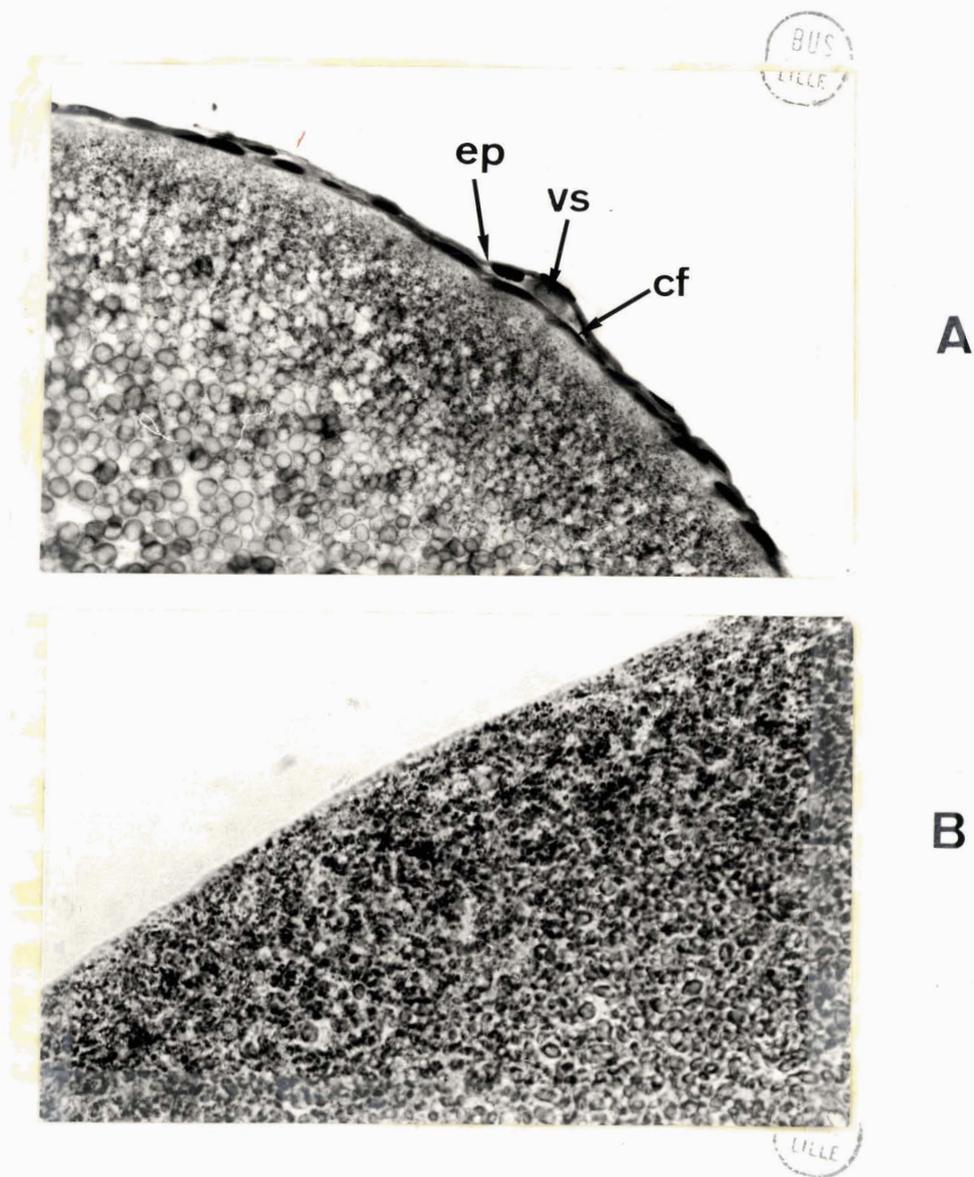


Figure 11 - Coupe d'ovocytes mûrs avant (A) et après (B) ablation des formations périovocytaires.

ep : épithélium interne de l'ovaire  
cf : cellules folliculaires  
vs : vaisseau sanguin.

Diamètre des ovocytes compris entre 800 et 1300 $\mu$	P.M. moyen mV	Nombre de cas
Ovocytes + formations péριοοουταίρες	- 62,84 mV $\pm$ 7,02	75
Ovocytes sans les forma- tions péριοοουταίρες	- 61,66 $\pm$ 10,56	18

Tableau 9 - Valeurs moyennes du P.M. des ovocytes entourés de l'épithélium interne de l'ovaire et des ovocytes libérés de cet épithélium.

Le tableau 9 atteste qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux séries d'ovocytes. Ces résultats nous permettent de penser que l'épithélium, entourant les ovocytes, ne présente aucune incidence sur la mesure du potentiel intracellulaire. En outre, KANNO et LOEWENSTEIN (1963) observent la faible résistance électrique de l'épithélium ovarien du Xénope. Ils concluent que cette résistance est négligeable devant la résistance élevée du complexe membranaire des ovocytes de Xénope.

Ces données nous permettent d'établir que l'épithélium ne perturbe pas les échanges ioniques entre le milieu intra-ovocytaire et le milieu externe.

1) Influence de la concentration potassique externe sur le P.M. des ovocytes

Nous avons dans un premier temps étudié la perméabilité du complexe membranaire de l'ovocyte aux ions  $K^+$  en faisant varier leur concentration dans le milieu extracellulaire.

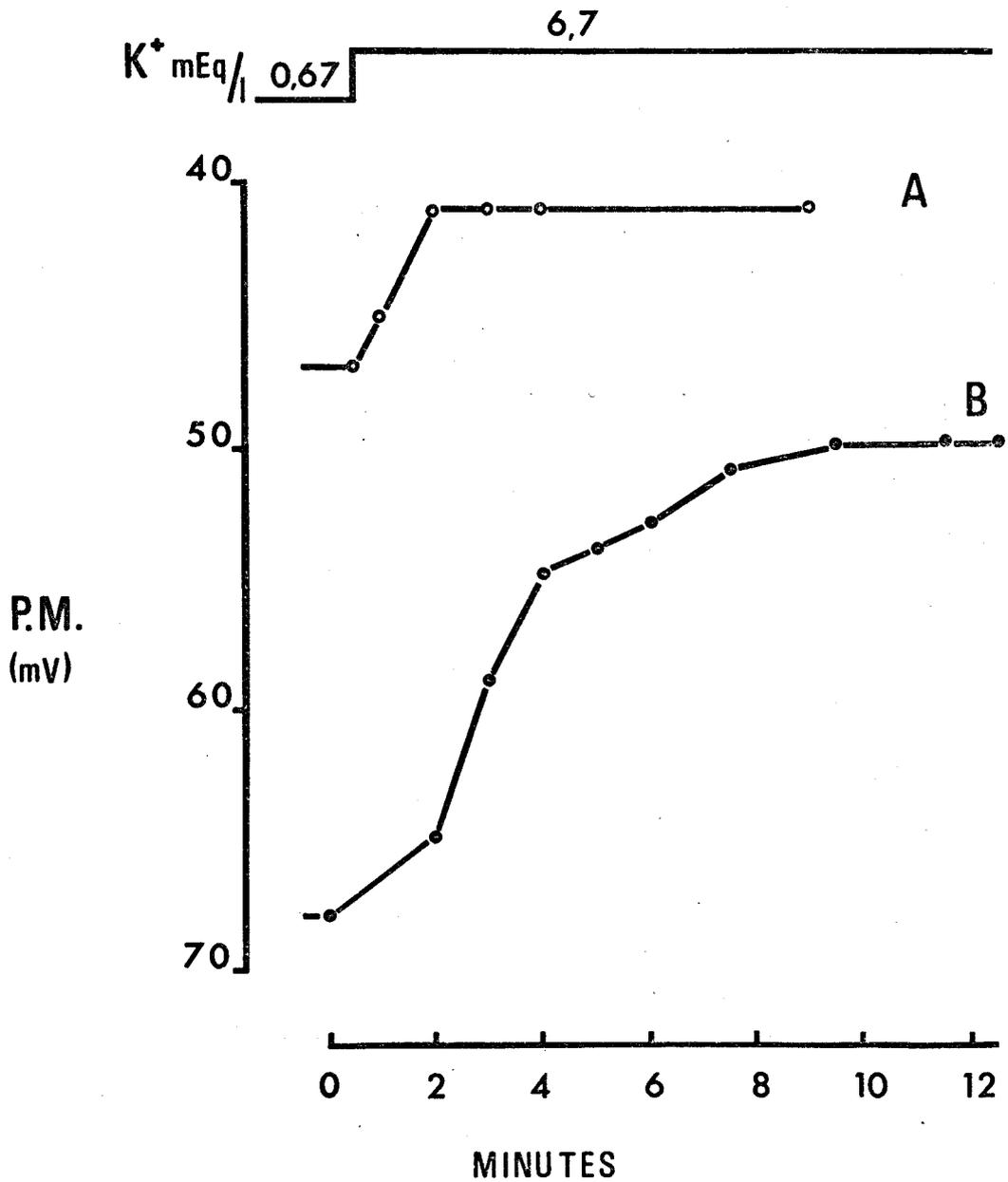


Figure 12 - Influence d'un milieu hyperpotassique ( $[K^+]_e \times 10$ ) sur le P.M. des ovocytes.

courbe A : ovocyte de diamètre : 530  $\mu$   
courbe B : ovocyte de diamètre : 960  $\mu$ .



La concentration potassique externe ( $[K^+]_e$ ) est réduite en deçà de 0,67 mEq/l (valeur normale) en diminuant la concentration du KCl dans le milieu de Steinberg. L'augmentation de la concentration potassique est réalisée par l'addition de  $K_2SO_4$  ("Techniques").

Pour la présentation des résultats du potentiel, nous avons tenu compte du diamètre des ovocytes.

Les valeurs de P.M. obtenues pour les différentes concentrations potassiques se fixent à un niveau stable, plus ou moins rapidement, généralement après deux minutes d'action de ces milieux pour les petits ovocytes, et après une dizaine de minutes pour les ovocytes de grande taille. La figure 12 donne un exemple de la variation du potentiel de membrane d'un petit ovocyte (courbe A) et d'un ovocyte de plus grand diamètre (courbe B) en fonction du temps d'application du milieu de Steinberg enrichi 10 fois en ions  $K^+$ .

Dans tous les cas, la réversibilité du phénomène a été observée lorsque la solution externe modifiée est remplacée par le milieu de Steinberg.

Le tableau 10 illustre les effets des variations de  $[K^+]_e$  sur l'amplitude du potentiel de membrane des ovocytes dont le diamètre est compris entre 500 et 600  $\mu$ , et celui des ovocytes dont le diamètre se situe entre 950 et 1400  $\mu$ . La valeur moyenne du potentiel donnée pour chaque  $[K^+]_e$  correspond aux valeurs maximales et stables obtenues pour les différents ovocytes.

Ces résultats indiquent que le milieu dépourvu en ions  $K^+$  n'entraîne qu'une faible hyperpolarisation, par contre, le milieu enrichi en  $K^+$  provoque des dépolarisations très nettes et d'autant plus importantes que  $[K^+]_e$  est plus forte (figure 13) :

- pour des ovocytes de grande taille (950  $\mu$  - 1400  $\mu$ ), la relation P.M. = f. ( $\log K_e$ ) est linéaire lorsque la concentration potassique dans le milieu externe est supérieure à 2,68 mEq/l. La pente de la droite est de

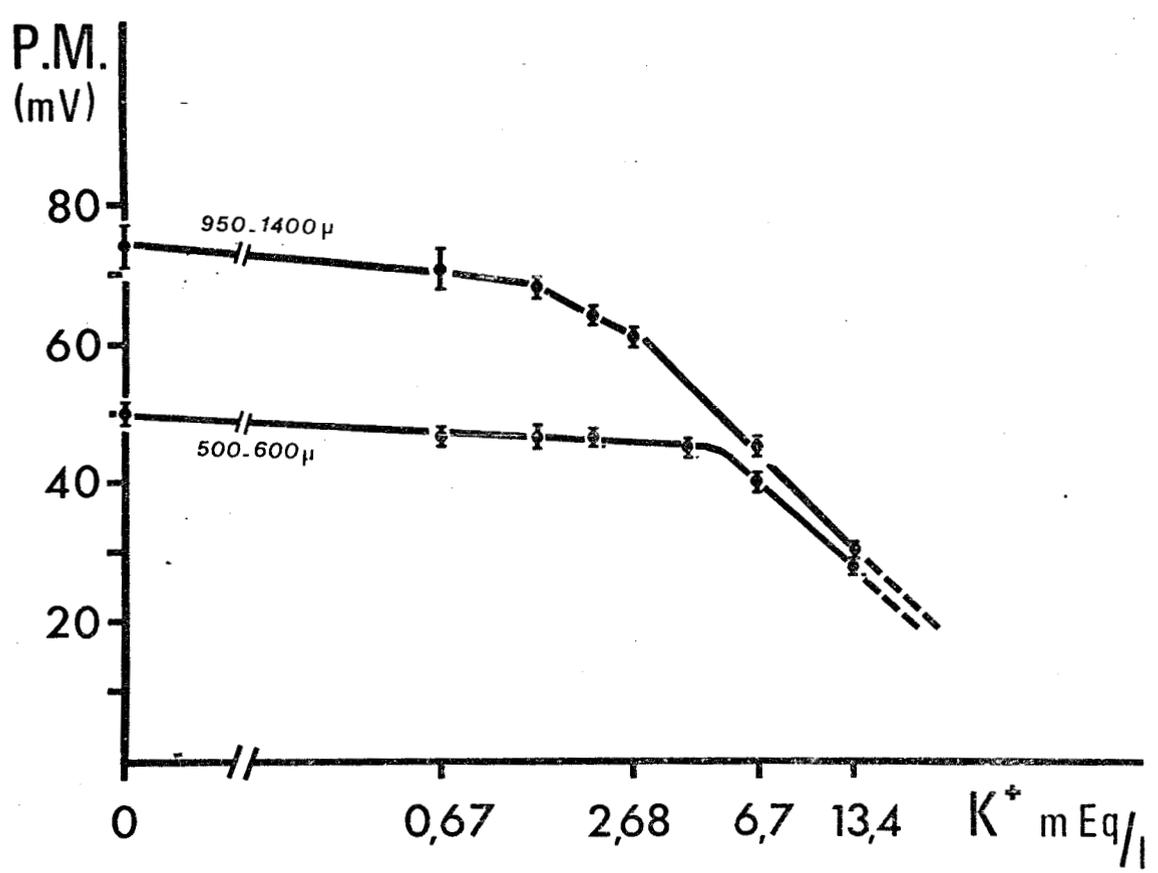


Figure 13 - Variation du P.M. (échelle linéaire) en fonction de la concentration extracellulaire de potassium (échelle logarithmique).



$K_e \times 0,67$ mEq/l	Diamètre des ovocytes 500 - 600 $\mu$		Diamètre des ovocytes 950 - 1400 $\mu$	
	P.M. mV	Nombre d'expériences	P.M. mV	Nombre d'expériences
0	- 50,12 $\pm$ 3,48	8	- 74,33 $\pm$ 4,50	12
1	- 46,66 $\pm$ 1,75	33	- 70,57 $\pm$ 4,64	32
2	- 46,62 $\pm$ 3,20	8	- 68,26 $\pm$ 4,76	14
3	- 46,87 $\pm$ 2,35	8	- 64,33 $\pm$ 3,04	13
4	-	-	- 60,83 $\pm$ 3,48	8
6	- 45 $\pm$ 3,16	8	- 54,55 $\pm$ 2,43	13
10	- 39,83 $\pm$ 2,99	9	- 45,72 $\pm$ 2,98	18
20	- 28,66 $\pm$ 3,14	8	- 30,22 $\pm$ 2,86	14

Tableau 10 - Valeurs moyennes du P.M. en fonction de la concentration potassique externe.

44 mV au lieu de 58 mV lorsque  $[K^+]_e$  varie d'un facteur 10. Lorsque  $[K^+]_e$  est inférieure à 2,68 mEq/l le P.M. varie plus faiblement.

- Pour des ovocytes plus petits (500 - 600  $\mu$ ), le P.M. reste quasi stable pour des  $[K^+]_e$  variant de 0 à 4 mEq/l. A partir de cette concentration, il diminue linéairement avec le logarithme de  $[K^+]_e$  ; la pente de la droite étant de 40 mV pour une variation de 10 fois la concentration potassique externe.

L'ensemble de ces résultats oblige à considérer le potentiel de membrane non comme un potentiel de pile de concentration, mais comme un potentiel de diffusion, dans lequel les ions  $K^+$  interviennent de façon importante, certes, mais non exclusive. Par ailleurs, la figure 13 permet de

préciser que le potentiel de membrane varie notablement à partir d'un seuil de concentration en ions  $K^+$  d'autant plus faible que le diamètre des ovocytes est plus grand, ce qui peut signifier que la perméabilité aux ions  $K^+$  du complexe membranaire s'accroît avec la maturation des ovocytes. Ces résultats sont conformes à ceux de MAENO (1959) sur les ovocytes de Bufo bufo.

Cette dernière hypothèse est corroborée par le fait que la résistance de membrane des jeunes ovocytes diminue plus faiblement que celle des ovocytes de grande taille lorsque  $[K^+]_e$  est égale à 6,7 mEq/l (figure 14). En effet, lorsqu'un échelon de courant est appliqué au complexe membranaire, la variation de potentiel qui en résulte est plus faible lorsque l'ovocyte baigne dans le milieu de Steinberg enrichi dix fois en ions  $K^+$  que dans ce milieu de  $[K^+]_e$  normale comme le montre les valeurs du rapport  $\frac{r_m (K^+ \times 10)}{r_m (K^+ \times 1)}$  consignées au tableau 11.

$r_m (K^+ \times 10)$  correspond à la valeur de la résistance effective pour  $[K^+]_e = 6,7 \text{ mEq/l}$  ;  
 $r_m (K^+ \times 1)$  correspond à la valeur de  $r_m$  pour  $[K^+]_e = 0,67 \text{ mEq/l}$ .

Diamètre des ovocytes : en $\mu$	$\frac{r_m (K^+ \times 10)}{r_m (K^+ \times 1)}$
500 - 600	0,8
950 - 1400	0,6

Tableau 11 - Mesures relatives de  $r_m$  pour  $[K^+]_e = 6,7 \text{ mEq/l}$   
 ( $r_m$  en milieu normal = 1 pour  $[K^+]_e = 0,67 \text{ mEq/l}$ .)

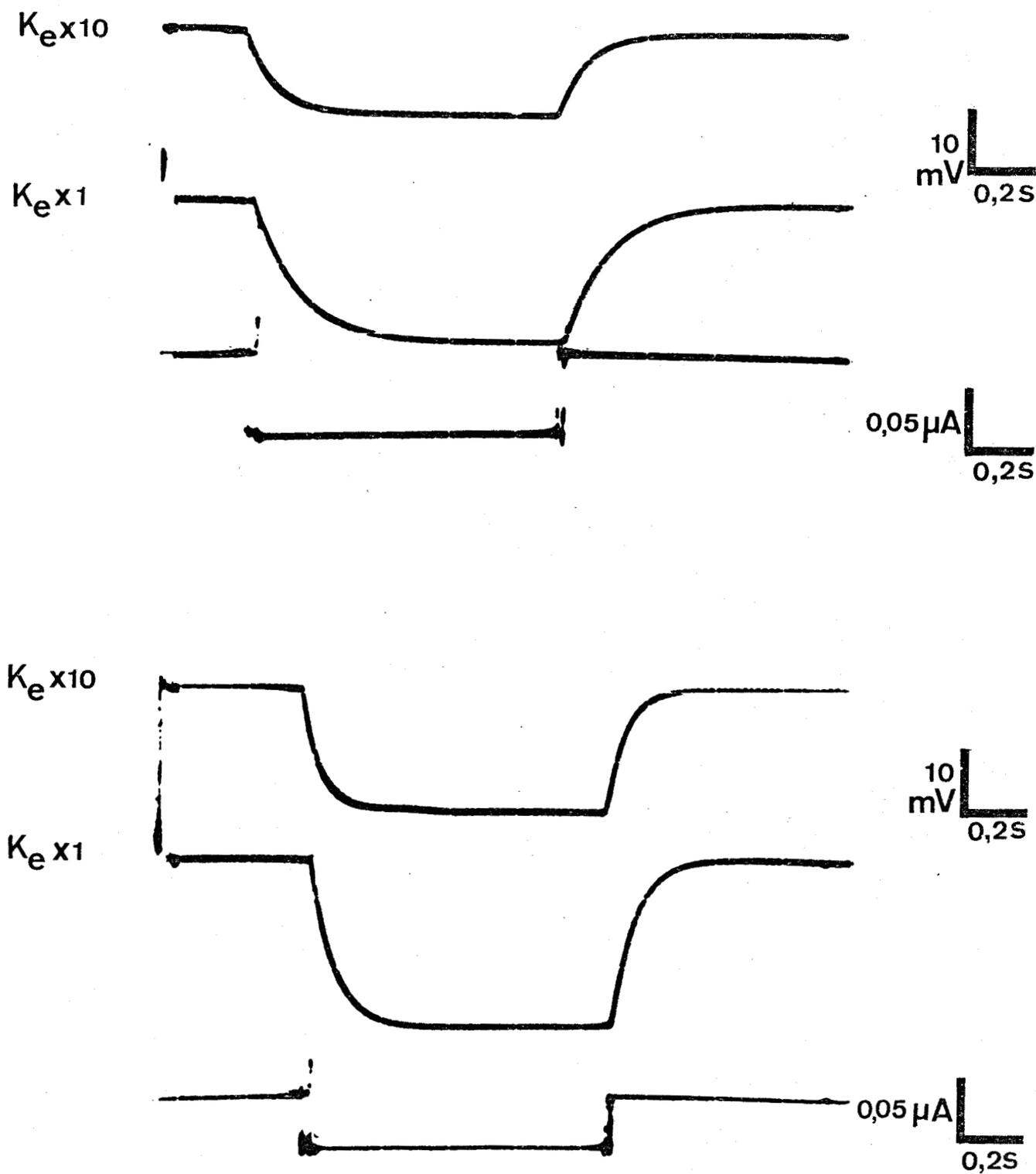


Figure 14 - Variation de la  $r_m$  sous l'action d'un milieu hyperpotassique  
 $[K^+]_e = 6,7 \text{ mEq/l.}$

en haut : ovocyte mûr.  
en bas : jeune ovocyte.



Cette variation de résistance observée traduit en fait la variation de la conductance membranaire puisque cette conductance  $g_m$  est égale à l'inverse de la résistance membranaire spécifique. Dans ces conditions, la conductance du complexe membranaire augmente, ce qui doit correspondre vraisemblablement à l'augmentation de la conductance spécifique aux ions  $K^+$ .

Connaissant les résistances spécifiques en milieu normal et celles en milieu enrichi en ions  $K^+$ , on peut en déduire que l'augmentation de la conductance, provoquée par le milieu hyperpotassique, est plus forte pour les ~~petits~~ <sup>grands</sup> ovocytes que pour ceux de ~~grande~~ <sup>petite</sup> taille.

En conclusion, le potentiel de membrane ne correspondant pas à une pile de concentration aux ions  $K^+$ , nous devons envisager la contribution des autres ions à la perméabilité globale du cortex ovocytaire.

## 2) Influence de la concentration sodique externe sur le P.M. des ovocytes

Les expériences de MAENO (1959) réalisées sur les ovocytes de Bufo bufo démontrent que la contribution sodique, dans le maintien du P.M., est nulle. De plus, des études plus récentes entreprises par DICK et MAC LAUGHLIN (1969) sur les ovocytes de Bufo bufo et par SIGLER et JANACEK (1971) sur les ovocytes de Rana temporaria font état d'une faible activité sodique intraovocytaire et suggèrent ainsi que la plupart du sodium est à l'état combiné dans ce milieu.

Dans le but de vérifier si la contribution sodique est négligeable, au niveau de notre préparation, une étude de l'influence de la modification de la concentration sodique externe  $[Na^+]_e$  a été entreprise. Les effets des milieux appauvris et enrichis en ions  $Na^+$  ont été analysés.

Les milieux hyposodiques résultent de la diminution de la concentration du  $NaCl$ ,  $[Cl^-]_e$  étant maintenue constante par apport de chlorhydrate

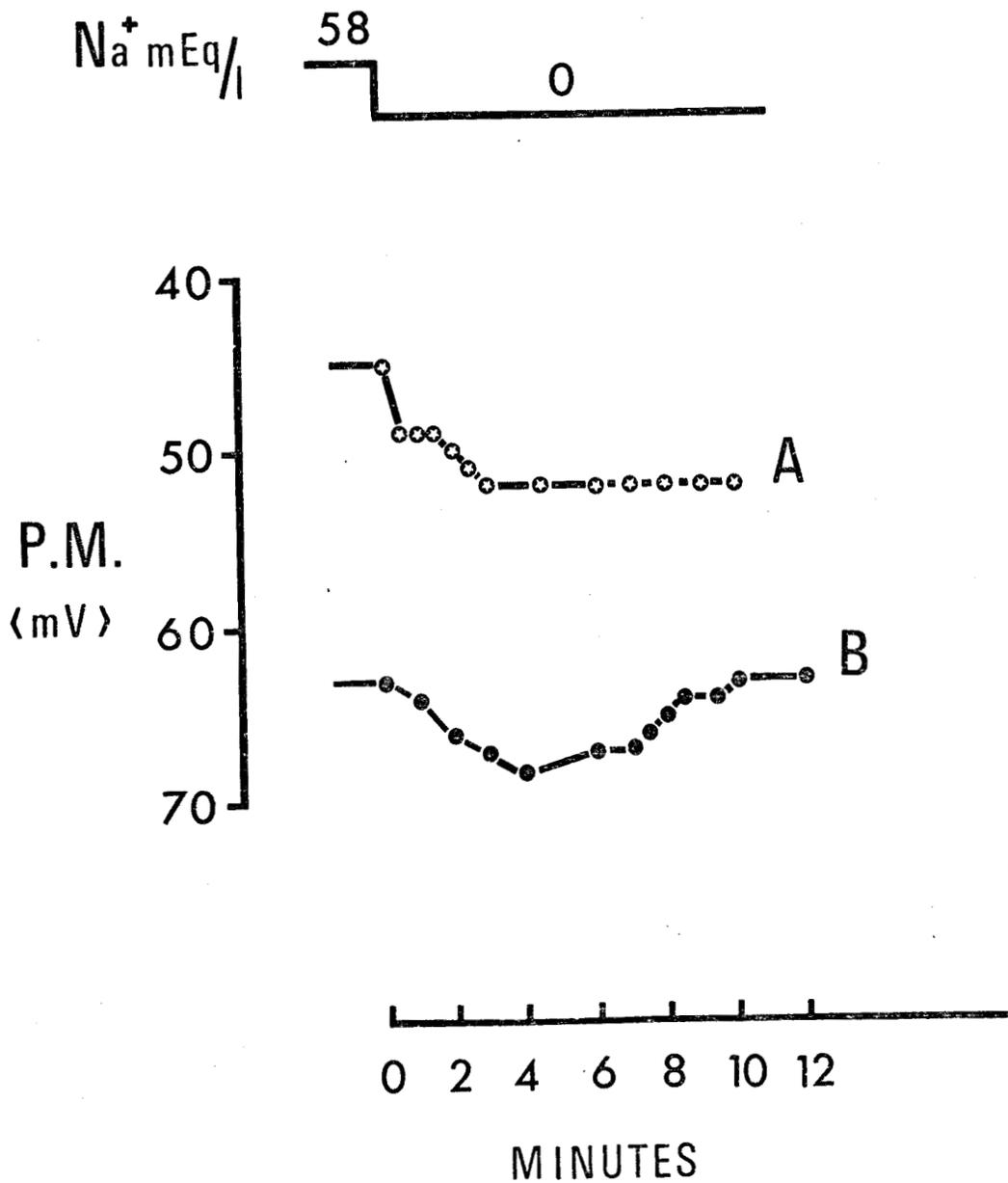


Figure 15 - Evolution du P.M. au cours du temps en milieu  $[Na^+]_e = 0$ .

courbe A : ovocyte de diamètre : 570 μ

courbe B : ovocyte de diamètre : 960 μ.



de choline (tableau 3, Techniques). Les milieux hypersodiques sont réalisés en ajoutant du sulfate de sodium à la solution normale (tableau 4, Techniques).

Lors de l'application des milieux appauvris en ions  $\text{Na}^+$ , le complexe membranaire de l'ovocyte peut réagir de trois manières différentes :

- Lorsque les ovocytes matures ( $950 \mu - 1400 \mu$ ) sont immergés dans un milieu dépourvu de  $\text{Na}^+$ , il se produit un effet hyperpolarisant qui ne dure que quelques minutes, puis le P.M., après dix minutes d'action de ce milieu, reprend sa valeur initiale (figure 15, courbe B).

- Pour ce qui est des ovocytes <sup>immatures</sup> matures ( $500 - 600 \mu$ ), deux effets opposés sont observés :

+ Certains ovocytes s'hyperpolarisent progressivement de quelques millivolts, effet probablement dû à la fuite des ions  $\text{Na}^+$  vers le milieu extérieur. Après deux à quatre minutes, l'amplitude du P.M. atteint une valeur maximale qui reste stable pendant la durée d'action du milieu anormal (figure 15, courbe A).

+ D'autres ovocytes, par contre, se dépolarisent transitoirement sous l'action du milieu sans  $\text{Na}^+$  (figure 16) pour finalement recouvrer la polarisation membranaire initiale. L'amplitude maximale de la dépolarisation transitoire est en moyenne de 4 à 6 mV.

Le tableau 12 mentionne les valeurs du P.M. en fonction des différentes concentrations sodiques externes. Ne sont portées, dans ce tableau, que les amplitudes du P.M. mesurées au maximum de l'hyperpolarisation transitoire pour les ovocytes dont le diamètre est compris entre  $950 \mu$  et  $1400 \mu$  et ayant subi l'action des milieux dépourvus en  $\text{Na}^+$ .

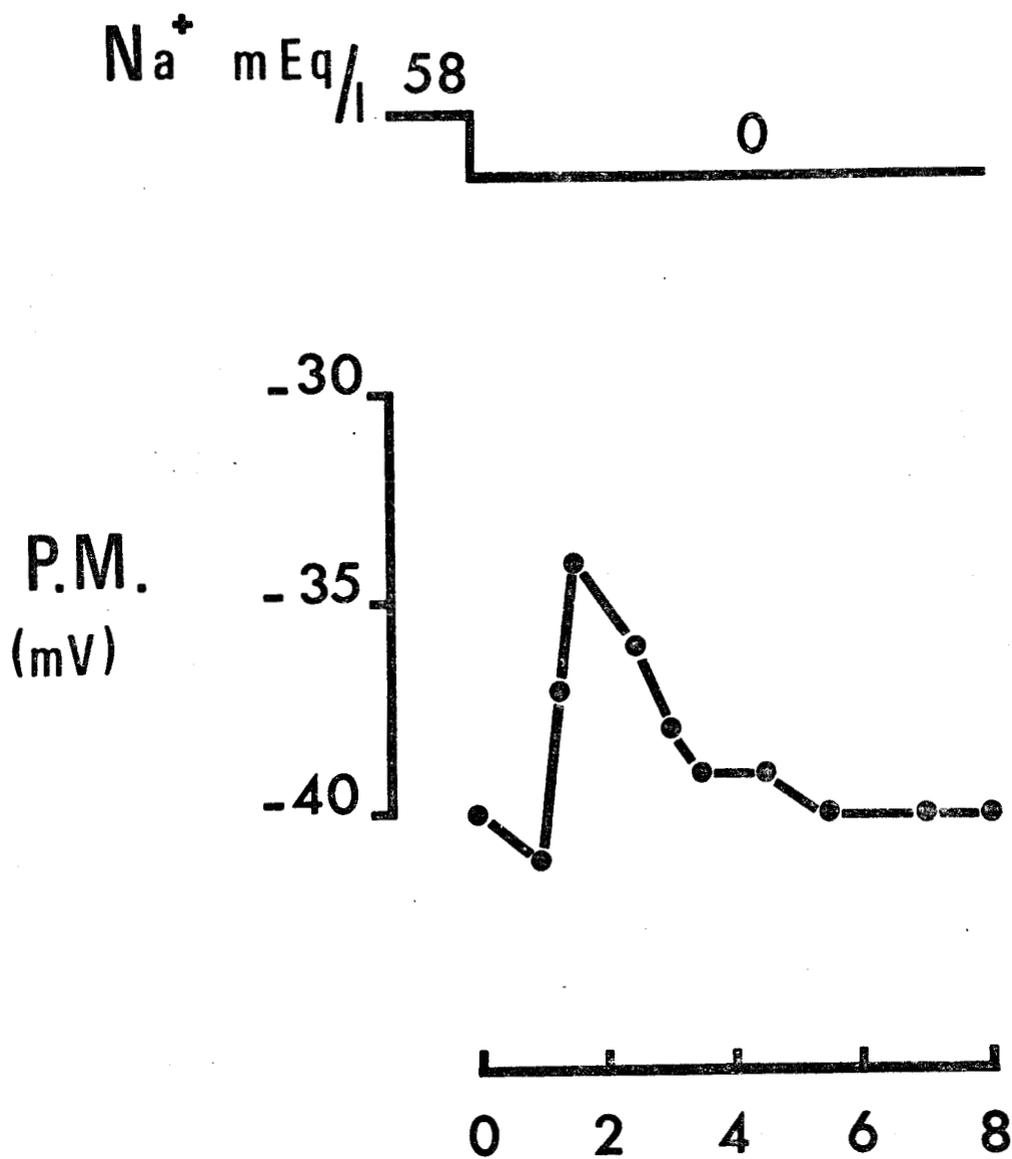


Figure 16 - Evolution du P.M. au cours du temps en milieu  $[\text{Na}^+]_e = 0$ .

ovocyte de diamètre : 530  $\mu$



$[Na^+]_e \times 58$ mEq/l	Diamètre des ovocytes 500 $\mu$ à 600 $\mu$		Diamètre des ovocytes 950 $\mu$ à 1400 $\mu$	
	P.M. mV	Nombre d'expériences	P.M. mV	Nombre d'expériences
0	49,60 $\pm$ 4,01	7	76,14 $\pm$ 5,74	12
0,4	44,80 $\pm$ 4,77	7	73,88 $\pm$ 4,35	7
1	45,60 $\pm$ 4,01	28	70,17 $\pm$ 4,70	32
1,5	45,85 $\pm$ 5,05	4	69,32 $\pm$ 1,97	7
2	46,46 $\pm$ 1,27	7	70,12 $\pm$ 2,90	7

Tableau 12 - Valeurs moyennes du P.M. des ovocytes de Pleurodèle en fonction de la concentration sodique externe.

La figure 17 représentant les courbes P.M. = f (log  $Na_e$ ) rend compte des modifications de l'amplitude du P.M. en fonction du logarithme de la concentration externe en ions  $Na^+$ . L'augmentation de la concentration sodique n'entraîne aucune variation du potentiel transmembranaire.

Une tentative d'explication, des phénomènes d'hyperpolarisation ou de dépolarisation transitoire et d'hyperpolarisation durable lors de l'action d'un milieu dépourvu de  $Na^+$ , ne peut être faite qu'en se référant aux nombreuses études effectuées sur les membranes excitables ; étant entendu que l'analogie entre le comportement de ces membranes et celui du complexe membranaire de l'ovocyte ne doit s'établir qu'avec beaucoup de circonspection.

En effet, à l'aide de choline marquée au  $^{14}C$ , RENKIN (1961) démontre son accumulation à l'intérieur de la cellule du muscle squelettique de la grenouille, la pénétration se ferait à la même vitesse que celle du sodium. Quant à OCHS (1966), il observe un effet dépolarisant des milieux dépourvus de Na, et conclut à une action propre de la choline. Un effet hyperpolarisant

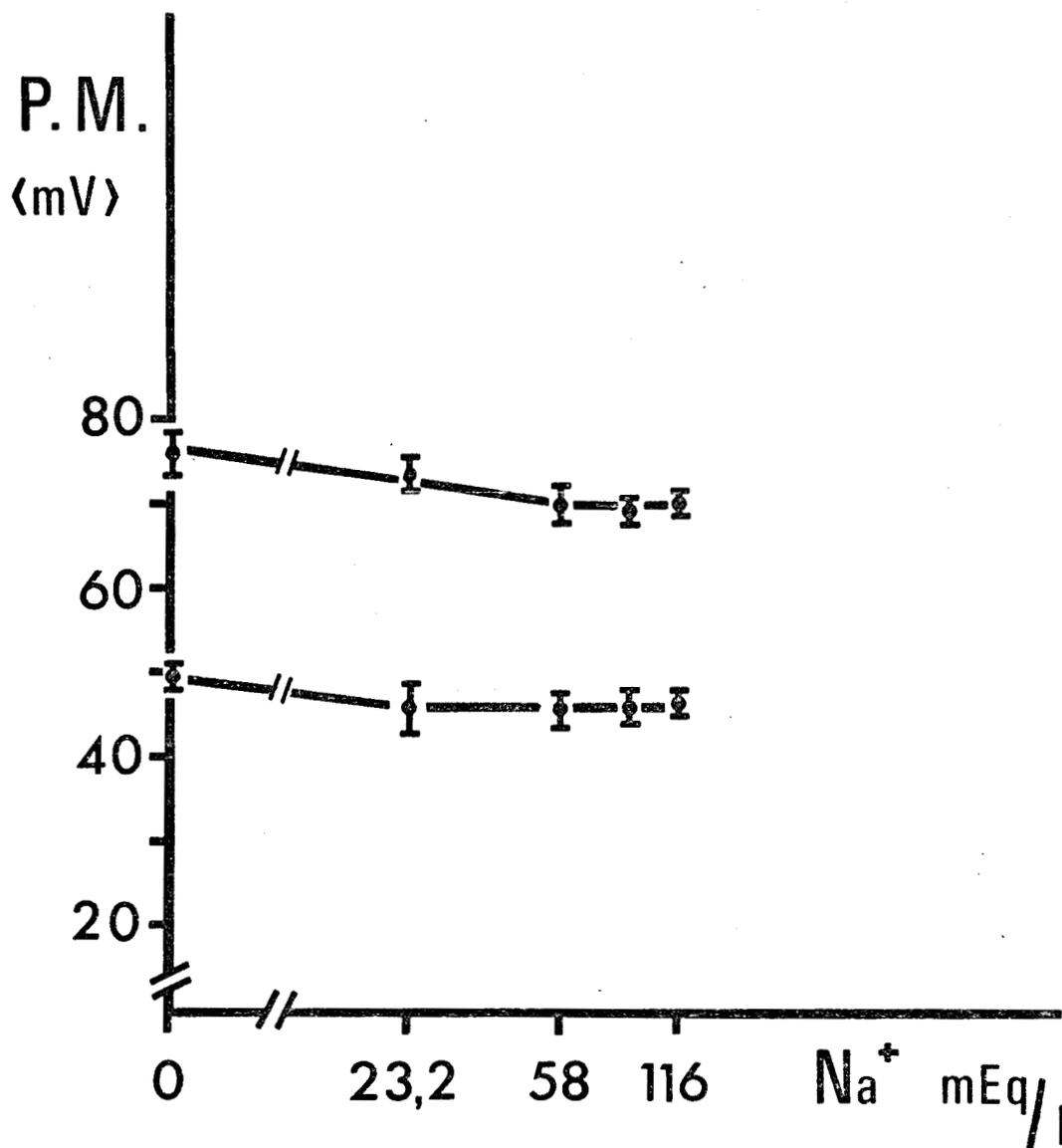


Figure 17 - Variation du P.M. (échelle linéaire) en fonction de la concentration extracellulaire de sodium (échelle logarithmique).



des milieux hyposodiques (la choline remplace le sodium) est observé par HAYS, LANG et GAINER (1968) sur les fibres musculaires de crabe, Callinectes sapidus ; par ailleurs, ces auteurs signalent une action toxique à long terme de la choline. Enfin, sur les fibres musculaires de Carcinus, MOUNIER (1970) mentionne une hyperpolarisation durable ou transitoire qui se manifeste en milieu privé de  $\text{Na}^+$  et additionné de choline.

L'hyperpolarisation durable observée pour les ovocytes immatures laisse supposer, en accord avec de nombreux auteurs (NASTUK et HODGKIN, 1950 ; NAKAJIMA et coll., 1962 ; HODGKIN et HOROWICZ, 1959), que la choline pourrait être considérée comme un cation imperméant. Par contre, l'effet dépolarisant transitoire observé pour ces ovocytes de même taille (500 - 600  $\mu$ ) pourrait traduire une éventuelle pénétration de la choline.

Ainsi, au vue de l'ensemble de ces résultats, il ne nous est donc pas possible de conclure à un effet propre de la choline. Pour cela, une étude concernant ce problème peut être envisagée en substituant aux ions  $\text{Na}^+$ , non plus la choline mais un autre cation tel que le tétraméthylamonium (TMA) ou le tétraéthylamonium (TEA).

### 3) Effets sur le P.M. des ovocytes mûrs de la modification de la concentration potassique externe en absence de sodium

Ayant mis en évidence, l'influence des ions  $\text{K}^+$  et des ions  $\text{Na}^+$  sur le potentiel de membrane, l'étude de la modification de  $\left[ \text{K}^+ \right]_e$  dans un milieu dépourvu en  $\text{Na}^+$  a été entreprise de façon à mieux montrer le rôle non négligeable du sodium sur le P.M. des ovocytes dont le diamètre est compris entre 950  $\mu$  et 1400  $\mu$ .

La figure 18 rend compte de l'évolution du P.M. en fonction du logarithme de  $\left[ \text{K}^+ \right]_e$ .

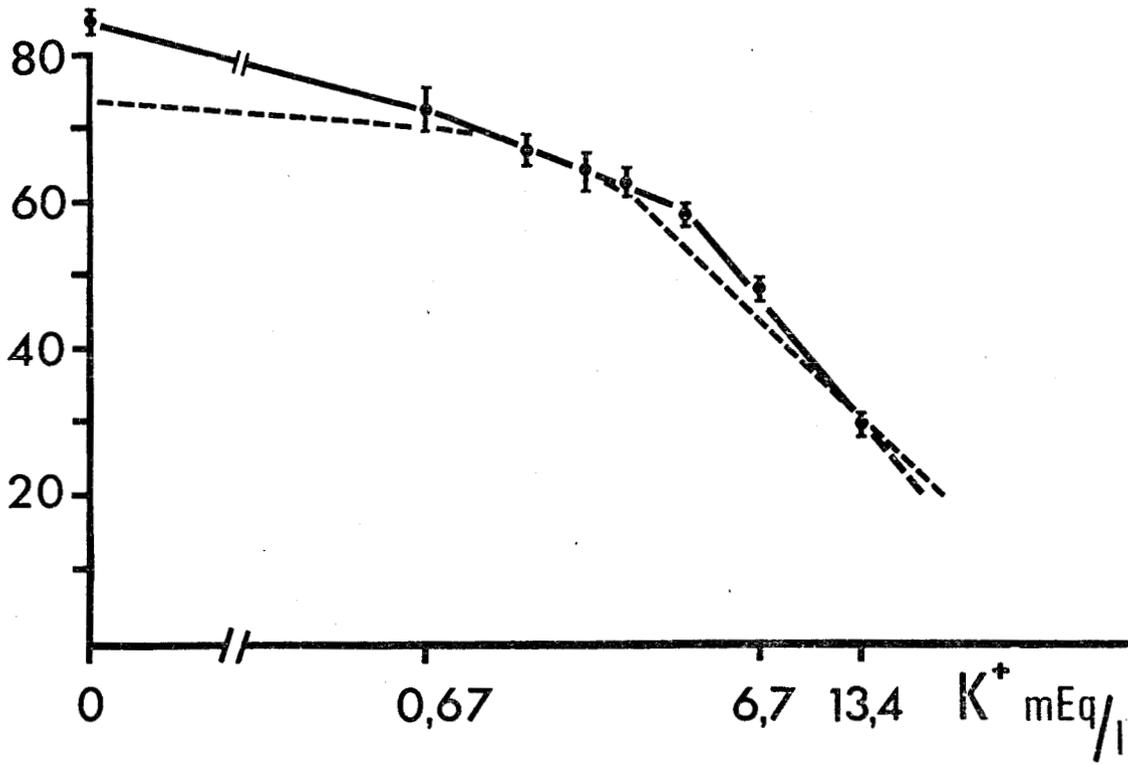


Figure 18 - Variation du P.M. en fonction de la concentration extracellulaire de potassium en absence de sodium (Trait plein).  
Courbe en pointillés : variation du P.M. en fonction de la concentration extracellulaire de potassium lorsque  $[Na^+]_e$  est normale.



La relation P.M. = f (log K<sub>e</sub><sup>+</sup>) en milieu sans Na<sup>+</sup> se traduit par une courbe dont l'allure est différente de celle obtenue en milieu de concentration normale (courbe en pointillés). En effet, pour des concentrations de K<sup>+</sup> supérieures à 4,02 mEq/l la relation est linéaire et la pente de la droite, pour une variation de 10 fois  $[K^+]_e$  est de 54 mV contre 44 mV en milieu sodique normal.

De plus, les milieux pauvres en K<sup>+</sup> provoquent en absence de sodium des effets plus importants ; en absence de sodium et de potassium, le P.M. est de 84,5 mV ± 3 mV contre 74,3 mV ± 4,5 mV en milieu de  $[Na^+]_e$  normale. Il faut signaler, par ailleurs que l'ovocyte placé dans des milieux dépourvus en ions K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup>, présente une hyperpolarisation durable.

La portion linéaire de la courbe (f 19) correspondant aux fortes  $[K^+]_e$  a une pente de 54 mV donc proche du potentiel d'équilibre de la pile au potassium que l'on calcule d'après l'équation de Nernst :

$$E_K = 58 \log \frac{a_{Ki}}{a_{Ke}} \quad (\text{mV}) \text{ à } 20^\circ \text{ C}$$

- E<sub>K</sub> : potentiel de la pile aux ions K<sup>+</sup>
- a<sub>Ki</sub>, a<sub>Ke</sub> : activités des ions K<sup>+</sup> intracellulaires et extracellulaires.

Ainsi, l'équation montre que l'amplitude du P.M. s'annule quand a<sub>Ki</sub> = a<sub>Ke</sub>. Par extrapolation de la droite vers les  $[K^+]_e$  fortes, on peut en déduire l'activité du potassium intraovocytaire. Cette activité est de l'ordre de 47 mEq/l.

Dans les conditions normales, le potentiel de membrane des ovocytes matures immergés dans le liquide de Steinberg correspond donc à un potentiel de diffusion, puisque la pente de la tangente au point d'abscisse 0,67 mEq/l.

est de valeur très inférieure à 58 mV pour  $[K^+]_e$  variant d'un facteur 10.

De plus, le fait, qu'en absence de Na le P.M. soit plus élevé, montre que les ions  $Na^+$  participent par leurs mouvements au maintien du P.M.

L'ensemble de ces derniers résultats montrent que les ions autres que le potassium et le sodium interviennent par leurs mouvements dans la genèse du potentiel de membrane, tels que les ions  $Ca^{++}$  ou  $Cl^-$ , bien qu'il soit généralement admis pour ces derniers qu'ils se distribuent selon un équilibre de Donnan.

4) Influence de la concentration externe en chlore et en calcium sur le P.M.

a) Influence d'un milieu dépourvu en ions  $Cl^-$

Le chlorure de sodium est remplacé dans sa totalité par du sulfate de sodium (paragraphe c, Techniques). Le tableau 13 révèle que le P.M. est inchangé lorsque les ovocytes matures ou immatures sont soumis à l'action de ce milieu même après une heure d'action.

Milieux $Cl_e \times 58$ mEq/l	Ovocytes 500 $\mu$ - 600 $\mu$		Ovocytes 950 $\mu$ - 1400 $\mu$	
	P.M. moyen mV	Nombre d'expériences	P.M. moyen mV	Nombre d'expériences
1	46,33 $\pm$ 6,55	9	73,33 $\pm$ 6,20	12
0	46,11 $\pm$ 3,98	9	72,50 $\pm$ 5,68	12

Tableau 13 - Valeurs moyennes du P.M. en fonction du diamètre des ovocytes en milieu normal et en milieu sans chlore.

L'absence d'effets observés en milieu sans  $\text{Cl}^-$  semble traduire une imperméabilité du complexe membranaire aux ions  $\text{Cl}^-$ . Car, si le complexe membranaire était perméable à ces ions, comme <sup>le</sup> supposent SIGLER et JANACEK (1971), le changement du rapport des activités dans le milieu extracellulaire et intraocyttaire devrait se traduire par un effet dépolarisant transitoire comme cela est de règle au niveau des fibres musculaires, puisque le  $\text{Cl}^-$  est distribué passivement de part et d'autre de la membrane de ces fibres selon un équilibre de Donnan (HAYS, LANG et GAINER, 1968 ; HODGKIN et HOROWICZ, 1959).

L'action des milieux enrichis en  $\text{Cl}^-$  n'a pas été étudiée, car l'augmentation des ions  $\text{Cl}^-$  dans le milieu de Steinberg provoque un accroissement important de la pression osmotique qui pourrait avoir un effet propre sur le P.M. En effet, LOVTRUP (1965) rend compte d'une variation du volume des ovocytes des Amphibiens en fonction de la pression osmotique et SIGLER et JANACEK (1971) démontrent que l'amplitude du P.M. des ovocytes de Rana temporaria et Rana esculenta varie sous l'influence de l'augmentation de la pression osmotique.

b) Influence du milieu dépourvu en ions  $\text{Ca}^{++}$  et d'un milieu hypercalcique

L'étude de deux milieux a été envisagée, l'un étant un milieu sans  $\text{Ca}^{++}$ , l'autre étant un milieu hypercalcique contenant vingt fois la concentration calcique normale. Ce milieu est réalisé par l'apport de  $\text{CaCl}_2$ .

Comme le montre le tableau 14, les modifications de la concentration externe des ions  $\text{Ca}^{++}$  n'entraînent aucune variation du potentiel de membrane après 15 à 20 minutes d'action des différents milieux.

Milieux	Ovocytes 500 - 600 $\mu$		Ovocytes 950 - 1400 $\mu$	
$[Ca^{++}]_e \times 0,34$ mEq/l	P.M. moyen mV	Nombre d'expériences	P.M. moyen mV	Nombre d'expériences
0	-	-	$- 69,66 \pm 1,52$	7
1	$- 50 \pm 4$	6	$- 69,83 \pm 4,30$	12
20	$- 50,44 \pm 3,05$	6	$- 67,50 \pm 3,51$	8

Tableau 14 - Valeurs moyennes du P.M. des ovocytes en milieux hypocalcique et hypercalcique.

Ce résultat est en contradiction avec celui obtenu par MAENO (1959) sur les ovocytes de Bufo. Cet auteur observe un effet très remarquable surtout pour des  $[Ca^{++}]_e$  comprises entre 0,1 et 1 mM/l. Il faut signaler cependant qu'il n'existe à notre connaissance aucune autre étude concernant l'action des ions  $Ca^{++}$  sur l'amplitude du P.M. des ovocytes.

Si, comme cela vient d'être mentionné, les ions  $Ca^{++}$  ne semblent exercer aucun rôle, à court terme, sur le P.M., par contre les ovocytes, équilibrés pendant 3 heures dans le milieu de Steinberg dépourvu d'ions  $Ca^{++}$ , présentent des potentiels de membrane de valeurs beaucoup plus faibles que celles correspondants au milieu normal (tableau 15).

En outre, lorsque les ovocytes, ayant subi l'action du milieu sans calcium, sont replacés dans la solution de référence, ils recouvrent la valeur de leur P.M. initial. Il faut signaler que le cortex ovocytaire, soumis à l'action du milieu sans calcium, semble plus distendu que dans les conditions normales. L'effet dépolarisant à long terme de l'absence de  $Ca^{++}$  (3 h.) pourrait, semble-t-il, être attribuable aux modifications de la structure membranaire entraînant alors une variation de la perméabilité aux autres ions.

Milieux	Ovocytes 500 - 600 $\mu$		Ovocytes 950 - 1400 $\mu$	
$[Ca^{++}]_e \times 0,34$ mEq/l	P.M. moyen mV	Nombre d'expériences	P.M. moyen mV	Nombre d'expériences
1	$- 46,66 \pm 1,75$	33	$- 71 \pm 4,50$	8
0	$- 34,20 \pm 5,44$	10	$- 43,75 \pm 3,80$	8

Tableau 15 - Valeurs moyennes du P.M. des ovocytes en milieu de Steinberg et en milieu dépourvu en ions  $Ca^{++}$ .

Cette hypothèse peut s'accorder avec l'absence d'effet initial de la modification de  $[Ca^{++}]_e$  sur le P.M.

En conclusion, l'absence d'effet de  $[Cl^-]_e$  et de  $[Ca^{++}]_e$  et la contribution non exclusive des ions  $Na^+$  et  $K^+$  amènent à penser que le P.M. pourrait résulter, en plus, d'un transport actif d'ions. C'est la raison pour laquelle l'étude de l'action d'un inhibiteur du métabolisme a été envisagée.

#### 5) Action du 2-4 Dinitrophénol (DNP) sur le P.M.

Les ovocytes matures (950  $\mu$  - 1400  $\mu$ ) sont immergés dans le milieu de Steinberg contenant  $10^{-5}$  g/l de DNP. Le 2-4 dinitrophénol est reconnu comme étant une substance qui supprime le couplage entre les réactions oxydatives et la synthèse d'ATP. Nous n'avons observé, dans ces conditions, aucune variation du P.M., mettant ainsi en évidence l'"inertie métabolique" des ovocytes mûrs.

#### Conclusions

Il existe, ainsi, une différence de potentiel de membrane de part et d'autre du complexe membranaire des ovocytes, c'est-à-dire entre le milieu

extérieur à l'ovocyte et son milieu intérieur, résultant de concentrations ioniques différentes et de perméabilités spécifiques ioniques membranaires. Il existe une relation linéaire entre l'amplitude du P.M. et le logarithme de  $[K^+]_e$  pour des fortes  $[K^+]_e$ . Pour la concentration normale ( $[K^+]_e = 0,67$  mEq/l) la pente de la tangente étant très inférieure à 58 mV : la contribution des ions  $K^+$  est importante mais pas exclusive ; en effet, les ions  $Na^+$  interviennent, par leurs mouvements, dans le maintien du P.M.

En outre, l'équation de Nernst ne s'applique pas quand la concentration de  $K^+$  est faible. Ce fait atteste que l'ovocyte, dans les conditions normales, ne se trouve pas en équilibre thermodynamique avec le milieu extracellulaire. La possibilité d'un mécanisme actif doit être écartée car l'action du DNP ne met en évidence aucune variation de l'amplitude du P.M. des ovocytes mûrs. Ce résultat n'est pas pour nous surprendre puisque l'on considère généralement l'ovocyte mature comme "métaboliquement inerte". Dans ces conditions, le potentiel de membrane serait dû à une pile de diffusion dans l'équation duquel doivent intervenir l'activité des ions  $Na^+$  et  $K^+$  dans les milieux extra- et intracellulaires ainsi que la perméabilité de la membrane à ces mêmes ions.

## CHAPITRE II

### CARACTERISTIQUES ELECTRIQUES MEMBRANAIRES DES OEUFS FECONDES

- 1) Mise en évidence du potentiel à travers la membrane vitelline et la membrane cytoplasmique
- 2) Variation du potentiel de "membrane" au cours de la segmentation
- 3) **Résistance** et capacité membranaires des oeufs fécondés et segmentés
- 4) Résistance effective à travers le plan de clivage.

1) Mise en évidence du potentiel à travers la membrane vitelline et la membrane cytoplasmique

Après la fécondation, les oeufs sont entourés de la membrane vitelline, encore appelée chorion, ainsi que par l'espace périvitellin et enfin la membrane cytoplasmique.

Les oeufs sont récoltés dès la ponte, ils sont dégangués et testés deux ou trois heures après la fécondation. La membrane vitelline reste en place.

Lorsque la pointe de l'électrode atteint la surface de l'oeuf, il se produit une déflexion négative (a) (figure 19) instantanée de l'ordre de - 20 mV suivie d'une inversion de la polarité de + 5 mV à + 8 mV (b) (figure 19). Cette différence de potentiel positive correspondrait, selon nous, à la différence de potentiel entre le milieu extérieur et l'espace périvitellin.

En accentuant la pénétration de l'électrode, le potentiel s'inverse à nouveau dans le sens négatif (c) (figure 19) et reste de valeur constante au cours du temps.

Cette dernière variation du potentiel constitue donc le potentiel intracellulaire ou potentiel de "membrane" (P.M.) des oeufs fécondés. Il varie de - 8 à - 60 mV selon le stade de segmentation des oeufs. Ce dernier potentiel correspondrait bien au potentiel intracellulaire car il coïncide avec l'apparition d'une variation de tension provoquée par le passage d'un courant transmembranaire appliqué par l'intermédiaire d'une seconde microélectrode (voir "Techniques").

Si les valeurs de l'amplitude du P.M. sont bien en accord avec celles mesurées par ITO et HORI (1966) sur les ovocytes de Triturus, l'interprétation qu'ils donnent sur les variations de potentiel (a et b figure 19) n'est pas la nôtre. Ces auteurs, en effet, considèrent que la première déflexion négative rapide (tracé a) constitue l'enregistrement du potentiel à travers le chorion et que l'inversion de la polarité (tracé b) résulte du phénomène

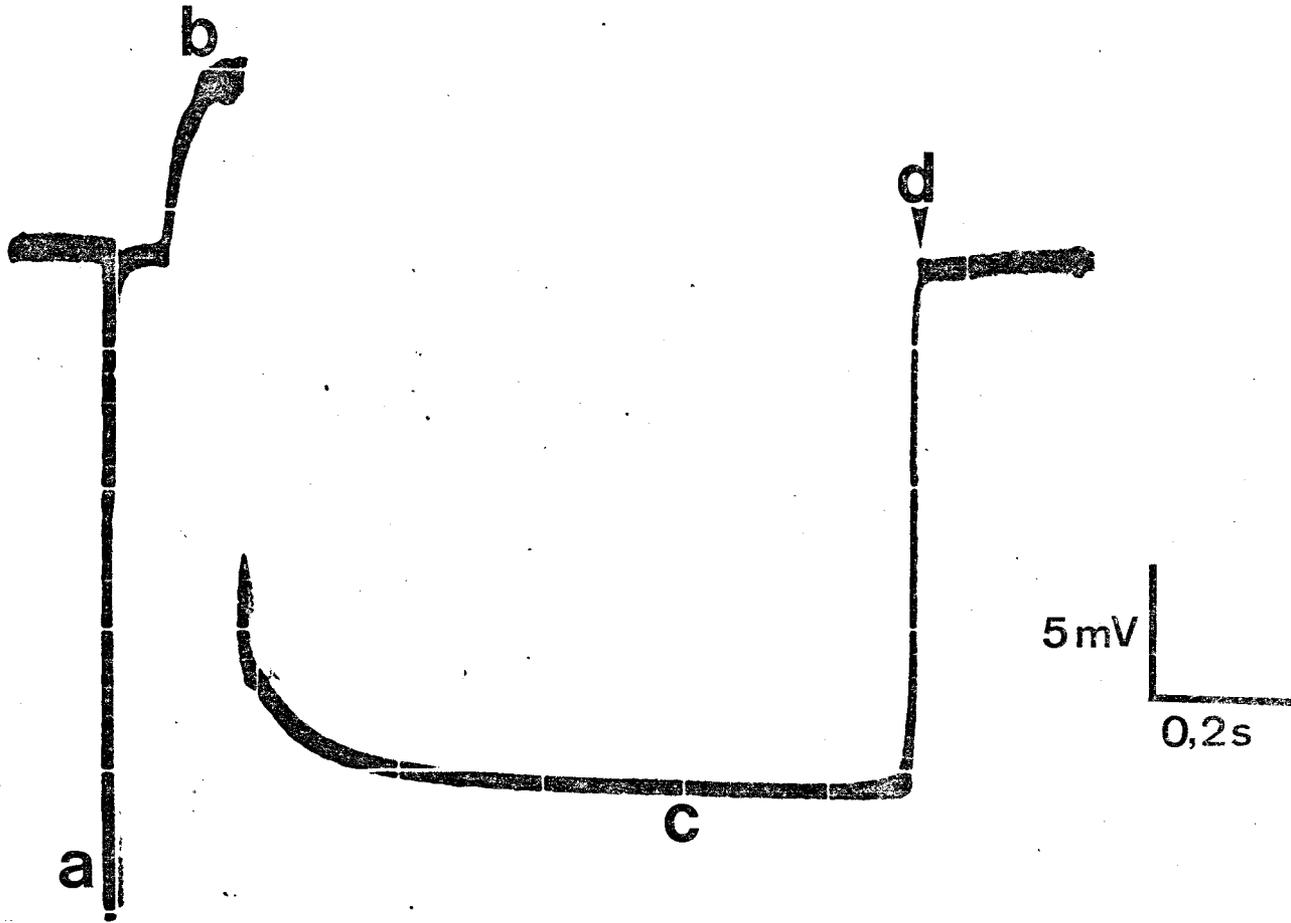


Figure 19 - Evolution du P.M. d'un oeuf au stade 2 au cours de la pénétration de la microélectrode à travers la membrane vitelline (b) et le plasmalemme (c).

d : retrait de la microélectrode.

mécanoélectrique, augmentant ainsi transitoirement la résistance à la pointe de l'électrode. En fait, l'expérience montre que sur les oeufs fécondés de Pleurodèle, il est plus facile de mettre en évidence le potentiel à travers la membrane vitelline aux stades 1 ou 2 (figure 19) où le sillon de division forme un espace facilement repérable entre le cortex de l'oeuf et la membrane vitelline, permettant de visualiser la pointe de la microélectrode et d'observer ainsi que sa position correspond à l'onde positive du tracé. A un niveau différent du sillon, la pénétration de la pointe de la microélectrode ne permet absolument pas l'enregistrement de la variation positive.

## 2) Variation du potentiel de "membrane" au cours de la segmentation

La mesure du P.M. est effectuée sur des oeufs à différents stades de leur développement ; la microélectrode est implantée dans tous les cas dans l'hémisphère animal.

Comme pour les oeufs de Rana pipiens (WOODWARD, 1968) et de Triturus (ITO et HORI, 1966), l'amplitude du P.M. augmente progressivement de - 8 mV à - 11 mV (moyenne -  $9,05 \pm 0,86$  mV) pour des oeufs insegmentés, jusque - 50 à - 60 mV (moyenne -  $58,63 \pm 8,20$  mV) pour des blastomères de jeune morula. (figure 20).

On distingue classiquement, au niveau de la structure de l'oeuf d'Amphibien, l'existence de champs, tel le champ cortical de DALCQ et PASTEELS (1937) et le champ gradient animal végétatif. On peut supposer que ces champs seraient en rapport avec une hétérogénéité de la structure du cortex.

La technique électrophysiologique est à même de montrer l'existence éventuelle d'une différence de la valeur du potentiel entre le pôle animal et le pôle végétatif, par exemple, permettant d'émettre l'hypothèse d'une variation de perméabilité du cortex.

P.M.  
(mV)

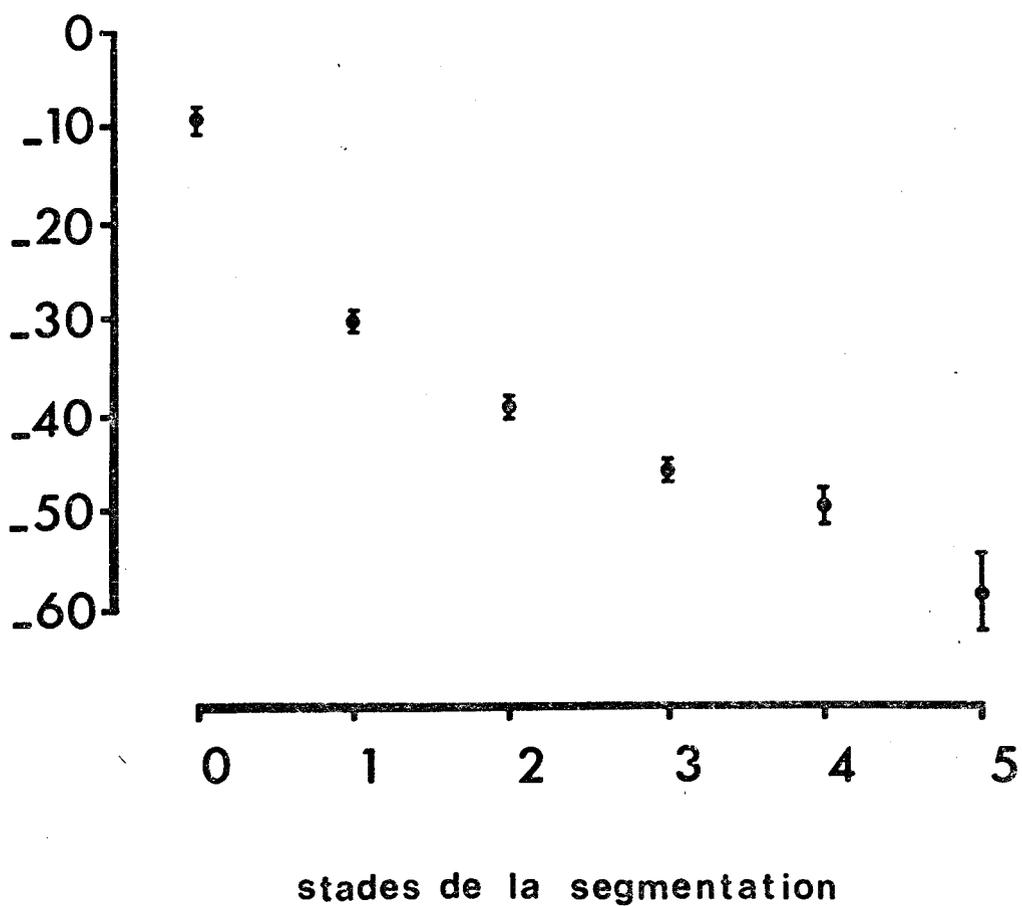


Figure 20 - Evolution du P.M. au cours de la segmentation.



Stades de la segmentation	Pôle animal		Pôle végétatif	
	Nombre d'expériences	P.M. mV	Nombre d'expériences	P.M. mV
st. 0	36	- 9,05 ± 0,86	21	- 9,8 ± 0,92
st. 1	37	- 30,21 ± 4,91	-	-
st. 2	30	- 39,03 ± 6,15	-	-
st. 3	21	- 43,85 ± 4,91	21	- 43,76 ± 4,72
st. 4	13	- 49,76 ± 7,74	11	- 49,27 ± 7,79
st. 5	11	- 58,63 ± 8,20	11	- 54,54 ± 4,63

Tableau 16 - Valeurs moyennes du P.M. mesurées au pôle animal et au pôle végétatif au cours de la segmentation des oeufs de Pleurodèle.

La mesure de l'amplitude du P.M., dans les hémisphères, animal et végétatif, effectuée sur les oeufs jusqu'à la morula, montre que la notion de champ cortical ne peut être assimilée à la notion de champ électrique comme l'atteste le tableau 16.

En effet, ce tableau ne révèle aucune différence significative entre les valeurs du potentiel mesurées dans les micromères et celles mesurées dans les macromères aux stades 0, 3, 4 et 5. Il semble donc que la membrane soit électriquement homogène. Cette interprétation est confirmée par l'étude de la mesure de la résistance membranaire du cortex de l'oeuf.

### 3) Résistance et capacité membranaires des oeufs fécondés et segmentés

La résistance et la capacité membranaires sont calculées par la méthode utilisée dans le cas des ovocytes. Lorsque les oeufs sont segmentés,

les deux microélectrodes sont situées dans le même blastomère.

a) Résistance membranaire des oeufs fécondés et segmentés

La figure 21 donne un aperçu des tracés obtenus sur un oeuf fécondé insegmenté permettant d'établir la relation voltage - courant. A partir de cette relation, il est facile de calculer la résistance effective  $r_m$  du cortex. En effet, selon ITO et HORI (1966), la résistance du chorion peut être négligée, la résistance  $r_m$  est alors convertie, en la multipliant par la surface de l'oeuf, en une résistance spécifique  $R_m$ .

La résistance effective des oeufs récoltés dès la ponte est en moyenne de 1271 K $\Omega$  ( $\sigma = 404$ ) soit une résistance spécifique moyenne de 78.697  $\Omega.cm^2$  ( $\sigma = 24.947$ ). Quelque temps avant l'apparition du premier sillon de division, la résistance effective moyenne n'est plus que de 588 K $\Omega$  ( $\sigma : 232$ ) soit une  $R_m$  de 36.520  $\Omega.cm^2$  ( $\sigma = 14.420$ ). Par contre, la  $R_m$  des oeufs de Triturus est de l'ordre de 630.000  $\Omega.cm^2$  (ITO et HORI, 1966). Il est à noter que ces valeurs sont plus élevées que celles trouvées par HIRAMOTO (1959) sur les oeufs fécondés d'un Echinoderme du genre Peronella ( $R_m : 1580$  à  $4700 \Omega.cm^2$ ).

La comparaison des mesures de l'amplitude du P.M. au pôle animal et au pôle végétatif (tableau 16) a permis de supposer que le cortex des oeufs insegmentés est électriquement homogène : la mesure de la résistance de membrane réalisée soit dans l'hémisphère animal, soit dans l'hémisphère végétatif, confirme cette interprétation (tableau 17).

En effet, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de la  $R_m$  calculées dans l'hémisphère animal et celles calculées dans l'hémisphère végétatif.

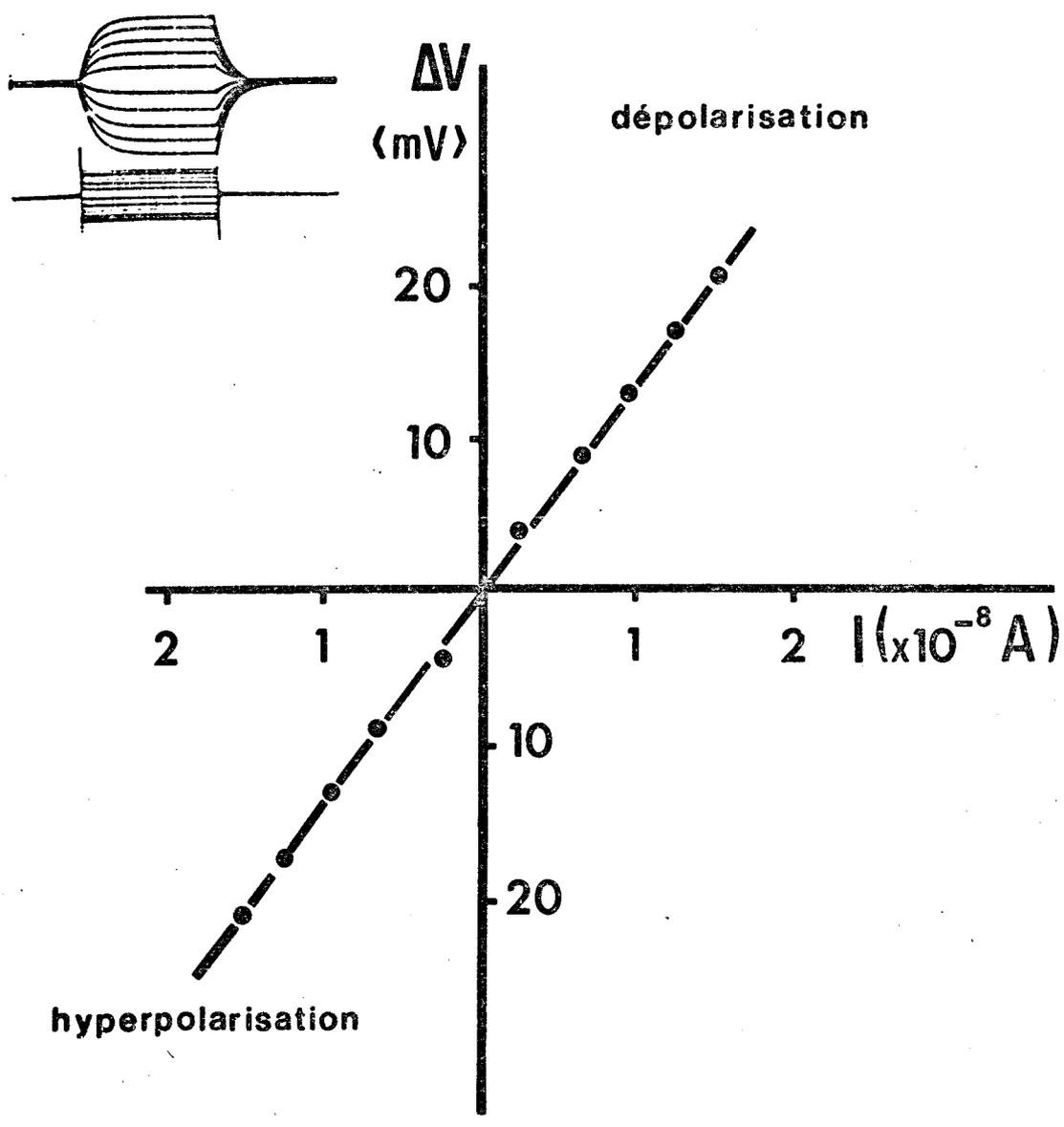


Figure 21 - Relation voltage - courant d'un oeuf fécondé insegmenté.



Hémisphère	$R_m : \Omega \cdot \text{cm}^2$	Nombre d'expériences
animal	$38.650 \pm 20.460$	9
végétatif	$35.150 \pm 9.430$	14

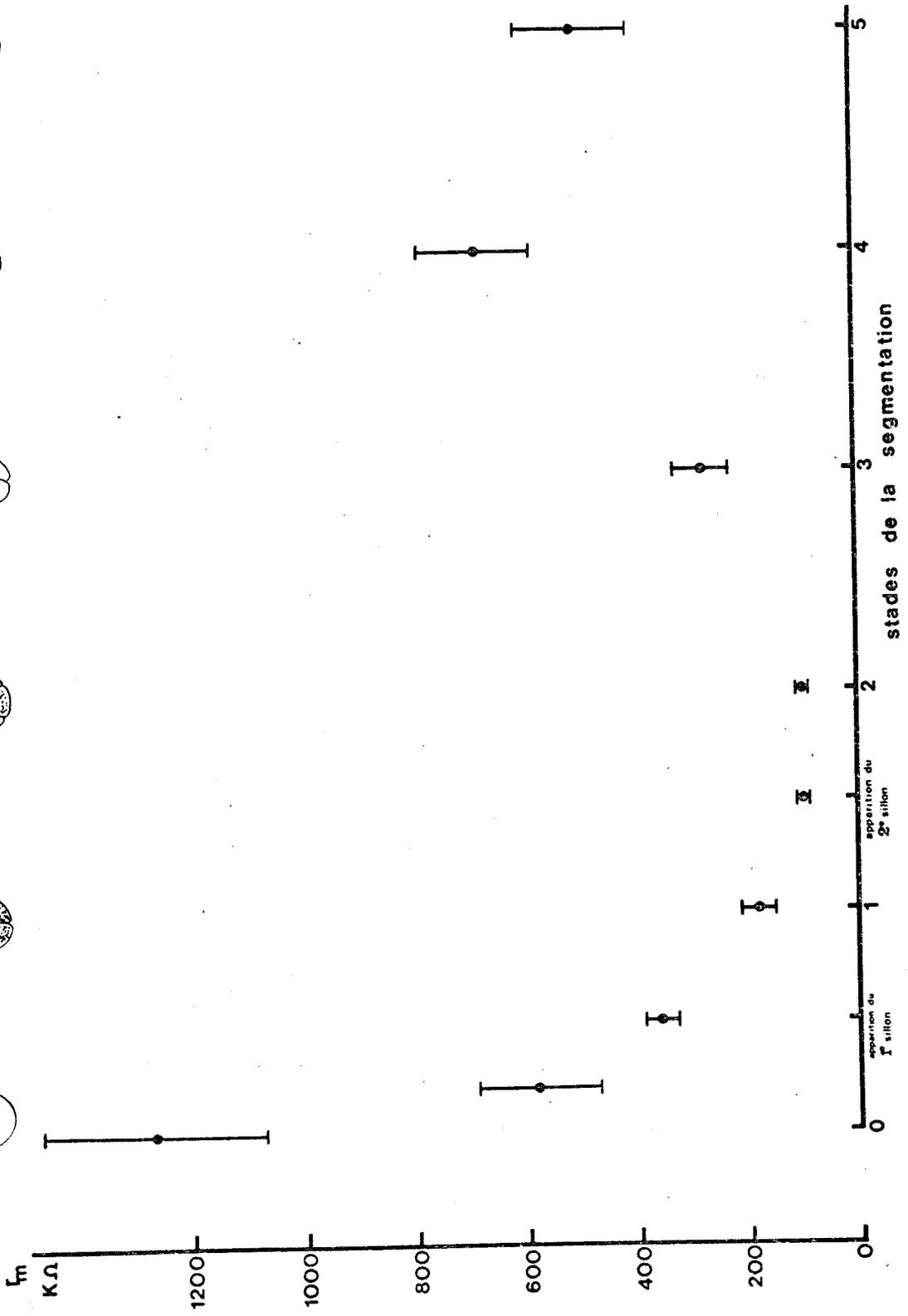
Tableau 17 - Valeurs moyennes de la  $R_m$  mesurées dans l'hémisphère animal et dans l'hémisphère végétatif des oeufs fécondés indivis de Pleurodèle.

L'évolution de la résistance au cours de la segmentation jusqu'à la morula se traduit par une diminution associée, comme cela a déjà été précisé à une augmentation du P.M. des blastomères. En effet, la diminution de la résistance effective, quelques heures avant l'apparition du premier sillon de division, s'accroît (figure 22) dès la première segmentation et atteint sa valeur la plus faible après la seconde division (4 blastomères). La  $r_m$  augmente ensuite dès la 3e division jusqu'au stade jeune morula.

Etant donné que le diamètre de l'oeuf reste constant pendant la segmentation, la valeur de la résistance (figure 22) n'est pas exprimée par unité de surface.

Si faible que soit la perméabilité de la surface cellulaire de l'oeuf indivis (car  $R_m$  est très grande) l'augmentation de la surface membranaire, du fait de la croissance active de nouvelles membranes n'est pas à l'origine de l'augmentation de la perméabilité globale de l'oeuf en segmentation.

Il faut rapprocher, semble-t-il, l'accroissement de la perméabilité au seul changement des propriétés de la membrane externe corticale. Ce point de vue s'accorde parfaitement avec les observations de ITO et HORI (1966) sur les oeufs de Triturus.



b) Capacité spécifique membranaire des oeufs fécondés et segmentés

Comme pour les ovocytes, la capacité membranaire a été calculée par la relation  $\tau_m = R_m \cdot C_m$ .

La valeur moyenne déduite pour  $C_m$  est de  $11,28 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ( $\sigma = 0,95$ ) pour les oeufs fécondés indivis, soit une valeur légèrement supérieure à celle des ovocytes ( $C_m = 6,3 \pm 1,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ).

Au cours de la segmentation, la capacité membranaire diminue, elle n'est plus que de  $0,8$  à  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (tableau 18).

Stades	$C_m = \mu\text{F}/\text{cm}^2$
st. 0	$11,28 \pm 0,95$
st. 1	$1,04 \pm 0,29$
st. 4	$0,78 \pm 0,30$
st. 5	$0,87 \pm 0,31$

Tableau 18 - Valeurs moyennes de la capacité spécifique du cortex des oeufs de Pleurodèle au cours de la segmentation.

De même sur les oeufs de Rana pipiens (WOODWARD, 1968) et de Triturus pyrrhogaster (ITO et HORI, 1966) la  $C_m$  est comprise entre  $0,7$  et  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ; elle reste constante durant le développement jusqu'à la morula. Quant à HIRAMOTO (1959), il mesure la capacité membranaire avant et après la fécondation des oeufs de l'Echinoderme Peronella. La valeur de  $C_m$  est comprise entre  $0,74$  et  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  puis elle devient 2 à 4 fois plus élevée après la fécondation.

Ainsi, pour la plupart des oeufs, l'augmentation de  $R_m$  lors de la

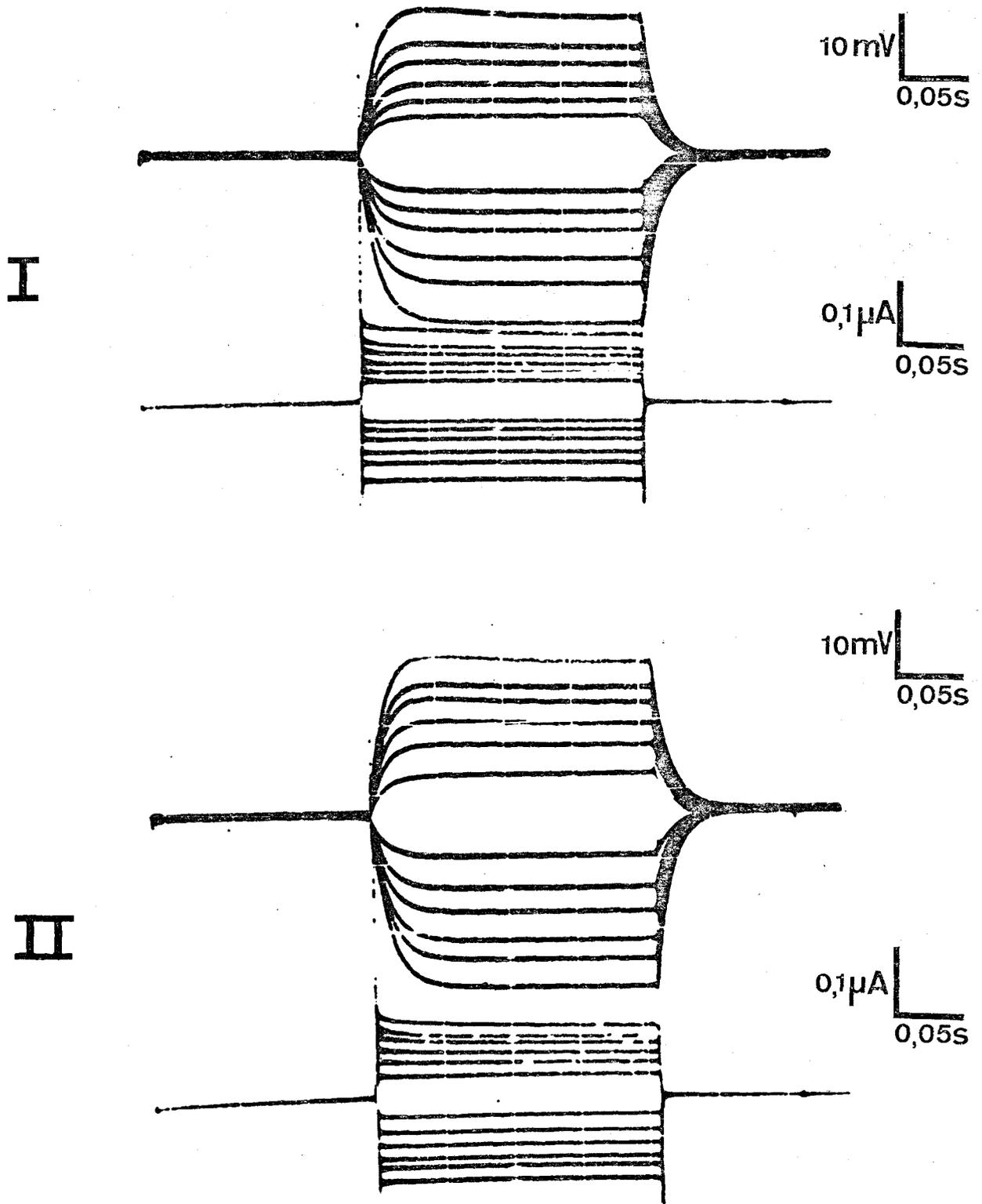


Figure 23 - Déplacements du P.M. d'un oeuf au stade 1 pour des courants dépolarisants (vers le haut) et hyperpolarisants (vers le bas).

I - Microélectrodes situées dans le même blastomère.

II - Microélectrodes situées de part et d'autre du plan de segmentation (voir figure 24).



fécondation est associée à un accroissement de la  $C_m$ .

Sur les oeufs de Pleurodèle, la mesure de la capacité membranaire spécifique au cours de la segmentation ne semble pas mettre en évidence la formation de nouvelles membranes qui ne participeraient pas selon nous aux propriétés électriques passives, ce rôle étant dévolu, jusqu'au stade morula à la seule membrane corticale. Cette conception est d'ailleurs étayée par les résultats suivants qui concernent la mesure de la résistance effective à travers le plan de clivage.

#### 4) Résistance effective à travers le plan de clivage

La technique consiste à appliquer des échelons de courants rectangulaires à travers le cortex cellulaire des oeufs en division. La variation de potentiel qui en résulte est enregistrée, soit dans le même blastomère où est implantée l'électrode portant le courant, soit dans le blastomère voisin (figure 23).

Cette méthode permet de donner une information sur le couplage électrique intercellulaire, c'est-à-dire sur la fraction de courant ionique qui passe d'une cellule à une autre à travers le plan de segmentation des cellules en division.

Dans un premier temps, la résistance effective de la couche corticale d'un blastomère est mesurée par le calcul  $\frac{dV}{dI}$  des courbes voltage - courant.

Dans un second temps, l'atténuation éventuelle de cette résistance effective, résultant du passage d'une fraction de courant ionique à travers le plan de segmentation, est évaluée.

La figure 24 illustre les résultats d'une expérience type réalisée après l'achèvement de la première division. Lorsque les deux microélectrodes sont situées dans le même blastomère, la résistance effective  $r_m$  calculée dans

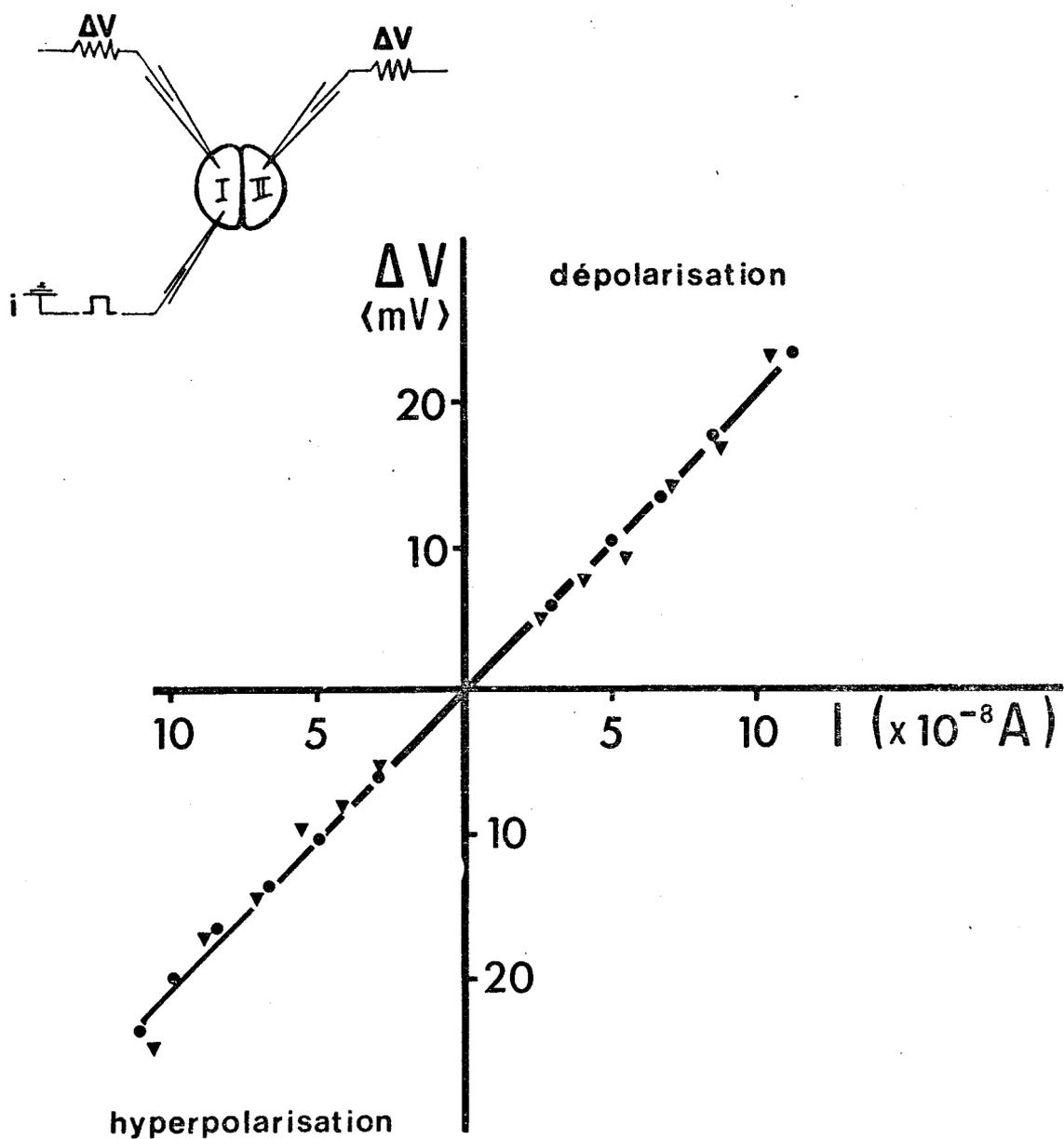


Figure 24 - Relations voltage - courant d'un oeuf au stade I.

- Microélectrodes situées dans le même blastomère (I).
- ▼—▼ Microélectrodes situées de part et d'autre du plan de segmentation (II).



ce cas précis est de  $200 \text{ K}\Omega$ . En plaçant l'électrode d'enregistrement dans le blastomère voisin, la valeur de la  $r_m$  ne change pas : les courbes voltage - courant sont alors confondues.

Après la première division, aucune atténuation de la résistance effective d'un blastomère à l'autre n'a donc pu être décelée.

Par contre, sur les oeufs de l'étoile de mer Asterias, ASHMAN, KANNO et LOEWENSTEIN (1964) enregistrent une augmentation de la  $r_m$  et l'absence de passage de courant d'un blastomère à l'autre après la première division. Ceci est en faveur d'un découplage complet entre les deux blastomères et permet de comprendre que la  $r_m$  augmente (la surface totale interrogée diminuant).

Notre résultat obtenu sur l'oeuf de Pleurodèle au stade 1 est d'ailleurs confirmé par les études en microscopie qui montrent, qu'à ce stade, de nombreux ponts cytoplasmiques permettent très facilement le passage des substances et, en particulier, des ions d'un blastomère à l'autre.

Dès le stade 2 (4 blastomères), comme l'atteste la courbe de la figure 25, l'atténuation de la  $r_m$  à travers les plans de segmentation devient sensible (20 p. 100) et reste ensuite à cette valeur jusqu'au stade 5 (jeune morula). L'atténuation est exprimée sous la forme du rapport entre la nouvelle valeur  $r_m$  enregistrée à travers le plan de clivage ( $r_{ms}$ ) et la  $r_m$  du cortex de l'oeuf ( $r_{mc}$ ) ; ce rapport est appelé le coefficient d'atténuation.

Le résultat montre la faible atténuation d'un blastomère à l'autre de la jeune morula (figure 26). Ainsi, la résistance effective mesurée entre le milieu intracellulaire d'un blastomère et le milieu extérieur est de  $442 \pm 125 \text{ K}\Omega$  (7 cas), cette résistance n'est plus que de  $372 \pm 118 \text{ K}\Omega$  (7 cas) lorsque les deux microélectrodes sont séparées par plusieurs jonctions intercellulaires. Le coefficient d'atténuation est dans ce cas de 0,8. ITO et LOEWENSTEIN (1969) trouvent un coefficient de 0,9 pour les blastomères contigus de la jeune morula de Triturus. Ils soulignent, d'autre part, que ce coefficient

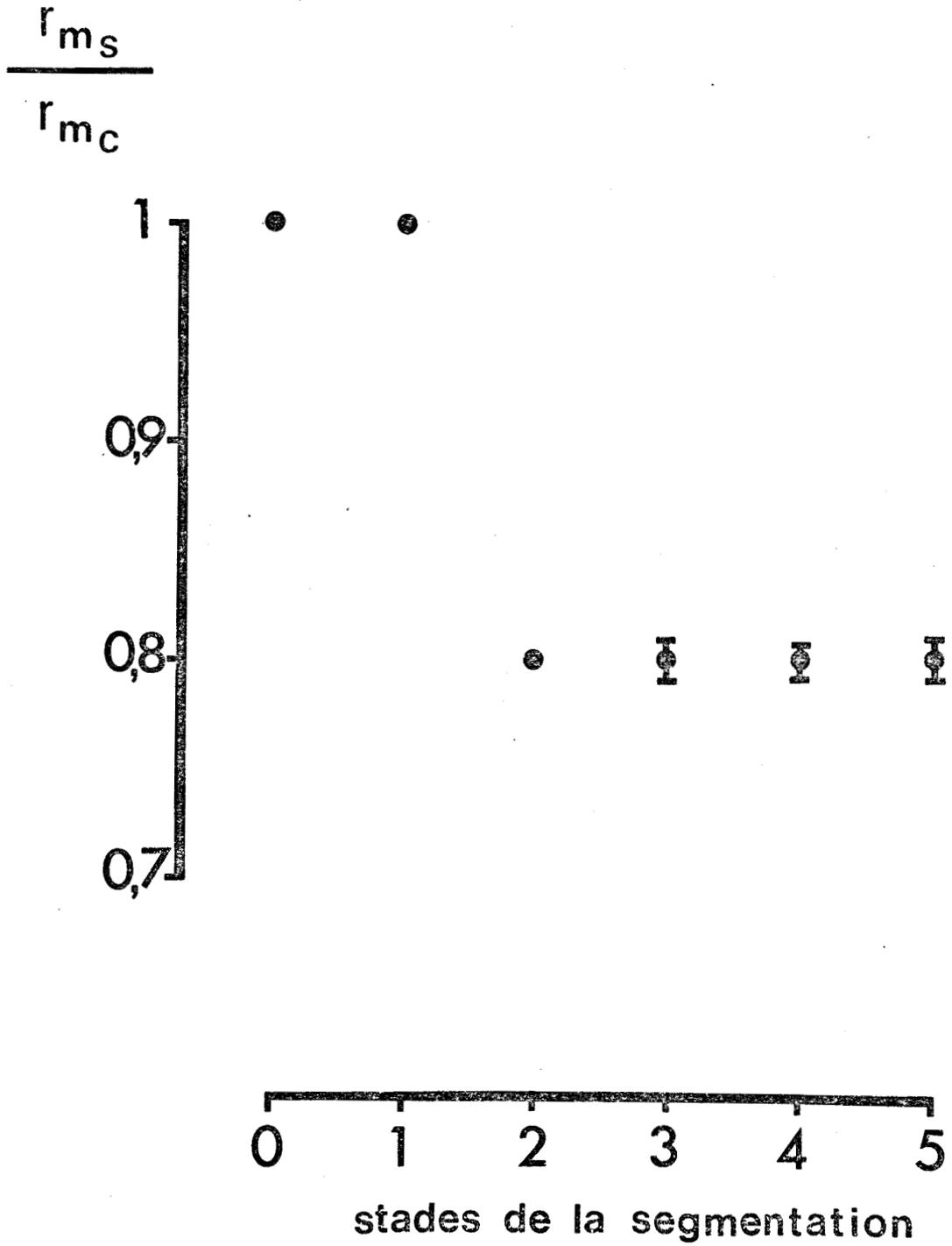
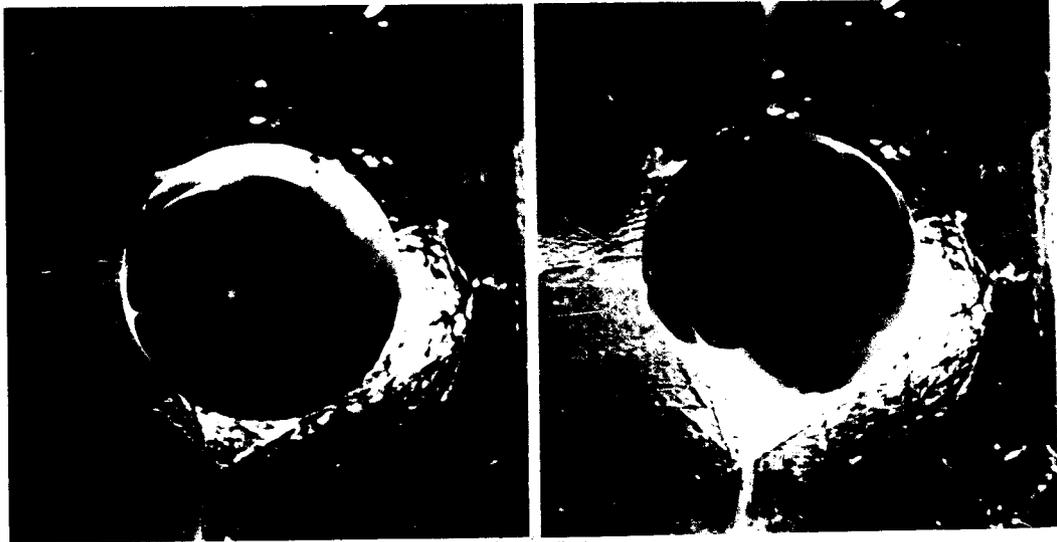
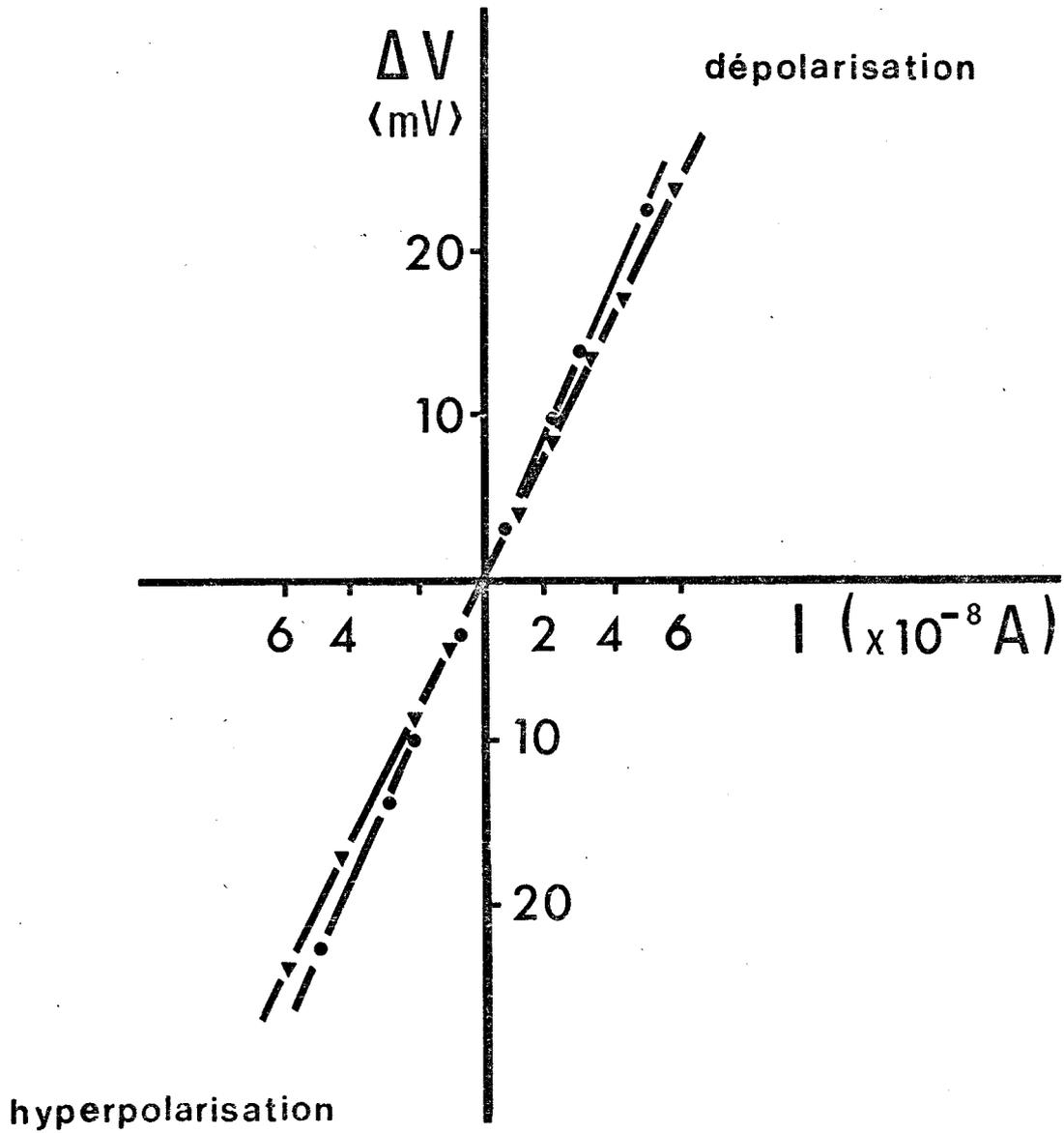


Figure 25 - Variation du coefficient d'atténuation pendant la segmentation.



LILLE



est encore de 0,8 lorsque les micromères sont séparés par une distance de 1 mm. Pour une telle distance, les auteurs comptent au moins 3 jonctions membranaires.

A la lumière de ces nouvelles données, les cellules de la morula de Pleurodèle semblent en communication ionique entre elles, du fait de la faible résistance électrique des membranes nouvellement formées, et le potentiel de membrane des blastomères correspondrait, dans ces conditions, au potentiel intracortical ; la membrane corticale jouerait, semble-t-il, le rôle exclusif de barrière entre le milieu externe et le milieu intracellulaire des blastomères. La morula pourrait être considérée, d'un point de vue électrophysiologique, comme une seule cellule.

**DISCUSSION**

**CONCLUSION**

## I - POTENTIEL DE MEMBRANE DES OVOCYTES. ROLE DES IONS

Le milieu intracellulaire des ovocytes de Pleurodèle est négatif par rapport au milieu extracellulaire. En effet, la différence de potentiel membranaire, que nous avons appelée P.M, entre ces deux milieux est de l'ordre de - 30 à - 70 mV. En outre, la valeur du P.M. dépend du diamètre des ovocytes donc de leur degré de maturité.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par MAENO (1959) sur les ovocytes de Bufo et par MORRILL et WATSON sur les ovocytes matures de Rana. KANNO et LOEWENSTEIN (1963) enregistrent cependant des potentiels de valeurs plus faibles : - 5 à - 35 mV sur les ovocytes de Xénope. Ces faibles valeurs peuvent correspondre au fait que ces derniers auteurs sélectionnent des ovocytes dont le diamètre est compris entre 100 et 600  $\mu$ . Sur les ovocytes de Pleurodèle, le P.M. varie de - 30 à - 45 mV lorsque le diamètre est compris entre 400 et 600  $\mu$ .

Il n'est pas exclu que la variabilité des résultats puisse résulter, d'une part des espèces et d'autre part du milieu de référence choisi ; notre milieu est le liquide de Steinberg dont la composition ionique est différente du milieu de Ringer utilisé par la plupart des auteurs.

En accord avec les travaux de KANNO et LOEWENSTEIN (1963) sur les ovocytes de Xénope, de MAENO sur les ovocytes de Bufo, la maturation des ovocytes de Pleurodèle s'accompagne d'une augmentation de l'amplitude du P.M. et de la valeur de la résistance membranaire spécifique.

En effet, pour un accroissement de diamètre de 400 à 1400  $\mu$ , la Rm augmente de 3000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  à 15000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Ces valeurs sont cependant plus élevées que celles mesurées sur les ovocytes d'Echinodermes : 3100  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  pour des ovocytes d'Asterias (TYLER et coll., 1956) et 1350  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  pour les ovocytes de Psammechinus miliaris (LUNDBERG, 1955).

Quant à la capacité membranaire spécifique de Pleurodèle, sa valeur moyenne est égale à  $6,3 \pm 1,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ; elle est comparable à celle calculée sur les ovocytes des Amphibiens Anoures (MAENO, 1959 ; KANNO et LOEWENSTEIN, 1963).

En général, la résistance membranaire spécifique des ovocytes est plus élevée que la  $R_m$  des fibres excitables de Vertébrés et d'Invertébrés. La  $R_m$  relevée, par exemple, sur la fibre musculaire du couturier de grenouille est d'environ  $2800 \Omega.\text{cm}^2$  et la  $C_m$  de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (ADRIAN et FREYGANG, 1962 a). Pour les fibres musculaires du crabe bleu, Callinectes sapidus (HAYS, LANG et GAINER, 1968), la  $R_m$  est de  $465 \pm 27 \Omega.\text{cm}^2$  et la  $C_m$  de  $39,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

En ce qui concerne les ovocytes, il faut signaler que la méthode utilisée pour le calcul de la  $R_m$  et de la  $C_m$  entraîne une sous-estimation de la valeur de  $R_m$  et une sur-estimation de la valeur de  $C_m$ , car le calcul de la surface membranaire à partir du diamètre ne tient pas compte de la structure des microvilli qui augmentent la surface réelle du plasmalemme.

A partir de ces constantes électriques membranaires, il est permis de supposer que le complexe membranaire des ovocytes, du fait de sa résistance élevée, est doué d'une perméabilité ionique extrêmement réduite qui évolue au cours de la maturation.

Nos résultats, concernant l'influence des ions monovalents sur le potentiel de membrane, mettent en évidence la contribution importante mais non exclusive d'un ion : le potassium et pour une moindre part : le sodium.

En effet, l'absence d'action des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{++}$  permet de conclure à l'imperméabilité du complexe membranaire des ovocytes de Pleurodèle à ces ions. Cependant, SIGLER et JANACEK (1971 II) supposent, sans aucune donnée expérimentale, que les ions  $\text{Cl}^-$  sont distribués passivement à travers le complexe membranaire des ovocytes de Rana temporaria et Rana esculenta. Cette hypothèse est discutable, dans la mesure où, sous l'action d'un milieu sans chlore, le potentiel diminue de façon transitoire puis revient à sa valeur

initiale comme l'ont montré HODGKIN et HOROWICZ (1959) sur les fibres musculaires. Cette évolution transitoire du P.M. n'a pas été observée sur notre matériel.

Comme pour l'absence de chlore, l'absence des ions  $\text{Ca}^{++}$  n'exerce, tout au moins à court terme, aucune influence sur le P.M. des ovocytes de Pleurodèle : il en est de même pour l'enrichissement du milieu externe en  $\text{Ca}^{++}$ , bien que MAENO signale un effet remarquable de la modification de  $[\text{Ca}^{++}]_e$  sur le P.M. lorsque  $[\text{Ca}^{++}]_e$  varie de 0,1 à 1 mM/l alors que la concentration normale est de 1 mM/l. En définitive, seuls les milieux dépourvus en  $\text{Ca}^{++}$  exercent une influence, les milieux enrichis n'ayant aucun effet. Ainsi l'interprétation de MAENO ne peut être satisfaisante car de nombreuses études sur les membranes excitables n'ont montré aucun effet sur le potentiel de repos (JENERICK et GERARD, 1953 ; WEIDMAN, 1955 ; FRANKENHAEUSER, 1957). Par ailleurs, l'absence des ions  $\text{Ca}^{++}$  dans le milieu externe peut modifier la structure du complexe membranaire des ovocytes et ainsi changer la perméabilité globale.

En ce qui concerne les ions  $\text{K}^+$ , une augmentation de 10 fois leur concentration normale provoque une variation de potentiel inférieure à 58 mV tant sur les ovocytes de petite taille que de grande taille. Ce résultat montre que les ovocytes de Pleurodèle ne sont pas en équilibre thermodynamique avec le milieu externe. Cependant, le complexe membranaire des ovocytes est préférentiellement plus perméable aux ions  $\text{K}^+$  qu'aux autres ions, cette perméabilité s'accroît avec le degré de maturité.

L'absence d'équilibre thermodynamique, dans les conditions normales, est d'ailleurs confirmée par l'effet de milieux riches en  $\text{K}^+$  dépourvus de  $\text{Na}^+$ . En effet, il a été montré que la pente de la droite, traduisant la variation du P.M. en fonction de  $[\text{K}^+]_e$  ne varie comme le prévoit l'équation de Nernst qu'à partir de  $[\text{K}^+]_e$  externe égale à 5,36 mEq/l alors que la concentration normale n'est que de 0,67 mEq/l. Ce résultat montre donc que les ions  $\text{Na}^+$  participent par leurs mouvements à la genèse du P.M. En absence de  $\text{Na}^+$ , le potentiel calculé

à partir de l'équation de Nernst est de - 100 mV, la valeur mesurée dans nos conditions expérimentales n'est que de - 74 mV. L'activité intraocyttaire des ions  $K^+$  déterminée graphiquement à partir de la courbe P.M. = f ( $\log K_e$ ), en absence de  $Na^+$  est de l'ordre de 47 mEq.l. Cette valeur est faible comparée à celle mesurée par DICK et MAC LAUGHLIN (1969) (82 mEq/l) sur les ovocytes de Bufo. Cette différence peut s'expliquer en tenant compte du fait que la force ionique de notre milieu de référence est moitié moindre de celle du milieu utilisé par DICK et MAC LAUGHLIN (1969) qui est le liquide de Ringer.

Bien que le complexe membranaire de l'ovocyte de Pleurodèle soit faiblement perméable aux ions  $Na^+$ , la participation sodique ne peut être négligée contrairement aux conclusions de MAENO (1959).

Cependant, il ne nous est pas possible d'expliquer actuellement les phénomènes d'hyperpolarisation durable ou transitoire et de dépolarisation transitoire des ovocytes en absence de sodium dans le milieu externe. Cette complexité des mouvements des ions  $Na^+$  est corroborée par les expériences autoradiographiques réalisées par DICK et LEA (1964) sur les ovocytes de Bufo. Ces auteurs observent qu'en absence de sodium, l'efflux sodique diminue avec le temps pour certains ovocytes, alors que pour d'autres, l'efflux augmente. DICK et LEA (1967) mettent en évidence un très faible transport actif des ions  $Na^+$  inhibé par l'ouabaïne. Ces résultats vont à l'encontre des conclusions de MAENO (1959) et plaident en faveur de notre interprétation.

L'absence d'action du 2-4 dinitrophénol sur les ovocytes matures de Pleurodèle nous amène à conclure à la non existence d'un mécanisme actif. Cependant, DICK et LEA (1967) observent que l'ouabaïne n'a aucune influence sur le P.M. des ovocytes de Bufo bien que la pompe sodique soit inhibée dans des proportions de 48 à 65 p. 100. Pour ces auteurs, il y aurait un échange entre la fraction libre et la fraction combinée du sodium, cette dernière fraction ayant été mise en évidence par DICK, FRY et ROGERS (1968). La nature

de ce processus est encore actuellement inconnue. Selon HOROWITZ et FENICHEL (1970), les échanges entre le sodium intracellulaire libre et le sodium combiné sont plus rapides pour les ovocytes immatures que pour les ovocytes matures.

L'absence d'effets des inhibiteurs associée avec la valeur importante de la  $R_m$  montre que les échanges préférentiels d'ions existent mais sont très faibles. De plus, les flux actifs, s'ils existent, ne semblent pas influencer sur l'amplitude du potentiel de membrane.

En conclusion, le P.M. des ovocytes de Pleurodèle pourrait être calculé à partir de l'équation de GOLDMAN (1943) modifiée par HODGKIN et KATZ (1949) faisant intervenir les perméabilités  $P_K$  et  $P_{Na}$  des ions  $K^+$  et  $Na^+$  (la perméabilité ayant les dimensions d'une vitesse)

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{P_K [K_i] + P_{Na} [Na_i]}{P_K [K_e] + P_{Na} [Na_e]}$$

Dans ces conditions, il reste à déterminer les perméabilités  $P_K$  et  $P_{Na}$  ainsi que les concentrations et les activités intracellulaires des ions  $Na^+$  et  $K^+$ .

Il y a lieu enfin de considérer le rôle éventuel<sup>des</sup> protéines intra-ovocytaires. En effet, OVERBEEK (1956) suggère qu'un polyélectrolyte en solution peut modifier la mobilité ionique des ions  $K^+$  et  $Cl^-$ . La mobilité des ions  $K^+$ , en particulier, peut être réduite de 4 fois, selon cet auteur et pourrait être, alors, différente de part et d'autre du système membranaire des ovocytes.

## II - CARACTERISTIQUES ELECTRIQUES MEMBRANAIRES DES OEUFS FECONDES ET SEGMENTES

### 1) Oeufs fécondés insegmentés

Le potentiel de membrane des oeufs fécondés insegmentés de Pleurodèle comme ceux de Triturus (ITO et HORI, 1966) et de Rana (WOODWARD, 1968) est plus faible que celui relevé sur les ovocytes. Quant à la résistance et la capacité membranaires, leur augmentation témoigne d'une diminution probable de la perméabilité provoquée par la modification profonde de la structure du cortex de l'oeuf qui survient après la fécondation. Il faut mentionner que les travaux les plus récents ne font état d'aucune variation de  $C_m$  (KAO, 1956 ; MAENO, 1959 ; ITO, 1962) ; cependant, des études plus anciennes dont celles de COLE et SPENCER (1938) rapportent, au contraire, une augmentation de  $C_m$  de 100 p 100 voire même 300 p 100 sur les oeufs d'un Echinoderme du genre Arbacia.

Les variations de l'activité des ions intracellulaires seraient associées à la modification du cortex des oeufs lors de la fécondation. En effet, certains auteurs dont MONROY, ODDO et ESPOSITO (1951) montrent un accroissement des concentrations du potassium lors de la fertilisation des oeufs d'Echinodermes, d'autres auteurs, en revanche, font état d'une diminution (MALM et WACHTIMEISTER, 1950 ; TYLER et coll., 1956).

L'évolution du P.M. des oeufs de Rana au moment de l'activation (MORRILL, 1965) est accompagnée d'une augmentation de la concentration des ions  $Ca^{++}$  et  $Cl^-$  intracellulaires associée à une diminution de celle aux ions  $K^+$ .

De même, MAENO (1959) montre que l'activation des oeufs de Bufo bufo est accompagnée d'une perméabilité transitoire de la couche corticale aux ions  $Cl^-$  ; selon cet auteur, cette perméabilité au chlore serait responsable du potentiel d'activation.

A la lumière de nos résultats, la diminution du P.M., d'une part, et l'augmentation de la  $R_m$  et la  $C_m$  d'autre part, après la fécondation, traduisent

l'existence d'une très faible perméabilité de l'oeuf insegmenté **et l'existence, semble-t-il**, d'une permittivité du condensateur membranaire qui serait plus forte que pour les ovocytes.

## 2) Oeufs segmentés

Lors de la segmentation, les oeufs de Pleurodèle dont le P.M. est faible après la fécondation, s'hyperpolarisent jusqu'à la morula ; dans le même temps, la résistance membranaire effective diminue. ITO et HORI (1966) ainsi que WOODWARD (1968) attribuent cette chute de résistance à l'apparition d'une perméabilité importante des nouvelles membranes qui se forment "de novo". Par ailleurs, WOODWARD (1968) suggère que la diminution corrélative de  $C_m$ , que nous avons également observée dès la première division, s'expliquerait par l'existence d'une capacité, en série avec la capacité membranaire, constituée par l'espace intercellulaire : cet espace serait rempli par la solution physiologique dans laquelle baigne l'oeuf. L'augmentation de la capacité bien que pouvant être nulle, ne serait pas décelable du fait de la création d'un shunt électrique. De plus, en inhibant la formation des sillons de division WOODWARD (1968) observe une augmentation de  $C_m$  de 3,3 p. 100 par sillon.

L'interprétation des phénomènes peut être, à notre avis, différente de celle exposée par WOODWARD. En effet, bien avant la formation du premier sillon de constriction, la valeur de la résistance est réduite de moitié et chute à nouveau dès l'apparition de ce sillon. Dans ce cas, les blastomères sont encore en communication par des ponts cytoplasmiques et la diminution de la résistance effective ne semble pas devoir être uniquement attribuable à la formation des nouvelles membranes mais l'être partiellement, voire totalement, à l'augmentation de la perméabilité du cortex de l'oeuf.

Dans ces conditions, la diminution de  $C_m$  dès la première segmentation

pourrait être due à l'accroissement de la perméabilité du cortex entraînant une diminution de la permittivité du condensateur.

A l'appui de cette hypothèse, ITO et HORI (1966) mentionnent un couplage électrique des cellules des oeufs de Triturus traduit par l'existence de résistances membranaires jonctionnelles faibles dont la valeur serait selon WOODWARD (1968) de  $950 \Omega \cdot \text{cm}^2$  pour les oeufs de Rana et de  $550 \Omega \cdot \text{cm}^2$  selon ITO et HORI (1966) sur les oeufs de Triturus. Dans ces conditions, la formation des nouvelles membranes ne devrait pas entraîner de variations importantes de la résistance mesurée à travers le cortex cellulaire. Celui-ci serait donc le siège des perméabilités ioniques spécifiques et constituerait une barrière à la libre diffusion des ions de part et d'autre.

En outre, le couplage électrique des cellules de la morula de Pleurodèle traduit une communication ionique importante, que reflète la faible atténuation de la  $r_m$  enregistrée de part et d'autre du plan de segmentation. A l'inverse, les cellules issues de la première segmentation des oeufs d'Asterias et d'Echinarachnius ne présentent pas de couplage électrique (ASHMAN, KANNO et LOEWENSTEIN, 1964 ; LOEWENSTEIN, 1966). Afin d'expliquer le processus, ces auteurs proposent le schéma ci-après.

D'après le schéma, si la résistance intercellulaire  $r_s$  est faible par rapport à la résistance de jonction  $r_c$ , aucun courant ne passera d'une cellule à l'autre : il n'y aura pas de couplage entre les cellules. Par contre, si  $r_s$  est beaucoup plus grande que  $r_c$ , une grande partie du courant ionique passera dans la cellule voisine : les cellules seront couplées électriquement.

Ainsi la mise en évidence du couplage électrique entre les cellules embryonnaires rend compte de la communication ionique possible à travers les jonctions de faible résistance. Les cellules d'une grande variété de tissus adultes épithéliaux présentent des communications intercellulaires semblables.

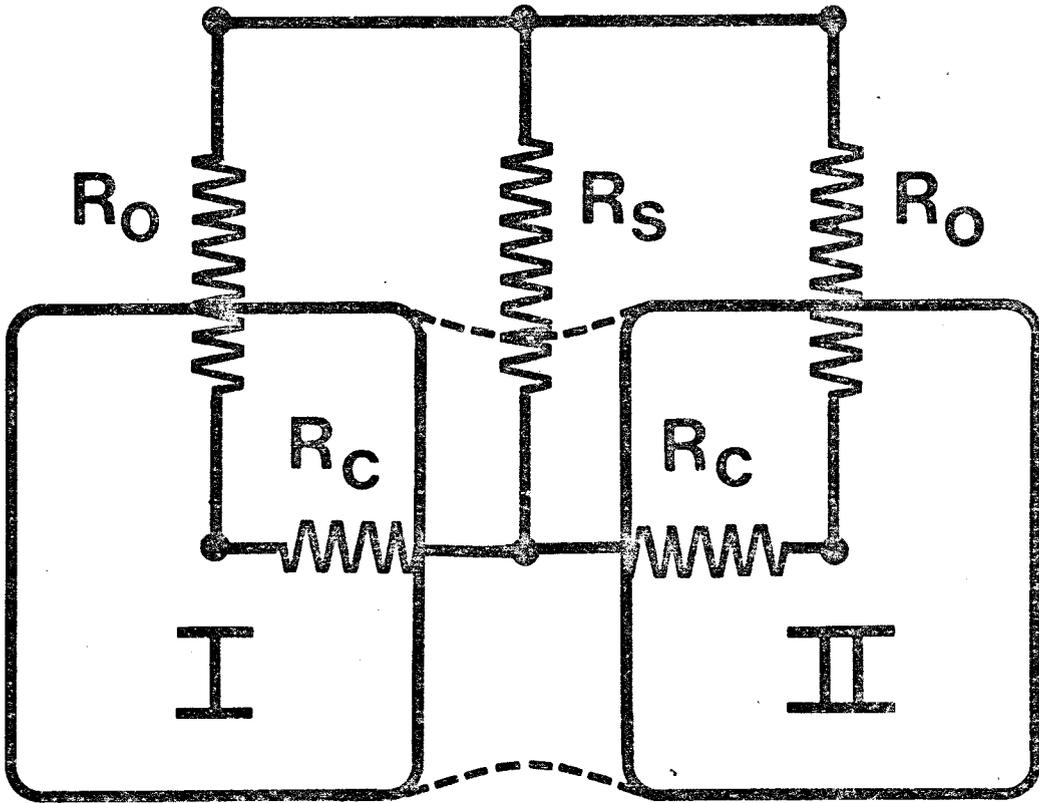


Figure 27 - Circuit équivalent d'un couplage électrique entre 2 cellules (d'après ASHMAN, KANNO et LOEWENSTEIN, 1964).

$r_o$  : résistance du cortex et de la membrane vitelline de l'oeuf

$r_s$  : résistance de l'espace intercellulaire

$r_c$  : résistance des membranes jonctionnelles.



Des molécules suffisamment grosses pourraient transporter, de cellule à cellule, une information génétique comme le suppose LOEWENSTEIN (1966). Certaines études (WOLPERT et MERCER, 1963) tendent à montrer que le passage des courants ioniques coïnciderait avec la formation de septae et "tight-jonctions". Ces hypothèses pourraient être confirmées par l'étude de la migration de grosses molécules marquées à travers les membranes jonctionnelles.

En conclusion, la membrane ovocytaire des ovocytes matures et immatures ainsi que le cortex des oeufs de Pleurodèle insegmentés et segmentés jusqu'à la morula seraient, sinon totalement, du moins en grande partie le niveau d'échanges des ions entre le milieu intra- et extracellulaire.

# BIBLIOGRAPHIE

ADRIAN, R.H. (1960).

Potassium chloride movement and the membrane potential of frog muscle.

J. Physiol., Londres, 151, 154-185.

ADRIAN, R.H. et FREYGANG, W.H. (1962 a).

The potassium and chloride conductance of frog muscle membrane.

J. Physiol., Londres, 163, 104-114.

ASHMAN, R.F., KANNO, Y. et LOEWENSTEIN, W.R. (1964).

The intracellular coupling at a forming membrane junction in a dividing cell.

Science, 145, 604-606.

BENNETT, M.L.V. et TRINKAUS, J.P. (1968).

Electrical coupling of embryonic cells by way of extracellular space and specialized junctions.

Biol. Bull. (WOODHOLE), 135, 415.

COLE, K.S. et SPENCER, J.M. (1938).

Electric impedance of fertilized arbacia egg suspensions.

J. Gen. Physiol., 21, 583-590.

COLE, K.S. et GUTTMAN, R.M. (1942).

Electric impedance of the frog egg.

J. Gen. Physiol., 25, 765.

DALCQ, A.M. et PASTEELS J. (1937).

Une conception nouvelle des bases physiologiques de la morphogenèse.

Arch. Biol., Liège, 48, 121-147.

DICK, D.A.T. et IEA, E.J.A. (1964).

Na fluxes in single toad oocytes with special reference to the effect of external and internal Na concentration on Na efflux.

J. Physiol., Londres, 174, 55-90.

DICK, D.A.T. et IEA, E.J.A. (1967).

The partition of sodium fluxes in isolated toad oocytes.

J. Physiol., Londres, 191, 289-308.

DICK, D.A.T., FRY, D.J. et ROGERS, A.W. (1968).

Autoradiographic demonstration of sequestered fraction of Na in single oocytes of Bufo bufo.

J. Physiol., Londres, 197, 2 B.P.

DICK, D.A.T. et MAC LAUGHLIN, S.G.A. (1969).

The activities and concentrations of sodium and potassium in toad oocytes.

J. Physiol., Londres, 205, 61-78.

DORFMAN, W.A. (1934).

Electrical polarity of the Amphibian egg and its reversal through fertilization.

Protoplasma, 21, 245-257.

FRANKEUHAUSER, B. (1957).

The effect of calcium on the myelinated nerve fiber.

J. Physiol., 137, 245.

GALLIEN, L. et DUROCHER, M. (1957).

Table chronologique du développement chez Pleurodeles waltlii.

Bull. Biol. Fr. et Belg., 91, 97-114.

GOLDMAN, D.E. (1943).

Potential, impedance, and rectification in membranes.  
J. Gen. Physiol., 27, 37-60.

HASAMA, B. (1934).

Über die bioelektrischen <sup>bulonus</sup>Phänomene an Ei von Hynobius nellosus bei  
künstlicher Befuchtung.  
Protoplasma, 22, 597-606.

HAYS, E., LANG, M.A. et GAINER, H. (1968).

A re-examination of the Donnan distribution as a mechanism for mem-  
brane potentials and potassium and chloride ions distributions in  
Crab muscle fibers.  
Comp. Biochem. Physiol., 26, 761-792.

HIRAMOTO, Y. (1959).

Changes in electric properties upon fertilization in the sea urchin  
egg.  
Exp. Cell Res., 16, 241.

HODGKIN, A.L. et KATZ, B. (1949).

The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant  
axon of the squid.  
J. Physiol., Londres, 108, 37-77.

HODGKIN, A.L. et HUXLEY, A.F. (1952).

A quantitative description of membrane current and its application  
to conduction and excitation in nerve.  
J. Physiol., 117, 500-544.

HODGKIN, A.L. et HOROWICZ, P. (1959).

The influence of potassium and chloride ions on the membrane poten-  
tial of single muscle fiber.  
J. Physiol., 148, 127-160.

HODGKIN, A.L. et HOROWICZ, P. (1960).

The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fiber.

J. Physiol., 153, 370-385.

HORI, R. (1958).

On the membrane potential of the unfertilized egg of the medaka Oryzias latipes and changes accompanying activation.

Embryologia., 4, n° 2, 79-81.

HOROWITZ, S.B. et FENICHEL, I.R. (1970).

Analysis of sodium transport in the Amphibian oocytes by extractive and radioautographic techniques.

J. Cell Biol., 47, 120-131.

HUTTER, O.F. et NOBLE, D. (1960).

The chloride conductance of frog skeletal muscle.

J. Physiol., 151, 89-102.

ITO, S. (1962).

Resting potential and activation potential of the Oryzias egg.

II. Change of membrane potential and resistance during fertilization.

Embryologia, 7, n° 1, 47-55.

ITO, S. et HORI, N. (1966).

Electrical characteristics of Triturus egg cells during cleavage.

J. Gen. Physiol., 49, 1019-1027.

ITO, S. et LEWENSTEIN, W.R. (1969).

Ionic communication between Early Embryonic cells.

Develop. Biol., 19, 228-243.

JENERICK, H.P. et GERARD, R.W. (1953).

Membrane potential and threshold of single muscle fibers.

J. Cell and Comp. Physiol., 42, 79.

KANNO, Y. et LOEWENSTEIN, W.R. (1963).

A study of the nucleus and cell membranes of oocytes with an intracellular electrode.

Exp. Cell Res., 31, 149-166.

KAO, C.Y. (1956).

Changing electrical constants of the Fundulus egg plasma membrane.

J. Gen. Physiol., 40, n° 1, 107-119.

LOEWENSTEIN, W.R. (1966).

Permeability of membrane junctions.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 137, 441.

LOEWENSTEIN, W.R. et KANNO, Y. (1963).

The electrical conductance and potential across the membrane of some cell nuclei.

J. Cell Biol., 16, 421-425.

LOEWENSTEIN, W.R., SOCOLAR, S.J., HIGASHINO, S., KANNO, Y. et DAVIDSON, N. (1965).

Intercellular communication : renal, minary bladder, sensory and salivary gland cells.

Science, 149, 295-298.

LOEWENSTEIN, W.R. et PENN, R.D. (1967).

Intercellular communication and tissue growth. II. Tissue regeneration

J. Cell Biol., 33, 235.

LØVTRUP, S. (1965).

Morphogenesis in the Amphibian embryo Fertilization and blastula formation.

Roux'Archiv für Entwicklungmechanik, 156, 204-248.

LUNDBERG, A. (1955).

Microelectrode experiments on unfertilized sea urchin eggs.  
Exp. Cell Res., 9, 393-398.

MAENO, T. et coll. (1956).

Potential measurements of the eggs of japanese killi fish Oryzias latipes.  
J. Fac. Sci. Kyushu. Univ. Ser., E 2, 87-94.

MAENO, T. (1959).

Electrical characteristics and activation potentiel of Bufo eggs.  
J. Gen. Physiol., 43, 139-157.

MALM, M. et WACHTMEISTER, L. (1950).

A comparison between the potassium content of unfertilized and fertilized sea urchin eggs.  
Arkiv. of Kemi, 2, 445-449.

MORRILL, G.A. (1965).

Water and electrolyte changes in Amphibian eggs at ovulation.  
Exp. Cell Res., 40, 664-667.

MORRILL, G.A. et WATSON, D.E. (1966).

Transmembrane electropotential changes in Amphibian eggs at ovulation, activation and first cleavage.  
J. Cell Physiol., 67, 85.

MOUNIER, Y. (1970).

Conductances ioniques membranaires de repos de la fibre musculaire de crabe.  
Thèse 3e cycle, Lille, 1 vol., 136 p. dactylographiées.

NAKAJIMA, S., IWASAKI, S. et OBATA, K. (1962).

Delayed rectification and anomalous rectification in frog's skeletal muscle membrane.

J. Gen. Physiol., 46, 97-115.

NASTUK, W.L. et HODGKIN, A.L. (1950).

The electrical activity of single muscle fibers.

J. Cell Comp. Physiol., 35, 39-73.

MONROY-ODDO, A. et ESPOSITO, A. (1951).

Changes in the potassium content of sea urchin eggs on fertilization.

J. Gen. Physiol., 34, 285-293.

OCHS, S. (1966).

Action of choline on frog sartorius muscle.

J. Physiol., Londres, 182, 244-254.

OVERBEEK, J.Th. (1956).

The Donnan equilibrium.

Prog. Biophys. biophys. Chem., 6, 58-84.

PASTEELS, J.J. (1961).

La réaction corticale de fécondation ou d'activation.

Bull. Soc. Zool., 86, n° 5, 600-629.

PENN, R.D. (1966).

Ionic communication between liver cells.

J. Cell Biol., 29, 171-173.

PETERFI, T. et ROTHSCHILD, Lord. (1935).

Bio-electric Transients during fertilization.

Nature, 135, 874-875.

REN KIN, E.M. (1961).

Permeability of frog skeletal muscle cells to choline.  
J. Gen. Physiol., 44, 1159-1164.

SCHEER, B.T., MONROY, A., SANTANGELO, M. et RICCOBONO, G. (1954).

Action potentials in sea urchin eggs at fertilization.  
Exp. Cell Res., 7, 284-287.

SIGLER, K. et JANACEK, K. (1971).

The effect of non-electrolyte osmolarity on frog oocytes. II.  
Intracellular potential.  
Biochem. Biophys. Acta, 241, 539-546.

TUPPER, J., SAUNDERS, J. et EDWARDS, C. (1970).

The onset of electrical communication between cells in the developing starfish embryo.  
J. Cell Biol., 46, 187-191.

TYLER, A., MONROY, A., KAO, C.Y. et GRUNDFEST, H. (1955).

Electrical potential changes upon fertilization of the starfish egg.  
Biol. Bull., 109, 352-353.

TYLER, A., MONROY, A., KAO, C.Y. et GRUNDFEST, H. (1956).

Membrane potential resistance of the starfish egg before and after fertilization.  
Biol. Bull., 111, 153-177.

VILAIN, J.P., CAPURON, A. et GUILBAULT, P. (1971).

Caractéristiques électriques membranaires des ovocytes de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien Urodèle).  
C.R. Soc. Biol., 165, n° 7-8, 1594-1600.

WADDINGTON, L. (1952).

Preliminary observations on the mechanism of cleavage in the Amphibian egg.

J. Exp. Biol., 32, 484-489.

WARTENBERG, H. et SCHMIDT, W. (1961).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der strukturellen Veränderungen in Rindenbereich des Amphibieneies im Ovar und nach der Befruchtung.

Z. Zellforsch., 54, 118-146.

WEIDMAN, S. (1955).

Effect of calcium ions and local anesthetics on electrical properties of Purkinje fibers.

J. Physiol., 129, 568.

WISCHNITZER, S. (1966).

The ultrastructure of the cytoplasm of the developing Amphibian egg. Advances in Morphogenesis, 5, 131-179.

WOLPERT, L. et MERCER, E.M. (1963).

An electron microscopic study of the development of the blastula of the urchin embryo and its radial polarity.

Exp. Cell Res., 30, 280-300.

WOODWARD, D.J. (1968).

Electrical signs of new membrane production during cleavage of Rana pipiens eggs.

J. Gen. Physiol., 52, 509-531.

ZOTIN, A.I. (1964).

The mechanism of cleavage in Amphibian and sturgeon eggs.

J. Embryol. Exp. Morphol., 12, 247.