

DONNEES CYTOLOGIQUES, ELECTROPHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES RELATIVES  
AU PHENOMENE DE FECONDATION CHEZ LE HOMARD (HOMARUS GAMMARUS (L.)) -  
IMPLICATION DU PROCESSUS D'ACTIVATION SUR LE MECANISME D'ATTACHE  
DES OEUFS PONDUS.

Marie GOUDEAU, Fabienne LACHAISE, Pascale KUBISZ et Henri GOUDEAU  
Université Pierre et Marie CURIE, 4 place JUSSIEU  
Laboratoires de Zoologie et de Biophysique - 75 005 PARIS  
et Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'ULM - 75 005 PARIS  
Station Biologique de ROSCOFF-29211  
C.E.N. SACLAY, Dept Biol.- 91191 Gif sur Yvette.

RESUME

Des mesures électrophysiologiques de potentiel membranaire d'ovocytes immatures et prématures de Homarus gammarus ont été effectuées dans différentes conditions expérimentales. Des contrôles cytologiques parallèles ont été réalisés. Il a été également établi, grâce à l'utilisation de techniques de chromatographie (HPLC) et de dosages radio-immunologiques, que ces mêmes ovocytes prématures de Homard contiennent différents ecdystéroïdes. D'autre part, la structure du pédicule d'attache (ou funicule) de l'oeuf pondu a été étudiée. Cette structure est constituée des deux enveloppes vitellines superposées, modifiées probablement lors de la réaction corticale à la fécondation. Enfin, les différentes enveloppes, sécrétées successivement par l'embryon au cours de son développement, ont été dénombrées et définies. Les taux d'ecdystéroïdes de l'embryon ont été également mesurés.

ABSTRACT

Electrophysiological measurements and related cytological controls were done on immature and submature oocytes of Homarus gammarus. By chromatography (HPLC) and radio-immunoassays (RIA) it was established that submature oocytes displayed different ecdysteroids. Furthermore, the structure of the stalk (funiculus) for the laid egg attachment was analyzed. It consisted of the two superimposed vitelline envelopes which were likely modified by the cortical reaction exudate during the fertilization process. In addition, the successive secretory phases, regarding to the embryonic envelopes were evidenced. Finally, the ecdysteroid titers of embryonic stages were measured.

MOTS-CLEFS : Ovocyte, Potentiel membranaire, Ecdysteroïdes, Enveloppe de fécondation, Mues embryonnaires, Funicule, Crustacé, Décapode, Homard.

KEY WORDS : Oocyte, membrane potential, Ecdysteroids, Fertilization envelope, Embryonic molts, Funiculus, Crustacea, Decapoda, Lobster.

## INTRODUCTION

Les travaux relatifs au processus de fécondation chez les Crustacés Décapodes Reptantia sont relativement peu nombreux, mis à part quelques éléments intéressant les Brachyours (Brown, 1966; Hirsch, 1971) et une étude cytologique extensive que nous avons réalisée chez le crabe Carcinus maenas (Goudeau et Lachaise, 1980 a; 1980 b; Goudeau, 1982a; 1982b; Goudeau et Becker, 1982). L'ensemble de ces données, bien qu'amenant des résultats certains en ce qui concerne le processus de fécondation, ne permettent pas par la seule approche cytologique de saisir l'ensemble du phénomène. Récemment nous avons pu, par une étude électrophysiologique couplée à une analyse anatomique de l'oeuf en cours de fécondation réalisée chez les Brachyours Maia squinado et Carcinus maenas, appréhender les étapes du phénomène et apprécier le temps nécessaire à leur réalisation in vitro (résultats soumis pour publication). Dans le but d'atteindre les mêmes objectifs chez Homarus gammarus, nous avons entrepris une étude anatomo-électrophysiologique. Nous rapportons ici les résultats préliminaires concernant cette espèce, relatifs aux caractéristiques électrophysiologiques de la membrane de l'ovocyte immature et prémature, ainsi qu'à l'effet de l'agent activant A 23 187 (ionophore calcium) sur ce modèle. De plus, nous avons réalisé une étude biochimique préliminaire centrée sur la détection, au niveau des ovocytes prématures, d'ecdystéroïdes afin de tenter d'établir le rôle que pourrait jouer ces hormones dans certains phénomènes liés au processus de fécondation. Par ailleurs, nous définissons dans ce travail, en ce qui concerne l'oeuf pondu de Homarus gammarus, la structure du funicule d'attache dont la réalisation est issue pour partie de la réaction corticale chez les crabes, lors de la fécondation (Goudeau et Lachaise, 1983). A l'encontre des différents stades du développement embryonnaire de Homarus gammarus nous avons défini également les enveloppes embryonnaires et déterminé qualitativement et quantitativement les ecdystéroïdes présents chez certains de ces stades embryonnaires.

## MATERIEL ET METHODES

### A. Matériel

Des femelles pubères de Homarus gammarus (L.), de longueur supérieure à 29 centimètres, ont été fournies par la Société anonyme "la Langouste" de Roscoff. Les ovocytes ont été prélevés, en vue d'expérimentations, au niveau ovarien et conservés dans l'eau de mer artificielle. Les "oeufs" pondus ont été récoltés sur les soies pléopodiales de femelles ovigères.

### B. Méthodes en vue d'études en microscopie électronique

#### 1) Microscopie électronique à balayage

Les "oeufs" pondus ont été fixés durant 3 heures à la température du laboratoire, dans un liquide fixateur comprenant 2,8% de glutaraldehyde dans un tampon cacodylate de sodium (0,4M) à pH 7,2. Du saccharose a été ajouté au liquide fixateur afin de réajuster la pression osmotique de ce dernier. Les spécimens ont été post-fixés avec une solution d'acide osmique à 1% dans le même tampon cacodylate de sodium, durant 2 heures. Après une déshydratation extrêmement progressive, les spécimens ont été traités par une série graduelle d'ethanol-acétate d'amyle, puis finalement maintenus dans l'acétate d'amyle pur. Ils ont été ensuite déshydratés par la méthode du point critique, puis métallisés avec un mélange d'or-palladium et enfin examinés à l'aide d'un microscope électronique Jeol.

#### 2) Microscopie électronique à transmission

Les ovocytes provenant d'expérimentations électrophysiologiques ainsi que leurs témoins, et les "oeufs" pondus, ont été fixés dans un mélange comprenant: 1,4% de glutaraldehyde dans un tampon cacodylate de sodium (0,4M

à pH 7,2) et 1% de chlorure de calcium, durant 45 minutes à 90 minutes, à la température du laboratoire. La pression osmotique du liquide fixateur a été réajustée par adjonction de saccharose. Les spécimens ont été ensuite post-fixés dans un mélange d'acide osmique à 1% dans le même tampon cacodylate de sodium, durant 1 à 2 heures. Après déshydratation, les spécimens ont été inclus dans l'Epon 812 ou bien dans l'ERL 4206 dont l'extrême viscosité permet une meilleure impregnation des tissus.

Les coupes ultrafines ont été réalisées à l'aide d'ultramicrotomes LKB et Reichert et colorées avec de l'acetate d'uranyle en solution alcoolique et contrastées avec du citrate de plomb selon Reynolds(1963).

Les coupes ont été observées à l'aide de microscopes électroniques Jeol 100 et Philips 300.

### C. Techniques électrophysiologiques

Les ovocytes ont été empalés, sous contrôle microscopique, à l'aide de microélectrodes de verre remplies de KCl (2M; 30 à 60 M $\Omega$  de résistance dans l'eau de mer). La microélectrode est connectée à un amplificateur à haute impédance d'entrée, le circuit étant fermé grâce à une électrode d'argent-argent chloruré reliée à l'eau de mer par un pont d'agar-KCl 2M. Les empallements sont réalisés grâce à un micromanipulateur à moteur pas-à-pas, ce qui minimise les lésions mécaniques de la membrane. La résistance de la membrane est appréciée en injectant du courant dans la microélectrode.

### D. Techniques de détection des ecdystéroïdes

Les extraits d'ovaires et d'"oeufs" pondus ont été analysés en chromatographie liquide de haute performance (HPLC) par injection sur colonne de silice après une purification en phase reverse. Les différents ecdystéroïdes sont ensuite dosés par radio-immunologie.

## RESULTATS

### I- ETUDE ANATOMO-ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET DETERMINATION DES ECDYSTEROIDES DES OVOCYTES DE HOMARUS GAMMARUS (L.).

#### A. Etude anatomo-électrophysiologique

##### 1) Données électrophysiologiques

a- Ovocytes immatures: Les ovocytes immatures ont un potentiel de membrane de  $-65 \pm 2$  mV, valeur qui est très proche de celle mesurée pour les crabes *Maia squinado* et *Carcinus maenas*.

Des expériences de substitutions d'ions (Fig. 1a) nous ont permis de préciser le déterminisme ionique de cette différence de potentiel. Ainsi, le remplacement total du sodium de l'eau de mer par du potassium, provoque une dépolarisation moyenne de la membrane de  $84,5 \pm 1,5$  mV. Cette valeur se rapproche suffisamment des 93 mV théoriques que l'on obtiendrait si la membrane de l'ovocyte n'était qu'exclusivement perméable au potassium, pour que l'on puisse affirmer que le potentiel de membrane est essentiellement potassium-dépendant. Ce résultat est corroboré par le fait que la suppression totale du chlorure ou du sodium hyperpolarise la membrane de  $10 \pm 1$  mV et la dépolarise de  $8 \pm 1$  mV respectivement. L'hyperpolarisation de la membrane sous l'effet de la suppression du chlorure a déjà été décrite chez d'autres espèces animales (Hagiwara et Jaffe, 1979) et ne peut s'expliquer simplement. Elle exclut l'existence d'une perméabilité importante pour l'anion. Cette observation est aussi valable pour le sodium. L'ajout dans l'eau de mer de l'ionophore calcium A 23 187 ne provoque aucun changement de la différence de potentiel transmembranaire (Fig. 1a). La résistance de la membrane est en moyenne inférieure à 1 M $\Omega$ , avec ou sans cet agent activant.

b- Ovocytes prématures: La maturation méiotique se manifeste, chez *Maia squinado* et chez *Carcinus maenas* par une diminution brutale de la polari-

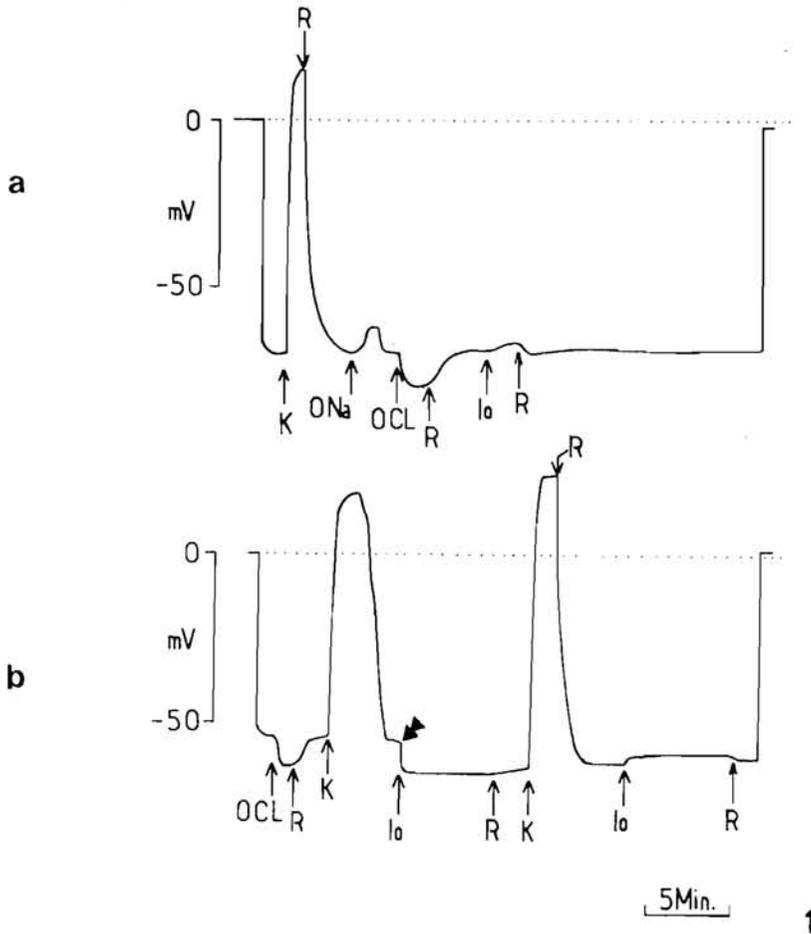


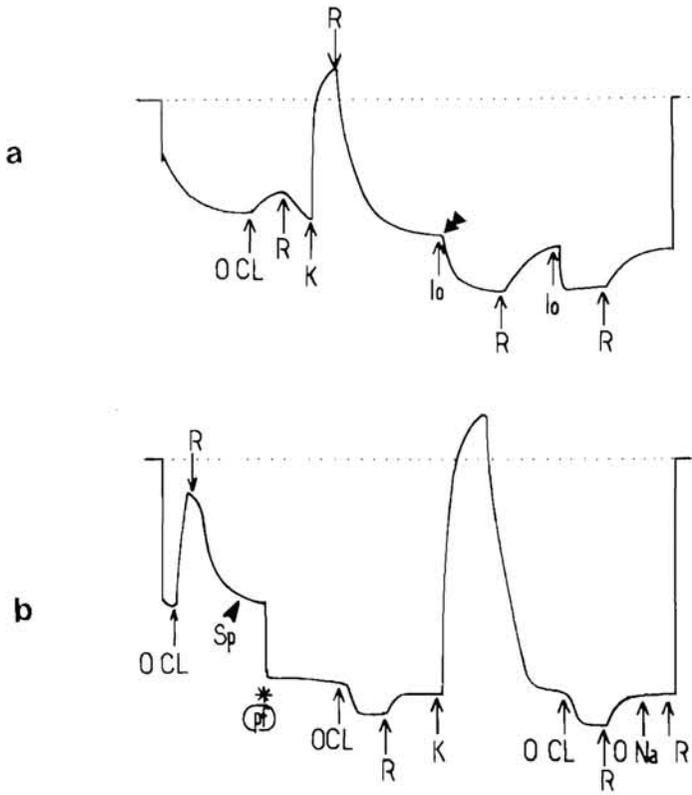
Fig. 1 - Potentiel de membrane de l'ovocyte immature et submature de Homarus gammarus.

La figure 1a représente l'enregistrement de potentiel trans-membranaire d'un ovocyte immature. Lorsque tout le sodium de l'eau de mer est remplacé par du potassium(K), la membrane se dépolarise de 85 mV et reprend sa polarisation lorsque l'eau de mer baigne à nouveau l'ovocyte(R). La suppression du chlorure de l'eau de mer(OCl<sub>6</sub>) hyperpolarise légèrement la membrane. L'ajout de l'ionophore A23 197 (2.10<sup>-6</sup> M dans l'eau de mer) (I<sub>o</sub>), ne provoque aucun effet. La figure 1b représente le même type de mesure effectuée sur un ovocyte submature. Dans ce cas, l'ajout de l'ionophore A23 187 (2.10<sup>-6</sup> M) provoque une hyperpolarisation de la membrane (▲) qui est lentement réversible. Notez, juste après la suppression de l'ionophore, la dépolarisation de la membrane sous l'effet du potassium(K) qui paraît largement augmentée.

sation membranaire qui s'accompagne de changements drastiques de la perméabilité de la membrane : celle-ci , en effet , acquiert une sélectivité vis à vis du chlorure , mais perd celle qu'elle possédait vis à vis du potassium (Goudeau et Goudeau, soumis pour publication). Ce phénomène se produit qualitativement aussi chez Homarus gammarus mais semble prendre, pour s'installer, plus de temps. Ainsi , nous avons mesuré sur les ovocytes prématures de Homarus gammarus des valeurs de potentiel que nous avons rangées en deux classes. Cette variabilité dans les valeurs de potentiel traduit probablement une évolution dans le temps du processus de maturation. Ainsi, les ovocytes de deux femelles (Fig.1b) ont fourni une valeur moyenne de potentiel de  $-49 \pm 2\text{mV}$  ( $n=12$ ). Leur membrane se dépolarise de  $64 \pm 2,5\text{ mV}$  lorsque tout le sodium de l'eau de mer est remplacé par du potassium. Les effets de la suppression du chlorure sont identiques à ceux détectés sur l'ovocyte immature, tandis que ceux produits par la suppression du sodium sont insignifiants. Ainsi, la membrane a essentiellement perdu une partie de sa perméabilité au potassium. Sa résistance augmente d'ailleurs et peut atteindre 2 à 4 M $\Omega$ . L'ajout de ionophore A 23 187 dans l'eau de mer provoque immédiatement une hyperpolarisation (lentement réversible au rinçage) qui amène la membrane à une valeur moyenne de potentiel de  $-62 \pm 2,5\text{ mV}$  ( $n = 11$ ). Juste après le rinçage de l'ionophore le remplacement du sodium par du potassium dépolarise la membrane de  $81 \pm 2\text{ mV}$ , sans modifier la réponse à la suppression du chlorure ou du sodium. Ainsi, sur les ovocytes traités par l'ionophore les valeurs de potentiel de membrane et de dépolarisation, provoquées par le potassium, sont pratiquement identiques à celles observées sur les ovocytes immatures. L'agent activant qui, fonctionnellement, augmente la concentration intracytosolique de calcium (Steinhardt et Epel, 1974) rend donc à la membrane sa perméabilité exclusive pour le potassium. Nous avons regroupé les ovocytes de deux autres femelles (Fig.2a) dans une autre classe de valeurs: en effet la valeur moyenne du potentiel de membrane de ces ovocytes est alors de  $-31 \pm 3\text{ mV}$  ( $n=16$ ). La membrane se dépolarise de  $45 \pm 4\text{mV}$  ( $n = 15$ ) sous l'effet du potassium, tandis que la suppression du chlorure provoque un effet variable , soit légèrement hyperpolarisant, soit dépolarisant ( de 10 mV en moyenne) comme sur les ovocytes maturés de Maia squinado ou de Carcinus maenas (Fig. 2a et 2b). Cette dépolarisation de la membrane lors de la suppression du chlorure de l'eau de mer est due à une sortie de l'anion hors de l'ovocyte et signale donc l'apparition d'une perméabilité au chlorure. La résistance de la membrane est de nouveau inférieure à 1 M $\Omega$ . Lorsque l'ionophore A 23 187 est ajouté à l'eau de mer, la membrane s'hyperpolarise de 10 à 15 mV, le potentiel de membrane , après complétion de l'effet, étant égal à  $-48 \pm 3\text{mV}$  ( $n = 8$ ) , et la dépolarisation induite par le potassium de  $74 \pm 6\text{ mV}$  ( $n = 4$ ). Il est important de noter que , au rinçage de l'ionophore, le potentiel reprend immédiatement sa valeur initiale ( alors que son effet était plus permanent sur les ovocytes prématures précédemment décrits). Ainsi l'agent activant augmente dans ce cas aussi la perméabilité de la membrane au potassium mais d'une manière moins complète et moins soutenue que pour les ovocytes prématures déjà mentionnés.

## 2) Données cytologiques

Les ovocytes immatures et prématures étudiés électrophysiologiquement et traités au ionophore calcium A 23 187 ont été ensuite analysés d'un point de vue ultrastructural. Les témoins de ces spécimens, maintenus dans de l'eau de mer sans adjonction d'agent activant ont été pareillement observés. L'étude ultrastructurale du cortex de ces ovocytes expérimentés et de leurs témoins indique qu'il n'existe aucun signe de réaction corticale pour chacune des situations expérimentales envisagées ( Fig. 4). En effet, il est impossible de déceler dans l'espace perivitellin de rejet d'une substance finement granuleuse qui puisse être comparable au premier exudat que nous avons observé dans la réaction corticale , chez les crabes Carcinus maenas (Goudeau, 1982b; Goudeau et Becker, 1982) et Maia squinado ( Goudeau et Goudeau, soumis



2

Fig. 2 - Potentiel de membrane de l'ovocyte submature de Homarus gammarus et de l'ovocyte mûr puis fécondé de Maia squinado.  
 La figure 2a représente l'enregistrement de la mesure de potentiel transmembranaire d'un ovocyte submature de Homarus gammarus n'ayant pas encore atteint le stade de maturation où il peut être fécondé. La suppression du chlorure (OCL) dépolairise légèrement la membrane de même que le remplacement du sodium par du potassium(K). L'ajout d'ionophore A23 187 ( $2.10^{-6}$  M dans l'eau de mer) (▲) provoque une hyperpolarisation consécutive, mais réversible de la membrane.  
 La figure 2b représente l'enregistrement d'un potentiel de fécondation (pf\*) obtenu sur un ovocyte physiologiquement mûr de Maia squinado. On peut noter l'analogie entre ce potentiel de fécondation et l'hyperpolarisation due au ionophore(I<sub>0</sub>).

pour publication). De plus, l'analyse des coupes ultrafines permet de déceler que les vésicules contenant des éléments en forme d'anneau, demeurent en place dans le cortex ovocytaire et ne subissent aucun phénomène d'exocytose ( Fig. 5). A ce sujet, nous devons rappeler que, pour le modèle crabe, ces éléments représentent le deuxième matériel précurseur impliqué dans la réaction corticale et fournissant après exocytose l'essentiel de l'enveloppe 2. Cette enveloppe, associée au revêtement vitellin sus-jacent, a été définie comme étant l'enveloppe de fécondation ( Goudeau, 1982b, Goudeau et Becker, 1982). Par ailleurs, l'analyse ultrastructurale de ces spécimens révèle l'exocytose d'un matériel ovocytaire granuleux, qui sans aucun doute représente un précurseur de l'enveloppe vitelline 1b alors en formation et dont les éléments viennent s'accoler à l'enveloppe vitelline 1a préexistante (Fig. 6). Cette observation complète les données publiées par Talbot (1981), concernant l'origine et l'élaboration de cette enveloppe vitelline la plus interne, dont le précurseur principal est issu des cellules folliculaires environnantes. Pour conclure, l'enveloppe vitelline 1b comprendrait un stroma granuleux d'origine ovocytaire et des éléments principaux d'origine folliculaire.

## B. Détermination des ecdystéroïdes

### 1) Ovocytes prématures

La figure 3a représente le résultat de la détection des ecdystéroïdes dans les ovocytes prématures de Homarus gammarus. Il apparaît que deux ecdystéroïdes en quantité relativement importante sont présents dans l'ovocyte prémature: de la ponastérone A ( 130 nano grammes / gramme de poids frais) et de la 20-hydroxyecdysone (10 nano grammes / gramme de poids frais). Il existe de plus, des traces d'ecdysone. La présence concomitante dans les ovocytes prématures, de ces deux hormones, dont l'une est le précurseur de l'autre, est pour l'instant de signification obscure.

### 2) Embryons

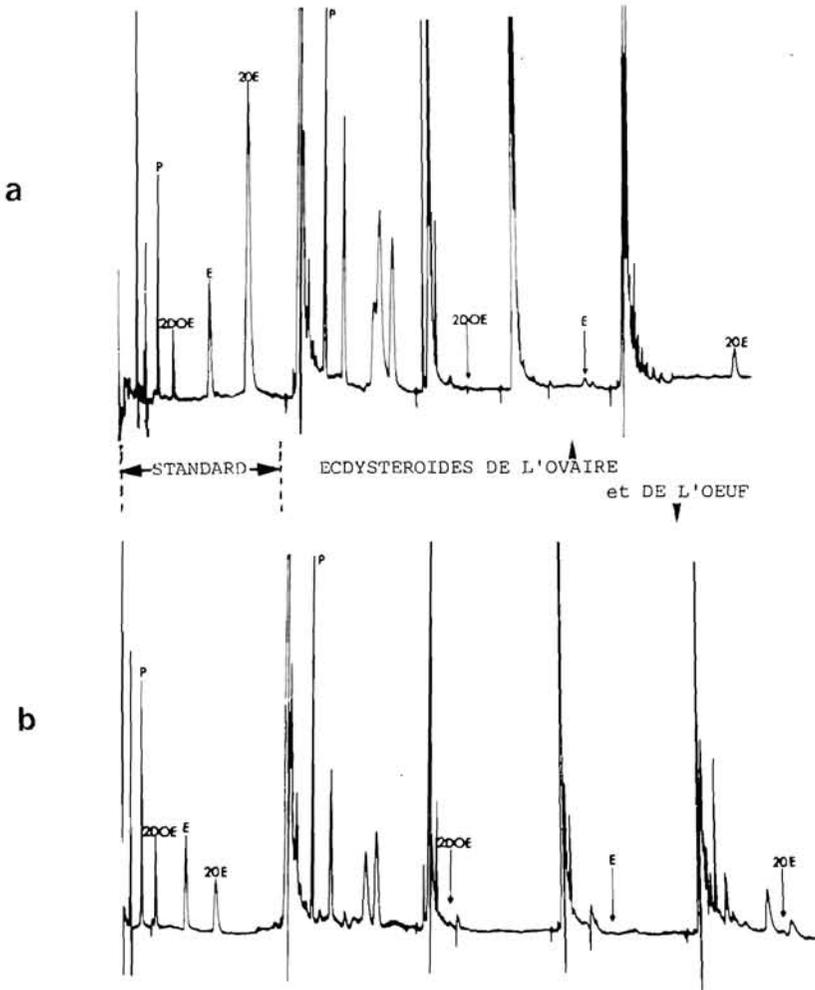
Les mêmes analyses biochimiques permettent de détecter la présence exclusive de ponastérone A dans les embryons en fin de développement (35 nano grammes / gramme de poids frais).

## II- ANALYSE ULTRASTRUCTURALE DU MECANISME D'ATTACHE DE L'"OEUF" PONDU DE HOMARUS GAMMARUS(L.)

L'"oeuf" nouvellement pondu de Homarus gammarus, comme celui d'autres Décapodes, est relié aux soies ovigères maternelles, par l'intermédiaire d'un pédicule d'attache ou funicule ( Fig. 7). Nous nous sommes appliqués à analyser sa constitution, à comprendre le mécanisme de son élaboration, et à analyser son contact avec la soie ovigère (Fig. 8).

Dans ce but, nous avons effectué des coupes ultrafines et semi-fines au niveau de la zone d'accollement du funicule à la soie ovigère ( sectionnée transversalement), et à l'embase du funicule. De l'ensemble de ces observations il résulte que le funicule de l'"oeuf" pondu de Homarus gammarus est constitué par l'association des enveloppes vitellines 1a et 1b accolées, comme cela a déjà été défini pour le crabe Carcinus maenas (Goudeau et Lachaise, 1983). Ces enveloppes vitellines, extrêmement étirées forment l'embase (Figs. 11, 13 et 14) et le corps du funicule (Figs. 13 et 14). Il faut noter que lorsque le funicule est élaboré, l'enveloppe 1b s'amenuise autour de l'oeuf à partir de l'embase du funicule, et n'est plus décelable sur la majorité de la superficie de l'oeuf. Celui-ci n'est plus donc limité que par l'enveloppe 1a externe (Fig. 15).

A son apex, le funicule s'accolle à la soie (Fig. 9), vraisemblablement par son extrémité aveugle limitée par l'enveloppe 1a. Celle-ci est



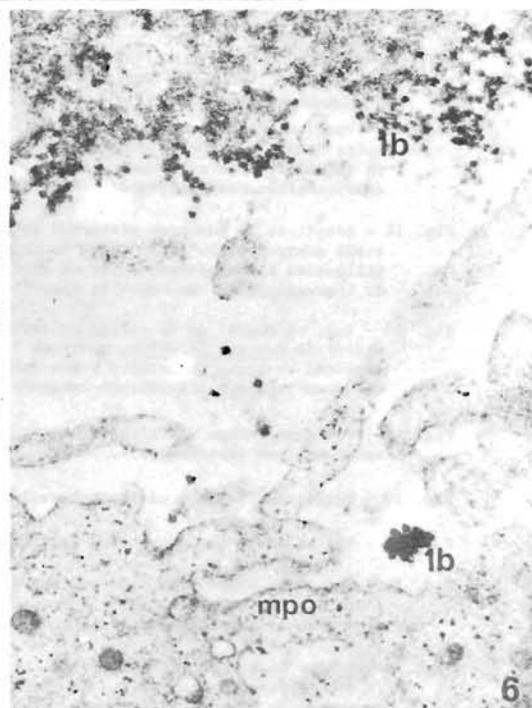
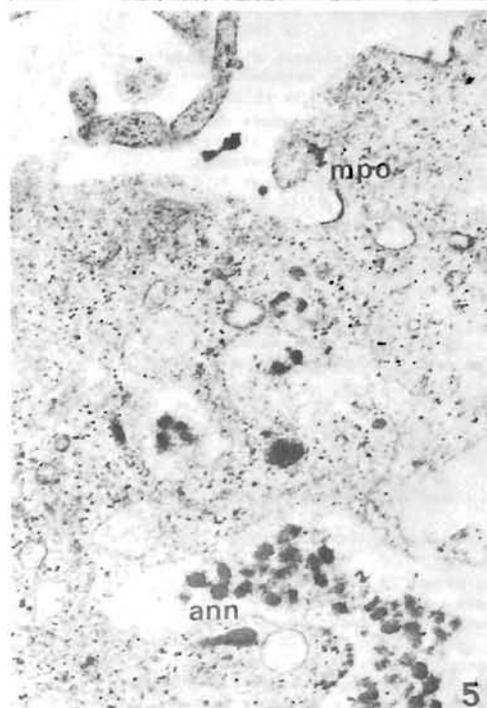
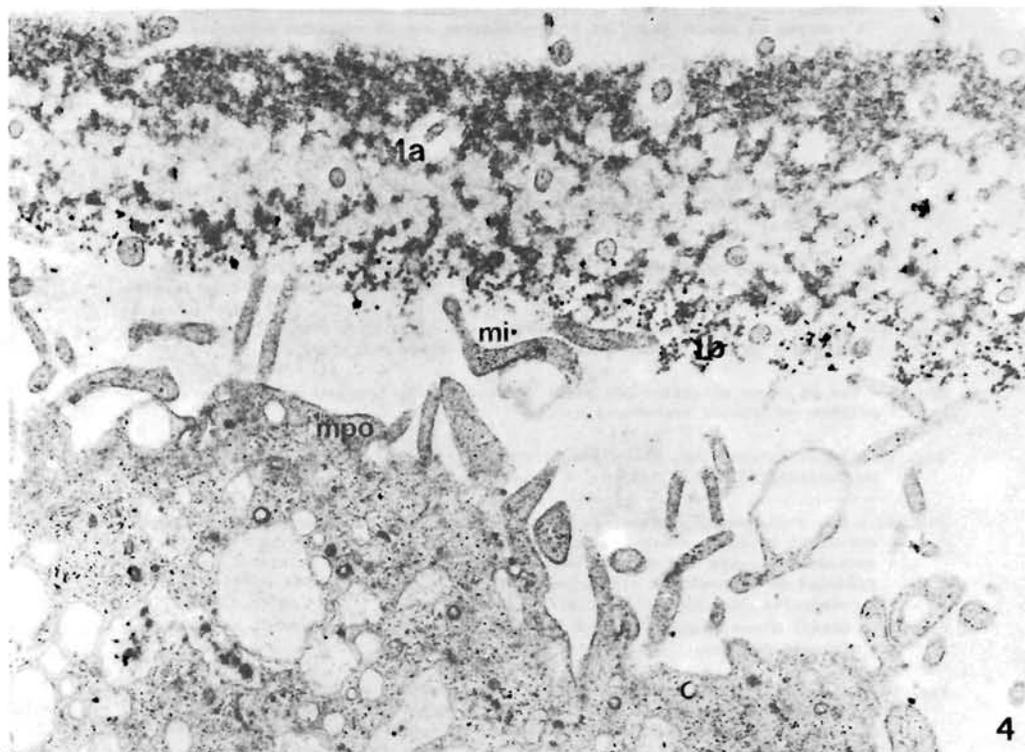
3

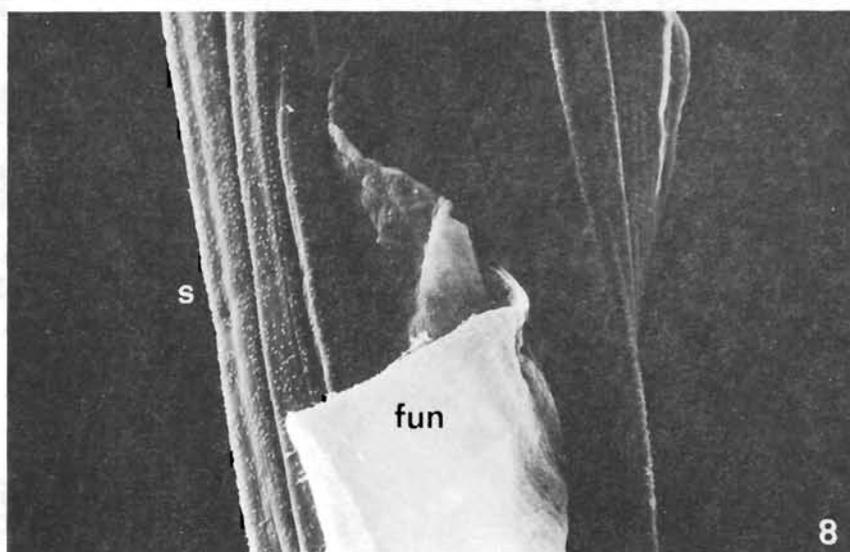
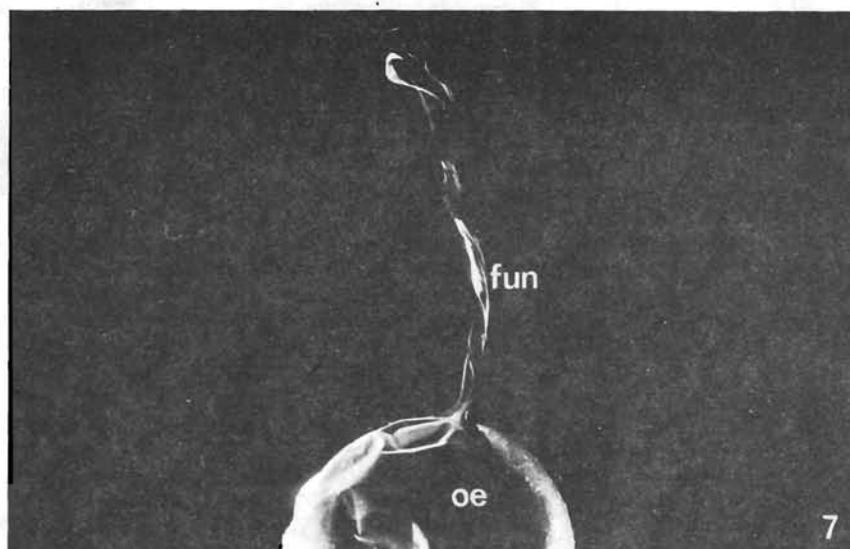
Fig. 3a - Mise en évidence des ecdystéroïdes dans les ovaires submature de Homarus gammarus (L.).

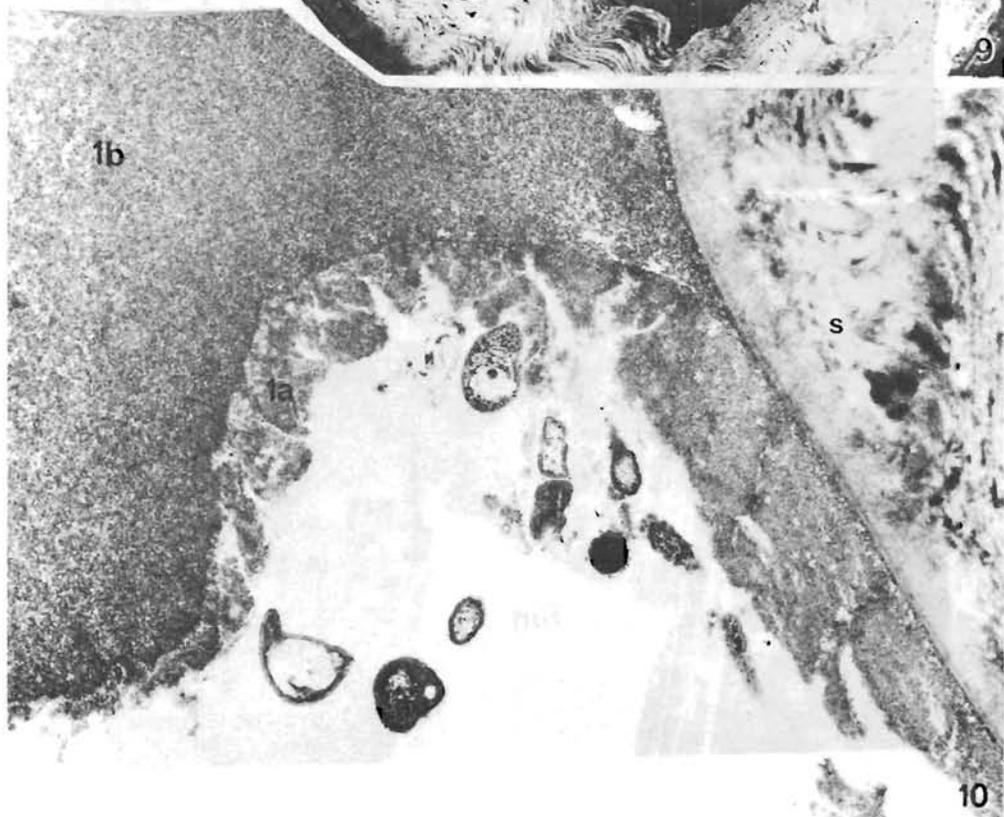
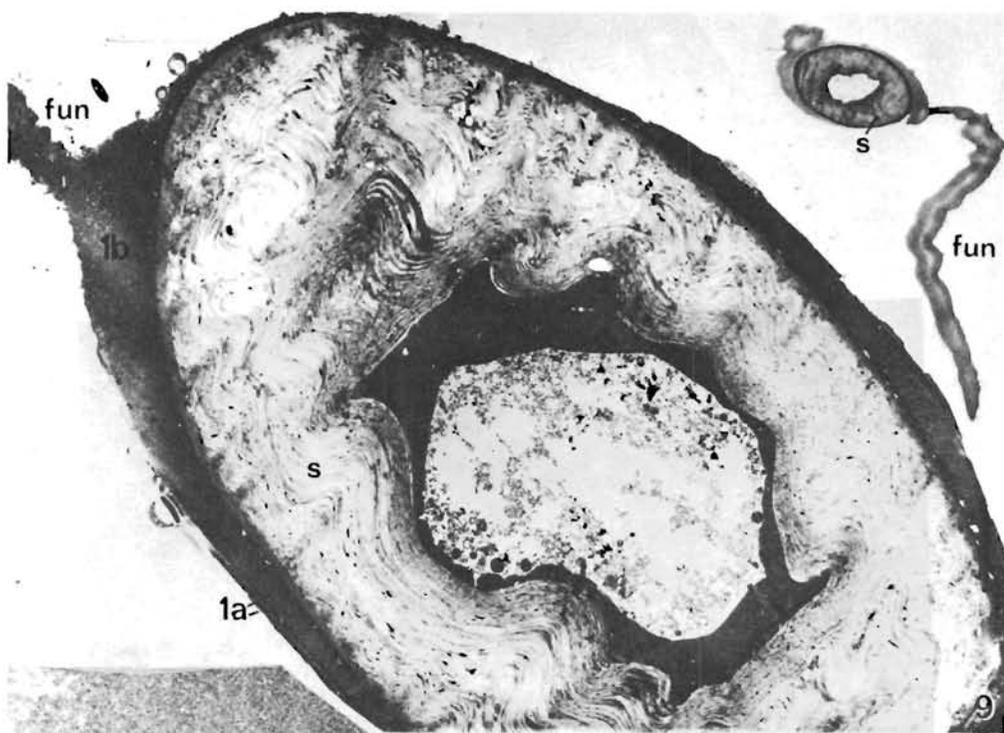
La figure représente un enregistrement typique des pics d'ecdystéroïdes obtenus en chromatographie liquide de haute performance (HPLC) par injection sur colonne de silice après une purification en phase inverse. Les pics sont étalonnés grâce à l'injection des ecdystéroïdes de référence en quantité connue (STANDARD). P, 2 DOE, E, 20E représentent respectivement la ponastérone A, la 2 deoxyecdysone, l'ecdysone et la 20 hydroxyecdysone.

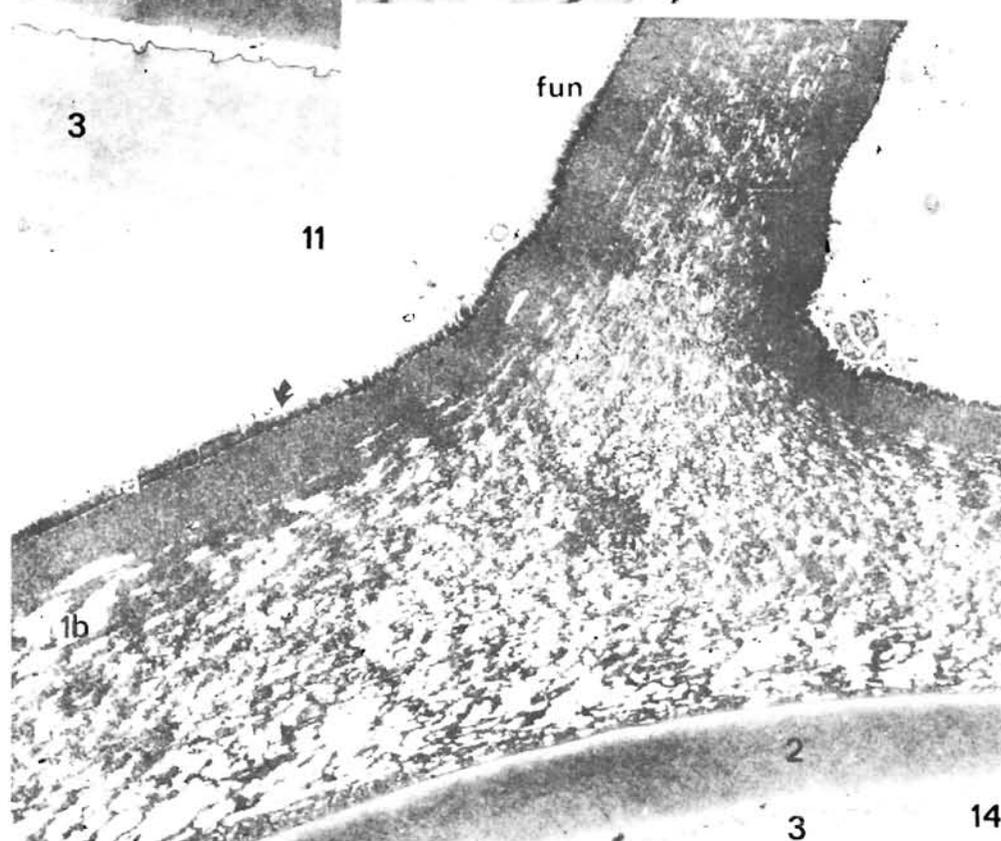
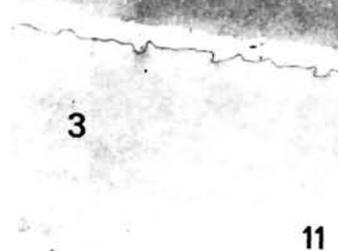
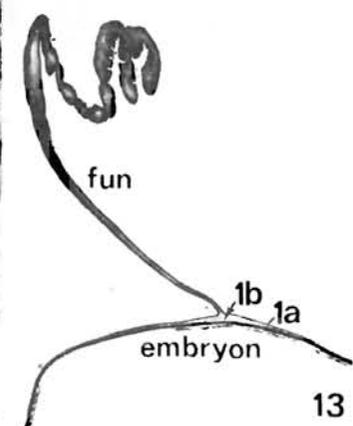
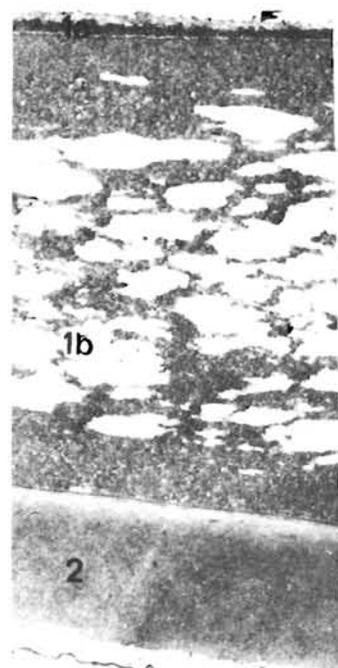
Fig. 3b - Mise en évidence des ecdystéroïdes dans les oeufs de Homarus gammarus (L.) (phase embryonnaire "zoé" avec l'enveloppe embryonnaire 6 sécrétée).

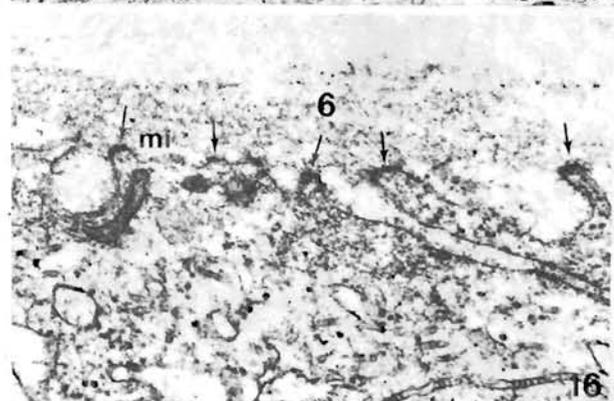
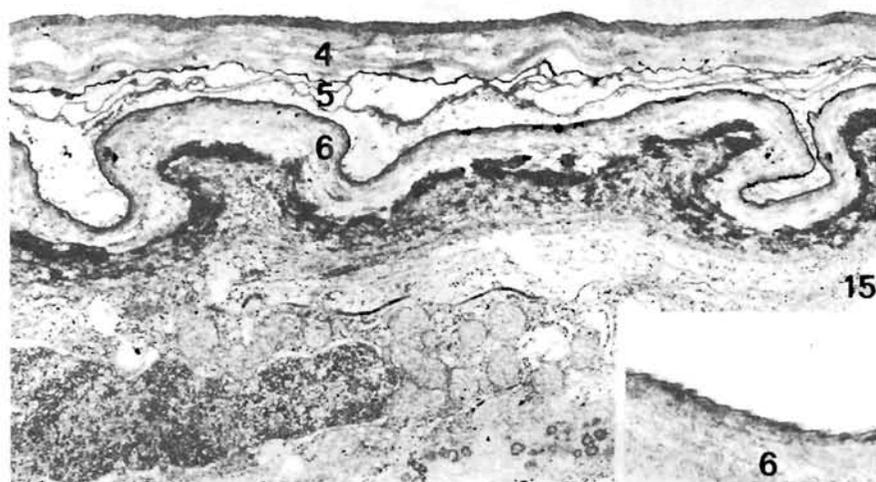
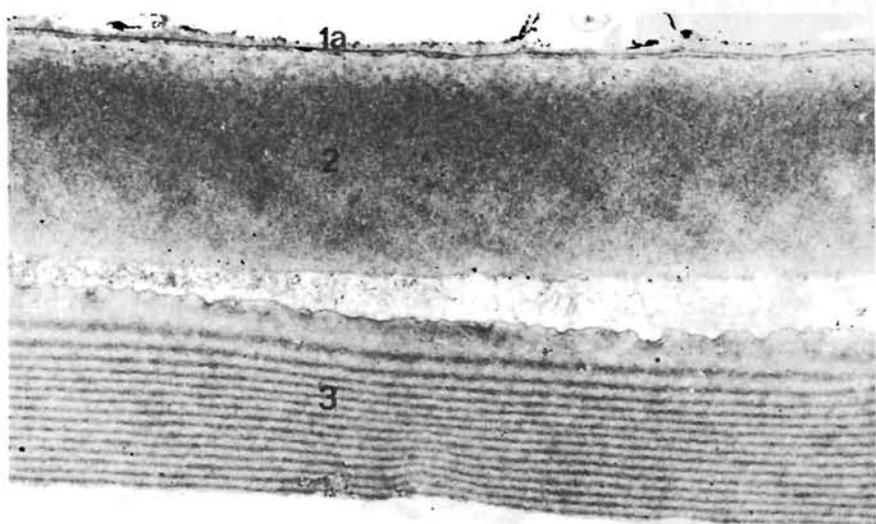
- Fig. 4 - Vue de la région corticale d'un ovocyte submaturation de Homarus gammarus(L.) en coupe ultrafine . L'ovocyte impliqué est celui dont on montre également les caractéristiques électrophysiologiques(Fig.1b) après application d'ionophore A 23 187, qui provoque une réponse analogue à un potentiel de fécondation . Ici, malgré la réponse électrique membranaire, le cortex de l'ovocyte ne réagit pas , et l'on n'observe aucune réaction corticale.  
(X 26 000)
- Fig. 5 - Détail de la région corticale de l'ovocyte décrit dans la figure 4. On observera la présence de vésicules corticales remplies d'éléments en forme d'anneaux analogues à ceux définis comme étant le deuxième précurseur de la réaction corticale chez les Crustacés Brachyours.  
(X 40 000)
- Fig. 6 - Détail de la région corticale de l'ovocyte décrit dans la figure 4. Cette coupe montre la sécrétion par l'ovocyte d'une substance granuleuse qui correspond à l'un des précurseurs de l'enveloppe vitelline 1b , en formation.  
(X 54 000)
- Fig. 7 - Vue épiscopique, au microscope électronique à balayage, d'un oeuf pondu muni de son pédicule d'attache(ou funicule) aux soies ovigères de la femelle.  
(X 34)
- Fig. 8 - Vue au microscope électronique à balayage de la zone d'accollement, du funicule d'un oeuf pondu, à un faisceau de soies ovigères.  
(X 440)
- Fig. 9 - Vue en coupe ultrafine du point d'attache d'un funicule à une soie ovigère sectionnée transversalement.  
(X 8 000)
- Fig. 10 - Détail d'une coupe ultrafine effectuée au niveau du point d'attache du funicule à la soie ovigère de Homarus gammarus.  
(X 26 000)
- Fig. 11 - Vue d'une section ultrafine effectuée au niveau des enveloppes superposées entourant un stade embryonnaire "nauplius", chez Homarus gammarus. La section intéresse la base du funicule et révèle, encore à ce niveau, la présence de l'enveloppe vitelline 1b. Notez la présence d'une substance surnuméraire sur l'enveloppe 1a ( flèche).  
(X 16 400)
- Fig. 12 - Détail d'une coupe ultrafine effectuée au point d'accollement du funicule à une soie ovigère.  
(X 40 000)
- Fig. 13 - Vue, en coupe sagittale semi-fine, de l'ensemble du funicule d'attache formé par les enveloppes vitellines superposées 1a+1b, d'un oeuf pondu. On observera que ces enveloppes vitellines sont extrêmement étirées au niveau du funicule et que par ailleurs l'enveloppe 1b n'existe exclusivement qu'à l'embase du funicule et s'amenuise brutalement autour de l'embryon.  
(X 200)
- Fig. 14 - Détail en coupe ultrafine de l'embase du funicule d'attache d'un stade embryonnaire "nauplius". Notez la présence d'une substance surnuméraire appliquée sur l'enveloppe 1a ( flèche).  
(X 11 200)
- Fig. 15 - Vue, en coupe ultrarame, de la région superficielle d'un stade embryonnaire "zoé" de Homarus gammarus, montrant la superposition de l'enveloppe de fécondation (= enveloppe vitelline + enveloppe 2) et des enveloppes embryonnaires successivement sécrétées par l'embryon ( enveloppes 3, 4, 5, 6).  
(X 16 400)
- Fig. 16 - Détail de la membrane plasmique apicale d'une cellule superficielle d'un stade embryonnaire "zoé". Cette coupe ultrafine révèle la présence de microvillosités à l'apex desquelles on peut observer le précurseur ( flèches) de l'enveloppe 6 en cours de sécrétion.  
(X 54 000)
- Fig. 17 - Vue, en coupe, de la région superficielle d'un stade d'éclosion ( 1ère mysis) de Homarus gammarus, montrant la cuticule larvaire (= enveloppe 7) sécrétée au cours du dernier stade embryonnaire. Le revêtement cuticulaire est sous-jacent à l'enveloppe embryonnaire 6.  
(X 20 000)
- Fig. 18 - Vue d'une coupe ultrafine révélant le détail de la structure des enveloppes embryonnaires superposées 4, 5 et 6 , de Homarus gammarus.  
(X 54 000)
- Fig. 19 - Détail de l'aspect ultrastructural de l'enveloppe embryonnaire 5.  
(X 54 000)
- Fig. 20 - Vue en coupe des enveloppes embryonnaires superposées 4, 5 et 6.  
(X 32 000)
- Fig. 21 - Vue d'une coupe ultrafine effectuée au niveau de l'enveloppe embryonnaire 6 et de la cuticule de la future 1ère mysis (= enveloppe 7). On observera l'agencement cuticulaire "en contraplaqué torsadé".  
(X 40 000)
- Figs. 22 et 23 - Détail de la sécrétion de la cuticule de la future 1ère mysis (= enveloppe embryonnaire 7), en cours de sécrétion. On remarquera, à l'apex de nombreuses microvillosités des cellules épidermiques , le dépôt de précurseurs ( flèches) de la cuticule de la mysis.  
(X 54 000 et X 40 000)

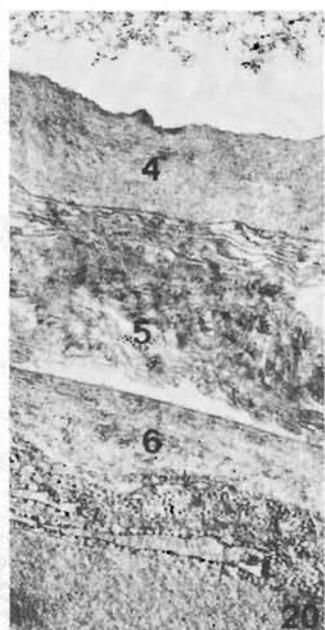
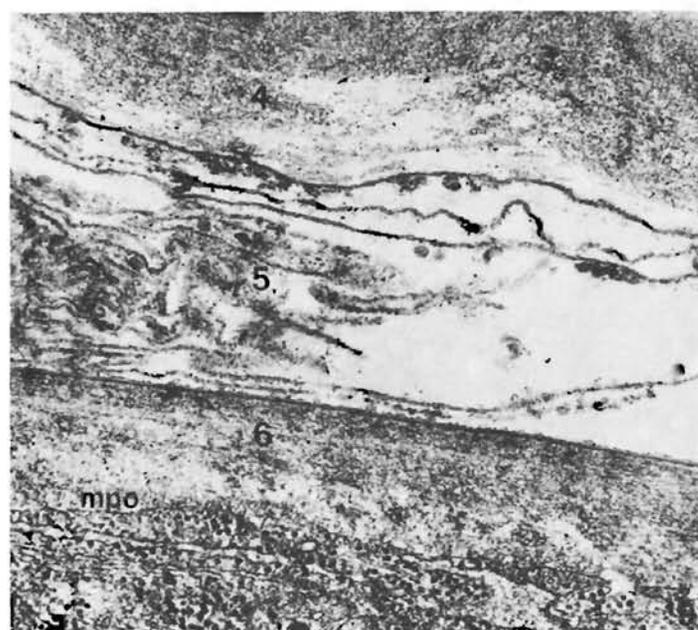


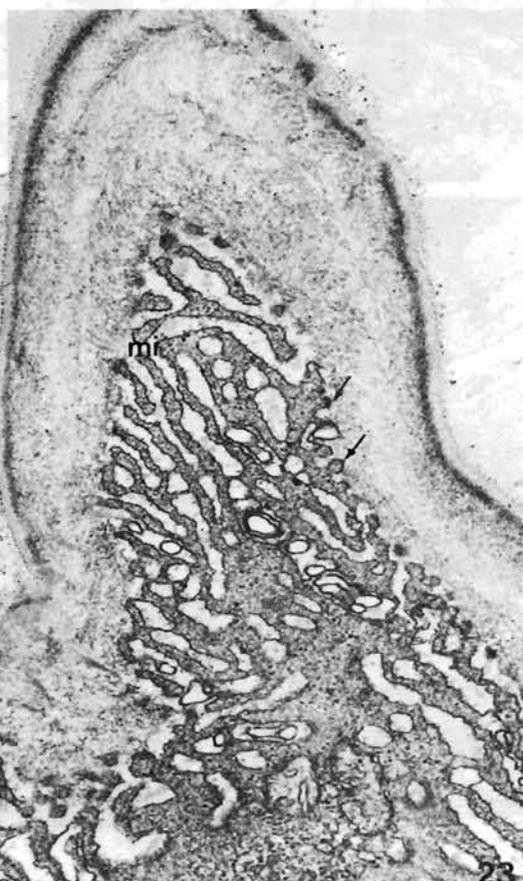
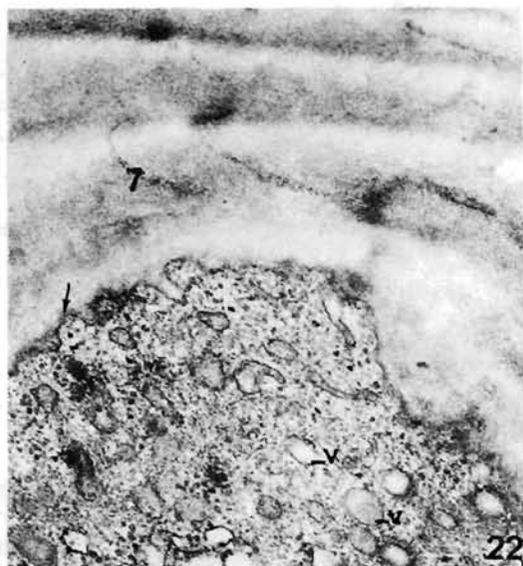












difficilement discernable au contact de la soie (Figs. 10 et 12). Il faut noter également la présence, décelée sur coupes ultrafines, d'un matériel additionnel appliqué à la surface de l'enveloppe 1a (Figs. 11 et 14).

### III- DESCRIPTION DES ENVELOPPES EMBRYONNAIRES DE HOMARUS GAMMARUS (L.).

L'observation de coupes ultrafines de la région superficielle d'embryons de Homarus gammarus à l'éclosion, indique indubitablement qu'il existe 7 enveloppes superposées. Le revêtement le plus externe est constitué de l'enveloppe vitelline 1a accolée à l'enveloppe 2 (issue de la réaction corticale), formant ainsi l'enveloppe de fécondation.

Sous-jacentes à ce revêtement, il existe cinq enveloppes superposées, dénommées respectivement enveloppes embryonnaires 3, 4, 5, 6 et 7 (Figs. 15, 17, 18 et 21). Ces enveloppes sont sécrétées par l'embryon. Certains aspects du mécanisme sécrétoire ont pu être mis en évidence pour les deux dernières enveloppes embryonnaires (6 et 7). Les précurseurs de l'enveloppe apparaissent accumulés à l'apex de microvillosités formées par la membrane plasmique apicale des cellules ectodermiques de l'embryon (Figs. 16, 21, 22 et 23). Il est à souligner que l'enveloppe 7 est répertoriée comme étant une enveloppe sécrétée au cours de la phase finale du développement embryonnaire et, de ce fait, peut être considérée comme une enveloppe embryonnaire, bien que fonctionnellement représentant la cuticule de la première mysis à l'éclosion. Il est à remarquer que, pour la même espèce, Cheung (1966) n'a décrit que deux enveloppes embryonnaires.

### DISCUSSION

De l'ensemble de nos résultats, plusieurs points originaux méritent d'être soulignés : i) la présence d'une hyperpolarisation membranaire de l'ovocyte prématuration sous l'effet de l'ionophore A 23 187; ii) un mécanisme sophistiqué d'attache de l'"oeuf" pondue aux soies ovigères maternelles; iii) la présence d'ecdystéroïdes dans les embryons qui, par ailleurs, présentent plusieurs enveloppes embryonnaires superposées.

#### L'hyperpolarisation membranaire de l'ovocyte sous l'effet de l'agent activant:

La fécondation chez la plupart des espèces animales étudiées se manifeste sur le plan électrophysiologique par une dépolarisation rapide et plus ou moins persistante de la membrane de l'oeuf. Cette variation de potentiel est définie comme étant le potentiel de fécondation (Hagiwara et Jaffe, 1979). Au potentiel de fécondation fait suite classiquement une repolarisation de la membrane due à une augmentation de la perméabilité de la membrane au potassium (Hagiwara et Jaffe, 1979). Le potentiel de fécondation est la conséquence d'une augmentation de la concentration intracytosolique en calcium de l'ovocyte (Ridgway et coll., 1977; Steinhardt et coll., 1977; Cuthbertson et coll., 1980) déclenchée par le contact entre les gamètes. L'ionophore calcium A 23 187 provoque, à la cinétique près, la même séquence d'événements électrophysiologiques que la fécondation (Steinhardt et Epel, 1974). Dans le cas des oeufs de Crustacés Maia squinado et Carcinus maenas nous avons récemment démontré (résultats actuellement soumis pour publication) que le potentiel de fécondation se manifeste par une hyperpolarisation permanente de la membrane due à une augmentation brutale de la perméabilité au potassium (Fig. 2b). Cette réponse présente une certaine analogie avec le potentiel de fécondation obtenu sur l'oeuf de Hamster qui est représenté par une série de phases d'hyperpolarisations récurrentes de la membrane (Miazaki et Igusa, 1980). Les hyperpolarisations ont été attribuées à des augmentations transitoires corrélatives de la concentration cytosolique en calcium (Igusa et Miazaki, 1983; Igusa et coll., 1983), provoquant une augmentation de la perméabilité au potassium (Meech, 1978). Il semble évident que les hyperpolarisations obtenues sur les ovocytes prématures de Homarus gammarus par

effet de l'ionophore A 23 187 relèvent du même mécanisme. L'hyperpolarisation de la membrane de l'ovocyte de Homard n'est persistante qu'en présence de l'ionophore. Ceci est probablement due au fait que l'activation de l'oeuf des Crustacés Décapodes reptantia peut nécessiter une augmentation importante du calcium intra-ovocytaire ( Jaffe, 1983) qui n'est assurée sur les ovocytes prématures de Homard qu'avec une augmentation conséquente de la perméabilité au calcium sous l'effet de l'ionophore. Une différence de sensibilité du système conditionnant la perméabilité au potassium sous l'influence du calcium n'est pas à exclure pour expliquer la différence de réversibilité de l'effet de l'ionophore sur les deux types d'ovocytes prématures expérimentés. L'absence d'effet de l'ionophore sur les ovocytes immatures n'est pas étonnante dans la mesure où on peut raisonnablement supposer que la perméabilité de la membrane au potassium est déjà maximale, pour ces ovocytes.

De plus, les résultats cytologiques négatifs quant à la réaction corticale, pour des ovocytes soumis à l'action activante de l'ionophore A 23 187, prouvent clairement que dans ce cas le phénomène n'est que membranaire sur un plan électrophysiologique. Le cortex de l'ovocyte prémature n'est donc pas encore préparé à l'enchaînement des événements propres à la fécondation et notamment à la réaction corticale.

#### Le mécanisme d'attache de l' "oeuf" pondu:

En ce qui concerne ce mécanisme d'attache, il est bon de souligner la présence d'une substance additionnelle, à la superficie de l'enveloppe 1a, qui de plus n'a pas été observée sur les "oeufs" pondus de Brachyours. Cette substance pourrait participer au mécanisme d'attache de l'extrémité du funicule à la soie ovigère, soit directement comme matériel adhésif comme cela a été envisagé pour de nombreuses espèces de Crustacés Reptantia ( voir revue dans : Goudeau et Lachaise, 1983), soit comme agent modifiant la structure de l'enveloppe vitelline 1a. Cette couche superficielle additionnelle pourrait être aussi interprétée comme résultant d'une modification biochimique de la partie la plus superficielle de l'enveloppe 1a. Ce phénomène probablement initié par l'environnement ionique de l'eau de mer lors de la ponte, est actuellement en cours d'étude.

D'autre part, il est à souligner qu'il existe une profonde modification structurale des enveloppes vitellines 1a et 1b entourant l'"oeuf" pondu et constituant le funicule, par rapport à l'aspect que fournissent ces enveloppes autour de l'ovocyte au niveau ovarien ( Talbot, 1981). Ces modifications pourraient être corrélatives d'un gain en élasticité permettant la formation du funicule. Si l'environnement ionique peut modifier l'enveloppe externe 1a, en revanche il est évident que l'agent modifiant la structure de l'enveloppe interne 1b doit vraisemblablement être originaire de l'ovocyte. Cette origine a été établie pour le modèle Brachyours dont l'agent modifiant la structure de l'enveloppe 1b est le premier matériel rejeté lors de la réaction corticale à la fécondation.

En conclusion, sur la base de ces observations anatomiques relatives au funicule d'un "oeuf" pondu de Macroure, qui complètent les résultats acquis précédemment à l'égard du funicule de l'"oeuf" d'un Brachyours ( Goudeau et Lachaise, 1983) on peut supposer qu'il s'agit d'un agencement structural généralisable à tous les "oeufs" pondus de Décapodes Reptantia.

#### Ecdystéroïdes et enveloppes embryonnaires chez l'embryon de Homarus gammarus

Au vue des résultats concernant les enveloppes embryonnaires de Homard, on est tenté d'établir une corrélation entre les phases sécrétoires de ces enveloppes et les différentes étapes de ce développement embryonnaire condensé (Fig.24). En effet ce développement comprend différentes phases décrites par Bumpus ( 1891) pour *Homarus americanus*, qualifiées de "nauplius", "metanauplius", "protozoé", "zoé", l'éclosion s'effectuant au stade de

la première mysis. Ces stades en effet, bien qu'embryonnaires, présentent néanmoins une analogie anatomique évidente avec ceux du développement post-embryonnaire des Décapodes Pénaeidés (Held, 1938).

On serait également tenté, compte-tenu de la présence de ponastérone A dans les embryons, de penser que cet ecdystéroïde puisse intervenir dans le déclenchement de la sécrétion des enveloppes embryonnaires du Homard.

OVAIRE ↓	MER → oeufs attachés aux soies ovigères ♀					
	fécondation Réac. Corticale Ponte Attache des Oeufs	Stades du développement embryonnaire condensé = Phases intraovulaires				
Ovocyte mûré	Oeuf fécondé	"Nauplius"	"Metanauplius"	"Protozoé"	"Zoé"	Mysis
Enveloppe 1a+1b	Capsule Embryonnaire = Envelop. 2	Envelop. 3	Envelop. 4	Envelop. 5	Envelop. 6	Cuticule de la 1 <sup>ère</sup> mysis = Envelop. 7
						24

Fig. 24 - Tableau récapitulatif relatif aux différents stades embryonnaires, et aux enveloppes embryonnaires sécrétées successivement par l'embryon de Homarus gammarus (L.).

- BROWN G.G., 1966- Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the Decapod Callinectes sapidus. J. Ultrastruct. Res., 14, p. 425-440.
- BUMPUS H.C., 1891- The embryology of the American lobster. J. Morph., 5, p. 215-262.
- CUTHBERTSON K.S. WHITTINGHAM D.G., COBBOLD P.H., 1981- Free  $Ca^{2+}$  Increases in exponential phases during mouse oocyte activation. Nature (lond.) 294, p. 754-755.
- CHEUNG T.S., 1966- The development of egg-membranes and egg attachment in the shore crab Carcinus maenas, and some related Decapods. J. mar. biol. Ass. U.K., 46, p. 373-400.
- GOUDEAU M. et LACHAISE F., 1980a- Fine structure and secretion of the capsule enclosing the embryo in a crab (Carcinus maenas (L.)). Tissue & Cell, 12, p. 287-308.
- GOUDEAU M. et LACHAISE F., 1980 b - 'Endogenous yolk' as the precursor of a possible fertilization envelope in a crab (Carcinus maenas) Tissue & Cell, 12, p. 503-512.
- GOUDEAU M., 1982a - Fertilization in a crab: I. Early events in the ovary and cytological aspects of the acrosome reaction and gamete contacts. Tissue & Cell, 14, p. 97-111.
- GOUDEAU M., 1982b - Cortical reaction and fertilization envelope setting in Carcinus maenas (L.), Crustacea Decapoda. XV th EDBO International embryological conference. Strasbourg (France).
- GOUDEAU M; et BECKER J., 1982- Fertilization in a crab. II. Cytological aspects of the cortical reaction and fertilization envelope elaboration. Tissue & Cell, 14, p. 273-282.
- GOUDEAU M. et LACHAISE F., 1983- Structure of the egg funiculus and deposition of embryonic envelopes in a crab. Tissue & Cell, 15, p. 47 - 62.
- HAGIWARA S. et JAFFE L.A., 1979- Electrical properties of egg cell membrane. Ann.Rev.Biophys.Bioeng., 8, p. 335-416.
- HELD J.H., 1938- La reproduction chez les Crustacés Décapodes de la famille des Pénéides. Ann.Inst.Oceanogr., 18, p.31-206.
- HINSCHG.W., 1971- Penetration of the oocyte envelope by spermatozoa in the spider crab. J.Ultrastruct.Res., 35, p.86-97.
- IGUSA Y. et MIAZAKI S.I., 1983- Effects of altered extracellular and intra cellular calcium concentration on hyperpolarizing responses of the hamster egg. J.Physiol., 340, p. 611-632.
- IGUSA Y., MIAZAKI S.I. et YAMASHITA n., 1983- Periodic hyperpolarizing responses in hamster and mouse eggs fertilized with mouse sperm. J. Physiol, 340, p. 633-647.
- JAFFE L.F., 1983- Source of calcium in egg activation. Dev. Biol., 99, p. 265-276.
- MEECH R.W., 1978- Calcium-dependant potassium activation in nervous tissues. Ann.Rev. Biophys & Bioeng., 7, p. 1-18.
- MYAZAKI S.I. et IGUSA Y., 1980-The fertilization potential consists of recurring hyperpolarization in golden Hamster eggs. Nature (Lond)
- REYNOLDS E.S., 1963- The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, p. 208-211.
- RIDGWAY E.B., GILKEY J.C. et JAFFE L.F., 1977- Free calcium increases explosively in activating medaka eggs. Proc. Natl. Acad. sci. USA, 74, p. 623-627.
- STEINHARDT R.A., ZUCKER R. et SCHATTEN G., 1977- Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. Dev. Biol., 58, p. 185-196.
- STEINHARDT R.A. et EPEL D., 1974- Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. Proc. Nat. Acad. sci. USA, 71, p. 1915-1919.
- TALBOT P., 1981- The ovary of the Lobster, Homarus americanus II. Structure of the mature follicle and origin of the chorion. J. Ultrastruct. Res. 76, p. 249-262.