

**ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LES FIGURES**

c	cortex
CA	CAtecholamines
CG	Cerebral Ganglia
DA	DopAmine
DAB	DiAminoBenzidine
d.i.c	dopamine-immunoreactive cell
d.i.f	dopamine-immunoreactive fibers
m. p	protector muscle
n	neuropil
NA	NorAdrenalin
n.i.c	noradrenalin-immunoreactive cells
n.i.f	noradrenalin-immunoreactive fibers
PG	Pedal Ganglion
VG	Visceral Ganglion
+	noradrenalin-immunoreactive cells
□	dopamine-immunoreactive cell

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	i
RÉSUMÉ .....	iii
TABLE OF ABBREVIATIONS USED IN THE FIGURES .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	ix
LISTE DES TABLEAUX .....	x
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
1.1. Système nerveux endocrinien et cellules neuro-sécrétrices (CNS).....	4
1.2. Les catécholamines: dopamine et noradrénaline .....	6
1.2.1. Synthèses, dosages et localisations de la dopamine et de la noradrénaline chez les mollusques bivalves.....	6
1.2.2. Implications de la dopamine et de la noradrénaline dans diverses fonctions physiologiques.....	7
1.2.2.1. Rôle des catécholamines dans la reproduction .....	7
1.2.2.2. Rôle des catécholamines dans la respiration et l'alimentation .....	13
1.2.2.3. Rôle des catécholamines dans la régulation cardiaque.....	13
1.2.2.4. Rôle des catécholamines dans le développement larvaire, la métamorphose et l'établissement des larves .....	14
1.2.2.5. Rôle des catécholamines dans la contraction du pied des bivalves .....	15
1.2.2.6. Rôle des catécholamines dans la réponse au stress.....	15
1.2.3. Effets opposés de la sérotonine et de la dopamine dans les différents processus physiologiques des bivalves .....	16
1.3. La sérotonine.....	12
1.3.1. Localisation et variations saisonnières chez les mollusques bivalves.....	18
1.3.2. Implications de la sérotonine dans la reproduction des mollusques bivalves .....	19
1.4. Les hormones stéroïdiennes.....	24

1.4.1.	Mise en évidence de la stéroïdogénèse chez les mollusques bivalves .....	24
1.4.2.	Variations de la concentration et implications des hormones stéroïdiennes dans la reproduction chez les mollusques .....	25
1.4.3.	Interactions entre la sérotonine et les stéroïdes .....	28
1.5.	Endurance et performance des spermatozoïdes .....	30
1.5.1.	Type de spermatozoïde chez les bivalves .....	30
1.5.2.	Initiation de la mobilité des spermatozoïdes chez les invertébrés aquatiques et métabolisme énergétique .....	31
1.5.3.	Différences de mobilité des spermatozoïdes entre les espèces .....	32
1.5.4.	Relations entre le métabolisme énergétique des spermatozoïdes, leur mobilité et la température du milieu externe .....	33
1.5.5.	Sérotonine et mobilité des spermatozoïdes .....	35
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS .....		36
CHAPITRE 2 : Dopamine and noradrenalin-like immunoreactivities in the ganglia of the soft-shell clam, <i>Mya arenaria</i> .....		40
ABSTRACT .....		41
2.1.	Introduction .....	42
2.2.	Materials and methods .....	45
2.2.1.	Animals, dissections, paraffin embedding and sectioning .....	45
2.2.2.	Immunohistochemical procedures .....	45
2.2.3.	Negative and positive controls .....	47
2.2.4.	Data analysis .....	48
2.3.	Results .....	49
2.3.1.	Distribution of dopamine and noradrenalin-immunoreactive cells in the visceral ganglion of <i>M. arenaria</i> .....	49
2.3.2.	Distribution of dopamine and noradrenalin-immunoreactive cells in the pedal ganglion of <i>M. arenaria</i> .....	55
2.3.3.	Distribution of dopamine-immunoreactive cells in the cerebral ganglia of <i>M. arenaria</i> .....	60
2.4.	Discussion .....	62
2.5.	Acknowledgments .....	69
2.6.	References .....	70

CHAPITRE 3 : In vitro induction of germinal vesicle breakdown in oocytes of the soft-shell clam, <i>Mya arenaria</i> .....	75
ABSTRACT.....	76
3.1. Introduction.....	77
3.2. Material and methods.....	81
3.2.1. Oocyte maturation assay with 5-HT.....	81
3.2.2. Statistical analysis .....	82
3.3. Results.....	84
3.4. Discussion.....	86
3.5. Acknowledgments .....	88
3.6. References.....	89
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	93
RÉFÉRENCES .....	96
ANNEXE 1 : Protocole permettant la détermination de la mobilité des spermatozoïdes de <i>Mya arenaria</i> , de leur teneur en ATP et de leur activité enzymatique à différentes températures ainsi que mise en évidence de l'influence de la sérotonine sur leur mobilité .....	111
ANNEXE 2 : Protocole permettant la mise en évidence de l'influence de pré-traitements stéroïdiens sur la dissolution de la vésicule germinale des ovocytes induite par la sérotonine chez <i>Mya arenaria</i> .....	117

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 2

- Figure 2.1** Dopamine and noradrenalin-like immunoreactivity in the visceral ganglion of *Mya arenaria*. ..... 50
- Figure 2.2** Dopamine and noradrenalin immunohistochemistry stained section of visceral, pedal and cerebral ganglia in *Mya arenaria*. ..... 54
- Figure 2.3** Dopamine and noradrenalin-like immunoreactivity in the pedal ganglion of *Mya arenaria*. ..... 56
- Figure 2.4** Dopamine-like immunoreactivity in the cerebral ganglia of *Mya arenaria*. 61

### CHAPITRE 3

- Figure 3.1:** Spherical oocyte of *M. arenaria* in GVBD with the nucleus free in the cytoplasm observed using a light microscope..... 83
- Figure 3.2:** Oocyte maturation in *M. arenaria* induced with 5-HT at varying concentrations and during different times (60, 90, 120 and 180 minutes)... 85

### ANNEXE 1

- Figure 4.1:** Représentation des zones de l'échantillon étudiées par le système d'analyse d'images CASA..... 115

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1

**Tableau 1.1** Dosage des catécholamines (DA et NA) chez les bivalves. .... 8-11

**Tableau 1.2** Induction de la GVBD chez les mollusques bivalves par la sérotonine. ....  
..... 22-23

### CHAPITRE 3

**Tableau 3.1** Serotonin induction of GVBD in bivalve molluscs. .... 79-80

### ANNEXE 1

**Tableau 4.1** Réglages des paramètres pour le dépistage des spermatozoïdes de *M. arenaria* par l'utilisation du système CASA..... 113

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

La population mondiale, et donc les besoins en protéines animales dans le monde, ne diminuent pas au fil des années, bien au contraire. Or, la productivité naturelle des masses d'eau mondiales (eaux douce, saumâtre et marine) est très grande mais devient de plus en plus limitée. De plus, depuis plus d'une dizaine d'années, les stocks de production halieutique ont décliné, principalement à cause de la surexploitation, de la dégradation de l'environnement et des maladies.

L'aquaculture, dont le but est l'élevage d'organismes aquatiques (poissons, mollusques, crustacés, plantes aquatiques...) nécessite l'intervention humaine dans le processus d'augmentation de la production. Le stock en élevage doit également être une propriété individuelle ou juridique (définition de la FAO, 2001). L'aquaculture peut seule répondre aux besoins croissants en protéines animales de la population mondiale et elle fournit actuellement plus du tiers des ressources mondiales aquatiques (FAO, 2001).

Au Canada, l'aquaculture est relativement nouvelle mais elle occupe déjà une place importante dans le secteur de la production marine. Les 5 espèces les plus importantes qui y sont élevées sont le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), la moule bleue (*Mytilus edulis*), le saumon quinnat (*Oncorhynchus tshawytscha*), l'huître du Pacifique (*Crassostrea gigas*)

et l'huître américaine (*Crassostrea virginica*). Les 6 principales espèces de mollusques bivalves et de crustacés élevées sont la moule bleue (*Mytilus edulis*), l'huître creuse du Pacifique (*Crassostrea gigas*), l'huître américaine (*Crassostrea virginica*), la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*), le pétoncle (*Placopecten magellanicus*) et le panope du Pacifique (*Panope abrupta*). Cependant, afin de permettre un développement continu de l'aquaculture, il est nécessaire de la diversifier en élevant de nouvelles espèces de valeur économique potentielle, telles que la mye, *Mya arenaria*, actuellement mise à l'essai en vue d'une production à grande échelle.

*Mya arenaria* est un mollusque bivalve pélecypode suspensivore et filtreur peuplant principalement les zones intertidales des régions tempérées et vivant enfoui dans le sédiment (Roseberry et al., 1991). C'est une espèce gonochorique qui possède un cycle de reproduction comprenant une période de ponte en juillet et, occasionnellement, une autre période de ponte en automne, selon la disponibilité en nutriments et la température du milieu (Etchian et al., 2004). La fécondation est externe et se fait après la libération des gamètes mâles et femelles dans le milieu environnant. Six stades de maturation ont été observés pour les mâles et les femelles. Les stades indifférent, ponte et passé sont communs aux deux sexes. Au contraire, les stades pré-vitellogénique, vitellogénique et post-vitellogénique sont seulement retrouvés chez les femelles. Les stades de développement d1 et d2 et mûr sont spécifiques aux mâles (Gauthier-Clerc et al., 2002; Siah et al., 2002).



Plusieurs études ont été menées sur cet organisme mais, afin de permettre sa production commerciale à grande échelle, il est nécessaire de mieux connaître les mécanismes neurophysiologiques et endocriniens qui contrôlent tous ses processus physiologiques tels que la reproduction.

### 1.1. Système nerveux endocrinien et cellules neuro-sécrétrices (CNS)

Chez les bivalves, il existe un système nerveux comprenant 3 paires de ganglions joints par des connectifs. Ces ganglions sont les ganglions cérébraux, les ganglions viscéraux et les ganglions pédieux. Ils contiennent des cellules neuro-sécrétrices (CNS) mises en évidence premièrement chez quelques espèces de Lamellibranches par Gabe, en 1955, puis étudiées par différents auteurs tels que Lubet en 1955, 1959 et 1960. Ces cellules ont la particularité de recevoir et de traiter les signaux nerveux qu'elles transmettent ensuite chimiquement grâce à l'élaboration, au transport et à la libération des neuroamines régulant ensuite les changements physiologiques d'organes cibles tels que les gonades. Les CNS sont localisées dans la zone corticale de tous les ganglions, mais plus particulièrement dans la zone corticale antéro-dorsale des ganglions cérébraux et dans le cortex dorsal des ganglions viscéraux et pédieux. Quatre types de CNS (a1 retrouvées en majorité, a2, a3 et a4) de taille et de forme variées ont été distingués dans les ganglions nerveux de *Mytilus edulis* (Gabe, 1955; Lubet, 1959; Illanes-Bücher, 1979). Le ganglion cérébral contient 75% de ces CNS (Illanes-Bücher et Lubet, 1980).

Mathieu, 1991, a montré que le nombre de ces CNS (entre 1500 et 4000) varie en fonction du stade du cycle neuro-sécrétoire. De plus, des recherches ont mis en évidence que les étapes des cycles gamétogénique et neuro-sécrétoires annuels chez les Mytilidés étaient étroitement liées. En effet, le nombre des CNS de type a1 des ganglions cérébraux augmente pendant la phase de reconstitution de la gonade et pendant la gamétogénèse, puis

chute brutalement juste avant la multiplication des spermatogonies et des ovogonies (Illanes-Bücher et Lubet, 1980). De plus, le matériel sécrétoire accumulé dans les CNS pendant la gamétogenèse est évacué lorsque les gamètes deviennent entièrement matures (Lubet, 1955 et 1959).

La nature de ces sécrétions est de deux types : aminergique (catécholamines et indol-amines) et peptidergique (Lubet et Mathieu, 1990). Les cellules aminergiques sont présentes dans tous les types de ganglions et, parmi les indol-amines, la sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT), a été mise en évidence pour la première fois par Welsh et Moorhead en 1960 chez les invertébrés, de même que la dopamine (DA) appartenant aux catécholamines. Au contraire, la noradrénaline (NA), aussi appelée norepinephrine, a été découverte pour la première fois par Cottrell en 1967 chez les Échinodermes, les mollusques et les crustacés.

## 1.2. Les catécholamines: dopamine et noradrénaline

### 1.2.1. Synthèses, dosages et localisations de la dopamine et de la noradrénaline chez les mollusques bivalves

La dopamine est le premier membre de la famille des catécholamines apparaissant dans la voie de leur biosynthèse. Elle est synthétisée à partir de la tyrosine (Tyr) dans les neurones catécholaminergiques et son hydroxylation par la dopamine- $\beta$ -hydroxylase conduit à la formation de la noradrénaline. Lacoste et al., 2001a, ont également mis en évidence leur synthèse par des cellules chromaffines du cœur chez *C. gigas*.

Ces catécholamines ont été dosées, principalement grâce à des techniques de chromatographie en phase liquide à haute-performance (HPLC), dans le système nerveux et dans les tissus périphériques de nombreux mollusques bivalves (Tableau 1.1). Cependant, leur localisation précise dans le système nerveux et dans les tissus périphériques des bivalves se limite aux résultats apportés par quelques études portant sur *Anodonta piscinalis*, *Mytilus edulis*, *Patinopecten yessoensis*, *Placopecten magellanicus* et *Sphaerium sulcatum* (Dahl et al., 1966; Sweeney, 1968; Stefano et Aiello, 1975; Matsutani et Nomura, 1984; Smith et al., 1998) et localisant simultanément la dopamine et la noradrénaline. Les études de Dahl et al., 1966, Stefano et Aiello, 1975, et Matsutani et Nomura, 1984, révèlent des neurones catécholaminergiques dispersés et une abondance de fibres nerveuses dans les neuropiles de tous les ganglions centraux de *A. piscinalis*, *M. edulis* et *P. yessoensis* alors

que les travaux de Sweeney, 1968, indiquent la présence de neurones catécholaminergiques seulement dans les ganglions viscéraux et cérébraux de *S. sulcatum*. Les résultats de Smith et al., 1998, démontrent également la présence de catécholamines dans les corps cellulaires et les fibres de tous les ganglions centraux mais ils montrent également leur présence dans les neurones et/ ou dans les fibres périphériques de nombreux tissus tels que les palpes labiaux, les lèvres, les intestins, les branchies, le pied, le manteau, les tentacules et le tégument gonadique de *P. magellanicus*.

## **1.2.2. Implications de la dopamine et de la noradrénaline dans diverses fonctions physiologiques**

### **1.2.2.1. Rôle des catécholamines dans la reproduction**

Tout d'abord, les catécholamines ont été dosées dans le système nerveux et dans les gonades de nombreux bivalves (Tableau 1.1) et des neurones et des fibres catécholaminergiques ont été détectés dans le tégument gonadique chez des bivalves tels que *P. yessoensis* et *P. magellanicus* (Matsutani et Nomura, 1986a; Smith et al., 1998). De plus, Khotimchenko et Deridovich, 1989, ont mis en évidence des structures ressemblant à des récepteurs et sensibles à la dopamine dans les gonades de *Mizuhopecten yessoensis*.

Ultérieurement, plusieurs études ont démontré une corrélation entre les variations saisonnières des concentrations des catécholamines et le cycle reproducteur chez plusieurs

**Tableau 1.1** Dosage des catécholamines (DA et NA) chez les bivalves.

Légende : D : espèce dulcicole, M : espèce marine, GC : ganglions cérébraux, GV : ganglions viscéraux, GP : ganglions pédieux, SN : ensemble des ganglions. “~” indique des valeurs déterminées visuellement sur les graphiques des articles cités.

Espèces	Type	Auteurs	Techniques	Tissus	Concentrations Dopamine (DA)	Concentrations Noradrénaline (NA)
<i>Aequipecten irradians</i>	M	Sweeney, 1963	Fluorométrie	Ganglions	74µg/g	-
				GC	11,6µg/g	-
<i>Anodonta piscinalis</i>	M	Dahl et al., 1966	Spectrofluorométrie	GV	19,2µg/g	-
				GP	47,1µg/g	-
				Palpes labiaux	1,5±0,23nmol/mg de protéines	-
<i>Clinocardium nuttallii</i>	M	Smith, 1982	HPLC	Branchies	1,4±0,38nmol/mg de protéines	-
				GC	0,42±0,07nmol/paire de ganglion	-
				GV	0,48±0,03nmol/paire de ganglion	-
				Gonade	972,99± 638,95ng/g	306,67± 114,40ng/g
<i>Crassostrea gigas</i>	M	Osada et al., 1987	HPLC	Branchies	3187,37± 986,50ng/g	3137± 103,95ng/g
				Branchies	1,1 (Août)-1,8µg/g (Janvier) ~	100 (Juin)-220ng/g (Octobre) ~
		Osada et Nomura, 1989	HPLC	Gonade	0 (Juin) -150ng/g (Janvier) ~	0 (Juin) -200ng/g (Janvier) ~
				Lacoste et al., 2001a	HPLC	Hémolymphe
<i>Ensis directus</i>	M	Sweeney, 1963	Fluorométrie	Ganglions	37 µg/g	-
				Branchies	443±87ng/g	54±8ng/g
<i>Ligumia subrostrata</i>	D	Dietz et al., 1992	HPLC	Suprabranchial nerve	1,051ng/g	11ng/g
				Hémolymphe	2,32±0,22ng/g	2,44±0,50ng/g

**Tableau 1.1** Dosage des catécholamines (DA et NA) chez les bivalves (suite).

Espèces	Type	Auteurs	Techniques	Tissus	Concentrations Dopamine (DA)	Concentrations Noradrénaline (NA)
<i>Macoma nasuta</i>	M	Smith, 1982	HPLC	Palpes labiaux	0,56±0,09nmol/mg de protéines	-
				Branchies	0,07±0,04nmol/mg de protéines	-
				GC	0,12±0,01nmol/paire de ganglion	-
				GV	0,21±0,04nmol/paire de ganglion	-
<i>Mercenaria mercenaria</i>	M	Sweeney, 1963	Fluorométrie	Ganglions	261 µg/g	-
<i>Modiolus demissus</i>	M	Malanga et al., 1972	Fluorométrie	Branchies	0,417 µg/g	0,030 µg/g
<i>Modiolus modiolus</i>	M	Sweeney, 1963	Fluorométrie	Ganglions	85 µg/g	-
		Malanga et al., 1972	Fluorométrie	Branchies	0,307 µg/g	0,032 µg/g
<i>Mya arenaria</i>	M	Sweeney, 1963	Fluorométrie	Ganglions	96 µg/g	-
<i>Mytilus californianus</i>	M	Smith, 1982	HPLC	Palpes labiaux	0,74±0,16nmol/mg de protéines	-
				Branchies	0,06±0,01nmol/mg de protéines	-
				GC	0,06±0,02nmol/paire de ganglion	-
				GP	0,6±0,01nmol/paire de ganglion	-
		GV	0,69±0,04nmol/paire de ganglion	-		
		Smith, 1987	HPLC	GC	24,7± 3,4 pmol/ paire de ganglion	-
				GP	31,7± 2,7 pmol/ paire de ganglion	-
GV	83,4± 1,1 pmol/ paire de ganglion	-				

**Tableau 1.1** Dosage des catécholamines (DA et NA) chez les bivalves (suite).

Espèces	Type	Auteurs	Techniques	Tissus	Concentrations Dopamine (DA)	Concentrations Noradrénaline (NA)
<i>Mytilus edulis</i>	M	Sweeney, 1963	Fluorométrie	Ganglions	35 µg/g	-
		Malanga et al., 1972	Fluorométrie	Branchies	0,419 µg/g	0,029 µg/g
		Stefano et al., 1977	Spectrofluorométrie	SN (GP, GC et GV)	37,25± 0,6µg/g (Août) - 15,55± 0,52 µg/g (Décembre)	3,57± 0,52µg/g (Août) -2,10± 0,11 µg/g (Décembre)
				SN (GP, GC, GV)	De 14,8±1,2 à 36,3± 0,8µg/gm de poids sec	1,4± 0,1 µg/gm de poids sec
		Stefano et Catapane, 1980	Détection radioenzymatique	SN (GP, GC, GV)	-	1,51± 0,14 µg/gm de poids sec
				GC	-	0,93± 0,1µg/gm de poids sec
				GV	-	1,58± 0,16µg/gm de poids sec
				GP	-	1,79± 0,14µg/gm de poids sec
		Smith, 1982	HPLC	Palpes labiaux	0,53±0,15nmol/mg de protéines	-
				Branchies	0,11±0,03nmol/mg de protéines	-
GC	0,03±0,003nmol/paire de ganglion			-		
GP	0,03±0,003nmol/paire de ganglion			-		
Osada et al., 1987	HPLC	Branchies	3108,58ng/g	23,64ng/g		
<i>Patinopecten yessoensis</i>	M	Osada et al., 1987	HPLC	Gonade	404,86± 28,49ng/g	26,71± 4,29ng/g
				Branchies	6014,74±1030,68 ng/g	755,38±124,91 ng/g
				GV	58591,84 ng/g	9580,55 ng/g
				GC et GP	9648,53ng/g	163,67ng/g



**Tableau 1.1** Dosage des catécholamines (DA et NA) chez les bivalves (suite).

Espèces	Type	Auteurs	Techniques	Tissus	Concentrations Dopamine (DA)	Concentrations Noradrénaline (NA)
<i>Pecten maximus</i>	M	Paulet et al., 1993	HPLC	GC et GP	De 360ng/ganglions (Juin) à 130ng/ganglions (Janvier) ~	De 120ng/ganglions (Décembre) à 40ng/ganglions (Janvier) ~
				GV	De 480ng/ganglions (Novembre) à 150ng/ganglions (Janvier) ~	80ng/ganglions ~
<i>Placopecten magellanicus</i>	M	Pani et Croll, 1995	HPLC	SN	1400pg/mg ~	1000pg/mg ~
				Pied	550 pg/mg ~	250 pg/mg ~
				Branchies	500 pg/mg ~	500 pg/mg ~
				Gonade	400 pg/mg ~	550 pg/mg ~
				Manteau	300 pg/mg ~	250 pg/mg ~
				Muscle	450 pg/mg ~	250 pg/mg ~
				Coeur	850 pg/mg ~	750 pg/mg ~
				Reins	500 pg/mg ~	350 pg/mg ~
<i>Sphaerium sulcatum</i>	D	Sweeney, 1968	Fluorométrie	Animal entier	5,2±1,6ng/animal	3,5±1,2ng/animal
<i>Spisula solidissima</i>	M	Sweeney, 1963	Fluorométrie	Ganglions	26 µg/g	-
				Palpes labiaux	15,2±2,9nmol/mg de protéines	-
				Branchies	4,2±0,27nmol/mg de protéines	-
<i>Tresus capax</i>	M	Smith, 1982	HPLC	GC	0,39±0,08nmol/paire de ganglion	-
				GP	1,06±0,11nmol/paire de ganglion	-
				GV	1,4±0,07nmol/paire de ganglion	-

mollusques bivalves. Martinez et Rivera, 1994, ont montré, chez *Argopecten irradians*, que la concentration en catécholamines est élevée à la fin de la gamétogenèse dans le système nerveux, et que, dans la gonade mâle, les concentrations les plus fortes sont observées en début de gamétogenèse pour la dopamine et en fin de gamétogenèse pour la noradrénaline. Osada et al., 1987, ont montré que les niveaux de dopamine dans la gonade diminuent lors de la ponte chez *P. yessoensis*. De même, Osada et Nomura, 1989, ont montré, chez *C. gigas*, que les concentrations en catécholamines sont plus faibles pendant la période de ponte en été et qu'elles augmentent juste après la ponte et cela jusqu'à l'hiver. Martinez et al., 1996a, ont montré que les concentrations de dopamine et de noradrénaline diminuent dans les ganglions viscéraux et augmentent dans les gonades pendant la période de ponte d'*Argopecten purpuratus*.

Certaines études ont également mis en évidence des liens directs entre les concentrations en catécholamines et le cycle reproductif des bivalves. Fong et al., 1993, ont montré que la dopamine retarde significativement la ponte chez *D. polymorpha* et Martinez et al., 1996b, qu'elle inhibe la ponte chez *A. purpuratus*. Paulet et al., 1993, ont également montré qu'il existe une corrélation entre le contenu en dopamine des ganglions viscéraux et la croissance gonadique chez *P. maximus* et Martinez et al., 2000, ont montré que la dopamine ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$ M) diminue la libération des oocytes chez *A. purpuratus*. Enfin, Khotimchenko, 1991, a confirmé la présence de dopamine dans les ovocytes matures de *M. yessoensis*.

Ces études démontrent donc un rôle potentiel des catécholamines dans les processus de reproduction des mollusques bivalves.

#### **1.2.2.2. Rôle des catécholamines dans la respiration et l'alimentation**

La dopamine a été dosée dans les branchies des mollusques bivalves (Tableau 1.1) et Stefano et Aiello, 1975, ont montré que des fibres dopaminergiques innervent les branchies de *M. edulis*. Des études ont décelé que la dopamine ainsi que les agents dopaminergiques inhibent l'activité ciliaire latérale des branchies et donc le débit de filtration de *M. edulis* (Paparo et Aiello, 1970; Stefano et al., 1977; Paparo 1988; Jones et Richards, 1993) alors que Malanga, 1974, 1975, a montré que la dopamine stimule le taux de transport des particules par les cils frontaux chez la même espèce. De plus, Beiras et Widdow, 1995, ont découvert que la dopamine et la noradrénaline inhibent la prise de nourriture par les larves de *M. edulis* se nourrissant grâce aux battements opposés des bandes de cils pré-orales et post-orales se trouvant sur le velum.

#### **1.2.2.3. Rôle des catécholamines dans la régulation cardiaque**

Il a été montré par Greenberg en 1960 que l'application de catécholamines sur des cœurs de *Venus mercenaria* cause leur excitation.

#### **1.2.2.4. Rôle des catécholamines dans le développement larvaire, la métamorphose et l'établissement des larves**

La dopamine et la noradrénaline ont été quantifiées par HPLC en phase larvaire chez différents mollusques bivalves tels que *P. maximus* (Cann-Moisan et al., 2002). Coon et al., 1985, ont montré que le précurseur des catécholamines, la L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) induit à la fois l'établissement des larves de *C. gigas* et leur métamorphose alors que la noradrénaline n'induit que leur métamorphose. De plus, Beiras et Widdows, 1995, ont montré chez la même espèce que la noradrénaline est plus efficace dans l'induction de la métamorphose que la dopamine. Bonar et al., 1990, ont mis en évidence que, parmi les catécholamines, la NA est la plus importante dans le contrôle de la métamorphose des larves d'huîtres alors que le comportement d'établissement des larves semble plutôt suivre la voie dopaminergique.

Cann-Moisan et al., 2002, ont montré que les teneurs en noradrénaline fluctuent peu pendant toute la phase larvaire de *Pecten maximus* alors que les teneurs en dopamine fluctuent entre les phases larvaire, pré-métamorphique et post-larvaire. En effet, pendant la phase larvaire, la teneur en dopamine augmente progressivement puis elle augmente fortement pendant la phase pré-métamorphique, et enfin, elle chute pendant la phase post-larvaire.

#### **1.2.2.5. Rôle des catécholamines dans la contraction du pied des bivalves**

De la dopamine et de la noradrénaline ont été quantifiées (Tableau 1.1) et localisées dans les ganglions pédieux de nombreux mollusques bivalves (Smith et al., 1998). De plus, il a été montré que l'application de dopamine ou de noradrénaline sur les ganglions ou le pied de *M. edulis* cause sa contraction (Aiello et al., 1981).

#### **1.2.2.6. Rôle des catécholamines dans la réponse au stress**

Lacoste et al., 2001a, 2001b, ont montré que *C. gigas* possède une forme de réponse neuroendocrine face au stress puisque la noradrénaline et la dopamine sont relâchées dans l'hémolymphe lors d'un stress. Ils ont également trouvé que la noradrénaline module certaines fonctions immunitaires telles que la production d'espèces oxygénées réactives (Lacoste et al., 2001c) et déclenche l'apoptose des hémocytes et/ ou régule la transcription des gènes codant pour les protéines de stress (hsp 70) (Lacoste et al., 2001d, 2002). De plus, la sécrétion de noradrénaline module la résistance des organismes aux pathogènes (Lacoste et al., 2001e).

### **1.2.3. Effets opposés de la sérotonine et de la dopamine dans les différents processus physiologiques des bivalves**

Des études ont montré que les concentrations de sérotonine sont inversement reliées aux concentrations de dopamine (Stefano et al., 1976 et Smith, 1987). De plus, Martinez et al., 1996a, montrent que les concentrations de dopamine et de noradrénaline varient de façon inverse pendant le cycle de reproduction des bivalves aux concentrations de sérotonine. Il a donc été suggéré que ces deux monoamines inhibent la production de l'autre monoamine.

Plusieurs études ont reporté que le ganglion cérébral de *S. sulcatum*, *M. edulis*, *A. piscinalis* et *P. yessoensis* contient à la fois des neurones catécholaminergiques et sérotoninergique (Dahl et al., 1966; Sweeney, 1968; Stefano et Aiello, 1975 et Matsutani et Nomura, 1984) que le ganglion viscéral de *S. sulcatum* contient principalement des neurones catécholaminergiques (Sweeney, 1968) ou que celui de *M. edulis*, *A. piscinalis* et *P. yessoensis* contient les deux types de neurones (Dahl et al., 1966; Stefano et Aiello, 1975 et Matsutani et Nomura, 1984) et que le ganglion pédieux de *A. piscinalis*, *S. sulcatum*, *M. edulis* et *P. yessoensis* possède à la fois des neurones catécholaminergiques et sérotoninergique (Dahl et al., 1966; Matsutani et Nomura, 1984; De Biasi et al., 1984) ou seulement des neurones sérotoninergiques (Sweeney, 1968). Matsutani et Nomura, 1984, ont cependant mis en évidence que le ganglion cérébral de *P. yessoensis* contient plus de

neurones sérotoninergiques que le ganglion viscéral qui lui possède un plus grand nombre de neurones catécholaminergiques que le ganglion cérébral.

Dans plusieurs études portant sur les bivalves, il a été découvert que la sérotonine et la dopamine ont des effets opposés sur différents processus physiologiques. En effet, Fong et al., 1993 ont découvert que la ponte chez *D. polymorpha* est retardée et que son intensité est réduite suite à l'application de dopamine seule ou couplée avec de la sérotonine, par rapport à une application seule de sérotonine. En ce qui concerne le mouvement du pied chez *M. edulis*, Aiello et al., 1981, ont montré que la sérotonine cause son extension alors que la dopamine cause sa contraction et Beiras et Widdows, 1995, ont observé que la sérotonine augmente la prise de nourriture des larves de *M. edulis* alors que la dopamine l'inhibe.

Dans de nombreuses études, les catécholamines ont été localisées dans les tissus centraux et périphériques de mollusques bivalves. Cependant, afin de pouvoir faire des liens entre leur distribution et leurs rôles et de pouvoir comparer leur distribution avec d'autres monoamines telles que la sérotonine, il est nécessaire de localiser NA et DA de façon spécifique.

### 1.3. La sérotonine

#### 1.3.1. Localisation et variations saisonnières chez les mollusques bivalves

La sérotonine, synthétisée à partir du L-tryptophane (Trp), a été largement retrouvée dans le système nerveux des bivalves. En effet, de nombreuses fibres sérotoninergiques ont été trouvées dans tous les ganglions de *Mytilus galloprovincialis* (De Biasi et Vitellaro-Zuccarello, 1987; Vitellaro-Zuccarello et al., 1991), *Pecten maximus*, qui est hermaphrodite, et *P. yessoensis* (Matsutani et Nomura, 1984; Paulet et al., 1993; Croll et al., 1995). Dans ces ganglions, Paulet et al., 1993, ont montré chez *P. maximus* que la concentration de 5-HT est soumise à des variations saisonnières. En effet, pendant l'hiver, période où a lieu la croissance gonadique, les concentrations de sérotonine diminuent de façon significative dans les ganglions cérébral et pédial et de façon plus faible dans le ganglion viscéral.

La sérotonine se retrouve également dans les gonades de nombreux bivalves. En effet, il a été montré, chez plusieurs espèces, une riche innervation des gonoductes, de l'épithélium germinal et des acini par des fibres enrichies en 5-HT (Matsutani et Nomura, 1984; Ram et al., 1992; Paulet et al., 1993; Martinez et al., 1996a; Siniscalchi et al., 2004). Chez *M. arenaria*, Garnerot et al., 2006, ont également montré la présence de fibres sérotoninergiques autour des follicules germinaux et dans les fibres musculaires de l'épithélium externe des gonades. Cependant, les neurones centraux et les nerfs



périphériques responsables de cette innervation des gonades n'ont pu être clairement identifiés dans aucune étude. Il est, en effet, difficile de retracer les fibres sérotoninergiques jusqu'aux corps cellulaires originaux (Matsutani et Nomura, 1984). Mais, il a été suggéré que la 5-HT serait transportée par les axones des CNS jusqu'aux gonades (Matsutani et Nomura, 1986b; Ram et al., 1992; Croll et al., 1995; Garnerot et al., 2006).

Dans les gonades, comme dans les ganglions, des variations de la concentration en sérotonine mais aussi des modifications de l'innervation par les fibres sérotoninergiques ont été mises en évidence pendant les phases du cycle gamétogénique de *Spisula solidissima* (Masseau et al., 2002). En effet, au stade 2 (phase mature), un nombre plus restreint de fibres sérotoninergiques, qu'au stade 1 (phase active), couvre la surface des acini et, de façon simultanée, la concentration en 5-HT dans la gonade à ce stade 2 est significativement plus faible qu'au stade 1. Ensuite, lorsque la ponte débute (stade 3) et que la masse totale des gonades diminue, un réseau de fibres plus important est observé autour de l'épithélium germinal des acini et la concentration en 5-HT augmente par rapport au stade 2.

### **1.3.2. Implications de la sérotonine dans la reproduction des mollusques bivalves**

La méiose est un processus se déroulant durant la gamétogenèse. Elle consiste en deux cycles de séparation chromosomique permettant de produire des gamètes haploïdes à partir de précurseurs diploïdes (Whitaker, 1996). La maturation méiotique pour les espèces

de mollusques est caractérisée par deux types de processus comprenant ou non un second arrêt à la première métaphase méiotique après une activation initiale des ovocytes bloqués en prophase I de la méiose (Colas et Dubé, 1998). Les ovocytes de la classe I sont arrêtés à la première prophase méiotique. Ils sont relâchés au stade de vésicule germinale et la fécondation est directement responsable de la réinitiation de la méiose, comme chez *S. solidissima* (Allen, 1953), ré initiation se manifestant par la dissolution de la vésicule germinale (GVBD). Au contraire, les ovocytes de la classe II, arrêtés en prophase I de la méiose, subissent la GVBD après stimulation, hormonale ou autre, et sont secondairement arrêtés en métaphase I jusqu'à leur fécondation permettant aux autres stades de maturation de prendre place (Colas et Dubé, 1998), comme chez *C. gigas* (Osanai, 1985).

De nombreuses recherches ont montré que la 5-HT stimule les processus de ponte de nombreux mollusques bivalves (Gibbons et Castagna, 1984; Hirai et al., 1988; Ram et al., 1993; Fong et al., 1994; O'Connor et Heasman, 1995; Alvarado-Alvarez, 1996; Fong, 1998). Elle a également été reconnue comme réinitiant la maturation méiotique d'ovocytes de classe I et II bloqués en prophase I de la méiose chez certains bivalves in vitro et in vivo, qu'ils soient gonochoriques ou hermaphrodites, tels que *A. purpuratus* (Martinez et al., 2000), *C. gigas* (Osanai, 1985; Osanai et Kuraishi, 1988; Kyosuka et al., 1997; Leclerc et al., 2000), *D. polymorpha* (Fong et al., 1994; Ram et al., 1992), *Hiatella flaccida* (Togo et al., 1993; Deguchi et Osanai, 1995), *Ruditapes decussatus* (Hamida et al., 2004), *Ruditapes philipinarum* (Osanai et Kuraishi, 1988; Guerrier et al., 1993; Gobet et al., 1994; Leclerc et al., 2000), *S. solidissima* (Hirai et al., 1988; Kadam et Koide, 1989; Krantic et al., 1993),

*Spisula sachalinensis* (Hirai et al., 1988; Varaksin et al., 1992) et *Tivela stultorum* (Alvarado-Alvarez et al., 1996) (Tableau 1.2). Cette induction de la GVBD par la 5-HT implique la présence de sites récepteurs, sur la membrane des oocytes, sur lesquels cette hormone pourrait se fixer de façon spécifique. Pendant la dernière décennie, 7 familles distinctes de récepteurs à la sérotonine (5-HT<sub>1</sub>–5-HT<sub>7</sub>) ont été identifiées et des sous populations ont été décrites pour nombre d'entre elles (Glennon et al., 2000). Tierney, 2001, indique que pour les mollusques, 5 gènes codants pour des récepteurs à 5-HT ont déjà été clonés (appartenant aux deux classes 5-HT<sub>1like</sub> et 5-HT<sub>2like</sub>). Chez *P. yessoensis*, deux types de récepteurs ont été identifiés (5-HT<sub>2</sub> et 5-HT<sub>1</sub> en excluant 5-HT<sub>1A</sub>) et chez *C. gigas* un seul type a été trouvé, le 5-HT<sub>1</sub>.

Étant donné que la sérotonine est détectée dans le système nerveux de nombreux bivalves et qu'elle induit la GVBD chez de nombreuses espèces, il a été émis l'hypothèse que c'est un inducteur naturel de la maturation ovocytaire. Cependant, Fong et al., 1996 et Osanai et Kuraishi, 1988, ont montré chez *Macra chinensis* et *M. edulis*, respectivement, que la 5-HT n'induit pas la maturation ovocytaire in vitro. De plus, les concentrations effectives de 5-HT ainsi que les temps d'action permettant la GVBD diffèrent d'une espèce à l'autre, malgré la mise en place du même protocole d'expérimentation par les auteurs. Par exemple, chez *T. stultorum*, il a été trouvé que la concentration de 5-HT la plus efficace permettant la GVBD est de 10<sup>-7</sup> M (Alvarado-Alvarez et al., 1996) alors que pour *S. solidissima*, ce sont des concentrations en 5-HT de 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-5</sup> M. qui sont les plus efficaces dans le déclenchement de la GVBD (Hirai et al., 1988).

**Tableau 1.2** Induction de la GVBD chez les mollusques bivalves par la sérotonine.

Légende : I : Oocytes de la première classe possédant un niveau de  $Ca^{2+}$  de  $635 \pm 82 nM$  au repos, II : Ovocytes de la seconde classe possédant un niveau de  $Ca^{2+}$  de  $480 \pm 31 nM$  (Guerrier et al., 1993), III : Oocytes de type intermédiaire pouvant être fécondés en prophase I et métaphase II, H : hermaphrodite, G : gonochorique, M : espèce marine, D : espèce dulcicole. “~” indique des valeurs déterminées visuellement sur les graphiques des articles cités.

Espèces	Caractéristiques des espèces	Auteurs	Induction significative de la GVBD par 5-HT	Concentrations efficace de 5-HT pour la GVBD	Temps (minutes)	Pourcentages de GVBD	Expérimentations
<i>Argopecten purpuratus</i>	H D II	Martinez et al., 2000	oui	$10^{-6}M$	20	~ 30%	In vitro sur morceaux de gonades
		Osanai, 1985	oui	$10^{-6}M$	20	100%	In vitro sur oocytes
<i>Crassostrea gigas</i>	H M III	Osanai et Kuraishi, 1988	oui	$10^{-5}M$	158-170	50%	In vitro sur oocytes
		Kyosuka et al., 1997	oui	$10^{-4}M-10^{-6}M$	60	~ 90%	In vitro sur oocytes
		Leclerc et al., 2000	oui	$10^{-6}M$	45	~ 95%	In vitro sur oocytes
<i>Dreissena polymorpha</i>	G D I	Fong et al., 1994 et Ram et al., 1996	oui	$10^{-4}M$	50	80%	In vitro sur morceaux de gonades
			oui	$10^{-3}M$	40-50	100%	In vivo avec individus exposés à la 5-HT
<i>Hiatella flaccida</i>	G M II	Deguchi et Osanai, 1995	oui en prophase I et métaphase I	$10^{-4}M-10^{-6}M$	30-45	100%	In vitro sur oocytes
<i>Mactra chinensis</i>	G M II	Fong et al., 1996	non	$10^{-3}M-10^{-7}M$	30-40	Pas significativement induit par 5-HT	In vitro sur oocytes
<i>Mytilus edulis</i>	G M II	Osanai et Kuraishi, 1988	non	$10^{-5}M-10^{-4}M$	170	Pas significativement induit par 5-HT	In vitro sur oocytes
<i>Ruditapes decussatus</i>	G M II	Hamida et al., 2004	oui	$20 \cdot 10^{-6}M$	90	67%	In vitro sur oocytes

**Tableau 1.2** Induction de la GVBD chez les mollusques bivalves par la sérotonine.

Espèces	Caractéristiques des espèces	Auteurs	Induction significative de la GVBD par 5-HT	Concentrations efficace de 5-HT pour la GVBD	Temps (minutes)	Pourcentages de GVBD	Expérimentations
<i>Ruditapes philippinarum</i>	G M II	Osanai et Kuraishi, 1988	oui	$10^{-5}$ M	100	100% à 21°C 40% à 18°C	In vitro sur oocytes
		Guerrier et al., 1993	oui	$10^{-6}$ M	60	90-100%	In vitro sur oocytes de 1ère classe et de 2 <sup>nd</sup> classe
		Gobet et al., 1994	oui	$10^{-6}$ M	60	≤ 30%	
		Leclerc et al., 2000	oui	$10^{-6}$ M	12	~ 95%	In vitro sur oocytes
<i>Spisula solidissima</i>	G M II	Hirai et al., 1988	oui	$2.10^{-5}$ M	?	100%	In vitro sur oocytes
		Kadam et Koide, 1989	oui	$5.10^{-6}$ M	30-45	95-100%	In vitro sur oocytes
		Krantic et al., 1993	oui	$10^{-5}$ M	30	~100%	In vitro sur oocytes
<i>Spisula sachalinensis</i>	G M II	Hirai et al., 1988	oui	$20.10^{-6}$ M	?	100%	In vitro sur oocytes
		Varaksin et al., 1992	oui	$10^{-4}$ M- $10^{-5}$ M $10^{-6}$ M	60	90% 80%	In vitro sur oocytes
<i>Tivela stultorum</i>	G M I	Alvarado-Alvarez et al., 1996	oui	$10^{-5}$ M- $10^{-7}$ M	?	~ 90-95%	In vitro sur oocytes

Les concentrations et les temps d'action efficaces de la 5-HT permettant le déclenchement de la GVBD ne sont pas les mêmes selon les espèces et, chez certaines espèces, la 5-HT n'induit pas la GVBD. La sérotonine va-t-elle déclencher la GVBD des ovocytes de *M. arenaria*? Si oui, quels vont être ses concentrations et ses temps d'action optimaux?

Chez les bivalves, les neuroamines telles que la sérotonine ne contrôlent pas à elles seules la reproduction. En réalité, il apparaîtrait que ce sont des régulations croisées entre elles et les hormones stéroïdiennes des gonades qui permettent ce contrôle du cycle reproductif

#### **1.4. Les hormones stéroïdiennes**

##### **1.4.1. Mise en évidence de la stéroïdogénèse chez les mollusques bivalves**

La stéroïdogénèse chez les bivalves a pu être mise en évidence premièrement par la découverte de différents types d'enzymes impliquées dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, telles que la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD) chez *C. gigas* (Mori et al., 1965a) ou encore la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD) chez *C. gigas* et *M. edulis* (Mori et al., 1965b; De Longcamp et al., 1970). Puis, les présences de 17 $\beta$ -oestradiol (E2), de testostérone (T) et de progestérone (P), qui sont les hormones stéroïdiennes retrouvées chez les vertébrés, synthétisées à partir d'un précurseur: le

cholestérol, ont été rapportées dans les gonades chez de nombreux bivalves. Chez *M. edulis*, de la progestérone (Reis-Henriques et Coimbra, 1990), de la  $17\beta$ -oestradiol (De Longcamp et al., 1974; Zhu et al., 2003) et de la testostérone (De Longcamp et al., 1974) ont été retrouvées dans les gonades. Siah et al., 2002, 2003 et Gauthier-Clerc et al., 2006, ont également rapporté la présence de ces stéroïdes (P, T et E2) dans les gonades de *Mya arenaria*. Les gonades et l'hépatopancréas apparaissent être les principaux organes où sont synthétisées ces hormones stéroïdiennes (De Longcamp et al., 1974).

#### **1.4.2. Variations de la concentration et implications des hormones stéroïdiennes dans la reproduction chez les mollusques**

Les concentrations en  $17\beta$ -oestradiol, testostérone et progestérone dans les gonades ainsi que les activités enzymatiques de la stéroïdogénèse semblent être sujettes à des variations. En effet, en ce qui concerne les enzymes stéroïdogéniques, Matsumoto et al., 1997, ont mis en évidence, chez *C. gigas*, une augmentation de l'activité de la  $17\beta$ -HSD pendant la gamétogenèse, à la fois chez les mâles et les femelles. Reis-Henriques et Coimbra, 1990, ont montré, chez *M. edulis*, que les niveaux de progestérone dans l'organisme entier, mais aussi dans les gonades sont maximaux en été pendant la période de ponte et sont similaires chez les deux sexes. Cela suggèrerait alors que la progestérone est un modulateur du cycle de reproduction. De plus, De Longcamp et al., 1974, ont noté que les concentrations de testostérone augmentent énormément pendant les derniers stades de la gamétogenèse chez *M. edulis* et Matsumoto et al., 1997, ont décrit que la concentration en

E2 augmente lors de la maturation et diminue après la ponte de *P. yessoensis* et de *C. gigas*. Chez *M. arenaria*, l'étude de Siah et al., 2002, montre qu'il existe un lien entre le cycle de reproduction et les variations des niveaux de progestérone. En effet, une augmentation de la concentration en progestérone a été observée pendant la phase mature des mâles et pendant la phase de ponte des femelles. De plus, Gauthier-Clerc et al., 2006, ont mis en évidence, également chez *M. arenaria*, l'existence d'un profil saisonnier similaire des concentrations des stéroïdes T et E2 chez les deux sexes. En effet, la concentration de ces stéroïdes tend à augmenter pour les deux sexes durant le cycle gamétogénique. Cela tendrait donc à montrer que les hormones stéroïdiennes ont un rôle dans la reproduction des mollusques bivalves.

Bien que le rôle de ces hormones stéroïdiennes soit encore débattu chez les invertébrés, des études ont mis en évidence des rôles potentiels de ces hormones dans la reproduction des mollusques bivalves, en ce qui concerne la vitellogenèse, la libération des gamètes, la maturation sexuelle, l'inversion du sexe et la gamétogenèse. Pour ce qui est de la vitellogenèse, il a été montré que la  $17\beta$ -oestradiol est un des principaux facteurs contrôlant chez *C. gigas* (Li et al., 1998) et qu'elle induit la synthèse de protéines vitellines retrouvées dans l'hémolymphe de *M. arenaria* (Blaise et al., 1999). Ensuite, en ce qui concerne la libération des gamètes, il a été montré chez *P. magellanicus*, que la  $17\beta$ -oestradiol, la progestérone et la testostérone l'induisent in vitro chez les deux sexes (Wang et Croll, 2003), qu'une injection de  $17\beta$ -oestradiol induit la ponte in vivo chez les deux sexes et que la testostérone induit la ponte seulement chez les mâles (Wang et Croll, 2006).



Puis, en ce qui a trait à la maturation sexuelle et à l'inversion des sexes, Wang et Croll, 2004, ont mis en évidence que ces trois hormones stéroïdiennes accélèrent la différenciation gonadique et modifient le sexe-ratio vers les mâles chez *P. magellanicus*. De plus, Mori et al., 1966, ont montré que des injections de  $17\beta$ -oestradiol induisent une inversion des sexes chez *C. gigas* et, en 1969, Mori a montré qu'une injection de  $17\beta$ -oestradiol accélère la maturation sexuelle chez les femelles. Enfin, l'injection des stéroïdes dans la gonade stimule la croissance des ovocytes au début et pendant toute la gamétogenèse (Varaksina et Varaksin, 1992) et stimule aussi la spermatogenèse de *Mizuhopecten yessoensis* (Varaksina et al., 1993). Chez *P. magellanicus*, la  $17\beta$ -oestradiol stimule la croissance des ovocytes alors que la testostérone apparaît induire leur dégénérescence (Wang et Croll, 2004). Chez les Pulmonés, la testostérone stimule la spermatogenèse et inhibe l'oogenèse alors que la  $17\beta$ -oestradiol a des effets contraires et que la progestérone stimule les deux gamétogenèses (De Longcamp et al., 1974). Ces actions ne sont possibles qu'en présence de récepteurs hormonaux, qui semblent avoir été découverts chez *Elliptio complanata* dans des homogénats de gonade (Gagné et al., 2001). De même, chez *P. magellanicus*, des expériences in vitro et in vivo suggèrent l'existence de récepteurs spécifiques aux oestrogènes dans les gonades chez les deux sexes (Wang, 2000) et chez *P. yessoensis*, Osada et al., 2003, semblent avoir également mis en évidence des récepteurs œstrogéniques, mais dans les ovocytes en développement et dans leurs cellules auxiliaires.

### 1.4.3. Interactions entre la sérotonine et les stéroïdes

Il a été montré que la  $17\beta$ -oestradiol accélère la libération des ovocytes induite par la sérotonine in vitro chez *P. yessoensis* et que des pré-traitements avec de l'aspirine et de l'actinomycine D (inhibiteur de la synthèse d'ARNm) inhibent cet effet (Osada et al., 1992). Cela indique que E2 peut affecter indirectement la libération des ovocytes induite par la 5-HT en accélérant la synthèse des prostaglandines dans les gonades et/ou directement en induisant la formation de récepteurs membranaires sérotoninergiques sur les ovocytes. Osada et al., 1998, ont montré qu'il existe une augmentation de la concentration des récepteurs à la 5-HT sur la membrane des ovocytes de morceaux de gonade traités avec E2 et que la diminution de la concentration en actinomycine D est synchronisée avec le profil de libération des ovocytes induite par la 5-HT. Cela suggère que l'action de la  $17\beta$ -oestradiol a plus probablement lieu via un mécanisme génomique et qu'elle induit la formation de récepteurs grâce à la synthèse d'ARNm dans les ovocytes, cela contribuant à augmenter la sensibilité de la ponte et de la GVBD à la 5-HT. Wang et Croll, 2003, ont montré, chez *P. magellanicus*, que la  $17\beta$ -oestradiol et la progestérone potentialisent la libération des gamètes induite par la 5-HT in vitro alors que la testostérone n'a d'effet que chez les mâles. Ces mêmes résultats ont été trouvés in vivo chez la même espèce, mis à part le fait que la progestérone ne potentialise la libération des gamètes que chez les mâles (Wang et Croll, 2006). Ils ont également montré que l'effet de ces stéroïdes peut être bloqué par des inhibiteurs de la synthèse de protéines et d'ARN, indiquant un mécanisme d'action génomique tel qu'indiqué par Osada et al., 1998.

Qu'en est-il pour la GVBD des ovocytes? Est-ce que, comme pour la ponte (Wang et Croll, 2003; Wang et Croll, 2006), les hormones stéroïdiennes vont potentialiser les effets de la sérotonine permettant le déclenchement de la GVBD des ovocytes chez *M. arenaria*?

Chez *M. arenaria*, la ponte permet la libération des gamètes mâles et femelles dans le milieu externe où ont lieu la fécondation et le développement embryonnaire. Cette stratégie de reproduction requiert donc des adaptations permettant la rencontre des gamètes mâles et femelles. La mobilité des spermatozoïdes est alors un facteur critique dans la rencontre des deux types de gamètes.

## 1.5. Endurance et performance des spermatozoïdes

### 1.5.1. Type de spermatozoïde chez les bivalves

Les spermatozoïdes chez *M. arenaria*, comme chez tous les bivalves, sont dits primitifs parce qu'ils sont caractéristiques des organismes qui libèrent leurs spermatozoïdes directement dans le milieu externe et parce que leur forme morphologique est simple, adaptée à la nage permettant la recherche des ovocytes. En effet, un spermatozoïde primitif est une petite cellule possédant trois régions: une tête, un axonème et un flagelle simple long d'environ 50µm (Franzen, 1956 et 1987). Leur tête est courte, ovoïde avec un noyau et un acrosome. L'axonème, qui est la partie motrice principale du flagelle, est court. Il ne possède que quelques mitochondries, 4 ou 5, arrangées en cercle à la base du noyau (Franzen, 1987), et il est formé d'un complexe de microtubules (9+ 2) partant du centriole situé également à la base du noyau. Rouse et Jamieson, 1987, préfèrent utiliser le terme "ect-aquasperme", en référence à la fécondation externe dans l'eau, plutôt que les termes "spermatozoïde primitif". En effet, seul le type de fécondation est caractérisé dans ce premier terme, aucune connotation phylogénétique liée au mode de fécondation n'est suggérée. Ces deux termes sont cependant retrouvés dans la littérature.

### **1.5.2. Initiation de la mobilité des spermatozoïdes chez les invertébrés aquatiques et métabolisme énergétique**

Les spermatozoïdes des oursins, formés dans les gonades, se trouvent dans un fluide séminal où la forte tension du CO<sub>2</sub> conduit à un pH inférieur à 7,5, inhibant leur mobilité et leur respiration (Christen et al., 1982). Cette quiescence leur permet de préserver leurs réserves énergétiques et de diminuer les risques d'altération de leurs membranes, de leurs structures internes et de leurs composés biochimiques. Ils restent dans cette phase jusqu'à leur libération et donc leur dilution dans le milieu externe où ils deviennent mobiles et où leur métabolisme devient fortement actif (Hamamah et Gatti, 1998). Les spermatozoïdes primitifs matures ne possédant ni ADN actif, ni matrice d'ARN, ni cytoplasme, sont libérés dans un milieu aqueux ne possédant aucun nutriment métabolisable. Leur capacité de biosynthèse est donc limitée. Néanmoins, ils ont la capacité de satisfaire aux demandes énergétiques pour leur métabolisme et leur motilité pendant un certain temps, grâce à des substrats endogènes tels que le glycogène, des systèmes enzymatiques ...etc. localisés dans leurs compartiments mitochondriaux et axonémaux (Anderson et Personne, 1976).

L'énergie nécessaire pour le battement des flagelles provient de l'hydrolyse de l'ATP par la dynéine ATPase de l'axonème, celle-ci devenant active après l'augmentation du pH faisant suite à la libération des spermatozoïdes dans un milieu où la tension du CO<sub>2</sub>

diminue (Christen et al., 1982). Il y a alors un équilibre entre la synthèse d'ATP par les mitochondries et son hydrolyse par les dynéines ATPases.

### **1.5.3. Différences de mobilité des spermatozoïdes entre les espèces**

Les spermatozoïdes peuvent être caractérisés, entre autre, par leur faible durée de vie qui varie d'une espèce à l'autre. Chez les Salmonidés, par exemple, les spermatozoïdes possèdent une courte période de mobilité. En effet, celle-ci ainsi que leur capacité de fécondation devient nulle après seulement quelques minutes (Scott et Baynes, 1980). Cosson et al., 1985, ont également montré que les battements des flagelles chez les spermatozoïdes de la truite diminuent régulièrement et de façon homogène pendant les 30 premières secondes d'activité puis, les 5 à 15% des spermatozoïdes encore mobiles après ces 30 secondes restent encore mobiles pendant une minute mais avec un battement flagellaire très faible. Au contraire, chez l'oursin, les spermatozoïdes peuvent rester mobiles encore plusieurs heures après leur activation (Christen et al., 1986). Cette différence entre la durée de vie des spermatozoïdes des Salmonidés et celle des oursins provient de leur différent type de reproduction; les oursins relâchent aléatoirement leurs gamètes dans le milieu environnant alors que les Salmonidés les relâchent sur les œufs au niveau de sites de ponte. Chez les oursins, il est donc nécessaire que la période de mobilité des spermatozoïdes soit assez longue afin d'augmenter les chances de rencontre des gamètes mâles et femelles.

Chez une espèce de mollusque bivalve telle que *M. arenaria*, où la mobilité des spermatozoïdes est un facteur critique dans la rencontre des deux types de gamètes, comme chez les oursins, la fécondation serait compromise si les spermatozoïdes possédaient une période de mobilité aussi courte que les spermatozoïdes des Salmonidés. D'après Lahnsteiner et al., 1996, les spermatozoïdes mobiles peuvent être définis par leur comportement de nage linéaire, non-linéaire ou circulaire et la vitesse des spermatozoïdes est un facteur clé permettant l'évaluation de leur mobilité. Quelles sont donc l'endurance et la performance (vitesse et linéarité) des spermatozoïdes de *M. arenaria* tout au long de leur période de mobilité?

#### **1.5.4. Relations entre le métabolisme énergétique des spermatozoïdes, leur mobilité et la température du milieu externe**

Perchec et al., 1995, ont montré, chez les spermatozoïdes de la carpe, que les niveaux d'ATP diminuent fortement pendant la phase de mobilité à 20°C mais à 2°C, ces taux d'ATP diminuent plus lentement, la différence de concentration en ATP étant significative entre les deux températures au bout de 5 minutes. De plus, ces spermatozoïdes ont une période de mobilité plus courte à 20°C, qui est leur température de ponte, qu'à 2°C. Cependant, leur vitesse et la fréquence des battements flagellaires sont plus élevées à 20°C. Cosson et al., 1985, ont également montré que la fréquence initiale des battements des flagelles des spermatozoïdes de la truite dépend de la température. En effet, à 20°C, la

fréquence des battements est maximale puis diminue avec une augmentation ou une diminution de la température.

Est-ce que la température influe également sur l'endurance, la performance et la diminution du taux d'ATP des spermatozoïdes d'un mollusque bivalve tel que *M. arenaria*? Les spermatozoïdes de *M. arenaria* possèdent-ils une thermo sensibilité?

La vitesse des spermatozoïdes, leur mobilité et la concentration en ATP diminuent de façon parallèle chez le crapet arlequin, *Lepomis macrochirus*, pendant les premières 60 secondes suivant leur activation. Cependant, aucune relation entre les changements de niveau d'ATP des spermatozoïdes et les changements dans leur pourcentage de mobilité et leur vitesse de nage n'a pu être mise en évidence. Cela tend alors à indiquer que les niveaux d'ATP ne sont pas corrélés à la vitesse de nage et au pourcentage de mobilité des spermatozoïdes chez *L. macrochirus* (Burness et al., 2005). Au contraire, chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, Lahnsteiner et al., 1998, ont trouvé une corrélation entre le taux de mobilité des spermatozoïdes et le niveau d'ATP.

L'endurance et la nage rapide requièrent de l'énergie, cependant, les résultats trouvés chez différentes espèces ne vont pas dans le même sens puisque chez certaines, il existe une corrélation entre les niveaux d'ATP et les taux de mobilité alors que chez d'autres espèces cette corrélation n'existe pas. Et chez un mollusque bivalve tel que *M. arenaria*, existe-t-il une corrélation entre les niveaux d'ATP et la mobilité des



spermatozoïdes (endurance et performance)? Si oui, va-t-elle dans le même sens que ce qui a déjà été trouvé auparavant chez d'autres espèces?

#### **1.5.5. Sérotonine et mobilité des spermatozoïdes**

Étant donné que la sérotonine induit la ponte et la maturation ovocytaire chez *S. solidissima*, Kadam et Koide, 1990, ont fait des tests afin de savoir si elle affecte la mobilité des spermatozoïdes. Leurs expériences ont montré que la 5-HT stimule la mobilité des spermatozoïdes immobilisés par le froid. De plus, Parisi et al., 1984, ont montré, chez *Paracentratus lividus*, qu'un antagoniste de la 5-HT, le metergoline, diminue la mobilité des spermatozoïdes et que de la sérotonine en association avec du metergoline contrebalance cette inhibition. Bandivdekar et al., 1992, ont mis en évidence chez *S. solidissima* des récepteurs à la 5-HT qui semblent faire partie des récepteurs de type 5-HT<sub>3</sub>. Cependant, chez d'autres espèces, telles que *D. polymorpha*, 5-HT n'a aucun effet sur la mobilité des spermatozoïdes (Mojares et al., 1995).

Comme les quelques expériences menées sur le sujet ne donnent pas les mêmes résultats, il serait intéressant de savoir si, chez *M. arenaria*, la sérotonine va ou non influencer d'une manière quelconque la mobilité (endurance et performance) des spermatozoïdes.

## PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

Tout d'abord, un grand nombre d'études ont démontré la présence et les concentrations de catécholamines dans les tissus de nombreux mollusques bivalves et ont montré leur implication dans divers processus physiologiques. Par contre, peu d'études portent sur leur localisation précise et aucune étude n'a localisé séparément la dopamine et la noradrénaline dans les ganglions des mollusques bivalves. Il est donc nécessaire de faire des études complémentaires afin de localiser les catécholamines dans les différents ganglions de *M. arenaria*, où de la dopamine a été trouvée et dosée par Sweeney en 1963, et de localiser avec précision et séparément la noradrénaline et la dopamine, cela afin de pouvoir faire des comparaisons avec la distribution dans les ganglions d'autres monoamines telles que la 5-HT et de faire des liens entre leur distribution et leurs différentes fonctions physiologiques.

Le premier objectif de cette étude vise donc à mettre en place un protocole utilisant la technique de l'immunohistochimie qui permettra ensuite pour la première fois de localiser avec précision et séparément les cellules et les fibres immunoréactives à la dopamine et à la noradrénaline dans les trois ganglions de *M. arenaria* et de faire des comparaisons avec la distribution de 5-HT dans ces mêmes ganglions.

Ensuite, les concentrations et les temps d'action efficaces de la 5-HT permettant le déclenchement de la GVBD ne sont pas les mêmes selon les espèces. Il est donc nécessaire

de voir chez *M. arenaria* si la 5-HT joue un rôle dans la GVBD des ovocytes et, si c'est le cas, quels sont, pour elle, les concentrations et les temps d'action optimaux, cela afin de développer de meilleures techniques de reproduction qui pourront être utilisées en aquaculture.

Le deuxième objectif de l'étude vise donc à mettre en place un protocole qui permettra de voir si la sérotonine influence la GVBD des oocytes chez *M. arenaria* et de déterminer les concentrations de sérotonine et les temps d'incubation optimaux permettant le déclenchement de la GVBD des ovocytes.

Puis, étant donné que les relations croisées entre les hormones stéroïdiennes et la sérotonine sont encore mal connues, l'expérience sur la GVBD permettra d'approfondir ce sujet à des fins d'amélioration des techniques de reproduction pour l'aquaculture mais aussi afin de mieux comprendre l'impact des perturbateurs endocriniens naturels. En effet, il est désormais reconnu que les perturbateurs endocriniens sont au moins partiellement responsables de modifications dans la reproduction et dans le développement des invertébrés et des vertébrés aquatiques (Vos et al., 2000). Cependant, il existe encore de très grosses lacunes en ce qui a trait à la compréhension de leurs mécanismes d'action et il est difficile de prouver que les modifications perçues au niveau de la reproduction proviennent bien de ces perturbateurs endocriniens.

Le troisième objectif de cette étude vise alors à analyser l'influence de prétraitements stéroïdiens (P, T et E2) sur les effets de la sérotonine à différentes concentrations sur la GVBD des oocytes.

Enfin, aucune étude n'a encore été menée sur l'endurance et la performance des spermatozoïdes chez un mollusque bivalve. Il serait donc particulièrement intéressant de faire cette étude chez *M. arenaria* possédant une technique de reproduction où tout dépend de la possibilité de rencontre des gamètes mâles et femelles libérés aléatoirement dans le milieu. Il serait également très intéressant de mesurer l'endurance et la performance des spermatozoïdes sous différentes conditions de température et avec ou sans sérotonine. En effet, très peu d'études ont porté sur l'action de la 5-HT sur la mobilité des spermatozoïdes et aucune étude n'a porté sur l'influence de la température sur la mobilité des spermatozoïdes d'un bivalve. Il existe également de nombreuses lacunes chez les mollusques bivalves en ce qui concerne le métabolisme des spermatozoïdes. Des analyses de leurs niveaux d'ATP seraient alors très intéressantes pendant toute leur phase de mobilité afin de voir si il existe une corrélation entre ces deux paramètres.

Le quatrième et dernier objectif de l'étude vise alors à analyser la mobilité des spermatozoïdes sous différentes conditions. En effet, les modifications de mobilité des spermatozoïdes suite à l'addition de sérotonine dans leur milieu, leur mobilité pendant 42h à des températures de 15°C et de 22°C et leur niveau d'ATP tout au long de l'expérience avec ou sans sérotonine et selon différentes conditions de température, vont être analysés.

L'une de ces températures est la température retrouvée naturellement dans le milieu pendant les périodes de libération des spermatozoïdes et l'autre température est une température supérieure à celle-ci, retrouvée ponctuellement et en de rares occasions pendant la période de ponte.

Initialement, ces deux derniers objectifs devaient faire partie l'étude. Cependant, suite à la difficulté d'obtenir des stades homogènes post-vitellogénique chez les femelles et matur chez les mâles, seuls les protocoles correspondant à ces objectifs ont pu être mis en place.

**CHAPITRE 2 : DOPAMINE AND NORADRENALIN-LIKE  
IMMUNOREACTIVITIES IN THE GANGLIA OF THE  
SOFT-SHELL CLAM, *MYA ARENARIA***

**SÉVERINE LOUIS, FLORENT GARNEROT, AND JOCELYNE PELLERIN**

Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 allée  
des Ursulines, Rimouski, Que., Canada G5L 3A1

<sup>1</sup>Key words: Mollusca, Bivalvia, catecholamines, ganglia

---

## ABSTRACT

Catecholamines (CA) and especially dopamine (DA) and noradrenalin (NA) have several neurotransmitter and hormonal functions in invertebrates and vertebrates. Many studies have found CA in the nervous system of bivalves but no studies so far have precisely localized DA and NA-immunoreactive cells and fibres in the ganglia of bivalves. Therefore, for the first time, immunohistochemistry was used to map the specific distribution of DA and NA-immunoreactive cells and fibres in the three pairs of ganglia of the soft-shell clam *Mya arenaria* and to give detailed descriptions of their morphology. NA-immunoreactivities were principally found in the pedal ganglia whereas DA-immunoreactivities were principally localized in the visceral and pedal ganglia. These DA-immunoreactive cells were distributed in the whole cortex of the visceral ganglia where they showed different sizes and morphologies (without processes cells, pear-shaped unipolar and multipolar cells). Therefore, they could be either projecting cells or local circuit cells with different physiological functions in the visceral ganglion. DA-immunoreactive cells were also detected in the whole cortex at the posterior face of the pedal ganglia as NA-immunoreactive cells. DA-immunoreactive fibres were detected in all nerves of the visceral ganglia, in the cerebrovisceral connectives of the visceral and cerebral ganglia and in the pedal nerve of the pedal ganglia. These findings indicate a possible implication of dopamine in peripheral neurotransmission for activities as foot contraction, respiration and nutrition and a net flow of dopamine from the visceral ganglion to the cerebral ganglia.

## 2.1. Introduction

Catecholamines (CA), dopamine (DA) and noradrenalin (NA), have been measured, mainly using high performance chromatography (HPLC), in the nervous system and in peripheral tissues of some bivalve molluscs such as *Clinocardium nuttallii*, *Macoma nasuta*, *Mytilus californianus*, *Mytilus edulis*, *Tresus capax*, *Ligumia subrostrata*, *Patinopecten yessoensis*, *Pecten maximus*, *Placopecten magellanicus*, and *Crassostrea gigas* (Smith, 1982; Dietz et al., 1985; Osada et al., 1987; Osada and Nomura, 1989; Paulet et al., 1993; Pani and Croll, 1995; Lacoste et al., 2001a) but also using fluorometry in *Mya arenaria* ganglia (Sweeney, 1963). Moreover, DA and NA were localized in the nervous system and in the peripheral tissues of *Anodonta piscinalis*, *Patinopecten yessoensis* and *Placopecten magellanicus* using histochemical fluorescence techniques (Dahl et al., 1966; Matsutani and Nomura, 1984; Smith et al., 1998). These authors localized CA in the cortex and in the neuropil of all major ganglia of the three species and Smith et al. (1998) also localized CA in peripheral nerve cells and/or fibres in other tissues such as labial palps, lip, intestine, gill filaments, foot, mantle, tentacles and gonad integument of *Placopecten magellanicus*.

Pharmacological and physiological studies have shown that CA plays essential roles in several physiological processes including reproduction, respiration, feeding, cardiac regulation, development, foot contraction and stress response. Indeed, Osada et al. (1987), Osada and Nomura (1989), Martinez and Rivera (1994) and Martinez et al. (1996a)



observed a correlation between seasonal catecholamines concentrations and reproductive activity of *P. yessoensis* and *Argopecten purpuratus*. While Fong et al. (1993) showed that DA application delayed spawning in *Dreissena polymorpha*, Martinez et al. (1996b) showed that DA required the presence of prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) to induce the release of oocytes in *Argopecten purpuratus*. Paparo and Aiello (1970), Paparo (1988) and Jones and Richards (1993) showed that DA reduced lateral ciliary activity of gills thus reducing filtration flow in *M. edulis*. Greenberg (1960) found that DA and NA excited isolated hearts of *Venus mercenaria* and Aiello et al. (1981) that NA and DA application in the foot and ganglia of *M. edulis*, caused foot contraction. NA appeared to be the most important catecholamine for *C. gigas* and *Crassostrea virginica* larvae metamorphosis, whereas a dopaminergic pathway controls settlement behaviour (Bonar et al., 1990). Lacoste et al. (2001a, 2001b, 2001c) found that NA and DA were released into the hemolymph of *C. gigas* in response to stress and that NA was able to induce hemocyte apoptosis and to modulate hemocyte reactive oxygen species and hemocyte phagocytosis.

These pharmacological, physiological and histological studies suggest therefore that these biogenic amines, DA and NA act via two ways, as neurohormones and/or as neurotransmitters or neuromodulators.

All the studies having localized CA in nervous bivalve system have also localized NA and DA. Therefore, the specific distribution of DA and NA-nerve cells and fibres is important to understand in the ganglia of bivalve molluscs. This catecholaminergic

distribution will be ultimately useful to understand the dopaminergic and noradrenalinergic roles in bivalve molluscs' nervous system, to compare with the distribution of other biogenic amines in ganglia, and to understand the interactions between these biogenic amines.

Our purpose in this study was to localize DA and NA-immunoreactive cells and fibres in the three pairs of ganglia of the soft-shell clam, *M. arenaria*.

## **2.2. Materials and methods**

### **2.2.1. Animals, dissections, paraffin embedding and sectioning**

Clams (55 to 65 mm) were collected at low tide in 2006 during summer at Metis Beach, Quebec, Canada (48°40' N, 68°00'W) and brought back to the experimental laboratory located in ISMER's Station Aquicole (Institut des Sciences de la Mer), Pointe-au-Père, Quebec, Canada. They were placed in aquaria with a continuous seawater flow of 30-45 L per hour.

The pedal, visceral and cerebral ganglia of bivalves (n= 20) were dissected under a binocular microscope and immediately placed in a gluteraldehyde based fixation solution (Chemicon) for 15 minutes at 36°C (gluteraldehyde 5% (1206 Mecalab), cacodylate 100 nM (C-0250 Sigma) and sodium meta-bisulfite 1% (S-1516 Sigma), pH= 7.3). After dehydration, the tissues were embedded in paraffin according to standard methods and serial cuts were done at 3 µm using a Zeiss microtome.

### **2.2.2. Immunohistochemical procedures**

Paraffin-embedded sections were deparaffinised by two incubations of 10 minutes each in xylene followed by an incubation of 30 minutes in a mix of methanol with 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidases. After this procedure, the slides were

rehydrated by 5 minutes washes in ethanol with different concentrations (two washes in ethanol 100%, one in ethanol 95% and one in ethanol 70%), 5 minutes in distilled water and twice 5 minutes in Tris buffer 1 (6,06 g Tris, 8,78 g NaCl, 2,5 g gelatin, 5 mL Triton X100, pH 7.4).

Anti-dopamine and anti-noradrenaline antibodies from Chemicon were raised in rabbit against dopamine or noradrenalin conjugated to bovine serum albumin (BSA) with glutaraldehyde (AB 1202 and AB 122S, Chemicon). They were used at a dilution of 1:600 in Tris buffer 1.

These primary antibodies were applied to the rehydrated sections on slides placed for 18 hours in a humid chamber at 4°C. After two washings in Tris buffer 1 for 5 minutes, the slides were incubated at ambient temperature for 3 hours with a secondary antiserum, an Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat (A9169 Sigma) diluted at 1:100 in Tris buffer 2 (6,06 g Tris, 8,78 g NaCl, pH= 7.4). Following three buffer rinses in Tris buffer 2, the peroxidase was revealed by incubating sections in a solution of diaminobenzidine (DAB) (30 mg/100 mL) and hydrogen peroxide (100 µL/100 mL) in Tris buffer 2 for 10 minutes. The slides were rinsed three times for 5 min in Tris buffer 2, dehydrated by incubation for 5 min in ethanol 70%, 5 min in ethanol 95% and quickly immersed in a light green counterstaining solution (0.2%). This light green counterstaining was used to make visible the tissue around the DA and NA-immunoreactive cells coloured in brown by the peroxidase/ DAB reaction. The stained slides were rinsed

twice for 5 min in 100% ethanol. After dehydration, sections were immersed twice for 10 minutes in xylene, mounted with Cytoseal (VWR Scientific) and cover-slipped.

### **2.2.3. Negative and positive controls**

To visualise the non-specific labelling, negative controls were performed using the same immunohistochemistry protocol but without the primary antibody. All the slides were compared with their negative controls. Brightness and contrast of some photographs were adjusted for better resolution of immunoreactive-cells and nerve fibres.

The specificity of the two primary antibodies was also tested by preadsorption controls (positive controls) on 5 serial sections with identified dopaminergic and noradrenalinergic-immunoreactive cells. The sections with identified dopaminergic-immunoreactive cells were incubated with rabbit anti-dopamine polyclonal antibody diluted at 1:600 and previously preadsorbed with a dopamine-glutaraldehyde conjugate (1000 µg/1 mL antiserum) and the sections with identified noradrenalinergic-immunoreactive cells were incubated with rabbit anti-noradrenalin polyclonal antibody diluted at 1:600 and previously preadsorbed with a noradrenalin-glutaraldehyde conjugate (1000 µg/1 mL antiserum) (Dopamine hydrochloride (H8502 Sigma) and L-noradrenalin hydrochloride (74480 Biochemika)). No labelling was observed in the positive controls whereas the section treated without the preadsorbed antibodies were intensely labelled in dopaminergic

and noradrenalinergic nerve cells. This experiment confirmed therefore the specificity of the two primary antibodies.

#### **2.2.4. Data analysis**

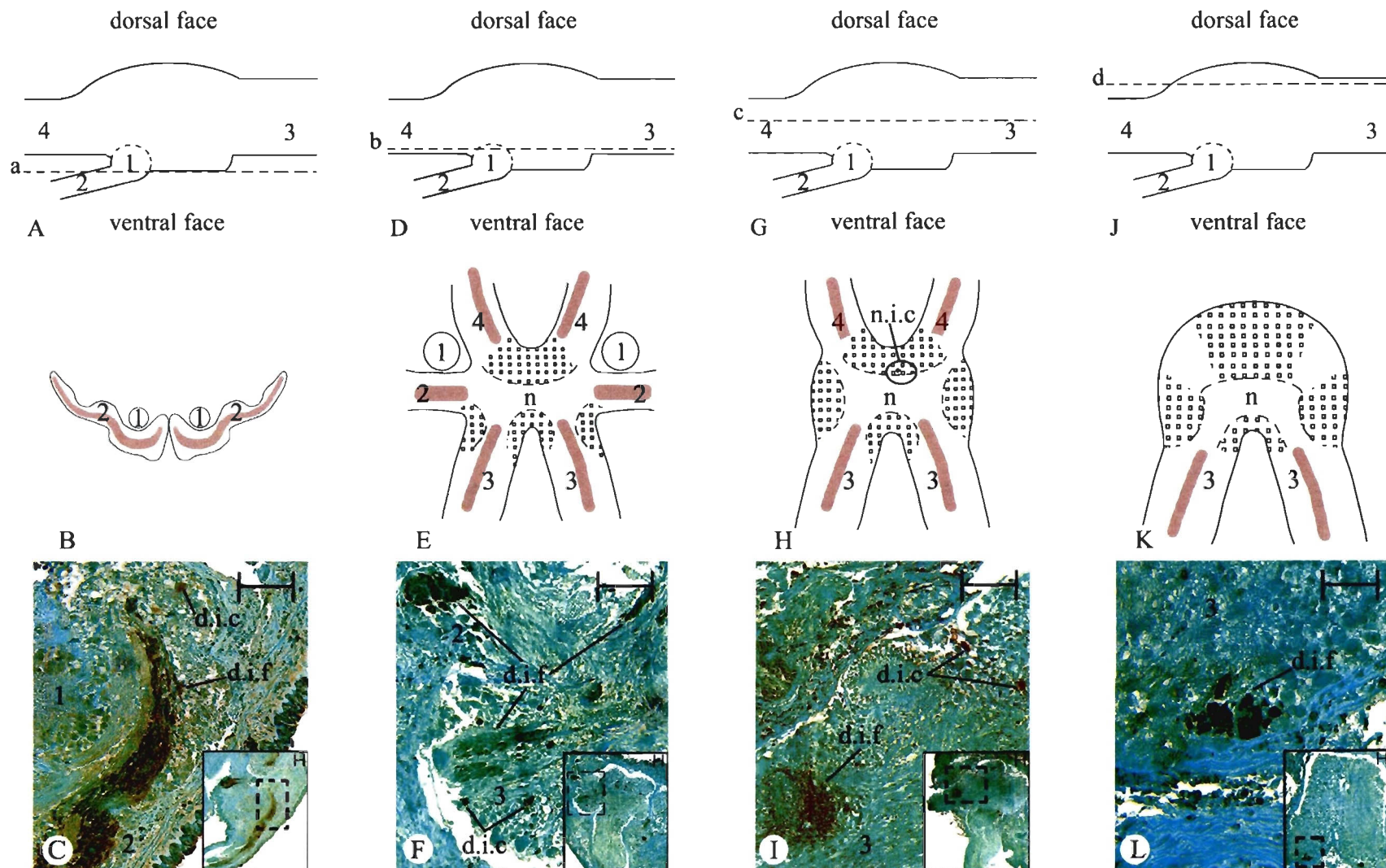
The stained slides with serial sections were observed with an Olympus BX41 light microscope at 200x and 400x enlargements. The images were captured by an Evolution VF camera using Image-Pro Plus 5.0.2 software. This software was used to measure mean diameters and areas of labelled cells.

## 2.3. Results

In the study, we performed serial cuts in the three pairs of ganglion. This procedure was used to map the distribution of NA and DA-immunoreactive cells and fibres from the ventral to the dorsal face of the visceral and cerebral ganglia and from the anterior to the posterior face of the pedal ganglion.

### 2.3.1. Distribution of dopamine and noradrenalin-immunoreactive cells in the visceral ganglion of *M. arenaria*

Figure 2.1. shows the distribution of DA-immunoreactive cells (DIC) and fibres (DIF) and NA-immunoreactive cells (NIC) in four cutting levels ranging from the ventral face to the dorsal face of VG. The cutting line 'a' is localized at the ventral face of VG and cuts the inferior part of the glomeruli and the branchial nerves (Fig. 2.1.A). At this ventral level 'a', large intensely stained dopamine fibres tracts were localized in the branchial nerves (Fig. 2.1.B-C). The cutting line 'b' is localized at the ventral face of VG and cuts the superior part of the glomeruli and all the nerves emerging from the ganglion: the cerebrovisceral connectives, the branchial nerves and the siphons and posterior pallear nerves (Fig. 2.1.D). At this ventral level 'b', DIC were found in the whole cortex of VG and DIF were observed in the three pairs of nerves emerging from VG (Fig. 2.1.E-F). The cutting line 'c' is localized in the middle part of VG and cuts the cerebrovisceral connectives and the siphons and posterior pallear nerves (Fig. 2.1.G). At this level 'c', DIC



**Figure 2.1** Dopamine and noradrenalin-like immunoreactivity in the visceral ganglion of *Mya arenaria*.



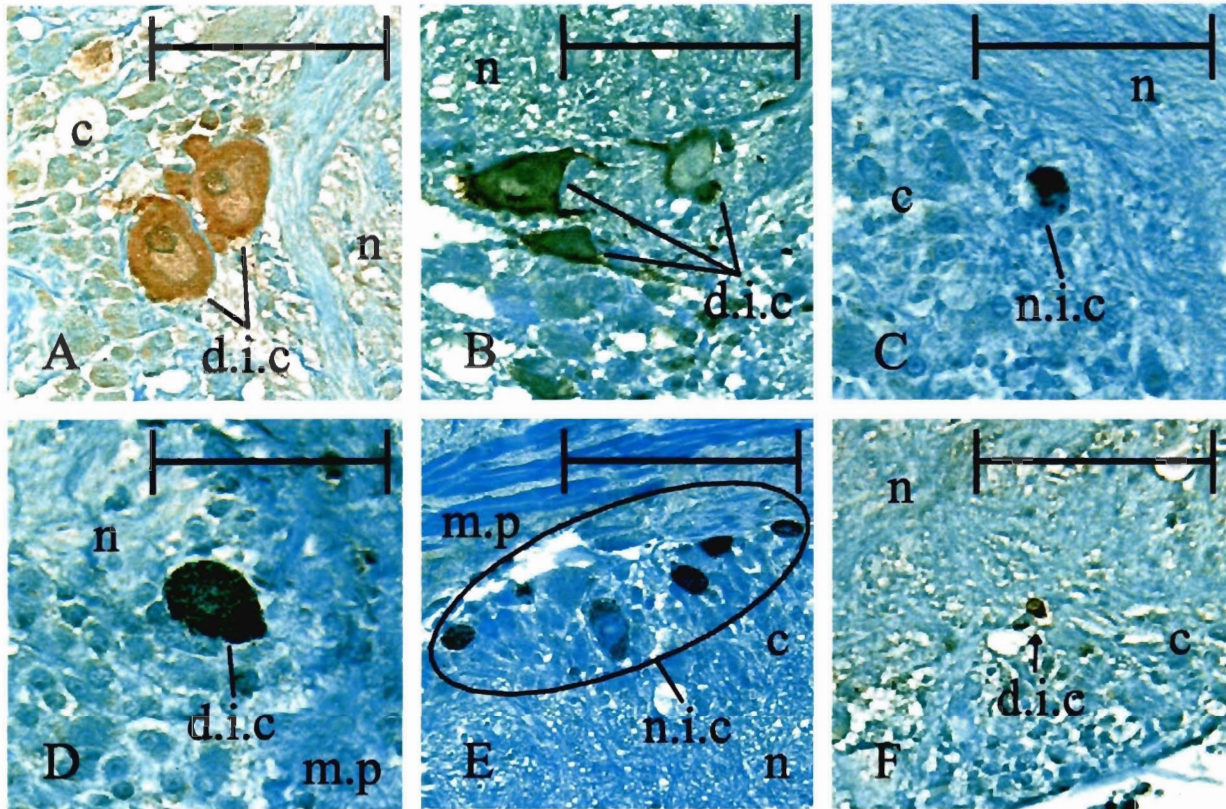
**Legend: Figure 2.1.** Dopamine and noradrenalin-like immunoreactivity in the visceral ganglion of *Mya arenaria*. **A.** Schematic side view of VG. The cutting line 'a' is localized at the ventral face of the ganglion, at the inferior part of the glomeruli (dotted line= cutting line 'a'), (1= glomerulus, 2= branchial nerve, 3= cerebrovisceral connective, 4= siphon and posterior palleal nerve). This legend is similar for all views of the figure 2.1. **B.** Schematic sagittal view of VG showing the general distribution of d.i.f in the branchial nerves at the cutting line 'a' observed in the figure 2.1.A. (gray color= d.i.f). This legend is similar for all views of the figure 2.1. **C.** Detailed enlargement of the small insert representing one dopamine immunohistochemistry stained section of the whole visceral ganglion at the cutting line 'a' (square with dotted lines on the dopamine immunohistochemistry stained section of the whole visceral ganglion refers to the detailed enlargement). This legend is similar for all views of the figure 2.1. **D.** Schematic side view of VG showing the cutting line 'b' localized at the ventral face of the ganglion, at the superior part of the glomeruli (dotted line= cutting line 'b'). **E.** Schematic sagittal view of VG at the cutting line 'b' observed in the figure 2.1.D. This view shows the general distribution of d.i.c in the whole visceral ganglion and dopamine-immunoreactive fibres in all the nerves emerging from VG, at the cutting line 'b'. **F.** Detailed enlargement of the small insert representing one dopamine immunohistochemistry stained section of the whole VG at the cutting line 'b'. **G.** Schematic side view of VG showing the cutting line 'c' localized in the middle of the ganglion (dotted line= cutting line 'c'). **H.** Schematic sagittal view of VG at the cutting line 'c' observed in the figure 2.1.G. This view shows the general distribution of d.i.c in the whole visceral ganglion and d.i.f in all the nerves emerging from the visceral ganglion at

the cutting line 'c'. **I.** Detailed enlargement of the small insert representing one dopamine immunohistochemistry stained section of the whole visceral ganglion at the cutting line 'c'. **J.** Schematic side view of VG showing the cutting line 'd' localized at the dorsal face of the ganglion (dotted line= cutting line 'd'). **K.** Schematic sagittal view of VG at the cutting line 'd' observed in the figure 2.1.J. This view shows the general distribution of d.i.c in the whole visceral ganglion and d.i.f in the cerebrovisceral connectives. **L.** Detailed enlargement of the small insert representing one dopamine immunohistochemistry stained section of the whole visceral ganglion at the cutting line 'd'. Scale bars= 100  $\mu$ m. Paraffin sections were prepared at 3  $\mu$ m thick. Brown staining of dopamine and noradrenalin-immunoreactive cells and fibres with diaminobenzidine (DAB) followed by a light green counterstaining. Enlargement 200x.

were present in the whole cortex and intensely DA fibres tracts were observed in the two pairs of nerves emerging from VG (Fig. 2.1.H-I). One NIC was also localized at the posterior face of the ganglion, between the siphons and posterior palpeal nerves (Fig. 2.1.H). The cutting line 'd' is localized at the dorsal face of VG and cuts the cerebrovisceral connectives (Fig. 2.1.J). At this dorsal level 'd', DIC were distributed in the whole cortex and DIF were localized in the cerebrovisceral connectives emerging from VG (Fig. 2.1.K-L).

Immunoreactivities for dopamine were prevalently distributed in the whole cortex of the visceral ganglion from the ventral face to the dorsal face but a few of small cells were also found in the central core. The dopamine-immunoreactive cells were more abundant in the ventral face, at the cutting line 'b' where 75% of cells in all ganglia observed (n= 20) were found.

DIC can be grouped in three size groups: the group 1 composed of small cells of ~3-12  $\mu\text{m}$  in mean diameter and 2-100  $\mu\text{m}^2$  (52% of total observed cells), the group 2 composed of cells of ~11-30  $\mu\text{m}$  in mean diameter and 100-500  $\mu\text{m}^2$  (43% of total observed cells) and the group 3 composed of cells of ~27-40  $\mu\text{m}$  in mean diameter and 500-1110  $\mu\text{m}^2$  (5% of total observed cells) (n= 220). The cells of the group 1 were scattered throughout the whole cortex and were present at all cutting lines. The cells of the group 2 were present at all levels except the cutting line 'd'. The cells of the group 3 (Fig. 2.2.A-B) were principally distributed in the ventral face of the ganglia, at the cutting line 'b'. No



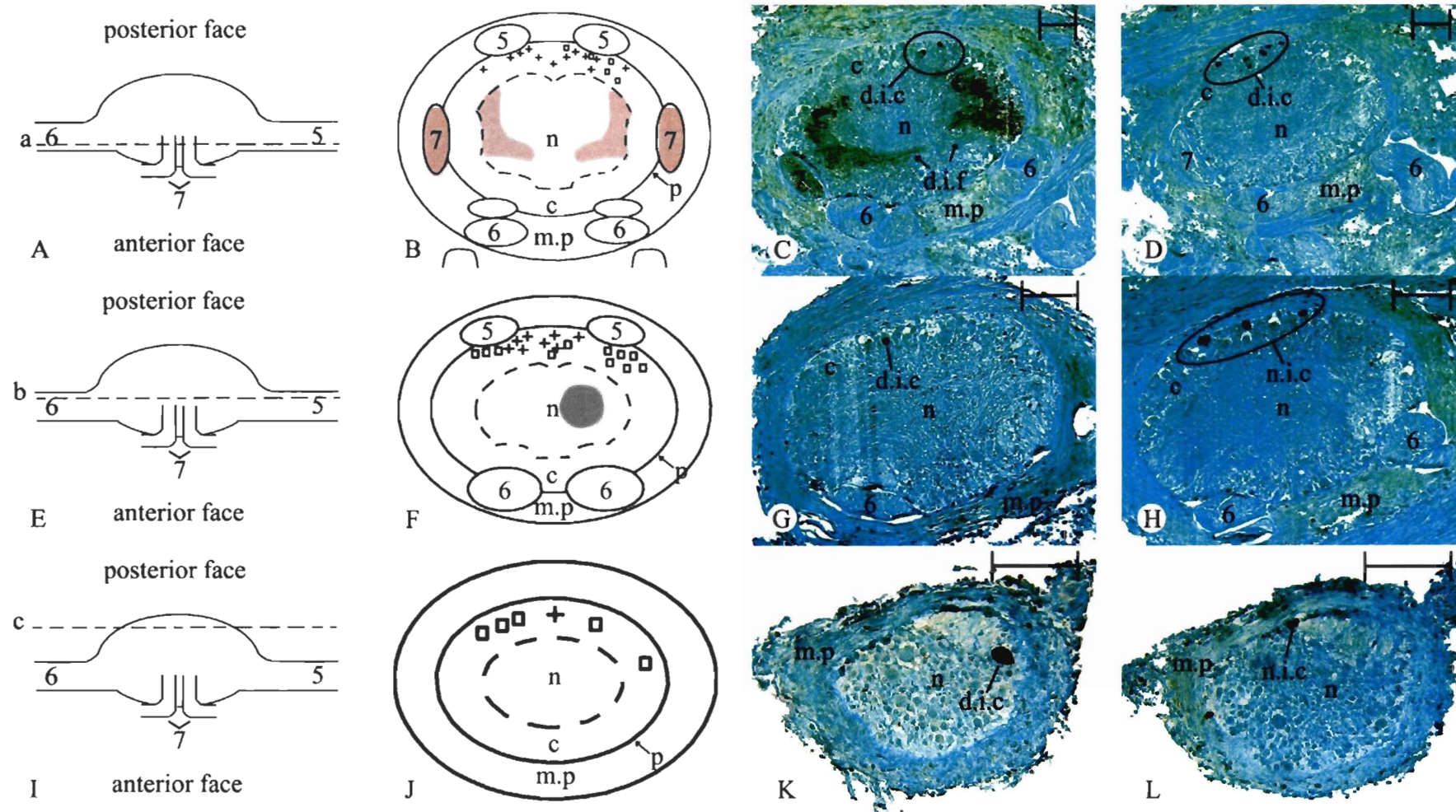
**Figure 2.2** Dopamine and noradrenalin immunohistochemistry stained section of visceral, pedal and cerebral ganglia in *Mya arenaria*. **A.** Large d.i.c in a stained section of a VG. **B.** Large d.i.c with one or more nerve fibres in a stained section of a VG. **C.** N.i.c without nerve fibres in a stained section of a VG. **D.** Round d.i.c without nerve fibres in a stained section of a PG. **E.** Round n.i.c without nerve fibres in a stained section of a PG. **F.** Small d.i.c in a stained section of a CG. Scale bars = 100  $\mu$ m. Paraffin sections were prepared at 3  $\mu$ m thick. Brown staining of d.i.c and n.i.c with diaminobenzidine (DAB) followed by a light green counterstaining. Enlargement 400 $\times$ .

immunoreactive cells were found in the glomeruli. Three types of cells were also observed: without processes cells (Fig. 2.2.A), pear-shaped unipolar cells and multipolar cells (Fig. 2.2.B). All the DIC exhibited homogenous brown staining.

Only one small noradrenalin-immunoreactive cell (NIC) was found in the cortex of one visceral ganglion among all visceral ganglia observed (n= 20) (Figs. 2.1.E and 2.2.C). This cell belonging to the first group (9  $\mu\text{m}$  in mean diameter and 50  $\mu\text{m}^2$ ) was found at the same location, between the two siphons and posterior pallear nerves, in different sections of the ganglion. NA staining was localized in intracellular granules. This round immunoreactive cell did not exhibit any processes.

### **2.3.2. Distribution of dopamine and noradrenalin-immunoreactive cells in the pedal ganglion of *M. arenaria***

Figure 2.3. shows the distribution of DIC, DIF, NIC and NA-immunoreactive fibres (NIF) in three cutting levels ranging from the anterior face to the posterior face of PG. The cutting line 'a' is localized at the anterior face of VG and cuts all the nerves emerging from the ganglion: the pedal nerves, the hyaline style nerves and the cerebropedal connectives (Fig. 2.3.A). At this level 'a', DIC and NIC were regrouped in the cortex in the dorsal face, near the hyaline style nerves and intensely dopamine stained fibres tracts were observed in the pedal nerve and in the neuropil of the ganglion (Fig. 2.3.B-D). The cutting line 'b' is localized in the middle part of PG and cuts the hyaline



**Figure 2.3** Dopamine and noradrenalin-like immunoreactivity in the pedal ganglion of *Mya arenaria*.

**Legend: Figure 2.3.** Dopamine and noradrenalin-like immunoreactivity in the pedal ganglion of *Mya arenaria*. **A.** Schematic side view of PG showing the cutting line 'a' localized at the anterior face of PG (dotted line= cutting line 'a'), (5= hyaline style nerve, 6= cerebropedal connective, 7= pedal nerves). This legend is similar for all views of the figure 2.3. **B.** Schematic sagittal view of PG showing the general distribution of dopamine and noradrenalin-immunoreactive cells and fibres in the dorsal face of PG at the cutting line 'a' observed in the figure 2.3.A. (gray color = d.i.f). **C.** Dopamine immunohistochemistry stained section of PG at the cutting line 'a'. **D.** Noradrenalin immunohistochemistry stained section of PG at the cutting line 'a'. **E.** Schematic side view of PG showing the cutting line 'b' localized in the middle of the ganglion (dotted line= cutting line 'b'). **F.** Schematic sagittal view of PG at the cutting line 'b' observed in the figure 2.3.E. This view shows the general distribution of dopamine and noradrenalin-immunoreactive cells and fibres in the dorsal face of PG, at the cutting line 'b'. **G.** Dopamine immunohistochemistry stained section of PG at the cutting line 'b'. **H.** Noradrenalin immunohistochemistry stained section of PG at the cutting line 'b'. **I.** Schematic side view of PG showing the cutting line 'c' localized at the posterior face of PG (dotted line= cutting line 'c'). **J.** Schematic sagittal view of PG at the cutting line 'c' observed in the figure 2.3.I. This view shows the distribution of d.i.c and n.i.c in the dorsal face of PG, at the cutting line 'c'. **K.** Dopamine immunohistochemistry stained section of PG at the cutting line 'c'. **L.** Noradrenalin immunohistochemistry stained section of PG at the cutting line 'c'. Scale bars = 100  $\mu$ m. Paraffin sections were prepared at 3mm thick. Brown staining of dopamine and

noradrenalin-immunoreactive cells and fibres with diaminobenzidine (DAB) followed by a light green counterstaining. Enlargement 200x.



style nerves and the cerebropedal connectives (Fig. 2.3.E). At this level 'b', DIC and NIC were also found in the cortex between the hyaline style nerves as observed in Fig. 2.3.B-D and NIF were found in the neuropile of PG (Fig. 2.3.F-H). The cutting line 'c' is localized in the posterior face of PG (Fig. 2.3.I) and at this level 'c', DIC and NIC were also found at the dorsal face, near the hyaline style nerves of PG (Fig. 2.3.J-L).

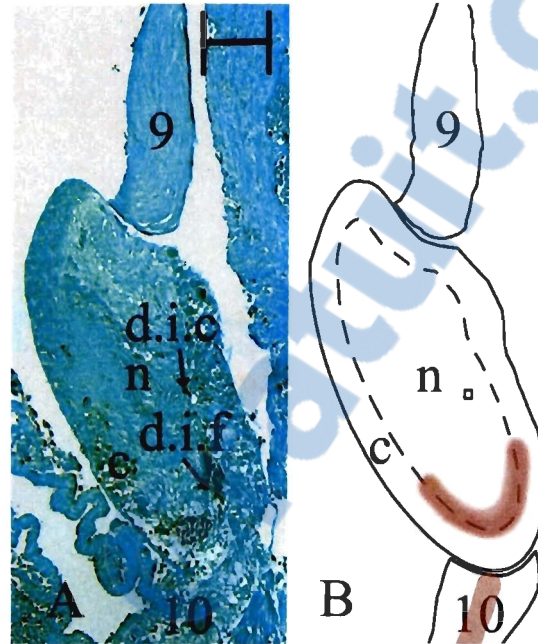
Dopamine-immunoreactivities were found in the cortex of the pedal ganglia (n= 3) from the anterior face to the posterior face. Immunoreactivities were always regrouped in the cortex in the dorsal face, near the hyaline style nerves, and were more abundant at the middle part of the ganglia (cutting line 'b'). Five dopamine immunoreactive cells were found in the pedal ganglia at the anterior face (cutting line 'a', Fig. 2.3.B), 11 at the middle part (cutting line 'b', Fig. 2.3.F) and 5 at the dorsal face (cutting line 'c', Fig. 2.3.J). All these cells measured ~10-25  $\mu\text{m}$  in mean diameter and 60-480  $\mu\text{m}^2$  (Fig. 2.2.D). All DIC were round, without processes. The staining was always localized in intracellular granules situated at the periphery of the cytoplasm.

Noradrenalin-immunoreactive cells were most abundant in the pedal ganglia than in the other ganglia. They were found in the cortex of the pedal ganglia (n= 3) from the anterior face to the posterior face. As for DIC, NA-immunoreactivities were always regrouped in the cortex in the dorsal face of the ganglia, near the hyaline style nerves, but they were more abundant at the anterior face and at the middle part (cutting lines 'a-b', Fig. 2.3.B and 2.3.F) than at the posterior face of the ganglia (cutting line 'c', Fig. 2.3.J). 12

immunoreactive cells were found in the pedal ganglia at the anterior face, 8 at the middle part and 1 at the posterior face. All these cells had a mean diameter  $\sim 5\text{-}25\ \mu\text{m}$  and  $25\text{-}350\ \mu\text{m}^2$  (Fig. 2.2.E). As the DIC, NIC were round, without processes and with a staining always localized in intracellular granules.

### **2.3.3. Distribution of dopamine-immunoreactive cells in the cerebral ganglia of *M. arenaria***

One small dopamine-immunoreactive cell was found in the cortex of only one cerebral ganglion among all cerebral ganglia observed ( $n=7$ ) (Fig. 2.4.A-B and Fig. 2.2.F). This small DIC ( $5\ \mu\text{m}$  in mean diameter and  $23\ \mu\text{m}^2$ ) was found at the same location in different sections of the same cerebral ganglion. This cell was pear-shaped with a homogenous brown staining. Stained dopaminergic fibres tracts were observed near and in the cerebrovisceral connectives emerging from the cerebral ganglia (Fig. 2.4.A-B).



**Figure 2.4** Dopamine-like immunoreactivity in the cerebral ganglia of *Mya arenaria*. **A.** Dopamine immunohistochemistry stained section of CG (9= anterior palleal and adductor nerve, 10= cerebrovisceral connective). This legend is similar for all views in the figure 2.4. **B.** Schematic sagittal view of CG showing the distribution of the only one d.i.c found in all the CG observed and of d.i.f found in and near the cerebrovisceral connectives (gray color = dopamine-immunoreactive fibres). Scale bars= 100  $\mu$ m. Paraffin sections were prepared at 3  $\mu$ m thick. Brown staining of dopamine-immunoreactive cells and fibres with diaminobenzidine (DAB) followed by a light green counterstaining. Enlargement 200x.

## 2.4. Discussion

The present study provides immunohistochemical evidences of the presence of catecholamines (NA and DA) in the nervous system of *M. arenaria*. It supports the hypothesis that NA and DA play neurotransmitter/ neuromodulator roles in this species and corroborates HPLC and fluorometric measures of catecholamines in the major ganglia of bivalves such as *Placopecten magellanicus* (Pani and Croll, 1995) and *Mya arenaria* (Sweeney, 1963).

We have found that the ganglia of *M. arenaria* contain both dopamine and noradrenalin-immunoreactive cells. DIC are principally present in the visceral and pedal ganglia of *M. arenaria* and one small DIC was detected in one cerebral ganglion. The noradrenalinergic cells were principally found in the pedal ganglion and one immunoreactive cell was detected in the visceral ganglion. Therefore, the pedal and the visceral ganglia appear to be the major sources of dopamine for physiological actions in *M. arenaria*. The pedal ganglion is also the major source of noradrenalin which is also present in the visceral ganglion. These findings are in agreement with the studies of Matsutani and Nomura (1984) who found predominant green fluorescence, presumably containing both catecholamines, in the pedal and visceral ganglia in *P. yessoensis* and of De Biasi et al. (1984) who observed green fluorescing cells in the pedal ganglia of *M. edulis*. Our findings are also partially consistent with the studies of Dahl et al. (1966) and Smith et al. (1998) who found numerous catecholamine-containing cells in the pedal and visceral ganglia and

in the cerebral ganglia of *A. piscinalis* and *P. magellanicus*. However, not all those studies distinguished the specific dopaminergic or noradrenalinergic nature of the catecholaminergic-containing cells.

The present study is the first to map the specific localisation of dopaminergic and noradrenalinergic immunoreactive cells from the ventral face to the dorsal face of the ganglia of a bivalve, *M. arenaria*, and to give detailed descriptions of the morphology of these immunoreactive structures.

Relatively few dopaminergic and noradrenalinergic cells were found in the ganglia of *M. arenaria*. This is consistent with other studies in invertebrates such as Crustacea where aminergic systems have been mapped. Schneider et al. (1992) and Cournil et al. (1994) found only small numbers of aminergic labelled neurons in the nervous systems of the species studied.

In the visceral ganglia of *M. arenaria*, dopamine immunoreactive cells, scattered in the whole cortex, display wide variations in size with presence of large immunoreactive cells not observed in the other ganglia. Moreover, we found three types of immunoreactive cells without or with one or more processes in these ganglia. These wide variations in size, their distribution and the morphological differences may be related to different physiological functions of the dopaminergic cells which could be either projecting cells or local circuit cells as hypothesized by De Biasi and Vitellaro-Zuccarello (1987). These

authors found serotonergic cells in the pedal ganglion of *M. galloprovincialis* with different morphologies. In contrary, Smith et al. (1998) found only small nerve cells (4-7  $\mu\text{m}$  in diameter) in the parietovisceral ganglia of *P. magellanicus* and Stefano and Aiello (1975) also found principally small catecholaminergic cells of 10-12  $\mu\text{m}$  in diameter in the visceral ganglia of *M. edulis*.

In contrast, in this study, DIC and NIC in the pedal ganglia were of uniform size without large immunoreactive cells. These DA and NA-immunoreactive cells had the same morphology, they were all round without identifiable processes, as De Biasi et al. (1984) observed in *M. edulis* pedal ganglia. They were also not scattered in the cortex of the pedal ganglia but always situated at the same location, near the hyaline style nerves. These findings may be related to one physiological function of these cells in opposite of the dopaminergic cells in the visceral ganglia. Moreover, as these cells were situated near the hyaline style nerves, they may act on digestive functions. It is possible that DA and NA would be involved in the control of enzyme discharge from digestive cells as it has been found by Giard et al. (1995) in *Pecten maximus*. Indeed, these authors found that dopamine can stimulate  $\alpha$ -amylase release from the cells of the stomach-digestive gland complex.

In this study, dopamine staining was always homogenous except in the pedal ganglia where it was concentrated in large intracellular granules. In contrast, intense noradrenalin staining in the visceral as well as in the pedal ganglia was found in all intracellular granules situated in the cytoplasm of the immunoreactive cells. The dopaminergic and

noradrenalinergic granules found around the nuclei of the immunoreactive cells suggest a storage function of these cells whereas the homogenous staining suggests a catecholaminergic diffusion stage. These two kinds of staining, corresponding to different stages of storage and diffusion, were also found in 5-HT neurons labelled by immunoperoxidase techniques in both vertebrate and invertebrate species as *M. edulis* (De Biasi et al., 1987) and the monkey (Kapadia et al., 1985).

Only one small dopamine immunoreactive cell and only one small noradrenalinergic cell were detected in one cerebral ganglion and in one visceral ganglion respectively. These findings are the evidence that dopamine and noradrenalin are synthesized respectively in the cerebral and visceral ganglia but that these ganglia are minor sources of catecholamines for physiological actions in *M. arenaria*.

Dopamine-immunoreactive fibres were detected in the cerebrovisceral connectives emerging from the visceral ganglia and from the cerebral ganglia. These findings suggest a role of these fibres in the communication of the two ganglia. Moreover, a large tract of DA-immunoreactive fibres was present in the neuropile of the posterior face of the cerebral ganglia, near the root of the cerebrovisceral connectives, whereas dopaminergic cells in this ganglion are scarce and small. These results suggest a net flow of dopamine from the visceral ganglion to the cerebral ganglia that is in agreement with the study of Stefano and Aiello (1975) in *M. edulis*. No DA and NA-immunoreactive fibres were detected in the cerebropedal connectives and no NA-immunoreactive fibres were observed in the cerebral

ganglia. Therefore, the pedal and cerebral ganglia may not be connected by NA and DA fibres.

The presence of DA-immunoreactive fibres in the branchial nerves and in the siphon and posterior pallear nerves of the visceral ganglia and in the pedal nerve of the pedal ganglia indicates a possible implication of dopamine in peripheral neurotransmission for foot contraction, respiration and nutrition. This hypothesis is supported by previous studies. Stefano and Aiello (1975) found evidence of branchial nerves emerging from the visceral ganglia and nerves in the gills containing green fluorescence suggesting that dopamine controls cilio-activity of the gills in *M. edulis*. Paparo and Aiello (1970), Paparo (1988) and Jones and Richards (1993) showed that DA is implicated in the ciliary activity of gills in *M. edulis*, while Aiello et al. (1981) found that DA causes foot contraction in the same species. Moreover, we found dopamine-immunoreactive fibres in the cerebrovisceral connectives and Garnerot (personal communication) described gonadal connectives emerging from the cerebrovisceral connectives and going into the gonad of *M. arenaria*. It was also reported by Siniscalchi et al. (2004) in *Venus verrucosa*. This suggests a gonadal dopaminergic innervation in *M. arenaria* and a possible implication of dopamine in reproduction processes as evidenced by pharmacological and physiological studies in *A. irradians*, *A. purpuratus*, *D. polymorpha*, *P. yessoensis* and *C. gigas* (Osada et al., 1987, Osada and Nomura, 1989; Fong et al., 1993; Martinez and Rivera, 1994; Martinez et al., 1996a, 1996b, 2000) as well as detection studies in the gonads of *C. gigas*, *P. magellanicus* and *P. yessoensis* (Osada et al., 1987; Osada and Nomura, 1989; Pani and Croll, 1995). However,



in a previous study, we did not detect any dopaminergic fibres in the gonads of *M. arenaria*. Also, no NA-fibres were observed in any nerves of the three ganglia in this study, whereas NA was detected in gonads of *C. gigas* and *P. magellanicus*, in gills of *C. gigas*, *Ligumia subrostrata*, *Modiolus demissus*, *Modiolus modiolus*, *M. edulis* and *P. yessoensis*, in suprabranchial nerves of *Ligumia subrostrata* (Malanga et al., 1972; Osada et al., 1987; Osada and Nomura, 1989; Dietz et al., 1992) and also in the liver, heart, kidney, muscles, mantle and foot of *P. magellanicus* (Pani and Croll, 1995). Therefore, it is not yet possible to elaborate a hypothesis for the functions of NA-immunoreactive cells from the observed distribution. Nevertheless, the detailed maps of noradrenalinergic and dopaminergic cells are useful to compare with the distribution map of other monoamines, such as serotonin (5-HT), which were localized in *M. arenaria* ganglia, gonads, digestive glands and gills (Garnerot et al., 2006; Garnerot, F. unpublished data).

Complementary studies in our laboratory showed numerous 5-HT immunoreactive cells in the cortex of the cerebral ganglia whereas these cells were not detected in the cortex of the visceral ganglia but only in their glomeruli, in *M. arenaria*. This distribution of serotonergic cells in these two ganglia of the soft-shell clam were completely different of the distribution of dopaminergic cells observed in this study and in the same ganglia. This is in agreement with histological studies that observed that serotonin predominates in the cerebral ganglia, whereas dopamine predominates in the visceral ganglion (as in *M. edulis* and *P. yessoensis*; Stefano and Aiello, 1975; Matsutani and Nomura, 1984). Pharmacological and physiological studies have also shown that 5-HT and DA have

opposite effects on physiological functions in bivalves. Indeed, Fong et al. (1993) showed that *Dreissena polymorpha* spawning is delayed and that its intensity is reduced after application of dopamine in comparison with an application of serotonin alone. Martinez et al. (1996a) found that DA and 5-HT concentrations varied inversely during the reproductive cycle of bivalves and that in spawning animal levels of 5-HT and DA decreased respectively only in the cerebral ganglia and in the visceral ganglia of *A. purpuratus*.

In contrary to these different localisations of monoamines in the cerebral and visceral ganglia, the distributions of NA, DA and 5-HT are similar in the pedal ganglia with immunoreactive cells distributed in the posterior face. This distribution of monoamines may be related to their functions in foot contraction and extension since Aiello et al. (1981) showed that serotonin causes foot extension whereas dopamine causes foot contraction in *M. edulis*.

In conclusion, this present study using immunohistochemistry techniques brings important knowledge about the specific dopaminergic and noradrenalinergic cells distribution in the ganglia of a mollusc bivalve, *M. arenaria*. Moreover, these findings will contribute to identify the functional roles of these mononamines and to understand these aminergic systems in this important species.

## 2.5. Acknowledgments

This work was supported by the CRSNG through the Discovery grant attributed to Jocelyne Pellerin. We thank Dr. Réjean Tremblay (ISMER, UQAR) for providing the light microscope and Image-Pro Plus software and Dr. Céline Audet (ISMER, UQAR) for providing some chemical substances during the experiments.

## 2.6. References

- Aiello E, Stefano GB, Catapane EJ. 1981. Dual innervation of the foot and the control of foot movement by the central nervous system in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Comp Biochem Physiol* 69C:25-30.
- Bonar DB, Coon SL, Walch M, Weiner RM, Fitt W. 1990. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *Bull Mar Sci* 46:484-498.
- Cournil I, Helluy SM, Beltz BS. 1994. Dopamine in the lobster *Homarus gammarus*. I. Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the nervous system of the juvenile. *J Comp Neurol* 344:455-469.
- Dahl E, Falck B, Von Mecklenburg C, Myhrberg H, Rosengren E. 1966. Neuronal localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in some Mollusca. *Z Zellforsch* 71:489-498.
- De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Blum I. 1984. Histochemical localization of monoamines and cholinesterases in *Mytilus* pedal ganglion. *Histochemistry* 81:561-565.
- De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L. 1987. Distribution of 5-HT-immunoreactivity in the pedal ganglion of *Mytilus galloprovincialis*. A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 249:111-116.
- Dietz TH, Steffens WT, Kays WT, Silverman H. 1985. Serotonin localization in the gills of the freshwater mussel, *Ligumia subrostrata*. *Can J Zool* 63:1237-1243.

- Dietz TH, Wilson JM, Silverman H. 1992. Changes in monoamine transmitter concentration in freshwater mussel tissues. *J Exp Zool* 261:355-358.
- Fong PP, Noordhuis R, Ram JL. 1993. Dopamine reduces intensity of serotonin-induced spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J Exp Zool* 266:79-83.
- Garnerot F, Pellerin J, Blaise C, Mathieu M. 2006. Immunohistochemical localization of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the gonad and digestive gland of *Mya arenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Gen Comp Endocrinol* 149:278-84.
- Giard W, Favrel P, Boucaud-Camou E. 1995. In vitro investigation of  $\alpha$ -amylase release from the digestive cells of the bivalve mollusc *Pecten maximus*: effect of second messengers and biogenic amines. *J Comp Physiol* 164B:518-523.
- Greenberg MJ. 1960. The responses of the *Venus* heart to catecholamines and high concentrations of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 15:365-374.
- Kapadia SE, De Lancrolle NC, LaMotte CC. 1985. Immunocytochemical and electron microscopic study of serotonin neuronal organization in the dorsal raphe nucleus of the monkey. *Neuroscience* 15:729-746.
- Jones HD, Richards OG. 1993. The effects of acetylcholine, dopamine and 5-hydroxytryptamine on water pumping rate and pressure in the mussel *Mytilus edulis* L. *J Exp Mar Biol Ecol* 170:227-240.
- Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA. 2001a. Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gen Comp Endocrinol* 122:181-188.

- Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA. 2001b. Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via  $\beta$ -adrenergic receptor-cAMP signalling pathway. *Gen Comp Endocrinol* 122:252-259.
- Lacoste A, Malham SK, Cueff A, Poulet SA. 2001c. Noradrenaline modulates hemocyte reactive oxygen species production via  $\beta$ -adrenergic receptors in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 25:285-289.
- Malanga CJ, Wenger GR, Aiello EL. 1972. Endogenous dopamine in bivalve gills. *Comp Biochem Physiol* 43A:825-830.
- Martinez G, Rivera A. 1994. Role of monoamines in the reproductive process of *Argopecten purpuratus*. *Invert Reprod Develop* 25:167-174.
- Martinez G, Saleh F, Mettifogo L, Campos E, Inestrosa N. 1996a. Monoamines and the release of gametes by the scallop *Argopecten purpuratus*. *J Exp Zool* 274:365-372.
- Martinez G, Garrote C, Mettifogo L, Pérez H, Uribe E. 1996b. Monoamines and prostaglandins E2 as inducers of the spawning of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *J Shell Res* 15:245-249.
- Martinez G, Olivares AZ, Mettifogo L. 2000. In vitro effects of monoamines and prostaglandins on meiosis reinitiation and oocyte release in *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Invert Reprod Develop* 38:61-69.
- Matsutani T, Nomura T. 1984. Localization of monoamines in the central nervous system and gonad of the scallop *Pactinopecten yessoensis*. *Bull Japan Soc Sci Fish* 50:425-430.

- Osada M, Matsutani T, Nomura T. 1987. Implication of catecholamines during spawning in marine bivalve molluscs. *Int J Invert Reprod Dev* 12:241-252.
- Osada M, Nomura T. 1989. Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol* 93C:171-173.
- Pani AK, Croll RP. 1995. Distribution of catecholamines, indoleamines, and their precursors and metabolites in the scallop, *Placopecten magellanicus* (Bivalvia, Pectinidae). *Cell Mol Neurobiol* 15:371-386.
- Paparo AA, Aiello E. 1970. Cilio-inhibitory effects of branchial nerve stimulation in the mussel, *Mytilus edulis*. *Comp Gen Pharmacol* 1:241-250.
- Paparo AA. 1988. Ciliary activity on the ctenidium of bivalve molluscs. *Comp Biochem Physiol* 91C:99-110.
- Paulet Y-M, Donval A, Bekhadra F. 1993. Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Invert Reprod Dev* 23:89-94.
- Schneider H, Trimmer BA, Rapus J, Eckert M, Kravitz EA. 1992. Octopamine immunoreactive neurons in the lobster CNS. *Soc Neurosci Abstr* 18:466.
- Siniscalchi A, Cavallini S, Sonetti D, Sbrenna G, Capuano S, Barbin L, Turolla E, Rossi R. 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. *Mar Biol* 144:1205-1212.
- Smith JR. 1982. A survey of endogenous dopamine and serotonin in ciliated and nervous tissues of five species of marine bivalves, with evidence for specific, high-affinity

dopamine receptors in ciliated tissue of *Mytilus californianus*. Comp Biochem Physiol 71C:57-61.

Smith SA, Nason J, Croll RP. 1998. Distribution of catecholamines in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. Can J Zool 76:1254-1262.

Stefano GB, Aiello E. 1975. Histofluorescent localization of serotonin and dopamine in the nervous system and gill of *Mytilus edulis* (Bivalvia). Biol Bull 148:141-156.

Sweeney D. 1963. Dopamine: Its occurrence in Molluscan ganglia. Science 139:1051.



**CHAPITRE 3 : IN VITRO INDUCTION OF GERMINAL VESICLE BREAKDOWN  
IN OOCYTES OF THE SOFT-SHELL CLAM, *MYA ARENARIA***

**SÉVERINE LOUIS, FLORENT GARNEROT, AND JOCELYNE PELLERIN**

## ABSTRACT

Serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT) is a neurohormone modulating different reproduction processes in marine molluscs as spawning, parturition, sperm reactivation and meiosis reinitiation in oocytes. We previously localized 5-HT in nerve cells in the cerebral and pedal ganglia and in serotonergic fibers in the gonads by immunohistochemistry in *Mya arenaria*. In this study, we found that in vitro application of serotonin reinitiates meiosis of oocytes arrested in prophase I, as shown by germinal vesicle breakdown (GVBD). The reinitiation of meiosis is concentration and time dependant. The highest percentage of oocytes undergoing GVBD (53%) was obtained with serotonin  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M after the longest exposure time tested (180 minutes). This study indicates that 5-HT synthesized in the ganglia could be conducted by serotonergic fibers to gonads where it induces the GVBD of oocytes in *Mya arenaria*, as hypothesized by others studies.

### 3.1. Introduction

Serotonin (5-HT or 5-hydroxytryptamine) is found in the ganglia of many bivalves as *Anodonta cataracta* and *Arctica islandica* (Welsh and Moorhead, 1960) and serotonergic innervations are observed in the gonads of species as *Patinopecten yessoensis* (Matsutani and Nomura, 1984), *Dreissena polymorpha* (Ram et al., 1992), *Pecten maximus* (Paulet et al., 1993), *Argopecten purpuratus* (Martinez et al., 1996) and *Venus verrucosa* (Siniscalchi et al., 2004). In *Mya arenaria*, Garnerot et al., 2006, and Garnerot, unpublished data, found serotonin nerve cells and serotonergic fibers in the cerebral and pedal ganglia. Serotonine reactive fibers were observed throughout the gametogenic stages around germinal follicles and in the muscular fibers of gonad external epithelium. These findings confirmed that ganglia and gonads are connected via serotonergic fibers.

Serotonin is a neurotransmitter modulating different reproduction processes as spawning in *Arctica islandica*, *Argopecten irradians*, *Crassostrea virginica*, *Geukensia demissa*, *Mercenaria mercenaria* (Gibbons and Castagna, 1984), *Chlamys asperrima* (O'Connor and Heasman, 1995), *Dreissena polymorpha* (Ram et al., 1993; Fong et al., 1994; Fong, 1998), *Spisula solidissima* (Gibbons and Castagna, 1984; Hirai et al., 1988) and *Tivela stultorum* (Alvarado-Alvarez, 1996), sperm reactivation in *S. solidissima* (Kadam and Koide, 1990), parturition in *Sphaerium transversum* (Fong and Warner, 1995) and meiosis reinitiation of oocytes arrested at prophase I and metaphase I, in vitro and in

vivo, in many hermaphrodite and gonochoristic species as in *A. purpuratus* (Martinez et al., 2000), *C. gigas* (Osanai, 1985; Osanai and Kuraishi, 1988; Kyosuka et al., 1997; Leclerc et al., 2000), *D. polymorpha* (Fong et al., 1994; Ram et al., 1996), *Hiatella flaccida* (Deguchi and Osanai, 1995), *Ruditapes decussatus* (Hamida et al., 2004), *Ruditapes philippinarum* (Osanai and Kuraishi, 1988; Guerrier et al., 1993; Gobet et al., 1994; Leclerc et al., 2000), *S. solidissima* (Hirai et al., 1988; Kadam and Koide, 1989; Krantic et al., 1993), *Spisula sachalinensis* (Hirai et al., 1988; Varaksin et al., 1992) and *Tivela stultorum* (Alvarado-Alvarez et al., 1996). In contrast, in *Macra chinensis* oocytes (Fong et al., 1996) and in *Mytilus edulis* oocytes (Osanai et Kuraishi, 1988), serotonin was not found to be a major factor in initiating germinal vesicle breakdown (GVBD) (Table 3.1). However, Garnerot et al., 2006, have suggested that serotonin in *Mya arenaria* which is transported from the nervous system to the gonads could be involved in the reproduction processes of *M. arenaria*. Hence, the purpose of this study was to determine whether serotonin can induce GVBD in vitro in *Mya arenaria* at the post-vitellogenic stage.

**Tableau 3.1** Serotonin induction of GVBD in bivalve molluscs.

Legend : H: hermaphrodite, G: gonochoristic, F: freshwater species, M: marine species, I: Oocytes type I, II: oocytes type II, III: oocytes of intermediate type (fertilization at prophase I and metaphase II). Symbol “~” indicates estimated values visually determined on figures of cited papers

Species	Species characteristics	Authors	Significant induction of GVBD by 5-HT	Effective concentration of 5-HT for GVBD	Time (minutes)	Pourcentages of GVBD	Experimentations
<i>Argopecten purpuratus</i>	H	Martinez et al., 2000	yes	$10^{-6}$ M	20	~ 30%	In vitro using ovaries pieces
	F						
<i>Crassostrea gigas</i>	II	Osanai, 1985	yes	$10^{-6}$ M	20	100%	In vitro using oocytes
	H	Osanai & Kuraishi, 1988	yes	$10^{-5}$ M	158-170	50%	In vitro using oocytes
	M	Kyosuka et al., 1997	yes	$10^{-4}$ M- $10^{-6}$ M	60	~ 90%	In vitro using oocytes
	III		yes	$10^{-6}$ M	45	~ 95%	In vitro using oocytes
<i>Dreissena polymorpha</i>	G	Fong et al., 1994 and Ram et al., 1996	yes	$10^{-4}$ M	50	80%	In vitro using ovaries pieces
	F		yes	$10^{-3}$ M	40-50	100%	In vivo with mussels exposed to 5-HT
<i>Hiatella flaccida</i>	G	Deguchi & Osanai, 1995	Yes at prophase I and metaphase I	$10^{-4}$ M- $10^{-6}$ M	30-45	100%	In vitro using oocytes
	M						
<i>Mactra chinensis</i>	G	Fong et al., 1996	no	$10^{-3}$ M- $10^{-7}$ M	30-40	Not significantly induced by 5-HT	In vitro using oocytes
	M						
<i>Mytilus edulis</i>	G	Osanai & Kuraishi, 1988	no	$10^{-5}$ M- $10^{-4}$ M	170	Not significantly induced by 5-HT	In vitro using oocytes
	M						
	II						

**Tableau 3.1** Serotonin induction of GVBD in bivalve molluscs (suite)

Species	Species characteristics	Authors	Significative induction of GVBD by 5-HT	Effective concentration of 5-HT for GVBD	Time (minutes)	Pourcentages of GVBD	Experimentations
<i>Ruditapes decussatus</i>	G M II	Hamida et al., 2004	yes	$20.10^{-6}M$	90	67%	In vitro using oocytes
<i>Ruditapes philippinarum</i>	G M II	Osanai & Kuraishi, 1988	yes	$10^{-5}M$	100	100% at 21°C 40% at 18°C	In vitro using oocytes
		Guerrier et al., 1993	yes	$10^{-6}M$	60	90-100%	In vitro using competent I and II
		Gobet et al., 1994	yes	$10^{-6}M$	60	≤ 30%	
		Leclerc et al., 2000	yes	$10^{-6}M$	12	~ 95%	In vitro using oocytes
<i>Spisula solidissima</i>	G M II	Hirai et al., 1988	yes	$2.10^{-5}M$	?	100%	In vitro using oocytes
		Kadam & Koide, 1989	yes	$5.10^{-6}M$	30-45	95-100%	In vitro using oocytes
		Krantic et al., 1993	yes	$10^{-5}M$	30	~100%	In vitro using oocytes
<i>Spisula sachalinensis</i>	G M II	Hirai et al., 1988	yes	$20.10^{-6}M$	?	100%	In vitro using oocytes
		Varaksin et al., 1992	yes	$10^{-4}M-10^{-5}M$ $10^{-6}M$	60	90% 80%	In vitro using oocytes
<i>Tivela stultorum</i>	G M I	Alvarado-alvarez et al., 1996	yes	$10^{-5}M-10^{-7}M$	?	~ 90-95%	In vitro using oocytes

### 3.2. Material and methods

Clams (55 to 65 mm) were collected at low tide in 2006 during spring and summer at Metis Beach, Quebec, Canada (48°40' N, 68°00'W) and brought back to the experimental laboratory located at ISMER's Station Aquicole (Institut des Sciences de la mer), Pointe-au-Père, Quebec, Canada. They were placed in aquaria with a continuous seawater flow of 30-45 L per hour. Sexual maturation was reached after increasing the water temperature and feeding clams with microalgae: *Nannochloropsis sp.*, at a concentration of  $10^6$  cells per mL and a flow rate of 30 mL per minute during 5 hours.

#### 3.2.1. Oocyte maturation assay with 5-HT

Optimum conditions to obtain the highest percentage of oocytes in GVBD in vitro were determined using gonads cut in pieces of 5mm and exposed to 5-HT ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) with different incubation times (60, 90, 120 or 180 minutes).

Samples of gonad were incubated at 15°C in 1 mL of 5-HT in microplates. Each treatment (5-HT and control) was carried out in three to five replicates, when a sufficient number of mature clams was available, each replicate coming from different organisms. The different concentrations of serotonin were obtained from an initial solution of  $10^{-2}$  M derived of serotonin creatine sulfate (Sigma, H7752) dissolved in artificial seawater (ASW) prepared with Instant Ocean (pH 8.2). Controls received only ASW. After the different

incubation times, the solutions of serotonin and ASW were removed and the gonads pieces were fixed in 2% formalin at 4°C. After one hour fixation, one portion of each piece was dissected with a scalpel and placed on a microscope slide in which 50 to 250 oocytes with or without visible germinal vesicle were counted per slide using a light microscope at 400x enlargement. The oocytes having undergone GVBD spontaneously or with the serotonin application were spherical with a free nucleus in the cytoplasm (Fig. 3.1). In contrast, the oocytes with a germinal vesicle were pear-shaped with a large germinal vesicle containing the nucleus. The percentage of oocytes which showed reinitiation of meiosis (without germinal vesicle) was calculated.

### **3.2.2. Statistical analysis**

Analyses were performed with SYSTAT version 11. Data distribution was analysed using Levene's test for homogeneity of variances and Kolmogorov-Smirnov's test for the normality of residuals ( $p < 0.05$ ). As the data distribution was homogeneous and normal, a two-way analysis of variance (ANOVA) (5-HT concentrations, exposure times and their interaction) was performed. This ANOVA was followed by a Pairwise multiple comparisons (Tukey test) ( $p < 0.05$ ) to identify differences among incubation times and concentrations of 5-HT.





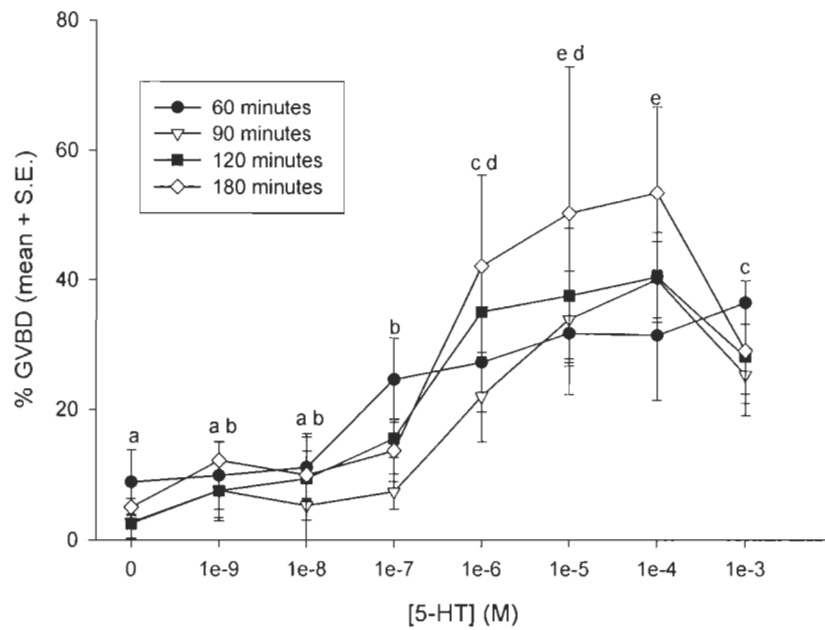
**Figure 3.1:** Spherical oocyte of *M. arenaria* in GVBD with the nucleus free in the cytoplasm observed using a light microscope. Enlargement 400 $\times$ .

### 3.3. Results

The results of the ANOVA showed significant differences between exposure times ( $p < 0.0001$ ), 5-HT concentrations ( $p < 0.0001$ ) and their interactions ( $p < 0.002$ ).

The occurrence of spontaneous GVBD of control untreated oocytes was less than 5% for all experiments except for the 60 minutes experiment where it was 8.9%. In the dose response experiment, significant differences were observed between the effects of  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-7}$  M 5-HT and their respective controls (Tukey test,  $p < 0.05$ ). The results showed concentration-response curves. GVBD percentage increased to reach a maximum at  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  M 5-HT and decreased to control levels at  $10^{-8}$  and  $10^{-9}$  M 5-HT (Fig.3.2).

In the time response experiment, significant differences were observed between the 180 minutes exposure time and the 60, 90 and 120 exposure times (Tukey test,  $p < 0.05$ ). The results showed time incubation-response curves. The percentage of oocytes undergoing GVBD reached a maximum of 53% and 50% at  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M 5-HT respectively for the highest exposure time (180 minutes).



**Figure 3.2:** Oocyte maturation in *M. arenaria* induced with 5-HT at varying concentrations ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) and during different times (60, 90, 120 and 180 minutes). Each value indicates the mean  $\pm$  S.E. A Tukey test was performed using the concentrations of 5-HT ( $p < 0.05$ ). For each letter “a”, “b”, “c”, “d” and “e”, the mean percentage of GVBD for each concentration of 5-HT is significantly different from the others ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. Discussion

In this study we showed that serotonin induced a pharmacological response in *M. arenaria* oocytes. The concentrations of 5-HT allowing the highest percentage of oocytes to undergo GVBD were  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M as observed in *M. edulis* or *S. sachalinensis* (Osanai and Kuraishi, 1988; Varaksin et al., 1992). These concentrations are higher than the physiological concentrations of 5-HT found in the ganglia and in the gonads of bivalves species as *Argopecten purpuratus* (Martinez et al., 1996). However, they were used to allow the comparisons with other studies as Fong et al., 1994.

The exposure time tested allowing the highest percentage of oocytes without germinal vesicle (53%) was 180 minutes. This percentage is lower than the percentage (80%) found by Fong et al., 1994, 50 minutes after the application of  $10^{-4}$  M 5-HT on *D. polymorpha* oocytes. This difference between the two experiments may be due to the longer time required for 5-HT to penetrate through the gonad to the oocytes of *M. arenaria*. It is also possible that the 5-HT receptors number would be lower in the gonad and on the oocytes surface of the soft-shell clam.

Nerve cells containing serotonin and serotonergic fibers have been detected by immunohistochemistry in the cerebral and pedal ganglia of *M. arenaria* (Garnerot, personal communication). Moreover, serotonergic fibers have been immunohistochemically found, during all the gametogenic stages, around germinal follicles and in the muscular fibers of

gonad external epithelium of this soft-shell clam (Garnerot et al., 2006). The finding that 5-HT triggers the GVBD of oocytes in *M. arenaria* indicates that 5-HT synthesized in the ganglia could be conducted by serotonergic fibers from those ganglia to the gonad where it is responsible for the induction of GVBD of oocytes. This induction also points to the possible existence of 5-HT receptors in the gonad and on the oocytes surface of *Mya arenaria*, a topic that should be developed in future investigations.

### **3.5. Acknowledgments**

This work was supported by the CRSNG through the Discovery grant attributed to Jocelyne Pellerin. We thank Dr. Réjean Tremblay (ISMER, UQAR) for providing the light microscope and Image-Pro Plus software.

### 3.6. References

- Alvarado-Alvarez, R., Gould, M. C. and J. L. Stephano. 1996. Spawning, in vitro maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Tivela stultorum*. *The Biological Bulletin*, 190: 322-328.
- Deguchi, R. and K. Osanai. 1995. Serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase and from the first metaphase in oocytes of the marine bivalve *Hiatella flaccida*: respective changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> and pH. *Developmental Biology*, 171: 483-496.
- Fong, P. P., Duncan, J., Hardege, J. D. and J. L. Ram. 1994. "Birth control" in zebra mussels: inhibition and sex-specific activation of spawning by high affinity serotonergic ligands. *Proceedings of the fourth international zebra mussel conference, Madison, Wisconsin*, 61-71p.
- Fong, P. P. and M. Warner. 1995. Serotonin-induced parturition in the fingernail clam *Sphaerium (Musculium) transversum* (Say). *Journal of Experimental Zoology*, 272: 163-166.
- Fong, P. P., Deguchi, R. and K. Kyojuka. 1996. Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from central Japan. *Biological Bulletin*, 191: 27-32.
- Fong, P. P. 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biological Bulletin*, 194: 143-149.
- Garnerot, F., Pellerin, J., Blaise, C. and M. Mathieu. 2006. Immunohistochemical localization of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the gonad and digestive gland of *Mya arenaria* (Mollusca: Bivalvia). *General and Comparative Endocrinology*, 149: 278-284.
- Gibbons, M.C. and M. Castagna. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture*, 40: 189-191.
- Guerrier, P., Leclerc-David, C. and M. Moreau. 1993. Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of

- the bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*. *Developmental Biology*, 159: 474-484.
- Gobet, I., Durocher, Y., Leclerc, C.,  
Moreau M. and P. Guerrier. 1994. Reception and transduction of the serotonin signal responsible for meiosis reinitiation in oocytes of the japanese clam *Ruditapes philippinarum*. *Developmental Biology*, 164: 540-549.
- Hamida, L., Madhioub, M-N., Cochard, J. C. and P. Le Pennec. 2004. Evaluation of the effects of serotonin (5-HT) on oocyte competence in *Ruditapes decussatus* (Bivalvia, Veneridae). *Aquaculture*, 239: 413-420.
- Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A.L., Kanatani, H. and S.S. Koide. 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *Journal of Experimental Zoology*, 254: 318-321.
- Kadam, A.L. and S.S. Koide. 1989. Characterization of a factor with oocyte maturation inducing activity in *Spisula*. *Biological Bulletin*, 176: 8-13.
- Kadam, A. L and S.S. Koide. 1990. Stimulation of *Spisula* sperm motility by 5-hydroxytryptamine analogs. *Invertebrate Reproduction and Development*, 17: 33-37.
- Krantic, S., Guerrier, P. and F. Dubé. 1993. Meiosis reinitiation in surf clam oocytes is mediated via a 5-hydroxytryptamine<sub>5</sub> serotonin membrane receptor and a vitelline envelope-associated high affinity binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 7983-7989.
- Kyosuka, K., Deguchi, R., Yoshida, N. and M. Yamashita. 1997. Change in intracellular Ca<sup>2+</sup> is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Developmental Biology*, 182: 33-41.
- Leclerc, C., Guerrier, P. and M. Moreau. 2000. Role of dihydropyridine-sensitive calcium channels in meiosis and fertilization in the bivalve molluscs *Ruditapes philippinarum* and *Crassostrea gigas*. *Biology of the Cell*, 92: 285-299.



- Martinez, G., Saleh, F., Mettifogo, L., Campos, E. and N. Inestrosa. 1996. Monoamines and the release of gametes by the scallop *Argopecten purpuratus*. *Journal of Experimental Zoology*, 274: 365-372.
- Martinez, G., Olivares, A. Z. and L. Mettifogo. 2000. In vitro effects of monoamines and prostaglandins on meiosis reinitiation and oocyte release in *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Invertebrate Reproduction and Development*, 38: 61-69.
- Matsutani, T. and T. Nomura. 1984. Localization of monoamines in the central nervous system and gonad of the scallop *Pactinopecten yessoensis*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50: 425-430.
- O'Connor, W. A. and M. P. Heasman. 1995. Spawning induction and fertilisation in the doughboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperrima*. *Aquaculture*, 136: 117-129.
- Osanai, K. 1985. In vitro induction of germinal vesicle breakdown in oyster oocytes. *Bulletin of the Marine Biological Station of Asamushi, Tôhoku University*, 18: 1-9.
- Osanai, K. and R. Kuraishi. 1988. Response of oocytes to meiosis-inducing agents in pelecypods. *Bulletin of the Marine Biological Station of Asamushi, Tôhoku University*, 18:45-56.
- Paulet, Y-M., Donval, A. and F. Bekhadra. 1993. Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Invertebrate Reproduction and Development*, 23: 89-94.
- Ram, J. L., Fong, P., Croll, R. P., Nichols, S. J. and D. Wall. 1992. The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), a new pest in North America: reproductive mechanisms as possible targets of control strategies. *Invertebrate Reproduction and Development*, 22(1-3): 77-86.
- Ram, J. L., Crawford, G. W., Walker, J. U., Mojares, J. J., Patel, N., Fong, P. P. and Kyozuka, K. 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*); Activation by internal or external application of serotonin. *Journal of Experimental Zoology*, 265: 587-598.

- Ram, J. L., Fong, P. P. and D. W. Garton. 1996. Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning and fertilization. *American Zoologist*, 36: 326-338.
- Siniscalchi, A., Cavallini, S., Sonetti, D., Sbrenna, G., Capuano, S., Barbin, L., Turolla, E. and R. Rossi. 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. *Marine Biology*, 144: 1205-1212.
- Varaksin, A. A., Varaksina, G. S., Reunova, O. V. and N. A. Latyshev. 1992. Effect of serotonin, some fatty acids and their metabolites on reinitiation of meiotic maturation in oocytes of bivalve *Spisula sachalinensis* (Schrenk). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 101: 627-630.
- Welsh, J.H. and M. Moorhead. 1960. The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates, especially in their nervous systems. *Journal of Neurochemistry*, 6: 146-169.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Depuis quelques dizaines d'années, les monoamines, telles que la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline, sont très étudiées, notamment chez les invertébrés, parce qu'elles présentent un intérêt certain en physiologie et en neurobiologie. Chez les mollusques bivalves, il a été démontré que les catécholamines et la sérotonine ont des rôles dans différents processus physiologiques, tels que la reproduction. De plus, plusieurs équipes de recherche ont dosé et localisé, mais de façon non spécifique, les catécholamines dans les tissus nerveux et périphériques de bivalves. Dans notre première étude utilisant la technique de l'immunohistochimie, nous avons déterminé spécifiquement et avec précision, pour la première fois, la distribution de la dopamine et de la noradrénaline dans les trois paires de ganglion d'un bivalve, *M. arenaria*.

Le ganglion viscéral semble être la source majeure de dopamine suivi du ganglion pédieux alors que c'est le ganglion pédieux qui semble être la source principale de noradrénaline. Dans le ganglion viscéral, il est possible que les cellules dopaminergiques ne remplissent pas toutes les mêmes fonctions physiologiques. En effet, certaines pourraient agir localement comme, en transmettant une information nerveuse à un autre neurone, alors que d'autres pourraient à l'inverse avoir une action périphérique. Au contraire, il est probable que les cellules dopaminergiques et noradrénergiques du ganglion pédieux n'agissent que sur une seule et même fonction physiologique, soit la fonction digestive. La distribution des fibres nerveuses dopaminergiques dans les nerfs et connectifs des trois

paires de ganglion indique qu'il existe un flux net de dopamine entre les ganglions cérébraux et viscéraux et suggère un rôle de la dopamine dans la respiration, la contraction du pied et la nutrition de *M. arenaria*. De plus, la dopamine pourrait également être impliquée dans les processus de reproduction.

La distribution des cellules dopaminergiques dans les ganglions cérébraux et viscéraux de *M. arenaria* est contraire à la distribution des cellules sérotoninergiques, ce qui est en accord avec de nombreuses études ayant localisé et mis en évidence des rôles physiologiques opposés de ces monoamines. Cependant, dans les ganglions pédieux, les cellules immunoréactives à la dopamine, noradrénaline et sérotonine, distribuées de façon semblable, pourraient agir sur la même fonction physiologique, telle que la contraction du pied.

Cette première étude nous a donc permis de dresser pour la première fois une carte de la distribution des catécholamines dans les ganglions d'un bivalve, de faire des comparaisons avec la distribution d'une autre monoamine, la sérotonine, dans les mêmes ganglions et d'émettre des hypothèses quant à leurs rôles dans différents processus physiologiques. Il est désormais nécessaire de faire des études complémentaires afin de vérifier les hypothèses émises et d'avancer encore plus dans la compréhension des mécanismes régulant les processus physiologiques des mollusques bivalves.

Dans notre seconde étude, nous avons découvert qu'une application de sérotonine *in vitro* peut induire la dissolution de la vésicule germinale des ovocytes de *M. arenaria* et que cette réinitiation méiotique est dépendante du temps et de la concentration de sérotonine. Cette découverte confirme donc que la sérotonine synthétisée dans les ganglions de *M. arenaria* est conduite par des fibres sérotoninergiques jusqu'aux gonades où elle est impliquée dans les processus reproductifs.

Les organismes mâles et femelles sont respectivement au stade d2 et post-vitellogénique pendant une très courte période durant l'été et il est difficile de provoquer une deuxième maturation des organismes en automne. Nous avons réussi à créer deux protocoles de recherche sur: (1) la détermination de la mobilité des spermatozoïdes de *Mya arenaria*, de leur teneur en ATP et de leur activité enzymatique à différentes températures ainsi que la mise en évidence de l'influence de la sérotonine sur leur mobilité (Annexe 1) et (2) la mise en évidence de l'influence de pré-traitements stéroïdiens sur la dissolution de la vésicule germinale des ovocytes induite par la sérotonine chez *Mya arenaria* (Annexe 2). Cependant, nous n'avons pas eu la possibilité de les mettre en place. Ces protocoles sont donc des points de départ pour de nouvelles études portant sur la compréhension des mécanismes neurophysiologiques et endocriniens contrôlant la reproduction des mollusques bivalves.

## RÉFÉRENCES

- Aiello, E., Stefano, G. B. and E. J. Catapane. 1981. Dual innervation of the foot and the control of foot movement by the central nervous system in *Mytilus edulis* (bivalvia). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 69C: 25-30.
- Allen, R. D. 1953. Fertilization and artificial activation in the egg of the surf-clam, *Spisula solidissima*. *The Biological Bulletin*, 105: 213-239.
- Alvarado-Alvarez, R., Gould, M. C. and J. L. Stephano. 1996. Spawning, in vitro maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Tivela stultorum*. *The Biological Bulletin*, 190: 322-328.
- Anderson, W. A. and P. Personne. 1976. The Molluscan spermatozoon: Dynamic aspects of its structure and function. *American Zoologist*, 16: 293-313.
- Bandivdekar, A. H., Segal, S. J. and S. S. Koide. 1992. Binding of 5-hydroxytryptamine analogs by isolated *Spisula* sperm membrane. *Invertebrate Reproduction and Development*, 21: 43-46.
- Beiras, R. and J. Widdows. 1995. Effect of the neurotransmitters dopamine, serotonin and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae. *Marine Biology*, 122: 597-603.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, F. and P. D. Hansen. 1999. Determination of vitellogenin-like properties in (*Mya arenaria* Hemolymph Saguenay Fjord,) Canada: A potential biomarker for endocrine disruption. *Environmental Research*, 14: 455-465.
- Bonar, D. B., Coon, S. L., Walch, M., Weiner, R. M. and W. Fitt. 1990. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *Marine Science*, 46: 484-498.
- Burness, G., Moyes, C. D. and R. Montgomerie. 2005. Motility, ATP levels and metabolic enzyme activity of sperm bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140A: 11-17.

- Cann-Moissan, C., Nicolas, L. and R. Robert. 2002. Ontogenic changes in the contents of dopamine, norepinephrine and serotonin in larvae and postlarvae of the bivalve *Pecten maximus*. *Aquatic Living Resources*, 15: 313-318.
- Christen, R., Schackmann, R. W. and B. M. Shapiro. 1982. Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 14 881-14 890.
- Christen, R., Schackmann, R. W. and B. M. Shapiro. 1986. Ionic regulation of sea urchin sperm motility, metabolism and fertilizing capacity. *Journal of Physiology*, 379: 347-365.
- Colas, P. and F. Dubé. 1998. Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Cell and Developmental Biology*, 9: 539-548.
- Coon, S. L., Bonar, D. B. and R. M. Weiner. 1985. Induction of settlement and metamorphosis of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) by L-DOPA and catecholamines. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 94: 211-221.
- Cosson, M-P., Billard, R., Gatti, J. L. and R. Christen. 1985. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture*, 46: 71-75.
- Cottrell, G. A. 1967. Occurrence of dopamine and noradrenaline in the nervous tissue of some invertebrate species. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 29: 63-69.
- Croll, R. P., Too, C. K. L., Pani, A. K. and J. Nason. 1995. Distribution of serotonin in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 28: 125-135.
- Dahl, E., Falck, B., Von Mecklenburg, C., Myhrberg, H. and E. Rosengren. 1966. Neuronal localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in some mollusca. *Zeitschrift für Zellforschung*, 71: 489-498.
- De Biasi, S., Vitellaro-Zuccarello, L. and I. Blum. 1984. Histochemical localization of monoamines and cholinesterases in *Mytilus* pedal ganglion. *Histochemistry*, 81: 561-565.

- De Biasi, S. and L. Vitellaro-Zuccarello. 1987. Distribution of 5-HT-immunoreactivity in the pedal ganglion of *Mytilus galloprovincialis*. A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Research*, 249: 111-116.
- Deguchi, R. and K. Osanai. 1995. Serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase and from the first metaphase in oocytes of the marine bivalve *Hiatella flaccida*: respective changes in intracellular  $Ca^{2+}$  and pH. *Developmental Biology*, 171: 483-496.
- De Longcamp, D., Drosdowsky, M. and P. Lubet. 1970. Endocrinologie des invertébrés- Biosynthèse des stéroïdes chez les mollusques. Mise en évidence d'une  $17\beta$ -hydroxysteroïde déshydrogénase dans la gonade de *Mytilus edulis* L. (Mollusques bivalves). *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris -Série D*, 271: 1564-1566.
- De Longcamp, D., Lubet, P. and M. Drosdowsky. 1974. The in vitro biosynthesis of steroid by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *General and Comparative Endocrinology*, 22: 116-127.
- Dietz, T.H., Wilson, J.M. and H. Silverman. 1992. Changes in monoamine transmitter concentration in freshwater mussel tissues. *Journal of Experimental Zoology*, 261: 355-358.
- Etchian, O., Mathieu, M., Audet, C. and J. Pellerin. 2004. Sexual maturation and related changes in aspartate transcarbamylase activity in gonadic tissues of the soft shell clam (*Mya arenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139B: 287-297.
- FAO. 2001. Fishery statistics: aquaculture production (1999). FAO Fisheries Series No 58/FAO Statistics Series No 160, Rome.
- Fong, P.P., Noordhuis, R. and J. L. Ram. 1993. Dopamine reduces intensity of serotonin-induced spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *The Journal of Experimental Zoology*, 266: 79-83.
- Fong, P.P., Duncan, J. and J.L. Ram. 1994. Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Experientia*, 50: 506-509.



- Fong, P. P., Deguchi, R. and K. Kyojuka. 1996. Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from central Japan. *The Biological Bulletin*, 191: 27-32.
- Fong, P. P. 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *The Biological Bulletin*, 194: 143-149.
- Franzen, A. 1956. On spermiogenesis, morphology of spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. *Zoologiska bidrag från Uppsala*, 31: 355-482.
- Franzen, A. 1987. Spermatogenesis. Chapter I in *Reproduction of marine invertebrates*. Volume IX. General aspects: seeking unity in diversity. Blackwell scientific publications, Palo Alto, California and The Boxwood Press, Pacific grove, California.
- Gabe, M. 1955. Particularités histologiques des cellules neurosécrétrices chez quelques Lamellibranches. *Conférences-Académie polonaise des sciences, Centre scientifique à Paris*, 240: 1810-1812.
- Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S. and P. D. Hansen. 2001. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128C: 213-225.
- Garnerot, F., Pellerin, J., Blaise, C. and M. Mathieu. 2006. Immunohistochemical localization of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the gonad and digestive gland of *Mya arenaria* (Mollusca: Bivalvia). *General and Comparative Endocrinology*, 149: 278-284.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C. and F. Gagné. 2002. Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comparative Biochemistry and Physiology*. 131: 457-467.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J. and J. C. Amiard. 2006. Estradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 145: 133-139.
- Gibbons, M.C. and M. Castagna. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture*, 40: 189-191.

- Glennon, R.A., Dukat, M. and R. B. Westkaemper. 2000. Serotonin receptor subtypes and ligands. *Psychopharmacology -The Fourth Generation of Progress. Part I. Preclinical section.*
- Guerrier, P., Leclerc-David, C. and M. Moreau. 1993. Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc *Ruditapes phillipinarum*. *Developmental Biology*, 159: 474-484.
- Gobet, I., Durocher, Y., Leclerc, C. Moreau M. and P. Guerrier. 1994. Reception and transduction of the serotonin signal responsible for meiosis reinitiation in oocytes of the japanese clam *Ruditapes philippinarum*. *Developmental Biology*, 164: 540-549.
- Greenberg, M. J. 1960. The responses of the *Venus* heart to catecholamines and high concentrations of 5-hydroxytryptamine. *British Journal of Pharmacology*, 15: 365-374.
- Hamamah, S. and J-L. Gatti. 1998. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction*, 13 (Supp.4): 20-30.
- Hamida, L., Madhioub, M-N., Cochard, J. C. and P. Le Pennec. 2004. Evaluation of the effects of serotonin (5-HT) on oocyte competence in *Ruditapes decussatus* (Bivalvia, Veneridae). *Aquaculture*, 239: 413-420.
- Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A.L., Kanatani, H. and S.S. Koide. 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *The Journal of Experimental Zoology*, 254: 318-321.
- Illanes-Bücher, J. 1979. Recherches cytologiques et expérimentales sur les neurosécrétions de la moule *Mytilus edulis L.* Thèse de doctorat, Université de Caen, UFR des Sciences de la Vie et du Comportement, 149 p.
- Illanes-Bücher, J. and P. Lubet. 1980. Étude de l'activité neurosécrétoire au cours du cycle sexuel annuel de la moule (*Mytilus edulis L.*) Mollusque Lamellibranches. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 105 : 141-145.

- Jones, H. D. and O. G. Richards. 1993. The effects of acetylcholine, dopamine and 5-hydroxytryptamine on water pumping rate and pressure in the mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 170: 227-240.
- Kadam, A.L. and S.S. Koide. 1989. Characterization of a factor with oocyte maturation inducing activity in *Spisula*. *The Biological Bulletin*, 176: 8-13.
- Kadam, A. L and S.S. Koide. 1990. Stimulation of *Spisula* sperm motility by 5-hydroxytryptamine analogs. *Invertebrate Reproduction and Development*, 17: 33-37.
- Kadam, P.A., Kadam, A.L., Segal, S.J. and S.S. Koide. 1991. Functional serotonin receptor sites on atlantic surfclam *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1817) oocyte and sperm. *Journal of Shellfish Research*, 10: 215-219.
- Khotimchenko Yu. S. and I. I. Deridovitch. 1989. The effect of dopamine and galoperidol on cAMP in the gonad of the bivalve molluscs *Mizuhopecten yessoensis* and the sea urchin *Strongylocentrotus intermidius*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 92C: 23-36.
- Khotimchenko Yu. S. 1991. Biogenic monoamines in oocytes of echinoderms and bivalve molluscs. A formation of intracellular regulatory systems in oogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C: 671-675.
- Krantic, S., Guerrier, P. and F. Dubé. 1993. Meiosis reinitiation in surf clam oocytes is mediated via a 5-hydroxytryptamine<sub>5</sub> serotonin membrane receptor and a vitelline envelope-associated high affinity binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 7983-7989.
- Kyosuka, K., Deguchi, R., Yoshida, N. and M. Yamashita. 1997. Change in intracellular  $Ca^{2+}$  is not involved in serotonin-induced meiosis reinitiation from the first prophase in oocytes of the marine bivalve *Crassostrea gigas*. *Developmental Biology*, 182: 33-41.
- Lacoste, A., Malham, S. K., Cueff, A., Jalabert, F., Gelebart, F. and S. A. Poulet. 2001a. Evidence for a form of adrenergic response to stress in the mollusc *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology*, 204: 1247-1255.

- Lacoste, A., Malham, S. K., Cueff, A. and S. A. Poulet. 2001b. Stress-induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Crassostrea gigas*. *General and Comparative Endocrinology*, 122: 181-188.
- Lacoste, A., Malham, S. K., Cueff, A. and S. A. Poulet. 2001c. Noradrenalin modulates hemocyte reactive oxygen species production via  $\beta$ -adrenergic receptors in the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 285-289.
- Lacoste, A., Malham, S. K., Cueff, A. and S. A. Poulet. 2001d. Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via  $\beta$ -adrenergic receptor-cAMP signalling pathway. *General and Comparative Endocrinology*, 122: 252-259.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S. K., Cueff, A. and S. A. Poulet. 2001e. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2304-2309.
- Lacoste, A., Malham, S. K., Cueff, A. and S. A. Poulet. 2002. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate  $\beta$ -adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *Journal of Cell Science*, 115: 761-768.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and R. A. Patzner. 1996. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15:167-179.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. and R. A. Patzner. 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, 163: 163-181.
- Leclerc, C., Guerrier, P. and M. Moreau. 2000. Role of dihydropyridine-sensitive calcium channels in meiosis and fertilization in the bivalve molluscs *Ruditapes philippinarum* and *Crassostrea gigas*. *Biology of the Cell*, 92: 285-299.
- Li, Q., Osada, M., Suzuki, T. and K. Mori. 1998. Changes in vitellin during oogenesis and effect of oestradiol-17 $\beta$  on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 33: 87-93.

- Lubet, P., 1955. Cycle neurosécrétoire de *Chlamys varia* L. et *Mytilus edulis* L. Conférences -Académie polonaise des sciences, Centre scientifique à Paris, 241: 119-121.
- Lubet, P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (Moll. Bivalves). Rev. Trav. I. S. T. P. M., Paris, 23: 387-548.
- Lubet, P., 1960. Essai d'analyse expérimentale des perturbations produites par l'ablation des ganglions nerveux chez *Mytilus edulis* L. et *Mytilus galloprovincialis*. Lmk. Annales d'Endocrinologie, Paris, 27: 353-365.
- Lubet, P. and M. Mathieu. 1990. Les régulations endocriniennes chez les Mollusques bivalves. Année Biologique, 29: 235-252.
- Malanga, C.J., Wenger, G.R. and E.L. Aiello. 1972. Endogenous dopamine in bivalve gills. Comparative Biochemistry and Physiology, 43A: 825-830.
- Malanga, C. J. 1974. Effects of dopamine on anaerobic metabolism and ciliary activity in bivalve gills. Comparative and General Pharmacology, 5: 51-59.
- Malanga, C.J. 1975. Dopaminergic stimulation of frontal ciliary activity in the gill of *Mytilus edulis*. Comparative Biochemistry and Physiology, 51C: 25-34.
- Martinez, G. and A. Rivera. 1994. Role of monoamines in the reproductive process of *Argopecten purpuratus*. Invertebrate Reproduction and Development, 25: 167-174.
- Martinez, G., Saleh, F., Mettifogo, L., Campos, E. and N. Inestrosa. 1996a. Monoamines and the release of gametes by the scallop *Argopecten purpuratus*. The Journal of Experimental Zoology, 274: 365-372.
- Martinez, G., Garrote, C., Mettifogo, L., Pérez, H. and E. Uribe. 1996b. Monoamines and prostaglandins E2 as inducers of the spawning of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. Journal of Shellfish Research, 15: 245-249.
- Martinez, G., Olivares, A. Z. and L. Mettifogo. 2000. In vitro effects of monoamines and prostaglandins on meiosis reinitiation and oocyte release in *Argopecten purpuratus* Lamarck. Invertebrate Reproduction and Development, 38: 61-69.

- Masseau, I., Bannon, P., Anctil, M. and F. Dubé. 2002. Localization and quantification of gonad serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Biological Bulletin*, 202: 23-33.
- Mathieu, M. 1991. The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, 94: 213-223.
- Matsutani, T. and T. Nomura. 1984. Localization of monoamines in the central nervous system and gonad of the scallop *Pactinopecten yessoensis*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50: 425-430.
- Matsutani, T. and T. Nomura. 1986a. Pharmacological observations on the mechanism of spawning in the scallop *Pactinopecten yessoensis*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52: 1589-1594.
- Matsutani, T. and T. Nomura. 1986b. Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Cell and Tissue Research*, 244: 515-517.
- Martinez, G., Saleh, F., Mettifogo, L., Campos, E. and N. Inestrosa. 1996a. Monoamines and the release of gametes by the scallop *Argopecten purpuratus*. *Journal of Experimental Zoology*, 274: 365-372.
- Martinez, G., Garrote, C., Mettifogo, L., Pérez, H. and E. Uribe. 1996b. Monoamines and prostaglandin E2 as inducers of the spawning of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Journal of Shellfish Research*, 15: 245-249.
- Martinez, G., Olivares, A. Z. and L. Mettifogo. 2000. In vitro effects of monoamines and prostaglandins on meiosis reinitiation and oocyte release in *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Invertebrate Reproduction and Development*, 38: 61-69.
- Matsumoto, T., Osada, M., Osawa Y. and K. Mori. 1997. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118: 811-817.
- Mojares, J. J., Stachecki, J. J., Kyojura, K., Armant, D. R. and J. L. Ram. 1995. Characterisation of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) sperm morphology and their mobility prior to and after spawning. *The Journal of Experimental Zoology*, 273: 257-263.

- Mori, K., Tamate, H. and K. Imai. 1965a. Presence of  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the tissues of maturing oysters. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 15: 269-277.
- Mori, K., Tamate, H. and K. Imai. 1965b. Presence of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in tissues of maturing oysters. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 16: 147-153.
- Mori, K., Tamate, H. and K. Imai. 1966. Histochemical study on the change of 17-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the oyster during the states of sexual maturation and spawning. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 17: 179-191.
- Mori, K. 1969. Effect of steroid in oyster-IV. Acceleration of sexual maturation in female *Crassostrea gigas* by estradiol-17 $\beta$ . *Bulletin Japanese Society Scientific Fisheries*, 35: 1077-1079.
- O'Connor, W.A. and M.P. Heasman. 1995. Spawning induction and fertilisation in the doughboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperrima*. *Aquaculture*, 136: 117-129.
- Osada, M., Matsutani, T. and T. Nomura. 1987. Implication of catecholamines during spawning in marine bivalve molluscs. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 12: 241-252.
- Osada, M., and T. Nomura. 1989. Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 93C: 171-173.
- Osada, M., Mori, K. and T. Nomura. 1992. In vitro effects of estrogen and serotonin on release of eggs from the ovary of the scallop. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 223-227.
- Osada, M., Nakata, A., Matsumoto, T. and K. Mori. 1998. Pharmacological characterization of serotonin receptor in the oocyte membrane of bivalve molluscs and its formation during oogenesis. *Journal of Experimental Zoology*, 281A: 124-131.
- Osada, M., Takamura, T., Sato, H. and K. Mori. 2003. Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: control by estradiol-17 $\beta$  and the central nervous system. *Journal of Experimental Zoology*, 299A: 172-179.

- Osanai, K. 1985. In vitro induction of germinal vesicle breakdown in oyster oocytes. Bulletin of the Marine Biological Station of Asamushi, Tôhoku University, 18: 1-9.
- Osanai, K. and R. Kuraishi. 1988. Response of oocytes to meiosis-inducing agents in pelecypods. Bulletin of the Marine Biological Station of Asamushi, Tôhoku University, 18:45-56.
- Pani, A. K. and R. P. Croll. 1995. Distribution of catecholamines, indoleamines, and their precursors and metabolites in the scallop, *Placopecten magellanicus* (Bivalvia, Pectinidae). Cellular and Molecular Neurobiology, 15: 371-386.
- Paparo, A. and E. Aiello. 1970. Cilio-inhibitory effects of branchial nerve stimulation in the mussel, *Mytilus edulis*. Comparative and General Pharmacology, 1: 241-250.
- Paparo, A. 1988. Ciliary activity in the ctenidium of bivalve molluscs. Comparative Biochemistry and Physiology, 91C: 99-110.
- Parisi, E., De Prisco, P., Capasso, A. and M. Del Prete. 1984. Serotonin and sperm motility. Cell Biology International Reports, 8: 95.
- Paulet, Y-M., Donval, A. and F. Bekhadra. 1993. Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. Invertebrate Reproduction and Development, 23: 89-94.
- Perchec, G., Jeulin, C., Cosson, J., André, F. and R. Billard. 1995. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. Journal of Cell Science, 108: 747-753.
- Ram, J. L., Fong, P., Croll, R. P., Nichols, S. J. and D. Wall. 1992. The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), a new pest in North America: reproductive mechanisms as possible targets of control strategies. Invertebrate Reproduction and Development, 22: 77-86.
- Ram, J. L., Crawford, G. W., Walker, J. U., Mojares, J. J., Patel, N., Fong, P. P., and K. Kyozyuka. 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Activation



- by internal or external application of serotonin. *Journal of Experimental Zoology*, 265: 587-598.
- Ram, J. L., Fong, P. P. and D. W. Garton. 1996. Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning and fertilization. *American Zoologist*, 36: 326-338.
- Reis Henriques, M. A. and J. Coimbra. 1990. Variations in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95A: 343-348
- Roseberry, L. Vincent, B. and C. Lemaire. 1991. Croissance et reproduction de *Mya arenaria* dans la zone intertidale de l'estuaire du Saint Laurent. *Canadian Journal of Zoology*, 69: 724-732.
- Rouse, G.W. and B. G. M. Jamieson. 1987. An ultrastructural study of the spermatozoa of the polychaetes *Eurorhoc complanata* (Amphinomidae), *Clymenella* sp. and *Micromaldane* sp. (Maldanidac), with definition of sperm types in relation to reproductive biology. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 19: 573-584.
- Scott, A. P. and S. M. Baynes. 1980. A review of the biology, handling storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish. Biology*, 17: 707-739.
- Siah, A., Pellerin, J., Benosman, A., Gagné, J-P. and J-C. Amiard. 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132A: 499-511.
- Siah, A., Pellerin, J., Amiard, J. C., Pelletier, E. and L. Viglino. 2003. Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology and Pharmacology*, 135C: 145-156.

- Siniscalchi, A., Cavallini, S., Sonetti, D., Sbrenna, G., Capuano, S., Barbin, L., Turolla, E. and R. Rossi. 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. *Marine Biology*, 144: 1205-1212.
- Smith, JR. 1982. A survey of endogenous dopamine and serotonin in ciliated and nervous tissues of five species of marine bivalves, with evidence for specific, high-affinity dopamine receptors in ciliated tissue of *Mytilus californianus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 71C: 57-61.
- Smith, J.R. 1987. The role of the nervous system in algae-induced gamete release by *Mytilus californianus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86: 215-218.
- Smith, S.A., Nason, J. and R. P. Croll. 1998. Distribution of catecholamines in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Canadian Journal of Zoology*, 76: 1254-1262.
- Stefano, G.B. and E. Aiello. 1975. Histofluorescent localization of serotonin and dopamine in the nervous system and gill of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *The Biological Bulletin*, 148: 141-156.
- Stefano, G. B., Captane, E. J. and E. Aiello. 1976. Dopaminergic agents : influence on serotonin in the molluscan nervous system. *Science*, 194: 539-541.
- Stefano, G. B., Catapane, E. J. and J. M. Stefano. 1977. Temperature dependent ciliary rhythmicity in *Mytilus edulis* and effects of monoaminergic agents on its manifestation. *The Biological Bulletin*, 153: 618-629.
- Stefano, G.B. and E.J. Catapane. 1980. Norepinephrine: its presence in the central nervous system of the bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Zoology*, 214: 209-213.
- Sweeney, D. 1963. Dopamine: Its occurrence in Molluscan ganglia. *Science* 139: 1051.

- Sweeney, D. 1968. The anatomical distribution of monoamines in a fresh-water bivalve mollusc, *Sphaerium sulcatum*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2: 601-613.
- Tierney, A. J. 2001. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128A: 791-804.
- Togo, T., Deguchi, R., and K. Osanai. 1993. Meiotic maturation and early development in the marine bivalve *Hiatella flaccida*. *Marine Biological Station of Asamushi Tohoku University*, 19: 41-47.
- Varaksin, A. A., Varaksina, G. S., Reunova, O. V. and N. A. Latyshev. 1992. Effect of serotonin, some fatty acids and their metabolites on reinitiation of meiotic maturation in oocytes of bivalve *Spisula sachalinensis* (Schrenk). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101C: 627-630.
- Varaksina, G. S. and A. A. Varaksin. 1992. Effect of estradiol, progesterone, and testosterone on oogenesis of yezo scallop. *Biologiya Morya*, 3: 61-68.
- Varaksina, G. S., Varaksin, A. A. and L. A. Maslennikova. 1993. Role of sex steroid hormones in spermatogenesis of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Biologiya Morya*, 1-2: 77-83.
- Vitellaro-Zuccarello, S., De Biasi, S., Bernardi, P. and A. Oggioni. 1991. Distribution of serotonin-, gamma-aminobutyric acid- and substance P-like immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of *Mytilus galloprovincialis*. *Tissue and Cell*, 23: 261-270.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J.V., Brandt, I. and A.D. Vethaak. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical reviews in toxicology*, 30: 71-133.

- Wang, C. 2000. Roles of sex steroids on reproduction of the sea scallop. PhD thesis. Department of Physiology and Biophysics. Dalhousie University, Halifax. 274 pp.
- Wang, C. and R. P. Croll. 2003. Effects of sex steroids on in vitro gamete release in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 44: 89-100.
- Wang, C. and R. P. Croll. 2004. Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*, 238: 483-498.
- Wang, C. and R. P. Croll. 2006. Effects of sex steroids on spawning in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*, 256: 423-432.
- Welsh, J.H. and M. Moorhead. 1960. The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates, especially in their nervous systems. *Journal of Neurochemistry*, 6: 146-169.
- Whitaker, M. 1996. Control of meiotic arrest. *Reviews of Reproduction*, 1: 127-135.
- Zhu, W., Mantione, K., Jones, D., Salamon, E., Cho, J. J., Cadet, P. and G. B. Stefano. 2003. The presence of 17 $\beta$ -estradiol in *Mytilus edulis* gonadal tissues: evidence for 17  $\beta$ -estradiol isoforms. *Neuroendocrinology Letters*, 24: 137-140.

**ANNEXE 1 : PROTOCOLE PERMETTANT LA DÉTERMINATION DE LA  
MOBILITÉ DES SPERMATOZOÏDES DE *MYA ARENARIA*, DE LEUR TENEUR  
EN ATP ET DE LEUR ACTIVITÉ ENZYMATIQUE À DIFFÉRENTES  
TEMPÉRATURES AINSI QUE MISE EN ÉVIDENCE DE L'INFLUENCE DE LA  
SÉROTONINE SUR LEUR MOBILITÉ**

## PROTOCOLE

### *Préparation des solutions :*

- **Solution de sérum albumine bovine (BSA) :** 6mg BSA/ml d'eau de mer
- **Solution A:**
  - 10,7  $\mu$ L de KCl 2M
  - 58,7  $\mu$ L de 1M de KOH
  - 10,7  $\mu$ L de tris saturé
- **Solution B:** pH= 7,1
  - 200mM de tréhalose
  - 100mM de sucrose
  - 20mM d'EDTA
  - 100mM d'imidazole

### *Utilisation et Paramètres du spermographe :*

- **Utilisation pour les expériences d'un spermographe :** microscope possédant une chambre à température contrôlée et étant relié à une caméra, elle-même reliée à un ordinateur possédant le système d'analyse des spermatozoïdes assisté par ordinateur (*Computer Assisted Sperm Analysis system* ou CASA) de Hamilton-Thorne Biosciences (CEROS 12.1).
- **Paramètres analysés pour chaque échantillon :** le pourcentage de mobilité, la vitesse curviligne (VCL correspondant à la distance que la tête du spermatozoïde couvre pendant la période d'observation,  $\mu$ m/s), la vitesse moyenne sur le chemin parcouru (VAP correspondant à la distance que le spermatozoïde effectue dans la direction du mouvement pendant la période d'observation,  $\mu$ m/s), la vitesse linéaire (VSL correspondant à la distance en ligne droite entre les points de départ et de fin du trajet, divisée par le temps d'observation, cela équivalant à la distance nette

effectuée pendant le temps d'observation,  $\mu\text{m/s}$ ) et la rectitude (STR)  $((\text{VSL}/\text{VAP}) \cdot 100)$ .

**Tableau 4.1** Réglages des paramètres pour le dépistage des spermatozoïdes de *M. arenaria* par l'utilisation du système CASA

Paramètres	Réglages
Taux de capture d'images (images/sec)	60
Durée de la prise d'images (images)	30
Taille minimale des cellules (pixels)	10
Vitesse des cellules en progression (VAP) ( $\mu\text{s}$ )	90
Rectitude (STR) (%)	50
Vitesse maximale des cellules se déplaçant lentement et étant considérées comme statique (VAP) ( $\mu\text{s}$ )	30
Vitesse maximale des cellules se déplaçant lentement et étant considérées comme statique (VSL) ( $\mu\text{s}$ )	25

### ***Obtention des spermatozoïdes :***

- 1. Détermination des stades de maturité** des individus mâles par microscopie optique.
- 2. Obtention directe des spermatozoïdes :** mise des gonades mâles matures (stade d2) dépourvues de leur glande digestive dans 1mL de BSA à température contrôlée. Agiter faiblement les vials afin de permettre la sortie des spermatozoïdes.

***Préparation des spermatozoïdes en vue des analyses à 15°C (ou 22°C) :***

- 1. Diviser la gonade en deux parties égales.**
- 2. Test de mobilité des spermatozoïdes :** placer une partie de la gonade dans un vial A contenant 1ml de BSA (Temps 0).
- 3. Détermination du niveau d'ATP et de l'activité métabolique des enzymes :** diviser la seconde partie de la gonade en deux et placer chacune des partie dans des vials avec 0, 5 ml de BSA (Temps 0).  
(vial B pour le test des niveaux d'ATP et vial C pour le test d'activité métabolique)

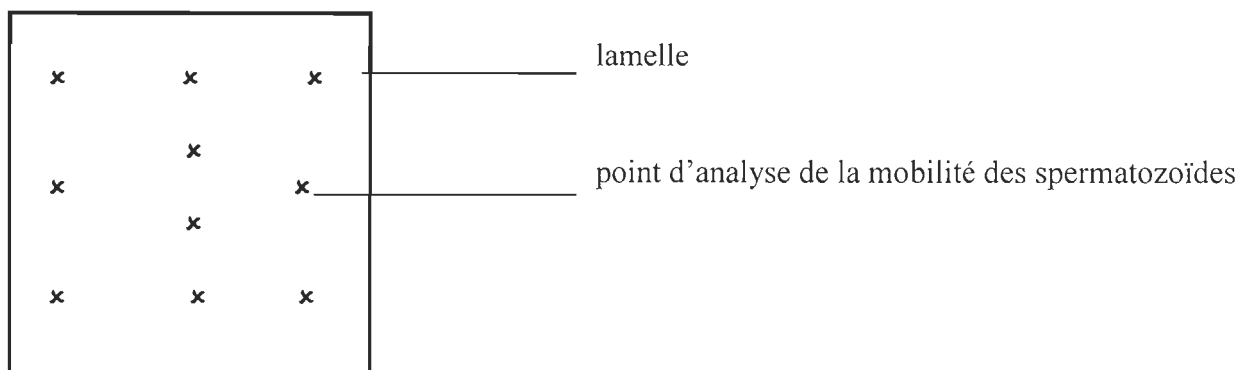
→ Placer immédiatement les vials dans un bain-marie à 15°C et agiter une dizaine de secondes.

***Analyses de la mobilité des spermatozoïdes :***

- 1. T= 5 minutes :** prendre un aliquot de 6, 5  $\mu$ l du vial A. Déposer l'aliquot sur une lame de microscope conservée à 15°C et recouvrir d'une lamelle. (L'utilisation de micro chambres de 20 $\mu$ m d'épaisseur ou de lame et lamelle ne change en rien la mobilité des spermatozoïdes).
- 2. T= 6 minutes :** 1 minute après la pause de la lamelle, déterminer la mobilité des spermatozoïdes.

→ Afin de couvrir l'ensemble de la lame pour l'estimation de la mobilité des spermatozoïdes, 10 champs par lame doivent être arbitrairement choisis (Fig. 4.1). Le nombre moyen de cellules par image doit être d'environ 100.





**Figure 4.1:** Représentation des zones de l'échantillon étudiées par le système d'analyse d'images CASA.

→ Dans certains cas, des dilutions complémentaires seront nécessaires afin de garder le nombre de cellules constant.

**Analyser la mobilité des spermatozoïdes :** 5 minutes, 6 heures puis toutes les 12 heures après le temps 0, et cela, pendant 42 heures.

***Détermination des niveaux d'ATP dans les spermatozoïdes (tiré de Burness et al., 2005) :***

1. **T= 30 secondes :** Ajouter 5  $\mu\text{l}$  de sperme (vial B) à 195  $\mu\text{l}$  d'acide perchlorique à 3,1%.
2. **Centrifuger** 2 minutes à 15 000g.
3. **Neutraliser** 180  $\mu\text{L}$  du surnageant par la solution A et ajouter une quantité infime de phénol rouge.
4. **Congeler** les extraits à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

***Analyses du métabolisme des spermatozoïdes (tiré deBurness et al., 2005) :***

1. **T= 2 minutes** : placer 500  $\mu\text{L}$  de sperme du vial C dans un eppendorf contenant 500  $\mu\text{L}$  de la solution de cryopréservation B.
2. **Placer les eppendorfs à  $-80^{\circ}\text{C}$**

***Influence de la sérotonine sur la mobilité des spermatozoïdes :***

1. Prendre deux aliquots de 20  $\mu\text{l}$  du vial A à  $15^{\circ}\text{C}$  et les placer dans 2 eppendorfs.
2. Ajouter 20  $\mu\text{l}$  d'ASW à un aliquot et 20  $\mu\text{l}$  de 5-HT à 1 mM au second aliquot (concentration finale 5-HT=  $5.10^{-4}$  M).
3. Analyser immédiatement la mobilité des spermatozoïdes.

→ Faire les mêmes expériences à  $22^{\circ}\text{C}$ .

**ANNEXE 2 : PROTOCOLE PERMETTANT LA MISE EN ÉVIDENCE DE  
L'INFLUENCE DE PRÉ-TRAITEMENTS STÉROÏDIENS SUR LA DISSOLUTION  
DE LA VÉSICULE GERMINALE DES OVOCYTES INDUITE PAR LA  
SÉROTONINE CHEZ *MYA ARENARIA***

## PROTOCOLE

### *Préparation des solutions :*

- **ASW** : ajout de 3g de Instant Océan (sans N-P) dans 100mL (pH 8-8,2) (30-32ppm)
- **Solution témoin** : 0,5% d'éthanol absolu dans ASW
- **Solutions mères stéroïdiennes  $10^{-4}$  M** :
  1. dissoudre premièrement les stéroïdes dans de l'éthanol absolu
  2. diluer avec ASW à  $10^{-4}$  M
  3. diluer pour obtenir les solutions filles ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$  et  $10^{-12}$  M)
- **Solution mère de sérotonine  $10^{-2}$  M** :
  1. dissoudre la sérotonine dans ASW
  2. diluer pour obtenir la solution fille à  $10^{-4}$  M

→ **garder à l'obscurité pour éviter l'oxydation**

### *Dissection :*

1. Déterminer avec un microscope optique le stade de maturité des organismes
2. Disséquer les gonades femelles au stade post-vitellogénique
3. Couper les gonades en morceaux de taille et de poids équivalents

***Tests de pré-traitement des ovocytes avec différents stéroïdes (oestradiol-17 $\beta$ , testostérone et progestérone) :***

1. **T= 0 : Pré-traitement des morceaux de gonades avec différentes concentrations de stéroïdes** → déposer les morceaux de gonade dans les puits d'une plaque de microtitration et ajouter 1mL de stéroïdes (P, T ou E<sub>2</sub>) aux différentes concentrations ou 1mL de solution témoin. Laisser incubé 2h à 15°C.
2. **T= 2h Pipeter les solutions stéroïdienne ou témoin**
3. **Fixation** : ajouter du formalin 2% à la moitié des morceaux de gonade expérimentaux et témoin à 4°C (1h minimum).
4. **Ajout de sérotonine** 10<sup>-4</sup> M pendant 3 heures à la moitié des puits restants.
5. **T= 5h : Pipeter les solutions contenant la sérotonine**
6. **Fixation** : ajouter du formalin 2% aux gonades ayant été incubées avec la sérotonine à 4°C (1h minimum).
7. **Observations des ovocytes avec ou sans vésicule germinale** : effectuer un frottis sur chaque morceau de gonade et compter de 50 à 250 ovocytes par lame grâce à un microscope optique (×40).

**→ Chaque expérience doit être effectuée en quintuple, avec chaque replicat provenant d'un organisme différent.**

