

50 376
1983
303

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE 1

50376
1983
303

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE 1

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Jean-Pierre VILAIN

**CONTROLE IONIQUE DE LA MATURATION
OVOCYTAIRE DES AMPHIBIENS URODELES**



Soutenu le 17. 12. 1983 devant le jury :

M.	A.	CAPURON	Président
Mme	Y.	MOUNIER	
MM.	P.	GUERRIER	
	J.C.	BEETSCHEN	
	R.	OZON	

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claudé	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertziennne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertziennne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertziennne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire.
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infra-rouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

AVANT-PROPOS

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur A. CAPURON qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. Qu'il me permette de lui témoigner ma respectueuse reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée, ainsi que pour la très grande liberté d'expression dont j'ai toujours bénéficiée au cours de mes activités.

Je remercie très sincèrement Monsieur P. GUERRIER, Directeur de Recherche au CNRS, de l'accueil chaleureux qu'il m'a toujours réservé au sein de son équipe ; j'y ai rencontré un complice, Marc MOREAU, dont je dois louer l'enthousiasme, la disponibilité, les connaissances scientifiques et l'extrême efficacité technique.

Je dois à Madame Y. MOUNIER, Professeur, mes premiers pas de chercheur, mes premières manipulations d'électrophysiologie. C'est avec un plaisir ému que je la retrouve dans mon jury de thèse.

Je suis très honoré que Messieurs les Professeurs J.C. BEETSCHEN et R. OZON aient bien voulu examiner ce travail.

L'aide amicale de mes collègues et du personnel du Laboratoire m'a été précieuse. Mes remerciements vont à chacun d'eux et en particulier à Mesdames N. ANDRIES, E. FERREIRA et C. GUERRIER pour la qualité de l'aide technique qu'elles m'ont apportée, Mademoiselle C. BESSAU pour la dactylographie de ce mémoire, Monsieur CHUIN, responsable de l'entretien des élevages, Madame AUGER et Monsieur LAZARECKI qui ont assuré le tirage des photographies.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	Page
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GENERALE	1
1.1. RELATIONS TEMPORELLES ENTRE LA MATURATION ET LA FECONDATION ..	1
1.2. LA MATURATION OVOCYTAIRE CHEZ LES AMPHIBIENS	2
1.2.1. L'ovocyte	2
1.2.2. Le système de contrôle hormonal de la maturation ...	3
1.2.3. Substance inductrice de la maturation	3
1.2.4. Site d'action de l'hormone	4
1.2.5. Traitements mimétiques	4
1.2.6. Effecteur intracytoplasmique : MPF	5
1.3. L'HYPOTHESE D'UN CONTROLE IONIQUE DE LA MATURATION	5
1.3.1. Exigence ioniques extracellulaires	6
1.3.1.1. Ions monovalents	6
1.3.1.2. Ions divalents	8
1.3.2. Mobilisation du Ca ²⁺ intracellulaire	10
1.4. CONCLUSION	12
CHAPITRE 2 - MATERIELS ET METHODES	14
2.1. METHODES GENERALES	14
2.1.1. Préparation des ovocytes	14
2.1.2. Milieux physiologiques	15
2.1.3. Méthodes d'observation	15
2.1.3.1. Microscopie photonique	16
2.1.3.2. Microscopie électronique	16
2.1.4. Etude de la maturation	16
2.1.5. Critères de la maturation	17
2.2. METHODES ELECTROPHYSIOLOGIQUES	18
2.2.1. Mesure des potentiels	18
2.2.2. Mesure des différents paramètres membranaires	18

2.2.2. Mesure des différents paramètres membranaires	18
2.2.2.1. Mesures en courant imposé	19
2.2.2.1.1. Application	20
2.2.2.1.2. Système à plusieurs constantes de temps	20
2.2.2.1.3. Relation voltage-courant	21
2.2.2.1.4. Réalisation pratique des mesures . en courant imposé	21
2.2.2.2. Potentiel imposé	22
2.2.2.2.1. Asservissement du potentiel ...	22
2.2.2.2.2. Réalisation pratique	23
2.2.3. Electrodes spécifiques et mesure des activités ioniques intracellulaires	23
2.2.3.1. Fabrication des électrodes	23
2.2.3.2. Calibration	24
2.2.3.3. Mesure de l'activité ionique intracellulaire	24
2.2.4. Mesures du Ca ²⁺ libre par l'Aequorine - Propriétés de l'Aequorine	24
2.2.4.1. Microinjection intracellulaire	25
2.2.4.2. Préparation de l'aequorine	25
2.2.4.3. Calibration	25
2.2.4.4. Détection de la lumière	25

CHAPITRE 3 - RESULTATS

3.1. CARACTERISTIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DE L'OVOCYTE

NON STIMULE	27
3.1.1. Potentiel de membrane (Em)	27
3.1.2. Bases ioniques du potentiel de membrane	29
3.1.2.1. Influence des ions Cl ⁻ sur le potentiel de membrane de <i>Pleurodeles waltlii</i>	31
3.1.2.2. Influence des ions Na ⁺ et K ⁺	31
3.1.2.2.1. Ions Na ⁺	31
3.1.2.2.2. Ions K ⁺	31

3.1.3. Conductance et capacités membranaires	32
3.1.3.1. Influence des cellules folliculaires	32
3.1.3.2. Influence des ions sur la conductance	35
3.1.4. Contribution des cations divalents	35
3.1.4.1. Influence du milieu Ca O Mg O EDTA sur Em et R	36
3.1.4.2. Repolarisation de la membrane ovocytaire : action des ions Mg ²⁺ ; Sr ²⁺ et Ba ⁺	37
3.1.4.3. Effets des milieux hypercalciques et hypermagnésiens sur le potentiel de membrane ..	37
3.1.4.4. Perméabilité Na ⁺ et K ⁺ en milieu dépourvu d'ions divalents	38
3.1.5. Mise en évidence d'un mécanisme de transport actif ..	39
3.1.6. Conclusion	41
 3.2. VARIATION DES PROPRIETES ELECTRIQUES MEMBRANAIRES PENDANT LA MATURATION	42
3.2.1. Induction de la maturation	42
3.2.2. Evolution des paramètres électriques membranaires pendant la maturation induite par la progestérone ou par ses mimétiques	44
3.2.2.1. Influence des modifications de surface	45
3.2.2.2. Le découplage électrique ovocyte-cellules folliculaires	45
3.2.3. Variations des perméabilités ioniques de la membrane des ovocytes pendant la maturation	46
3.2.3.1. Ions K ⁺	46
3.2.3.2. Ions Na ⁺	47
3.2.4. Calcium et maturation	50
3.2.4.1. Activité du Ca ²⁺ dans les ovocytes non stimulés	50
3.2.4.2. Réponse calcique après stimulation hormonale ..	50
3.2.4.3. Réponse calcique en présence de substances mimétiques	51

3.2.4.4. <i>Inhibition réversible de la réponse calcique</i>	52
3.2.5. Conclusion	53

CHAPITRE 4 - DISCUSSION GENERALE	55
--	----

PUBLICATIONS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1

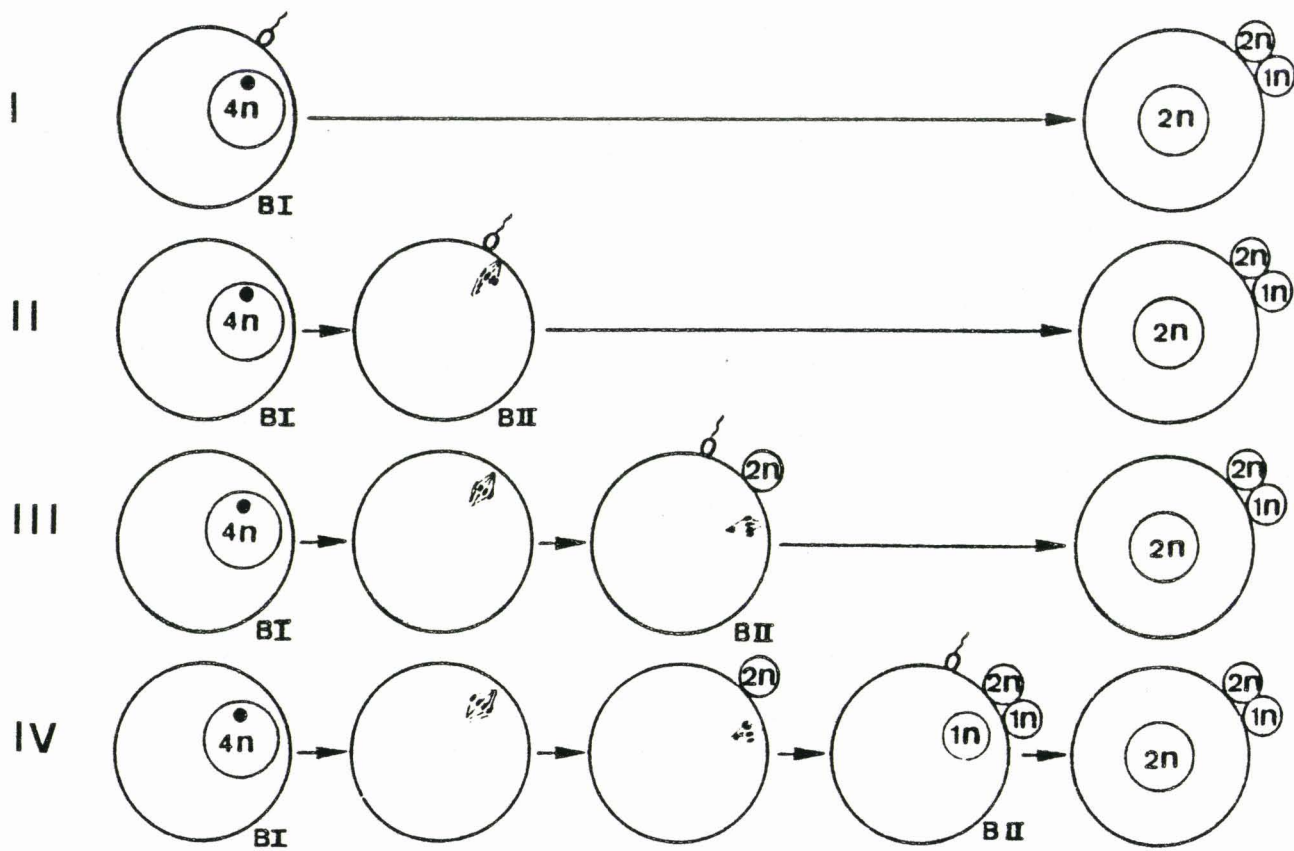
INTRODUCTION GENERALE

La fécondation, qui implique la reconnaissance et la fusion des gamètes mâles et femelles, conduit à l'union de leurs noyaux. Un mécanisme régulateur doit donc intervenir afin que les embryons qui en résultent ne présentent pas plus de chromosomes que leurs parents. Ce mécanisme, qui ramène le nombre de chromosomes de $2n$ à n se situe pendant la période de formation des gamètes et est connu sous le nom de méiose. Il comporte deux divisions successives, les divisions de maturation. Chez les mâles, la méiose se déroule très rapidement sans phase d'arrêt. Elle est synchronisée avec la différenciation des spermatozoïdes. En revanche, chez les femelles, l'accroissement et la différenciation des ovocytes (vitellogenèse) et la méiose sont deux événements bien séparés. En fait, les cellules germinales femelles entrent très précocement en méiose pendant la vie foetale ou larvaire, et la maturation nucléaire peut atteindre la prophase de la première division de maturation (stade diplotène), bien avant que la phase d'accroissement des ovocytes ne soit achevée. A ce stade, l'ovocyte primaire possède un très volumineux noyau, la vésicule germinative (V.G.) qui renferme l'équivalent en A.D.N. de $4n$ chromosomes. La synthèse d'A.D.N. est achevée dès ce moment : 4 groupes de n chromosomes seront répartis entre l'oocyte et les trois globules polaires potentiels. Outre ces phénomènes nucléaires qui réduisent de moitié le stock diploïde de chromosomes et permettent les échanges de gènes, d'autres remaniements concernent à la fois le cytoplasme et la membrane des gamètes, préparant ainsi l'ovocyte à la fécondation.

1.1. RELATIONS TEMPORELLES ENTRE LA MATURATION ET LA FECONDATION

Chez de nombreuses espèces, il est bien établi que la fécondation ne peut se réaliser qu'au cours d'un stade précis de la maturation pour qu'un développement normal puisse en résulter. Selon JUST (1939), les animaux peuvent être regroupés en 4 classes (fig. 1).

Chez certaines espèces, appartenant à la classe I, comme chez les nématodes Rhabditides et l'*Ascaris*, les bivalves *Spisula* ou *Barnea*, les Echiurides *Urechis* ou *Myzostoma*, la fécondation a lieu au stade V.G. (ovocyte I). Elle déclenche à la fois la maturation et le développement. Dans la classe II, une phase de prématuration, incluant la rupture de la V.G., conduit les ovocytes en métaphase de première division méiotique. Les stimuli efficaces sont très



Oocyte I		Oocyte II	Ootid	Zygote
Prophase	Metaphase I	Metaphase II		

Figure 1 : Les relations temporelles entre la maturation et la fécondation des gamètes femelles selon les quatre classes d'animaux.

B I = Premier blocage au stade vésicule germinative.
 B II = Second blocage au stade métaphase 1 ou 2.



variés : changement du milieu extérieur comme chez l'annélide *Chaetopterus* (LILLIE, 1902), libération d'une neurohormone comme chez *Arenicola* (MEIJER, 1979 a, b, 1980), action de protéases spécifiques ainsi qu'il a été décrit chez *Sabellaria* (PEAUCELLIER, 1977 a). L'*Amphioxus*, parmi les prochordés, de même que la majorité des vertébrés se rangent dans une 3ème classe où la fécondation n'est possible que lorsque l'ovocyte atteint la métaphase de la seconde division de maturation. Cette évolution dépend d'une stimulation hormonale et les ovocytes demeurent bloqués à ce stade jusqu'à ce qu'ils soient fécondés ou activés artificiellement.

Enfin, chez les coelentérés et chez les échinides, la maturation est achevée avant fécondation (classe IV).

Il faut signaler, pour être complet, que certains animaux n'appartiennent pas strictement à l'une des classes. Cela est vrai pour l'annélide déjà citée *Sabellaria* dont les ovocytes peuvent déjà être fécondés au stade V.G. et pour l'étoile de mer dont la fécondation monospermique peut intervenir à quelque stade que ce soit, après induction de la rupture de la V.G. par l'hormone

1.2. LA MATURATION OVOCYTAIRE CHEZ LES AMPHIBIENS

1.2.1. L'ovocyte

Au terme de leur croissance, les ovocytes d'amphibiens, bloqués en prophase de méiose, se présentent comme de grosses cellules sphériques enveloppées par une couche de cellules folliculaires et une enveloppe vitelline, traversée par des macrovillosités issues des cellules folliculaires. Ces macrovillosités établissent des jonctions avec la membrane plasmique ovocytaire qui est ornée de nombreuses microvillosités. Les relations étroites qui s'établissent ainsi entre l'ovocyte et ses cellules folliculaires ont été étudiées chez *Rana esculenta* (WARTENBERG et GUSEK, 1960) *Rana pipiens* (KEMP, 1956a, KEMP, 1961) *Xenopus laevis*, *Rana temporaria*, *Triturus alpestris*, *Ambystoma mexicanum* (WARTENBERG, 1962) et *Triturus viridescens* (HOPE et al., 1963). Chez le Xénope, BROWNE et al. (1979) ont démontré que les complexes jonctionnels sont régulés sous l'action des hormones gonadotropes.

1.2.2. Le système de contrôle hormonal de la maturation

Dès 1939, HEILBRUNN *et al.* ont montré, chez *Rana*, que les hormones gonadotropes, secrétées par l'hypophyse, agissent sur le follicule ovarien pour induire la maturation des ovocytes. Ces hormones demeurent inefficaces lorsqu'elles sont appliquées à des ovocytes défolliculés (MASUI, 1967 ; SMITH *et al.*, 1968).

Deux hormones pituitaires gonadotropes ont été isolées chez trois espèces d'Amphibiens : *Ambystoma tigrinum* (LICHT *et al.*, 1975), *Rana cateisbiana* (LICHT et PAPKOFF, 1974) et *Rana pipiens* (FARMER *et al.*, 1977). Elles apparaissent comme les homologues de la "follicle stimulating hormone" (FSH) et de la "luteinizing hormone" (LH) des Mammifères, et elles déclenchent la production ou la décharge par la cellule folliculaire d'un second médiateur agissant directement sur l'ovocyte.

1.2.3. Substance inductrice de la maturation

Les ovocytes de *Rana pipiens*, défolliculés et insensibles aux hormones gonadotropes peuvent maturer sous l'action de la progestérone (MASUI, 1967 ; SCHUETZ, 1967 b ; SMITH *et al.*, 1968). Selon ces auteurs, les cellules folliculaires pourraient sécréter une hormone homologue de la progestérone sous l'action des gonadotropines.

FORTUNE *et al.* (1975) puis THIBIER-FOUCHET *et al.* (1976) confirment l'hypothèse de MASUI en démontrant que l'hormone gonadotrope du Xénope et l'hormone gonadotrope-chorionique humaine (HCG) induisent la transformation intrafolliculaire de la prégrénolone en progestérone. La cyanokétone et l'éliptine, qui suppriment cette transformation (THIBIER-FOUCHET *et al.*, 1976), inhibent parallèlement la maturation de follicules intacts stimulés par les gonadotropines. Ces mêmes inhibiteurs sont incapables de bloquer les maturations déclenchées par la progestérone (WRIGHT, 1971 ; SNYDER et SCHUETZ, 1973 ; FORTUNE *et al.*, 1975). Chez les Urodèles, la maturation a été peu étudiée. Ainsi, chez *Pleurodeles waltlii* (BRACHET, 1974) et *Nophtotalmus viridescens* (BARSACCHI-PILONE G. et HUMPHRIES, 1975), la progestérone ne permettrait la reprise de la méiose des ovocytes qu'après une injection préalable de gonadotropines. Cette assertion a cependant été démentie par VILAIN (1977) qui a obtenu la maturation de l'ovocyte de *Pleurodeles* sous l'action de la seule progestérone.

1.2.4. Site d'action de l'hormone

La progestérone se révèle efficace si elle est appliquée à l'extérieur des ovocytes : certains auteurs démontrent qu'elle est sans effet après injection dans les ovocytes de *Rana pipiens* (MASUI et MARKERT, 1971 ; SMITH et ECKER, 1969, 1971) ou de *Xenopus laevis* (DRURY et SCHORDERET-SLATKINE, 1975 ; JACOBELLI *et al.*, 1974). Les auteurs précisent que la progestérone agit à la surface externe de la membrane. ISHIKAWA *et al.* (1977) ont obtenu la maturation d'ovocytes de *Xenopus* sous l'action de desoxycorticostérone couplée à de l'agarose. BAULIEU *et al.* (1978) et GODEAU *et al.* (1978) ont utilisé, pour leur part, un stéroïde branché sur un polymère de poids moléculaire élevé (20.000 daltons). Cette molécule, non perméante, provoque la maturation des ovocytes de *Xenopus* et reste inefficace après microinjection intracellulaire. Toutefois, des résultats récents obtenus après microinjection de progestérone en solution huileuse dans les ovocytes de *Xenopus* (TSO *et al.*, 1982) plaident en faveur d'une action hormonale s'exerçant au niveau des sites membranaires internes.

1.2.5. Traitements mimétiques

Les organomercuriels, parachloromercuribenzoate ou parahydroxymercuri-phenylsulfonate (BRACHET *et al.*, 1975), et certains agents oxydants des fonctions SH comme la cystéamine (PAYS *et al.*, 1977) sont capables d'induire la maturation de l'ovocyte d'Amphibien. Ces agents demeurent inefficaces lorsqu'ils sont injectés dans les ovocytes (BRACHET *et al.*, 1975 ; PAYS *et al.*, 1977). La valinomycine, ionophore à K^+ , provoque la maturation (BALTUS *et al.*, 1977) et l'ionophore A 23187 peut également induire la reprise de la méiose, à condition qu'il soit appliqué dans un milieu enrichi en ions divalents (WASSERMAN et MASUI, 1975 ; MOREAU *et al.*, 1976). L'insuline est capable d'induire la maturation des ovocytes de *Xenopus* (EL-ETR *et al.*, 1979 ; WALLACE et MISULOVIN, 1980). Enfin SCHORDERET-SLATKINE *et al.* (1977) ont obtenu la maturation des ovocytes de *Xenopus* sous l'action d'un grand nombre d'agents connus pour mobiliser le calcium. Certains ions, comme Mn^{++} et CO_3H^- (ROBINSON, 1979) seraient aussi actifs.

1.2.6. Effecteur intracytoplasmique : MPF

Chez les ovocytes de *Rana pipiens*, MASUI et MARKERT (1971) décrivent l'apparition d'un facteur intracytoplasmique qui se révèle capable d'induire la maturation lorsqu'il est injecté dans des ovocytes récepteurs non stimulés par l'hormone. Ce MPF (Maturation Promoting Factor) qui présente tous les caractères d'un système phosphorylant autocatalytique (DRURY, 1978 ; WU et GERHART, 1980) a été retrouvé tant chez l'Etoile de mer (KISHIMOTO et KANATANI, 1976) que chez d'autres espèces d'amphibiens (REYNHOUT et SMITH, 1974 ; SCHORDERET-SLATKINE et DRURY, 1973 ; WASSERMAN et MASUI, 1975). Tous les traitements mimétiques connus provoquent également l'apparition du MPF qui précède toujours la rupture de la vésicule germinative, et s'effectue indépendamment de toute transcription du génome ovocytaire (SCHORDERET-SLATKINE et DRURY, 1973 ; REYNHOUT et SMITH, 1973). Chez les amphibiens, la formation du MPF est bloquée par la cycloheximide et nécessite la synthèse d'une protéine qualifiée d'"initiateur" par WASSERMAN et MASUI (1975). Elle implique également la phosphorylation de protéines endogènes (MALLER *et al.*, 1977 ; REYNHOUT et SMITH, 1974 ; WASSERMAN et MASUI, 1975). Les tentatives effectuées jusqu'à présent pour purifier le MPF sont restées sans succès. Enfin, il a été montré qu'il s'agit là d'un facteur universel susceptible de contrôler tant la division des cellules somatiques que celle des cellules germinales (WASSERMAN et SMITH, 1978 ; SUNKARA *et al.*, 1979 ; NELKIN *et al.*, 1980 ; MEIJER et GUERRIER, 1983 ; SCHAT *et al.*, 1983 ; YONGLAI *et al.*, 1983).

1.3. L'HYPOTHESE D'UN CONTROLE IONIQUE DE LA MATURATION

Le processus de la maturation débute dès l'instant où la rupture de la V.G. se trouve programmée et se termine avec l'expulsion des globules polaires. On a vu que ce processus peut être déclenché par des stimuli très divers et qu'il peut se dérouler en plusieurs étapes comportant un second blocage soit en métaphase 1, soit en métaphase 2 (fig. 1). Ce deuxième blocage ne peut être levé que par la fécondation ou l'activation.

Il est vraisemblable que tous les stimuli efficaces (hormone, agonistes ou mimétiques) agissent par l'intermédiaire d'un messager commun qui, dans tous les cas, aboutit à la production du MPF et qu'il est nécessaire

de caractériser. En fait, il a été montré que la formation du MPF est indépendante de toute transcription du génome ovocytaire (GUERRIER et DOREE, 1975 ; KISHIMOTO *et al.*, 1981 ; SCHORDERET-SLATKINE, et DRURY, 1973). De plus, chez l'Etoile de mer et contrairement à ce qui se passe chez les amphibiens (WASSERMAN et MASUI, 1975 a), la maturation s'effectue normalement en absence de toute synthèse protéique. Dans ce cas précis, on a donc un exemple tout à fait remarquable d'un processus d'activation biologique contrôlé au niveau posttraductionnel. C'est dire que la maturation n'a pu évoluer que grâce à la modification d'éléments préexistants. Un tel effet s'expliquerait aisément par la mise en route de processus d'activation enzymatique susceptibles d'être contrôlés par des changements de l'environnement ionique intracellulaire. C'est cette question que nous allons examiner maintenant en effectuant une analyse aussi complète que possible des données de la littérature actuellement à notre disposition. De l'ensemble de ces données, on peut extraire deux types d'arguments qui plaident en faveur d'un contrôle ionique de la maturation ovocytaire. Ce sont :

- la dépendance de la maturation vis-à-vis de la composition ionique du milieu extracellulaire.
- la mise en évidence de changements significatifs et indispensables dans les activités ioniques intracellulaires.

1.3.1. Exigences ioniques extracellulaires

Ces exigences concernent tant les ions monovalents que les ions divalents.

1.3.1.1. Ions monovalents

Parmi ces ions, une importance toute particulière a toujours été accordée à l'ion potassium (ECKER et SMITH, 1971). Ces auteurs ont, en effet, été les premiers à attirer l'attention sur le fait que les ovocytes de *Rana pipiens*, en fin d'accroissement, présentent une faible activité protéosynthétique, celle-ci n'augmentant qu'au cours de la méiose. Le taux maximum de cette synthèse ne serait atteint que pour des concentrations en K^+ externe relativement élevées. Cette dépendance de la synthèse protéique vis-à-vis de l'environnement ionique s'étend sur plus de 18 à 24 heures après addition de l'hormone. Actuellement, cette relation ne semble plus apparaître comme aussi

stricte et directe qu'on pouvait le penser à l'origine. C'est ainsi que les ovocytes de *Xenopus*, saisis au stade VI (DUMONT, 1972) et prélevés quatre jours après une injection de H.C.G. présentent une activité protéosynthétique élevée comparable à celle d'ovocytes soumis à la progestérone et provenant d'animaux non traités. Ces ovocytes ne mûrissent qu'à la condition expresse qu'ils soient de plus soumis à l'action de la progestérone (WASSERMAN *et al.*, 1982).

Lorsque la synthèse protéique est inhibée par la cycloheximide, les ovocytes mûrissent s'ils reçoivent une injection de cytoplasme contenant du MPF (WASSERMAN et MASUI, 1975 a ; DRURY et SCHORDERET-SLATKINE, 1975). Récemment, WASSERMAN (1982) a isolé avec succès deux fractions physiologiquement et physiquement séparables à partir du cytoplasme d'ovocytes de *Xenopus* en cours de maturation : l'une stimule la synthèse protéique tandis que l'autre conduit directement à la rupture de la V.G. D'autres expériences réalisées sur *Xenopus* par BALTUS *et al.* (1977) mettent l'accent sur l'importance apparente du mouvement des ions K^+ pendant la maturation. Selon ces auteurs la valinomycine, ionophore K^+ , serait capable de provoquer la rupture de la V.G. en absence de K^+ externe, condition qui entraîne une chute de 40 % du K^+ intracellulaire. En outre, les recherches de VITTO et WALLACE (1976), WALLACE et STEINHARDT (1977) et KOFOID *et al.* (1979) révèlent que l'absence de K^+ externe ou que la réduction de l'influx actif de K^+ par l'ouabaïne facilite l'induction de la maturation par la progestérone. La situation est loin d'être claire dans la mesure où un milieu dépourvu de K^+ , retarde significativement la maturation d'ovocytes dénudés de *Rana pipiens* alors que la strophantidine demeure inefficace (MORRILL et ZIEGLER, 1980).

La même indécision concerne les mouvements des ions Na^+ . En effet, si leur absence accélère bien la rupture de la V.G. chez *Rana pipiens* (MORRILL et ZIEGLER, 1980), elle n'a en revanche aucun effet sur la maturation des ovocytes de *Xenopus*. Cependant, chez cette dernière espèce, l'amiloride qui bloque les canaux Na^+ empêcherait la reprise de la méiose (BALTUS *et al.*, 1977). D'autres informations dérivent d'expériences de mesure de flux réalisées à l'aide de traceurs radioactifs et effectuées sur des ovocytes débarrassés de leurs cellules folliculaires. Ces observations démontrent que les flux passifs et actifs de sodium et de potassium augmentent très tôt, sinon

immédiatement après addition de progestérone à des ovocytes de *Xenopus laevis* (O'CONNOR *et al.*, 1977). Chez *Rana pipiens* (ZIEGLER et MORRILL, 1977) la perméabilité K^+ disparaît pratiquement après la rupture de la V.G. . Ces résultats suggèrent qu'une diminution de la concentration interne de K^+ , suivie d'une réduction de la perméabilité sélective aux ions K^+ pourrait jouer un rôle important dans la reprise de la méiose. Cette hypothèse a paru confirmée par un certain nombre d'observations réalisées sur d'autres systèmes. Ainsi, chez la souris, la valinomycine retarderait l'évolution de la maturation, probablement par la voie d'un accroissement de la concentration potassique interne. Chez l'Etoile de mer, il a été décrit que le tétraéthylammonium, qui bloque les canaux K^+ , s'opposerait au déclenchement de la méiose par la 1-Méthyladénine (1-MeAde) (DOREE *et al.*, 1976). L'analyse des expériences réalisées à l'aide de traceurs radioactifs (DOREE, 1981 ; GUERRIER *et al.*, 1979) révèle cependant l'existence d'une situation plus complexe dans laquelle se trouvent associées une stimulation transitoire de la pompe Na^+-K^+ et une augmentation de la perméabilité passive au Na^+ . Par ailleurs, le dithiothreitol, substance mimétique de la 1-MeAde, augmente la perméabilité passive aux ions K^+ , ce que l'on n'observe jamais avec l'hormone naturelle.

D'après DOREE (1981) et GUERRIER *et al.* (1979), l'activation de la pompe Na^+-K^+ et la stimulation de l'influx de Na^+ ne seraient que la conséquence directe d'une augmentation transitoire de la concentration interne en ions calcium libres. En ce qui concerne les anions, ROBINSON (1979) a pu enregistrer, à l'aide d'une sonde vibrante, des courants externes qui entrent au pôle animal et quittent le pôle végétatif des ovocytes de *Xenopus*. Il démontre que ces courants sont transportés par les ions Cl^- et vraisemblablement régulés par les ions Ca^{++} .

1.3.1.2. Ions divalents

La rupture de la vésicule germinative nécessite la présence de Ca^{++} externe chez l'annélide *Chaetopterus* (IKEGAMI *et al.*, 1976 ; BRACHET et DENIS-DONINI, 1977) de même que chez les bivalves *Barnea* (PASTEELS, 1930, 1938 ; DUBE et GUERRIER, 1982 a) et *Spisula* (SCHUETZ, 1975b, GUERRIER *et al.*, 1981). Chez *Barnea*, les ions Ca^{++} seuls peuvent déclencher la maturation alors que, chez l'annélide *Sabellaria*, les ionophores A 23187 et X 537 peuvent agir

en absence de Ca^{++} externe (PEAUCELLIER, 1977). Une situation analogue semble prévaloir chez *Chaetopterus* car de fortes concentrations d'ionophore sont efficaces même en absence de Ca^{++} externe (ECKBERG et CARROLL, 1982).

Les ovocytes de l'étoile de mer *Marthasterias glacialis* répondent, pendant une partie de la saison, à un accroissement de la concentration externe en Ca^{++} et la reprise de la méiose ainsi obtenue ne peut en aucun cas être attribuée à une éventuelle libération d'hormone par les cellules folliculaires (GUERRIER *et al.*, 1978). Les ions Ca^{++} agissent en effet directement sur des ovocytes dénudés et même préactivés par l'ionophore ou le spermatozoïde. Cette réponse au Ca^{++} externe peut être inhibée par des agents qui bloquent les canaux calciques comme le D 600, l'Isoptin et le La^{3+} (MOREAU *et al.*, 1978 a). En revanche, la maturation déclenchée par l'hormone se déroule même en présence de La^{3+} et en absence complète de Ca^{++} et Mg^{++} externes, bien que D 600 et Isoptine restent inhibiteurs dans ces conditions. ROSENBERG et LEE (1981), signalent en revanche, que la préincubation d'ovocytes de *Patiria miniata* dans de l'eau de mer dépourvue de Ca^{++} et Mg^{++} affecte sévèrement l'issue du traitement hormonal, ce qui pourrait s'expliquer par un épuisement des compartiments intracellulaires. Toutes ces observations conduisent donc à penser que la 1-MeAde pourrait agir en libérant le Ca^{++} à partir de compartiments intracellulaires, hypothèse qui a été largement confirmée après injection intracellulaire d'une photoprotéine calcium dépendante : l'aequorine (MOREAU *et al.*, 1978 a). Ces quelques données ne suffisent cependant pas à clore la longue liste des arguments que l'on peut développer en faveur d'un rôle positif du Ca^{++} dans le déclenchement de la maturation. L'utilisation de nombreuses substances connues pour agir sur la perméabilité calcique ou sur les sites de liaisons du Ca^{++} devait, en effet, révéler que le Ca^{++} est bien le signal effectif de la maturation chez ces invertébrés marins.

Chez les Amphibiens, la nécessité de la présence de cations divalents, dans le milieu extérieur, a été signalée pour la première fois par MERRIAM (1971) et il est vraisemblable que l'épuisement expérimental des compartiments intracellulaires nuise également dans ce cas au bon déroulement de la maturation. Actuellement, on reconnaît que la progestérone et que

de nombreuses substances mimétiques peuvent déclencher la maturation même en absence de Ca^{++} externe (KNAUBER et ARANCIBIA cités par KOFOID *et al.*, 1979 ; MASUI *et al.*, 1979 ; MOREAU *et al.*, 1980). Il convient d'ajouter que les ions Mn^{++} (ROBINSON, 1979 ; KOFOID *et al.*, 1979 ; MOREAU *et al.*, 1983) et La^{3+} (SCHORDERET-SLATKINE *et al.*, 1976) qui déplacent les ions Ca^{++} de leurs sites membranaires permettent également la reprise de la méiose ovocytaire chez *Xenopus*. BAULIEU *et al.* (1978) et SCHORDERET-SLATKINE *et al.* (1976) donnent une liste extensive de composés très divers qui pourraient déclencher la méiose en agissant par mobilisation du Ca^{++} .

L'utilisation des traceurs radioactifs éclaire aussi singulièrement ce problème. Ainsi, chez *Xenopus*, O'CONNOR *et al.* (1977) observent une lente augmentation de l'accumulation de Ca^{++} qui décline avant la rupture de la vésicule germinative, cet effet est inhibé en présence de cycloheximide ou de théophylline. Ces derniers auteurs montrent, en outre, un efflux rapide et conséquent de Ca^{++} parallèle à l'efflux de K^+ . Leur conclusion principale est que le traitement hormonal pourrait bien provoquer une augmentation de la concentration interne en ions Ca^{++} libres. MORRILL *et al.* (1980) arrivent à la même conclusion, chez *Rana pipiens*, où divers agonistes comme la progestérone, l'insuline, le D 600 et le La^{3+} engendrent une diminution de l'accumulation de Ca^{++} et un accroissement d'efflux pendant les quinze premières minutes. En revanche, l'ionophore A 23187 stimulerait à la fois accumulation et efflux de Ca^{++} . Dans ces conditions, l'ionophore apparaît s'opposer à la maturation alors qu'il se révèle un inducteur efficace dans le cas de *Xenopus* (WASSERMAN et MASUI, 1975a ; MOREAU *et al.*, 1976). Chez cette même espèce, l'injection iontophorétique de Ca^{++} dans la région corticale des ovocytes déclenche la maturation (MOREAU *et al.*, 1976). On notera enfin que BALTUS *et al.* (1977), en augmentant simplement la concentration externe de Ca^{++} et de Mg^{++} ont pu déclencher la reprise de la méiose chez *Xenopus*, en absence même de tout traitement par l'ionophore.

1.3.2. Mobilisation du Ca^{++} intracellulaire

Alors que, chez les Mollusques, nous avons signalé l'importance d'un influx de Ca^{++} lors du déclenchement de la maturation, le cas de l'ovocyte des Annélides *Sabellaria*, *Chaetopterus* et *Arenicola* qui peuvent mûrir en

milieu dépourvu de Ca^{++} , parle en faveur de l'intervention d'une libération du Ca^{++} interne. L'utilisation d'aequorine et de fractions riches en membrane plasmique a permis de montrer la réalité de ce phénomène chez *Arenicola* (MEIJER, 1980). Une démonstration plus directe de ce phénomène a été fournie dans le cas des ovocytes d'étoile de mer. MOREAU *et al.* (1978) ont injecté une photoprotéine, l'aequorine, dans des ovocytes de *Marthasterias glacialis*. Qu'il s'agisse d'un groupe d'ovocytes ou d'un ovocyte isolé, les auteurs observent qu'un flash lumineux dépendant de la concentration se produit régulièrement moins de 2 secondes après addition de l'hormone. Cette réponse transitoire ne dure pas plus de 30 secondes et correspond à une augmentation micromolaire de la concentration interne en Ca^{++} libre, pour un seuil hormonal égal à $0,1 \mu M$ (MOREAU et GUERRIER, 1979 ; MOREAU *et al.*, 1978 a).

L'importance d'une telle réponse calcique lors de la reprise de la méiose de l'étoile de mer est étayée par les observations suivantes :

- seuls les analogues structuraux actifs de la 1-MeAde et ses mimétiques déclenchent une libération transitoire de Ca^{++} dépendante de la concentration (GUERRIER *et al.*, 1979 ; MOREAU *et al.*, 1978 b).

- l'EGTA, qui chélate le Ca^{++} libéré, bloque la réponse lumineuse et la maturation si on l'ajoute avant et pendant le temps d'apparition de la réponse calcique.

- de nombreux inhibiteurs de la réponse biologique (D 600, procaine, théophylline) empêchent la méiose en abaissant la réponse Ca^{++} intracellulaire au-dessous de la valeur seuil efficace. Ces deux réponses sont restaurées en augmentant la concentration de 1-MeAde (GUERRIER *et al.*, 1978 ; MOREAU *et al.*, 1978 a).

Chez les Amphibiens, WASSERMAN *et al.* (1980), travaillant sur des ovocytes individuels de mutant albinos de *Xenopus*, ont également décrit une libération transitoire instantanée de Ca^{++} intracellulaire dès application de la progestérone. Nous verrons que nos résultats ne diffèrent de ceux de WASSERMAN *et al.* (1980) que sur le plan cinétique (MOREAU *et al.*, 1980 ; VILAIN *et al.*, 1980).

En définitive, l'ensemble de ces données tendrait donc à présenter le Ca^{++} comme le messager secondaire universel responsable du déclenchement de la maturation, qu'il agisse par l'intermédiaire d'un influx comme chez les Mollusques bivalves ou par l'intermédiaire d'une libération à partir des compartiments internes comme chez l'étoile de mer ou les amphibiens.

Un tel changement dans la compartimentation du Ca^{++} pourrait fort bien contrôler les perméabilités ioniques et influencer sur l'activité de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ainsi que cela a déjà été écrit pour l'ovocyte d'étoile de mer (DORÉE, 1981 ; GUERRIER *et al.*, 1979). Cependant, il demeure difficile d'analyser plus avant cette situation lorsqu'on ignore tout des bases ioniques du potentiel de membrane et de la conductance membranaire des ovocytes.

1.4. CONCLUSION

L'ovocyte des amphibiens constitue un bon modèle de cellule-cible réagissant à un signal hormonal. C'est un système particulièrement favorable pour étudier les mécanismes biochimiques et physiologiques qui contrôlent la reprise de la division cellulaire. L'arrêt de la maturation à un stade plus ou moins avancé de la méiose et le redémarrage de celle-ci sous l'influence de divers stimuli extérieurs (hormones, mimétiques) représentent déjà une situation privilégiée. Le fait que l'impact de ces stimuli se situe au niveau de la membrane plasmique et qu'il peut en résulter une activation du fonctionnement de divers enzymes clés (contrôle post-traductionnel) constitue un autre élément d'intérêt.

Enfin, nous avons vu que la reprise de la méiose s'effectue par l'intermédiaire d'un facteur intracytoplasmique universel, le MPF, dont l'élaboration pourrait elle-même répondre à l'action d'un messager secondaire ubiquiste et qu'il convient de mieux appréhender.

Au cours de cette étude bibliographique, nous avons passé en revue nombre de données qui conduisent toutes à penser que le contrôle hormonal des processus de la maturation pourrait s'exercer par l'intermédiaire d'un changement des activités ioniques intracellulaires. Les causes immédiates et la signification de ces variations qui affectent potentiel et conductance membranaire ne sont pas encore clarifiées.

L'un des objectifs essentiels de ce travail a été de tenter d'apporter une réponse à ces questions. Il s'inscrit donc pleinement dans l'ensemble des recherches qui ont été menées dans ce domaine. Son originalité principale repose dans la stratégie que nous avons adoptée et qui a consisté :

- A étendre l'analyse du processus de maturation au cas des Amphibiens Urodèles, longtemps négligés et qui, comme les Anoures, répondent à la progestérone pendant une partie au moins de l'année (VILAIN, 1977) et se retrouvent également bloqués en métaphase de deuxième division de maturation.

- A tenter de mieux comprendre les mécanismes par lesquels le signal hormonal peut entraîner un changement des propriétés électriques membranaires et des activités intracytoplasmiques.

- A rechercher enfin des arguments expérimentaux objectifs, susceptibles d'asseoir notre hypothèse principale selon laquelle l'ion Ca^{++} pourrait intervenir dans le déclenchement de la méiose et contrôler les divers mouvements ioniques qui l'accompagnent.

Il va de soi que l'orientation de ce programme s'est trouvée infléchie en fonction de l'évolution des techniques et de l'état d'avancement de la question.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

2.1. METHODES GENERALES

2.1.1. Préparation des ovocytes

Des femelles matures de *Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltlii* et *Ambystoma mexicanum*, provenant de diverses sources, ont été maintenues en élevage tant à Lille qu'à Roscoff. Elles ne subissent aucun traitement préalable par les hormones hypophysaires. Contrairement à ce que laissait entendre un certain nombre de publications antérieures (BRACHET *et al.*, 1970 ; BRACHET, 1974, BARSACCHI, PILONE et HUMPHRIES, 1975), ce traitement se révèle toujours inutile même dans le cas des amphibiens urodèles (VILAIN, 1977).

Après anesthésie des animaux au MS 222 (Tricaine méthane sulfonate, Sandoz), un fragment d'ovaire est prélevé dans la cavité abdominale. Les follicules, préparés par dissection manuelle, sont placés pour équilibration dans les milieux physiologiques choisis, pendant 6 à 12 heures, à la température de 13-14°C. Ce délai permet l'élimination des follicules lésés ou éventuellement stimulés par le traitement mécanique. Il favorise également l'obtention d'une population homogène de cellules qui se trouvent placées dans un milieu parfaitement défini après équilibration des compartiments ioniques qui entourent l'ovocyte (espace sous-folliculaire, milieu externe).

La majorité des expériences réalisées a porté sur des follicules entiers. Certaines expériences spécifiques ont nécessité une défolliculation préalable des ovocytes. Pour ce faire, trois procédés ont été utilisés :

- dissection manuelle à l'aide de pinces fines.
 - agitation mécanique rotatoire dans un béccher dont la paroi interne était revêtue de papier abrasif à grains très fins (0.05 µm).
 - traitement enzymatique à la collagénase (Worthington, 5 h, 1 mg/ml).
- Ce traitement est suivi d'une période de récupération à 4°C (12 h environ).

2.1.2. Milieux physiologiques

Quatre milieux physiologiques de base ont été utilisés, dont les compositions ioniques sont les suivantes :

- Solution de Steinberg :

NaCl 58 mM ; KCl 0,67 mM ; Ca (NO₃)₂ 0,33 mM ; MgSO₄ 0,82 mM

- Solution de Merriam (MERRIAM, 1971 a).

NaCl 88 mM ; KCl 1 mM ; Ca (NO₃)₂ 0,33 mM ; MgSO₄ 0,82 mM ;
CaCl₂ 0,41 mM.

- Solution de Ringer :

NaCl 112 mM ; KCl 2 mM ; CaCl₂ 1,3 mM.

- Solution OR₂ de WALLACE (WALLACE *et al.*, 1973)

NaCl 82,5 mM ; KCl 2,5 mM ; CaCl₂ 1 mM ; MgCl₂ 1 mM ;
Na₂HPO₄ 1 mM.

Le pH de ces solutions est ajusté à 7,4 -7,6 à l'aide du tampon Hepes/NaOH.

Pour la maturation, le milieu OR₂ nous a toujours fourni les meilleurs résultats. Par ailleurs, diverses solutions de composition ionique modifiée ont été préparées afin d'étudier les propriétés de perméabilité de la membrane ovocytaire.

- Les solutions hyperpotassiques résultent de l'apport d'ions K⁺ sous la forme de K₂SO₄. La concentration potassique externe (K⁺) est réduite en deçà de la valeur normale du milieu de référence en diminuant la concentration de KCl.

- Les milieux hyposodiques résultent de la diminution de la concentration de NaCl, (Cl⁻)_e étant maintenue constante par apport de chlorure de choline.

- Les ions Cl⁻ ont été remplacés par du propionate ou de l'isethionate de Na.

- Sur les milieux sans Ca⁺⁺ et sans Mg⁺⁺, nous avons ajouté soit de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) qui complexe les ions Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺, soit de l'acide éthylène glycol bis (amino-ethyl-ether) -N-N'-tétra acétique (EGTA) qui complexe les ions Ca⁺⁺.

2.1.3. Méthodes d'observation

Outre l'observation vitale qui est particulièrement efficace dans le cas des amphibiens urodèles, nous avons eu recours aux techniques cytologiques pour la mise en évidence des figures de division et aux techniques cytochimiques pour l'évolution du glycogène. Les observations ont été effectuées en microscopie photonique et électronique.

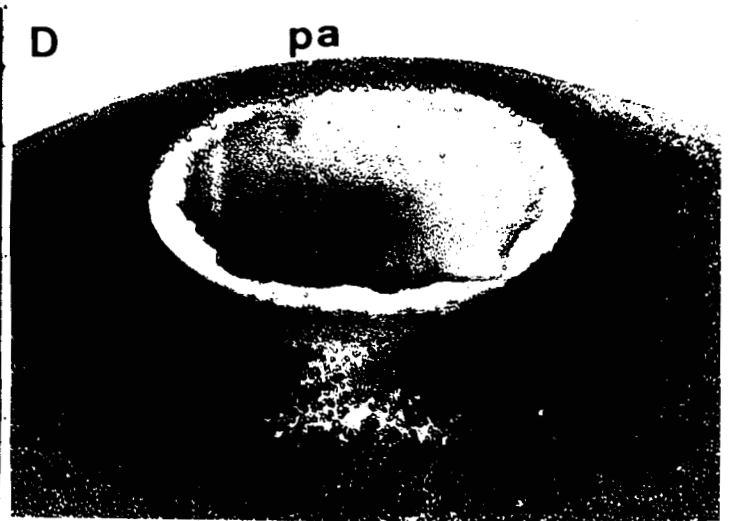
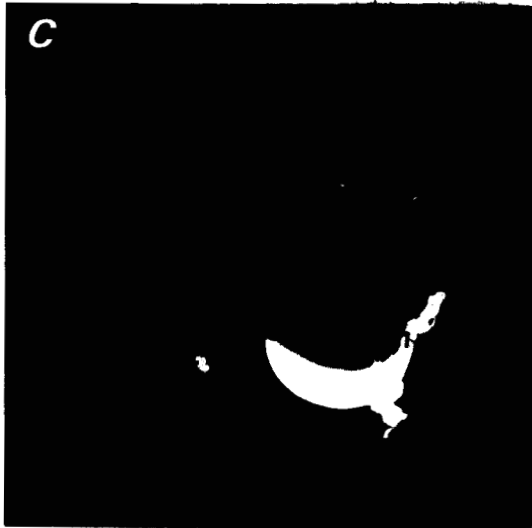
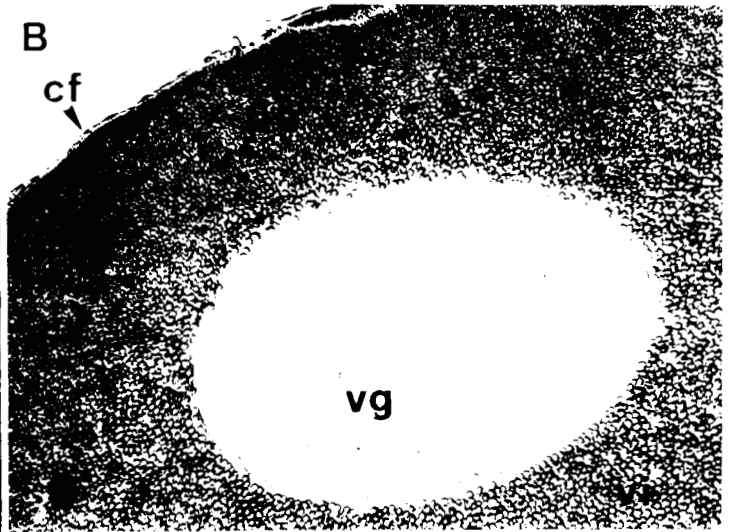
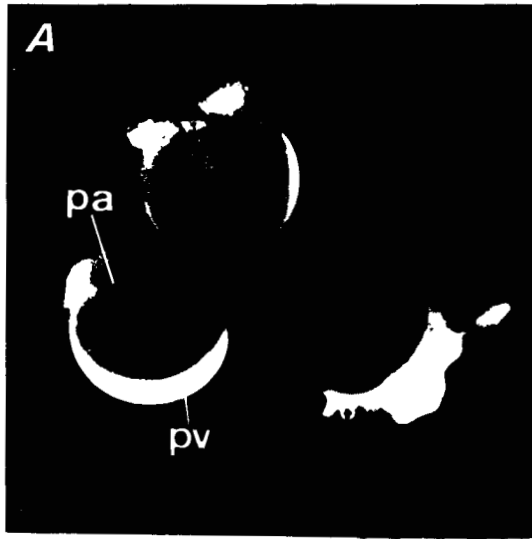
Planche I : Les principales étapes de la maturation de l'ovocyte de Pleurodèle.

Figure A et B : Ovocytes témoins n'ayant subi aucun traitement hormonal. pa : pôle animal ; pv : pôle végétatif ; cf : cellules folliculaires, vg : vésicule germinative, vi : vitellus (X 15 ; X 170).

Figures C et D : Migration de la vésicule germinative au pôle animal après traitement des ovocytes à la progestérone. Ovocytes au stade VG. En migrant, la vésicule germinative (vg) laisse derrière elle une traînée de cytoplasme dépourvu de vitellus (flèche) (X 15 ; X 170).

Figures E et F : Ovocytes après la rupture de l'enveloppe nucléaire. Apparition de la tâche de maturation (tm) et formation du fuseau métaphasique (f) de la deuxième division méiotique. Les chromosomes (chr) sont bien individualisés. L'une des pointes du fuseau vient affleurer la surface membranaire. (X 15 ; X 800).





BUS
LILLE

2.1.3.1. Microscopie photonique

Ovocytes témoins et ovocytes stimulés ont été fixés dans le Bouin Hollande toutes les heures pendant une période de 24 heures. Les pièces sont ensuite incluses dans le paraplaste après passage dans une solution de colloïdine diluée à 1 % dans le benzoate de méthyl.

Les ovocytes sont débités en coupes sériées de 7 μ m, colorées par le rouge nucléaire associée au Picro-indigocarmin.

2.1.3.2. Microscopie électronique

Les ovocytes sont fixés au glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon phosphate 0,05 M, pH = 7,4 pendant 24 heures. Avant le passage dans la solution de lavage, les deux hémisphères animal et végétatif sont séparés. Les ovocytes subissent une post fixation de 3 h. au tetroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon phosphate. L'exposition des pièces à l'acétate d'uranyle 1 % dans l'alcool 70° est effectuée en cours de déshydratation. Après inclusion dans l'épon, les coupes sont réalisées à l'ultramicrotome REICHERT OMU2, puis ramassées sur des grilles à membrane (parlodion en solution 0,4 % dans l'acétate d'isoamyle). Elles sont contrastées par le citrate de plomb selon la technique de REYNOLDS (1963) précédée d'un passage dans l'acétate d'uranyle en solution alcoolique. Les grilles ont été examinées sur un microscope électronique JEOLJEM 120.

2.1.4. Etude de la maturation

Follicules ou ovocytes isolés ont été soumis en continu à l'action de la progestérone (1 μ g/ml, SIGMA) ou de divers agents mimétiques. Les incubations ont en général été réalisées à la température ambiante.

La maturation est un processus relativement lent qui comprend la migration de la vésicule germinative vers le pôle animal et sa rupture, l'émission du premier globule polaire et la formation du fuseau de deuxième division de maturation qui reste bloqué en métaphase (Planche I).

Chez les Urodèles, il est très facile de suivre, sous une loupe binoculaire, les diverses étapes de la maturation. La planche I fig. A présente un ovocyte de Pleurodèle en fin de croissance dont le diamètre est inférieur à 1,5 mm. Pendant les premières heures d'incubation hormonale,

Planche II : Vue d'ensemble d'un ovocyte de Pleurodèle au terme de sa croissance. Coupe réalisée au pôle animal.

L'enveloppe vitelline (ev) est traversée par les microvillosités (mv) de l'ovocyte (ov), ainsi que par les macrovillosités (ma) qui sont les prolongements cellulaires des cellules folliculaires (cf). Le cytoplasme contient des mélanosomes (ml), des plaquettes vitellines (vi), des vésicules lipidiques (l), des mitochondries (m) concentrées en grande partie dans la zone corticale du cytoplasme, et des lamelles annelées (la). (X 8000).



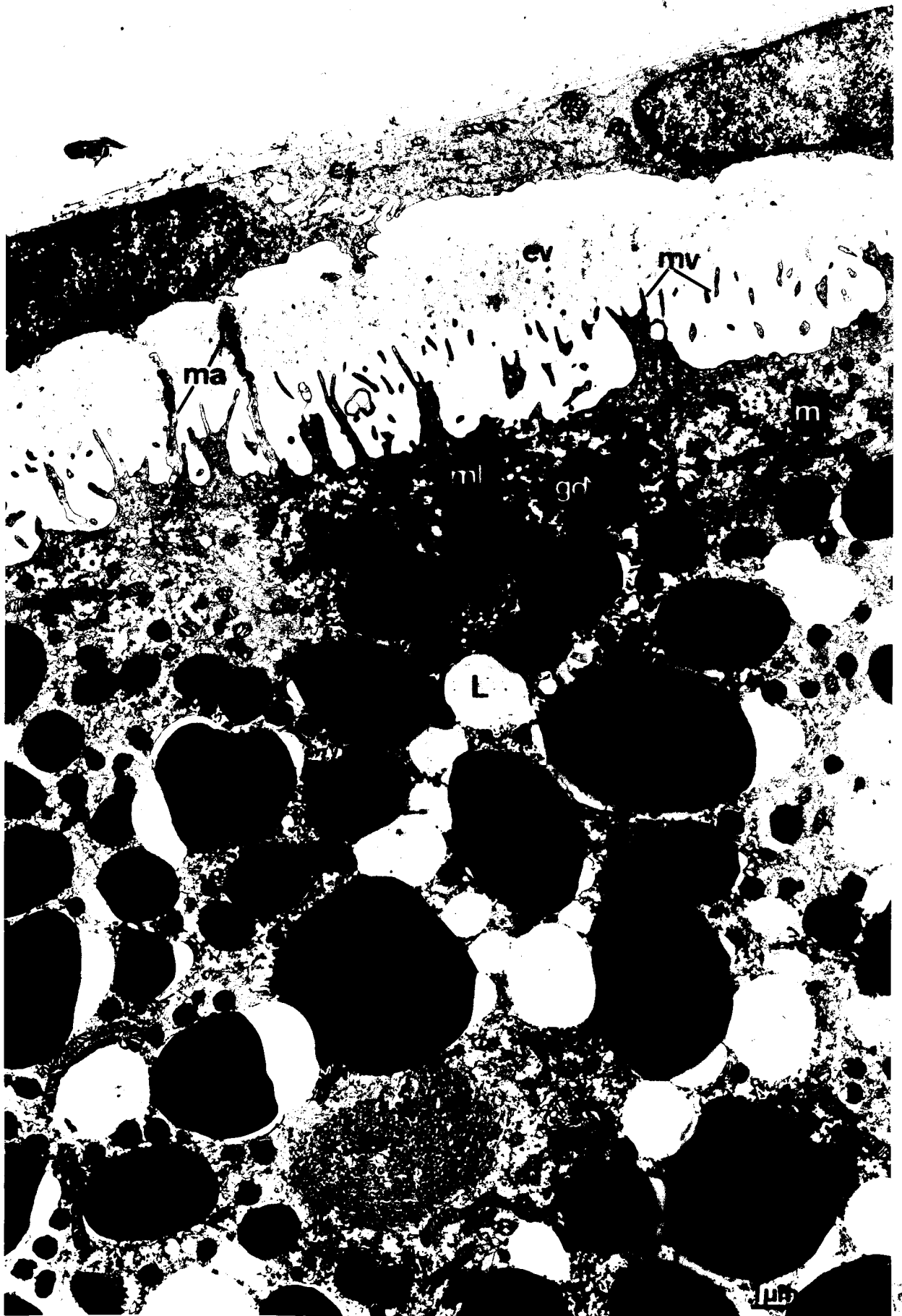


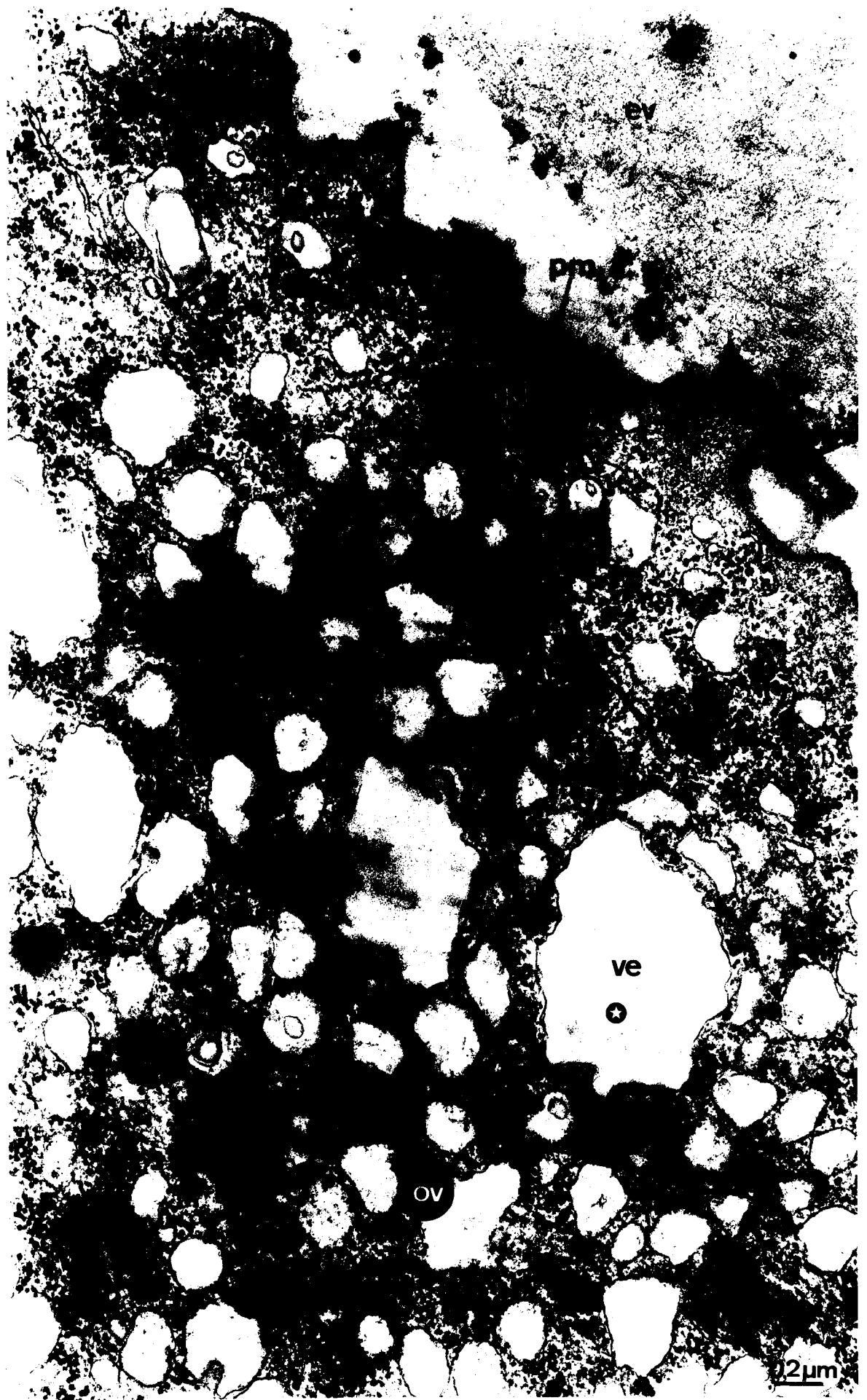
Planche III : Morphologie de la surface ovocytaire et du cytoplasme cortical (pôle animal) après la rupture de l'enveloppe de la vésicule germinative (12 heures d'incubation hormonale).

La membrane plasmique (pm) ne présente plus de véritables microvillosités.

Le cytoplasme cortical dépourvu d'organites cytoplasmiques est envahi par des masses considérables de vésicules (ve, étoile) de différente taille.

Le glycogène (gl) cytoplasmique forme des petits groupes compacts ; un granule dense (gd) situé près du plasmalemma peut être observé à ce stade. (X 42000).





aucun changement morphologique apparent ne se produit; après 5 à 6 heures, les vésicules germinatives intactes migrent au pôle animal où elles affleurent sous la membrane plasmique. Elles dessinent superficiellement une tache circulaire et translucide. Ce stade vésicule germinative animale (V.G.A.) est représenté Planche I fig. C. La tache se réduit entre 9 et 12 heures puis disparaît pour faire place à une zone claire au centre de laquelle on observe un point sombre (Pl. I, fig. E). Cet ensemble correspond à ce qui est communément appelé la tache de maturation. On distingue assez aisément le premier globe polaire sombre au centre de la tache claire et un second point noir décentré qui correspond à l'attache du fuseau de 2ème division de maturation. Dans le même temps, les cellules folliculaires se détachent de l'ovocyte et la pigmentation se modifie : elle devient foncée et granuleuse dans l'hémisphère animal.

Au niveau de résolution ultrastructural, l'ovocyte de Pleurodèle, comme celui de tous les amphibiens est entouré par une couronne continue de cellules folliculaires et par une enveloppe vitelline structurée (Pl II). Celle-ci est traversée par les macrovillosités de cellules folliculaires qui établissent des jonctions avec la membrane plasmique de l'ovocyte. La surface cellulaire est ornée de nombreuses microvillosités et le cortex forme une mince bande cytoplasmique dans laquelle abondent des mitochondries, des mélanosomes localisés dans l'hémisphère animal et des plages clairsemées de glycogène. L'ovocyte est envahi par un vitellus extrêmement riche dans lequel on observe parfois des lamelles annelées. Après stimulation hormonale, on assiste à une réduction progressive des microvillosités : la surface tend à se réduire (Pl. III). Simultanément, le glycogène s'accumule au pôle animal puis il est expulsé dans l'espace périvitellin. Nous avons montré que ce phénomène ne présente pas un caractère général (TAGHY et VILAIN, en préparation) puisqu'il est absent chez *Xenopus* et beaucoup moins développé dans le cas d'*Ambystoma*.

2.1.5. Critères de la maturation

Nous avons vu que la simple observation morphologique permet de suivre aisément la maturation de l'ovocyte des Urodèles. Il n'en va pas de même chez *Xenopus* où la rupture de la vésicule germinative survient pendant le cours

même de sa migration. Au bout de 5 à 6 heures, on observe encore, dans ce cas, une tache de maturation. Cependant, ce seul signe extérieur ne peut constituer à lui seul, un critère objectif du succès de la maturation. Une évolution anormale des ovocytes, appelée "pseudomaturation" peut, en effet, reproduire cet aspect en l'absence même de toute formation d'un fuseau méiotique (STEINERT *et al.*, 1974). Dans ces conditions, les contrôles cytologiques s'avèrent particulièrement nécessaires. Cependant, il existe une autre technique rapide et sûre qui permet de conclure au succès de la maturation. Cette technique, que nous avons systématiquement utilisée, consiste à stimuler l'ovocyte par un courant (80 V, 200 ms) appliqué entre deux électrodes Ag.AgCl. Ce traitement provoque l'activation des oeufs maturés (émission du deuxième globule polaire, apparition du croissant gris, pseudo-segmentation). Chez *Xenopus*, on observe, en outre, l'élévation de la membrane de fécondation, phénomène qui ne s'observe pas chez les Urodèles qui sont dépourvus de granules corticaux et ne présentent pas de réaction corticale.

2.2. METHODES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

2.2.1. Mesure des potentiels

Le potentiel de membrane est mesuré entre une électrode de référence AgAgCl, et une micropipette remplie de KCl 3 M, dont la résistance est comprise entre 15 et 40 M Ω .

Un amplificateur WPI M707, possédant une impédance d'entrée de $10^{12}\Omega$, et un courant de fuite < 5 pA, permet la liaison entre la microélectrode et les systèmes d'enregistrement (oscilloscope, enregistreur Servotrace Sefram ou Gould).

La pénétration de la microélectrode est facilitée lorsque nous faisons varier la compensation de capacité dans le circuit de "feed back" de l'amplificateur.

2.2.2. Mesure des différents paramètres membranaires

La mesure des différents paramètres membranaires peut se faire :
 , en imposant un courant I à travers la membrane dans des conditions

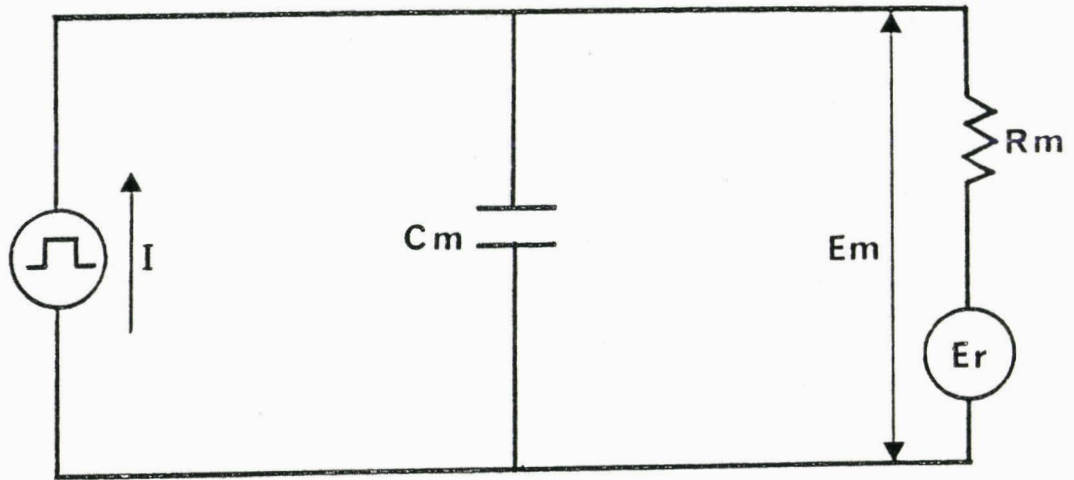


Figure 2 : Principe de la mesure en courant imposé (current clamp).

E_r : potentiel de repos ; R_m : résistance membranaire ;
 C_m : Capacité membranaire ; E_m : potentiel de membrane ;
 I : Courant constant.

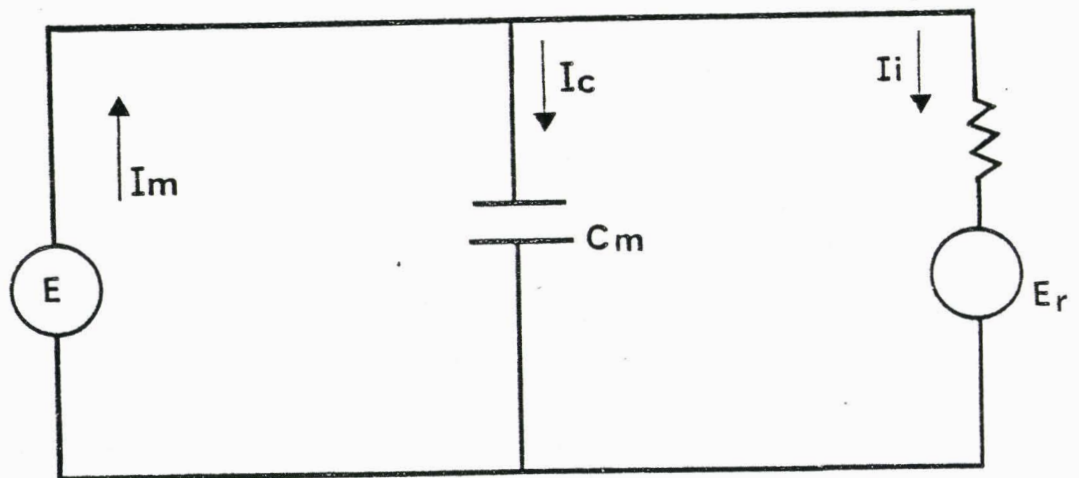


Figure 3 : Principe de la mesure en potentiel imposé (voltage-clamp).

I_m : courant membranaire total ;
 I_c : courant capacitif ;
 I_i : courant ionique
 E : potentiel imposé ;
 E_r : potentiel de repos.



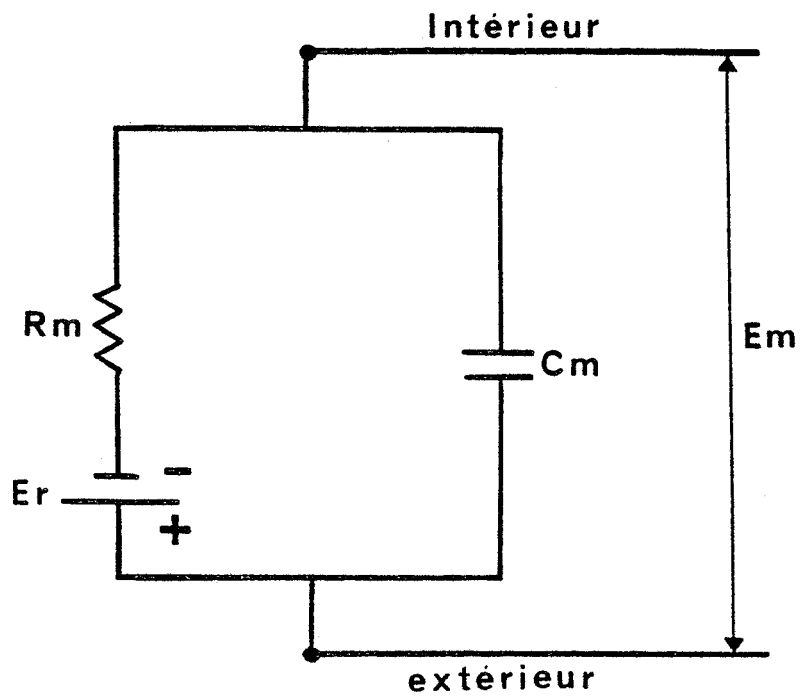


Figure 4 : Schéma électrique simplifié de la membrane plasmique.

R_m : Résistance membranaire

C_m : Capacité membranaire

E_r : fem due aux ions

E_m : potentiel de membrane

de densité de courant uniforme et en mesurant la d.d.p. aux bornes de la membrane. Le schéma de principe est représenté sur la fig. 2. Cette mesure s'appelle mesure en courant imposé (current clamp).

. en imposant un potentiel constant E aux bornes de la membrane et en enregistrant le courant I_m correspondant. La fig. 3 représente le schéma de principe. C'est la mesure en potentiel imposé (voltage clamp).

2.2.2.1. Mesures en courant imposé

Il est facile d'utiliser des modèles physiques pour décrire les propriétés membranaires des cellules. En général, une cellule se comporte (en partie tout au moins) comme un circuit RC, lorsqu'on la soumet à un courant I (Fig. 4).

Si un courant $I(t)$ est appliqué au circuit de la fig. 2, il va se partager en deux composantes I_r dans la résistance, I_c dans la capacité.

$$I(t) = I_r + I_c$$

la loi d'Ohm nous permet d'écrire

$$I_r = \frac{1}{R_m} (E_m - E_r) \quad (1)$$

la charge de la capacité est donnée par

$$q = C_m E_m \quad (2)$$

soit en fonction du temps

$$\frac{dq}{dt} = \frac{d}{dt} (C_m E_m) \quad (3)$$

$\frac{dq}{dt}$ correspond à une quantité d'électricité par unité de temps, c'est la définition d'un courant.

$$\frac{dq}{dt} = I_c = C_m \frac{d E_m}{dt} \quad (4)$$

en combinant (1) et (3), nous pouvons calculer $I(t)$:

$$I(t) = \frac{1}{R_m} (E_m - E_r) + C_m \frac{d E_m}{dt} \quad (5)$$

Le courant de stimulation est nul au temps $t = 0$ et possède une amplitude constante jusqu'à la fin de l'impulsion. L'équation (5) se simplifie donc de la manière suivante :



$$E_m - E_r = i R_m (1 - e^{-t/R_m C_m})$$

si nous posons $\tau = R_m C_m$

$$E_m - E_r = i R_m (1 - e^{-t/\tau})$$

$E_m - E_r$ représente le déplacement du potentiel lors d'une stimulation, et la valeur finale de cette dépolarisation est $i R_m$. La constante de temps détermine la vitesse de variation de E_m après le stimulus. Par exemple lorsque $t = \tau$

$$E_m - E_r = i R_m (1 - e^{-1}) = 0,632 i R_m$$

A la fin de l'impulsion l'équation de la phase descendante de la variation de potentiel sera :

$$E_m - E_r = i R_m e^{-t/\tau}$$

2.2.2.1.1. Application

La méthode classique pour mesurer la résistance d'une cellule consiste à appliquer un courant i de valeur déterminée pendant un temps suffisamment long pour que le changement de potentiel ait atteint son maximum.

Dans ces conditions R_m peut être déduit de l'équation :

$$R_m = \frac{E_m - E_r}{i}$$

et la constante de temps est mesurée par le temps Δt mis par $E_m - E_r$ pour atteindre 63 % de $i R_m$. La capacité est déduite de la mesure τ/R_m .

2.2.2.1.2. Système à plusieurs constantes de temps

Une méthode simple de détermination consiste à utiliser une représentation graphique à partir de l'équation

$$E_m - E_r = i R_m (1 - e^{-t/\Sigma RC})$$

posons

$$\left. \begin{aligned} E_m - E_r &= \Delta E \\ i R_m &= V_{\max} \end{aligned} \right\} \Delta E = V_{\max} (1 - e^{-t/\Sigma RC})$$

$$\frac{\Delta E - V_{\max}}{V_{\max}} = -e^{-t/\Sigma RC} \quad \text{ou} \quad \text{Log} \left(1 - \frac{\Delta E}{V_{\max}} \right) = -\frac{t}{\Sigma RC}$$

Cette dernière équation est celle d'un ensemble de vecteurs ayant pour coefficient directeur :

$$-\frac{1}{R_1 C_1} ; -\frac{1}{R_2 C_2} ; -\frac{1}{R_n C_n}$$

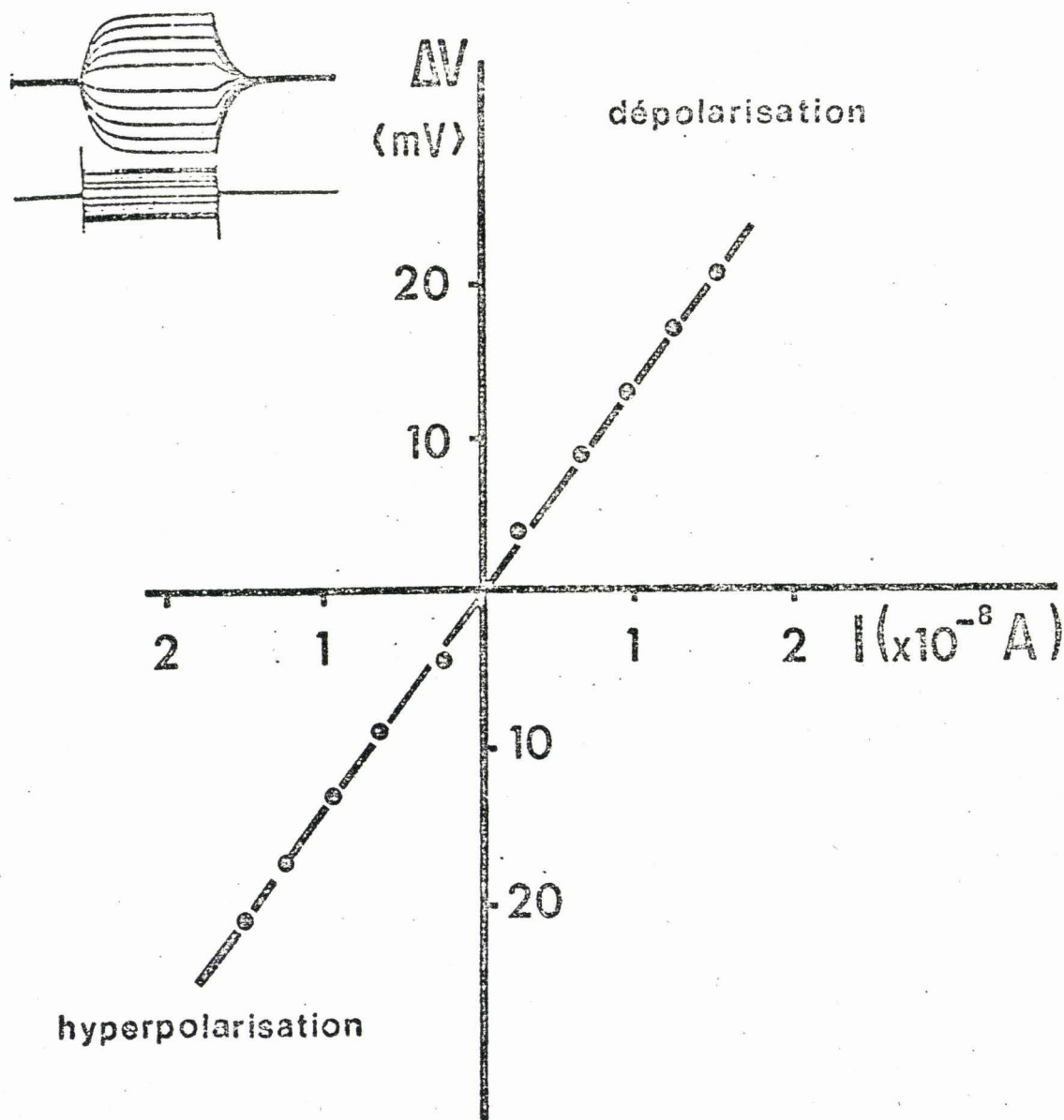


Figure 5 : Relation voltage-courant d'un oeuf fécondé insegmenté de Pleurodèle.

Les tracés en haut à gauche représentent les variations de potentiel obtenues lors de l'application de différents échelons de courant à travers la membrane cellulaire.

Sur le graphique, les variations de potentiel (ΔV) sont portées en ordonnée et les courants (I) en abscisse.

La pente des vecteurs sera l'inverse des constantes de temps du système.

2.2.2.1.3. Relation voltage-courant

Un modèle physique n'est qu'une première approximation de la membrane au repos, car R_m n'est pas constant, mais varie avec le potentiel de membrane. Cette propriété est appelée rectification. Le tracé de la fig. 5 est construit en portant le courant appliqué à la cellule en abscisse et les variations de potentiel en ordonnée.

$$R_m \text{ peut être déduit : } \frac{E_m - E_r}{i} = \frac{\Delta E}{i}$$

Pour des dépolarisations supérieures ou inférieures à "n" mV, nous voyons que $\Delta E/i$ varie. En première approximation, nous calculerons donc R_m au voisinage du potentiel de repos ou R_m ne semble pas varier.

La plupart des cellules excitables présentent des rectifications dans certaines régions de potentiel. Par exemple, pour l'axone de calmar R_m est constant et grand en hyperpolarisation, alors que pour des stimuli dépolarisants R_m est petit (HODGKIN *et al.*, 1952). Ceci est dû à une augmentation de la conductance potassique en dépolarisation.

Au contraire, dans le muscle squelettique, la R_m augmente en dépolarisation (ADRIAN et FREYGANG, 1962). Cette propriété est appelée rectification anormale. On l'observe aussi sur la fibre cardiaque (NOBLE, 1965). Dans ces modèles, c'est la conductance potassique qui augmente en hyperpolarisation.

2.2.2.1.4. Réalisation pratique des mesures en courant imposé

Dans les expériences de courant imposé, nous avons utilisé deux pipettes remplies de KCl, une pour la mesure de la variation de potentiel, l'autre pour l'injection du courant. La résistance de ces électrodes est de 20-40 M Ω . L'ovocyte est considéré comme une sphère et les électrodes forment entre elles un angle de 60°, afin d'obtenir une uniformité spatiale de la distribution du courant (EISENBERG et ENGEL, 1970). Les stimulations sont délivrées par un générateur de créneaux Tektronix TM 500, le courant étant maintenu constant dans le circuit de stimulation grâce à une résistance de forte valeur (200 à 500 M Ω). La valeur du courant imposé est lue aux bornes d'une résistance de 100 k Ω (Fig. 6).

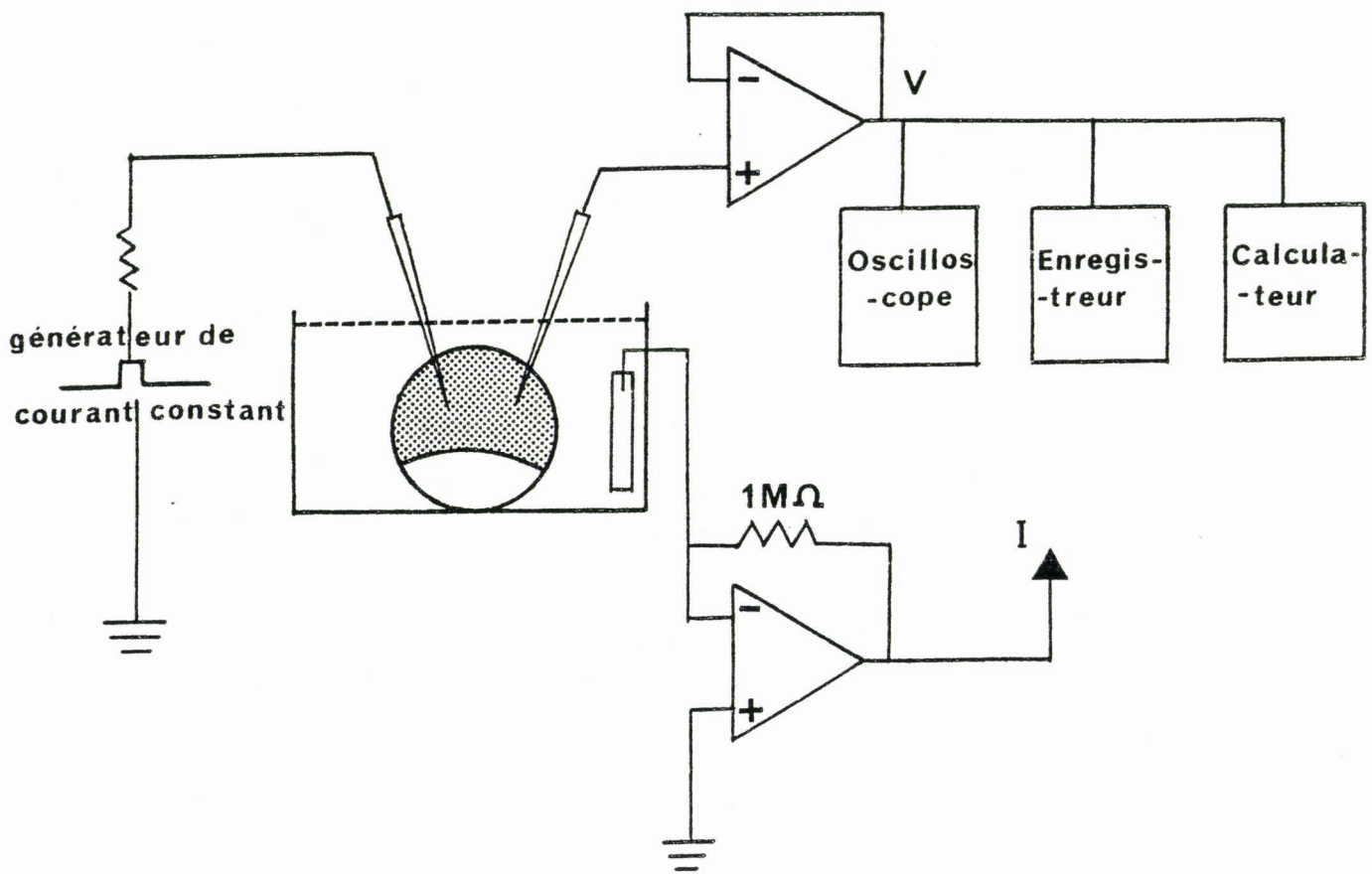


Figure 6 : Schéma global du montage électrique utilisé pour les mesures des paramètres membranaires, des ovocytes d'Amphibien, en courant imposé.

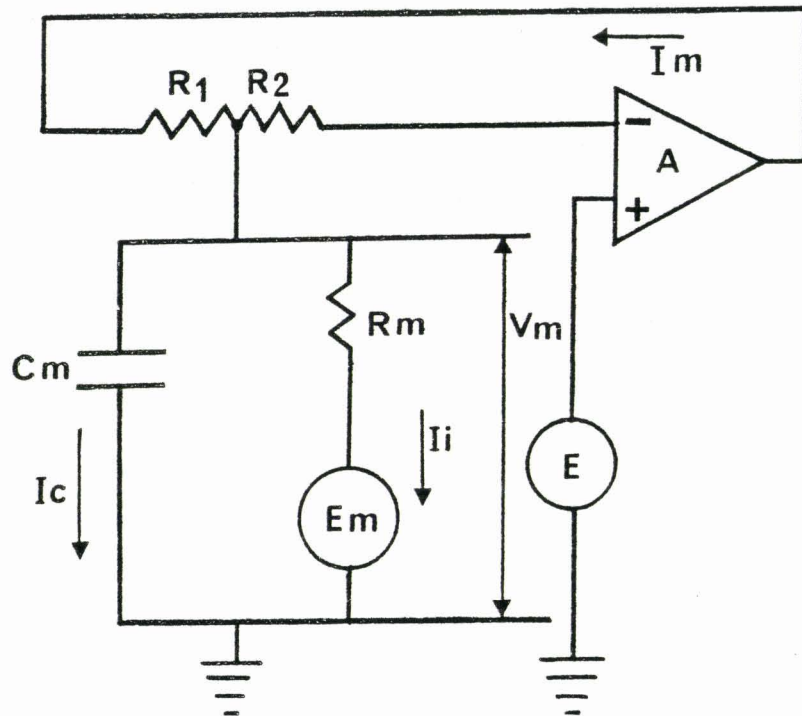


Figure 7 : Principe de l'asservissement électronique permettant d'imposer un potentiel de part et d'autre de la membrane.

- R_1 : résistance de la microélectrode de courant
- R_2 : résistance de la microélectrode de potentiel
- A : amplificateur opérationnel à grand gain
- R_m : résistance membranaire
- C_m : capacité membranaire
- E_m : fem due aux ions
- E : potentiel imposé
- V_m : potentiel de membrane
- I_c : courant capacitif
- I_i : courant ionique
- I_m : courant membranaire

2.2.2.2. Potentiel imposé

Cette méthode est incontestablement supérieure à celle du courant imposé, car elle permet de s'affranchir du courant dû à la capacité C_m et du potentiel d'action observé dans les cellules excitables. Sur la fig. 3, E est un générateur de tension constante de résistance interne nulle et de f.e.m. E

I_m = courant membranaire global

I_c = courant capacitif dû à C_m

I_i = courant ionique global

$$I_m = I_c + I_i = C_m \frac{dE}{dt} + I_i .$$

Si E est constant, $\frac{dE}{dt} = 0$, d'où $I_c = 0$ et $I_m = I_i$.

2.2.2.2.1. Asservissement du potentiel

La résistance interne d'un générateur n'est jamais nulle. En effet, le potentiel délivré par la microélectrode a une impédance de 10 à 100 M Ω selon les expériences.

COLE (1949) et MARMONT (1948) ont pensé utiliser un principe d'asservissement en contre réaction (Fig. 7).

A est un amplificateur différentiel de gain A, sa tension de sortie U_s est appliquée à la microélectrode R_1 . Le générateur de tension E est connecté à l'entrée positive A, et l'entrée négative A à la microélectrode R_2 .

Ce montage va donc permettre de comparer V_m à la tension de référence E délivrée par le générateur.

Si V_m est le potentiel de membrane, on peut écrire, dans la mesure où les impédances d'entrée de A sont grandes vis-à-vis de R_2 et de la résistance interne du générateur E :

$$U_s = A (E - V_m)$$

Or, on sait que $U_s = I_m R_1 + V_m$

$$\text{d'où } V_m = \frac{A E}{A + 1} - \frac{R_1 I_m}{A + 1}$$

Dans ces conditions, on applique aux bornes de la membrane une f.e.m. $\frac{A E}{A + 1}$ de résistance interne $\frac{R_1}{A + 1}$

Si A est très grand (souvent de l'ordre de 20 000 à 300 000) le rapport $\frac{R_1}{A + 1}$ devient petit donc négligeable par rapport à R_m et $\frac{A E}{A + 1}$ est $\approx E$.

Grâce à ce montage en contre réaction (feed-back), on s'approche du cas idéal proposé sur la fig. 3. Il convient seulement d'utiliser un amplificateur à grand gain.

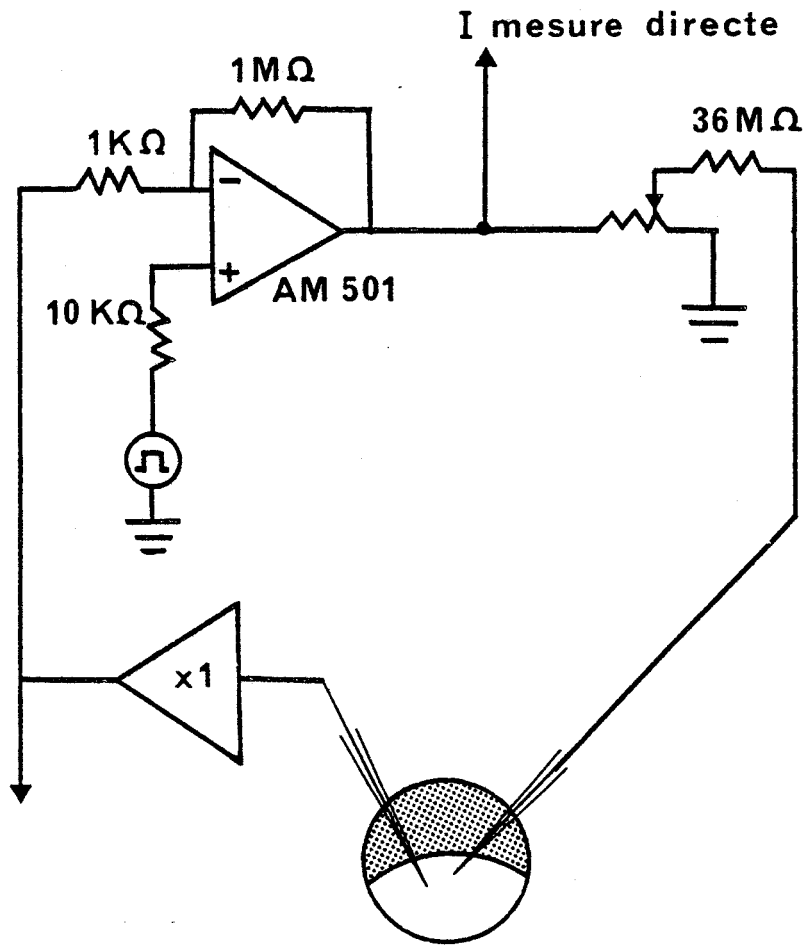


Figure 8 : Schéma global du montage électrique utilisé pour les mesures en potentiel imposé (voltage-clamp) dans l'ovocyte d'Amphibien.

2.2.2.2.2. Réalisation pratique

Deux électrodes sont nécessaires pour imposer un potentiel. L'angle de 60° entre les deux électrodes utilisé lors des expériences de courant imposé est conservé lors des mesures faites en potentiel imposé.

Dans les oeufs d'amphibiens, la vitesse d'établissement du potentiel est lente en raison de la capacité de la cellule et de la faible résistance de la membrane. Dans ces conditions, pour pouvoir "clamber" de manière satisfaisante l'ovocyte, nous devons utiliser un amplificateur permettant des réponses rapides en sortie lors d'une variation de tension à l'entrée de même qu'une grande excursion de tension en sortie (ici ± 80 V). Nous avons utilisé deux types d'amplificateurs AM 501 de Tektronix, ou 1020 de Teledyne Philbrick). Ces amplificateurs permettent de passer de - 50 mV à + 100 mV en 50 millisecondes.

Les variations de courant sont lues aux bornes d'un convertisseur courant tension, après inversion du signal, ou aux bornes d'une résistance de 100 k Ω (Fig. 8).

2.2.3. Electrodes spécifiques et mesure des activités ioniques intracellulaires.

Les électrodes spécifiques K^+ ou Ca^{++} sont à membrane liquide. L'échangeur d'ions est du type 477 317 de Corning, et l'ionophore Ca^{++} nous a été fourni par le professeur W.SIMONS (Zurich). Il est composé du mélange suivant : 10 % de ligand neutre : N,N'-di (11-éthoxycarbonyl) undecyl - N, N', 4,5-tetraméthyl - 3,6 -dioxoactane-1, 8-dioamide (ETH 1001) et 1 % de sodium tetraphényl borate ($NaBH_4$) dans du (0-nitrophényl) octylether (O-NPOE) utilisé comme solvant (OEHME *et al.*, 1976).

2.2.3.1. Fabrication des électrodes

La méthode utilisée dérive de celle proposée par WALKER (1971). L'échangeur d'ion est dissous dans un solvant non miscible à l'eau. En général, la surface du verre est hydrophile et l'eau risquerait de s'accumuler et de déplacer le solvant de l'échangeur d'ion. Pour pallier cet inconvénient on rend le verre hydrophobe en traitant, au préalable, la pointe de l'électrode à l'aide d'un composé siliconé (tri-n butylchlorosilane).

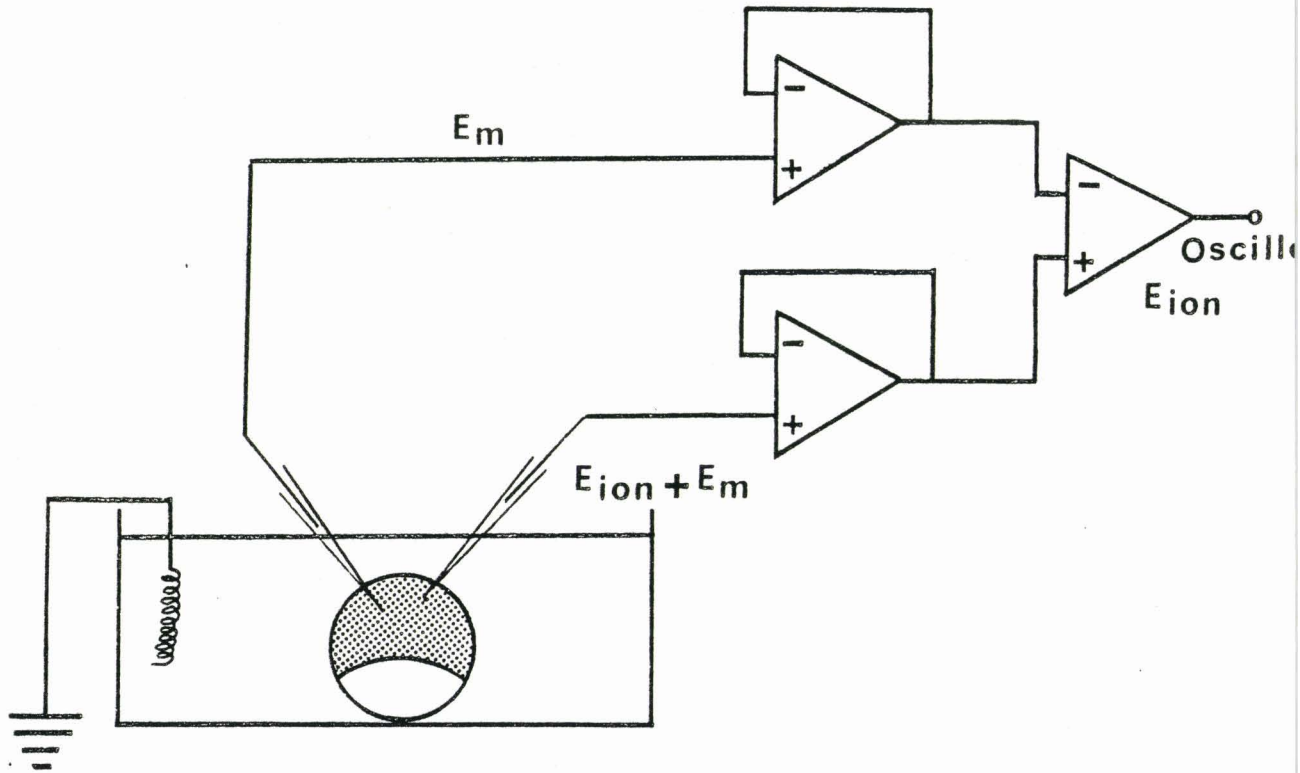


Figure 9 : Montage électronique permettant la mesure de l'activité ionique intracellulaire.

- E_m : mesure du potentiel de membrane
- $E_{ion} + E_m$: mesure du potentiel dû à l'activité ionique et du potentiel de membrane.

Pour la fabrication des microélectrodes spécifiques, nous utilisons du verre borosilicaté (Ref 6C-150 T de Clark electromedical) possédant un diamètre externe de 1.5 mm et un diamètre interne de 1 mm.

2.2.3.2. Calibration

L'électrode de référence est une microélectrode conventionnelle au KCl 3 M. Le potentiel délivré par l'électrode spécifique est mesuré à l'aide d'un électromètre Analog Device 311 J monté en gain unitaire. Cet électromètre possède un courant d'entrée $< 10^{-14}$ A, et une impédance de $10^{14}\Omega$. Les variations de potentiel sont enregistrées à l'aide d'un amplificateur différentiel, et visualisées sur enregistreur SEFRAM type Servotrace. La calibration se fait pour des concentrations ioniques croissantes et décroissantes.

2.2.3.3. Mesure de l'activité ionique intracellulaire

La mesure précise des activités ioniques intracellulaires dépend de la précision de la mesure du potentiel de membrane. L'électrode spécifique enregistre les variations de potentiel dues au changement de l'activité ionique et au potentiel de membrane. Le calcul de l'activité ionique intracellulaire implique la mesure séparée de E_m pour pouvoir soustraire cette valeur du potentiel délivrée par l'électrode spécifique.

Cette opération se fait à l'aide d'un amplificateur opérationnel monté en soustracteur. Le montage est représenté fig. 9.

2.2.4. Mesures du (Ca^{++}) libre par l'Aequorine - Propriétés de l'Aequorine.

La photoprotéine aequorine, extraite de la méduse *Aequorea aequorea* émet de la lumière à 470 nm en présence de Ca^{++} , sans apport extérieur d'énergie. La réaction est spécifique et très sensible. Le processus est stoechiométrique et il faut 2 Ca^{++} / micromolécule d'aequorine (SHIMOMURA, et JOHNSON, 1979).

Le dosage du Ca^{++} se borne à une mesure d'intensité de lumière puisque la lumière émise est directement proportionnelle à la concentration de Ca^{++} . La mise en oeuvre de cette technique implique les opérations suivantes :

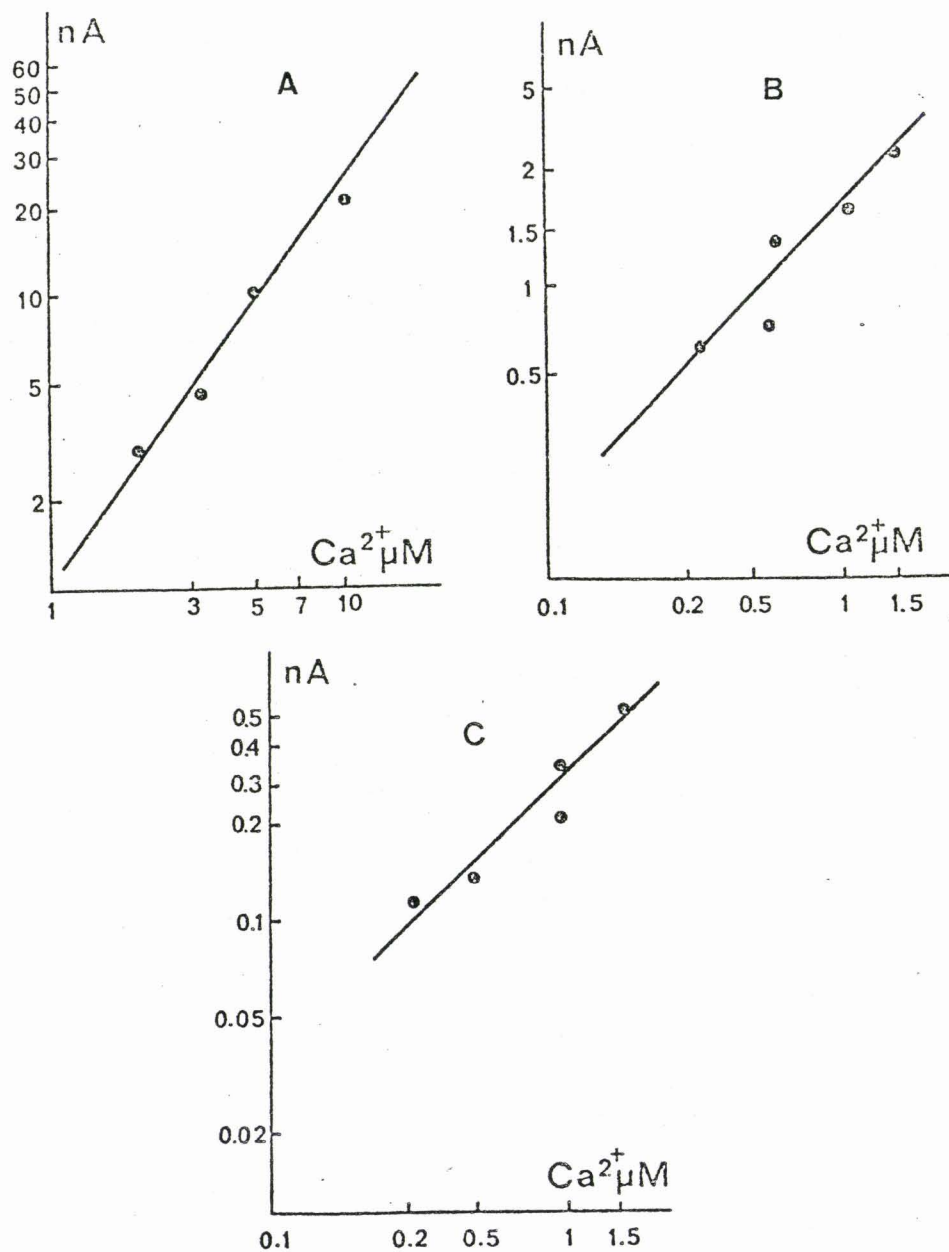


Figure 10 : Mesure de la lumière émise par la réaction Ca^{2+} aequorine.

A - Calibration de la solution d'aequorine.

B - Injection d'aequorine dans une goutte de tampon Ca^{2+} EGTA d'un volume voisin de celui d'un ovocyte de *Xenopus* (1 μl).

C - Lumière émise par un ovocyte sous l'action d'une iontophorèse calcique.



2.2.4.1. Microinjection intracellulaire

Le poids moléculaire de l'aequorine est de 20 000 daltons, et la microinjection est la seule méthode qui permette, à ce jour, d'introduire l'aequorine dans les cellules.

La technique d'injection utilisée dans ce travail consiste à appliquer un gaz comprimé à une micropipette contenant une petite quantité d'aequorine à la pointe.

2.2.4.2. Préparation de l'aequorine

La préparation demande quelques soins afin d'éviter la contamination par le calcium (MOREAU, 1981 Thèse d'Etat). Nous avons utilisé l'aequorine SIGMA (St Louis Missouri) type III A 4140 en tube de 10 mg. Le fabricant conditionne l'aequorine précipitée dans du sulfate d'ammonium et protégée par 10 mM d'EDTA. L'utilisation de l'aequorine nécessite un désalage sur colonne Sephadex G 25 fine. La composition du tampon d'élution a été fixée empiriquement par ASHLEY et RIDGWAY (1968). Il est composé de 20 mM d'acétate de Na et 1 μ M d'EDTA pH 6.2

2.2.4.3. Calibration

Nous avons utilisé une méthode dérivée de celle décrite par KUSANO *et al.* (1975) et STEINHARDT *et al.* (1977). La calibration consiste à délivrer par iontophorèse du Ca^{++} ($I = 0.2 \mu\text{A}$, CaCl_2 1 M). Nous admettons, avec KUSANO *et al.* (1975), que le nombre de transport de la pipette est 0.2. Les résultats obtenus sont consignés sur la fig. 10. Si l'on compare les valeurs fournies par l'injection d'aequorine dans une goutte de tampon de volume égal à celui de l'ovocyte (fig. 10) on note que l'oeuf doit absorber au moins 80 % de la lumière émise.

2.2.4.4. Détection de la lumière

Les quantités de lumière émises par l'aequorine restent faibles et doivent être mesurées avec des détecteurs sensibles. On utilise un photomultiplicateur (PM). Le PM doit posséder une sensibilité réduite dans le rouge afin d'obtenir un courant de noir très faible. Nous avons utilisé

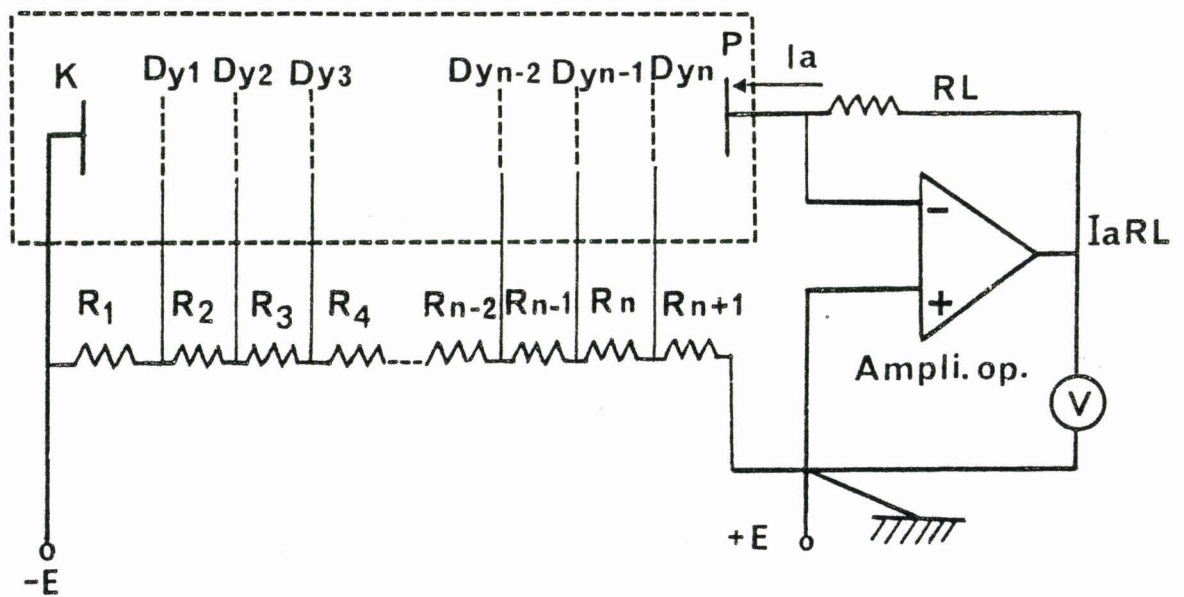


Figure 11 : Schéma de montage d'un photomultiplicateur (P.M) et mesure du courant anodique.

K : Cathode

P : Plaque (Anode)

Dy₁ --- Dyn : Dynode

+E, -E : d.d.p. appliquée au PM

R.L : Résistance de contre réaction

-Le courant I_a est proportionnel à la d.d.p V ; $I_a = \frac{V}{RL}$



plusieurs types de PM à fenêtre frontale (EMI 9635 QB ou Hamatsu R374), ou à fenêtre latérale EMI 9781 B. Les cathodes des PM à fenêtres frontales étaient portées à - 1100 V, et la cathode du PM à fenêtre latérale à -950 V.

Le courant anodique induit par la réaction lumineuse est mesuré par un amplificateur opérationnel monté en convertisseur courant tension, muni d'un filtre ayant une constante de temps variant de 10 à 200 ns fig. 11.

CHAPITRE 3

RESULTATS

CHAPITRE 3

RESULTATS

3.1. CARACTERISTIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DE L'OVOCYTE NON STIMULE

3.1.1. Potentiel de membrane (E_m)

La littérature rend compte d'un certain nombre de désaccords entre les auteurs en ce qui concerne la valeur du potentiel de membrane des ovocytes.

Deux idées doivent essentiellement être retenues :

- Le potentiel de membrane est toujours enregistré avec des techniques traumatisantes pour la membrane (microélectrodes).
- Le potentiel de membrane dépend largement de la composition ionique du milieu externe.

HAGIWARA et JAFFE (1979) soulignent que si le milieu externe des oeufs marins est simple à définir, il en va tout autrement pour d'autres organismes tels que les Insectes, les Mammifères et les Amphibiens.

Le potentiel de membrane des ovocytes des Amphibiens Anoures reste aussi un sujet de controverse. ZIEGLER et MORRIL (1977) rapportent que les valeurs du potentiel de membrane des ovocytes dénudés et des follicules entiers de *Rana* sont respectivement de -77 ± 2 mV et -36 ± 2 mV. WALLACE et STEINHARD (1977) trouvent des résultats semblables chez *Xenopus* où la valeur du potentiel des follicules entiers est en moyenne de -27 ± 2 mV, celle des ovocytes défoliculés de -65 ± 2 mV.

Ces derniers auteurs précisent que l'augmentation de la valeur du potentiel de membrane qui suit la défoliculation serait consécutive à l'activation d'un processus électrogène de transport dépendant du Na^+ et du K^+ . Une étude plus récente de KUSANO et al. (1982) fait état d'une différence significative entre la valeur du potentiel de membrane des ovocytes de *Xenopus* en provenance de Chicago ($E_m = -51,8 \pm 14,6$ mV) et

celle des ovocytes de *Xenopus* en provenance de Londres ($E_m = -42 \pm 10,9$ mV). Curieusement, lorsque les ovocytes sont défolliculés à l'aide d'un traitement à la collagénase, la valeur de E_m chute à une valeur identique moins négative pour ces deux catégories d'ovocytes.

Chez les Urodèles, la pénétration de la microélectrode dans un follicule entier s'accompagne d'une première variation de potentiel de -10 à -15 mV correspondant, selon KANNO et LOEWENSTEIN (1963), à l'insertion de l'électrode dans l'espace situé entre les cellules folliculaires et la membrane plasmique de l'ovocyte. Une brusque chute du potentiel survient ensuite et se stabilise entre -30 et -70 mV chez le Pleurodèle. (Publication n°1) et -40 et -80 mV chez l'Axolotl.

Nous avons constaté que les follicules isolés de l'ovaire, qu'ils soient conservés entiers ou aussitôt défolliculés présentent des valeurs de potentiel faibles et très dispersées mais qui augmentent progressivement dès la première heure d'incubation dans le milieu physiologique de référence.

Par contre, lorsque des follicules sont isolés et équilibrés dans le milieu extracellulaire pendant toute une nuit à 14-16°C, la valeur moyenne de leur potentiel, mesurée à la température du laboratoire (18-20°C) se révèle d'emblée plus fortement négative et identique à celle d'ovocytes dénudés et testés dans les mêmes conditions. Ainsi, pour une même femelle de Pleurodèle, E_m se situe à $-62,8 \pm 7$ mV ($n = 75$) pour des follicules entiers et à $-61,6 \pm 10,5$ mV ($n = 18$) pour des ovocytes dénudés.

Dans ces conditions, la présence de l'épithélium folliculaire n'exercerait aucune incidence sur la valeur du potentiel de membrane et ne perturberait pas les échanges ioniques entre le milieu intraovocytaire et le milieu externe.

Pour la suite de nos expériences, des follicules entiers ont donc été équilibrés dans le milieu physiologique pendant toute une nuit à 14, 16°C afin de standardiser nos conditions expérimentales. Toutes les expérimentations ultérieures sont réalisées à la température du laboratoire (18° - 20°C).

3.1.2. Bases ioniques du potentiel de membrane

Chez les Anoures, des expériences de substitution du potassium réalisées sur des ovocytes de type hyperpolarisé montrent que la diminution de la concentration externe en K^+ se traduit paradoxalement par une dépolarisation, tandis qu'une augmentation des ions K^+ égale à vingt fois la concentration initiale entraîne une dépolarisation biphasique (WALLACE et STEINHARDT, 1977). Ces résultats, conjugués avec l'action d'inhibiteur (ouabaïne), semblent indiquer que le potentiel de repos des ovocytes de *Xenopus* dépend plus largement d'un transport actif de Na^+-K^+ que de la perméabilité passive aux ions K^+ . Chez *Rana pipiens* (TUPPER et MALOFF, 1978 ; ZIEGLER et MORRILL, 1977) et chez *Xenopus laevis* (WALLACE et STEINHARDT, 1977) la membrane des ovocytes se dépolarise lorsqu'on augmente le K^+ du milieu externe, et les valeurs observées permettent d'estimer que la concentration interne des ions K^+ est de l'ordre de 200 mM. Cette évaluation diffère sensiblement des valeurs enregistrées par absorption atomique et qui indiquent une concentration de l'ordre de 110 mM (ZIEGLER et MORRILL, 1977). L'activité ionique intraovocytaire des ions K^+ (aK_i) est très voisine de la concentration intracellulaire de K^+ $[K^+]_i$ quelles que soient les espèces étudiées (Tableau I). Par contre, l'activité sodique intracellulaire (aNa_i) apparaît beaucoup plus faible que la concentration intracellulaire de Na^+ $[Na^+]_i$. Ces résultats permettent d'affirmer que les ions K^+ intracellulaires sont libres alors qu'une grande partie du sodium interne est à l'état combiné dans le cytoplasme ovocytaire. Pour TUPPER et MALOFF (1973), le Na^+ contribuerait, cependant, à la dépolarisation de la membrane ovocytaire. L'analyse des flux par traceurs radioactifs démontre une constante perméabilité au Na^+ aussi bien dans le cas des ovocytes de *Rana* (MORRILL et al., 1977 b) que dans celui de *Xenopus* (O'CONNOR et al., 1977).

Selon MAENO (1959), la perméabilité sodique des ovocytes de *Bufo* est nulle. En revanche, DICK et MAC LAUGHLIN (1969) sur le même matériel et SIGLER et JANACEK (1971) sur *Rana temporaria*, décrivent une faible activité sodique intraovocytaire. En outre, chez *Xenopus*, ROBINSON (1979),

Animaux	$[Na^+]_i$	$a Na_i$	$[K^+]_i$	$a K_i$	Références
<i>Bufo bufo</i>	25,8	9,3	113	82	DICK et Mc LAUGHLIN 1969
	66,7 - 115	-	14,2 - 86,4	-	CANNON et al. 1974
<i>Rana pipiens</i>	59,1	-	93,8	-	CENTURY et al. 1970
	180 - 190	-	28 - 29	-	CANNON et al. 1974
	90 ± 4	44 ± 2,4	117 ± 3	80 ± 3,7	MORRILL et al. 1977
	73 - 77	6 ± 1	93 - 104	120 ± 3	PALMER et al. 1978
	94 ± 4	-	102 ± 2	-	MORRILL et ZIEGLER 1980
(Salamandres)					
<i>Eurycea b. bislineata</i>	83,6 ± 4,8	-	91,6 ± 6,7	-	CENTURY et al. 1970
<i>Desmognathus o.</i>	74,3 ± 3,3	-	81,1 ± 2,2	-	CENTURY et al. 1970
<i>Ochrophaeus</i>	75,2 ± 27	16,2	88,6 ± 1,5	99,2	HOROWITZ et al. 1979

Tableau I : Valeurs moyennes des concentrations $[Na^+]_i$ et $[K^+]_i$ et des activités $a Na_i$ et $a K_i$ intracellulaires des ions Na^+ et K^+ dans les ovocytes de plusieurs espèces d'amphibiens. Concentrations et activités sont exprimées en m Eq/l d'eau cellulaire.

utilisant la sonde vibrante mise au point par JAFFE et NUCITELLI (1977), a mesuré des courants primaires externes transportant des ions Cl^- . Selon ZIEGLER et MORRILL (1977) et MORRILL et ZIEGLER (1980), la perméabilité aux ions Cl^- serait encore plus importante dans le cas des ovocytes de *Rana pipiens*.

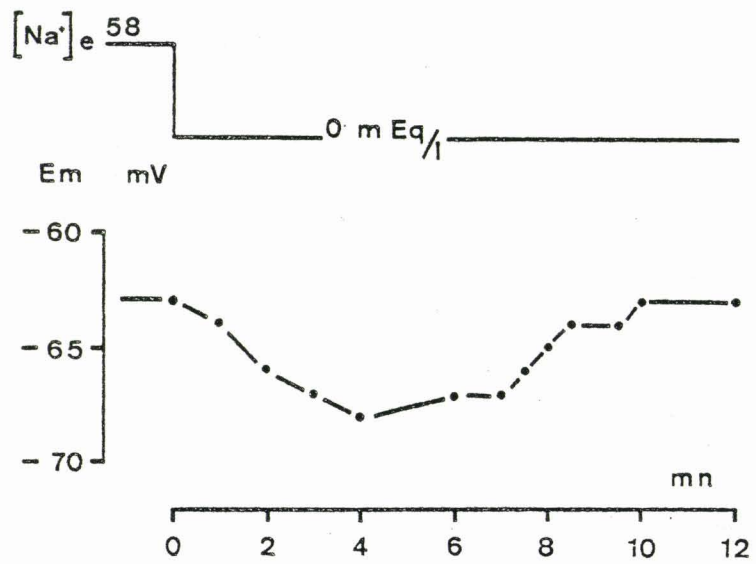


Figure 12 : Evolution du potentiel de membrane (E_m) d'un ovocyte de Pleurodèle au cours du temps dans un milieu $[Na^+]_e = 0$.

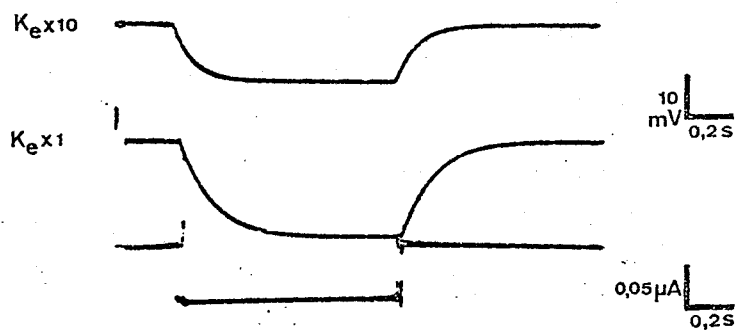
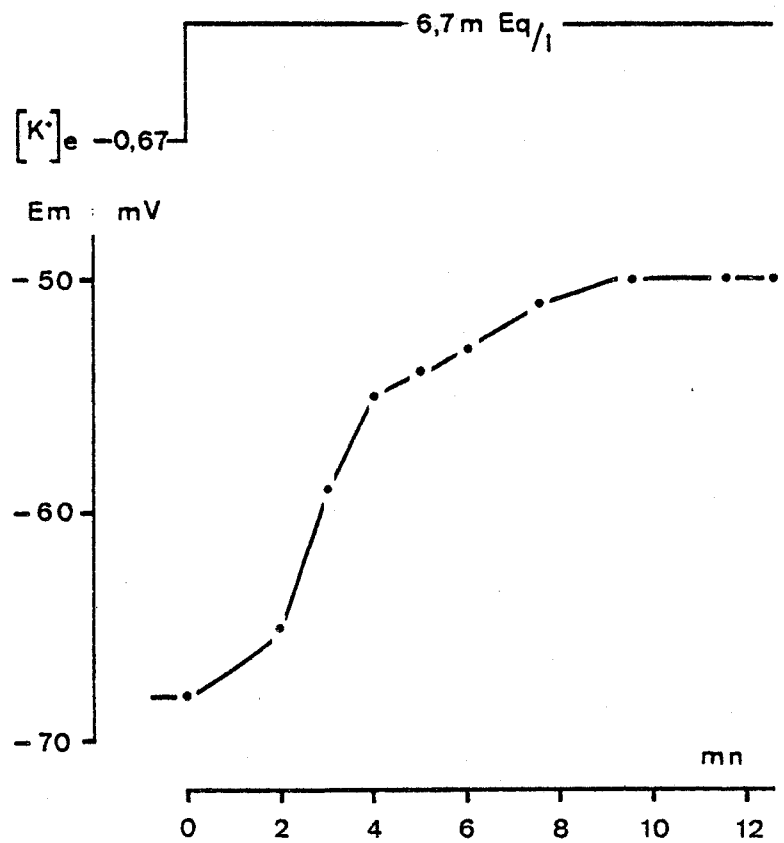


Figure 13 : en haut : Evolution du potentiel de membrane (E_m) d'un ovocyte de Pleurodèle sous l'action d'un milieu hyperpotassique $[K^+] \times 10$.

en bas : Variation du potentiel de membrane sous l'effet d'un courant hyperpolarisant en milieu K^+ normal ($K_e \times 1$) et milieu hyperpotassique ($K_e \times 10$).

La résistance membranaire diminue lorsque la concentration externe des ions K^+ est augmentée.



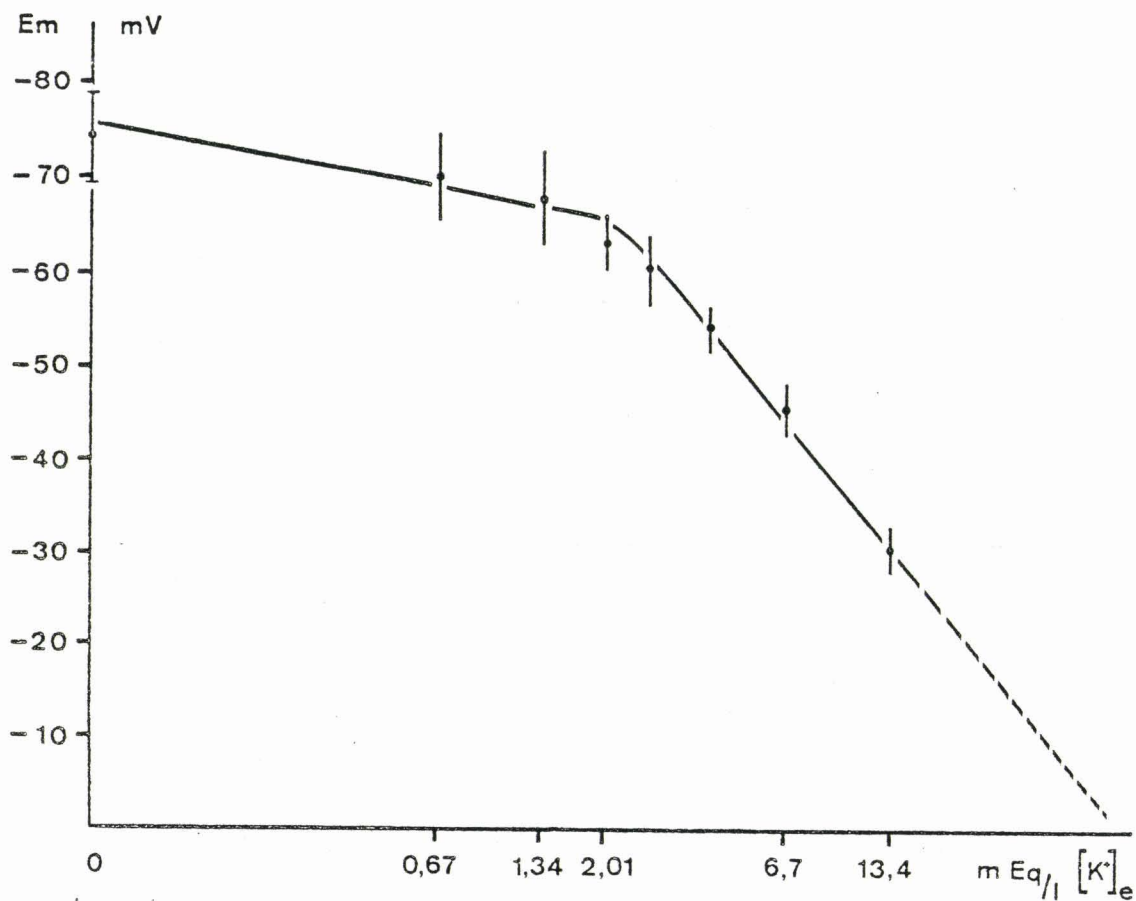


Figure 14 : Variation de E_m (échelle linéaire) des ovocytes de Pleurodèles en fonction de la concentration extracellulaire de potassium $[K^+]_e$ (échelle logarithmique). La pente de la droite comprise entre $[K^+]_e = 2,68$ mEq/l et $[K^+]_e = 26,8$ mEq est de 45 mV.



3.1.2.1. Influence des ions Cl^- sur le potentiel de membrane de *Pleurodeles waltlii*

La valeur de E_m des ovocytes mesurée en milieu de Steinberg normal ($-73,33 \pm 6,20$ mV, $n = 12$) ne change pas significativement lorsque les ions Cl^- sont substitués par les ions propionate ($E_m = -72,50 \pm 5,68$; $n = 12$). Si les ions Cl^- sont distribués passivement selon un équilibre de DONNAN comme cela est la règle au niveau des fibres musculaires (HODGKIN et HOROWICZ 1959 ; HAYS et al. 1968 ; MOUNIER et GUILBAULT, 1970), on doit s'attendre à observer une dépolarisation transitoire lorsque ces anions sont supprimés du milieu externe. Il apparaît donc que les ions Cl^- externes ne participent pas à la genèse du potentiel de membrane des ovocytes de Pleurodèle.

3.1.2.2. Influence des ions Na^+ et K^+

3.1.2.2.1. Ions Na^+

Chez le Pleurodèle, les milieux dépourvus de Na^+ hyperpolarisent la membrane ovocytaire de quelques millivolts ; la membrane se repolarise ensuite jusqu'à sa valeur initiale (fig. 12). En revanche, toute augmentation de la concentration en Na^+ n'entraîne aucune variation significative du potentiel de membrane (Publication n°2).

3.1.2.2.2. Ions K^+

Les effets d'une augmentation de 10 fois de la concentration externe en ions K^+ $[\text{K}^+]_e$ sont illustrés sur la figure 13.

Les milieux enrichis en ions K^+ provoquent des dépolarisations très nettes. En revanche, un milieu dépourvu d'ions K^+ n'entraîne qu'une faible hyperpolarisation. Dans tous les cas ces phénomènes sont réversibles.

La relation $E_m = f(\ln [\text{K}^+]_e)$ est une courbe qui devient linéaire au delà d'une concentration en ions K^+ quatre fois supérieure à la concentration normale du milieu de Steinberg (fig. 14). La pente de la droite est de 45 mV au lieu de 58 mV, valeur calculée à partir de l'équation de NERNST lorsque $[\text{K}^+]_e$ varie d'un facteur 10. Ce dernier résultat confirme que le potentiel de membrane des ovocytes de Pleurodèle ne correspond pas à une pile de concentration aux ions K^+ puisque la contribution des ions Na^+ ainsi que nous l'avons montré précédemment, n'est pas négligeable. En effet, la relation $E_m = f(\ln [\text{K}^+]_e)$ en milieu dépourvu de Na^+ se traduit par une

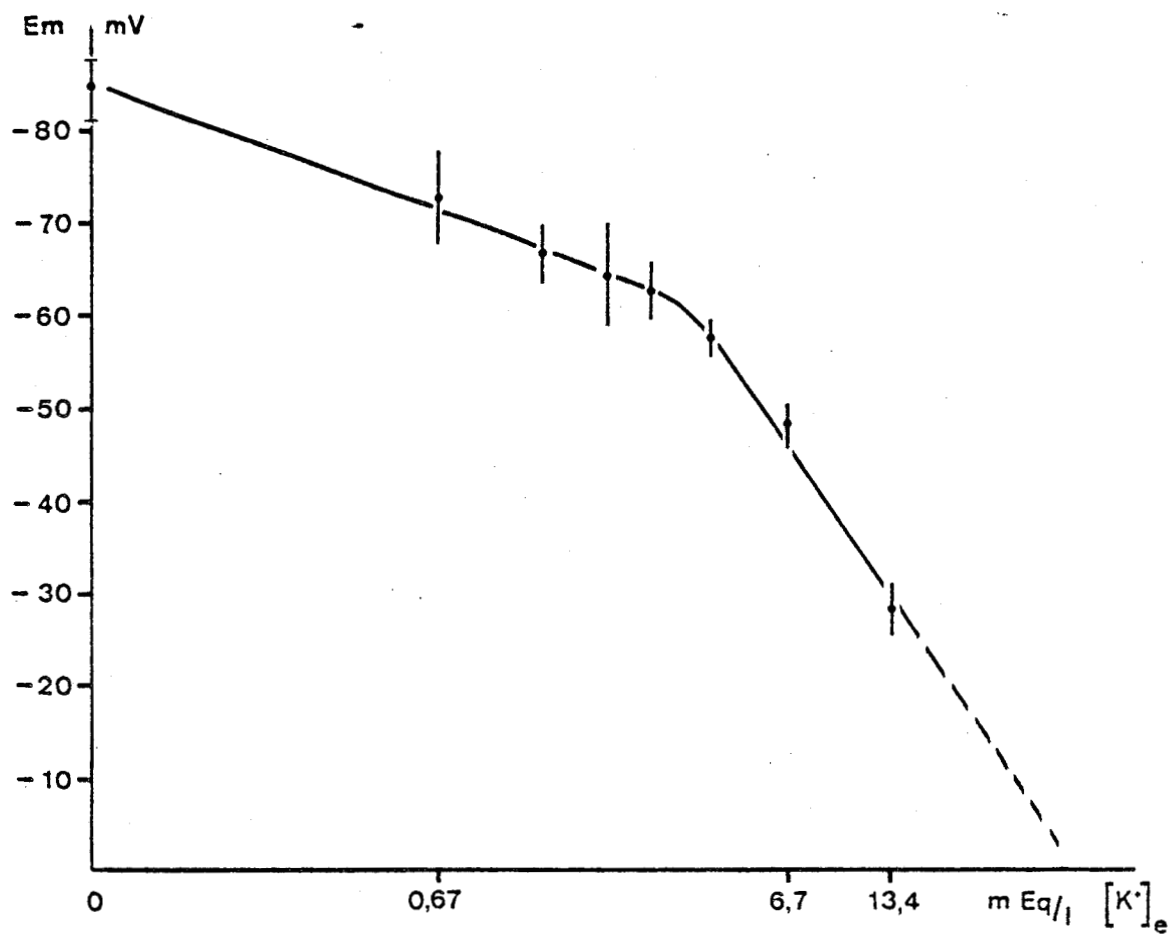


Figure 15 : Variation de E_m des ovocytes de Pleurodèle en fonction de la concentration extracellulaire de potassium $[K^+]_e$ en absence de ions Na^+ $[Na^+]_e = 0$.

La pente de la droite comprise entre $[K^+]_e = 4,02$ mEq/l et $[K^+]_e = 40,2$ mEq/l est de 54 mV.



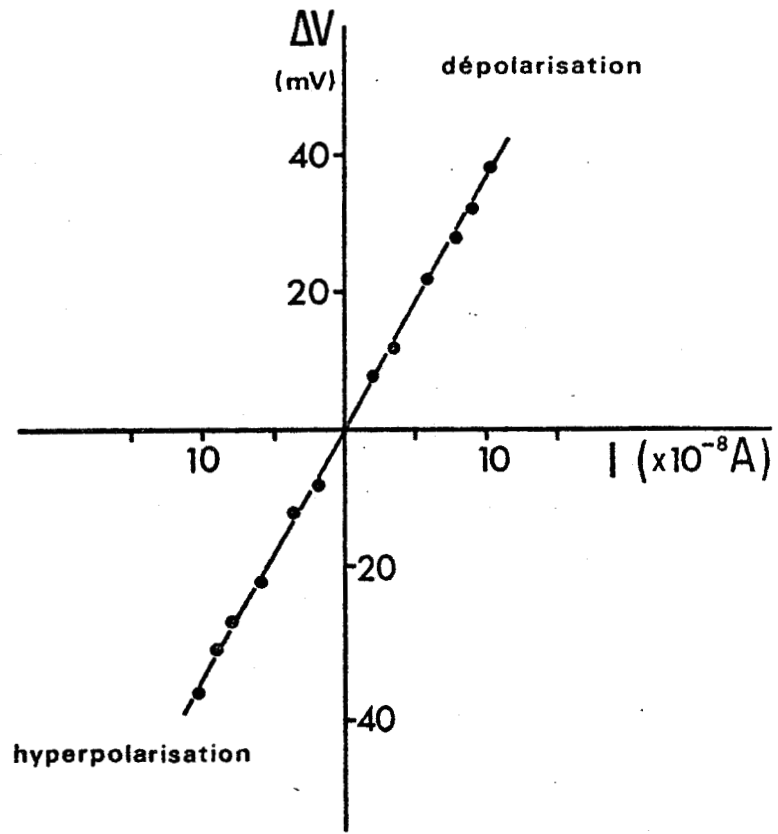
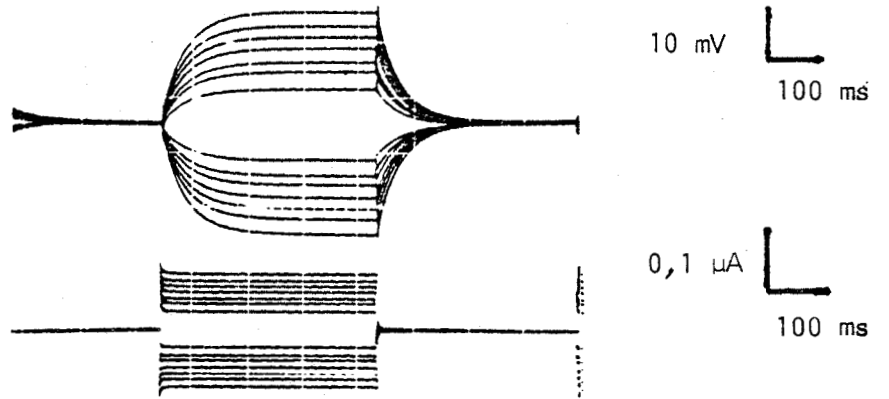


Figure 16 : En haut : Enregistrement de la variation du potentiel de membrane d'un ovocyte de Pleurodèle pendant l'application de courants dépolariants et hyperpolarisants en milieu Steinberg.

En bas : Relation voltage-courant d'un ovocyte de Pleurodèle.

courbe dont la pente, linéaire au delà de $[K^+]_e$ égale à 4,02 mEq/l en milieu Steinberg, est de 55 mV pour une variation de 10 fois $[K^+]_e$ (fig. 15). Les milieux totalement dépourvus d'ions K^+ et Na^+ provoquent d'importantes hyperpolarisations et ceci sans repolarisation. Dans ces conditions, la valeur de E_m est de $-84,5 \pm 3$ mV contre $-74,3 \pm 4,5$ mV en milieu $[Na^+]_e$ normal. Si l'on suppose la valeur de E_m du potentiel de membrane proche de la valeur E_K donnée par la relation :

$$E_K = -58 \log \frac{a K_i}{a K_e}$$

(mV à 20°C)

- E_K = potentiel de la pile aux ions K^+
- $a K_i, a K_e$ = activité respective des ions K^+ intra et extracellulaires

E_m s'annule lorsque $a K_i = a K_e$

L'extrapolation de la droite de la figure 15 permet d'estimer l'activité intra ovocytaire des ions K^+ à : 47 mEq/l

$$\text{d'où } E_K = -99,6 \text{ mV}$$

Le rapport des perméabilités P_{Na} / P_K est estimé à 0,034.

3.1.3. Conductance et capacité membranaires

La figure 16 présente une relation voltage-courant typique obtenue à partir d'un ovocyte, elle se caractérise par l'absence de rectification.

3.1.3.1. Influence des cellules folliculaires

La résistance totale des follicules, mesurée dans nos conditions expérimentales, est la résultante de la résistance de la membrane plasmique ovocytaire en parallèle avec la résistance des cellules folliculaires qui lui sont couplées par l'intermédiaire des jonctions "gap" (Pl. IV). La valeur de ces composantes a été déterminée en utilisant les méthodes de courant imposé et de voltage imposé. L'étude a porté sur des ovocytes folliculés ou non de *Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltlii* et *Ambystoma mexicanum*. La résistance totale a été calculée à partir des courbes voltage courant et les constantes de temps membranaires estimées à partir des formules décrites dans le chapitre "Matériels et Méthodes".

Planche IV : Morphologie des microvillosités et des relations ovocytes-cellules folliculaires.

Figure A : Les microvillosités ovocytaires (mv) sont constituées d'une substance dense où l'on peut distinguer de fins faisceaux fibrillaires et des microtubules (mt) parallèles au grand axe de la microvillosité. (X 42000).

Figure B et C : Ces figures illustrent des jonctions (flèches) entre l'ovocyte (ov) et les cellules folliculaires, par l'intermédiaire des macrovillosités (ma) qui viennent au contact du plasmalemme (pm). (B) X 74000, (C) X 57000.

Les figures A, B et C représentent des coupes d'ovocytes témoins.

Figure D : Jonction (flèches) après 6 heures d'incubation en présence de progestérone (X 56000).





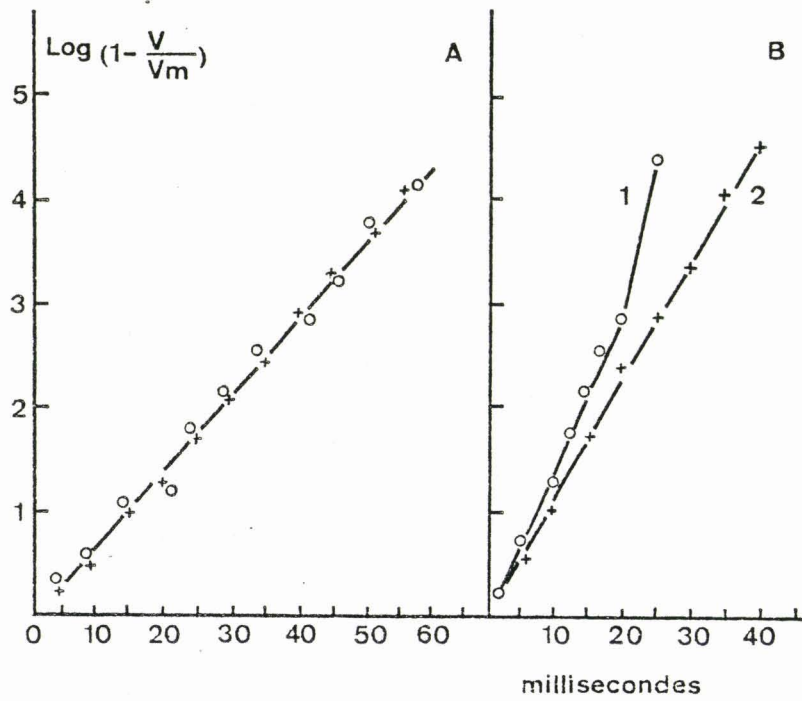


Figure 17 : Mesure en courant imposé des constantes de temps membranaires d'ovocytes d'Ambystoma.

A. Ovocytes défolliculés

B. Ovocytes avec cellules folliculaires

(○-○) courants dépolarisants

(+--+) courants hyperpolarisants

Dans les follicules intacts, on peut mettre en évidence deux constantes de temps de valeur différente. Ces deux composantes (fig. 17, courbe B) s'observent dans les conditions dépolarisantes, seule la composante lente est retrouvée dans les conditions hyperpolarisantes (Publication n° 7).

Il n'existe plus qu'une seule composante dans les ovocytes défolliculés ; les courants hyperpolarisants et dépolarisants donnant des valeurs identiques (fig. 17 , courbe A). Les valeurs de ces constantes de temps et de la résistance de membrane pour les trois espèces étudiées sont données dans le Tableau II.

Animaux	R en K.Ω			τ en ms		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
<i>Xenopus</i> (7♀)	107,9 ± 34; (n=75)	483 ± 22; (n=58)	314 ± 82 (n=58)	31,8 ± 5; 16 ± 7 (n=62)	44,1 ± 7,4; (n=42)	31,6 ± 17 (n=83)
<i>Pleurodeles</i> (3♀)	122 ± 69; (n=17)	392 ± 39; (n=19)	311 ± 7 (n=12)	24,6 ± 4; 5,9 ± 2,3 (n=12)	29,9 ± 3 (n=6)	20,2 ± 6 (n=8)
<i>Ambystoma</i> (4♂)	120 ± 8 (n=14)	284 ± 9,2 (n=14)	léthal	7,6 ± 1,6; 3,3 (n=14)	14,3 ± 7,6 1,8 (n=12)	léthal

Tableau II : Valeurs moyennes de la résistance (R) et des constantes de temps membranaires (τ) avant (a) et après la défolliculation manuelle (b) et à la collagénase (c).



Des résultats similaires ont été obtenus en voltage imposé sur des ovocytes de pleurodèle. En présence de cellules folliculaires, la résistance totale est de $112 \pm 41,9 \text{ K } \Omega$ ($n=7$). Elle passe à $349,2 \pm 54,4 \text{ K } \Omega$ ($n=8$) lorsque les ovocytes sont défoliculés manuellement.

Ainsi, la défoliculation provoque une augmentation de la résistance membranaire avec une perte correspondante de la composante rapide de la constante de temps. Cette composante correspondrait donc à la contribution propre des cellules folliculaires, tandis que la composante lente serait caractéristique de la membrane plasmique ovocytaire. En outre, la jonction "gap" semble polarisée puisque ces deux composantes n'apparaissent qu'avec des courants dépolarisants.

Si l'on estime les surfaces respectives des ovocytes de *Xenopus*, *Pleurodeles* et *Ambystoma* à $4,5 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$, $6,2 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$ et $11,3 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$, la résistance spécifique des ovocytes dénudés manuellement de chaque espèce peut-être évaluée à environ $21700 \Omega \text{ cm}^2$, $24300 \Omega \text{ cm}^2$ et $32000 \Omega \text{ cm}^2$. Les valeurs de la capacité membranaire sont respectivement de l'ordre de $2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Xénope), $1,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Pleurodèle) et $0,44 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Axolotl). Ces valeurs, calculées uniquement à partir du diamètre ovocytaire moyen ne sont cependant que très approximatives et devraient être corrigées par un facteur tenant compte de l'état de développement des microvillosités. DICK et al. (1970) considèrent que la surface réelle des ovocytes de *Bufo* doit être environ de 6 fois supérieure à celle évaluée uniquement à partir du diamètre. Quant à KADO et al. (1981), les microvillosités et les cryptes augmentent d'un facteur 20 la surface membranaire des ovocytes de *Xenopus*. Bien que, sous évaluées, ces valeurs de R apparaissent beaucoup plus élevées que celles calculées dans le cas des fibres excitables de Vertébrés et d'Invertébrés. Ainsi la R_m de la fibre musculaire du couturier de grenouille est d'environ $2800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (ADRIAN et FREYGANG, 1962 a). Pour les fibres musculaires du Crabe bleu *Callinectes sapidus*, la R_m ne dépasse pas $465 \pm 27 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (HAYS et al. 1968). La résistance membranaire de l'axone de Calmar est de $700 \Omega \cdot \text{cm}^2$, celle de la membrane de la fibre nerveuse du crabe de l'ordre de $5000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (KATZ 1966). Par contre, la résistance membranaire des oeufs non fécondés

d'Oursin culmine aux environs de $680 \text{ K} \cdot \Omega \cdot \text{cm}^2$ (JAFÉ et ROBINSON, 1978).

L'apport des cellules folliculaires dans le calcul de la résistance membranaire totale ne peut être négligée. Les jonctions "gap" étant les seuls points de contact entre les cellules folliculaires et l'ovocyte, il est probable que leur faible résistance électrique au regard de celle de la membrane plasmique ovocytaire dérive une partie du courant. Seules les valeurs de R obtenues après la défolliculation rendent compte de la conductance globale de la membrane plasmique des ovocytes.

3.1.3.2. Influence des ions sur la conductance

Lorsque le milieu externe est enrichi 10 fois en ions K^+ , la résistance chute à 65 % environ de sa valeur initiale (fig. 13) alors qu'un milieu dépourvu de Na^+ ne provoque qu'une faible variation de R. L'absence des ions Cl^- demeure sans effet significatif sur la résistance.

La conductance ionique membranaire des ovocytes est donc constituée par une importante conductance potassique et une conductance sodique très faible. Par ailleurs, la perméabilité sélective de la membrane ovocytaire aux ions K^+ et Na^+ semble dépendre du Ca^{2+} externe puisqu'un milieu sans Ca^{2+} augmente le flux de Na^+ et diminue le flux de K^+ (ECKER et SMITH 1971 ; TUPPER et MALOFF 1973).

3.1.4. Contribution des cations divalents

Lorsque la concentration externe de Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_e$ passe de 1 mM/1 à 0,1 mM, MAENO (1959) enregistre une dépolarisation de la membrane des ovocytes de *Bufo* alors qu'un milieu additionné d'EDTA (1 mM) et dépourvu d'ions divalents provoque une hyperpolarisation importante des ovocytes défolliculés de la même espèce. Parallèlement, la résistance augmente (IWAO et al. 1981). Chez *Xenopus*, l'addition de 10 mM d'EGTA au milieu externe fait passer en quelques minutes le potentiel de membrane de - 76 mV à - 15 mV (BELLE et al., 1977). Selon ces auteurs, l'augmentation du CaCl_2 jusqu'à 10 mM provoquerait le même effet.

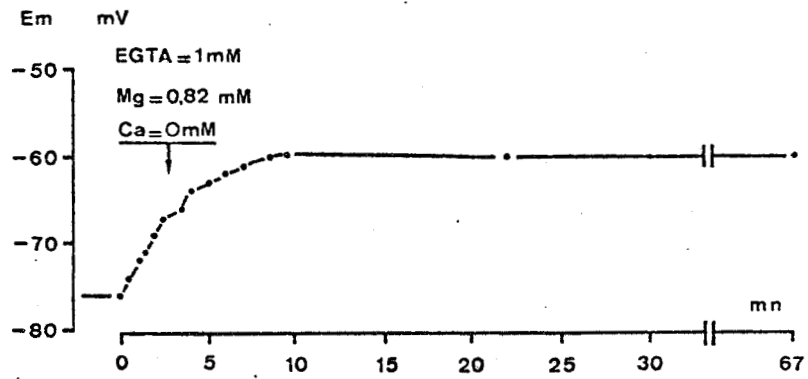


Figure 18 : Evolution de Em d'un ovocyte de Pleurodèle en milieu Steinberg EGTA (1 mM) dépourvu des ions Ca^{2+} .

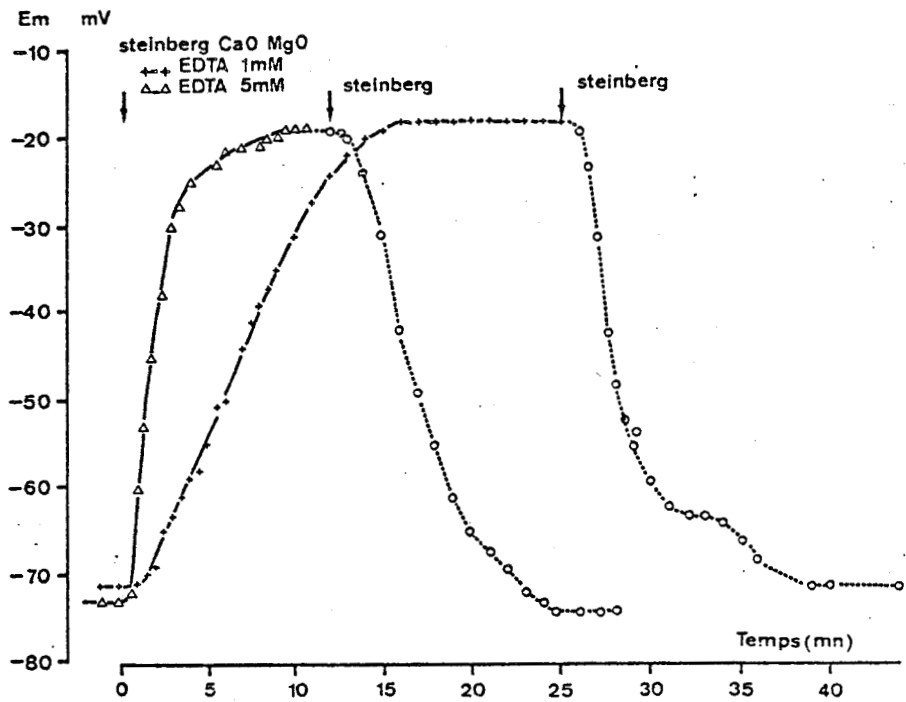


Figure 19 : Evolution de Em en milieu Steinberg EDTA (1 mM et 5 mM) dépourvu des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Ovocytes de Pleurodèle.

Au contraire, chez le Pleurodèle, l'action d'un milieu hypercalcique ou hypocalcique pendant 15 à 20 minutes ne produit aucune variation décelable sur le potentiel de membrane (Tableau III).

Milieux $[Ca^{2+}]_e$ m Eq/l	E_m - mV	Nombre d'ovocytes
0	- 69,66 ± 1,52	7
0,34 Steinberg normal	- 69,83 ± 4,30	12
6,8	- 67,5 ± 3,51	8

Tableau III : Valeurs moyennes du potentiel de membrane des ovocytes de Pleurodèle en milieux hypercalcique et hypocalcique.

Lorsque les ovocytes sont équilibrés pendant près de 3 heures dans un milieu de Steinberg dépourvu d'ions Ca^{2+} , leur membrane se dépolarise néanmoins puisque E_m passe de - 71 ± 4,50 mV (n = 8) à - 43,75 ± 3,80 mV (n = 8). Cet effet, à long terme, semble altérer la structure de la membrane qui paraît plus distendue que dans les conditions physiologiques normales. Ce phénomène est cependant réversible. De plus, l'addition d'EGTA (1 mM) à un milieu extracellulaire dépourvu d'ions Ca^{2+} provoque une dépolarisation membranaire immédiate et réversible de 19 à 20 mV environ (fig. 18).

3.1.4.1. Influence du milieu Ca O MgO EDTA sur E_m et R

Comme précédemment, la valeur de E_m ne change pas lorsque le milieu extracellulaire est totalement dépourvu d'ions divalents. Par contre, l'addition d'EDTA (1 et 5 mM) à ce même milieu entraîne une dépolarisation membranaire qui s'établit en quelques minutes (fig. 19) et se stabilise à environ - 18 mV (Publication n° 3).

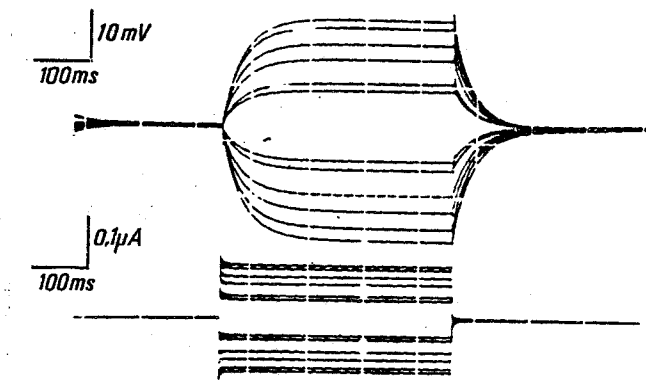


Figure 20 : Variation du potentiel de membrane pendant l'application de courants dépolarisants et hyperpolarisants en milieu Steinberg (en haut) et milieu Steinberg EDTA (1 mM) Ca 0 Mg 0 (en bas). Ovocyte de Pleurodèle.

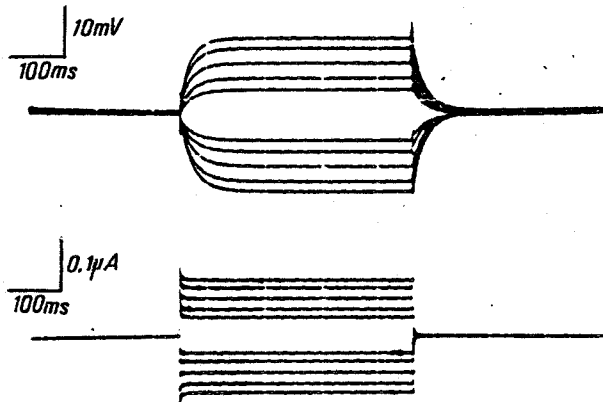
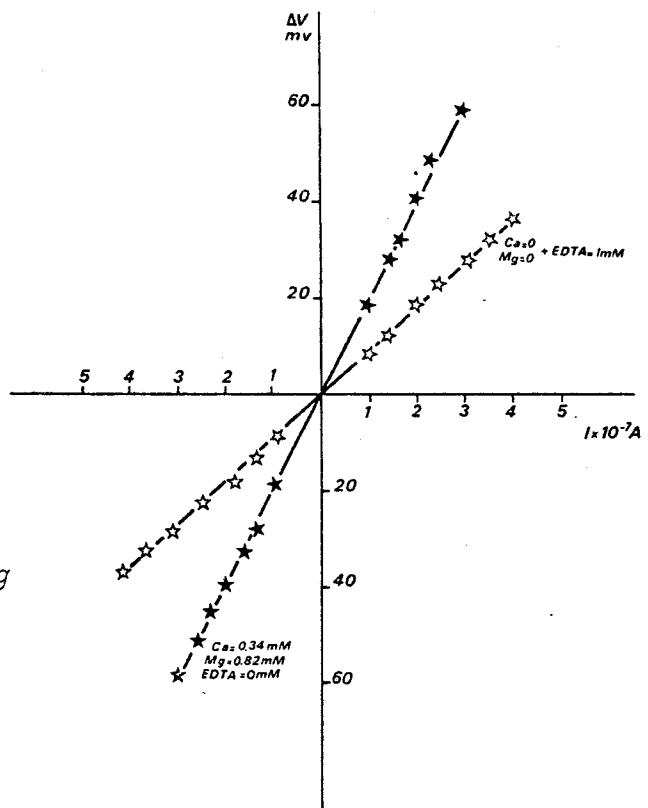


Figure 21 : Relations voltage courant dans le milieu de Steinberg normal (★) et dans le milieu Steinberg EDTA (1 mM) dépourvu des ions divalents. Ovocyte de Pleurodèle.



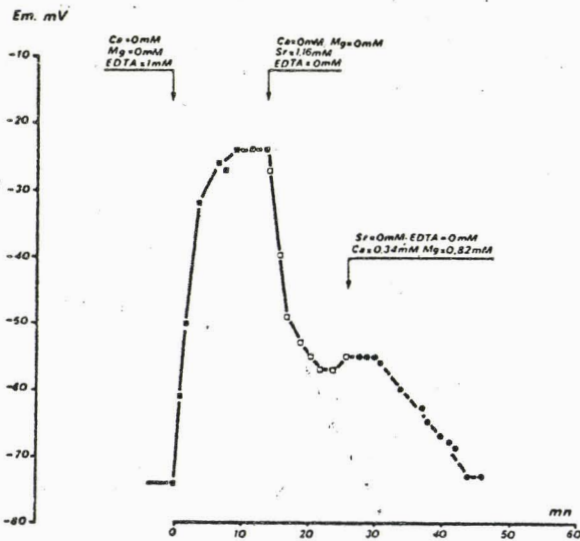
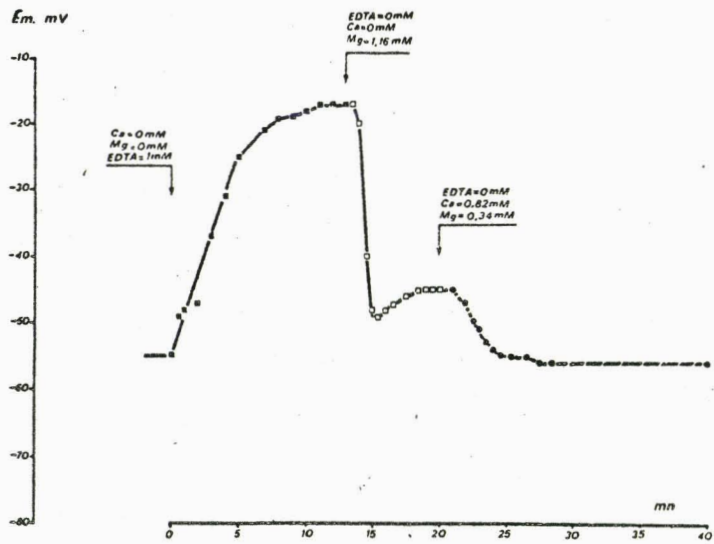


Figure 22 : Evolution de Em en milieu Steinberg EDTA (1 mM)
(1 mM) Ca 0 Mg 0 (■) ;

en haut : milieu Steinberg $Mg^{2+} = 1,16 \text{ mEq}$ (□) ;

en bas : milieu Steinberg $Sr^{2+} = 1,16 \text{ mEq}$ (◻) ;
et Steinberg normal. Ovocyte de Pleurodèle.



Parallèlement, la constante de temps diminue très fortement (fig. 20) et la valeur de la résistance membranaire chute de 60 à 70 % puisqu'elle passe dans l'exemple présenté (fig. 21), de 200 K Ω en Steinberg à 84 K Ω en milieu Ca 0 Mg 0 EDTA.

3.1.4.2. *Repolarisation de la membrane ovocytaire : action des ions Mg²⁺ ; Sr²⁺ et Ba²⁺*

La repolarisation des ovocytes dépolarisés en milieu Ca 0 Mg 0 EDTA peut être obtenue aisément sous l'action des ions Mg²⁺ ou Sr²⁺. Cette repolarisation, rapide mais incomplète, est parfois suivie par une légère dépolarisation (fig. 22). Les ions Ba²⁺ sont sans effet. Dans ces conditions expérimentales, les ions Mg²⁺ et Sr²⁺ sont capables de repolariser immédiatement la membrane bien que de manière partielle. Une réversibilité complète n'est obtenue que par l'association des ions Ca²⁺ et Mg²⁺. Cette observation souligne l'importance des ions Ca²⁺ extracellulaires, qui, par leur présence, contribuent à maintenir la stabilité du potentiel de membrane.

3.1.4.3. *Effets des milieux hypercalciques et hypermagnésiens sur le potentiel de membrane*

La perméabilité membranaire des ovocytes aux ions Na⁺ étant très faible, nous avons substitué les ions Na⁺ par les ions Ca²⁺ ou Mg²⁺. Chacun de ces milieux hypercalcique et hypermagnésien, totalement dépourvus d'ions Na⁺, provoque un effet légèrement hyperpolarisant de 4 à 6 mV semblable à celui obtenu lors de la substitution du sodium par de la choline.

Contrairement aux données rapportées par BELLE et al. (1977), chez *Xenopus*, l'augmentation de la concentration extracellulaire en calcium ou en magnésium ne provoque aucun effet spécifique sur la valeur de Em. Par contre, l'addition de chélateurs à des milieux dépourvus d'ions divalents entraîne une dépolarisation rapide. Ces données ne permettent en aucune façon de conclure à l'existence d'une perméabilité spécifique de la membrane ovocytaire aux ions Ca²⁺ et Mg²⁺. Elles suggèrent que les ions divalents pourraient jouer de manière indirecte, en contrôlant les perméabilités Na⁺ et K⁺.

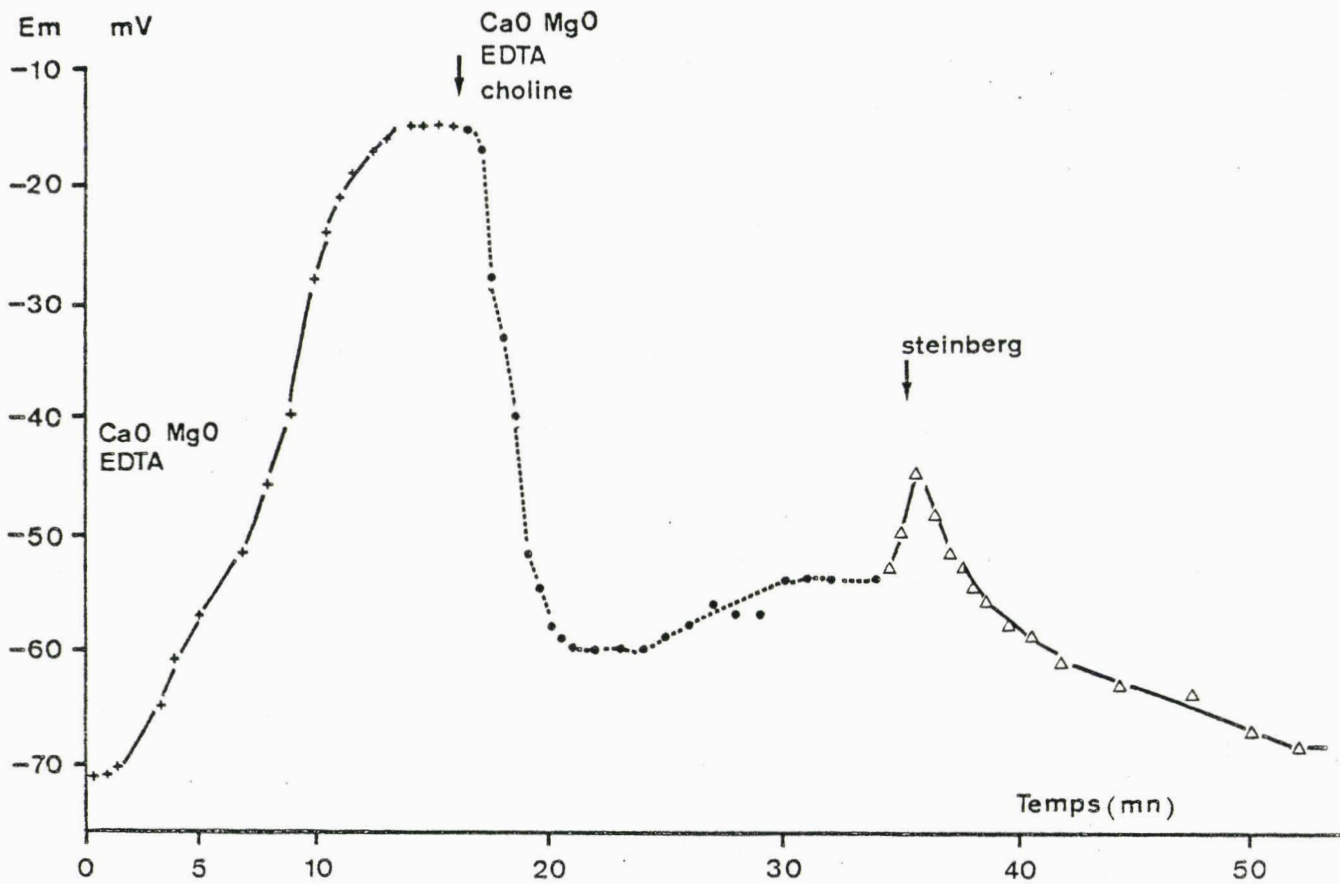


Figure 23 : Evolution de Em en milieu Steinberg EDTA (1 mM) Ca 0 Mg 0 (++) ; en absence de Na⁺ (•---•) et en Steinberg normal (Δ-Δ). Ovocyte de Pleurodèle.



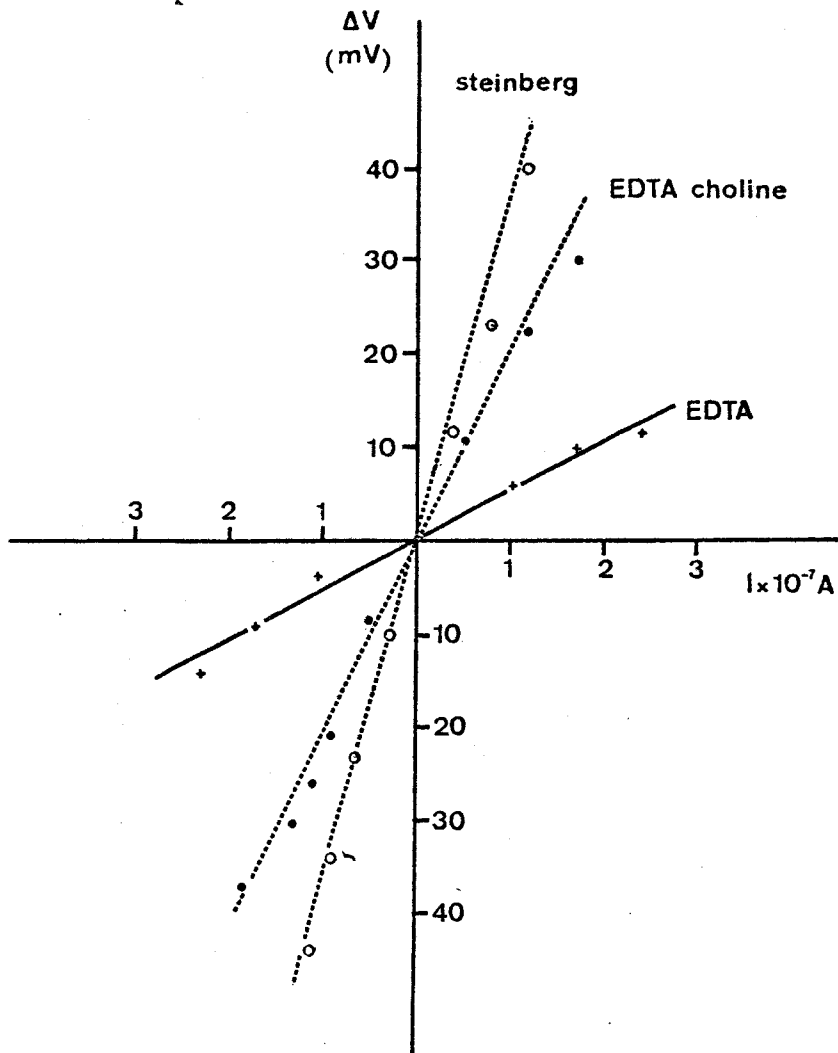


Figure 24 : Relations voltage-courant d'un ovocyte de Pleurodèle en milieu Steinberg normal (○---○) ; milieu Steinberg EDTA (5 mM) dépourvu des ions divalents (+--+) et en milieu EDTA dépourvu des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et Na^+ . Dans ce dernier milieu le sodium est remplacé par la choline (●---●).

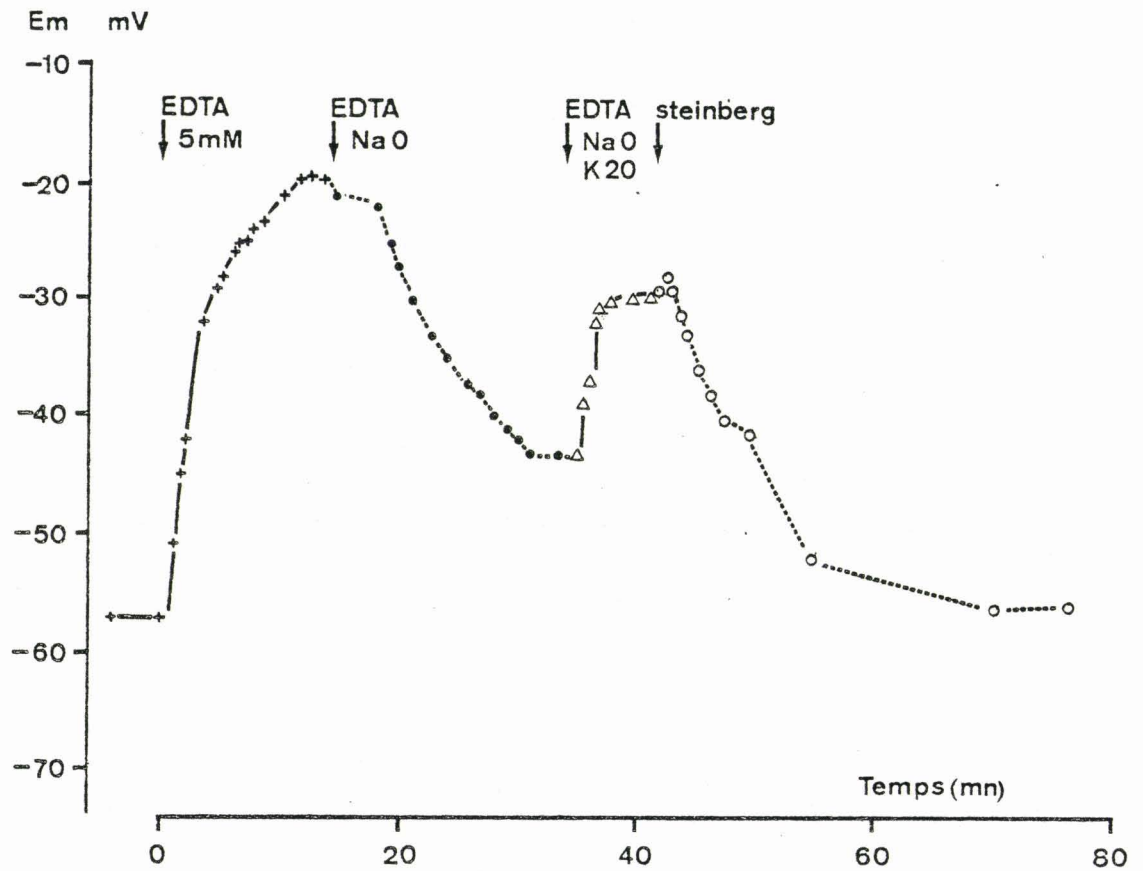


Figure 25 : Evolution de Em d'un ovocyte de Pleurodèle
 - en milieu Steinberg EDTA (5 mM) Ca 0 Mg 0
 - en milieu Steinberg EDTA Ca 0 Mg 0 choline
 - en milieu Steinberg EDTA Ca 0 Mg 0 choline K20
 (dans ce milieu, la concentration des ions K^+ a
 été multipliée par 20).
 - en milieu Steinberg normal.

3.1.4.4. Perméabilité Na^+ et K^+ en milieu dépourvu d'ions divalents

Le remplacement du Na^+ par de la choline permet une repolarisation partielle des ovocytes préalablement placés en milieu Ca 0 Mg 0 EDTA (fig. 23). Parallèlement, la résistance totale de la membrane - qui diminue en milieu Ca 0 Mg 0 EDTA (fig. 24) - augmente à nouveau lorsque Na^+ est totalement absent de la solution. Ainsi, la dépolarisation initiale en Ca 0 Mg 0 EDTA résulte d'une augmentation de conductance (chute de R) qui se trouve en grande partie annulée en absence d'ions Na^+ . La conductance sodique semble donc principalement impliquée. Toutefois, la repolarisation observée n'étant que partielle et instable, il était logique d'envisager que la perméabilité K^+ puisse également se trouver modifiée dans ces conditions.

Un milieu Ca 0 Mg 0 EDTA choline dont la concentration en ions K^+ est modifiée d'un facteur 20 engendre une dépolarisation membranaire qui se stabilise à une valeur moyenne de E_m de l'ordre de $-26,08 \pm 4,06$ mV ($n = 12$). Cette valeur n'est pas significativement différente de celle obtenue en milieu Steinberg K_{20} ($E_m = -30,22 \pm 2,86$ mV $n = 14$). Il apparaît que les ions divalents ne modifient pas la perméabilité aux ions K^+ .

La chélation des ions divalents extracellulaires augmente la conductance sodique alors que celle-ci se révèle extrêmement réduite dans notre milieu extracellulaire de référence. Cette chélation n'intéresse pas seulement les ions divalents de la solution physiologique mais également ceux situés sur la face externe de la membrane plasmique de l'ovocyte. Les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ont donc un rôle stabilisant pour la membrane ovocytaire.

Toute substance présentant des affinités étroites pour les ions divalents tend à modifier la perméabilité Na^+ et à perturber l'équilibre ionique de part et d'autre de la membrane ovocytaire. Cependant, dans les conditions normales de milieu, cet équilibre ne peut être altéré que si d'importantes modifications apparaissent dans les concentrations ou activités ioniques intracellulaires qui peuvent être également contrôlées par des mécanismes de transport actif.



3.1.5. Mise en évidence d'un mécanisme de transport actif

L'un des mécanismes de transport actif les plus classiques se caractérise par un influx de K^+ couplé à un efflux de Na^+ , flux qui travaillent contre le gradient électrochimique. L'énergie utilisée à cet effet est engendrée par une enzyme : la $Na^+ - K^+$ ATPase Mg^{2+} dépendante (SKOU 1965-1973) encore appelée pompe $Na^+ K^+$. Son activité peut être mise en évidence soit en l'inhibant soit en l'activant. Les glycosides cardiaques (SCHATZMAN 1953) comme l'ouabaïne (SEN et al. 1969) sont inhibiteurs et provoquent une dépolarisation membranaire de quelques millivolts. L'activation de la pompe Na-K est obtenue à la suite d'une injection intracellulaire de Na^+ (THOMAS 1972). On observe alors une hyperpolarisation membranaire qui ne se produit pas en présence d'ouabaïne ou en absence de potassium externe.

Le tableau IV rassemble les résultats obtenus à partir des follicules entiers de Pleurodèle et d'Axolotl étudiés dès leur isolement de l'ovaire et soumis à l'ouabaïne ($10^{-4}M$). Une dépolarisation membranaire de l'ordre de + 4 à + 5 mV est habituellement observée au bout de quelques minutes pour des ovocytes de Pleurodèle, prélevés à des époques très différentes de l'année. Pour l'Axolotl, la dépolarisation est de l'ordre de + 7 mV.

Animaux	Valeurs du potentiel de membrane $E_m \pm \sigma$	Amplitude de la dépolarisation en ouabaïne	Nombre d'ovocytes traités
Pleurodèle 30.08.79	- 67 \pm 3,74 mV (de - 62 à - 72 mV)	+ 0,8 \pm 1,79 mV (de 0 à + 4 mV)	5
Pleurodèle 31.09.79	- 38 \pm 8,04 mV (de - 28 à - 45 mV)	+ 4,75 \pm 0,96 mV (de + 4 à + 6 mV)	4
Pleurodèle 10.06.82	- 55 \pm 14,9 mV (de - 34 à - 78 mV)	+ 5 \pm 0,9 mV (de + 4 à + 6 mV)	8
Axolotl 14.06.82	- 68 \pm 7,16 mV (de - 60 à - 75 mV)	+ 7 \pm 4,08 mV (de + 1 à + 10 mV)	4

Tableau IV : Valeurs de E_m des ovocytes de Pleurodèle et d'Axolotl mesurées dès leur isolement de l'ovaire et amplitude de la dépolarisation membranaire en ouabaïne $10^{-4}M$.

Des résultats analogues sont obtenus lorsque les ovocytes sont préalablement équilibrés pendant plus de 12 heures dans le milieu OR_2 (Tableau V) . Dans deux séries expérimentales, l'ouabaine demeure sans effet.

Animaux	Valeurs du potentiel de membrane $E_m \pm \sigma$	Amplitude de la dépolarisation en ouabaine	Nombre d'ovocytes traités
Pleurodèle 30.08.79	- 62,5 \pm 5,5 mV (de - 55 à - 72 mV)	0 mV	7
Pleurodèle 8.03.82	- 72,25 \pm 4,23 mV (de - 64 à - 79 mV)	0 mV	8
Pleurodèle 22.04.82	- 65,60 \pm 12,6 mV (de - 40 à - 80 mV)	+ 4 \pm 5,9 mV (de 0 à + 17 mV)	8
Pleurodèle 10.06.82	- 67,1 \pm 1,8 mV (de - 64 à - 69 mV)	+ 4,33 \pm 4,4 mV (de 0 à + 9 mV)	6
Axolotl 14.06.82	- 52 \pm 9,9 mV (de - 42 à - 64 mV)	+ 4,17 \pm 4,3 mV (de 0 à + 11 mV)	6

Tableau V : Valeurs de E_m des ovocytes de Pleurodèle et d'Axolotl équilibrés en OR_2 pendant plus de 12 heures à 13°-14°C. Amplitude de la dépolarisation membranaire en ouabaine $10^{-4}M$.

Dans l'une de ces séries (P 30.08.79 ; Tableau V) , 10 ovocytes ont subi une injection iontophorétique de Na^+ . Une heure après cette injection, la valeur de E_m restait de l'ordre de - 20 mV, ce qui signifie que la membrane de ces ovocytes s'est révélée incapable de "pomper" le Na injecté.

L'inactivité de la pompe ne peut être attribuée à une mauvaise condition physiologique de ces ovocytes puisque les valeurs de leur potentiel de membrane restent du même ordre que celles habituellement enregistrées.

Malgré quelques exceptions, encore inexplicées, l'ensemble de ces données met en évidence une composante membranaire sensible à l'ouabaine dont l'activité contribue à hyperpolariser la membrane de 4 à 5 mV.

3.1.6. Conclusion

La membrane des ovocytes de *Pleurodèle* est principalement perméable aux ions K^+ puisque la conductance augmente lorsque le milieu externe est enrichi en ions K^+ . En outre, la relation $E_m = f(\ln (K^+)_e)$ est linéaire lorsque $[K^+]_e$ est supérieure à 2,68 mEq/l. La pente est de 44 mV, valeur proche de celle observée par KUSANO et al. (1982) sur les ovocytes de *Xenopus* qui est de 46 mV. Ces données indiquent que la perméabilité aux ions K^+ n'est pas exclusive, d'autant que l'absence des ions Na^+ dans le milieu externe se traduit par un effet hyperpolarisant de quelques millivolts qui atteste clairement de leur participation à la genèse du potentiel de membrane.

Chez *Pleurodeles*, contrairement à la situation observée chez *Rana* (ZIEGLER et MORRILL, 1977 ; MORRILL et ZIEGLER 1980), les ions Cl^- n'affectent pas la valeur du potentiel de membrane.

Par ailleurs, la perméabilité sélective de la membrane des ovocytes de *Pleurodeles* aux ions K^+ et Na^+ dépend des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} extracellulaires. Cependant, la membrane ovocytaire ne paraît pas pourvue d'une perméabilité significative aux ions divalents et ceux-ci ne feraient que stabiliser la membrane plasmique en contrôlant plus particulièrement la perméabilité sodique.

Certains auteurs (WALLACE et STEINHARDT 1977 ; WEINSTEIN et al. 1982) soutiennent que le potentiel de membrane des ovocytes en prophase I est engendré par l'activité de la pompe Na-K. Or, nous avons constaté, tout au moins chez le *Pleurodèle*, que des ovocytes folliculés ou déf folliculés présentent des valeurs de potentiel de membrane de même amplitude et que les effets de la ouabaïne ne se traduisent que par une faible dépolarisation membranaire de l'ordre de quelques millivolts.

La valeur moyenne de E_m est souvent comprise entre - 60 et - 70 mV et il n'est pas rare d'obtenir des valeurs plus proches de - 70 mV, l'état physiologique des ovocytes dépendant, le plus souvent, de l'âge de la femelle. Or, la valeur de la pile potassique E_K a été estimée dans nos conditions expérimentales à - 99,6 mV, valeur quelque peu éloignée de celle de E_m . La contribution des ions Na^+ au potentiel de membrane représente - 4 à - 6 mV. Il en

va de même pour la pompe Na-K. Il faut donc envisager que l'action traumatisante des microélectrodes doit faire chuter de plusieurs millivolts (au moins 10 mV) la valeur du potentiel de membrane.

La pente des relations voltage-courant traduit le caractère ohmique de la membrane qui ne présente pas de rectification à l'inverse de la situation que l'on rencontre chez les Etoiles de mer *Mediaster aequalis* et *Nordora punctiformis* (MIYAZAKI et al. 1975 a ; HAGIWARA et TAKAHASHI 1974). Chez les Urodèles, nous n'avons jamais observé d'excitabilité membranaire de même nature que celle décrite pour l'ovocyte des Anoures *Bufo* (MAENO, 1959) et *Xenopus* (KADO et al. 1979 ; BAUD et al. 1982). Chez ces animaux, la membrane plasmique de l'ovocyte est capable d'engendrer un potentiel d'action de longue durée, en réponse à un fort courant dépolarisant. Sur le même matériel, KUSANO et al. (1982) affirment cependant n'avoir jamais obtenu un tel phénomène et concluent à la nature ohmique de la membrane des ovocytes de *Xenopus*. Nous avons pu reproduire, sur cette espèce, les résultats de KADO et al. (1979) et de BAUD et al. (1982) ce qui confère plus de valeur aux données négatives que nous présentons en ce qui concerne l'ovocyte des Urodèles.

3.2. VARIATION DES PROPRIETES ELECTRIQUES MEMBRANAIRES PENDANT LA MATURATION

3.2.1. Induction de la maturation

Nous avons étudié la variation des propriétés électriques membranaires dans diverses conditions expérimentales qui permettent d'induire la maturation. On sait que la progestérone agit directement sur la membrane de l'ovocyte ; outre l'hormone naturelle, nous avons utilisé divers mimétiques également actifs. Ce sont essentiellement le PHMPS, les ions Mn^{2+} et la valinomycine.

Nous avons enfin découvert un autre procédé qui autorise le déblocage de l'évolution méiotique ovocytaire. Il s'agit de la défolliculation des ovocytes. Que celle-ci soit réalisée manuellement ou par tout autre procédé, mécanique ou enzymatique, elle engendre de véritables maturations en l'absence de toute stimulation hormonale (Publication n° 7). Les résultats présentés dans le tableau VI rendent compte de ces observations. Les pourcentages de maturation observés sont plus importants chez les Urodèles que chez *Xenopus*. Cependant, en dehors de leur saison normale de ponte, les ovocytes de Pleurodèle ne répondent ni à la progestérone ni à la défolliculation. Il est exclu

que les maturations déclenchées par le traitement à la collagénase puissent résulter d'une contamination par la progestérone ou quelque ion mimétique puisqu'aucune différence significative dans les taux de maturation n'a été observée avant et après une dialyse intensive de l'enzyme. Dans tous les cas, les ovocytes stimulés présentent un fuseau métaphasique et peuvent être activés. Des résultats identiques ont été obtenus lorsque les follicules sont extraits par une abrasion très ménagée. Cette méthode, appliquée aux ovocytes de *Xenopus*, a produit 64 % de maturation (32/50). Ici, encore, le milieu utilisé n'apparaît pas contaminé puisqu'il ne provoque aucune maturation lorsqu'il est ultérieurement appliqué à des follicules entiers. Par ailleurs, toutes les expériences de contrôle que nous avons réalisées en absence de papier abrasif (voir Matériels et Méthodes) nous ont fourni des résultats négatifs, même après 36 heures de traitement. Il apparaît donc que le découplage de la jonction ovocyte-cellules folliculaires peut déclencher la reprise de la méiose chez les Amphibiens comme chez les Mammifères. Ces derniers

Animaux	Traitement collagénase	Défolliculation manuelle	Progestérone sur follicule	Ovocytes non traités
Xenope (10 ♀)	61 % (119)	25 % (113)	72 % 210	0 % 240
Pleurodèle (5 ♀)	92 % (100)	74 % (42)	100 % (80)	0 % (175)
Axolotl (4 ♀)		67 % (78)	100 % (70)	0 % (80)

Tableau VI : Pourcentage de maturation après défolliculation ou addition de progestérone 10^{-6} g/ml de follicules intacts. () nombre d'ovocytes traités.

résultats nous ont incité à étudier les variations des propriétés électriques membranaires des ovocytes pendant la maturation et, plus spécifiquement, à rechercher le ou les facteurs responsables de ces modifications.

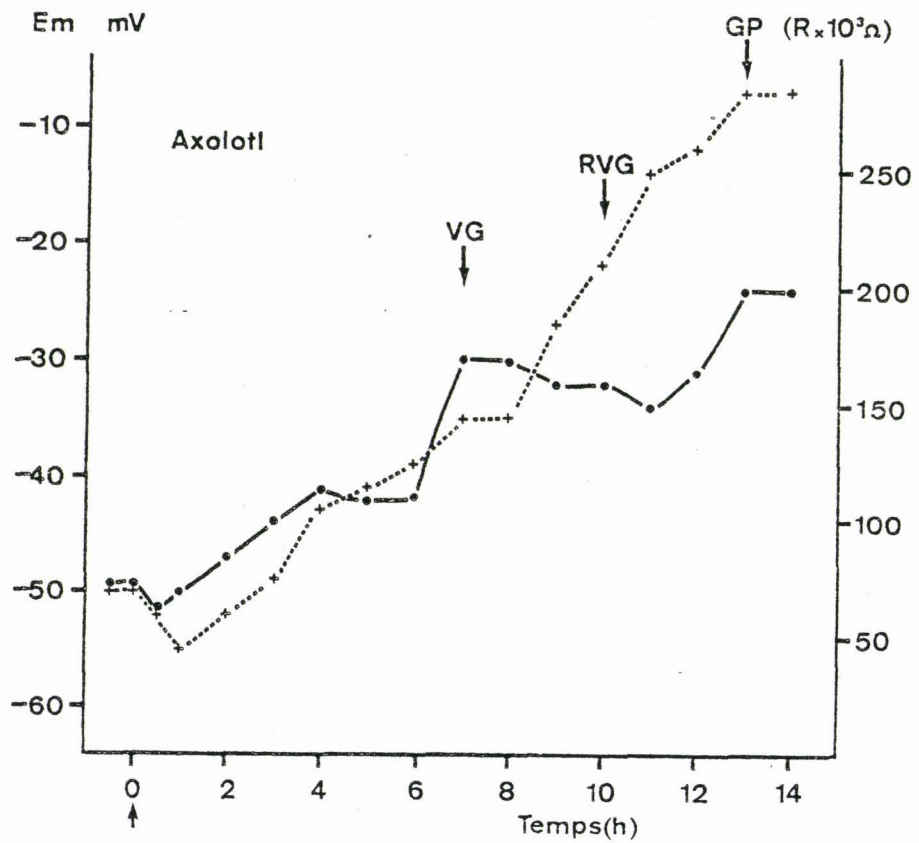


Figure 26 : Evolution du potentiel de membrane (E_m) d'un follicule entier d'Axolotl et variations de la résistance membranaire (R) après addition de progestérone (\uparrow) (10^{-6} g/ml) en milieu OR_2 .

(+---+) E_m ; (•-•) R

VG : Vésicule germinative au pôle animal

RVG : Rupture de la vésicule germinative

GP : Apparition du premier globule polaire



3.2.2. Evolution des paramètres électriques membranaires pendant la maturation induite par la progestérone ou par ses mimétiques

Chez les Anoures, des travaux antérieurs ont montré que les ovocytes ovulés sont dans un état très dépolarisé par rapport à des ovocytes ovariens (MAENO, 1959 ; MORRILL et WATSON, 1966). L'action de la progestérone est caractérisée par la diminution du potentiel de membrane jusqu'à une valeur de - 10 mV environ, mesurée dans les milieux Ringer ou OR₂. Parallèlement, les auteurs enregistrent une augmentation de la résistance membranaire (ITO 1972 ; MAENO 1959 ; MOREAU et al., 1976 a ; WALLACE et STEINHARDT, 1977 ; ZIEGLER et MORRILL, 1977).

Les études portant sur les ovocytes de *Rana pipiens* indiquent que le début de la dépolarisation coïncide avec le gonflement et la rupture de la vésicule germinative (ZIEGLER et MORRILL, 1977). Le cytoplasme ovocytaire deviendrait isopotentiel avec le milieu extracellulaire à la fin de la maturation.

Nous avons testé individuellement des follicules entiers provenant de 5 femelles de Pleurodèle et de 5 femelles d'Axolotl. La valeur moyenne du potentiel de membrane des ovocytes de Pleurodèle utilisés dans cette série s'est située entre - 38 et - 85 mV ($\bar{m} = - 57,2 \pm 18,7$ mV) et celle des ovocytes d'Axolotl entre - 34 et - 73 mV ($\bar{m} = - 55,8 \pm 15,7$ mV).

La résistance membranaire de ces ovocytes, entourés de leurs cellules folliculaires, dépasse 100 K Ω ainsi que nous l'avons déjà noté dans le tableau II.

Des modifications importantes du potentiel, de la résistance et de la capacitance surviennent toujours avant que la rupture de la vésicule germinative ne puisse être détectée visuellement. La période, correspondant à la migration de la vésicule germinative, suivie de sa rupture, varie considérablement d'un ovocyte à l'autre. Il faut attendre entre 12 et 15 heures chez le *Pleurodèle* et près de 8 à 9 heures chez l'*Axolotl*.

Chez ces deux espèces, les tracés révèlent que dépolarisation membranaire et augmentation de la résistance interviennent de façon lente et continue dès l'application de progestérone (fig. 26, 27). La valeur du potentiel de membrane atteint - 13,6 \pm 5,7 mV (n = 17) après l'émission du premier globule polaire chez le *Pleurodèle* et - 19 \pm 12 mV (n = 7) chez l'*Axolotl*.

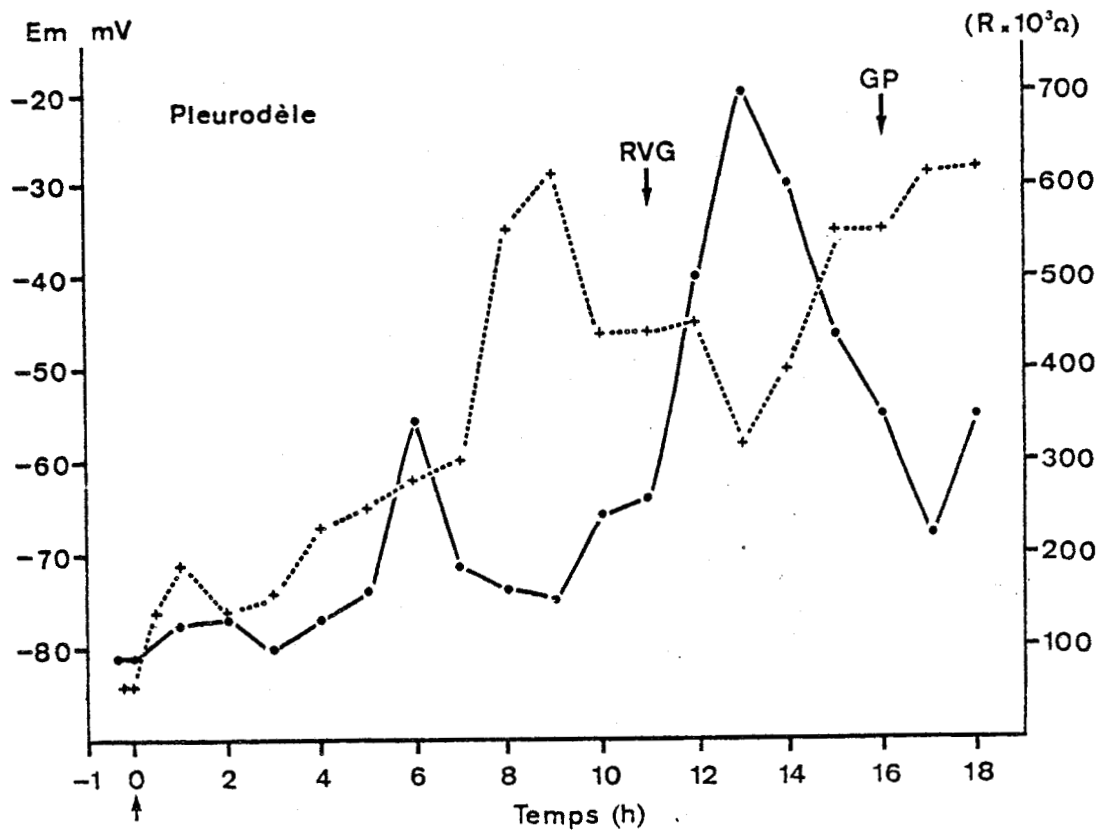


Figure 27 : Evolution du potentiel de membrane (E_m) d'un follicule de Pleurodèle et variations de la résistance membranaire (R) après addition de progestérone (10^{-6} g/ml) en milieu OR₂. L'ordonnée de gauche indique la valeur du potentiel de membrane (E_m), l'ordonnée de droite la résistance de membrane (R).

(+---+) E_m ; (•-•) R

RVG rupture de la vésicule germinative

GP apparition du premier globule polaire.



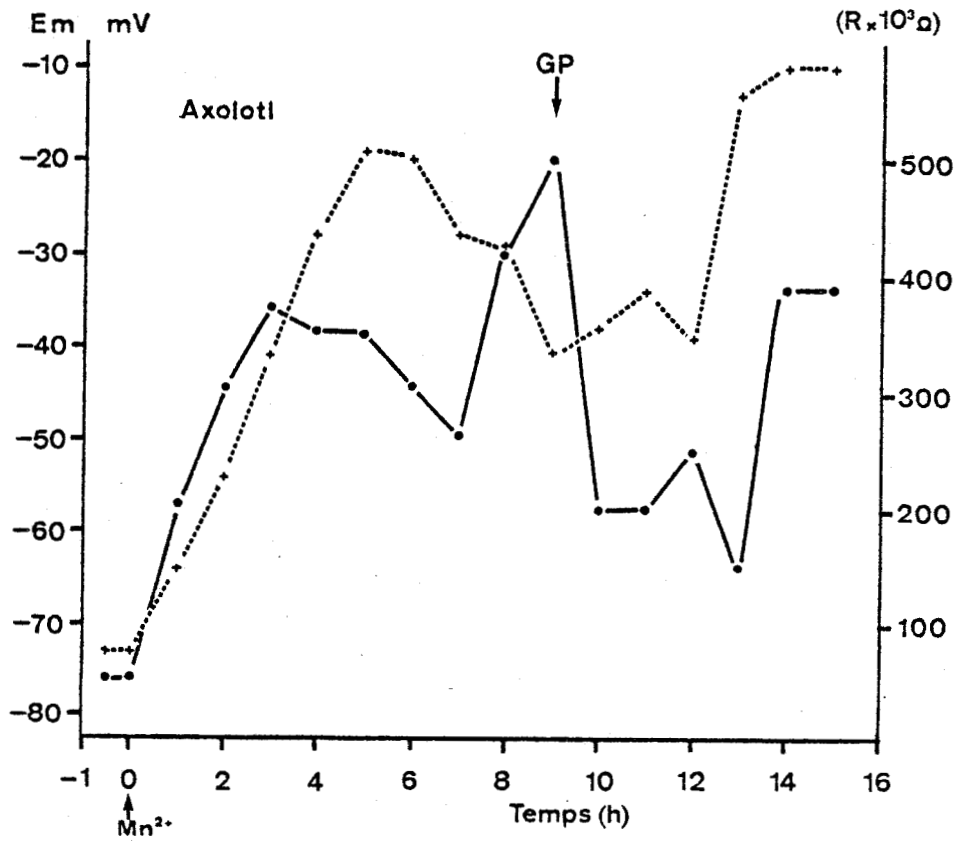


Figure 28 : Evolution du potentiel de membrane (E_m) d'un follicule d'*Axolotl* et variations de la résistance membranaire (R) après addition d'ions Mn^{2+} (5 mM) dans milieu OR_2 . L'ordonnée de gauche indique la valeur du potentiel de membrane (E_m), l'ordonnée de droite la résistance (R). GP : apparition du premier globule solaire.

(+--+) E_m (●-●) R



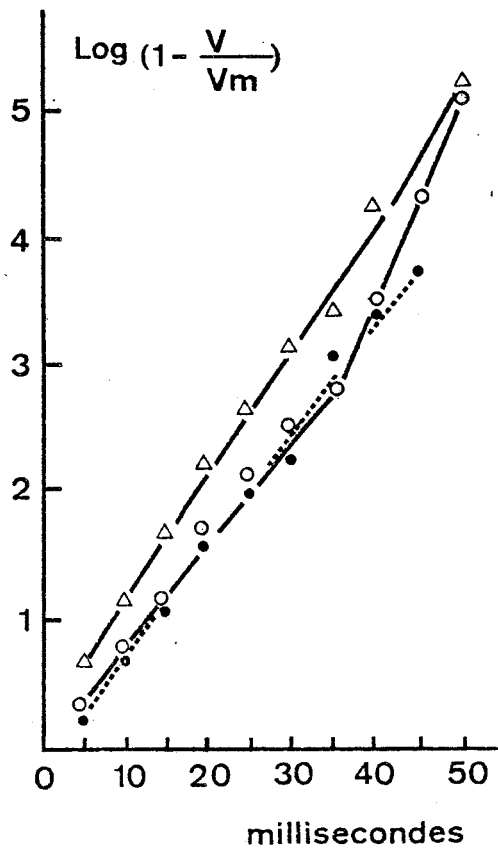


Figure 29 : Variation des constantes de temps membranaires des ovocytes folliculés, d'Ambystoma, après addition de progestérone.

$(O-O)$: $t = 0 \text{ mn}$

$(\bullet-\bullet)$: $t = 80 \text{ mn}$

$(\Delta-\Delta)$: $t = 180 \text{ mn}$



Dans le même temps, la résistance totale augmente d'abord graduellement puis très fortement au cours de l'émission du globule polaire jusqu'à un pic dont la valeur est de 5 à 6 fois supérieure à la valeur initiale. Chez le Pleurodèle, elle se stabilise enfin à un niveau moyen de $817 \pm 249 \text{ K } \Omega$ ($n = 7$), niveau très supérieur à celui des ovocytes ovariens. Les ovocytes de petite taille et ceux bloqués pendant la phase de repos sexuel ne présentent jamais de variations de leurs paramètres électriques membranaires lorsqu'ils sont soumis à la progestérone. Les ions Mn^{2+} (5 mM) ainsi que le PHMPS provoquent les mêmes variations (fig. 28). Ces résultats témoignent de modifications importantes engendrées par la progestérone ou ses mimétiques et qui vont dans le sens d'une diminution considérable de la conductance membranaire. Il convient, cependant, de tenir compte des profonds remaniements morphologiques qui affectent les follicules entiers au cours du processus de maturation.

3.2.2.1. *Influence des modifications de surface*

Les observations en microscopie électronique d'un ovocyte témoin et d'un ovocyte mûré révèlent une régression quasi totale des microvillosités (Planche II) pendant la maturation. Il en résulte une diminution de surface dont le corollaire électrophysiologique immédiat est un accroissement de la résistance totale et une chute de la valeur du condensateur membranaire.

On notera de plus que ces enregistrements ont été réalisés sur des follicules entiers. Or, nous avons déjà indiqué que la défolliculation manuelle ou enzymatique des ovocytes modifiait considérablement la valeur de la résistance membranaire par disparition de la composante à faible résistance liée aux jonctions "gap".

3.2.2.2. *Le découplage électrique ovocyte-cellules folliculaires* (Publication n° 7)

En travaillant sur des follicules entiers, les ovocytes et les cellules folliculaires commencent à se découpler ioniquement dans les vingt premières minutes qui suivent l'addition d'hormone. La figure 29 démontre que la composante rapide, mesurée à t_0 ($\tau_m = 7 \pm 3,83 \text{ ms}$ $n = 12$), n'est plus observable au bout de 80 minutes, tandis que la composante lente ($\tau_m = 12 \pm 4,19 \text{ ms}$ $n = 7$) persiste sans variation significative ($\tau_m = 10 \quad 4,09 \text{ ms}$ $n = 15$) au bout de 180 minutes. Aucune évolution

ultérieure ne se produit jusqu'à la rupture de la vésicule germinative, indiquant que les cellules folliculaires sont physiologiquement découplées au delà des trois premières heures suivant la stimulation hormonale, bien que nos observations ultrastructurales montrent des jonctions "gap" apparemment intactes jusqu'à 6 heures d'incubation hormonale (Planche IV, fig. D). En conclusion, la régression des microvillosités, ainsi que le découplage électrique, qui intervient entre l'ovocyte et ses cellules folliculaires après quelques minutes d'incubation hormonale, pourraient rendre compte en partie de la dépolarisation et de l'augmentation de la résistance membranaire observées pendant les trois premières heures de la maturation ; parallèlement, il est très vraisemblable qu'interviennent des modifications importantes, liées à des changements de perméabilité ionique de la membrane ovocytaire (diminution de la conductance). Nous avons donc mesuré à ce propos l'activité ionique intracellulaire des ions K^+ à l'aide d'une microélectrode spécifique.

3.2.3. Variations des perméabilités ioniques de la membrane des ovocytes pendant la maturation.

Chez *Rana*, il a été montré que la dépolarisation membranaire est associée en partie avec une diminution de la perméabilité potassique (MORRILL et ZIEGLER, 1980), ce qui constituerait, selon les auteurs, le prélude au développement d'un état excitable atteint vers la 2ème division méiotique.

Cette variation de la conductance potassique a été également mise en évidence par la technique des traceurs radio-actifs (O'CONNOR et al., 1977). L'influx et l'efflux de K^+ augmentent deux heures après le traitement par la progestérone puis diminuent, après rupture de la vésicule germinative.

Chez *Rana pipiens*, l'accumulation de Na^+ s'accroît après la stimulation hormonale puis elle décline après rupture de la V.G. pour devenir inférieure à sa valeur initiale tandis que la concentration interne de K^+ diminue (ZIEGLER et MORRILL, 1977).

3.2.3.1. Ions K^+

La technique des microélectrodes spécifiques permet de mesurer simultanément la variation du potentiel de membrane et la différence de potentiel due à l'activité ionique intra-ovocytaire. Cette technique nous

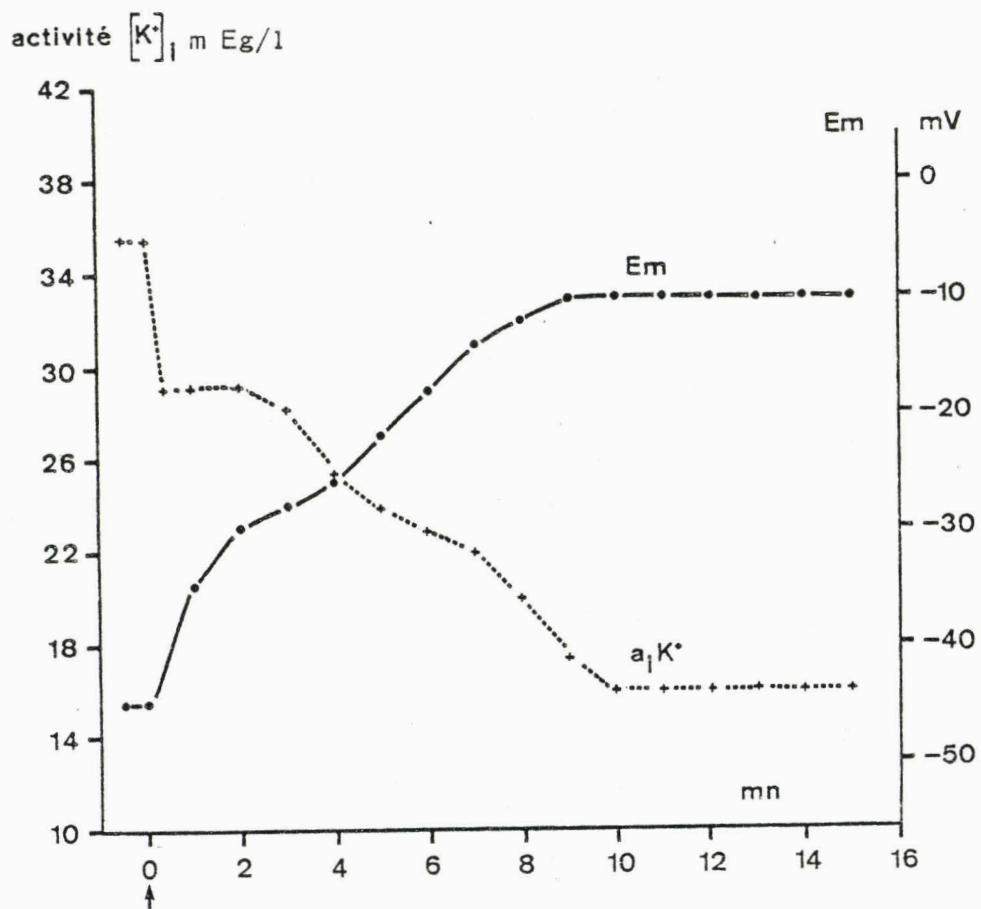


Figure 30 : Evolution du potentiel de membrane (E_m) et de l'activité intracellulaire des ions $[K^+]_i$ d'un ovocyte de Pleurodèle après addition de progestérone (10^{-6} g/ml). L'ordonnée de gauche indique l'activité des ions $[K^+]_i$ en mEq/l; l'ordonnée de droite la valeur du potentiel de membrane (E_m) en mV.

a fourni une valeur moyenne de l'activité intracellulaire des ions K^+ de l'ordre de 37 mEq/l, valeur qui permet d'estimer la pile potassique E_K à - 67 mV, valeur très inférieure à celle obtenue par le calcul théorique.

Dès les premières minutes, la membrane se dépolarise. Parallèlement, on observe une diminution de l'activité intracellulaire des ions K^+ , diminution qui dépasse 45 % (fig. 30). La chute de l'activité ionique traduit une réduction de la perméabilité aux ions K^+ . Cette réduction serait responsable tant de la diminution de la conductance membranaire que de la dépolarisation observée au cours de la maturation.

Dans l'hypothèse où une telle modification de la perméabilité potassique constituerait un facteur clé dans le déclenchement de la maturation on pourrait s'attendre logiquement à ce qu'un changement dans la concentration externe des ions K^+ parvienne à lever le blocage des ovocytes arrêtés en prophase I.

Cependant, et contrairement aux données de KOFROID et al. (1979) qui soulignent que les ions K^+ inhibent la maturation des ovocytes de *Xenopus*, nous n'avons jamais pu obtenir la reprise de la méiose des ovocytes de Pleurodèle ou d'Axolotl en supprimant simplement les ions K^+ du milieu extérieur bien que la valinomycine, ionophore K^+ , se révèle efficace à déclencher la maturation. Nous aurons l'occasion de revenir plus loin sur cette contradiction apparente qui se trouvera alors résolue de manière satisfaisante.

3.2.3.2. Ions Na^+

Bien que n'ayant pas testé la perméabilité aux ions Na^+ sur le plan électrophysiologique, nous avons étudié les effets de l'absence des ions Na^+ externes sur le déclenchement de la maturation des ovocytes de Pleurodèle.

Lorsqu'on substitue les ions Na^+ par de la choline ou par les ions Ca^{2+} dans le milieu externe, le pourcentage de maturation chute considérablement par rapport au milieu normal (Tableau VII). Ce résultat, qui démontre que les ions Na^+ extracellulaires sont nécessaires à la reprise de la méiose chez le Pleurodèle, laisse supposer que la conductance sodique devrait logiquement augmenter. Il y a là une contradiction avec le fait que les ovocytes

de *Xenopus* perdent leur excitabilité après l'addition de progestérone (BAUD et al., 1982). Il devient impossible quelques heures après l'application hormonale, d'activer les canaux sodiques responsables du potentiel d'action. Cependant, très récemment, SCHLICHTER (1982) décrit l'apparition de potentiels d'action spontanés depuis la métaphase I jusqu'à la métaphase II des ovocytes de *Rana pipiens* ; dans le même temps, l'activité interne des ions Na^+ s'accroît (SCHLICHTER 1983).

Animaux	OR ₂	OR ₂ choline	OR CaCl ₂
P 18.01.78	32/33	5/33	non testé
P 24.01.78	30/30	1/30	non testé
P 1.02.78	30/30	4/30	non testé
P 8.11.78	20/20	11/20	8/20
P 15.11.78	18/20	12/20	6/20

Tableau VII : Ovocytes de Pleurodèle soumis à la progestérone (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en milieu OR₂ ; OR₂ dépourvu d'ions Na^+ (OR₂ choline ; OR₂ CaCl₂).

Par ailleurs, certains auteurs font remarquer que l'un des événements les plus importants qui marquent la reprise de la méiose chez les Anoures consiste dans l'inhibition du mécanisme d'échange actif $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (VITTO et WALLACE, 1977 ; WALLACE et STEINHARDT, 1977 ; WEINSTEIN et al. 1982). Ces mêmes auteurs attribuent un rôle prépondérant à la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dans la genèse du potentiel de membrane des ovocytes non stimulés de *Xenopus* et de *Rana*.

Lorsque des ovocytes de Pleurodèle, incubés continuellement en présence de progestérone, sont individuellement soumis à l'action de la ouabaïne (10^{-4} M), ce glycoside cardiaque, actif au départ, n'exerce plus

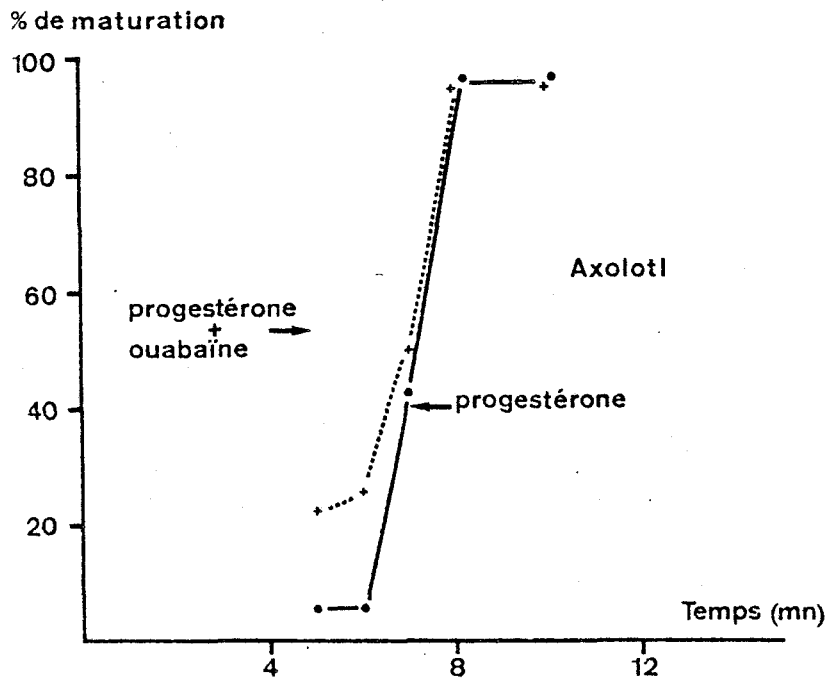
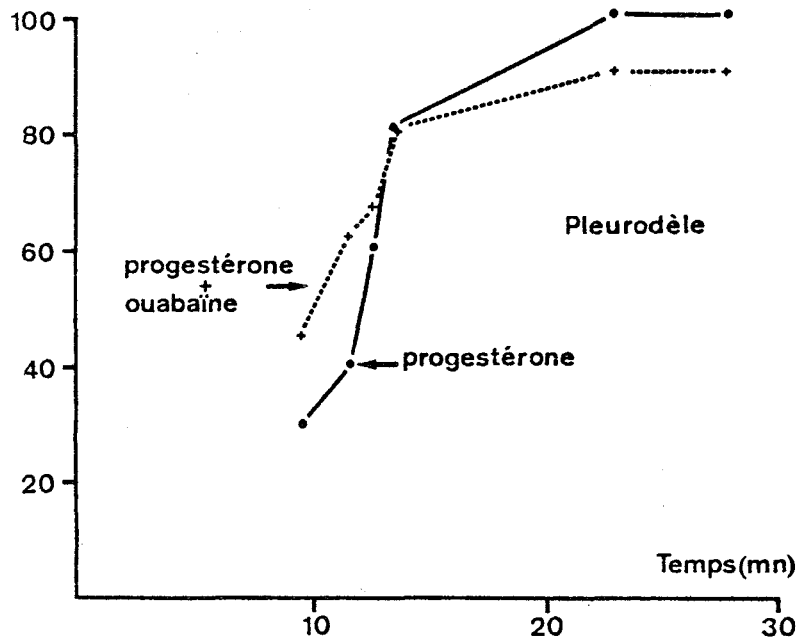


Figure 31 : Pourcentage de maturation des ovocytes de Pleurodèle (en haut) et d'Axolotl (en bas) en fonction du temps d'incubation dans la progestérone (10^{-6} g/ml) et dans la progestérone en présence de ouabaine 10^{-4} M. Pour chaque courbe 50 ovocytes ont été incubés dans 10 ml de milieu OR₂ en présence de progestérone (•-•) et de progestérone + ouabaine 10^{-4} M (+--+).



aucune action dépolarisante sur la membrane quelques 3 heures environ après addition de l'hormone.

L'activité de la pompe serait donc arrêtée à ce stade. Lorsque progestérone et ouabaïne agissent simultanément depuis l'origine, on observe, en outre, que la maturation se trouve favorisée comme l'atteste les expériences suivantes réalisées chez le Pleurodèle et l'Axolotl.

- En présence de progestérone les vésicules germinatives sont visibles au pôle animal au bout de 5 à 6 heures, leur rupture intervenant dès la 9ème heure pour le Pleurodèle (fig. 31, courbe A) et dès la 5ème heure pour l'Axolotl (fig. 31, courbe B).

- L'addition d'ouabaïne 10^{-4} M dans le milieu d'incubation accélère tant la migration des vésicules germinatives au pôle animal que leur rupture (fig. 31, courbe A et B). Dans ces conditions expérimentales, l'ouabaïne n'a pas d'effet significatif sur les pourcentages de maturation obtenus.

Il semble donc que la progestérone inhibe le transport actif $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ sensible à l'ouabaïne. Dans ces conditions, le fait que la maturation soit facilitée sous l'action conjuguée de la progestérone et de l'ouabaïne pourrait s'expliquer dans l'hypothèse d'une compétition entre l'hormone et le glycoside cardiaque pour les mêmes sites membranaires. Il apparaît difficile d'attribuer un rôle fondamental à l'inhibition de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Chez *Xenopus*, nous avons, en effet, observé de manière répétitive, que les seuls ovocytes qui se révèlent réfractaires à l'action de la progestérone sont justement ceux qui ne possèdent au départ aucune pompe fonctionnelle ou activable par injection de Na^+ .

Ni l'arrêt de la pompe, ni les modifications des conductances ioniques membranaires ne semblent donc pouvoir constituer le signal efficace de la reprise de la méiose. La variation très progressive des paramètres électriques ovocytaires apparaît toujours consécutive à une diminution de la sélectivité de la perméabilité membranaire. Quel signal primaire peut être à l'origine de ces modifications ?

Nous avons déjà souligné quelle contribution indirecte pouvaient apporter les ions divalents extérieurs dans le maintien de la différence de potentiel existant entre les milieux externe et intracellulaire, par la voie d'un contrôle de la perméabilité sodique. Nous avons vu que la perméabilité

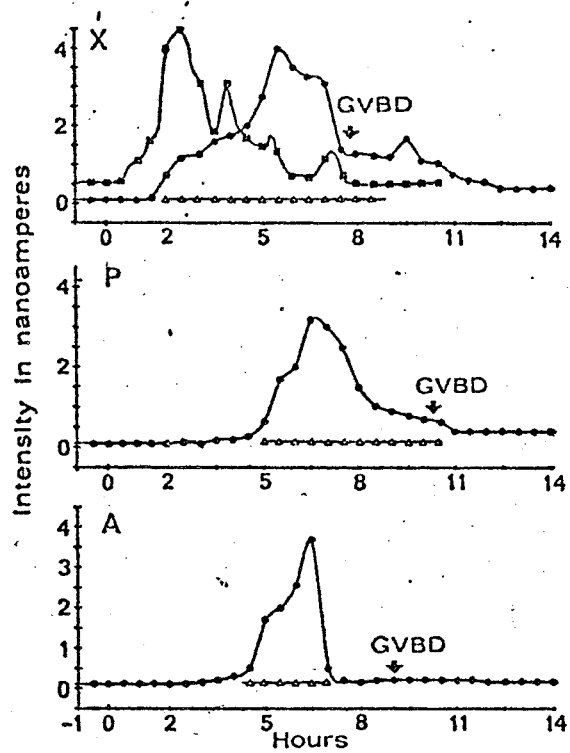


Figure 32 : Libération intracellulaire de Ca^{2+} induite par la progestérone dans les ovocytes de *Xenopus* (X), *Pleurodeles* (P), et *Ambystoma* (A), injectés d'aequorine.

- *Xenopus mutant albinos*
- △-△ *Ovocytes témoins injectés d'aequorine*

Les taux de maturation pour ces expériences ont été respectivement :

X sauvage : 17/30 ; X albinos 7/15
 P : 14/25 + 6/25 vésicules germinatives au pôle animal (VG)
 A : 21/25 + 2/25 VG



potassique n'est apparemment pas modifiée dans ces conditions. Dans cette perspective, on pourrait donc imaginer que la progestérone puisse contrôler les perméabilités Na^+ et K^+ en modifiant la répartition des ions divalents tant à la surface de la membrane que dans le milieu intracellulaire.

3.2.4. Calcium et maturation (Publication n° 5)

De nombreux arguments suggèrent que les ions Ca^{2+} pourraient jouer le rôle de messager secondaire lors de la stimulation hormonale des ovocytes d'Amphibiens (MAROT et al., 1976 ; SCHORDERET-SLATKINE et al., 1977 ; BAULIEU et al., 1978). MOREAU et al. (1976), en injectant du Ca^{2+} par iontophorèse dans les ovocytes de *Xenopus*, ont déclenché la maturation en l'absence de tout apport hormonal. Cependant, à cette époque et chez les Amphibiens, aucune expérience n'avait apporté la preuve d'un changement de l'activité intracellulaire de Ca^{2+} lors de la reprise de l'évolution méiotique. Seules, l'injection intracellulaire de photoprotéines de même que l'utilisation d'électrodes Ca^{2+} sensibles pouvaient apporter une démonstration définitive de l'existence de variations dans l'activité intracellulaire des ions Ca^{2+} . Notre étude a porté sur *Xenopus*, *Ambystoma* et *Pleurodeles*.

3.2.4.1. Activité du Ca^{2+} dans les ovocytes non stimulés

L'activité de "repos" des ions Ca^{2+} , mesurée avec les microélectrodes sensibles dans les ovocytes de *Xenopus* et d'*Ambystoma*, est respectivement de 0,4 et 0,9 10^{-6} M.

3.2.4.2. Réponse calcique après stimulation hormonale

Après injection préalable d'aequorine dans des ovocytes, l'addition de progestérone déclenche une variation lumineuse transitoire qui rend compte d'une augmentation de l'activité interne du Ca^{2+} . La durée (3 à 6 heures) et l'amplitude de ces variations sont semblables dans les 3 espèces étudiées (fig. 32). En outre, l'absence de Ca^{2+} et Mg^{2+} externes, dont les conséquences sur la perméabilité membranaire des ovocytes ont longuement été analysées par ailleurs, n'empêche pas la manifestation du pic calcique. Ainsi l'altération des perméabilités Na^+ et K^+ demeure sans effet sur la libération intracellulaire du Ca^{2+} en présence de progestérone.

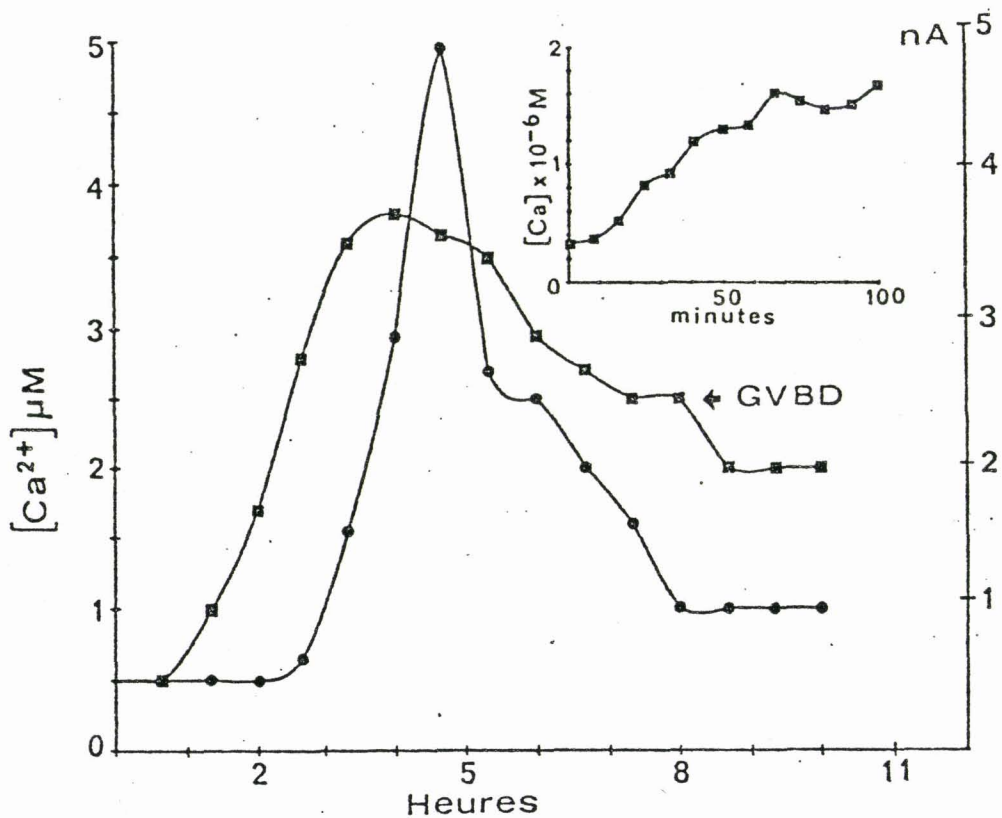


Figure 33 : Libération intracellulaire de Ca^{2+} induite par la progestérone dans les ovocytes d'*Ambystoma*. Enregistrement effectués avec une électrode Ca^{2+} sensible (■-■) sur un seul ovocyte, et sur une population de 25 ovocytes injectés d'aéguorine (●-●) 14 ovocytes ont mûri.

L'encart illustre le changement de l'activité Ca^{2+} enregistré pendant les deux premières heures qui suivent l'action de la progestérone. L'ordonnée de droite indique l'intensité de la lumière émise en nA, l'ordonnée de gauche l'activité calcique mesurée avec l'électrode Ca^{2+} sensible.

Dans chaque cas, la rupture de la vésicule germinative survient 2 à 3 heures après l'émission maximale de lumière.

L'enregistrement des variations de l'activité du Ca^{2+} intracellulaire montre une augmentation de l'activité calcique détectable dès les dix premières minutes après l'addition de progestérone. L'activité calcique mesurée par microélectrode passe de 0,7 à 7 μM . Les représentations graphiques de la figure 33 montrent la parfaite concordance obtenue par ces deux techniques.

Outre l'activité interne du Ca^{2+} , nous avons pu apprécier, avec une électrode Ca^{2+} sensible placée dans le milieu externe, l'augmentation de l'activité du Ca^{2+} externe 30 minutes après le traitement hormonal. L'efflux total correspond à une diminution d'environ 0,03 μM de la teneur en Ca^{2+} de l'ovocyte et correspond à 0,1 % du pic calcique intracellulaire. Cet efflux n'intervient pas en absence de Ca^{2+} externe.

Aucune variation de l'activité calcique n'a pu être enregistrée avec les ovocytes de *Xenopus* dont le diamètre est inférieur à 1 mm et qui ne répondent jamais à la stimulation hormonale ainsi qu'avec les ovocytes de *Pleurodèle* de taille normale qui ne mûrissent jamais pendant la saison de repos sexuel.

3.2.4.3. Réponse calcique en présence de substances mimétiques

Des substances comme le PHMPS, les ions Mn^{2+} et la valinomycine induisent la reprise de la méiose des ovocytes des trois espèces d'Amphibiens, provoquent la dépolarisation membranaire et la diminution de la conductance ionique bien que leurs effets connus au niveau membranaire soient très différents (voir chapitre I).

L'action du PHMPS et des ions Mn^{2+} (10 mM) se caractérise par une brève émission lumineuse enregistrée dès les premières minutes, suivie d'une deuxième variation transitoire qui débute 2 heures après l'addition des drogues et dure environ 3 heures. Les mêmes phénomènes sont observés en absence de Ca^{2+} et de Mg^{2+} externes. La valinomycine, utilisée sur l'ovocyte d'*Axolotl*, ne déclenche qu'un seul pic calcique, semblable à celui obtenu avec la progestérone. Aucune réponse n'est enregistrée en absence de Ca^{2+} externe.

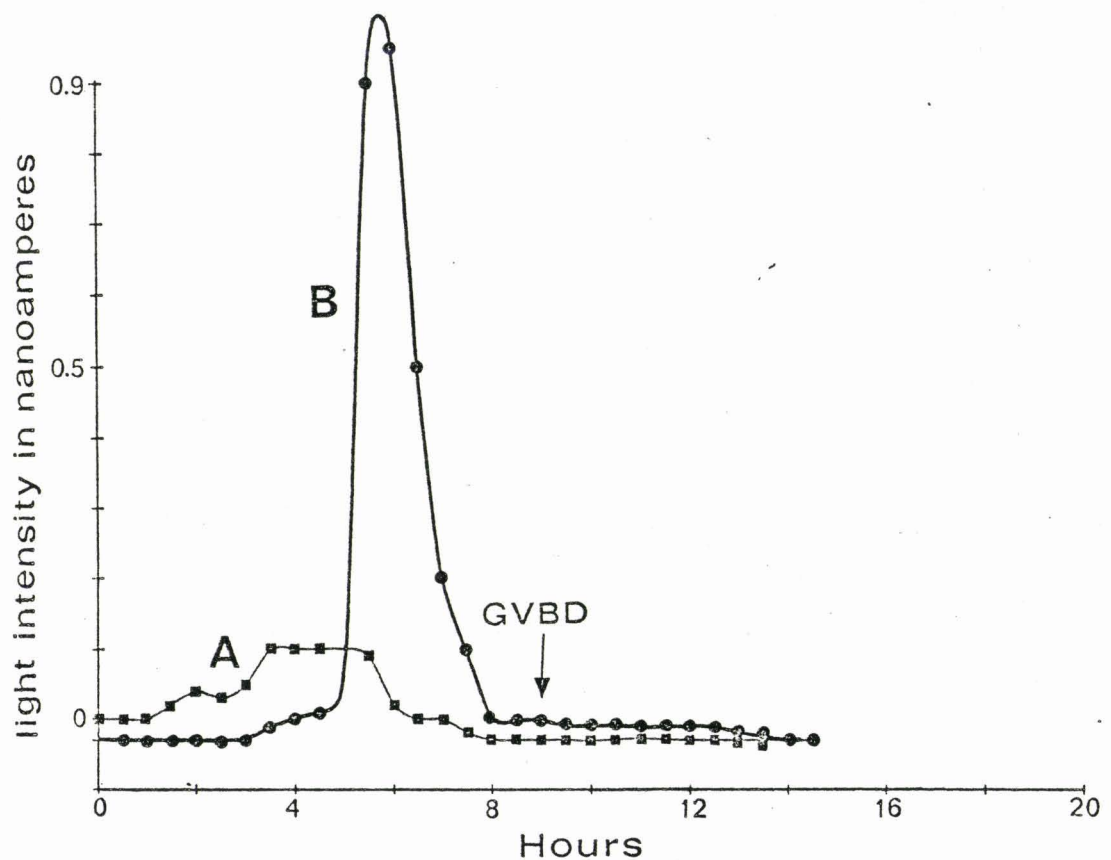


Figure 34 : Effet d'un milieu OR2-propionate de sodium dépourvu des ions Cl^- sur la libération de Ca^{2+} induite par la progestérone dans les ovocytes d'Ambystoma.

A. Libération de Ca^{2+} induite par la progestérone sur un lot de 25 ovocytes incubés dans le milieu propionate Cl^- depuis $t = -45$ mn. Le progestérone est ajoutée à $t = 30$ mn. Les ovocytes ont été lavés à $t = +13$ h 30 mn.

B. Libération de Ca^{2+} obtenue dans les ovocytes lavés. $t = 0$ est la fin du lavage.

En A aucun déclenchement de la maturation n'est observé, en B 21/25 ovocytes ont émis leur premier globule polaire.

Ainsi que nous venons de le voir, la libération intracellulaire de Ca^{2+} représente, sans aucun doute, une étape essentielle dans l'action de la progestérone. Elle pourrait bien constituer l'événement clé, responsable de la reprise de la méiose puisque cette réponse calcique s'observe avec tous les mimétiques, y compris la valinomycine. Par ailleurs, il semble bien que cette réponse soit indispensable à la maturation puisque des ovocytes de Pleurodèle, bloqués en prophase I pendant leur période de repos sexuel ne libèrent jamais de Ca^{2+} sans l'effet de la progestérone. Dès lors, et dans le cadre de cette hypothèse, on pouvait effectuer la prédiction suivante : toute substance capable d'inhiber la reprise de la méiose devrait empêcher également la réponse calcique. C'est, effectivement, ce que nous avons observé.

3.2.4.4. *Inhibition réversible de la réponse calcique* (Publication n° 6)

Le remplacement total ou partiel (1/2) du NaCl présent dans l'OR₂, par du propionate de sodium inhibe la réinitiation méiotique des ovocytes d'*Axolotl* ainsi que l'évolution du potentiel de membrane qui reste stable après une hyperpolarisation initiale de 5 mV. Par contraste, l'isethionate, autre substituant du chlore, ne bloque ni la maturation induite par la progestérone, ni la dépolarisation membranaire qui l'accompagne.

L'inhibition obtenue avec le propionate s'avère réversible par simple lavage, sans addition supplémentaire de progestérone. Les enregistrements effectués démontrent que seul le traitement au propionate abolit la libération de Ca^{2+} et que celle-ci s'effectue au contraire normalement, après la procédure de rinçage (fig. 34).

Comme le propionate, la cycloheximide, inhibiteur des synthèses protéiques bloque de manière réversible, la reprise de la méiose des ovocytes de *Xenopus* (BALTUS et al. 1973) et de *Rana* (SAMSON et SCHUETZ, 1979). Cette drogue n'a pas d'effet sur le potentiel de membrane des ovocytes d'*Axolotl* mais inhibe la réponse calcique, la dépolarisation et la maturation. Cette inhibition est encore réversible par simple lavage.

3.2.5. Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons montré que la maturation des ovocytes s'accompagne :

- d'une dépolarisation de la membrane plasmique,
- d'une augmentation de la résistance membranaire,
- d'une diminution de l'activité des ions K^+ intracellulaires,
- d'une libération intracellulaire transitoire de Ca^{2+} .

La dépolarisation membranaire qui accompagne la maturation des Amphibiens est un phénomène général qui intéresse tant les Anoures (BELLE et al., 1976, 1977 b ; MOREAU et al., 1976 c ; WALLACE et STEINHARDT, 1977 ; KADO et al., 1981 ; ZIEGLER et MORRILL, 1977 ; IWAO et al., 1981) que les Urodèles. Cependant, WALLACE et STEINHARDT (1977) soulignent que les ovocytes de *Xenopus*, qui ne s'hyperpolarisent jamais après dissection de l'ovaire (ovocytes du type dépolarisé) mûrent normalement et ne se dépolarisent pas plus fortement que ceux du type hyperpolarisé après traitement à la progesté-
rone.

En travaillant sur des follicules entiers, nous avons montré que l'augmentation de la résistance qui accompagne la maturation est consécutive, d'une part, à la chute de la composante ohmique de la jonction ovocyte-cellule folliculaire, d'autre part, à la diminution de la sélectivité de la membrane ovocytaire aux ions K^+ . L'activité intracellulaire des ions K^+ des ovocytes de Pleurodèle déterminée par la courbe $E_m = f(\ln[K^+]_e)$ a été estimée à 47 mEq/l, valeur nettement inférieure à celles enregistrées chez les Anoures (Tableau I). Une valeur voisine (54 mM) a été mesurée chez *Hyla labialis* (HUNTER et DULUQUE, 1959). Si l'on tient compte, cependant, de la concentration des ions K^+ extracellulaires (2,5 mM), les valeurs de la pile potassique E_K sont de l'ordre de - 97 mV pour les ovocytes de la grenouille (PALMER et al. 1978) et de - 92 mV pour les ovocytes de la salamandre (HOROWITZ et al., 1979) ; elles apparaissent donc du même ordre de grandeur que celle calculée chez le Pleurodèle où

$$\begin{aligned} a. K_e &= 0,67 \text{ mEq (milieu Steinberg)} \\ a. K_i &= 47 \text{ mEq} \\ E_K &= - 107 \text{ mV (en milieu Steinberg)} \end{aligned}$$

Les mesures effectuées avec les microélectrodes sensibles donnent une valeur plus faible puisque :

$$a K_e = 2,5 \text{ m Eq (milieu OR}_2\text{)}$$

$$a K_i = 37 \text{ m Eq}$$

$$E_k = -67,8 \text{ mV (milieu OR}_2\text{)}$$

Il est très vraisemblable que E_k se situe entre -107 mV et -67 mV .

Le rapport des perméabilités des follicules de *Pleurodèles* a été estimé à 0,034, valeur plus faible que celle rapportée par MORRILL et al. (1977) chez *Rana* (0,06) et par O'CONNOR et al. (1977) chez *Xenopus*. La valeur de $E_k = -67 \text{ mV}$ est très certainement la valeur la plus proche de la pile potassique compte tenu du fait que le rapport P_{Na}/P_K est voisin de 0,034 et que E_k mesurée en milieu OR_2 est plus proche de la valeur moyenne des potentiels de membrane des ovocytes de Pleurodèle. Dans ces conditions, l'activité des ions K^+ qui est de 37 m Eq dans les ovocytes non stimulés passe à 16 m Eq à la fin de la maturation.

Une modification comparable a été observée lors de la maturation des ovocytes de *Bufo* par DICK et HO YEN (1974). Chez cette espèce, la concentration des ions K^+ intraovocytaire chute à 15 m Eq. Bien qu'il s'agisse d'une mesure de concentration et non d'activité, les auteurs (voir Tableau I) s'accordent à penser que tous les ions K^+ intracellulaires sont libres.

Outre la dépolarisation membranaire, la pompe Na^+-K^+ , sensible à l'ouabaïne, perd toute activité 2 à 3 heures après addition de la progestérone. Chez *Rana*, WEINSTEIN et al. (1982) signalent de même la disparition d'un courant membranaire sensible à la strophantidine et une perte d'activité de la $Na K$ -ATPase.

Enfin, dans les 3 espèces d'Amphibiens étudiés, nous avons mis en évidence une libération de Ca^{2+} intracellulaire qui survient 2 à 3 heures avant la rupture de la vésicule germinative. Les vérifications réalisées avec des électrodes sensibles montrent qu'une augmentation significative de l'activité de Ca^{2+} est détectable 10 minutes après l'addition hormonale.

Il est à noter que la variation transitoire de Ca^+ intervient même en absence de Ca^+ externe. L'importance de cet événement dans le

contrôle du processus de maturation est étayée par les observations suivantes :

- Tous les mimétiques testés (PHMPS, Valinomycine, ions Mn^{2+}) entraînent à la fois la libération de Ca^{2+} et la méiose.

- L'injection d'EGTA, réalisée avant l'apparition du MPF, empêche la méiose (MASUI et al., 1977 ; MOREAU et al. 1976).

- Aucune libération de Ca^{2+} n'est observée lorsque les stimuli appliqués ne parviennent pas à déclencher la reprise de la méiose. C'est le cas pour des ovocytes de petite taille soumis à l'action de la progestérone et pour les ovocytes de Pleurodèle saisis en fin d'accroissement et prélevés pendant la saison de repos sexuel (mai à septembre). Le même résultat s'observe lorsque les ovocytes d'Axolotl sont traités à la progestérone en présence d'inhibiteurs variés de la réponse biologique comme la procaine, la théophylline (MOREAU et al. 1980) le propionate de Na ou la cycloheximide (VILAIN et al. 1980). Le caractère réversible de l'action de ces deux derniers agents sur la réponse calcique et sur la maturation est particulièrement suggestif.

En fait, la cycloheximide, qui n'exerce aucun effet sur les propriétés électrophysiologiques de la membrane ovocytaire, inhibe non seulement la libération de Ca^{2+} , mais aussi les synthèses protéiques, la phosphorylation des protéines et la formation du MPF. Les données que nous avons rassemblées ne permettent pas d'assurer qu'une synthèse protéique soit nécessaire pour obtenir la libération du calcium intracellulaire. En effet, la cycloheximide conserve son effet inhibiteur dans le cas des maturations induites par iontophorèse calcique (MOREAU et al., 1976 c) ou par application de l'ionophore A 23187 (WASSERMAN et MASUI 1975 b). L'action de la cycloheximide pourrait donc s'exercer indépendamment sur deux processus très différents : la libération de Ca^{2+} et la synthèse protéique, processus qui apparaissent tous deux également nécessaires au succès de la maturation.

CHAPITRE 4

DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE 4

DISCUSSION GENERALE

En présence de progestérone, les ovocytes des Urodèles évoluent normalement depuis la prophase I jusqu'à la métaphase II ; tous les événements morphologiques décrits chez les Anoures sont parfaitement visibles "*in vitro*". Cependant, les ovocytes de Pleurodèle sont insensibles à l'action de la progestérone pendant la période de repos sexuel - mai à septembre - dans nos conditions d'élevage ; cette période de blocage de la maturation, jamais observée chez l'Axolotl, nous incite à reconsidérer le rôle physiologique des cellules folliculaires.

Nous avons montré pour la première fois chez les Amphibiens l'existence d'un couplage ionique entre les macrovillosités des cellules folliculaires et la membrane plasmique de l'ovocyte par l'intermédiaire des jonctions "gap". On sait que la perméabilité de ces complexes jonctionnels est sensible à la concentration interne des ions Ca^{2+} libres puisqu'en effet leur augmentation intracytoplasmique réduit la perméabilité des jonctions "gap" (ROSE et LOEWENSTEIN, 1975). Lors de la reprise de la méiose ovocytaire des amphibiens, l'augmentation de l'activité ionique du Ca^{2+} intracellulaire est décelable après dix minutes d'incubation hormonale ; le découplage ionique des cellules folliculaires peut être enregistré au bout de quatre vingts minutes ; il est total au delà de 3 heures, moment où la libération transitoire de Ca^{2+} est à son maximum. On pourrait penser que les cellules folliculaires exercent un contrôle négatif permanent sur le déclenchement de la méiose et que la libération intracellulaire de Ca^{2+} permet de lever ce contrôle en rendant la jonction imperméante. C'est dans ce sens que nous pouvons interpréter les vraies maturations obtenues après défolliculation. Nous pensons que les ions Ca^{2+} intraovocytaires régulent directement la perméabilité des jonctions ; pendant la période de repos sexuel, la progestérone

et même ses mimétiques se révèlent inefficaces à déclencher la réponse calcique ; le découplage ovocyte-cellules folliculaires ne peut avoir lieu. Pour que la démonstration soit complète, il suffirait de tester le couplage ionique d'une part en présence de progestérone et d'autre part, en injectant des ions Ca^{2+} pendant la période de blocage. L'injection intracellulaire simultanée de substances fluorescentes de différents poids moléculaires et d'ions Ca^{2+} serait également fort utile bien que la faible taille des cellules folliculaires constitue un obstacle majeur à la réalisation de ces expérimentations.

Outre que la défolliculation déclenche la reprise de la méiose ovocytaire des Amphibiens, elle stimulerait, selon certains auteurs (ZIEGLER et MORRILL, 1977 ; WALLACE et STEINHARDT, 1977), l'activation de la pompe Na-K qui entraînerait une hyperpolarisation de plus de 30 mV. La situation est différente chez le Pleurodèle où le potentiel de membrane des ovocytes folliculés ou dénudés, est un potentiel de diffusion aux ions K^+ et Na^+ . Le transport actif Na-K, sensible à l'ouabaïne ne contribue que pour quelques millivolts (-5 à -7 mV) à la valeur du potentiel de membrane. Cependant, après 3 heures environ d'incubation hormonale, la pompe Na-K cesse son activité. Or, VITTO et WALLACE (1976) et nous mêmes avons montré que l'ouabaïne inhibiteur de la Na-K-ATPase, facilitait la reprise de la méiose induite par la progestérone. Ce même glycoside cardiaque produit une diminution du couplage électrique des cellules du muscle cardiaque (WEINGART 1977); le maintien d'un gradient électrochimique membranaire des ions Na^+ par une pompe électrogène est essentiel pour préserver les jonctions cellulaires (DE MELLO 1976 ; COHEN 1977). Il est possible d'envisager que la pompe Na-K participe à la régulation hormonale des jonctions "gap" ovocytes-cellules folliculaires. Ainsi, l'activité "*in vitro*" de la Na-K ATPase ovarienne de *Rhodnius prolixus* est accrue par l'hormone juvénile (DAVEY et HUEBNER, 1974 ; ABU-HAKIMA et DAVEY, 1979). Chez le Pleurodèle, l'arrêt de la pompe Na-K survient au bout de la 3ème heure d'incubation hormonale, moment où la libération intracellulaire des ions Ca^{2+} est maximale et où le découplage ionique entre les cellules folliculaires et l'ovocyte est total. MORRILL et al. (1971) ont suggéré que la libération intracellulaire de Ca^{2+} pourrait inhiber la pompe Na-K, tandis que KOSTELLOW et al. (1982) démontrent que la forte affinité de l'ouabaïne tritiée pour le complexe enveloppe vitelline-membrane plasmique des

ovocytes de *Rana* disparaît en présence de progestérone. L'hormone serait donc capable de se fixer sur les sites membranaires de la Na-K ATPase. Afin d'éclairer ce problème, il serait particulièrement utile de tester si l'arrêt de la pompe se produit également lorsque la reprise de la méiose est déclenchée par des mimétiques de l'hormone ou si l'injection intracellulaire de Ca^{2+} produit à elle seule cet effet.

Un travail récent apporte un éclairage très intéressant concernant le rôle des cellules folliculaires dans le déclenchement de la maturation des follicules entiers de *Rana* (WEINSTEIN et al. 1983) par des extraits hypophysaires. Une augmentation immédiate de la conductance potassique provoque une hyperpolarisation du follicule. Aucun effet semblable n'est observé avec la progestérone ; l'hyperpolarisation ne peut avoir lieu que si les cellules folliculaires sont couplées ioniquement à l'ovocyte. Il s'agit de savoir si l'augmentation transitoire de la conductance potassique intéresse tout le plasmalemme ovocytaire ou ne s'établit que par l'intermédiaire des jonctions. Cependant, ce changement de la conductance potassique ne semble pas nécessaire au déclenchement de la maturation puisqu'en présence de progestérone et de ses mimétiques, les ovocytes se dépolarisent de manière lente et continue. Cette dépolarisation membranaire résulte de la réduction de la sélectivité de la membrane aux ions K^+ qui accompagne d'ailleurs dans le temps la libération intracellulaire des ions Ca^{2+} . Selon MORRILL et ZIEGLER (1980) la diminution de P_k serait seule responsable de la diminution du rapport P_{Na}/P_k puisque l'influx de ^{22}Na ne varie pas au cours de la maturation des ovocytes de *Rana*. Chez *Xenopus*, O'CONNOR et al. (1977) affirment au contraire que l'influx de Na^+ est multiplié par 5 et SCHLICHTER (1983) enregistre une augmentation de $[\text{Na}^+]_i$ responsable de l'apparition de potentiels d'action spontanés entre la métaphase I et la métaphase II des ovocytes de *Rana*. Chez les Urodèles, l'activité intracellulaire des ions Na^+ au cours de la maturation n'a pas été testée et nous ne pouvons affirmer si la perméabilité sodique est modifiée.

Nous avons personnellement montré que les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} externes stabilisent la structure de la membrane et contrôlent les conductances sodique et potassique de manière comparable à la situation décrite pour les membranes excitables (FRANKEUHAUSER et HODGKIN, 1957). Comme l'ont démontré

BRUMMETT et DUMONT (1976), il existe des charges négatives à la surface membranaire des microvillosités des ovocytes de Xénope où les ions divalents agiraient comme il est supposé dans le cas des surfaces membranaire des cellules nerveuses (GILBERT et EHRENSTEIN, 1969), soit par un effet d'écran, soit par fixation sur les sites négatifs. Dans une grande variété de cellules dont les ovocytes de *Rana pipiens* (MORRILL et al., 1964) le calcium extracellulaire détermine le taux intracellulaire de sodium et de potassium. On pouvait donc penser que les ions Ca^{2+} externes étaient indispensables à la reprise de la méiose ainsi que MERRIAM (1971 a) l'avait affirmé. Nous montrons cependant que les maturations des ovocytes de Pleurodèle et d'Axolotl se déroulent normalement jusqu'à la métaphase II en absence de Ca^{2+} . Ces données nous permettent d'affirmer que la réponse calcique n'est pas due à l'augmentation d'un influx d'ions Ca^{2+} et qu'elle survient même quand les propriétés membranaires sont considérablement perturbées.

La libération des ions Ca^{2+} intracellulaires s'avère au contraire d'autant plus importante qu'elle ne se produit jamais pendant la période de repos sexuel où les ovocytes de Pleurodèle même soumis à la progestérone ne subissent ni maturation, ni modification de leurs paramètres électriques membranaires. On peut supposer que la libération de Ca^{2+} dans l'ovocyte modifie la perméabilité membranaire. Ainsi, dans des systèmes cellulaires aussi divers que les globules rouges (WHITTAM, 1969 ; LEW 1969 ; ROMERO et WHITTAM, 1971) les cellules hépatiques (VAN ROSSUM, 1970) et les neurones d'escargot (MEECH et STRUMWASSER, 1970) toute augmentation du Ca^{2+} intracellulaire s'accompagne d'un accroissement de la perméabilité aux ions K^+ . Or, nos résultats font apparaître un mécanisme inverse puisque la maturation des ovocytes s'accompagne d'une augmentation transitoire du Ca^{2+} intracellulaire et d'une diminution de la perméabilité potassique. Une intéressante perspective de recherche consistera donc à vérifier si l'introduction iontophorétique de Ca^{2+} peut influencer sur la perméabilité cellulaire passive.

Outre les organites cytoplasmiques, il a été proposé que la régulation de la concentration du calcium libre intracellulaire dans les cellules excitables et non excitables est engendré par un mécanisme d'échange Na-Ca qui permet de maintenir une faible concentration de Ca^{2+} intracytoplasmique (BLAUSTEIN et HODGKIN, 1969 ; BAKER 1972) : la sortie de Ca^{2+} est couplée avec l'entrée de Na^+ . Cet efflux de Ca^{2+} ATP-dépendant est bloqué en milieu

dépourvu de Na^+ (DIPOLO et BEAUGE, 1979). Or, un tel milieu entraîne une hyperpolarisation transitoire des ovocytes de Pleurodèle. La phase d'hyperpolarisation pourrait résulter de l'inversion du mécanisme d'échange Na-Ca (sortie de Na^+ , entrée de Ca^{2+}) en admettant comme l'ont fait de nombreux auteurs (MULLINS 1977 ; HORACKOVA et VASSORT, 1979) que cet échange est électrogène et en faveur de l'efflux sodique. Le retour à la valeur de E_m pourrait être attribué à l'arrêt de l'échange Na-Ca. Au cours de la maturation, nous avons enregistré l'évolution d'un efflux calcique contre le gradient électrochimique qui nous laisse supposer que cet efflux est couplé à une entrée de Na^+ qui ne peut plus être compensée par la pompe Na-K bloquée dès la 3ème heure de la maturation. Un tel mécanisme entraînerait un accroissement de l'activité intracellulaire de Na^+ .

L'excitabilité électrique était considérée comme une caractéristique spécifique de certaines cellules hautement différenciées comme les cellules nerveuses et musculaires. Il est devenu évident que cette propriété se retrouve même au niveau des ovocytes non maturés et dans les oeufs des animaux appartenant à des phylums très différents. Chez les Amphibiens Anoures, il est possible d'activer des canaux membranaires (BAUD et al., 1982 ; SCHLICHTER, 1983 ; MILEDI 1982 ; BARISH 1983) alors qu'en utilisant les mêmes techniques de voltage imposé, nous n'avons pu, jusqu'à présent, activer ces mêmes canaux membranaires dans les ovocytes de Pleurodèle.

Cette différence au niveau des propriétés membranaires se révèle très importante quand on sait que les oeufs des Anoures, monospermiques, présentent un potentiel d'activation dès la pénétration du spermatozoïde alors que les oeufs de Pleurodèle, polyspermiques, ne révèlent aucune variation significative de leur potentiel de membrane au moment de la fécondation (CHARBONNEAU et al. 1983).

L'absence de potentiel de fécondation de l'oeuf d'Urodèle semble compatible avec la théorie du blocage électrique à la polyspermie, développée par L.A. JAFFE (1976, 1980). Les mécanismes moléculaires dépendants du potentiel susceptible de réguler l'interaction des gamètes sont à rechercher. Selon GOULD-SOMERO (1981), l'activation locale des canaux sodiques par le spermatozoïde suffirait à déclencher les réactions d'activation de l'oeuf qui excluent

la pénétration des spermatozoïdes surnuméraires.

L'utilisation des techniques de bruit membranaire ou de patch-clamp devrait nous permettre de détecter les variations les plus précoces de la perméabilité de la membrane lorsque celle-ci interagit soit avec l'hormone dans le cas des ovocytes soit avec le spermatozoïde dans le cas de l'oeuf. Il convient de rechercher quels mécanismes communs peuvent sous-tendre ces phénomènes de blocage et de déblocage qui paraissent régulés par des états transitoires de la membrane plasmique et qui impliquent toujours l'intervention des ions calcium.

Publication n° 1

- J.P. VILAIN, A. CAPURON et P. GUILBAULT, 1971 : Caractéristiques électriques membranaires des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien Urodèle). *C.R. Soc. Biol.*, 165, 1594-1600.

Caractéristiques électriques membranaires des ovocytes
de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien Urodèle).

par J. P. VILAIN, A. CAPURON et P. GUILBAULT.

La membrane cellulaire des ovocytes est électriquement polarisée, douée de perméabilité plus ou moins forte, voire sélective, vis-à-vis des substances susceptibles de la traverser, et en particulier des ions. Il en résulte des propriétés électriques passives que nous nous sommes proposé de mesurer sur les ovocytes d'un Amphibien Urodèle : *Pleurodeles waltlii* Michah.

Les nombreuses études réalisées sur les systèmes membranaires entourant les œufs d'Echinodermes, de Téléostéens et d'Amphibiens (1 à 4) ont permis de déterminer un potentiel membranaire (PM), une résistance électrique (R_m), et une capacité (C_m). De plus, certains

(1) A. Tyler, A. Monroy, Cy Kao et H. Grundfest, *Biol. Bull.*, 1955, t. 109, p. 352.

(2) Cy Kao, *J. Gen. Physiol.*, 1956, t. 40, p. 107.

(3) T. Maeno, *J. Gen. Physiol.*, 1959, t. 43, p. 139.

(4) G. A. Morrill et D. E. Watson, *J. Cell Physiol.*, 1966, t. 67, p. 85.

auteurs (3, 5) précisent que la valeur du PM diffère largement selon le degré de maturité des ovocytes de Batraciens anoures tels que le Craud et le Xénope.

Cette présente note constitue une étude concernant la détermination des caractéristiques électriques membranaires des ovocytes de Pleurodèle.

Techniques. — Les ovocytes sont libérés de l'ovaire après ouverture de la cavité abdominale de la femelle ; ils sont isolés et équilibrés pendant 4 heures dans le milieu de Steinberg dont la composition ionique en mM/l est la suivante : NaCl = 58 ; KCl = 0,67 ; Ca (NO₃) 4H₂O = 0,33 ; MgSO₄ 7H₂O = 0,83. La solution est tamponnée par un mélange Tris-HCl qui maintient le pH à une valeur de 7,4.

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

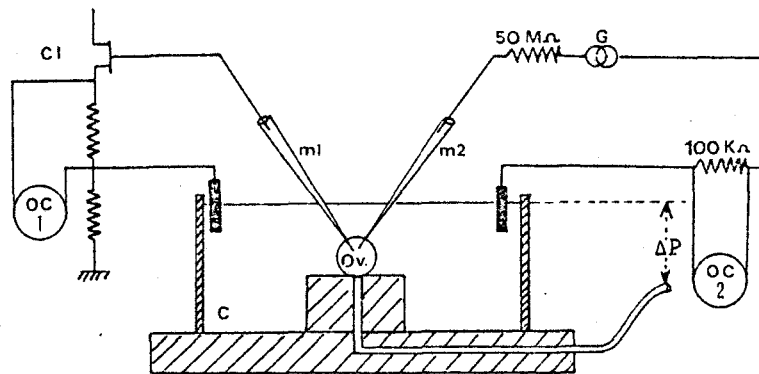


Fig. 1. — Schéma du montage utilisé pour l'enregistrement du potentiel de membrane et de la résistance de membrane des ovocytes.

m1. microélectrode d'enregistrement ; m2. microélectrode de stimulation ; Ov. ovocyte ; C. cuve ; G. générateur de courant constant ; C.I. changeur d'impédance ; O.C.1. première voie de l'oscilloscope ; O.C.2. deuxième voie de l'oscilloscope.

Les ovocytes sont placés sur un drain de 400 μ de diamètre, leur maintien étant assuré par une pression négative de quelques millimètres d'eau (6) (fig. 1).

Le PM est mesuré entre une électrode indifférente et une microélectrode remplie de KCl 3 M implantée dans l'ovocyte (fig. 1). Le diamètre à la pointe de cette microélectrode est au maximum de 0,5 μ, sa résistance est comprise entre 5 et 15 MΩ. Les électrodes sont reliées à un changeur d'impédance (7) par l'intermédiaire de deux électrodes au

(5) Y. Kanno et W. R. Loewenstein, *Exp. Cell Res.*, 1963, t. 31, p. 149.

(6) D. A. T. Dick et S. G. A Mc Laughlin, *J of Physiol.*, 1969, t. 205, p. 271

(7) J. Cheval, Bull. d'information Technique CNRS, n° 2 mai 1966.

calomel impolarisables. L'application de courants polarisants, permettant la mesure de la résistance et de la capacité membranaire, est réalisée à l'aide de la deuxième microélectrode.

Résultats. — I. POTENTIEL DE MEMBRANE. — Il est bien connu que l'ovocyte, prélevé dans l'ovaire, est entouré d'un système membranaire complexe présentant de l'intérieur vers l'extérieur : le plasmalemmme, la zona radiata, les cellules folliculaires et l'épithélium interne de l'ovaire (8). De ce fait, cet ensemble membranaire, très élastique, constitue un obstacle à la pénétration de la microélectrode : en effet, lorsque la pointe de celle-ci est au contact de la surface membranaire, il se produit une petite invagination accompagnée d'une variation de potentiel de -10 à -15 mV ; elle correspondrait, selon certains auteurs (5), à l'insertion de la microélectrode dans l'espace formé par la membrane

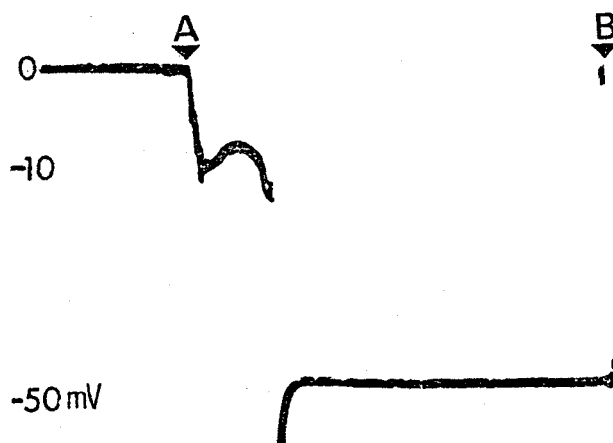


Fig. 2. — Evolution du potentiel lors de la pénétration de la microélectrode dans l'ovocyte.

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

épithéliale 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 mV et -70 mV.

Ces résultats (fig. 2) sont semblables à ceux obtenus sur les ovocytes de *Bufo bufo* (3), de *Rana pipiens* (4) et de *Xenopus laevis* (5) bien que, chez ce dernier animal, les valeurs du PM mesurées soient plus faibles.

Nos résultats montrent que le niveau de PM atteint dépend du diamètre des ovocytes, comme l'atteste la fig. 3.

De plus, ce potentiel ne dépend pas du lieu de pénétration, 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

(8) H. Wartenberg et W. Schmidt, *Z. Zellforsch.*, 1961, t. 54, p. 118.

le pôle animal et le pôle végétatif, ne présentent aucune différence significative entre les valeurs du PM enregistrées dans l'hémisphère animal et dans l'hémisphère végétatif (tableau). Il faut enfin remarquer que, pour ces mêmes ovocytes, les valeurs de PM sont très dispersées. Cette dispersion semblerait montrer que ces cellules de diamètre égal sont à un stade de maturité différent.

II. RÉSISTANCE ET CAPACITÉ MEMBRANAIRES. — *Résistance.* — La valeur de la résistance membranaire (r_m) de l'ovocyte est déterminée par la pente dV/di des courbes voltage-courant. Le tracé de la fig. 4

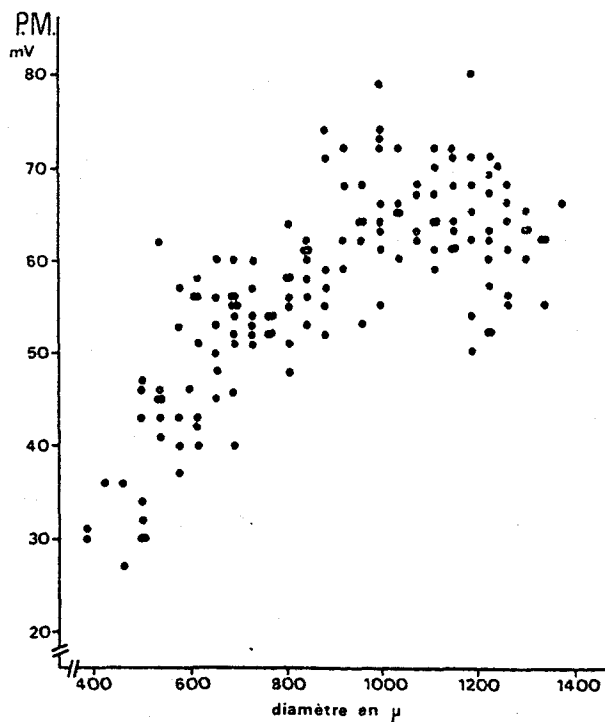


Fig. 3. — Amplitude du P.M. en fonction du diamètre des ovocytes.

donne un exemple de la variation du potentiel en fonction du temps, lors de l'application d'un échelon de courant rectangulaire de part et d'autre de la membrane. Cette variation est exponentielle, elle montre que la membrane est constituée, d'un point de vue électrique, d'une résistance et d'une capacité en parallèle. La fig. 4 montre la relation classique voltage-courant d'un ovocyte dont la membrane ne présente pas de propriétés de rectification (la courbe reste linéaire).

Connaissant le diamètre, la résistance totale (r_m) de l'ovocyte est convertie, en la multipliant par la surface membranaire de la cellule, en une résistance spécifique R_m ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) (1, 2).

Les valeurs de R_m que nous avons obtenues sont de l'ordre de $3000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ pour les petits ovocytes et de $15.000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ pour les ovocytes de grand diamètre. Ces résultats sont comparables à ceux trou-

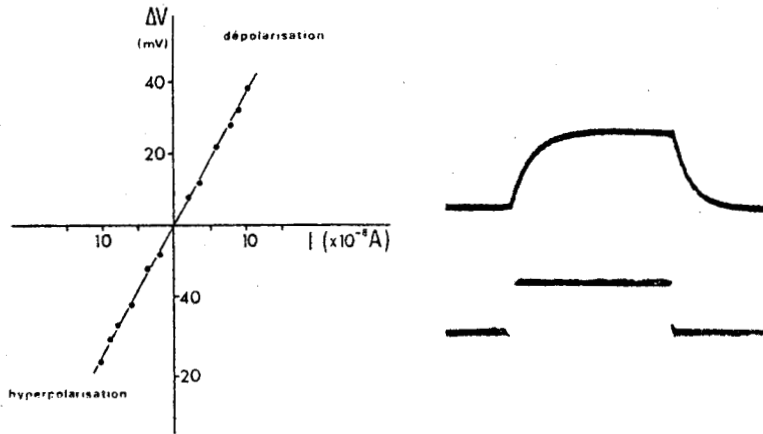


Fig. 4. — Relation voltage-courant d'un ovocyte (P.M. : -63 mV ; diamètre : 1154μ). Enregistrement de la variation de potentiel pendant l'application d'un courant.

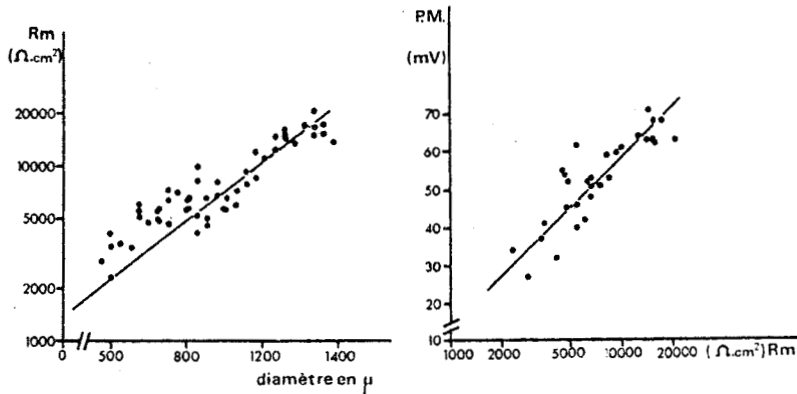


Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 5. — Relation entre le log de R_m et le diamètre des ovocytes.
 ——— droite de régression $y = 0,00081 x + 3,13$ ($r = 0,90$).

Fig. 6. — Relation entre le P.M. et log. de R_m .
 ——— droite de régression $y = 45,8 x - 124,6$ ($r = 0,93$).

vés par Maeno (3) sur les ovocytes de *Bufo bufo* ($R_m = 25.000 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Il faut signaler que la résistance totale (r_m), mesurée dans nos conditions expérimentales, englobe la résistance de la membrane ovocytaire

et la résistance de l'épithélium interne de l'ovaire : celle-ci peut être considérée comme négligeable, car Kanno et Loewenstein (5) estiment sa valeur à moins de 2,5 p. 100 de la résistance totale.

Hémisphère	PM en mV	Nombre d'ovocytes testés
Hémisphère animal.....	62,13; $\sigma = 10,47$	30
Hémisphère végétatif....	61,72, $\sigma = 10,98$	22

Valuers moyennes du PM enregistrées dans l'hémisphère animal et dans l'hémisphère végétatif.

Enfin, la résistance spécifique (R_m) dépend, comme pour le PM, de la taille des ovocytes (fig. 5). 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 PM et le logarithme décimal de la R_m dépendent tous deux du diamètre met en évidence une relation entre le PM et le log. R_m (fig. 6), la corrélation entre ces deux paramètres étant très significative ($r = 0,93$). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Kanno et Loewenstein (5) sur les ovocytes de Xénope.

Capacité. — La valeur de la capacité membranaire est calculée à partir de l'équation suivante : $\tau_m = R_m \cdot C_m$

τ_m définit la constante de temps ; elle correspond dans le cas d'une sphère, donc de l'ovocyte, au temps mis par la variation du potentiel provoquée par l'application d'un courant rectangulaire de part et d'autre de la membrane pour atteindre 63 p. 100 de la valeur initiale. τ_m est ainsi calculée graphiquement à partir des tracés semblables à celui de la fig. 3. Les valeurs de C_m se situent entre 4,8 et 8,8 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (moyenne : 6,3 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ $\sigma = 1,3$). Ces résultats sont sensiblement identiques à ceux obtenus sur les ovocytes de *Bufo bufo* (3) (entre 6 et 11 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$) et sur les ovocytes de *Xenopus laevis* (5) ($5,4 \pm 0,7$ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$).

Conclusion. — L'analyse de la variation du PM et de la résistance membranaire en fonction du diamètre des ovocytes de *Pleurodeles* 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 doivent résulter, dans de telles conditions, d'une évolution de la perméabilité membranaire des ovocytes. Ceci s'accorde avec les observations de Maeno (3) qui démontrent que le PM des jeunes ovocytes correspond principalement à un potentiel de pile de concentration aux ions K^+ (la contribution des ions Cl^- et Na^+ au maintien du PM étant très faible), tandis que, pour les ovocytes murs, la perméabilité n'est plus attribuable uniquement aux ions K^+ . Ainsi, l'évolution précise des caractéristiques électriques passives, témoins des modifications de la perméabilité ionique membranaire, va nous permettre de déterminer, grâce à l'étude des effets de milieux de

concentration anormale, notamment en ions K^+ et Na^+ , l'évolution des conductances ioniques pendant la maturation des ovocytes de *Pleurodeles*.

*(Laboratoire de Physiologie cellulaire
et Laboratoire d'Embryologie expérimentale, U.E.R. de Biologie,
Université des Sciences et des Techniques, B.P. 36, 59 - Lille).*

Publication n° 2

- J.P. VILAIN, A. CAPURON et P. GUILBAULT, 1971 : Influence des cations monovalents K^+ et Na^+ sur le potentiel intracellulaire des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien urodèle). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 276, 573-576.

PHYSIOLOGIE CELLULAIRE. — *Influence des cations monovalents K^+ et Na^+ sur le potentiel intracellulaire des ovocytes de Pleurodeles waltlii Michah. (Amphibien Urodèle)*. Note (*) de MM. Jean-Pierre Vilain, Alfred Capuron et Pierre Guilbault, présentée par M. Louis Gallien.

Les modifications de la concentration des cations K^+ et Na^+ dans le milieu de Steinberg mettent en évidence le rôle de ces ions dans le maintien du potentiel intracellulaire des ovocytes de Pleurodèle. La technique électrophysiologique utilisée montre une contribution importante, mais non exclusive du potassium et, à un degré moindre, celle du sodium.

Nous avons montré, antérieurement, la présence d'un potentiel intracellulaire (P. M.) à travers le complexe membranaire (plasmalemme, épithéliums folliculaire et ovarien) entourant l'ovocyte de *Pleurodeles waltlii*. L'amplitude du potentiel diffère selon le degré de maturité des ovocytes. En effet, l'ovogenèse s'accompagne d'une augmentation de la valeur du P. M. de -30 à -70 mV (¹). Dans le même temps, la résistance membranaire spécifique (R_m) autre caractéristique électrique passive de l'ovocyte augmente de 3 000 à 15 000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. La valeur de la R_m laisse supposer que ce complexe membranaire est doué d'une perméabilité extrêmement réduite, diminuant au cours de la maturation. Il était donc intéressant de connaître la nature des diverses espèces ioniques qui, par leurs mouvements, maintiennent une différence de potentiel entre les milieux intra- et extra-ovocytaires. Pour ce faire, nous avons étudié les modifications du potentiel de membrane des ovocytes induites par des changements de concentrations ioniques.

TECHNIQUES. — Les expériences sont réalisées sur les ovocytes isolés de Pleurodèle. Le potentiel de membrane (P. M.) est enregistré selon la technique de dérivation transmembranaire (¹).

Le milieu de survie utilisé est le liquide de Steinberg dont les concentrations des ions K^+ et Na^+ sont respectivement de 0,67 et de 58 mEq/l. Les solutions hyperpotassiques résultent de l'apport d'ions K^+ sous la forme de K_2SO_4 . L'apport de K_2SO_4 entraîne corrélativement une augmentation de la pression osmotique par rapport à celle de la solution de référence. Il n'a pas été tenu compte de cette augmentation, celle-ci restant très faible. La concentration potassique externe ($[K^+]_e$) est réduite en deçà de 0,67 mEq/l en diminuant la concentration de KCl du milieu de Steinberg. Les milieux hyposodiques résultent de la diminution de la concentration de NaCl, $[Cl^-]_e$ étant maintenue constante par apport de chlorhydrate de choline.

RÉSULTATS. — A. *Rôle éventuel des épithéliums folliculaire et ovarien dans les échanges avec le milieu externe.* — L'ovocyte est entouré intimement par les cellules folliculaires et le feuillet interne de l'épithélium ovarien, il était donc nécessaire de connaître l'influence éventuelle de ces épithéliums sur le P. M. Pour 75 ovocytes, dont les diamètres sont compris entre 800 et 1 300 μ , la valeur moyenne du P. M. est de $-62,84$ mV ($\sigma = 7,02$). L'ablation des adhérences épithéliales n'entraîne aucune modification significative du P. M. puisque sa valeur moyenne est de $-61,66$ mV ($\sigma = 10,56$).

Dans ces conditions, les épithéliums entourant l'ovocyte ne présentent aucune incidence sur la mesure du potentiel intracellulaire. En outre, les travaux de Kanno et Loewenstein (²) démontrent leur faible résistance électrique chez *Xenopus laevis*.

Ces résultats laissent supposer que ces épithéliums constituent une barrière

extrêmement diffusible aux ions et ne perturbent donc pas les échanges entre le milieu intra-ovocytaire et le milieu externe.

B. *Influence de $[K^+]_e$ sur le P. M.* — Pour l'interprétation des résultats, il a été tenu compte du diamètre des ovocytes.

Les valeurs de P. M. obtenues pour les différentes $[K^+]_e$ se fixent à un niveau stable plus ou moins rapidement, généralement après 2 mn d'action de ces milieux pour les petits ovocytes et après une douzaine de minutes pour les ovocytes de grande taille. La figure 1 donne un exemple de la variation du P. M. d'un ovocyte jeune (courbe A) et d'un ovocyte plus âgé (courbe B) en fonction du temps d'application du milieu de Steinberg enrichi 10 fois en ions K^+ .

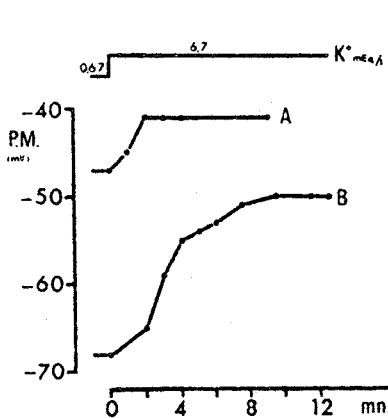


Fig. 1

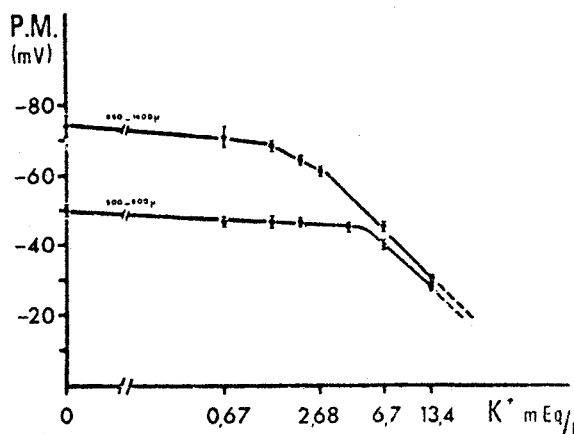


Fig. 2

Fig. 1. — Influence d'un milieu hyperpotassique ($[K^+]_e \times 10$) sur le P. M. des ovocytes. Courbe A : ovocyte de diamètre : 530 μ . Courbe B : ovocyte de diamètre : 960 μ .

Fig. 2. — Variation du P. M. (échelle linéaire) en fonction de la concentration extracellulaire de potassium (échelle logarithmique).

Dans tous les cas, la variation du P. M. est réversible. Les résultats, ainsi obtenus, indiquent que le milieu dépourvu en ions K^+ n'entraîne qu'une faible hyperpolarisation alors que le milieu enrichi en K provoque des dépolarisations très nettes et d'autant plus importantes que $[K^+]_e$ est plus forte (fig. 2) :

— Pour des ovocytes de grande taille (950-1 400 μ) la relation $P. M. = f(\log K_e)$ est linéaire lorsque $[K^+]_e$ est supérieure à 2,68 mEq/l. La pente de la droite est de 44 mV lorsque $[K^+]_e$ varie d'un facteur 10. Lorsque $[K^+]_e$ est inférieure à 2,68 mEq/l, le P. M. varie faiblement.

— Pour des ovocytes plus petits (500-600 μ), le P. M. reste quasi stable pour $[K^+]_e$ 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 dix fois $[K^+]_e$.

Par ailleurs, la figure 2 permet de préciser que le P. M. varie notablement à partir d'un seuil de concentration en ions K^+ d'autant plus faible que le diamètre des ovocytes est plus grand.

C. Influence de $[Na^+]_e$ sur le P. M. — Lors de l'application d'un milieu dépourvu en ions Na^+ , le complexe membranaire de l'ovocyte peut réagir selon trois manières différentes :

— Lorsque les ovocytes matures (950-1 400 μ) sont immergés dans un milieu dépourvu de Na, il se produit un effet hyperpolarisant qui ne dure que quelques minutes, puisqu'après 10 mn le P. M. reprend sa valeur initiale (*fig. 3*, courbe B).

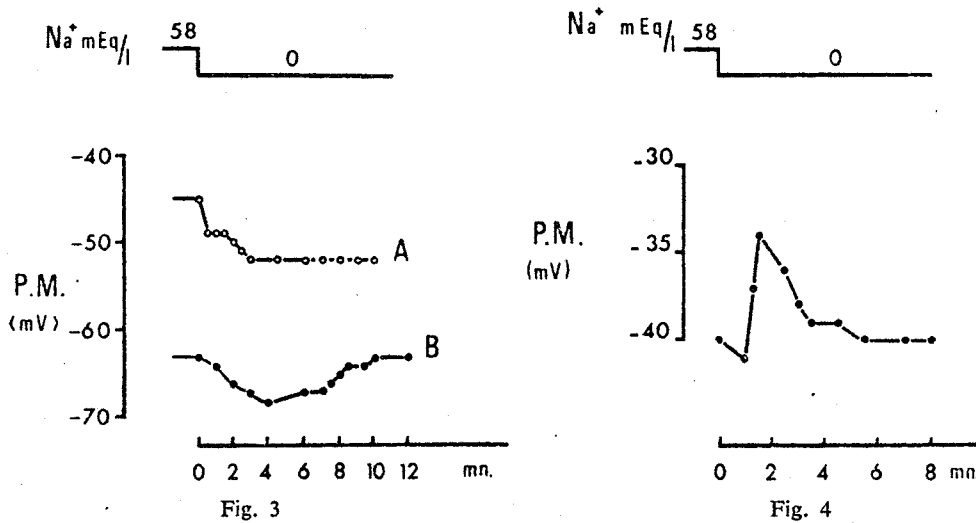


Fig. 3. — Evolution du P. M. au cours du temps en milieu $[Na^+]_e = 0$. Courbe A : ovocyte de diamètre : 570 μ . Courbe B : ovocyte de diamètre : 960 μ .

Fig. 4. — Evolution du P. M. au cours du temps en milieu $[Na^+]_e = 0$. Ovocyte de diamètre : 530 μ .

— Pour ce qui est des ovocytes immatures (500-600 μ) deux effets opposés sont observés.

a. Certains ovocytes s'hyperpolarisent progressivement de quelques millivolts, effet qui peut être attribué à la fuite des ions Na^+ vers le milieu externe. Après 2 ou 4 mn, l'amplitude du P. M. atteint une valeur maximale qui reste stable pendant toute la durée d'action du milieu anormal (*fig. 3*, courbe A).

b. D'autres ovocytes, par contre, se dépolarisent transitoirement sous l'action du milieu sans Na (*fig. 4*) pour finalement recouvrer leur polarisation membranaire initiale. L'amplitude maximale de la dépolarisation transitoire est en moyenne de 4 à 6 mV. Les effets des milieux hyposodiques sont semblables à ceux qui viennent d'être décrits, ils sont seulement moins amples et d'autant plus faibles que $[Na^+]_e$ est proche de la valeur normale.

DISCUSSION. — Les résultats présentés concernant l'influence des cations monovalents sur le P. M. mettent en évidence la contribution importante, mais non exclusive, des mouvements des ions K^+ et, pour une moindre part, ceux du sodium dans le maintien du P. M., puisqu'il a été montré que les ions Cl^- et Ca^{++} ne semblent jouer aucun rôle (3).

Si le potassium est distribué passivement, le P. M. peut être représenté par l'équation de Nernst.

$$P. M. = 58 \log \frac{[K^+]_i}{[K^+]_e} \text{ (à } 20^\circ\text{C).}$$

Une augmentation de dix fois $[K^+]_e$ entraîne, dans ces conditions, une variation de 58 mV. Dans nos expériences, les variations de potentiel enregistrées sur les ovocytes de petite taille (40 mV) et de grande taille (44 mV) sont inférieures à celles prévues par la relation de Nernst. On peut en déduire que le potentiel de membrane n'est pas dû à un potentiel de pile de concentration aux ions K^+ . En effet, bien que le complexe membranaire des ovocytes soit faiblement perméable aux ions Na^+ , la participation sodique ne peut être négligée, contrairement aux conclusions de Maeno ⁽⁴⁾ sur les ovocytes de *Bufo bufo*. Cependant, il n'est pas possible d'expliquer actuellement les variations complexes du P. M. en absence de sodium. La difficulté d'interprétation de ces derniers effets est à rapprocher des observations de Dick et Lea ⁽⁵⁾ : en absence de sodium, l'efflux sodique diminue avec le temps pour certains ovocytes de *Bufo*, alors que pour d'autres l'efflux augmente. Ces mêmes auteurs ⁽⁶⁾ montrent que cet efflux de Na^+ est dû à un transport actif.

En conséquence, l'ovocyte de Pleurodèle n'est pas en équilibre thermodynamique avec le milieu extérieur au cours de l'ovogenèse. Il est donc permis d'invoquer, dans ces conditions, un mécanisme actif du transport des ions Na^+ .

(*) Séance du 9 octobre 1972.

(1) J.-P. VILAIN, A. CAPURON et P. GUILBAULT, *C. R. Soc. Biol.*, 165, 1971, p. 1594-1600.

(2) Y. KANNO et W. R. LOEWENSTEIN, *Exp. Cell Res.*, 31, 1963, p. 149-166.

(3) J.-P. VILAIN, *Thèse 3^e cycle*, Lille, 1972.

(4) T. MAENO, *J. Gen. Physiol.*, 43, 1959, p. 139-157.

(5) D. A. T. DICK et E. J. A. LEA, *J. Physiol.*, Londres, 174, 1964, p. 55-90.

(6) D. A. T. DICK et E. J. A. LEA, *J. Physiol.*, Londres, 191, 1967, p. 289-308.

*Laboratoire de Physiologie Cellulaire
et Laboratoire d'Embryologie Expérimentale,
UER de Biologie,
Université des Sciences et Techniques,
B. P. n° 36, 59650 Villeneuve-d'Ascq, Nord.*

Publication n° 3

- J. P. VILAIN, 1978 : Contribution des cations divalents au maintien du potentiel de membrane des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien Urodèle). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 286, 1319-1322.

BIOÉLECTRICITÉ. — *Contribution des cations divalents au maintien du potentiel de membrane des ovocytes de Pleurodeles waltlii Michah (Amphibien Urodèle).* Note (*) de Jean-Pierre Vilain, présentée par M. Alfred Fessard.

L'augmentation ou la suppression de la concentration des ions Ca^{++} et Mg^{++} ne modifie pas significativement la valeur du potentiel de membrane (E_m) des ovocytes de Pleurodèle. Cependant, l'addition d'agents chélateurs, tels que l'EGTA et l'EDTA à des solutions dépourvues des ions divalents, entraîne une dépolarisation et une augmentation de la conductance membranaire. On en déduit que les ions Ca^{++} et Mg^{++} sont nécessaires pour stabiliser la membrane plasmique des ovocytes.

When the external concentration of Ca and Mg is changed, the oocyte membrane potential, in the Urodela Amphibian: Pleurodeles waltlii, is not significantly modified. The addition of chelator agents, EGTA and EDTA in Ca, Mg free Steinberg solution promotes a membrane depolarisation and the rise of membrane conductance. It is concluded that divalent ions Ca^{++} and Mg^{++} are needed to maintain a potential difference between internal and external medium of the oocyte.

Les ions Ca^{++} et Mg^{++} stabilisent la structure des membranes excitables et contrôlent à l'état de repos, les conductances sodique et potassique (¹). Dans une grande variété de cellules dont les ovocytes de *Rana pipiens* (²), le calcium extracellulaire détermine le taux intracellulaire de sodium et de potassium. Quant au potentiel de membrane des ovocytes de *Bufo bufo* (³) et de *Rana pipiens* [(⁴), (⁵)] sa valeur est fonction de la concentration des ions Ca^{++} dans le liquide de Ringer.

Nous avons étudié le rôle des ions divalents (Ca^{++} , Mg^{++} , Sr^{++} , Ba^{++}) sur la valeur (E_m) du potentiel de membrane des ovocytes de Pleurodèle; dans certains cas la mesure de la résistance totale permet de connaître le devenir de la conductance membranaire.

MATÉRIELS ET TECHNIQUES. — Les ovaires sont prélevés sur des Pleurodèles élevés au laboratoire. Les ovocytes sont isolés sans être défollicularisés, puis regroupés en deux lots en fonction de leur taille. Le potentiel intracellulaire (E_m) ainsi que la résistance électrique (r_m) sont enregistrés selon la technique de dérivation transmembranaire décrite antérieurement (⁶).

Le milieu physiologique de référence utilisé est le liquide de Steinberg dont la composition est la suivante : NaCl : 58 mM; KCl : 0,67 mM; Mg SO_4 : 0,82 mM; $\text{Ca (NO}_3)_2$: 0,34 mM, tampon tris HCl à pH 7,4-7,6. Ce milieu est ensuite modifié en supprimant totalement les ions Ca^{++} et les ions Mg^{++} par l'addition soit de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) qui complexe les ions Ca^{++} et Mg^{++} , soit de l'acide éthylène glycol bis (amino éthyl ether) — N, N' — tétra-acétique (EGTA) qui complexe les ions Ca^{++} .

Des milieux hypercalciques et hypermagnésiens ont été réalisés par substitution des ions Na^+ par les ions Ca^{++} et Mg^{++} afin de ne pas augmenter la pression osmotique du milieu extérieur. Elle est ajustée par un apport de saccharose puis elle est contrôlée à l'osmomètre.

RÉSULTATS. — 1. *Modifications de E_m en milieu Steinberg dépourvu de calcium.* — L'addition de l'EGTA (1 mM) au milieu de Steinberg dépourvu de calcium se manifeste par une dépolarisation membranaire de 19 mV environ pour les gros ovocytes, et de 9 mV pour les petits ovocytes. Le potentiel devient parfaitement stable au bout d'une dizaine de minutes, et peut se maintenir ainsi à sa nouvelle valeur pendant plus de 1 h. Dans tous les cas nous avons obtenu la réversibilité du phénomène.

2. *Modifications de E_m et de r_m en milieu Steinberg EDTA dépourvu de calcium et de magnésium.* — La valeur de E_m ne change pas lorsque le milieu extracellulaire est simplement dépourvu de ses ions divalents.

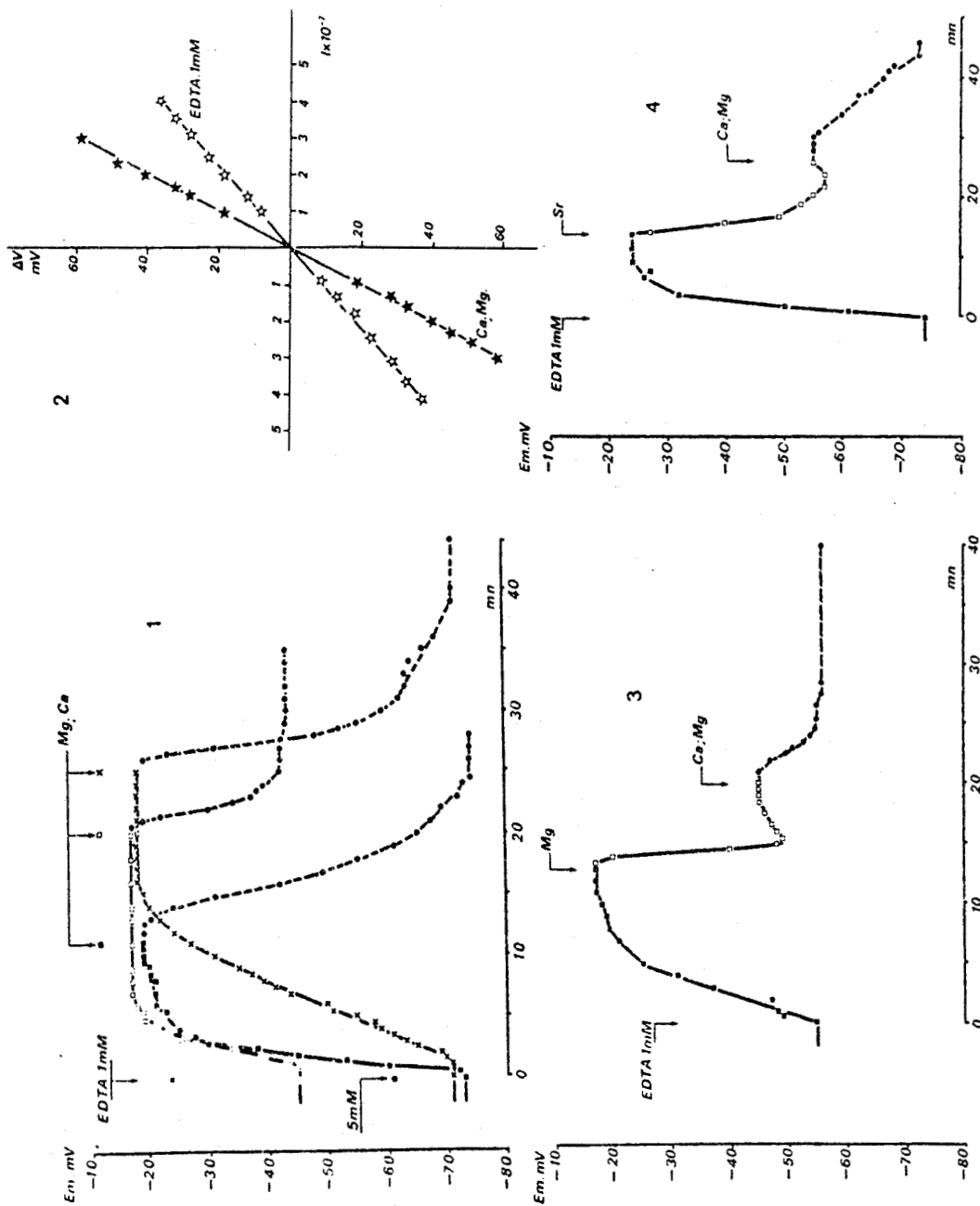


Fig. 1. - Évolution de E_m en milieu Steinberg EDTA dépourvu des ions Ca^{++} et Mg^{++} . (x), diamètre de l'ovocyte 1112 μ , EDTA 1 mM; (■), diamètre de l'ovocyte 960 μ , EDTA 5 mM; (□), diamètre de l'ovocyte 692 μ , EDTA 1 mM. Retour dans le Steinberg normal pour tous les ovocytes (●). $Ca^{++} = 0.34$ mEq; $Mg^{++} = 0.82$ mEq.

Fig. 2. - Relations voltage-courant dans le milieu Steinberg normal (x) et dans le Steinberg EDTA (1 mM) dépourvu des ions divalents (*).

Fig. 3. - Évolution de E_m en milieu Steinberg EDTA 1 mM, 0 Ca, 0 Mg (■); milieu Steinberg 0 EDTA, $Mg^{++} = 1.16$ mM (□) et Steinberg normal (●). Diamètre de l'ovocyte : 800 μ .

Fig. 4. - Évolution de E_m en milieu Steinberg EDTA 5 mM, 0 Ca, 0 Mg (■), milieu Steinberg 0 EDTA, $Sr^{++} = 1.16$ mEq (□) et Steinberg normal (●). Diamètre de l'ovocyte : 1300 μ .



Après l'addition d'EDTA (1 et 5 mM), la membrane ovocytaire se dépolarise en quelques minutes de façon rapide. La dépolarisation se stabilise ensuite jusqu'à une nouvelle valeur de E_m égale à -18 mV environ, quelles que soient la taille des ovocytes et la valeur initiale de E_m (tableau et *fig. 1*). Les valeurs de E_m obtenues lorsque les ovocytes sont traités par 1 mM et 5 mM d'EDTA présentent une légère variation qui peut s'expliquer par une action plus complète lorsque la concentration est de 5 mM. Cette différence peut refléter également une certaine diversité des populations d'ovocytes.

Milieu Steinberg Ca ⁺⁺ = 0 Mg ⁺⁺ = 0	E_m (mV) \pm (écart-type)			
	Diamètre (μ) des ovocytes		Diamètre (μ) des ovocytes	
	500-800	n	800-1 300	n
EDTA 1 mM.....	18,02 \pm 2,59	34	18,74 \pm 2,6	46
EDTA 5 mM.....	17,23 \pm 4,39	40	17,98 \pm 3,68	59

Valeurs moyennes de E_m obtenues en milieu Steinberg EDTA (1 et 5 mM) dépourvu de calcium et de magnésium. n, nombre d'ovocytes éprouvés

La résistance membranaire effective a été mesurée sur un certain nombre d'ovocytes. Les relations voltage-courant permettent de comparer les pentes des courbes obtenues en milieu Steinberg et en milieu Steinberg 0 Ca, 0 Mg-EDTA (1 mM). La figure 2 montre la diminution de la valeur de la pente de la droite réalisée en milieu EDTA. Dans le cas présenté la valeur initiale de r_m passe de 200 k Ω en milieu Steinberg à 84 k Ω , valeur mesurée en milieu modifié EDTA. La diminution de r_m est en moyenne de 60 à 70 % pour les gros ovocytes, et de 50 à 60 % pour les petits ovocytes.

3. *Repolarisation de la membrane ovocytaire par les ions Mg⁺⁺, Sr⁺⁺ et Ba⁺⁺.* — La membrane des ovocytes est au préalable dépolarisée par un milieu Steinberg EDTA (1 mM). E_m est ensuite mesurée dans un milieu de Steinberg contenant l'un des ions divalents suivants : Mg⁺⁺, Sr⁺⁺, Ba⁺⁺. La concentration extracellulaire de ces ions est égale à la concentration totale de calcium et de magnésium composant normalement le milieu de référence soit 1,16 mM/l. Dans un premier temps, ces milieux provoquent une repolarisation extrêmement rapide mais incomplète en présence soit de Mg⁺⁺ ou de Sr⁺⁺ (*fig. 3 et 4*). Dans un second temps nous avons parfois observé une légère dépolarisation. Par contre, la présence de baryum ne provoque qu'une très faible repolarisation. Dans tous les cas, le phénomène est réversible.

4. *Effets des milieux hypercalciques et hypermagnésiens sur le potentiel de membrane.* — La perméabilité membranaire des ovocytes aux ions Na⁺ étant extrêmement faible (?), nous avons remplacé mEq par mEq les ions Na⁺ par les ions Ca⁺⁺ ou Mg⁺⁺. Chacun de ces milieux, hypercalcique et hypermagnésien, totalement dépourvus des ions Na⁺, provoque un effet légèrement hyperpolarisant de 4 à 6 mV semblable à celui obtenu par simple substitution du sodium par la choline (?).

DISCUSSION. — Le traitement des ovocytes par le milieu de Steinberg, simplement dépourvu en ions divalents, ne provoque aucune modification immédiate de la valeur de E_m . Il faut attendre plus de 3 h pour obtenir un effet dépolarisant lorsque la solution ne contient pas de calcium (résultats non publiés). L'addition des chélateurs, et principalement l'EDTA,

à ces mêmes milieux, entraîne une dépolarisation rapide et de grande amplitude, en quelques minutes, de la membrane ovocytaire.

L'augmentation de la concentration extracellulaire de calcium ou de magnésium ne modifie pas l'effet hyperpolarisant attribué à l'absence de sodium extracellulaire ⁽⁷⁾. Le calcium n'est pas le seul ion divalent qui contribue au maintien d'une différence de potentiel, d'autant plus que le Mg^{++} ou Sr^{++} permettent la repolarisation rapide de la membrane.

En conclusion, les ions divalents stabilisent la structure des membranes plasmiques des ovocytes, ils contrôlent vraisemblablement les perméabilités sodique et potassique, mécanisme déjà démontré au niveau des membranes excitables ⁽¹⁾, plus récemment sur les membranes cellulaires pancréatiques ⁽⁸⁾ et sur les membranes artificielles de nature phospholipidique [⁽⁹⁾, ⁽¹⁰⁾, ⁽¹¹⁾].

(*) Séance du 20 mars 1978.

⁽¹⁾ B. E. FRANKENHAEUSER et A. L. HODGKIN, *J. Physiol (Londres)*, 137, 1957, p. 218-244.

⁽²⁾ G. A. MORRILL, H. R. KABACK et E. ROBBINS, *Nature*, 204, 1964, p. 641-642.

⁽³⁾ T. MAENO, *J. Gen. Physiol.*, 43, 1959, p. 139-157.

⁽⁴⁾ G. A. MORRILL, J. ROSENTHAL et D. E. WATSON, *J. Cell. Physiol.*, 67, 1966, p. 375-382.

⁽⁵⁾ J. T. TUPPER et B. L. MALOFF, *J. Exp. Zool.*, 185, 1973, p. 133-144.

⁽⁶⁾ J. P. VILAIN, A. CAPURON et P. GUILBAULT, *C. R. Soc. Biol.*, 165, 1971, p. 1594-1600.

⁽⁷⁾ J. P. VILAIN, A. CAPURON et P. GUILBAULT, *Comptes rendus*, 276, série D, 1973, p. 573.

⁽⁸⁾ O. H. PETERSEN et N. UEDA, *J. Physiol.*, 250, 1975, 31 p.

⁽⁹⁾ S. G. A. MACLAUGHLIN, G. SZABO et G. EISENMAN, *J. Gen. Physiol.*, 58, 1971, p. 667-687.

⁽¹⁰⁾ M. BARA, *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 16, 1976, p. 121-128.

⁽¹¹⁾ D. L. GILBERT et G. EHRENSTEIN, *Biophys. J.*, 9, 1969, p. 447-463.

Université des Sciences et Techniques de Lille,
Laboratoire de Morphogenèse animale, B.P. n° 36, 59650 Villeneuve-d'Ascq.

Publication n° 4

- J.P. VILAIN, 1977 : Maturation *in vitro* des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien urodèle). *Mem. Soc. Zool. France*, 41, Symp. L. Gallien, 93-102.

CHAPITRE VI

Maturation *in vitro* des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien urodèle)

par J.-P. VILAIN

Laboratoire de Morphogenèse Animale, Université des Sciences et Techniques de Lille,
59650 VILLENEUVE D'ASQ

Résumé. — La maturation *in vitro* des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* a été mise au point dans le but de suivre les modifications éventuelles des paramètres électriques de la membrane.

Le déclenchement de la maturation *in vitro* des ovocytes des Anoures se réalise de façon routinière en présence de progestérone alors que, jusqu'à présent, chez les Urodèles, la reprise de la méiose n'a été obtenue qu'après le conditionnement préalable des femelles par des injections d'extraits hypophysaires.

Sur les ovocytes de Pleurodèle, nous avons observé l'ascension de la vésicule germinative au pôle animal, la rupture de la vésicule suivie de l'émission du premier globule polaire dans les conditions habituellement utilisées chez les Anoures.

Les ovocytes sont prélevés sur des femelles, n'ayant subi aucune injection préalable et dont le choix n'a fait l'objet d'aucune attention particulière. Les ovocytes non défollicularisés, provenant de cinq femelles, ont été placés en suspension dans les solutions de Steinberg, de Merriam et de Ringer. Dans un premier temps, le pH de ces trois milieux est ajusté à la valeur 7,5. La progestérone, en traitement continu à la concentration 10^{-6} M, induit la réalisation complète de la maturation de 60 % des ovocytes dans le milieu de Steinberg, 81 % dans le milieu de Merriam et 70 % dans le milieu de Ringer.

Lorsque les ovocytes sont dépourvus manuellement de leurs cellules folliculaires, la reprise de la méiose ne parvient pas toujours à son terme : la montée de la vésicule germinative peut ne pas être suivie de sa rupture.

Lorsque le pH des trois solutions est à la valeur 8,5, le milieu de Steinberg permet la maturation de 94 % des ovocytes non défollicularisés, le milieu de Merriam 91 %, le milieu de Ringer 81 %. Ces résultats ont été acquis à partir de deux femelles. L'alcalinité du milieu, quelle que soit la solution utilisée, favorise le déclenchement de la maturation et permet d'atteindre des taux élevés d'ovocytes maturés.

Dans ces mêmes conditions, l'absence des cellules folliculaires n'affecte pas la réponse des ovocytes à la progestérone.

Summary. — The *in vitro* maturation of *Pleurodeles waltlii* oocytes was performed to elucidate the eventual modifications of the electrical parameters of the membrane.

Progesterone is the most efficient steroid hormone which triggers the *in vitro* maturation of the Anouuran oocytes ; whereas intraperitoneal injections of pituitary suspensions were necessary, up to now, to obtain meiosis reinitiation in Urodèle amphibian oocytes. The cytological changes associated with *Pleurodeles* oocyte maturation : movement of the germinal vesicle toward the surface of the animal pole, the breakdown and the emission of the first polar body were performed in the usual conditions applied to Anouuran meiosis.

The full grown oocytes were removed from females that received no hormonal pretreatment that were chosen at random.

The largest oocytes with intact follicular layers were removed from five animals and placed successively in Steinberg's, Merriam's and Ringer's solution. First, the pH of these three solutions was adjusted to 7.5.

The continuous treatment with progesterone 10^{-6} M induces the complete maturational events in 60 % of the oocytes incubated in Steinberg's solution, 81 % in Merriam's and 70 % in Ringer's.

When the oocytes were divested of their outer cellular layers, the migration of the germinal vesicle was not always followed by its desintegration.

The pH of the solution was then adjusted to 8.5 ; the percentage of matured oocytes with intact follicular layers reached 94 % in Steinberg's solution, 91 % in Merriam's and 81 % in Ringer's. These results were established from two females.

The alkaline solutions, whatever the solution used, facilitate the meiosis reinitiation and allow high matured oocytes ratio.

In the some conditions, the lack of the outer cellular layers has no influence on the hormonal response of the oocytes.

INTRODUCTION

L'appréciation des paramètres électriques des ovocytes de *Pleurodeles waltlii*, selon des méthodes électrophysiologiques, a permis la mise en évidence d'une différence de potentiel entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire (Vilain, 1971). Cette différence de potentiel traduit la perméabilité sélective de la membrane plasmique de l'ovocyte aux ions K^+ et Na^+ (Vilain, Capuron et Guibault, 1973). Ainsi la membrane contrôle l'environnement ionique favorable aux mécanismes biochimiques et physiologiques qui accompagnent l'évolution des ovocytes des Amphibiens (Morrill, Rosenthal et Watson, 1966 ; Cannon, Dick et Ho Yen, 1974), la maturation (Moreau, Guerrier et Doree, 1976 ; Wallace et Steinhardt, 1977 ; Marot, Belle et Ozon, 1976), la segmentation et les différentes étapes de l'embryogenèse des Amphibiens (Slack et Warner, 1973 ; De Laat, Buwalda et Habets, 1974 ; Barth et Barth, 1974).

L'étape de la maturation, qui nous intéresse dans cette note, est mieux connue chez les Anoures que chez les Urodèles. Chez ces derniers, l'induction de la maturation *in vitro* des ovocytes nécessite un « conditionnement » préalable des femelles par des injections d'hormones hypophysaires (Brachet, Hanocq et Van Gansen, 1970 ; Brachet, 1974 ; Barsacchi-Pilone et Humphries, 1975). Dans le cadre de nos travaux, il était important d'obtenir intégralement *in vitro*, le déclenchement de la maturation des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* ainsi que son évolution. Nous avons donc recherché les conditions optimales à la reprise de la méiose par l'action directe de la progestérone sur les ovocytes, sans préparation hormonale des femelles.

MATERIEL ET METHODES

Les ovaires sont prélevés sur les Pleurodèles élevés au laboratoire et n'ayant subi aucune injection préalable. Le choix des animaux n'a fait l'objet d'aucune attention particulière, nous avons utilisé des femelles qui ont pondu depuis plusieurs années et dont les ovocytes ont été prélevés à diverses reprises.

Les ovocytes, choisis au terme de leur croissance, ne sont pas systématiquement défollicularisés ; dans certains cas nous avons pu extraire manuellement les cellules folliculaires.

La maturation est suivie dans trois milieux d'incubation dont les compositions ioniques sont les suivantes :

Solution de Steinberg :

NaCl : 58 mM KCl : 0,67 mM Ca (NO₃)₂ : 0,33 mM Mg SO₄ : 0,82 mM

Solution de Merriam :

NaCl : 88 mM KCl : 1 mM Ca (NO₃)₂ : 0,33 mM Mg SO₄ : 0,82 mM
Ca Cl₂ : 0,41

Solution de Ringer :

NaCl : 112 mM KCl : 2 mM Ca Cl₂ : 1,3 mM

Le pH de ces trois solutions est ajusté à 7,5 et à 8,5 par des concentrations appropriées de $\text{CO}_3 \text{H Na}$ ou Tris-HCl . Toutes les expériences sont réalisées à la température du laboratoire ; le traitement des ovocytes par la progestérone, à la concentration 10^{-6} M est continu jusqu'à la maturation. Les observations faites à la loupe binoculaire ont permis de suivre les taches de maturation sur le vivant et de vérifier la disparition de la vésicule germinative par dissection d'ovocytes bouillis. Dans certaines expériences, l'examen histologique est effectué selon les techniques classiques : coupes sériées de 7μ d'épaisseur et coloration au rouge nucléaire et picroindigocarmin.

RESULTATS

1. Maturation des ovocytes à pH 7,5 dans les trois milieux d'incubation

Les lots d'ovocytes testés dans chacun des milieux proviennent de cinq femelles différentes (tableau 1). Les signes de la maturation, que nous avons observés sur les ovocytes de Pleurodèle, correspondent à l'ascension de la vésicule germinative au pôle animal, la rupture de la vésicule suivie de l'émission du premier globule polaire.

La progestérone, à la concentration 10^{-6} M , induit la réalisation complète de la maturation de 60 % des ovocytes dans le milieu de Steinberg, 81 % dans le milieu de Merriam et 70 % dans le milieu de Ringer.

Considérons le cas de la femelle référencée 16 03 77 du tableau 1 ; la rupture de la vésicule germinative s'est réalisée pour tous les ovocytes traités dans le milieu de Merriam ; la solution de Steinberg représente les conditions les moins favorables à la

Femelles	Steinberg 7,5		Merriam 7,5		Ringer 7,5	
	Ovocytes traités	Ovocytes maturés	Ovocytes traités	Ovocytes maturés	Ovocytes traités	Ovocytes maturés
19 11 76	73	50	—	—	84	63
29 11 76	64	34	55	45	49	32
26 01 77	38	22	34	31	29	17
16 02 77	27	15	30	15	24	15
16 03 77	30	19	29	29	30	26
Totaux	232	140	148	120	216	153
%	100	60	100	81	100	70

Tableau 1 - Effet des milieux Steinberg, Merriam et Ringer à pH 7,5 sur la maturation des ovocytes traités à la progestérone 10^{-6} M .

réinitiation de la méiose puisque la durée d'incubation est plus longue pour n'obtenir, par ailleurs, que 63 % d'ovocytes maturés. La figure 1 relate le pourcentage de maturation, obtenue au cours de cette expérience, en fonction de la durée d'incubation dans les trois milieux en présence de progestérone. La rupture de la vésicule germinative survient plus rapidement dans les solutions de Merriam et de Ringer que dans le milieu de Steinberg.

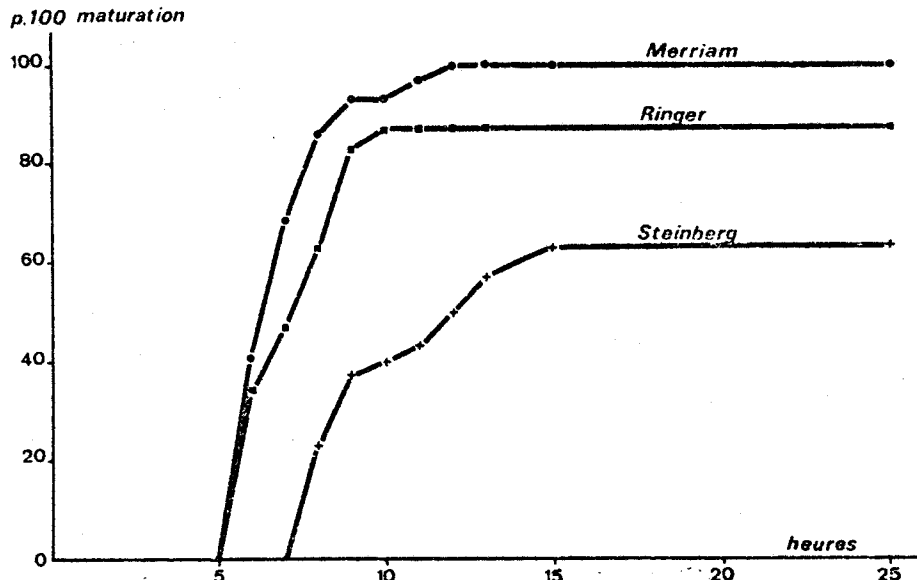


Fig. 1 - Pourcentage d'ovocytes maturés dans les milieux de Steinberg, Merriam et Ringer à pH 7,5 en fonction de la durée d'application de la progestérone 10^{-6} M. Expérience référencée 16 03 77, tableau 1.

Lorsque les ovocytes, débarrassés manuellement des cellules folliculaires, sont placés dans les mêmes conditions, la migration de la vésicule germinative n'est pas toujours suivie de sa rupture. Néanmoins, dans deux séries expérimentales, la maturation s'est déroulée jusqu'à son terme (tableau 5). L'ensemble de ces résultats a été acquis pendant la période s'étendant entre les mois de septembre et mars ; en dehors de cette période, dans les mêmes conditions, la méiose ne s'est effectuée que dans des cas exceptionnels (tableau 3).

2. Maturation des ovocytes dans les trois milieux à pH 8,5

Vingt à trente ovocytes sont mis en suspension dans les milieux dont le pH est amené à 8,5. Les expériences ont été réalisées à partir de deux femelles (tableau 2).

L'addition de progestérone permet la maturation de 94 % des ovocytes, non défollicularisés, dans le milieu de Steinberg, 91 % dans le milieu de Merriam, 81 % dans le milieu de Ringer.

Dans l'une des deux expériences, référencée 16 03 77 dans le tableau 2, la réinitiation de la méiose survient entre la 5^e et la 12^e heure en Steinberg pH 8,5, alors que les ovocytes évoluent entre la 7^e et la 15^e heure à pH 7,5 (fig. 2). En outre, nous avons

obtenu 100 % de maturation en solution alcaline alors que ce milieu se révèle le moins favorable à pH 7,5. De même, la figure 3 relate l'évolution plus précoce des ovocytes dans le milieu de Merriam à pH 8,5.

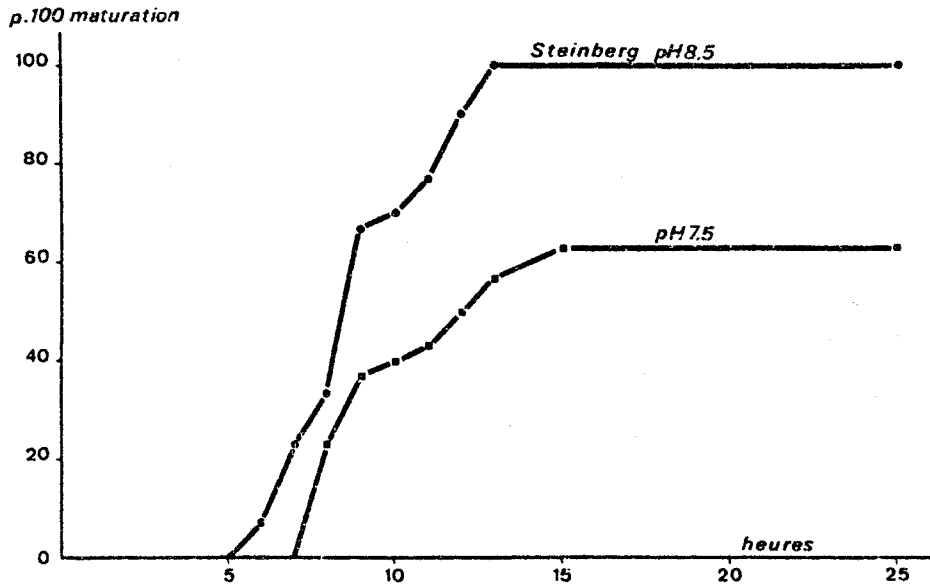


Fig. 2 - Pourcentage d'ovocytes maturés, dans le milieu de Steinberg à pH 7,5 et à pH 8,5, en fonction de la durée d'application de la progestérone 10^{-6} M. Expérience référencée 16 03 77, tableaux 1 et 2.

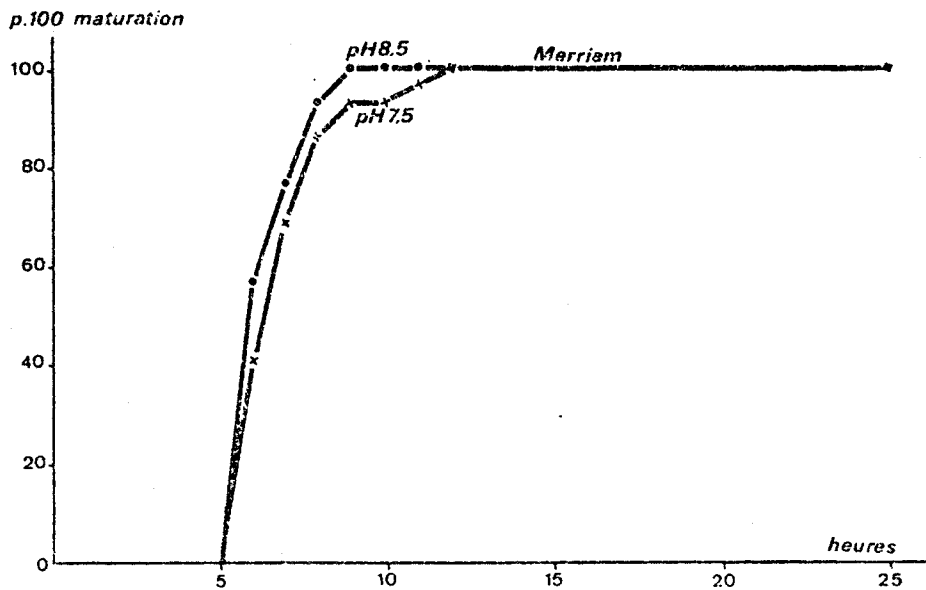


Fig. 3 - Pourcentage d'ovocytes maturés, dans le milieu de Merriam à pH 7,5 et à pH 8,5, en fonction de la durée d'application de la progestérone 10^{-6} M. Expérience référencée 16 03 77, tableaux 1 et 2.



L'augmentation de pH n'altère en rien les mécanismes de la maturation qui évolue normalement jusqu'à l'émission du premier globule polaire. L'alcalinité des milieux accélère l'induction de la maturation par la progestérone.

Les observations, faites sur des ovocytes débarassés manuellement de leurs cellules folliculaires et placés dans les mêmes conditions expérimentales, ont abouti à des résultats tout à fait comparables (tableau 5).

Comme précédemment, la période printanière n'a guère été propice à la reproduction de nos expériences de maturation *in vitro* dans les milieux à pH 8,5 (tableau 4)

Femelles	Steinberg 8,5		Merriam 8,5		Ringer 8,5	
	Ovocytes traités	Ovocytes maturés	Ovocytes traités	Ovocytes maturés	Ovocytes traités	Ovocytes maturés
7 02 77	35	31	27	22	27	22
16 03 77	30	30	30	30	—	—
Totaux	65	61	57	52	27	22
%	100	94	100	91	100	81

Tableau 2 - Effet des milieux Steinberg, Merriam et Ringer à pH 8,5 sur la maturation des ovocytes traités sur la progestérone $10^{-6}M$.

Femelles	Steinberg 7,5		Merriam 7,5	
	Ovocytes traités	Ovocytes maturés	Ovocytes traités	Ovocytes maturés
27 04 77	28	3	—	—
29 04 77	40	0	40	0
20 05 77	38	1	39	1
Totaux	106	4	79	1

Tableau 3 - Nombre d'ovocytes maturés en milieu Steinberg et Merriam pendant la saison printanière.

Femelles	Steinberg 8,5		Merriam 8,5	
	Ovocytes traités	Ovocytes maturés	Ovocytes traités	Ovocytes maturés
27 04 77	29	15	—	—
29 04 77	40	0	40	0
20 05 77	39	1	40	0
Totaux	108	16	80	0

Tableau 4 - Nombre d'ovocytes maturés en milieu Steinberg et Merriam à pH 8,5 pendant la saison printanière.

	Nombre d'ovocytes traités	Nombre d'ovocytes maturés
Steinberg pH 7,5	100	7
	16	0
	13	13
Merriam pH 7,5	12	3
	14	14
Steinberg pH 8,5	15	12
Merriam pH 8,5	15	15
	19	18

Tableau 5 - Nombre d'ovocytes défollicularisés en milieu Steinberg et Merriam à pH 7,5 et à pH 8,5 traités à la progestérone 10^{-6} M.

DISCUSSION

La maturation *in vitro* des ovocytes de Pleurodèle a été obtenue dans les conditions habituellement utilisées chez les Anoures. En effet, l'addition de progestérone, à des milieux d'incubation constitués des mêmes espèces ioniques à des concentrations différentes, déclenche la maturation des ovocytes arrivés au terme de leur accroissement : les femelles opérées n'ont subi aucune injection préalable d'extraits hypophysaires.

Le temps de réponse des ovocytes à l'action de la progestérone est très sensible à la composition ionique des milieux extracellulaires ; les changements de la pression osmotique, qui en résultent, peuvent être mis en cause, seule une étude précise de ce problème permettrait de lever le doute.

La solution de Merriam à pH 7,5 se révèle être le milieu le plus favorable au déclenchement de la maturation : la rupture de la vésicule germinative survient dès la 6^e heure pour se compléter vers la 12^e heure ; le pourcentage de maturation y est le plus élevé.

La reprise de la méiose apparaît plus tardivement chez le Pleurodèle que chez les Anoures puisque dans les mêmes conditions de milieu et de pH, le temps de latence après la stimulation hormonale est de 3 à 6 heures chez le Xénope, 6 à 10 heures chez *Rana pipiens* (Brachet, 1974). Cette constatation a déjà été faite à propos de la maturation d'un autre Urodèle : *Notophthalmus viridescens* (Barsacchi-Pilone et Humphries, 1975).

L'élimination manuelle des cellules folliculaires semble perturber la reproduction des événements morphologiques de la maturation à pH 7,5, alors qu'en milieu alcalin, l'absence d'épithélium folliculaire n'affecte pas la réponse des ovocytes à la progestérone. Ce résultat nous paraît être un argument en faveur d'une action de l'alcalinité des milieux au niveau de la membrane ovocytaire. En outre, l'augmentation du pH des trois milieux accélère le déclenchement de la maturation et permet d'atteindre des taux élevés d'ovocytes maturés.

Des substances non hormonales, comme le parachloromercuribenzoate (PCMB) (Brachet et Pays-de-Schutter, 1974), l'ionophore A 23 187 (Wasserman et Masui, 1975) et l'ion La^{3+} (Schorderet-Slatkine, Schorderet et Baulieu, 1976) induisent la maturation des ovocytes de Xénope. Ces agents, agissant essentiellement au niveau de la membrane plasmique, on peut supposer que le site initial d'interaction entre la progestérone et l'ovocyte serait membranaire. Nous pensons que l'effet de la modification du pH des solutions d'incubation des ovocytes de Pleurodèle doit intervenir au niveau de ce site. Chez les Anoures, on a démontré la dépendance de la stimulation hormonale et de la concentration extracellulaire de Ca^{++} (Merriam, 1971 ; Wasserman et Masui, 1975 ; Marot, Belle et Ozon, 1976 ; Moreau, Doree et Guerrier, 1976). Il existe, de plus, des charges négatives à la surface membranaire des microvillosités des ovocytes de Xénope (Brummett et Dumont, 1976) où les ions divalents agiraient, comme il est supposé dans le cas des surfaces membranaires des cellules nerveuses (Gilbert et Ehrenstein, 1969), soit par un effet d'écran, soit par fixation sur les sites négatifs. Selon Hille (1975) les ions H^+ se lieraient directement sur les sites négatifs d'où une compétition entre les ions Ca^{2+} et les protons en surface de la membrane plasmique des cellules nerveuses. La diminution de la concentration en protons, entraînerait donc une redistribution des ions Ca^{++} à la surface de la membrane des ovocytes de Pleurodèle d'où la facilitation de la maturation que nous avons observée en milieu alcalin.

BIBLIOGRAPHIE

- BARSACCHI-PILONE G. et HUMPHRIES A.A., 1975. Progesterone induced *in vitro* maturation in oocytes of *Notophthalmus viridescens* (Amphibia Urodela) and some observations on cytological aspects of maturation. *J. Embryol. exp. Morphol.*, **34**, 451-466.
- BRACHET J., 1974. Observations cytologiques et cytochimiques sur la maturation de l'ovocyte chez les Urodèles. *Ann. Biol.*, **13**, 271-284.
- BRACHET J., HANOCQ F. et VAN GANSEN P., 1970. A cytochemical and ultrastructural analysis of *in vitro* maturation in amphibian oocytes. *Develop. Biol.*, **21**, 157-190.
- BRACHET J. et PAYS-DE-SCHUTTER A., 1974. Induction de la maturation, chez l'ovocyte de Xénope, par trois inhibiteurs des groupes sulfhydryles de la membrane plasmique. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **279**, 2107-2110.
- BARTH L.G. et BARTH L.J., 1974. Ionic regulation of embryonic induction and cell differentiation in *Rana pipiens*. *Devel. Biol.*, **39**, 1-22.

- BRUMMETT A.R. et DUMONT J.N., 1976. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). III. Localization of negative charges on the surface of developing oocytes. *J. Ultrastr. Res.*, **55**, 4-16.
- CANNON J.D., DICK D.A.T. et HOYEN D.O., 1974. Intracellular sodium and potassium concentrations, in toad and frog oocytes during development. *J. Physiol.*, **241**, 497-508.
- DE LAAT S.W., BUWALDA R.J.A. et HABETS A.M., 1974. Intracellular ionic distribution, cell membrane permeability and membrane potential of the *Xenopus* egg during first cleavage. *Exp. Cell Res.*, **89**, 1-14.
- GILBERT D.L., EHRENSTEIN G., 1969. Effect of divalent cations on potassium conductance of squid axons: determination of surface charge. *Biophys. J.*, **9**, 447-463.
- HILLE B., 1975. An essential ionized acid group in sodium channels. *Feder. Proc.*, **34**, 1318-1321.
- MAROT J., BELLE R., OZON R., 1976. Recherches sur la maturation de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Arguments en faveur du rôle des ions calcium. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **282**, 1301-1304.
- MERRIAM R.W., 1971. Progesterone induced maturational events in oocytes of *Xenopus laevis*. I. Continuous necessity for diffusible calcium and magnesium. *Exp. Cell. Res.*, **68**, 75-80.
- MOREAU M., DOREE M., GUERRIER P., 1976. Electrophoretic introduction of calcium ions into the cortex of *Xenopus laevis* oocytes triggers meiosis reinitiation. *J. Exp. Zool.*, **197**, 443-449.
- MORRILL G.A., ROSENTHAL J. et WATSON D.E., 1966. Membrane permeability changes in Amphibian eggs at ovulation. *J. Cell Physiol.*, **67**, 375-382.
- SCHORDERET-SLATKINE S., SCHORDERET M. et BEAULIEU E.E., 1976. Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by lanthanum. *Nature*, **262**, 289-290.
- SLACK C. et WARNER A.E., 1973. Intracellular and intercellular potentials in the early amphibian embryo. *J. Physiol.*, **232**, 313-330.
- VILAIN J.P., 1971. Caractéristiques électriques membranaires des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle). *C.R. Soc. Biol.*, **165**, 1594-1600.
- VILAIN J.-P., CAPURON A. et GUILBAULT P., 1973. Influence des cations monovalents K^+ et Na^+ sur le potentiel intracellulaire des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michah (Amphibien Urodèle). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **276**, 573-576.
- WALLACE R.A. et STEINHARTD R.A., 1977. Maturation of *Xenopus* oocytes. II. Observations on membrane potentiel. *Develop. Biol.*, **57**, 305-316.

Publication n° 5

- M. MOREAU, J. P. VILAIN et P. GUERRIER, 1980 : Free calcium changes associated with hormone action in amphibien oocytes. *Dev. Biol.*, 78, 201-214.

Free Calcium Changes Associated with Hormone Action in Amphibian Oocytes

M. MOREAU,* J. P. VILAIN,† AND P. GUERRIER*

* Station Biologique, 29211 Roscoff, and † Laboratoire d'Embryologie, Université de Lille I, Villeneuve d'Ascq, France

Received August 7, 1979; accepted in revised form December 18, 1979

Ca²⁺-sensitive electrodes and the photoproteins obelin and aequorin were used with the oocytes of the anuran *Xenopus laevis* and the urodeles *Ambystoma mexicanum* and *Pleurodeles waltlii* in order to detect any changes in internal free Ca²⁺ which might result from progesterone or agonist stimulation. A dramatic Ca²⁺ surge was recorded: from $0.7 \times 10^{-6} M$ in the unstimulated oocyte to $7 \times 10^{-6} M$ after stimulation but before germinal vesicle breakdown (GVBD). Ca²⁺ efflux was also measured, but it accounted for less than 0.2% of the internal Ca²⁺ transient; this efflux did not take place in the absence of external calcium. The Ca²⁺ surge and maturation in response to progesterone, *p*-hydroxymethylenesulfonate (PHMPS), or Mn²⁺ occurred normally even when divalent cations were absent from the external medium. In contrast, external divalent cations were necessary for the induction of meiosis and a Ca²⁺ transient by the K⁺ ionophore valinomycin. HCO₃⁻ also triggers meiosis and causes Ca²⁺ release, but the release occurs with quite different kinetics. Incompletely grown or seasonally dormant oocytes as well as 10 mM theophylline- or procaine-treated oocytes neither release Ca²⁺ nor respond to the hormone. We conclude that intracellular released Ca²⁺ is likely to be the major "second messenger" following hormone stimulation in amphibian oocytes as in starfish.

INTRODUCTION

It is now well established that progesterone, the natural hormone which triggers maturation in amphibians (Fortune *et al.*, 1975), acts at the cell surface (Smith and Ecker, 1971; Smith, 1975; Godeau *et al.*, 1978); it induces the formation of an intracellular maturation promoting factor or MPF (Masui and Markert, 1971; Drury, 1978). This factor causes germinal vesicle breakdown (GVBD) and the development of the oocyte to the metaphase of the second maturation division. At this point development pauses until fertilization or activation. Many compounds have been found to mimic progesterone action, by acting either at the cell surface (Brachet *et al.*, 1975; Schorderet-Slatkine *et al.*, 1977) or intracellularly (Moreau *et al.*, 1976a, b). The mechanisms by which membrane perturbations may lead to MPF production are poorly understood, although Ca²⁺ has been

suggested as a possible second messenger. Many arguments have been presented in support of this view (Marot *et al.*, 1976; Schorderet-Slatkine *et al.*, 1977; Baulieu *et al.*, 1978), the most direct ones based on the demonstration by Wasserman and Masui (1975) and Moreau *et al.* (1976a) that chemical as well as physical iontophoresis of Ca²⁺ into the oocyte cytoplasm can trigger true meiosis in the absence of hormone treatment. So far, however, neither tracer analysis (Marot *et al.*, 1976; O'Connor *et al.*, 1977) nor aequorin studies (Bellé *et al.*, 1977) have provided sufficient evidence that internal free Ca²⁺ levels change during hormone stimulation.

In this paper, we demonstrate for the first time, using two different methods, a dramatic rise in free Ca²⁺ concentration within the cytoplasm of anuran and urodele oocytes soon after progesterone or agonist stimulation. This Ca²⁺ transient may be

necessary for meiosis reinitiation since incompletely grown or inhibitor-treated oocytes which do not undergo meiosis also fail to produce the Ca^{2+} transient.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of oocytes. Sexually mature *Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltlii*, and *Ambystoma mexicanum*, obtained from different stocks, were reared in Roscoff. Ovaries were removed from females anesthetized with MS 222 (aminobenzoate methanesulfonic acid salt, Aldrich). Full-grown oocytes were usually dissected out of their follicles with fine forceps. Although this procedure leaves large numbers of follicle cells still associated with the oocyte, we preferred it to the classical collagenase treatment which introduces severe artifacts (unpublished). The isolated oocytes were allowed to recover for at least 6 hr in Falcon petri dishes containing OR_2 solution (Wallace *et al.*, 1973) before performing the experiments. Oocytes prepared in this way and continuously exposed to progesterone (10^{-6} g/ml) showed 97.5% meiosis reinitiation (SD = 6.2, $N = 187$) for *Ambystoma* and 99% meiosis (SD = 3.16, $N = 235$) for *Pleurodeles*. The score was less satisfactory with *Xenopus* oocytes (40.5% true meiosis, SD = 10.5, $N = 220$). The same *Xenopus* oocytes prepared with collagenase may give 70–90% maturation (Vilain *et al.*, 1980).

Preparation of the photoproteins. Aequorin (type I) was purchased from Sigma. The aequorin sample was freed of traces of ammonium sulfate and EDTA by passage through a column containing Sephadex G 25 fine which had been equilibrated with a solution of Na acetate, 10 mM; EDTA, 1 μM , pH 6.2. Obelin was freshly prepared in Roscoff (Campbell, 1974).

Light detection. Light emission was detected in a light-tight box without a light guide using an EMI 9335 QB or an Hamamatsu R 374 photomultiplier rated at an anode voltage of 1 100 V. The anode current was measured with a current to voltage converter having a time constant of 40

msec, displayed on an oscilloscope, and recorded on a chart recorder. Calibration of each batch of aequorin to be used was achieved according to Baker *et al.* (1971).

Known quantities of Ca^{2+} were driven by constant-current iontophoresis (2 μA) from a pipet containing 1 M CaCl_2 and injected either into a 1- μl droplet of aequorin suspended in CaMg -free OR_2 passed on Chelex 100 or into an aequorin-loaded oocyte. Transport number of the pipet (Kusano *et al.*, 1975) was 0.2. From these data, it appeared that only 20% of the expected emitted light could be recorded from the oocyte (Table 1). That sufficient aequorin was present throughout the experiment was checked systematically by adding 10% Triton X-100 to the preparation at the end of the recording period. The light emitted during exposure of one isolated oocyte to Triton X-100 was at least 10-fold higher than that recorded during an experiment involving as many as 25 aequorin-loaded maturing oocytes.

Microinjection procedure. The photoproteins (420 μg of aequorin/ml) were pressure injected through a micropipet with a beveled tip, 3–5 μm in diameter. Pressure pulses were applied through a thyristor

TABLE 1
CALIBRATION OF THE LIGHT RESPONSE OBTAINED BY Ca^{2+} STIMULATION OF THE AEQUORIN^a USED IN THE PRESENT WORK (SEE MATERIALS AND METHODS)

Iontophoresis duration (sec)	Ca^{2+} delivered (pmoles)	Flash intensity (nA)		Ca^{2+} concentration change (μM)
		Droplet	Oocyte	
0.3	0.6	0.6	—	0.42
0.4	0.8	0.85	—	0.57
0.5	1.0	1.20	—	0.71
0.6	1.2	1.44	0.20	0.86
0.7	1.4	1.70	0.34	1.00
0.8	1.6	1.85	0.40	1.14
0.9	1.8	1.92	0.41	1.30
1.0	2.0	2.10	0.44	1.43

^a For the same quantity of Ca^{2+} delivered by iontophoresis, anode current deviation was found to be at least 10 times higher with freshly prepared obelin than with the aequorin samples prepared from Sigma.

which commanded a three-way electrovalve (Danfoss) linked to the electrode and to a regulated tank of compressed air. It was adjusted so that one pulse delivered a volume of about 0.1 μ l, i.e., less than 10% of the oocyte volume. Microinjection was always performed in normal OR₂ medium. For experiments in CaMg-free OR₂ the oocytes, injected in normal OR₂ and allowed to heal for 2 hr, were then transferred to the modified OR₂ for a prolonged equilibration period, usually more than 8 hr, with repeated changes every hour.

Ca²⁺-sensitive electrodes. Ca-sensitive microelectrodes were constructed according to the procedure described by Oehme *et al.* (1976). The tip of the electrode contained a resin consisting of *N,N'*-di(11-ethoxycarbonyl)undecyl-*N,N',4,5*-tetramethyl-3,6-dioxatane diacide diamide and 1% (w/w) of sodium tetrphenylborate (NaTPB) in *O*-nitrophenyloctyl ether (ONPOE). 1 M CaCl₂ was used as the electrolyte. The potential measuring electrode contained 3 M KCl. The output from the Ca-sensitive electrode was connected to an operational amplifier (Analog Devices 311 J) having an input impedance of 10¹⁴ Ω . Membrane potential was subtracted via a

differential amplifier from Ca²⁺ electrode potential to obtain a measure of intracellular Ca²⁺ activity. Calibration was made using Ca²⁺-EGTA buffers (Steinhardt *et al.*, 1977). Electrodes were chosen which gave an approximately 29-mV slope for a 10-fold positive or negative change in (Ca²⁺) and which had a time constant of less than 30 sec. Such electrodes which function linearly in the range of 0.1 to 1 μ M (Ca²⁺) are quite difficult to obtain. In fact, only two were satisfactory from a lot of 250. These maintained their characteristics for at least 3 weeks. Figures 1A and B give the calibration of the one which was used in the experiments to be described.

Introduction of the electrode into the oocyte did not cause a depolarization of E_m greater than 1 mV. There was no significant drift of the electrode (less than 0.5 mV) when it was calibrated before and after each experiment over the full Ca²⁺ concentration range used. Similarly, no drift was observed when the electrode was introduced and maintained for more than 2 hr in a non-maturing oocyte. Tip potentials of the Ca²⁺ and the potential electrodes were 0.5 \pm 0.1 mV. It has been verified, moreover, in our material, that there is no difference in the

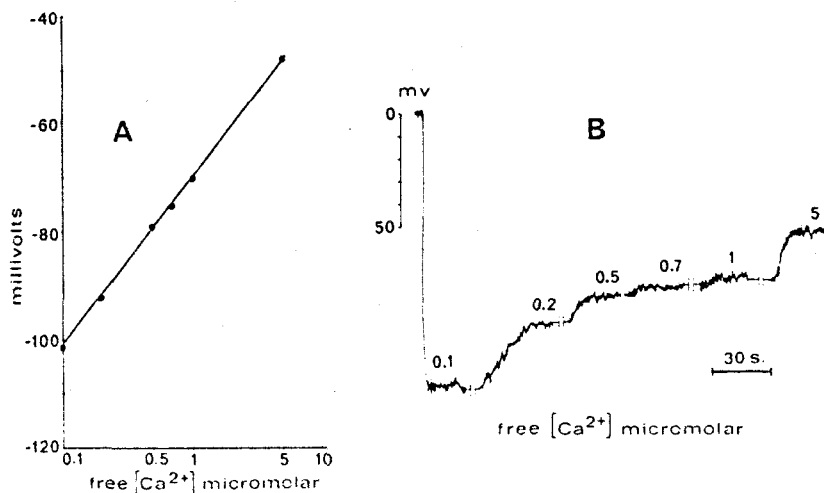


FIG. 1. Calibration of the Ca²⁺-sensitive electrode used during this work. Calibration was performed using Ca²⁺-EGTA buffers as described by Steinhardt *et al.* (1977). The calibration curve (A) is presented simultaneously with the original records (B).

potentials recorded from two independent electrodes, which allows voltage-clamp as well as current-clamp studies.

RESULTS

Ca^{2+} Levels in the Unstimulated Oocyte

Resting levels of free Ca^{2+} ions have been measured by impaling a single unstimulated oocyte with a Ca^{2+} -sensitive electrode as well as a potential electrode for reference. According to our calibration data (Fig. 1), this level ranged from 0.4 to $0.9 \times 10^{-6} M$ in *Xenopus* as well as in *Ambystoma* oocytes. Resting level could also be detected by monitoring continuous light emission over dark current from a number of oocytes injected with the photoprotein obelin. Using the photoprotein aequorin, however, we detected no light signal in the resting oocyte, even when 25 oocytes were observed simultaneously. More than 10 such control experiments have been performed with aequorin. Since all the oocytes used in our experiments healed perfectly within the 2-hr resting period which followed photoprotein injection and presented a normal aspect, we never observed any leakage from them over at least the 14-hr recording period we used systematically.

Ca^{2+} Responses following Progesterone Stimulation

Changes in the internal free Ca^{2+} concentration resulting from continuous exposure to progesterone ($1 \mu g/ml$) were easily recorded with aequorin, provided that enough responsive oocytes (5 to 25) were present in the preparation. The recorded light response appears to be proportional to the quantity of Ca^{2+} released (Shimomura *et al.*, 1963a,b, 1970; Blinks *et al.*, 1976), and we found indeed that the integrated light signal was also proportional to the number of oocytes which matured normally during the course of one experiment (Fig. 2). During this work, we have performed 16 such aequorin experiments with *Ambystoma*, 14 with *Pleurodeles*, and 11 with *Xenopus*, using oocytes which were taken either from the wild type (9 experiments) or from the albino (a^p) mutant (2 experiments). The average number of oocytes used in one experiment was 21 (SD = 3.5) and the percentages of true maturation were, respectively, 59 (SD = 20), 60 (SD = 16), and 46 (SD = 13) for *Ambystoma*, *Pleurodeles*, and *Xenopus*. All these experiments gave us highly reproducible positive results as typically shown in Fig. 3. Duration (from 3

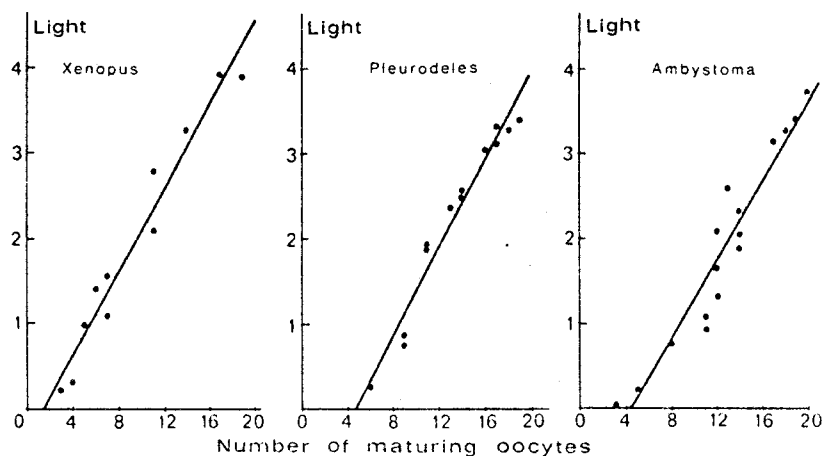


FIG. 2. Correlation between the light recorded and the number of oocytes which have matured in each individual experiment. Oocytes from *Xenopus*, *Pleurodeles*, and *Ambystoma* were loaded with $0.1 \mu l$ of the aequorin solution whose calibration is presented in Table 1. Light quantity has been obtained by integrating the signal over a 14-hr period in each experiment and is given in arbitrary units.

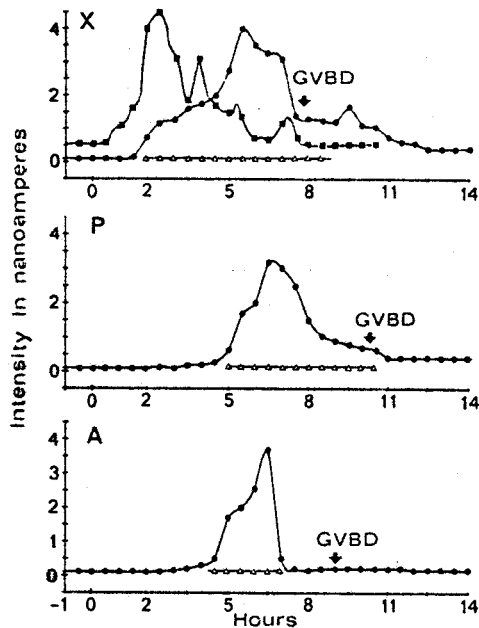


FIG. 3. Progesterone-induced Ca^{2+} transients as recorded in *Xenopus* (X), *Pleurodeles* (P), and *Ambystoma* (A) oocytes injected with aequorin from the same batch as used for the calibration shown in Table 1. (■—■) *Xenopus* albino mutant; (Δ — Δ) unstimulated control oocytes injected with aequorin. Maturation of the albino mutant was determined by cytological controls effected 24 hr after progesterone addition. Maturation ratios were, in these experiments, X wild type = 17/30; X albino = 7/15; P = 14/25 + 6/25 germinal vesicles at the animal pole (GVA); and A = 21/25 + 2/25 GVA.

to 6 hr) and peak amplitude (4 nA for 25 oocytes) of the detectable Ca^{2+} transients are similar in the three species, when the oocytes were injected with aequorin from the same batch. In each case, germinal vesicle breakdown (GVBD) was found to occur some 2 to 3 hr after maximal peak light emission. We ignore, however, the exact timing of this event in the case of the albino mutant where peak light emission occurred earlier than we observed with the wild type.

Continuous records of internal free Ca^{2+} levels were also obtained from single *Xenopus* (Fig. 4), *Ambystoma* (Fig. 5), or *Pleurodeles* oocytes, using Ca^{2+} -selective electrodes. With the electrode, a significant increase in Ca^{2+} activity could be detected as early as 10 min after progesterone addition,

i.e., sooner than it is possible to measure with aequorin, even when using the albino mutant. With both techniques, however, the maximum Ca^{2+} surge occurs at the same time as illustrated in Fig. 5. The peak cytoplasmic Ca^{2+} activity was $4.8 \pm 2.1 \mu\text{M}$ (6 experiments), the internal free Ca^{2+} change being typically from 0.7×10^{-6} to 7×10^{-6} M in the *Xenopus* oocyte. It occurred 2 to 3 hr before GVBD. The Ca-sensitive electrode technique also allowed us to follow Ca^{2+} efflux from the oocytes. The electrode was placed in 0.3 ml of normal OR_2 medium containing 50 oocytes (Fig. 4C). External Ca^{2+} activity was found to begin to increase about 30 min after hormone treatment. The total efflux corresponds to a decrease of about $0.03 \mu\text{M}$ in the oocyte Ca^{2+} content, which corresponds to 0.1% of the internal Ca^{2+} surge.

GVBD and Ca^{2+} Responses in the Absence of External Ca^{2+}

The great majority of the oocytes used in these experiments resumed maturation, whatever the medium (Merriam, Steinberg, or OR_2). Under these conditions, however, maturation was delayed by 2 hr relative to controls. These results are at variance with some previous reports (Merriam, 1971; Marot *et al.*, 1976). They have been repeated and confirmed in a series of experiments which, for more security, involved careful and extensive washing of the oocytes over at least an 8-hr period in CaMg-free OR_2 supplemented with 10 mM EDTA. Percentage maturation recorded under these conditions from four different *Pleurodeles* females was 68.7 ± 24.6 ($N = 89$) instead of the 92.5 ± 9.6 ($N = 100$) obtained in normal OR_2 medium. With four different *Xenopus* females, the score was 35 ± 8.8 ($N = 121$), as compared to 34.8 ± 5.1 ($N = 140$) for the controls.

Maturation also occurred normally in the presence of 10 mM EGTA or when the washing procedure was omitted. Cytological controls performed on a lot of seven

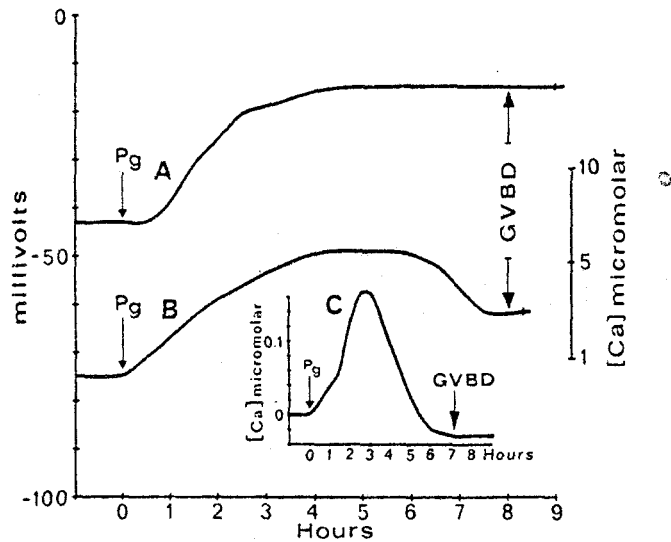


FIG. 4. Ca^{2+} -sensitive electrode records. (A) Change in the resting potential (E_m) as recorded from a single *Xenopus* oocyte stimulated with progesterone at t_0 (Pg-labeled arrow). (B) Simultaneous change in internal Ca^{2+} activity ($E_{Ca} - E_m$) as recorded by the Ca^{2+} -sensitive electrode. The right scale refers to the micromolar Ca^{2+} internal concentration according to the calibration presented in Fig. 1. C (inset), the increase in the external Ca^{2+} concentration ($E_{Ca} - E_0$) recorded from 50 progesterone-stimulated oocytes (electrode in the external medium, 0.3 ml normal OR_2).

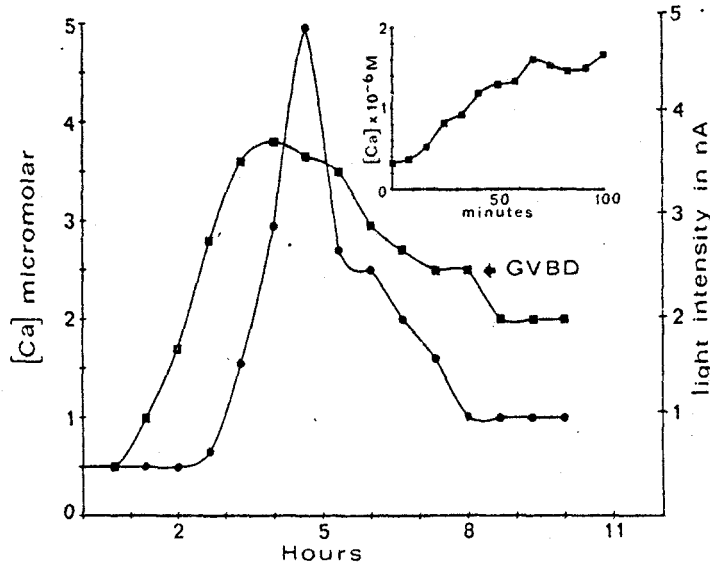


FIG. 5. Progesterone-induced Ca^{2+} transients as recorded from a Ca^{2+} -sensitive microelectrode (■—■) or 25 aequorin-injected oocytes taken from the same *Ambystoma* (●—●). Maturation ratio was 14/25. Inset illustrates initial changes in Ca^{2+} activity as recorded with the electrode. Right ordinate indicates light intensity in nA. Left ordinate refers to Ca^{2+} activity changes as measured with the Ca^{2+} -sensitive electrode.

Pleurodeles oocytes which resumed meiosis in 10 mM EDTA, CaMg-free OR_2 demonstrated, moreover, the constant presence of the first polar body and of a normal second metaphase spindle (Fig. 6A).

The addition of EDTA to the CaMg-free external medium does not prevent the internal Ca^{2+} surge induced by the hormone (Fig. 7). In fact, light emitted under these conditions was higher than that produced

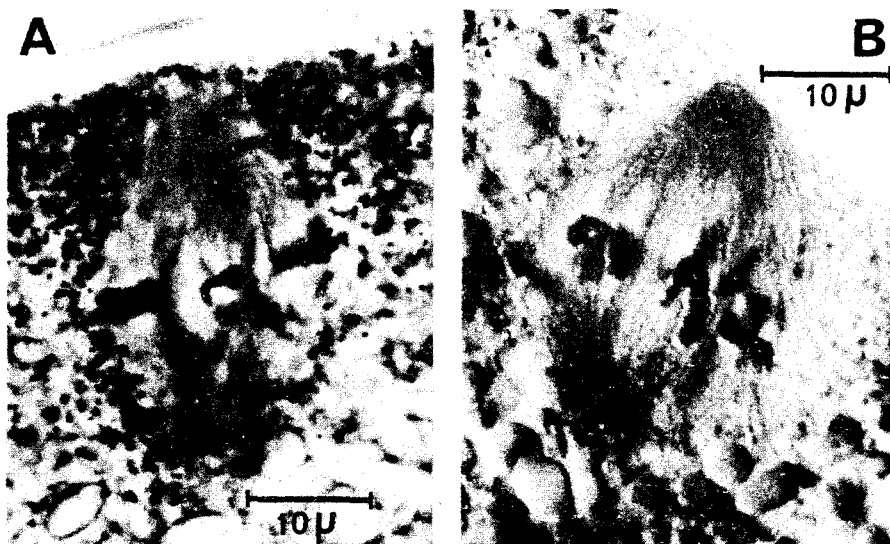


FIG. 6. Second metaphase spindles observed in *Pleurodeles* oocytes, which resumed maturation under the influence of progesterone in 10 mM EDTA CaMg-free OR₂ (A) or under the influence of Mn²⁺ ions (B). Phase contrast (A) and Nomarski (B).

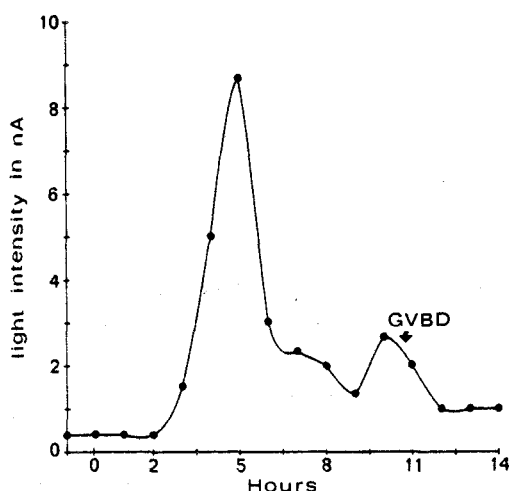


FIG. 7. Progesterone-induced Ca²⁺ transient as recorded in 20 *Ambystoma* oocytes injected with aequorin and suspended in CaMg-free OR₂ medium. Maturation ratio was 11/20.

by the controls in normal OR₂ medium (0.45 nA/oocyte instead of 0.2 nA). We found, however, that Ca²⁺ efflux did not take place in the absence of external Ca²⁺. If aequorin was added to the external medium (Chelex 100-treated CaMg-free OR₂), no calcium efflux could be detected even when as many as 100 *Pleurodeles* oocytes/2 ml were pres-

ent, which normally resumed meiosis after progesterone stimulation. Maturation ratio was 80/100 + 6/100 GVA (GV at the animal pole). This result has been also confirmed using the Ca-sensitive electrode.

Absence of Ca²⁺ Surge under Conditions Where Progesterone Fails to Elicit GVBD

No Ca²⁺ surge could be recorded either from immature *Xenopus* oocytes, less than 1 mm in diameter, which do not resume meiosis after progesterone addition (7 experiments), or from the normal-sized but progesterone-irresponsible *Pleurodeles* oocytes (Vilain, 1978) which are found during the resting season, i.e., from May to September (11 experiments).

Oocytes of *Ambystoma*, *Pleurodeles*, and *Xenopus* which have been injected with EGTA (Moreau *et al.*, 1976b) or exposed to 10 mM theophylline (O'Connor and Smith, 1976) or 10 mM procaine (Moreau, unpublished) in the external solution do not undergo GVBD when exposed to progesterone. We now report that oocytes treated in these ways also fail to undergo an increase in internal free calcium in response to pro-

gesterone (7 experiments with EGTA, 1 with theophylline, and 5 with procaine).

Ca²⁺ Responses following Mimetic Treatments

Many treatments have been found to trigger meiosis in *Xenopus* oocytes. We have studied some of these here to see if they stimulate an increase in internal free Ca^{2+} concentration.

PHMPS. *p*-Hydroxymercuriphenylsulfonate is known to induce meiosis reinitiation (Brachet *et al.*, 1975) and to increase $^{45}Ca^{2+}$ uptake in *Xenopus* oocytes (Marot *et al.*, 1976). This drug was used at a concentration of 0.1 mM, to stimulate lots of 25 aequorin-injected oocytes from *Xenopus* (2 experiments), *Pleurodeles* (5 experiments), or *Ambystoma* (5 experiments). In each case, this caused two Ca^{2+} transients. First, a brief light emission occurred during the first minute, beginning within 5 sec after PHMPS addition in *Pleurodeles* or 20 sec in *Ambystoma*. The second Ca^{2+} transient was observed about 2 hr after drug addition and lasted for about 3 hr; the light emission decreased before GVBD (Fig. 8). An additional experiment was performed on 25 obelin-injected *Ambystoma* oocytes which were carefully washed (8 hr) and

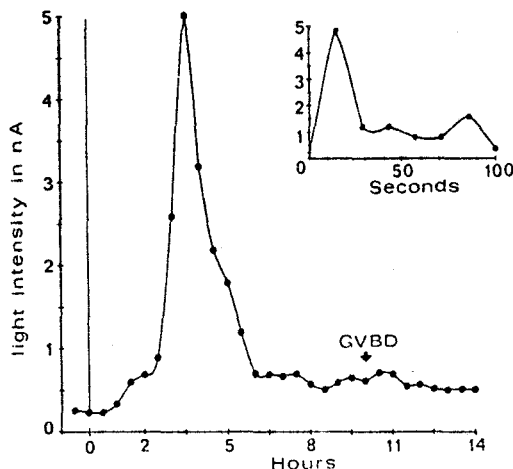


FIG. 8. PHMPS-induced Ca^{2+} transients as recorded from 20 *Pleurodeles* oocytes injected with aequorin. Inset illustrates initial light changes. Maturation ratio was 13/20.

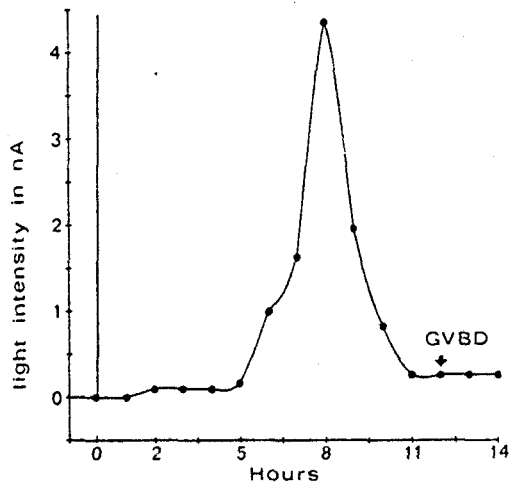


FIG. 9. PHMPS-induced Ca^{2+} transients as recorded from *Ambystoma* oocytes injected with obelin and suspended in CaMg-free OR₂. Maturation ratio: 17/25.

stimulated in CaMg-free OR₂. Results in Fig. 9 show that both Ca^{2+} surges occurred. Ca^{2+} release in these experiments was of the same order as that recorded after hormone stimulation. Percentages maturation obtained with this drug were not very different from those recorded with progesterone ($94 \pm 4.2\%$, $N = 130$ versus 100% , $N = 125$ for *Ambystoma*; $92 \pm 6.1\%$, $N = 100$ versus $91.6 \pm 5.4\%$, $N = 75$ for *Pleurodeles*; and $42.8 \pm 9.1\%$, $N = 100$ versus $46.4 \pm 8.1\%$, $N = 80$ for *Xenopus*).

Mn²⁺ ions. Ten millimolar external Mn^{2+} can mimic progesterone action in triggering meiosis reinitiation in the three species studied; this has also been reported by Robinson (1979), working on *Xenopus* oocytes. Our cytological preparations demonstrated that true maturation occurred, since stimulated oocytes always extruded a first polar body and formed a normal second metaphase spindle (Fig. 6B). Percentages maturation were 64.2 ± 25 ($N = 69$) in *Ambystoma* (4 females), 58.3 ± 37 ($N = 100$) in *Pleurodeles* (3 females), and 62.3 ± 8.6 ($N = 167$) in *Xenopus* (6 females), as compared to the respective control values of 95 ± 10 ($N = 75$), 100 ($N = 90$), and 42.7 ± 9.8 ($N = 180$).

In 13 experiments, each performed with 25 aequorin-injected oocytes from *Pleurodeles* (5 experiments), *Xenopus* (4 experiments), and *Ambystoma* (4 experiments), treatment with 10 mM $MnCl_2$ resulted in a brief light emission recorded during the first minute, which was followed by a second flash of longer duration occurring 2 hr later (Fig. 10). The Mn^{2+} -induced Ca^{2+} surge and maturation also take place normally in $CaMg$ -free OR_2 medium.

Valinomycin. Baltus *et al.* (1977) reported that the K^+ ionophore valinomycin could trigger meiosis reinitiation in *Xenopus*, possibly by affecting ions other than Ca^{2+} . It thus seemed important to us to study the effect of this drug on aequorin-injected oocytes. Working with *Ambystoma* oocytes, suspended in OR_2 , we found in two experiments that this treatment resulted in a free Ca^{2+} surge (Fig. 11) and brought about true maturation in 30% of the oocytes (15 over 50). No response occurs without external Ca^{2+} .

Carbon dioxide. It is now well established that changing intracellular pH (pHi) may produce Ca^{2+} release from internal stores (Fabiato and Fabiato, 1978) and that CO_2 is a potent agent in changing pHi

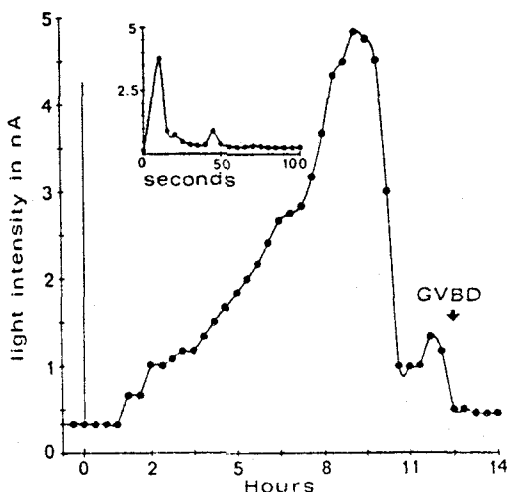


FIG. 10. Mn^{2+} -induced Ca^{2+} transients as recorded from 45 *Pleurodeles* oocytes injected with aequorin. Inset shows initial changes in light emission. Maturation ratio: 28/45.

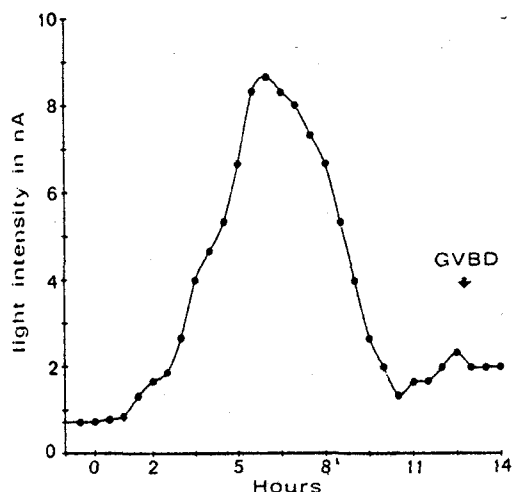


FIG. 11. Valinomycin-induced Ca^{2+} transient as recorded from 20 *Ambystoma* oocytes injected with aequorin. Maturation ratio: 7/20.

(Caldwell, 1958; Aickin and Thomas, 1977; Lea and Ashley, 1978). It has been shown, moreover, that the increase in light emission produced by aequorin-injected cells under the influence of CO_2 is not brought about by a direct action of either H^+ or CO_2 on the apparent affinity of the photoprotein for Ca^{2+} (Lea and Ashley, 1978). We therefore exposed two different lots of 25 aequorin-injected oocytes from *Ambystoma* to CO_2 for 10 min. CO_2 was applied by bubbling into an OR_2 medium where $NaHCO_3$ was substituted for $NaCl$ (Robinson, 1979). Twenty minutes after beginning this treatment, brief flashes of light were recorded; these occurred randomly throughout the experiment. Each flash corresponded to about 4 nA, and these were recorded for at least a 26-hr period (Fig. 12). As already reported by Robinson (1979), meiosis was, however, more difficult to obtain with HCO_3^- than with progesterone and the other mimetics. Most treated oocytes went only to a stage where the germinal vesicle was apparent at the animal pole. True maturations occurred in only 16% of the population.

DISCUSSION

A great number of treatments have been found to trigger meiosis when applied to

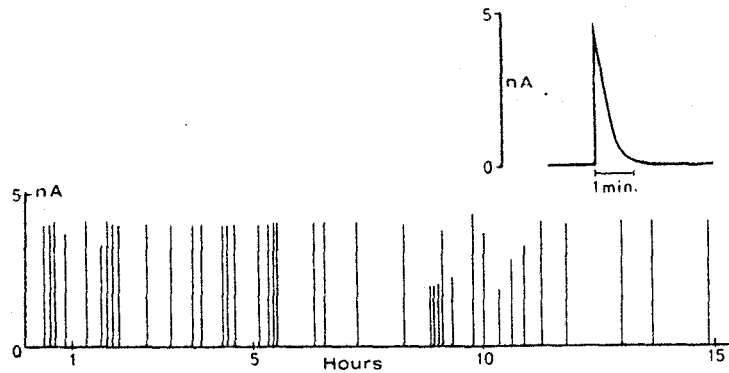


FIG. 12. HCO_3^- -induced Ca^{2+} transients as recorded from 25 *Ambystoma* oocytes injected with aequorin. Maturation ratio: 21/25 GVA + 4/25 true maturations.

Xenopus oocytes: among them are Ca^{2+} iontophoresis (Moreau *et al.*, 1976a), treatment with the ionophore A 23 187 (Wasserman and Masui, 1975), and treatment with the SH reagent PHMPS (Brachet *et al.*, 1975). It has been proposed that these meiosis stimulating drugs, with the exception of the K^+ ionophore valinomycin (Baltus *et al.*, 1977), might act by displacing Ca^{2+} from the membrane (Schorderet-Slatkine *et al.*, 1977; Baulieu *et al.*, 1978). Recently, Robinson (1979) reported that Mn^{2+} ions and CO_2 could also reinitiate meiosis in *Xenopus*, although he had no clue as to how the mechanism of these agents may act. The major observation reported in the present paper is that Ca^{2+} release is one of the first consequences of the action of progesterone and four of its mimetics. This observation on three species of amphibians, both urodeles and anurans, is very similar to our findings with aequorin-injected starfish oocytes (Guerrier *et al.*, 1978; Moreau *et al.*, 1978a,b) and greatly strengthens the hypothesis that Ca^{2+} release is a trigger for meiosis reinitiation.

Previous attempts to use aequorin to monitor free Ca^{2+} changes during progesterone- and PHMPS-induced maturation in *Xenopus* have failed to show any increase in light output (Bellé *et al.*, 1977). A likely explanation of this result is that these authors made their measurements using single oocytes, since they were unable to remove the injection pipet from their colla-

genase-prepared oocytes; therefore, light levels were probably below the detection limit of the monitoring system. Another improvement which made our measurements possible was the reduction in the concentration of EDTA present in the injection medium from 10 to 1 μM . This procedure improved the percentage maturation observed in injected oocytes. Even when these precautions were taken, the buffering capacity of the injected aequorin remained noticeable since the percentage maturation was usually reduced as compared to that obtained following injection of control buffers. This is particularly sensible with *Ambystoma* and *Pleurodeles*, where one can easily see the difference between a broken germinal vesicle and one which has only migrated toward the animal pole; such a decision cannot easily be made in *Xenopus*, where cytological controls must be systematically performed.

In our experiments, we have combined the advantages of two techniques: photo-protein injection and Ca^{2+} -sensitive electrodes. With aequorin and obelin, we could detect the early flashes produced by Mn^{2+} and PHMPS. These were too rapid to be recorded by the electrode since their duration fell below the time of response of the electrode (see Figs. 1, 8, and 10). On the other hand, the electrode appeared more sensitive to smaller Ca^{2+} changes in this material. This allowed us to see that the progesterone-induced Ca^{2+} transient begins

as early as 15 min after hormone application, i.e., some 15 and 75 min before that a significant light response could be recorded in *Xenopus* oocytes taken from the albino and the wild type, respectively. Also, because the electrode method avoids the problem of light absorption by the yolky cytoplasm, it can be more accurately calibrated. In addition, the electrode, but not aequorin, allowed us to determine that Ca^{2+} efflux occurs only in the presence of external calcium.

The Ca^{2+} transient precedes MPF formation (Masui and Markert, 1971). Interestingly, the level of internal free calcium begins to decrease prior to GVBD; this suggests a renewed sequestering capacity of the cytoplasm, possibly necessary for MPF action and subsequent microtubules assembly, as discussed by Masui *et al.* (1977). This might explain why true maturation is rarely obtained in response to CO_2 or when high Ca^{2+} concentrations are applied simultaneously with ionophore A 23187 (Baltus *et al.*, 1977).

Our results suggest that a free Ca^{2+} surge is a necessary condition for meiosis reinitiation. The following points support this hypothesis: (1) Injection of EGTA or EDTA inhibited GVBD (Moreau *et al.*, 1976a; Masui *et al.*, 1977); (2) small oocytes which do not respond to progesterone never show a Ca^{2+} transient; (3) between May and September, full-grown oocytes from *Pleurodeles* do not undergo meiosis in response to progesterone and also fail to produce a Ca^{2+} transient; (4) inhibition of progesterone-induced maturation by 10 mM theophylline (O'Connor and Smith, 1976) or 10 mM procaine hydrochloride (present paper) is correlated with the absence of a Ca^{2+} transient; and (5) a variety of agents, including the K^+ ionophore valinomycin, both initiates meiosis and causes a Ca^{2+} transient.

At this point, one may ask what is important: Ca^{2+} fluxes which occur through the membrane as described by O'Connor *et al.* (1977) or a Ca^{2+} release from intracel-

lular stores as we have shown to occur in starfish oocytes (Moreau *et al.*, 1978a, b)? We favor the second possibility because we find that the oocytes of *Xenopus*, *Pleurodeles*, and *Ambystoma* reinitiate true meiosis in CaMg-free medium, even when supplemented with 10 mM EDTA. These results differ from those reported by Marot *et al.* (1976). The reason for this discrepancy is unclear, since we obtained the same positive results on collagenase-treated oocytes prepared following the exact procedure they used and whatever the incubation medium was (Merriam, Steinberg, or OR_2). On the other hand, our observations are in good agreement with those of Ecker and Smith (1971) and with the finding of Masui *et al.* (1977) that progesterone-induced maturation can take place in medium where Ca^{2+} and Mg^{2+} have been replaced by Ba^{2+} or Sr^{2+} .

The source of Ca^{2+} for intracellular release is unknown. It is rather unlikely, however, that Ca^{2+} is liberated through binding of progesterone to the postulated melanosome receptor (Ozon and Bellé, 1973; Carraud and Ozon, 1979), since oocytes of the albino mutant of *Xenopus*, which contain no melanosomes or premelanosomes (Bluemink and Hoperskaya, 1975), produce the same progesterone-induced Ca^{2+} transient as in the wild type.

Ca^{2+} has been proposed as a second messenger for a wide range of physiological and biochemical functions (Rasmussen and Goodman, 1977; Rebhun, 1977; Kretsinger, 1979; Masui and Clarke, 1979). Specifically, Ca^{2+} may act by way of calmodulin, a well-characterized protein found in many cells, which changes its conformation over a physiological range of Ca^{2+} concentrations (Waisman *et al.*, 1978a). Calmodulin may activate various enzymes including cyclic nucleotide phosphodiesterase, adenylate cyclase, and protein kinases (Cheung *et al.*, 1975; Schulman and Greengard, 1978; Yasawa and Yagi, 1978; Waisman *et al.*, 1978b). That calmodulin may function dur-

ing amphibian maturation is indicated by the finding that meiosis can be initiated by the injection of Ca^{2+} -activated calmodulins in *Xenopus* oocytes (Maller and Krebs, 1978). In the course of the present work, we also found that an 18,000 MW acidic and heat-stable protein, prepared from *Sphaerechinus granularis* oocytes and which comigrated with authentic brain calmodulin on 5-10% SDS PAGE, triggered meiosis reinitiation when injected in *Ambystoma* oocytes, simultaneously with Ca^{2+} concentrations inefficient by themselves. How calmodulin may in turn effect the initiation of meiosis is unknown; c-AMP may or may not be involved (Maller and Krebs, 1977; O'Connor and Smith, 1979; Mulner *et al.*, 1979; Schorderet-Slatkine *et al.*, 1979). At this point, it is worth noting that the phosphodiesterase inhibitor theophylline does not seem to block meiosis by changing endogenous levels of c-AMP (O'Connor and Smith, 1976) but rather by precluding the development of the necessary Ca^{2+} surge. In conclusion, the initiation of meiosis in the amphibian oocyte provides an excellent model for studying how external stimuli may change cell function and control cell division through a modulation of the intracellular ionic environment.

This work was supported by the DGRST (ACC Membranes biologiques 7770259 and 7970779). We are greatly indebted to Dr. J. A. M. van den Biggelaar and R. van Oosterom from the Zoologische Laboratorium for providing *Ambystoma* and especially to Mrs. R. Verhoeff de Fremery from the Hubrecht Laboratory in Utrecht for *Ambystoma* and *Xenopus*, including the albino *ap* mutant, as well as to Dr. Houillon from Paris VI and Dr. A. Capuron from Lille I for furnishing generous samples of *Ambystoma* and *Pleurodeles*. We also wish to thank Dr. Simon from Zurich for his generous gift of Ca^{2+} -selective resins, Dr. A. K. Campbell from Cardiff for preparing the obelin, and Dr. L. Jaffe from Woods Hole and L. Tilney from Philadelphia for helpful discussions and for kindly correcting the English version. The excellent assistance of Mrs. C. Guerrier is also greatly acknowledged.

REFERENCES

- AICKIN, C. C., and THOMAS, R. C. (1977). Micro-electrode measurement of intracellular pH and buffering power of mouse soleus muscle fibres. *J. Physiol. London* 267, 791-810.
- BAKER, P. F., HODGKIN, A. L., and RIDGWAY, E. B. (1971). Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J. Physiol. London* 218, 709-775.
- BALTUS, E., HANOCQ-QUERTIER, J., PAYS, A., and BRACHET, J. (1977). Ionic requirements for induction of maturation (meiosis) in full-grown and medium-sized *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 3461-3465.
- BAULIEU, E. E., GODEAU, J. F., SCHORDERET, M., and SCHORDERET-SLATKINE, S. (1978). Steroid induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes: Surface and calcium. *Nature (London)* 275, 593-598.
- BELLÉ, R., OZON, R., and STINNAKRE, J. (1977). Free calcium in full grown *Xenopus laevis* oocyte following treatment with ionophore A23187 or progesterone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 8, 65-72.
- BLINKS, J. R., PRENDERGAST, F. G., and ALLEN, D. G. (1976). Proteins as biological calcium indicators. *Pharmacol. Rev.* 28, 1-93.
- BLUEMINK, J. G., and HOPERSKAYA, O. A. (1975). Ultrastructural evidence for the absence of premitochondria in eggs of the albino mutant (*ap*) of *Xenopus laevis*. *Wilhelm Roux Arch.* 177, 75-79.
- BRACHET, J., BALTUS, E., DE SCHUTTER-PAYS, A., HANOCQ-QUERTIER, E., and STEINERT, G. (1975). Induction of maturation (meiosis) in *Xenopus laevis* oocytes by three organomercurials. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1274-1278.
- CALDWELL, P. C. (1958). Studies on the internal pH of large muscle and nerve fibres. *J. Physiol. London* 142, 22-62.
- CAMPBELL, A. K. (1974). Extraction, partial purification and properties of Obelin, the calcium-activated luminescent protein from the hydroid *Obelia geniculata*. *Biochem. J.* 143, 411-418.
- CARTEAUD, A., and OZON, R. (1979). Preliminary characterization of calcium binding to melanosomes isolated from Amphibian oocytes. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 19, 103-110.
- CHEUNG, W. Y., BRADHAM, L. S., LYNCH, T. J., LIN, Y. M., and TALLANT, E. A. (1975). Protein activator of cyclic 3':5' nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1055-1062.
- DRURY, K. (1978). Method for the preparation of active maturation promoting factor (MPF) from *in vitro* matured oocytes of *Xenopus laevis*. *Differentiation* 10, 181-186.
- ECKER, R. E., and SMITH, L. D. (1971). Influence of exogenous ions on the events of maturation in *Rana pipiens* oocytes. *J. Cell. Physiol.* 77, 61-70.
- FABIATO, A., and FABIATO, F. (1978). Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol. London* 276, 233-255.
- FORTUNE, J. E., CONCANNON, P. W., and HANSEL, W.

- (1975). Ovarian progesterone levels during *in vitro* oocyte maturation and ovulation in *Xenopus laevis*. *Biol. Reprod.* **13**, 561-567.
- GODEAU, F., SCHORDERET-SLATKINE, S., HUBERT, P., and BAULIEU, E. E. (1978). Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 2353-2357.
- GUERRIER, P., MOREAU, M., and DOREE, M. (1978). Control of meiosis reinitiation in starfish: Calcium ion as the primary effective trigger. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* **18**, 441-452.
- KRETSINGER, R. K. (1979). The informational role of calcium in the cytosol in *Advan. Cycl. Nucl. Res.* (in press).
- KUSANO, K., MILEDI, R., and STINNAKRE, J. (1955). Microinjection of calcium into droplets of aequorin. *Proc. Roy. Soc. London B* **189**, 39-47.
- LEA, T. J., and ASHLEY, C. C. (1978). Increase in free Ca^{2+} in muscle after exposure to CO_2 . *Nature (London)* **275**, 236-238.
- MALLER, J. L., and KREBS, E. G. (1977). Progesterone stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **252**, 1712-1718.
- MALLER, J. L., and KREBS, E. G. (1978). Intracellular c-AMP levels and the initiation of meiosis in *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.* **79**, 180 a.
- MAROT, J., BELLÉ, R., and OZON, R. (1976). Recherche sur la maturation de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Arguments en faveur du rôle des ions calcium. *C.R. Acad. Sci. Paris* **282**, 1301-1304.
- MASUI, Y., and MARKET, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177**, 129-146.
- MASUI, Y., MEYERHOF, P. G., MILLER, M. A., and WASSERMAN, W. J. (1977). Roles of divalent cations in maturation and activation of vertebrate oocytes. *Differentiation* **9**, 49-57.
- MASUI, Y., and CLARKE, H. J. (1979). Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* **57**, 185-282.
- MERRIAM, R. W. (1971). Progesterone-induced maturation events in oocytes of *Xenopus laevis*. I. Continuous necessity for diffusible calcium and magnesium. *Exp. Cell Res.* **68**, 75-80.
- MOREAU, M., DOREE, M., and GUERRIER, P. (1976a). Electrophoretic introduction of calcium ions into the cortex of *Xenopus laevis* oocytes triggers meiosis reinitiation. *J. Exp. Zool.* **197**, 443-449.
- MOREAU, M., GUERRIER, P., and DORRE, M. (1976b). Induction of meiosis by injection of heterologous protein kinase and phosphorylase kinase in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Exp. Zool.* **197**, 435-442.
- MOREAU, M., GUERRIER, P., and DOREE, M. (1978a). Membrane recognition and transduction during the hormone induced meiosis reinitiation in Starfish oocytes. *Biol. Cell* **32**, 69-74.
- MOREAU, M., GUERRIER, P., DOREE, M., and ASHLEY, C. C. (1978b). 1-Methyladenine induced release of intracellular calcium triggers meiosis in starfish oocytes. *Nature (London)* **272**, 251-253.
- MULNER, O., HUCHON, D., THIBIER, C., and OZON, R. (1979). Cyclic-AMP synthesis in *Xenopus laevis* oocytes. Inhibition by progesterone. *Biochim. Biophys. Acta* **582**, 179-184.
- O'CONNOR, C. M., ROBINSON, K. R., and SMITH, L. D. (1977). Calcium, potassium and sodium exchange by full-grown and maturing *Xenopus laevis* oocytes. *Develop. Biol.* **61**, 28-40.
- O'CONNOR, C. M., and SMITH, D. (1976). Inhibition of oocyte maturation by theophylline: Possible mechanism of action. *Develop. Biol.* **52**, 318-322.
- O'CONNOR, C. M., and SMITH, L. D. (1979). *Xenopus* oocyte cAMP-dependent protein kinases before and during progesterone-induced maturation. *J. Exp. Zool.* **207**, 367-374.
- OEHME, M., KESSLER, M., and SIMON, W. (1976). Neutral carrier Ca^{2+} -microelectrode. *Chimia* **30**, 204-206.
- OZON, R., and BELLÉ, R. (1973). Progesterone receptor associated with the "melanosome" fraction of *Pleurodeles wallii* oocytes (Urodela Amphibian). *Biochim. Biophys. Acta* **320**, 588-593.
- RASMUSSEN, H., and GOODMAN, B. P. (1977). Relationship between calcium and cyclic nucleotides in cell activation. *Physiol. Rev.* **57**, 421-509.
- REBHUN, L. I. (1977). Cyclic nucleotides, calcium and cell division. *Int. Rev. Cytol.* **49**, 1-54.
- ROBINSON, K. R. (1979). Electrical currents through full-grown and maturing *Xenopus* oocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**, 837-841.
- SCHORDERET-SLATKINE, S., SCHORDERET, M., and BAULIEU, E. E. (1977). Progesterone induced meiotic reinitiation *in vitro* in *Xenopus laevis* oocytes. A role for the displacement of membrane-bound calcium. *Differentiation* **9**, 67-76.
- SCHORDERET-SLATKINE, S., SCHORDERET, M., BOQUET, P., GODEAU, F., and BAULIEU, E. E. (1978). Progesterone-induced meiosis in *Xenopus laevis* oocytes: A role for c-AMP at the "maturation promoting factor" level. *Cell* **15**, 1269-1275.
- SCHULMAN, H., and GREENGARD, P. (1978). Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 5432-5436.
- SHIMOMURA, O., JHONSON, F. H., and SAIGA, Y. (1963a). Further data on the bioluminescent protein, aequorin. *J. Cell. Comp. Physiol.* **62**, 1-8.
- SHIMOMURA, O., JHONSON, F. H., and SAIGA, Y. (1963b). Microdetermination of calcium by aequorin luminescence. *Science* **140**, 1339-1340.
- SHIMOMURA, O., and JHONSON, F. H. (1970). Calcium binding, quantum yield and emitting molecule in

- aequorin bioluminescence. *Nature (London)* **227**, 1356-1357.
- SMITH, L. D. (1975). Molecular events during oocyte maturation. In "Biochemistry of Animal Development" (R. Weber, ed.), Vol. 3, pp. 1-46. Academic Press, New York.
- SMITH, L. D., and ECKER, R. E. (1971). The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocyte in the induction of maturation. *Develop. Biol.* **25**, 232-247.
- STEINHARDT, R. A., ZUCKER, R., and SCHATTEN, G. (1977). Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. *Develop. Biol.* **58**, 185-196.
- VILAIN, J. P. (1978). Maturation *in vitro* des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien urodèle). *Mem. Soc. Zool. France* **41**, Symp. L. Gallien, 93-102.
- VILAIN, J. P., MOREAU, M., and GUERRIER, P. (1980). Oocyte-follicle coupling and meiosis reinitiation in Amphibians (submitted).
- WAISMAN, D. W., STEVENS, F. C., and WANG, J. H. (1978a). Purification and characterization of a Ca^{2+} -binding protein in *Lumbricus terrestris*. *J. Biol. Chem.* **253**, 1106-1113.
- WAISMAN, D. M., SINGH, T. J., and WANG, J. H. (1978b). The modulator-dependent protein kinase. A multifunctional protein kinase activable by the Ca^{2+} -dependent modulator protein of the cyclic nucleotide system. *J. Biol. Chem.* **253**, 3387-3390.
- WALLACE, R. A., JARED, D. W., DUMONT, J. N., and SEGA, M. W. (1973). Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. III. Optimum incubation conditions. *J. Exp. Zool.* **184**, 321-334.
- WASSERMAN, W. J., and MASUI, Y. (1975). Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A 23187. *J. Exp. Zool.* **193**, 369-375.
- WASSERMAN, W. J., and MASUI, Y. (1976). A cytoplasmic factor promoting oocyte maturation: Its extraction and preliminary characterization. *Science* **191**, 1266-1268.
- YASAWA, M., and YAGI, K. (1978). Purification of modulator-deficient myosin light-chain kinase by modulator protein-sepharose affinity chromatography. *J. Biochem.* **84**, 1259-1265.

Publication n° 6

- J.P. VILAIN, M. MOREAU, et P. GUERRIER, 1980 : Propionate and cycloheximide reversibly block progesterone induced calcium surge in *Ambystoma mexicanum* oocytes. *Develop. Growth and Differ*, 22, 25-31.

PROPIONATE AND CYCLOHEXIMIDE REVERSIBLY
BLOCK PROGESTERONE INDUCED CALCIUM
SURGE IN *AMBYSTOMA MEXICANUM* OOCYTES

JEAN PIERRE VILAIN*, MARC MOREAU**
AND PIERRE GUERRIER**

Université de Lille I
et Station Biologique, Roscoff, 29211, FRANCE

The photoprotein aequorin was used in order to monitor Ca^{2+} transients in conditions where progesterone induced maturation was reversibly inhibited. Propionate but not isethionate Cl-free medium impaired both meiosis reinitiation and the Ca^{2+} transient, unless oocytes were returned to normal Cl-containing medium. Similar results were obtained with the protein synthesis inhibitor cycloheximide. In both cases, the incidence of germinal vesicle breakdown (GVBD) and the time schedule relating it to the Ca^{2+} surge appeared not very different from that found from control oocytes. The evidence suggests that both treatments act on the initial step by which progesterone triggers the intracellular Ca^{2+} release needed for maturation promoting factor (MPF) elaboration. No definitive conclusion can be reached however from these experiments concerning the need for protein synthesis during meiosis reinitiation.

We found recently, using Ca^{2+} sensitive electrodes and the photoproteins aequorin and obelin that treatment of anuran and urodele oocytes with progesterone and some of its mimetics triggers an early Ca^{2+} transient (16). We considered this Ca^{2+} transient as an essential step for release of the meiotic block since it never occurred in progesterone irresponsive oocytes or in oocytes simultaneously treated with 10 mM of either theophylline or procaine. In this work, aequorin-injected oocytes were used in order to demonstrate the effect of two different inhibitory treatments on both meiosis reinitiation and the Ca^{2+} surge. The first treatment consisted of using Cl-free medium since data from ROBINSON (18) suggested that progesterone might indirectly affect a Ca^{2+} -dependent chloride permeability of the oocyte. In these conditions, we found that propionate but not isethionate-chloride exchange impaired meiosis reinitiation, unless oocytes were washed and returned to normal Cl-containing medium. These effects were found to coincide with the inhibition and recovery of the progesterone induced Ca^{2+} surge. Identical results were obtained with the protein synthesis inhibitor cycloheximide which has been shown to inhibit reversibly meiosis reinitiation both in *Xenopus* (2) and *Rana* oocytes (19). These data strengthen the idea that Ca^{2+} surge is an important step in meiosis reinitiation and that most inhibitors act at this level, blocking the production of the maturation promoting factor.

MATERIALS AND METHODS

Fully-grown oocytes (1.8 to 2.0 mm in diameter) were isolated from ovarian tissues excised from mature

* Université de Lille I, BP 36, Villeneuve d'Ascq, FRANCE

** Dr. Pierre Guerrier, Station Biologique, 29211 Roscoff, FRANCE.

Ambystoma mexicanum females anesthetized with MS 222 (aminobenzoate methanesulfonic acid salt, Aldrich). Oocytes were released from the follicles by manual dissection and allowed to recover for 8 hr in OR₂ medium (26). This delay ensured the elimination of occasionally stimulated oocytes from the experimental batches. Oocytes prepared in this way and continuously exposed to progesterone (1 µg/ml) showed 97.5 ± 6.2% maturation, n = 187. Incubations of control and treated oocytes were run simultaneously in covered polystyrene petri dishes (Falcon) containing 10.0 ml of OR₂. Stock progesterone (Sigma) was prepared up to 1 mg/ml in absolute ethanol and used at a concentration of 1 µg/ml all throughout the experiment. Cycloheximide (Sigma) was regularly made up fresh in OR₂ at a stock concentration of 1 mg/ml. The incubation dose was 10 to 20 µg/ml, drug being applied 1 hr before progesterone addition. Cl-free medium were obtained by substituting Na isethionate or Na propionate for NaCl (82.5 mM) in the OR₂ medium. Washing has been performed according to SAMSON and SCHUETZ (19). Aequorin (Sigma, type I) was recovered after filtration through a short column containing Sephadex G 25 coarse which has been equilibrated with a solution of Na acetate, 10 mM; EDTA, 1 µM; pH 6.2. The protein was pressure injected into the oocytes (0.1 µl by cell) through a micropipet with a bevelled tip 3 × 5 µm. Light emission was detected without a light guide, using an EMI 9635 QB or an Hamamatsu R 374 photomultiplier operated at 1100 V. The anode current was measured with a current to voltage converter having a time constant of 60 ms, displayed on an oscilloscope and recorded on a chart recorder. Germinal vesicle breakdown (GVBD) was determined at the end of each incubation period, looking at the oocytes under a dissecting microscope. In *Ambystoma*, it is indeed easy to see the difference between those oocytes which underwent GVBD and have the black dot representing the 2nd maturation spindle and the ones whose germinal vesicle has only migrated towards the animal pole (GVA). Furthermore, oocytes which matured normally were found to activate, extruding the second polar body and releasing the follicular envelope, when stimulated by a pulse (80 V, 100 ms) applied between two Ag-AgCl plates separated by 2 cm. Evolution of the resting potentials was recorded by classical electrophysiological techniques. Electrodes were filled with 3 M KCl and had resistances of 15–30 MΩ. The voltage monitoring electrode was connected to a unity-gain amplifier. The indifferent reference Ag-AgCl electrode, bathing in 3 M KCl, was linked to the medium through an agar-bridge in order to avoid junction potentials. Data were recorded with a Tektronix oscilloscope and with a Sefram pen recorder.

RESULTS

From Table 1, it can be seen that isethionate does not block progesterone-induced maturation. Moreover, this anion has no effect on the oocyte resting potential which evolves normally after progesterone stimulation from -60, -70 mV to -20, -30 mV. By contrast, replacement of all or half of the NaCl present in OR₂ medium by propionate readily inhibited meiosis reinitiation as well as the evolution of the resting potential. This remained stable after an initial hyperpolarization of about 5 mV. It is possible that this effect depends on the fact that propionate is a weak acid, by which the intracellular pH may be affected (5). Propionate inhibition of meiosis reinitiation is however reversible since washing the oocytes always allowed them to resume true maturation without additional exposure to progesterone (Table 1). Clearly, this is not an "off response" to the weak acid since control experiments performed only with propionate, in absence of the hormone, repeatedly failed to trigger meiosis reinitiation.

Essentially identical results were obtained with cycloheximide. This drug, which has no significant effect on the oocyte resting potential, also blocks the depolarization response following progesterone addition, as has been already described for *Rana* (29). Data from Table 2 confirm moreover that cycloheximide is as a potent inhibitor of meiosis reinitiation in *Ambystoma* as it has been previously described for *Xenopus* (2, 3, 4, 12, 20, 27) and for *Rana* (17, 23). They also demonstrated this effect to be reversible by simple washing without additional progesterone exposure as previously shown for *Xenopus* (2) and for *Rana* (19). True maturations were

Table 1. Effect of Cl-free OR₂ medium on progesterone-induced meiosis reinitiation in *Ambystoma mexicanum* oocytes.

First treatment*	Resulting GVBD	Post Treatment		Resulting GVBD
		Wash**	Progesterone	
Progesterone	24/25			
OR ₂ vehicle	0/25	no	yes	25/25
Isethionate + Progesterone	20/20			
Propionate + Progesterone	0/25	[yes yes	yes no	10/10 15/15
Progesterone	36/40			
OR ₂ vehicle	0/15	no	yes	15/15
Propionate + Progesterone	[0/25*** 0/15	yes [no yes	no no no	21/25 0/15 10/10
Half Propionate + Progesterone	0/15	[no yes	no no	0/5 10/10

* Progesterone (1 µg/ml) added 45 min after placing the oocytes in Cl-free OR₂ medium.

** Wash consisted in 3 × 10 ml rinse, then reincubation in 10.0 ml OR₂ alone or with progesterone. Wash began at t = + 14 h.

*** Experiment with aequorin-injected oocytes.

Table 2. Effect of cycloheximide on progesterone-induced maturation in *Ambystoma mexicanum*.

Experiment	First treatment*	Resulting GVBD	Post Treatment		Resulting GVBD
			Wash*	Progesterone	
1	Progesterone	15/15			
	OR ₂ vehicle	0/15	no	yes	15/15
	Cycloheximide (10 µg/ml)	[3 GVA/25** 6 GVA/25***	yes yes	no no	16/25 21/25
	+ Progesterone	6 GVA/20	yes	no	18/20
2	Progesterone	15/15			
	OR ₂ vehicle	0/15	no	yes	15/15
	Cycloheximide (15 µg/ml) + Progesterone	[0/23*** 0/15	yes yes	no no	16/23 + 7 GVA 10/15 + 3 GVA
3	Progesterone	15/15			
	OR ₂ vehicle	0/15	no	yes	15/15
	Cycloheximide (20 µg/ml) + Progesterone	2 GVA/25***	yes	no	8/15 + 7 GVA
4	Progesterone	20/20			
	OR ₂ vehicle	0/50			
	Cycloheximide (10 µg/ml) + Progesterone	12 GVA/25***	yes	no	8/25 + 14 GVA

* Wash and incubation conditions as for Table 1.

** GVA refers to partially stimulated oocytes showing only migration of germinal vesicle towards the animal pole. After first treatment, the others oocytes remained unstimulated. After second treatment, all the remaining oocytes have undergone GVBD and showed the black dot for 2nd maturation spindle.

*** Experiments with aequorin-injected oocytes.



usually obtained in these conditions, except in some experiments where a variable percentage of oocytes stopped their evolution after the germinal vesicle has reached the animal pole (Table 2). In no case did GVBD obtained from cycloheximide pretreated and washed oocytes occur before GVBD was observed in untreated paired oocytes from the same age stimulated with the hormone. On the contrary, such treated oocytes were often found to resume maturation with a significant delay, GVBD occurring up to 16 hr after washing instead of the usual 9–10 hr observed for control oocytes treated only with progesterone.

Now, when the same experiments were repeated, using aequorin-injected oocytes, it appeared that both propionate (Fig. 1, A) and cycloheximide treatments (Fig. 2, A) virtually abolished the Ca^{2+} surge which normally occurs after progesterone stimulation. Following the washing procedure (which was completed in less than 15 min) a second Ca^{2+} transient developed however (Figs. 1, B and 2, B), which attained the usual value and preceded GVBD by 2 to 3 hr. In those cycloheximide-treated oocytes which showed a significant delay in resuming maturation, we found moreover that the Ca^{2+} surge was greatly delayed as was GVBD. This last event occurred however at the expected time, some 3 hr after peak light emission, i.e. be-

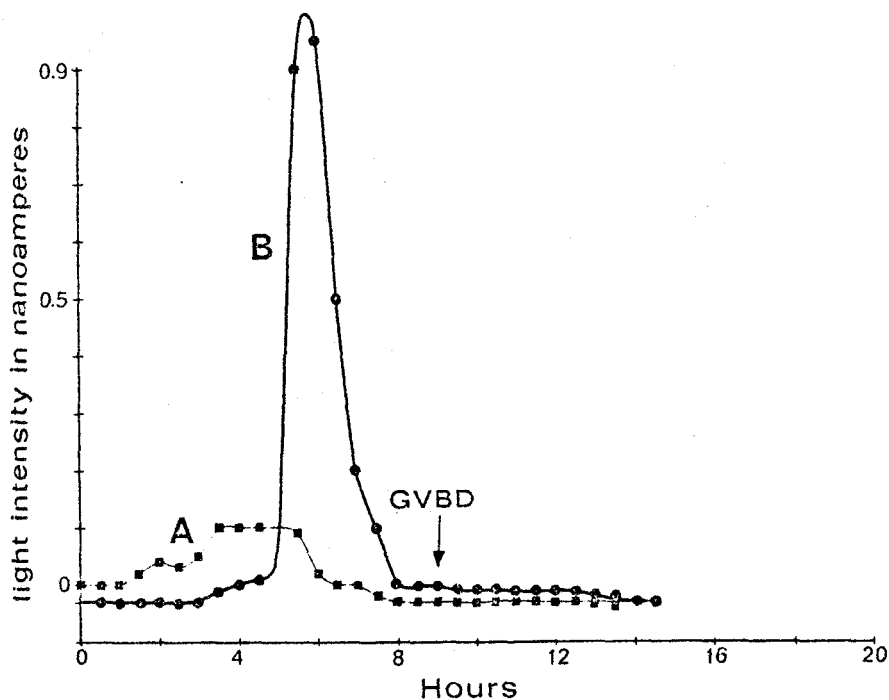


Fig. 1. Effects of propionate Cl^- -free OR_2 medium on progesterone-induced Ca^{2+} surge and maturation in *Ambystoma mexicanum* oocytes.

- , Ca^{2+} surge in presence of propionate (A). Progesterone was added at $t = +30$ min to oocytes suspended in propionate Cl^- -free medium from $t = -45$ min. The oocytes were washed at $t = +13$ hr 30 min.
- , Ca^{2+} surge in the same washed oocytes (B). At the end of the washing procedure. Maturation ratio were 0/25 at 13 hr 30 min and 21/25 true GVBD with first polar body at 28 hr.

Control experiments performed on aequorin-injected oocytes maintained in OR_2 medium in absence of hormone addition repeatedly failed to show any transient Ca^{2+} surge.

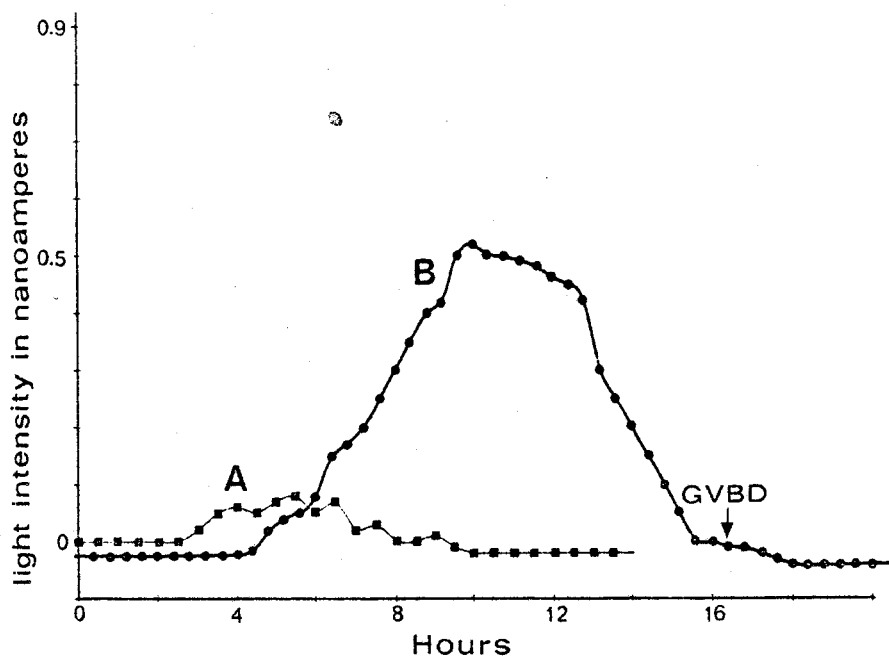


Fig. 2. Effects of cycloheximide on progesterone-induced Ca^{2+} surge and maturation in *Ambystoma mexicanum* oocytes.

- , Ca^{2+} surge in progesterone+cycloheximide (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated oocytes (A). Cycloheximide and progesterone added at $t = -45$ min and $+30$ min respectively. Oocytes washed at $t = +14$ hr.
- , Ca^{2+} surge in the washed oocytes (B). $t =$ end of washing procedure. Maturation ratio were 6 GVA/25 at 14 hr and 21/25 GVBD with first polar body at 24 hr.

tween 9 and 13 hr after washing out the inhibitor instead of the usual 5 to 7 hr period following hormone addition, as observed for progesterone-stimulated control oocytes (16).

DISCUSSION

The data presented here demonstrate that administration of propionate or cycloheximide simultaneously with progesterone blocks meiosis reinitiation in *Ambystoma*; these treatments also reduce the Ca^{2+} surge which normally occurs following progesterone or mimetic stimulation (16). This agrees well with our finding that 10 mM theophylline or procaine completely abolished both the Ca^{2+} surge and meiosis reinitiation in *Xenopus* and strengthens the view that the Ca^{2+} transient constitutes an indispensable early step in the meiosis reinitiation process. Such an assumption is further supported by fact that both the Ca^{2+} surge and maturation resume normally without additional progesterone exposure when propionate or cycloheximide are washed out of the medium. Of course, this suggests either that progesterone has already hit its primary target before washing or that a sufficient amount of it remained trapped in the oocyte at this stage. This is not unlikely since SMITH and ECKER (25) found that 50% of the steroid remained bound to the oocyte after an extensive washing and since progesterone did not appear to move rapidly from its local membrane site of application (22). In our experiments, it is worth noting that the delayed GVBD we observed sometimes to occur after the washing

procedure were directly related to an abnormal delay in development of the Ca^{2+} surge. By contrast, this event always maintained its usual temporal relationships to GVBD. On this point, our data are in close agreement with those obtained on *Rana* by SAMSON and SCHUETZ (19). Both demonstrate that no advance is taken up by the oocyte on its way to maturation during the period it is incubated with cycloheximide. It follows that this drug must act quite early during the process of meiosis reinitiation. Since the maximal Ca^{2+} surge seems to coincide temporally with the appearance of full MPF activity (27, 11), it is not surprising that cycloheximide inhibits the burst of protein phosphorylation which, in progesterone-stimulated *Xenopus* oocytes, was found to occur just before GVBD (10).

These new data raise again the problem as to whether cycloheximide acts directly by suppressing the intracellular Ca^{2+} release as did procaine, theophylline and propionate or directly through its well known effect as an inhibitor of protein synthesis. Presently, the question is far from clear, although it is well documented that protein synthesis actually increases after progesterone stimulation and that cycloheximide may inhibit more than 90% of the protein synthesized by the oocyte (11). The fact that this inhibition is readily reversible in *Ambystoma* as well as in *Xenopus* (2) and *Rana* (19) remains quite puzzling however. So are the facts that few significant differences have been observed in the pattern of proteins synthesized by treated and untreated oocytes before GVBD (11) and that protein synthesis is also stimulated in non maturing oocytes taken from HCG injected frogs (1). Finally it must also be remembered that, in mammals (24) as well as in starfish (7), protein synthesis is not required for triggering meiosis, at least up the first metaphase. Using *Marthasterias glacialis* oocytes, we found moreover that emetine, an other protein synthesis inhibitor, did not block maturation at those concentrations which abolished protein synthesis. It was only effective when higher doses were used which inhibited the intracellular Ca^{2+} release and the phosphorylation step which normally accompanied it (9, 15).

The hypothesis that cycloheximide may act at the protein synthesis level cannot be denied however on the basis of the present experiments. It has been shown indeed that *Xenopus* oocytes, stimulated by LANTHANUM (21), by chemical or physical iontophoresis (28, 13) or through phosphophorylase kinase or protein kinase injection (14), failed to mature in the continuous presence of cycloheximide. The delayed responses we observed sometimes in the development of the Ca^{2+} surge after prolonged cycloheximide treatment and further washing also suggest that even this early response may require the synthesis of an initiator, as first proposed by WASSERMAN and MASUI (27). This might eventually be a protease, since various antiproteases have been found to block the progesterone or ionophore but not the MPF-induced maturation (8). Presently, it remains unclear whether MPF-induced maturation may take place or not in the complete absence of protein synthesis (6, 23, 27). Clearly, much work remains to be done on this subject before a definitive answer can be reached.

This work partly supported by D. G. R. S. T. ACC 79.7.07.88.

REFERENCES

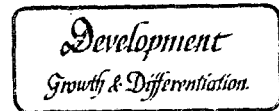
1. ADAMSON, E. D. and H. R. WOODLAND, 1977. *Develop. biol.*, **57**, 136-149.
2. BALTUS, E., J. BRACHET, J. HANOCQ-QUERTIER and E. HUBER, 1973. *Differentiation*, **1**, 127-143.

3. BRACHET, J., 1967. *Exp. Cell Res.*, 48, 233-235.
4. ———, A. PAYS-DE SCHUTTER and E. HUBERT, 1975. *Differentiation*, 3, 3-14.
5. DE HEMPTINNE, A. and R. MARANNES, 1979. *J. Physiol.*, 295, 22 P-23 P.
6. DRURY, D. C. and SCHORDERET-SLAKINE, 1975. *Cell*, 4, 269-274.
7. GUERRIER, P. and M. DORÉE, 1975. *Develop. Biol.*, 47, 341-348.
8. ———, M. MOREAU and M. DORÉE, 1977. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 284, 317-319.
9. ———, ——— and ———, 1977. *Mol. Cell Endocrinol.*, 7, 137-150.
10. MALLER, J. L., M. WU and J. C. GERHART, 1977. *Develop. Biol.*, 58, 295-312.
11. MASUI, Y. and H. J. CLARKE, 1979. *Intern. Rev. Cytol.*, 57, 185-282.
12. MERRIAM, R. W., 1972. *J. Exp. Zool.*, 180, 421-426.
13. MOREAU, M., M. DORÉE and P. GUERRIER, 1976. *J. Exp. Zool.*, 197, 443-449.
14. ———, P. GUERRIER and M. DORÉE, 1976. *J. Exp. Zool.*, 197, 435-442.
15. ———, ——— and ———, 1978. *Biol. cellulaire*, 32, 69-74.
16. ———, J. P. VILAIN and P. GUERRIER, 1979. *Develop. Biol.*, (in press).
17. MORRILL, G. A., F. SCHATZ and V. S. ZABRENESKY, 1975. *Differentiation*, 4, 143-152.
18. ROBINSON, K. R., 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 837-841.
19. SAMSON, D. A. and A. W. SHUETZ, 1979. *J. Exp. Zool.*, 208, 213-220.
20. SCHORDERET-SLAKINE, S., 1972. *Cell Differ.*, 1, 179-189.
21. ———, M. SCHORDERET and E. E. BAULIEU, 1976. *Nature*, 262, 289-290.
22. SCHUETZ, A. W. and J. C. CLOUD, 1977. *Differentiation*, 8, 191-194.
23. ——— and D. SAMSON, 1979. *Develop. Biol.*, 68, 636-642.
24. SCHULTZ, R. M. and P. M. WASSARMAN, 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 538-541.
25. SMITH, L. D. and R. E. ECKER, 1971. *Develop. Biol.*, 25, 232-247.
26. WALLACE, R. A., D. W. JARED, J. N. DUMONT and M. W. SEGA, 1973. *J. Exp. Zool.*, 184, 321-334.
27. WASSERMAN, W. J. and Y. MASUI, 1975. *Exp. Cell Res.*, 91, 381-388.
28. ——— and ———, 1975. *J. Exp. Zool.*, 193, 369-375.
29. ZIEGLER, D., and G. A. MORRILL, 1977. *Develop. Biol.*, 60, 318-325.

(Received for publication: November 20, 1979)

Publication n° 7

- J.P. VILAIN, M. MOREAU et P. GUERRIER, 1980 : Uncoupling of oocyte-follicle cells triggers reinitiation of meiosis in amphibian oocytes. *Develop., Growth and Differ.*, 22, 687-691.



UNCOUPLING OF OOCYTE-FOLLICLE CELLS TRIGGERS REINITIATION OF MEIOSIS IN AMPHIBIAN OOCYTES

JEAN-PIERRE VILAIN¹, MARC MOREAU² AND
PIERRE GUERRIER²

¹Université de Lille 1. B. P. 36 VILLENEUVE D'ASCQ-FRANCE

²Station Biologique 29211 ROSCOFF-FRANCE

Reinitiation of meiosis has been triggered *in vitro* in oocytes of the anuran *Xenopus laevis* and the urodeles *Pleurodeles waltlii* and *Ambystoma mexicanum* by enzymatic, mechanical or manual defolliculation, without addition of hormone. By measuring changes in the membrane resistance and time constants, we also demonstrate the existence of an electrical polarized coupling between the oocyte and its follicle and show that progesterone breaks it definitively within the first two hours. These results are discussed in relation to mammalian maturation.

Meiosis reinitiation in amphibian and starfish oocytes has been shown to depend directly upon the release of intracellular Ca^{2+} under the influence of the natural hormone and various mimetics (4, 18, 19, 26). In the amphibians, it is clearly established that follicle cells synthesize and release progesterone under the influence of pituitary hormones (14, 22). This hormone is known to act directly at the cell level *in vitro* as well as *in vivo*, and renders oocytes fertilizable (8, 30). Although this has been rarely quoted in the literature (1), many authors, working with *Xenopus* oocytes, however, found that spontaneous maturation may also occur following defolliculation. This may be why some authors (24, 28) used only oocytes enclosed in a follicle to study basic membrane properties and their variations upon progesterone stimulation. However, such studies, when measuring changes in the oocyte membrane resistance, have neglected the possible "shunt" effect that the follicular cells may have introduced. Recent evidences indicate, moreover, that typical gap junctions exist between the amphibian oocyte and its follicle (16), and they are susceptible to hormone regulation (7).

In this paper, we establish that spontaneous maturation actually occurs in anuran and urodelen oocytes following enzymatic or mechanical defolliculation. By measuring changes in the membrane resistance and time constants, both on free oocytes and intact follicles, we also demonstrate the existence of a polarized coupling between the oocyte and its follicle and show that progesterone breaks it definitively after 80 min.

MATERIAL AND METHODS

Sexually mature HCG unstimulated *Xenopus laevis*, *Pleurodeles waltlii* and *Ambystoma mexicanum* obtained from different stocks were reared in Roscoff. Full grown oocytes taken from the ovary were dissected out of their follicles either with fine forceps, collagenase treatment (20), or by stirring them in a beaker coated on its internal side with abrasive paper 0.05 μ m grain. Collagenase treated oocytes (5 hr, 1mg/ml, Worthington), which were allowed to recover overnight at 4°C in OR₂ medium (27), mechanically defolliculated oocytes, or

intact follicles were then submitted to progesterone stimulation (Sigma, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Controls consisted of similarly prepared material not treated with progesterone.

Appearance of the black dot for the second maturation spindle (Urodeles), cytological controls demonstrating the presence of an arrested second metaphase spindle, and the capacity of the treated oocytes to become activated when stimulated by a pulse (80 V, 200 ms) applied between two Ag-Ag Cl plates were the only criteria used for concluding in true maturation. Current-clamp measurements were performed in a conventional manner, using two electrodes (20-30 M Ω). Permanent records were made with a linear chart recorder and the membrane time constants were analysed with an 11 bits digital transient recorder. These were calculated using the expression $V = V_m(1 - e^{-\frac{t}{RC}})$ Where R is the membrane resistance in ohms, C the membrane capacity in farads, V_m the membrane potential at the plateau levels in volts, and t the time in seconds. The time constant given in seconds was obtained by plotting $\text{Log} \left(1 - \frac{V}{V_m} \right)$ versus time.

RESULTS

When we first compared the effects of progesterone or Mn^{2+} ions (19) on intact follicles or denuded oocytes, we found repeatedly that follicle-free oocytes evolved faster and gave a higher percentage of true maturations. The data presented in Table 1 account very well for these observations, since they indicate that true maturations can be triggered by simple defolliculation without addition of any hormone. Such stimulated oocytes have been found to exhibit exactly the same patterns of change in membrane potential and conductance as are usually found after addition of progesterone (5, 17, 28, 31). The maturation ratios observed were always higher with urodeles than with *Xenopus* oocytes. Preliminary results demonstrate however that *Pleurodeles* oocytes, taken outside of their normal breeding season, neither respond to progesterone nor to defolliculation. In addition, we wish to stress that collagenase triggered maturations cannot result from a steroid contamination, since no significant difference in maturation ratios were observed before or after an extensive dialysis of the enzyme. In each case, the oocytes presented a normal second metaphase spindle and could be activated. Almost identical results (GVBD and 1st polar body extrusion) have been obtained when the follicle cells were removed by gentle abrasion. When applied to *Xenopus* oocytes, this method resulted in 64% maturation (32 out of 50 oocytes), whereas the medium recovered from the experimental vessel could never trigger any maturation if assayed on intact follicles. All the control experiments, which were performed in absence of abrasive paper, were fully negative, even after a 36 hr treatment. It thus appears that uncoupling the oocyte-follicle cell junction may actually trigger meiosis reinitiation.

Table 1. Percentage of maturation after defolliculation or addition of 10^{-6} M progesterone to intact follicles.

Animals	Collagenase treatment	Manual defolliculation (1 oocyte/10 ml OR ₂)	Progesterone on follicle	Untreated follicles
<i>Xenopus</i> (10 ♀)	61% (119)	25% (113)	72% (210)	0% (240)
<i>Pleurodeles</i> (5 ♀)	92% (100)	74% (42)	100% (80)	0% (175)
<i>Ambystoma</i> (4 ♀)	lethal	67% (78)	100% (70)	0% (80)

The properties of this junction have been further explored using the current clamp technique. Only one component time constant could be recorded from the defolliculated oocytes, hyperpolarizing and depolarizing currents giving identical values (curve 1, Fig. 1A). On the contrary, oocytes enclosed in follicles exhibited two different time constants. Both components (curve 1, Fig. 1B) were revealed in the depolarizing conditions while only the slow component was observed in the hyperpolarizing conditions (curve 2, Fig. 1B). Table 2 gives mean values for these time constants and for the membrane resistance in the three species here studied. One

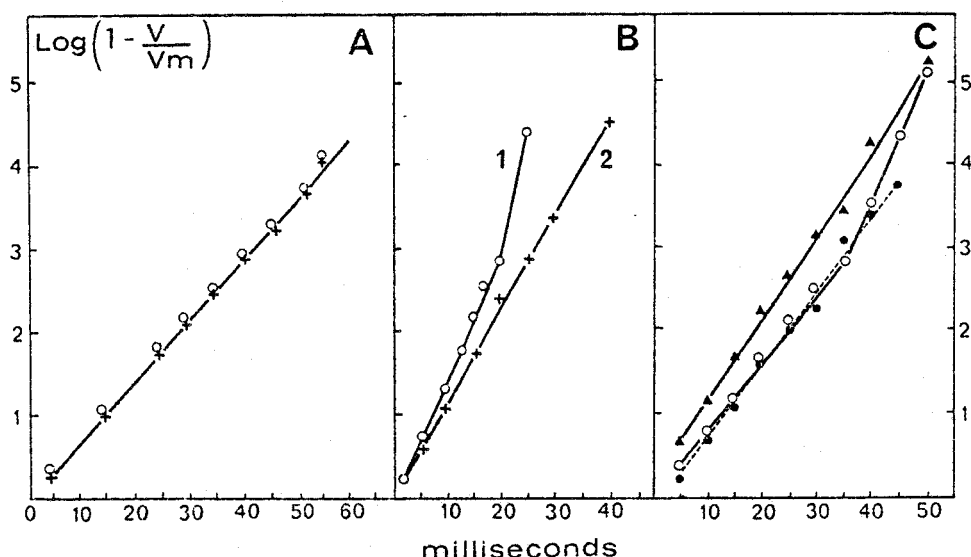


Fig. 1. Time constants of the membrane of *Ambystoma* oocyte, as measured by current clamp in typical experiments. A defolliculated oocytes, $\circ-\circ$ depolarizing currents, $+-+$ hyperpolarizing currents; B, oocytes with follicle cells, $\circ-\circ$ depolarizing currents, $+-+$ hyperpolarizing currents; C, changes of the time constants, measured by depolarizing currents after the addition of progesterone to follicle enclosed oocytes. $\circ-\circ$ $t=0$ min, $\bullet-\bullet$ $t=80$ min, $\triangle-\triangle$ $t=180$ min post hormone addition.

Table 2. Mean values of the membrane resistance R and the membrane time constants τ , before (a) and after manual (b) or collagenase (c) defolliculation.

Animals	R in K Ω			τ in seconds ms		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
<i>Xenopus</i> (7 ♀)	107.9 ± 34	483.0 ± 22	314.7 ± 82	31.8 ± 5	44.1 ± 7.4	31.6 ± 17
	(n=75)	(n=58)	(n=58)	16.0 ± 7	(n=42)	(n=83)
<i>Pleurodeles</i> (3 ♀)	122.0 ± 6.9	392.0 ± 39	311.0 ± 70	24.6 ± 4	29.9 ± 3	20.2 ± 6
	(n=17)	(n=19)	(n=12)	5.9 ± 2.3	(n=6)	(n=8)
<i>Ambystoma</i> (4 ♀)	120.5 ± 8	284.0 ± 9.2	lethal	7.6 ± 1.6	14.3 ± 7.6	lethal
	(n=14)	(n=14)		3.3 ± 1.8	(n=12)	

can see that defolliculation results in a dramatic increase in the membrane resistance, with a parallel loss of the fast time constant component. That component must therefore represent a contribution from the follicle cells, whereas the slow component probably represents the true plasma membrane time constant. Working on intact follicles, we found, moreover, that oocytes and follicles began to uncouple within 20 min after progesterone addition. In Fig. 1C, indeed, it can be seen that the fast component, measured at t_0 ($\tau = 7 \text{ ms} \pm 3.83$, $n = 12$), is no longer present at 80 minutes, while the slow component ($\tau = 12 \text{ ms} \pm 4.19$, $n = 7$) persists with no significant variation ($\tau = 10 \text{ ms} \pm 4.07$, $n = 15$) at 180 min. No further evolution then occurred up to germinal vesicle breakdown, indicating that follicle cells are completely sloughed off within the first 2 hr.

DISCUSSION

In this paper, we establish that true maturation can occur following defolliculation of the amphibian oocyte. No similar data have been reported elsewhere, except for the mammalian oocyte. In mammals, it is indeed well documented that reinitiation of meiosis can occur *in vitro*, after release of the oocytes from their ovarian follicle into a suitable medium, without addition of hormone (6, 10, 11, 13, 23). A lot of ultrastructural observations have demonstrated the presence of gap-junctions between the oocyte, the cumulus and the granulosa cells (2, 3, 12), junctions which are hormonally controlled and usually break down following gonadotropin stimulation (9, 15, 21). Similar specialized junctions have been also demonstrated to occur in amphibians, between macrovilli of the follicle cells and the oocyte plasma membrane (7, 16, 29). Our measurements now demonstrate that these junctions are also polarized and hormone regulated. From these results, one may thus ask if progesterone really acts *in vivo* by an other way than by decoupling the oocyte-follicle cells junction. This proposition, however, must not be taken as a negation of the fact that progesterone may directly trigger meiosis in defolliculated oocytes (30). That follicle cells cannot exert a permanent negative control upon maturation is indeed supported by our observation that *Pleurodeles* oocytes, taken outside of the normal season (25), are no longer able to respond either to progesterone or to defolliculation. They do not exhibit as well the transient Ca^{2+} increase which normally accompanies maturation (19). It is therefore possible that some compound may have moved from the follicular cells to the oocyte *via* the gap-junctions and precluded the overall maturation process. During the normal season, on the contrary, a positive mechanism of control may be envisaged, by which a mechanical, enzymatic or hormonally induced disruption of the functional oocyte-follicle coupling may lead to the same intracellular Ca^{2+} surge which is normally brought about by the hormone or its mimetics acting on denuded oocytes. In any case, these new findings, which point to a possible redundant process, warrant further research.

This research was supported by the D.G.R.S.T. (ACC 7770259 and 7970777). We wish to thank Dr. J. P. Trinkaus for correcting the English version.

REFERENCES

1. ADAMSON, E. D. and H. R. WOODLAND, 1977. *Develop. Biol.*, **57**, 136-149.

2. ALBERTINI, D. F. and E. ANDERSON, 1974. *J. Cell Biol.*, **79**, 234-250.
3. ANDERSON, E. and D. F. ALBERTINI, 1976. *J. Cell Biol.*, **71**, 680-686.
4. BAULIEU, E. E., F. GODEAU, M. SCHORDERET and S. SCHORDERET-SLATKINE, 1978. *Nature*, **275**, 593-598.
5. BELLE, R., R. OZON and J. STINNAKRE, 1977. *Mol. Cell Endocrinol.*, **8**, 65-72.
6. BIGGERS, J. D., D. G. WHITTINGHAM and R. P. DONAHUE, 1967. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 560-567.
7. BROWNE, C. L., H. S. WILEY and J. N. DUMONT, 1979. *Science*, **203**, 182-183.
8. BRUN, R., 1975. *Experientia*, **31**, 1275-1276.
9. DEKEL, N. and W. H. BEERS, 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4369-4373.
10. DONAHUE, R. P., 1968. *J. Exp. Zool.*, **169**, 237-250.
11. EPPIG, J. J., 1977. *Develop. Biol.*, **60**, 371-388.
12. EPSTEIN, M. L., W. H. BEERS and N. B. GILULA, 1976. *J. Cell Biol.*, **79**, 302 a.
13. FOOTE, W. D. and C. THIBAUT, 1969. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**, 329-349.
14. FORTUNE, J. E., P. W. CONCANNON and W. HANSEL, 1975. *Biol. Reprod.*, **13**, 561-567.
15. GILULA, N. B., M. L. EPSTEIN and W. H. BEERS, 1978. *J. Cell Biol.*, **78**, 58-75.
16. HOPE, J., A. A. HUMPHRIES and G. H. BOURNE, 1963. *J. Ultrastruct. Res.*, **9**, 302-324.
17. MOREAU, M., P. GUERRIER and M. DOREE, 1976. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **282**, 2309-1312.
18. MOREAU, M., P. GUERRIER, M. DOREE and C. C. ASHLEY, 1978. *Nature*, **272**, 251-253.
19. MOREAU, M., J. P. VILAIN and P. GUERRIER, 1980. *Develop. Biol.*, **78**, 201-214.
20. SCHORDERET-SLATKINE, S. and K. C. DRURY, 1973. *Cell Differ.*, **2**, 247-254.
21. SZÖLLÖSI, D., M. GERARD, Y. MENEZO and C. THIBAUT, 1978. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **18**, 511-521.
22. THIBIER-FOUCHET, C., O. MULNER and R. OZON, 1976. *Biol. Reprod.*, **14**, 317-326.
23. TSAFRIRI, A. and C. P. CHANNING, 1975. *Endocrinol.*, **96**, 922-927.
24. TUPPER, J. T. and B. L. MALOFF, 1973. *J. Exp. Zool.*, **185**, 133-144.
25. VILAIN, J. P., 1978. *Mem. Soc. Zool. France*, **41**, Symposium Gallien, 93-102.
26. VILAIN, J. P., M. MOREAU and P. GUERRIER, 1980. *Develop. Growth Differ.*, **22**, 39-45.
27. WALLACE, R. A., D. W. JARED and M. W. SEGA, 1973. *J. Exp. Zool.*, **184**, 321-334.
28. WALLACE, R. A. and R. A. STEINHARDT, 1977. *Develop. Biol.*, **57**, 305-316.
29. WARTENBERG, H., 1962. *Z. Zellforsch.*, **58**, 427-486.
30. WASSERMAN, W. J. and L. D. SMITH, 1978. In "The Vertebrate ovary". R. E. Jones ed., Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 443-468.
31. ZIEGLER, D. and G. A. MORRILL, 1977. *Develop. Biol.*, **60**, 318-325.

(Received for publication: May 22, 1980)

PUBLICATIONS

- 1) MOUNIER, Y., VILAIN, J.P. et GUILBAULT, P., 1970. - Influence du PH externe sur la perméabilité ionique membranaire de la fibre musculaire de Crabe (*Carcinus maenas*). *C.R. Soc. Biol.*, 164, 2566-2570.
- * 2) 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, 1594-1600.
- 3) VILAIN, J.P., 1972. - Propriétés électriques des oeufs fécondés et segmentés de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle). *C.R. Acad. Sci., Paris*, 275, 2929-2932.
- * 4) VILAIN, J.P., CAPURON, A. et GUILBAULT, P., 1973. - Influence des cations monovalents K^+ et Na^+ sur le potentiel intracellulaire des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle). *C.R. Acad. Sci., Paris*, 278, 573-576.
- 5) VILAIN, J.P., 1974. - Couplage électrique membranaire entre les blastomères de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodèle) au cours de la segmentation. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 278, 1617-1620.
- * 6) VILAIN, J.P., 1977. - Maturation *in vitro* des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien Urodèle). *Mém. Soc. Zool., France*, Symp. L. GALLIEN, 93-102 parue dans "Progrès récents en Biologie du développement des Amphibiens".
- * 7) VILAIN, J.P., 1978. - Contribution des cations divalents au maintien du potentiel de membrane des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Amphibien Urodèle). *C.R. Acad. Sci., Paris*, 286, 1819-1322.
- * 8) MOREAU, M., VILAIN, J.P. et GUERRIER P., 1980. - Free calcium changes associated with hormone action in Amphibian oocytes. *Develop. Biol.*, 78, 201-214.
- * 9) VILAIN, J.P., MOREAU, M. et GUERRIER, P., 1980. - Propionate and cycloheximide reversibly block progesterone induced calcium surge in *Ambystoma mexicanum* oocytes. *Develop. Growth and Diff.* 22, 25-31.

- * 10) VILAIN, J.P., MOREAU, M. et GUERRIER, P., 1980. - Oocyte-follicle cells uncoupling triggers meiosis reinitiation in Amphibian. *Develop. Growth Diff.* 22, 687-691.
- 11) GUERRIER, P., MOREAU, M., MEIJER, L., MAZZEI, G., VILAIN, J.P. et DUBE, F., 1982. - The role of calcium in meiosis reinitiation. In : *Membranes in Growth and Development*, G. GIEBISH and J.F. HOFFMAN, eds 139-155.
- 12) CHARBONNEAU, M., MOREAU, M., PICHERAL, B., VILAIN, J.P. et GUERRIER, P., 1983. - Fertilization of Amphibian eggs. A comparison of electrical responses between Anurans and Urodeles. *Develop. Biol.* 98, 304-318.
- 13) CHARBONNEAU, M., MOREAU, M., GUERRIER, P. et VILAIN, J.P., 1983. - Voltage noise changes during monospermic and polyspermic fertilization of mature eggs of the anuran, *Rana temporaria*. *Develop. Growth and Differ.* (In press).
- 14) A la demande d'Academic Press pour Fertilization. C. METZ and A. MONROY, eds. Ionic Regulation of oocyte maturation. MOREAU, M., GUERRIER, P., et VILAIN, J.P. .

Certains résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet de publications marquées par un astérisque.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABU-HAKIMA, R. et DAVEY, K.G., 1979. - A possible relationship between ouabain sensitive ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) dependent ATPase and the effect of juvenile hormone of the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Biochem.*, 9, 195-199.
- ADRIAN, R.H. et FREYGANG, W.H., 1962. - The potassium and chloride conductance of frog muscle membrane. *J. Physiol., Londres*, 163, 61-103.
- ASHLEY, C.C. et RIDGWAY, E.B., 1968. - Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibres. *J. Physiol., London*, 209, 105-130.
- BAUD, C., KADO, R.T. et MARCHER K., 1982. - Sodium channels induced by depolarization of the *Xenopus laevis* oocyte. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 79, 3188-
- BAKER, P.F., 1972. - Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 24, 177-223.
- BALTUS, E., BRACHET, J., HANOCQ-QUERTIER, J., et HUBERT, E., 1973. - Cytochemical and biochemical studies on progesterone induced maturation in amphibian oocytes. I. Ribonucleic acid and protein synthesis (effects of inhibitors and of a "maturation promoting factor"). *Diff.*, 1, 127-143.
- BALTUS, E., HANOCQ-QUERTIER, J., PAYS, A. et BRACHET, J., 1977. - Ionic requirements for induction of maturation (meiosis) in full-grown and medium-sized *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 74, 3461-3465.
- BARISH, M.E., 1983. - A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J. Physiol., Lond.*, 342, 309-325.
- BARSACCHI-PILONE, G. et HUMPHRIES, A.A., 1975. - Progesterone induced *in vitro* maturation in oocytes of *Notophthalmus viridescens* (Amphibia Urodela) and some observations on cytological aspects of maturation. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 34, 451-466.
- BAULIEU, E.E., GODEAU, F., SCHORDERET, M. et SCHORDERET-SLATKINE, S., 1978. - Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocyte surface and calcium. *Nature*, 275, 593-598.

- BLAUSTEIN, M.P. et HODGKIN, A.L., 1969. - The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. *J. Physiol., Lond.*, 200, 497-527.
- BELLE, R., MAROT, J. et OZON, R., 1976 - Recherches sur la maturation de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. L'entrée de la progestérone est nécessaire pour la maturation. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 283, 175-178.
- BELLE, R., OZON, R., STINNAKRE, J., 1977. - Free calcium in full grown *Xenopus laevis* oocyte following treatment with ionophore A 23187 or progesterone. *Mol. Cell Endocrinol.*, 8, 65-72.
- BRACHET, J., 1974. - Observations cytologiques et cytochimiques sur la maturation de l'ovocyte chez les Urodèles. *Ann. Biol.*, 13, 271-284.
- BRACHET, J., HANOCQ, F. et VAN GANSEN, P., 1970. - An cytochemical and ultrastructural analysis of *in vitro* maturation in Amphibian oocytes. *Develop. Biol.*, 21, 157-195.
- BRACHET, J., BALTUS, E., PAYS-DE SCHUTTER, A., HANOCQ-QUERTIER, J., HUBERT, E. et STEINERT, G., 1975. - Induction of maturation (meiosis) in *Xenopus laevis* oocytes by three organo mercurials. *Proc. Natl. Acad. Sc., U.S.A.*, 72, 1574-1578.
- BRACHET, J., PAYS-DE SCHUTTER, A. et HUBERT, E., 1975. - Studies on maturation in *Xenopus laevis* III. Energy production and requirements for protein synthesis. *Differentiation*, 3, 3-14.
- BRACHET, J. et DENIS-DONINI, S., 1977. - Effet de divers agents (ionophore du calcium et du potassium, organomercuriels, dithiols, colchicine, cytochalasine B) sur la maturation et la différenciation sans clivage chez l'oeuf de chaetoptère. *C.R. hebd. Seanc. Acad. Sc. Paris*, 284, 1091-1096.
- BROWNE, C.L., WILEY, H.S., et DUMONT, J.N., 1979. - Oocyte-follicule cell gap junction in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability. *Science*, 203, 182-183.
- BRUMMETT, A.R. et DUMONT, J.N., 1976. - Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) III. Localization of negative charges on the surface of developing oocytes. *J. Ultrast. Res.*, 55, 4-16.

- CANNON, J.D., DICK, D.A.T. et HO YEN, D.O., 1974. - Intracellular sodium and potassium concentrations in toad and frog oocytes during development. *J. Physiol., Lond.*, 241, 497-508.
- CENTURY, T.J., FENICHEL, I.R. et HOROWITZ, J.B., 1970. - The concentrations of water, sodium and potassium in the nucleus and cytoplasm of Amphibian oocytes. *J. Cell. Sci.*, 7, 5-13.
- CHARBONNEAU, M., MOREAU, M., PICHERAL, B., VILAIN, J.P. et GUERRIER P., 1983. - Fertilization of Amphibian eggs : A comparaison of electrical responses between Anurans and Urodeles. *Dev. Biol.*, 98, 304-318.
- COHEN, C.J., 1977. - Characterization of the resting potential in *Chironomus* salivary gland cells. *Exptl. Cell. Res.* 106, 15-30.
- COLE, K.S., 1949. - Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch. Sci. Physiol.*, 3, 253.
- CROSS, N.L., et ELINSON, R.P., 1980. - Fast block to polyspermy in frogs mediated by changes in the membrane potential. *Dev. Biol.*, 75, 187.
- DAVEY, K.G. et HUEBNER, E., 1974. - The response of the follicle cells of *Rhodnius prolixus* to juvenile hormone and antigonadotropin. *Can. J. Zool.*, 52, 1407-1412.
- DE MELLO, W.C., 1976. - Influence of the sodium pump on intercellular communication in heart fibres : effect of intracellular injection of sodium ion on electrical coupling. *J. Physiol., Lond.*, 263, 171-197.
- DICK, D.A.T., et HO YEN, 1974. - Intracellular sodium and potassium concentrations in oocyte of *Bufo bufo* at the beginning of maturation. *J. Physiol.*, 241, 509-514.
- DICK, D.A.T. et Mc LAUGHLIN, S.G.A., 1969. - The activities and concentrations of sodium and potassium in toad oocytes. *J. Physiol., Lond.*, 205, 61-78.
- DIPOLO, R. et BEAUGE, R., 1979. - Physiological role of ATP-driven calcium pump in squid axon. *Nature*, 278, 271-273.
- DOREE, M., 1981. - 1-methyladenine induced stimulation of protein phosphorylation and Na⁺ pump does not require the presence of the nucleus. *J. Exp. Zool.*, 217, 147-150.

- DOREE, M., GUERRIER, P. et MOREAU, M., 1976 b. - Contrôle hormonal de la méiose des ovocytes d'Etoile de mer. II. Etude de quelques propriétés fondamentales du récepteur de la 1-méthyladénine. Dans "Actualités sur les hormones d'Invertébrés". *Coll. Intern. CNRS*, n° 251, 199-205.
- DRURY, K., 1978. - Method for the preparation of active maturation promoting factor (MPF) from *in vitro* matured oocytes of *Xenopus laevis*. *Differentiation*, 10, 181-186.
- DRURY, K.C. et SCHORDERET-SLATKINE, S., 1975 a. - Les effets du cortisol et de la progestérone directement injectés à l'intérieur de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 280, 1273-1275.
- DRURY, K. et SCHORDERET-SLATKINE, S., 1975 b. - Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*. *Cell*, 11, 269-274.
- DUBE, F., and GUERRIER, P., 1982 a. - Activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) oocytes by sperm or KCl, but not by NH₄Cl, requires a Ca²⁺ influx. *Develop. Biol.*, 92, 408-417.
- DUMONT, J.N., 1972. - Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.*, 136, 153-182.
- ECKBERG, W.R. and CARROLL, A.G., 1982. - Sequestered calcium triggers oocyte maturation in *Chaetopterus*. *Cell Differ.*, 11, 155-160.
- ECKBERG, R.E. and SMITH, L.D., 1971. - Influence of exogenous ions on the events of maturation in *Rana pipiens* oocytes. *J. Cell Physiol.* 77, 61-70.
- EISENBERG, R.S. et ENGEL, E., 1970. - The spatial variation of membrane potential near a small source of current in a spherical cell. *J. Gen. Physiol.* 55, 736-757.
- EL-ETR, M., SCHORDERET-SLATKINE, S., BAULIEU, E.E., 1979 - Meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes initiated by insulin. *Science*, 205, 1397-1399.
- FARMER, S.W., PAPKOFF, M. et LICHT, P., 1975. - Purification of turkey gonadotropins. *Biol. Reprod.* 12, 415-422.
- FORTUNE, J.E., CONCANNON, P.W. et HANSEL, W., 1975. - Ovarian progestérone levels during *in vitro* oocyte maturation and ovulation in *Xenopus laevis*. *Biol. Reprod.* 13, 561-567.

- FRANKENHAEUSER, B. et HODGKIN, A.L., 1957. - The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol.* 137, 218-244.
- GILBERT, D.L. et EHRENSTEIN, G., 1969. - Effect of divalent cations on potassium conductance of squid axons : determination of surface charge. *Biophysic. J.*, 9, 447-463.
- GODEAU, J.F., SCHORDERET-SLATKINE, S., HUBERT, P. et BAULIEU, E.E., 1978 a. - Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 2353-2357.
- GOULD-SOMERO, M., 1981. - Localized gating of egg Na⁺ channels by sperm. *Nature*, 291, 254-256.
- GUERRIER, P., DOREE, M., 1975. - Hormonal control of reinitiation of meiosis in Starfish. The requirement of 1-methyladenine during nuclear maturation. *Develop. Biol.*, 47, 341-348.
- GUERRIER, P., MOREAU, M. et DOREE, M., 1978. - Control of meiosis reinitiation in starfish : calcium ions as the primary effective trigger. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18, 441-452.
- GUERRIER, P., MOREAU, M. et DOREE, M., 1979. - Relationships between hormone-induced calcium release and ⁸⁶Rubidium uptake stimulation in starfish oocytes. *Rev. canad. Biol.*, 38, 145-156.
- GUERRIER, P., DUBE, F. and MOREAU, M., 1981. - External calcium requirements for oocyte maturation in the surf clam *Spisula solidissima*. *Biol. Bull.*, 161, 335.
- HAGIWARA, S. and JAFFE, L.A., 1979. - Electrical properties of egg cell membranes. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 8, 385-416.
- HAGIWARA, S. and TAKAHASHI, K., 1974. - The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg. *Cell. J. Membr. Biol.*, 18, 61-80.
- HAYS, E., LANG, M.A. et GAINER, H., 1968. - A re-examination of the Donnan distribution as a mechanism for membrane potentials and potassium and chloride ions distributions in Crab muscle fibers. *Comp. Biochem. Physiol.*, 26, 761-792.

- HEILBRUNN, L.V., DAUGHERTY, K. et WILBUR, K.M., 1939. - Initiation of maturation in the frog egg. *Physiol. zool.*, 12, 97-100.
- HODGKIN, A.L. et HOROWICZ, P., 1959. - The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fiber. *J. Physiol.*, 148, 127-160.
- HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. et KATZ, B. - 1952. - Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. physiol.* 116, 424-448.
- HOPE, J., HUMPHRIES, A.A., Jr. et BOURNE, G.H., 1963. - Ultrastructure studies on developing oocytes of the salamander *Triturus viridescens*. I. The relationship between follicle cells and developing oocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, 9, 302-324.
- HORAČKOVÁ, M. et VASSORT, G., 1979. - Sodium-calcium exchange in regulation of cardiac contractility. Evidence for an electrogenic, voltage dependent mechanism. *J. Gen. Physiol.*, 73, 403.
- HOROWITZ, S.B., PAINE, P.L., TLUCZEK, L. et JAMES, K., 1979. - Reference phase analysis of free and bound intracellular solutes. I. Sodium and Potassium in Amphibian oocytes. *Biophys. J.*, 25, 33-44.
- HUNTER, F.R. et DU LUQUE, O., 1959. - Osmotic studies of Amphibian eggs. II. Ovarian eggs. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, 177, 468-481.
- IKEGAMI, S., OKADA, T.S. et KOIDE, S.S., 1976. - On the role of calcium ions in oocyte maturation in the polychaete *Chaetopterus pergamentaceus*. *Dev. Growth Differ.* 18, 33-43.
- ISHIKAWA, K., HANAOKA, Y., KONDO, Y. et IMAI, K., 1977 - Primary action of steroid hormone at the surface of Amphibian oocyte in the induction of germinal vesicle breakdown. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 9, 91-100.
- ITO, S., 1972. - Effects of media of different ionic composition on the activation potential of anuran egg cells. *Develop. Growth Differ.*, 14, 217-227.
- IWAO, Y., ITO, S. et KATAGIRI, C., 1981. - Electrical properties of toad oocytes during maturation and activation. *Develop. Growth and Diff.*, 23, 89-100.

- JAFFE, L.A., 1976. - Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated. *Nature*, 261, 68-71.
- JAFFE, L.A., 1980. - Electrical polyspermy block in sea urchins : nicotine and low sodium experiments. *Develop. Growth and Diff.*, 22, 503-507.
- JAFFE, L.F. and NUCCITELLI, R., 1977. - Electrical controls of development. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 6, 445-476.
- JAFFE, L.A. and ROBINSON, K.R., 1978. - Membrane potential of the unfertilized sea urchin egg. *Develop. Biol.*, 62, 215-228.
- JUST, E.E., 1939. - "Basic Methods for Experiments on eggs of Marine Animals". Philadelphia
- KADO, R.T., MARCHER, K.S. and OZON, R., 1979. - Mise en évidence d'une dépolari-sation de longue durée dans l'ovocyte de *Xenopus laevis*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 288, 1187-1189.
- KADO, R.T., MARCHER, K.S. and OZON, R., 1981. - Electrical membrane properties of the *Xenopus laevis* oocyte during progesterone induced meiotic maturation. *Dev. Biol.*, 83, 471-476.
- KANNO, Y. and LOEWENSTEIN, W.R., 1983. - A study of the nucleus and cell membranes with an intracellular electrode. *Exp. Cell Res.*, 31, 149-166.
- KATZ, B., 1966. - Nerve, muscle and synapse. Mc Graw. Hill book company.
- KEMP, N.E., 1956 a. - Electron microscopy of growing oocytes of *Rana pipiens*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 281.
- KEMP, N.E., 1961. - Cortical changes in fertilized eggs of *Rana pipiens*. *J. Appl. Phys.*, 32, 1643 (Abstr).
- KISHIMOTO, R., HIRAI, S. and KANATANI, H., 1981. - Germinal vesicle material is required for amplification of MPF in starfish oocytes. *Develop. Biol.*, 81, 177-181.
- KISHIMOTO, T. and KANATANI, H., 1976. - Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocytes. *Nature*, 260, 321-322.

- KUSANO, K., MILEDI, R. et STINNAKRE, J., 1975. - Microinjection of calcium in droplets of aequorin. *Proc. Roy. Soc. Biol. Sci.*, 189, 39-47.
- KUSANO, K., MILEDI, R. et STINNAKRE, J., 1982. - Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J. Physiol., Lond.*, 328, 143-170.
- KOFOID, E.C., KNAUBER, D.C. and ALLENDE, J.E., 1979. - Induction of amphibian oocyte maturation by polyvalent cations and alkaline pH in the absence of potassium ions. *Develop. Biol.*, 72, 374-380.
- KOSTELLOW, A.B., WEINSTEIN, S.P. et MORRILL, G.A., 1982. - Specific binding of progesterone to the cell surface and its role in the meiotic divisions in *Rana* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 720, 356-363.
- LEW, V.L., 1970. - Effect of intracellular calcium on the potassium permeability of human red cells. *J. Physiol.*, 168, 679-697.
- LEW, V.L. et FERREIRA, H.G., 1976. - Variable Ca sensitivity of a K-selective channel in intact red-cell membranes. *Nature, Lond.*, 263, 336-338.
- LILLIE, F.R., 1902. - Differentiation without cleavage in the egg of the annelid *Chaetopterus pergamentaceus*. *Arch. Entw. Mech.*, 14, 447-499.
- LICHT, P., FARMER, S.W. et PAPKOFF, H., 1975. - The nature of the pituitary gonadotropins and their role in ovulation in a urodele amphibian (*Ambystoma tigrinum*). *Life Sci.*, 17, 1049-1054.
- LICHT, P. et PAPKOFF, H., 1974. - Separation of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of the bull frog *Rana catesbeiana*. *Endocrinology*, 94, 1587-1594.
- MAENO, T., 1959. - Electrical characteristics and activation potential of *Bufo* eggs. *J. Gen. Physiol.*, 43, 139-157.
- MALLER, J.L., WU, M. and GERHART, J.C., 1977. - Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Develop. Biol.*, 58, 295-312.
- MARMONT, G., 1949. - Studies on the axon membrane. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 34, 351-382.

- MAROT, J., BELLE, R. et OZON, R., 1976. - Recherches sur la maturation de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Arguments en faveur du rôle des ions calcium. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 282, 1301-1304.
- MASUI, Y., 1976. - Relative roles of the pituitary, follicle cells and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.*, 166, 365-376.
- MASUI, Y. and MARKERT, C., 1971. - Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 177, 129-146.
- MASUI, Y., MEYERHOF, P.G. and ZIEGLER, D.H., 1979. - Control of chromosome behaviour during progesterone induced maturation of Amphibian oocytes. *J. of Steroid Biochem.*, 11, 715-722.
- MEECH, R., 1972. - Intracellular calcium injection activates potassium conductance in aphysia nerve cells. *Fed. Proc.*, 29, 834.
- MEIJER, L., 1979 a. - Hormonal control of oocyte maturation in *Arenicola marina* L. (Annelida Polychaeta). I. Morphological study of oocyte maturation. *Develop. Growth Differ.*, 21, 303-314.
- MEIJER, L., 1979 b. - Hormonal control of oocyte maturation in *Arenicola marina* L. (Annelida Polychaeta). II. Maturation and fertilization. *Develop. Growth Differ.* 21, 315-329.
- MEIJER, L., 1980. - Hormonal control of oocyte maturation in *Arenicola marina* L. (Annelida Polychaeta). III. Importance of Ca⁺⁺ and -SH groups in meiosis reinitiation. *Develop. Growth Differ.* 22, 33-38.
- MEIJER, L. and GUERRIER, P., 1983. - Activation and fertilization of starfish oocytes. *Intern. Rev. Cytol.* (In press).
- MERRIAM, R.W., 1971 a. - Progesterone-induced maturational events in oocytes of *Xenopus laevis*. I. Continuous necessity for diffusible calcium and magnesium. *Exp. Cell Res.* 68, 75-80.
- MILEDI, R., 1982. - A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 215, 491-497.
- MOREAU, M., 1981. - Role de l'ion calcium dans la reprise de la méiose oocytaire chez l'étoile de mer et les Amphibiens. *Thèse Doctorat d'Etat, Université Paris 6.*

- MOREAU, M., DOREE, M. and GUERRIER, P., 1976. - Electrophoretic introduction of calcium ions into cortex of *Xenopus laevis* oocytes triggers meiosis reinitiation. *J. Exp. Zool.*, 197, 443-449.
- MOREAU, M., DUFRESNE-DUBE, L. and GUERRIER, P., 1983. - Electrophysiological analysis of fertilization in *Dentalium*. In preparation.
- MOREAU, M. and GUERRIER, P., 1979. - Free calcium changes associated with hormone action in oocytes. In "Detection and measurements of free Ca^{2+} in cells". C.C. Ashley and A.K. Campbell eds. North Holland, Elsevier, 219-226.
- MOREAU, M., GUERRIER, P. and DOREE, M., 1976. - Modifications précoces des propriétés électriques de la membrane plasmique des ovocytes de *Xenopus laevis* au cours de la réinitiation méiotique induite par la progestérone, le pCMB ou l'ionophore A 23187. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 282, 1309-1312.
- MOREAU, M., GUERRIER, P. and DOREE, M. 1978 b. - Membrane recognition and transduction during the hormone-induced meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Biol. Cell.*, 32, 69-74.
- MOREAU, M., GUERRIER, P. et VILAIN, J.P., 1983. - Ionic regulation of oocyte maturation in "Fertilization". *Acad. Press*, C. Metz and A. Monroy Eds.
- MOREAU, M., GUERRIER, P., DOREE, M. and ASHLEY, C.C., 1978 a. - 1-methyladenine induced release of intracellular calcium triggers meiosis in starfish oocytes. *Nature* 272, 251-253.
- MOREAU, M., VILAIN, J.P. and GUERRIER, P., 1980. - Free calcium changes associated with hormone action in amphibian oocytes. *Develop. Biol.*, 78, 201-214.
- MORRILL, G.A., KABACK, H.R. et ROBBINS, F., 1964. - Effect of Calcium on intracellular sodium and potassium concentrations in plant and animal cells. *Nature*, 14, 641-642.
- MORRILL, G.A., KOSTELLOW, A.B. and MURPHY, J.B., 1971. - Sequential forms of ATPase activity correlated with changes in cation binding and membrane potential from meiosis to first cleavage in *Rana pipiens*. *Exp. Cell. Res.*, 65, 289-298.

- MORRILL, G.A. and WATSON, D.E., 1966. - Transmembrane potential changes in amphibian eggs at ovulation, activation and first cleavage. *J. Cell Physiol.*, 67, 85-92.
- MORRILL, G.A. and ZIEGLER, D.H., 1980. - Na⁺ and K⁺ uptake and exchange by the amphibian oocyte during the first meiotic division. *Develop. Biol.*, 74, 216-223.
- MORRILL, G.A., ZIEGLER, D.H. and KOSTELLOW, A.B., 1980. - Kinetics of calcium efflux and exchange from *Rana pipiens* oocytes immediately following reinitiation of the first meiotic division : comparison of various meiotic agonists and antagonists. *Cell Calcium*, 1, 359-370.
- MORRILL, G.A., ZIEGLER, D. and ZABRENETZKY, V.S., 1977 b. - An analysis of transport exchange and binding of sodium and potassium in isolated amphibian follicles and denuded oocytes. *J. Cell Science*, 26, 311-322.
- MOUNIER, Y. et GUILBAULT, S., 1970. - Influence du chlore sur les phénomènes électriques de repos de la fibre musculaire striée de Crabe. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 271, 415-418.
- MULLINS, L.J., 1977. - A mechanism for Na/Ca transport. *J. Gen. Physiol.*, 70, 681-695.
- NELKIN, B., NICHOLS, C. et VOGELSTEIN, B., 1980. - Protein factor(s) from mitotic CHO cells induce meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Letters*, 109, 233-238.
- NOBLE, D., 1965. - Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward going (anomalous) rectification. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 66, suppl. 2, 127-136.
- O'CONNOR, C.M., ROBINSON, K.R. and SMITH, L.D., 1977. - Calcium potassium and sodium exchange by full-grown and maturing *Xenopus laevis* oocytes. *Develop. Biol.*, 52, 318-322.
- OEHME, M., KESSLER, M. et SIMON, W., 1976. - Neutral carrier Ca²⁺ microélectrode. *Chimia*, 30, 204-206.
- PALMER, L.G., CENTURY, T.J. et CIVAN, M.M., 1978. - Activity coefficients of intracellular Na⁺ et K⁺ during development of frog oocytes. *J. Membr. Biol.*, 40, 25-38.

- PASTEELS, J.J., 1930. - Les effets de la rupture de la balance des chlorures de l'eau de mer sur l'oeuf de pholade, *Barnea candida*. I. Analyse des premiers stades du développement. II. Etude de l'action des sels sur le protoplasme. *Arch. Biol. (Liège)*, 40, 247-355.
- PASTEELS, J.J., 1938. - Le rôle du calcium dans l'activation de l'oeuf de pholade. *Trav. Stat. Biol. Wimereux*, 13, 515-530.
- PAYS, A., HUBERT, E., BRACHET, J., 1977. - A comparison between organomercurial and progestérone induced maturation in amphibian oocytes. *Differ.* 8, 79.
- PEAUCELLIER, G., 1977 a. - Initiation of meiotic maturation by specific proteases in oocytes of the polychete annelid *Sabellaria alveolata*. *Exp. Cell Res.*, 106, 1-14.
- REYNHOUT, J.K. et SMITH, L.D., 1973. - Evidence for steroid metabolism during the *in vitro* induction of maturation in oocytes of *Rana pipiens*. *Develop. Biol.* 30, 392-402.
- REYNHOUT, J.K. et SMITH, L.D., 1974. - Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of Amphibian oocytes exposed to progesterone. *Develop. Biol.*, 38, 394-400.
- REYNOLDS, E.S., 1963. - The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-211.
- ROBINSON, K.R., 1979. - Eléctrical currents through full-grown and maturing *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 837-841.
- ROMERO, P.J. et WHITTAM, R., 1971. - The control by internal calcium of membrane permeability to sodium and potassium. *J. Physiol. (Lond.)*, 214, 481-507.
- ROSENBERG, M.P. and LEE, H.H., 1981. - The roles of Ca and Mg in starfish oocyte maturation induced by 1-methyladenine. *J. Exp. Zool.* 217, 389-397.
- SAMSON, D.A. and SCHUETZ, A.W., 1979. - Progestérone induction of oocyte maturation in *Rana pipiens* : Reversibility of cyclohexinide inhibition. *J. Exp. Zool.*, 208, 213-220.
- SCHATT, P., MOREAU, M. et GUERRIER, P., 1983. - Variations cycliques de la phosphorylation des protéines et de l'activité MPF pendant la segmentation précoce de l'oeuf d'oursin. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 296, 551-554.

- SCHATZMANN, H.J., 1953. - Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven kaliumund natrium-transport durch die erythrocytenmembran. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 11, 346-354.
- SCHLICHTER, L.C., 1982. - A novel action potential mechanism : Na and Cl channels lacking inactivation. *J. Cell Biol.*, 95, 139 a.
- SCHLICHTER, L.C., 1983. - A role for action potentials in maturing *Rana pipiens* oocytes. *Develop. Biol.*, 98, 60-69.
- SCHORDERET-SLATKINE, S. and DRURY, K.C., 1973. - Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. Appearance of a maturation promoting factor in enucleated oocytes. *Cell Differ.* 2, 247-254.
- SCHORDERET-SLATKINE, S., SCHORDERET, M. and BAULIEU, E.E., 1976. - Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by lanthanum. *Nature* 262, 289-290.
- SCHORDERET-SLATKINE, S., SCHORDERET, M. and BAULIEU, E.E., 1977. - Progesterone-induced meiotic reinitiation *in vitro* in *Xenopus laevis* oocytes. A role for displacement of membrane-bound calcium. *Differentiation*, 9, 67-76.
- SCHUETZ, A.W., 1967 b. - Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog (*Rana pipiens*) oocytes. *J. Exp. Zool.*, 166, 347-354.
- SCHUETZ, A.W., 1975 a. - Induction of nuclear breakdown and meiosis in *Spisula solidissima* oocytes by calcium ionophore. I. *Exp. Zool.*, 191, 433-440.
- SEN, A.K., TOBIN, T. et POST, R.L., 1969. - A cycle for ouabain inhibition of sodium potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 244, 6596-6604.
- SHIMOMURA, O. et JOHNSON, F.H., 1979. - Chemistry of the calcium-sensitive photo-protein aequorin. In : detection and measurement of free Ca^{2+} in cells. Ed. Ashley, C.C. et Camebell, A.K., Elsevier North/Holland. *Biomedical Press*.
- SIGLER, K. et JANACEK, K., 1971. - The effect of non electrolyte osmolarity of frog oocytes II. Intracellular Potential. *Biochem. Biophys. Acta*, 241, 539-546.
- SKOU, J.C., 1965. - Enzymatic basis for active transport of Na and K across cell membrane. *Physiol. Review*, 45, 596-617.

- SKOU, J.C., 1973. - The relationship of the (Na⁺ + K⁺)-activated enzyme system to transport of sodium and potassium across the cell membrane. *J. Bioenerg.*, 4, 1-30.
- SMITH, L.D. et ECKER, R.E., 1969. - Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*. *Develop. Biol.*, 19, 281-309.
- SMITH, L.D. et ECKER, R.E., 1971. - The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Develop. Biol.*, 25, 233-247.
- SMITH, L.D., ECKER, R.E. et SUBTELNY, S., 1968. - *In vitro* induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from ovarian follicles. *Develop. Biol.*, 17, 627-643.
- SNYDER, B.W. et SCHUETZ, A.W., 1974. - *In vitro* evidence of steroidogenesis in Amphibians (*Rana pipiens*) ovarian follicle and its relationship to meiotic maturation and ovulation. *J. Exp. Zool.*, 183, 333-342.
- STEINERT, G., BALTUS, E., HANOCQ-QUERTIER, J. et BRACHET, J., 1974. - Ultrastructure of *Xenopus laevis* oocytes after injection of an extract from progesterone-treated oocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, 49, 188-210.
- STEINHARDT, R.A., ZUCKER, R. and SCHATTEN, G., 1977. - Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. *Develop. Biol.*, 58, 185-196.
- SUNKARA, P.S., WRIGHT, D.A. et RAO, P.N., 1979. - Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in Amphibian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 2799-2802.
- TAGHY, Z. et VILAIN, J.P. - La reprise de la méiose chez les amphibiens Urodèles. Etude cytologique et cytochimique. (En préparation).
- THIBIER-FOUCHET, C., MULNER, O. et OZON, R., 1976. - Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes of *Xenopus laevis*. *Biol. Reprod.*, 14, 317-326.
- THOMAS, R.C., 1982. - Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiol. Rev.* 52, 563-594.
- TSO, J., THIBIER, C., MULNER, O. et OZON, R., 1982. - Microinjected progesterone reinitiates meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 79, 5552-5556.

- TUPPER, J.T. and MALOFF, S.L., 1973. - The ionic permeability of the amphibian oocyte in the presence or absence of external calcium. *J. Exp. Zool.*, 185, 133-143.
- VAN ROSSUM, G.V.D., 1970. - Net movements of calcium and magnesium in slices of rat liver. *J. Gen. Physiol.* 55, 183-196.
- VILAIN, J.P., 1977. - Maturation *in vitro* des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien, Urodèle). *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 41, *Symp. L. Gallien*, 93-102.
- VILAIN, J.P., MOREAU, M., and GUERRIER, P. (1980 a). - Propionate and cycloheximide reversibly inhibit progesterone dependent Ca^{2+} release and meiosis reinitiation in *Ambystoma mexicanum* oocytes. *Develop. Growth Differ.* 22, 39-45.
- VITTO, A., Jr., and WALLACE, R.A., 1976. - Maturation of *Xenopus* oocytes. I. Facilitation by ouabain. *Exp. Cell Res.*, 97, 56-62.
- WALKER, Jr., J.L., 1971. - Ion specific liquid ion exchanger microelectrodes. *Analyt. Chem.*, 43, 89-92 A.
- WALLACE, R.A., JARED, D.W., DUMONT, J.N. and SEGA, M.W., 1973. - Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. III. Optimum incubation conditions. *J. Exp. Zool.*, 184, 321-334.
- WALLACE, R.A. and STEINHARDT, R.A., 1977. - Maturation of *Xenopus* oocytes. II. Observations on membrane potential. *Develop. Biol.*, 57, 305-316.
- WALLACE, R.A. et MISULOVIN, Z., 1980. - The role of zinc and follicle cells in insulin initiated meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Science*, 210, 928-930.
- WARTENBERG, H., 1962. - Elektronen mikroskopische und histochemische studien Über die Oogenese der Amphibieneizelle. *Z. Zellforsch Mikroskop. Anat.*, 58, 427-486.
- WARTENBERG, H. et GUSEK, W., 1960. - Elektronenoptische Untersuchungen über die feinstruktur des Ovarialeies und des Follikel epithels von Amphibien. *Exp. Cell Res.*, 19, 199-209.
- WASSERMAN, W.J. et MASUI, Y., 1975 a. - Effects of cycloheximide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Exp. Cell Res.*, 91, 381-388.

- WASSERMAN, W.J. et MASUI, Y., 1975 b. - Initiation of meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A 23187. *J. Exp. Zool.*, 193, 369-375.
- WASSERMAN, W.J. et SMITH, L.D., 1978. - The cyclic behaviour of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J. Cell Biol.*, 78, 15-22.
- WASSERMAN, W.J., PINTO, L.M., O'CONNOR, C.M. et SMITH, L.D., 1980. - Progesterone induced a rapid increase in $[Ca^{2+}]$ of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 1534-1536.
- WEINGART, R., 1977. - The actions of ouabain on intercellular coupling and conduction velocity in mammalian ventricular muscle. *J. Physiol.*, 264, 341-366.
- WEINSTEIN, S.P., KOSTELLOW, A.B., ZIEGLER, D.H., 1982. - Progesterone-induced down-regulation of an electrogenic Na^+ , K^+ - ATPase during the first meiotic division in Amphibian oocytes. *J. Membr. Biol.* 69, 41-48.
- WEINSTEIN, S.P., MORRILL, F.A. et KOSTELLOW, A.B., 1982. - Relationships between plasma membrane depolarization, nuclear membrane breakdown, and the appearance of cytoplasmic factors during the first meiotic division in *Rana pipiens* oocytes. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 108, 876-880.
- WEINSTEIN, S.P., MORRILL, G.A. et KOSTELLOW, A.B., 1983. - Increased potassium conductance in *Rana* follicles after stimulation by pituitary extract. *Develop. Growth and Differ.*, 25, 11.
- WHITTAM, R., 1968. - Control of membrane permeability to potassium in red blood cells. *Nature, Lond.*, 219, 610.
- WRIGHT, P.A., 1961. - Induction of ovulation *in vitro* in *Rana pipiens* with steroids. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1, 20-23.
- WU, M. et GERHART, J.C., 1980. - Partial purification and characterization of the maturation promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 79, 465-477.
- YONGLAI, E.V., GODEAU, F., MEVIHILL, B. and BAULIEU, E.E., 1982. - Effects of cholera toxin and actinomycin on synthesis of $[^{35}S]$ methionine-labeled proteins during progesterone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Develop. Biol.*, 91, 36-42.

ZIEGLER, D.H. and MORRILL, G.A., 1977. - Regulation of the amphibian oocyte plasma membrane ion permeability by cytoplasmic factors during first division. *Develop. Biol.*, 60, 318-325.



RESUME

L'ovocyte des Amphibiens constitue un modèle particulièrement favorable pour étudier les mécanismes par lesquels un signal extérieur (hormonal ou mimétique) perçu et transformé au niveau membranaire entraîne un changement des propriétés électrophysiologiques de la membrane plasmique et des activités intracytoplasmiques.

Après avoir étudié les caractéristiques électrophysiologiques de la membrane plasmique des ovocytes d'un Amphibien Urodèle : *Pleurodeles waltlii*, nous avons démontré sans ambiguïté que l'application de progestérone ou de ses mimétiques, responsable de la reprise de la méiose, entraîne une augmentation notable de la concentration en calcium libre intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$. L'analyse fait appel à trois techniques distinctes (i) mesure des variations de la conductance membranaire, (ii) mesure de l'activité ionique intracellulaire de Ca^{2+} et de K^+ avec des électrodes Ca^{2+} spécifiques et K^+ spécifiques, (iii) microinjection intracellulaire de la photoprotéine asquorine. Ces expériences nous ont permis de montrer que le Calcium fonctionne comme messager secondaire tant chez les Anoures que chez les Urodèles. Des arguments supplémentaires démontrent que la cycloheximide, substance inhibitrice des synthèses protéiques, et le propionate de Na bloquent de manière réversible la libération de calcium et la réinitiation méiotique. L'utilisation des techniques d'analyse biologique et électrophysiologique a permis de montrer que la défolliculation des ovocytes de *Xenopus*, *Pleurodeles* et *Ambystoma* permet la reprise de l'évolution méiotique en absence de toute addition d'hormone exogène.

L'influence de la libération transitoire du Ca^{2+} au niveau des perméabilités passive et active de la membrane ovocytaire est discutée ainsi qu'au niveau de la jonction cellule folliculaire ovocyte.

Mots clés : Amphibien, ovocyte, méiose, perméabilité membranaire, voltage-clamp, échange actif.