

2M11.2790.1

Université de Montréal

Localisation et quantification de la sérotonine au cours de la gamétogénèse
chez la palourde, *Spisula solidissima*

par

Isabelle Masseur

Département des sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biologiques

août, 1999

© Isabelle Masseur, 1999



QH

302

U54

2000

v.004



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire de maîtrise intitulé:

«Localisation et quantification de la sérotonine au cours de la gamétogénèse
chez la palourde, *Spisula solidissima*»

Présenté par:
Isabelle Masseau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Thérèse Cabana	Présidente-rapporteure
Dr. François Dubé	Directeur de recherche
Dr. Michel Anctil	Co-Directeur
Dr. Laurent Descarries	Membre du jury

SOMMAIRE

La palourde de l'Atlantique, *Spisula solidissima* est un mollusque bivalve très prisé comme ressource commerciale pour la consommation humaine. Cet attrait envers ce pélécy-pode marin a donné lieu, durant ces quarante dernières années, à de nombreuses études visant, tout d'abord, à mieux connaître la biologie de cette espèce et, deuxièmement, à développer une voie d'approvisionnement complémentaire, l'aquiculture. Ces études, ajoutées aux connaissances déjà acquises vers les années 1950, lors d'expériences dans lesquelles la palourde était utilisée comme modèle en biologie de la fécondation, permettent aujourd'hui de bien connaître cette espèce. En 1984, la palourde a été utilisée dans une étude montrant que la sérotonine exogène, lorsqu'injectée dans les gonades, induit la ponte. Il en est de même chez cinq autres espèces de bivalves. Par la suite, plusieurs autres études, réalisées chez ce lamellibranche, se sont ajoutées et ont montré que la sérotonine pouvait aussi, à de faibles concentrations, faciliter l'activation de l'ovocyte par le spermatozoïde et, à de fortes concentrations, déclencher la reprise de la méiose, *in vitro*. Ensuite, un groupe de chercheurs a mis en évidence la présence de récepteurs à la sérotonine à la surface des ovocytes de *Spisula*. Dès lors, la sérotonine, déjà connue pour être présente dans le système nerveux central de la palourde, s'est révélé un candidat physiologique susceptible d'être impliqué dans la ponte chez cette espèce.

Dans ce travail, à l'aide des techniques d'immunohistochimie et de chromatographie liquide à haute pression, nous avons montré que la sérotonine est présente dans les gonades de la palourde chez les deux sexes. Elle est contenue dans des projections nerveuses variqueuses qui enveloppent toute la gonade. En coupe, celles-ci apparaissent donc, à l'extérieur de l'acinus, couvrant entièrement l'épithélium

germinatif. Cette innervation sérotoninergique est présente, telle que présumée, durant le stade de ponte, ce qui suggère que la sérotonine pourrait être physiologiquement impliquée dans la ponte. Par contre, sa présence ne se limite pas simplement à ce stade, mais elle est présente durant tout le cycle gamétogénétique. L'étroite relation entre la concentration de sérotonine dans la gonade et la masse totale de cette dernière suggère que la quantité de sérotonine demeure relativement stable et à un niveau appréciable durant tout le cycle gamétogénétique. À l'examen microscopique, cette hypothèse est appuyée par la relation entre la masse totale de la gonade et son innervation sérotoninergique puisque cette dernière varie selon la multiplication et l'accroissement des cellules sexuelles, dépourvues de sérotonine, dans les acini.

En somme, la présence de la sérotonine dans la gonade est en accord avec son rôle présumé dans le déclenchement de la ponte. De plus, sa présence durant les divers stades du cycle gamétogénétique suggère une implication de la sérotonine dans d'autres fonctions reproductrices dont entre autres, la fécondabilité de l'ovocyte par le spermatozoïde. De quelle façon la sérotonine intervient-elle durant la ponte et dans les autres fonctions au sein de la gonade ? Quelles sont les cellules-cibles de la sérotonine ? Comment s'effectue sa régulation, soit au niveau de sa libération et/ou de sa liaison avec un récepteur gonadique spécifique, sont des questions qui devront être résolues dans un prochain avenir.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
1.0 INTRODUCTION.....	1
1.1 Description de la palourde, <i>Spisula solidissima</i>	1
1.1.1 Distribution et aquiculture.....	1
1.1.2 Biologie et écologie	2
1.1.3 Anatomie du système reproducteur	3
1.1.4 Cycle de reproduction	6
1.1.5 Système nerveux	9
1.2 Facteurs influençant le cycle reproducteur et la ponte	12
1.2.1 Facteurs exogènes.....	13
1.2.2 Facteurs endogènes	14
1.3 Distribution et fonctions connues de la sérotonine dans le règne animal	15
1.4 Rôle de la sérotonine dans la reproduction des bivalves	15
1.4.1 Induction de la ponte par la sérotonine	16
1.4.2 Induction de la ponte par des analogues de la sérotonine	17
1.4.3 Reprise de la méiose.....	18
1.4.4 Facilitation de la fécondation.....	20
1.4.5 Récepteurs à sérotonine sur les ovocytes	20
1.4.6 Implication physiologique.....	21
1.5 Localisation et quantification de la sérotonine au sein du système nerveux et du système reproducteur des mollusques.....	22
1.5.1 Système nerveux	23
1.5.2 Système reproducteur	24
1.5.2.1 Localisation.....	24
1.5.2.2 Quantification.....	26
1.5.2.3 Variation saisonnière	26
1.6 Objectifs de l'étude	28

2.0 LOCALISATION ET QUANTIFICATION DE LA SÉROTONINE AU COURS DE LA GAMÉTOGÉNÈSE CHEZ LA PALOURDE, <i>SPISULA SOLIDISSIMA</i>	30
ACCUSÉ DE RÉCEPTION DE L'ARTICLE:.....	31
ABSTRACT	33
INTRODUCTION.....	34
MATERIALS AND METHODS	37
Handling of specimens	37
Immunohistochemistry	37
Measurement of serotonin content	39
Statistical procedures	40
RESULTS	41
Serotonin content.....	42
Localization of serotonin immunoreactivity	45
DISCUSSION	47
Acknowledgements.....	52
REFERENCES.....	52
3.0 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	75
4.0 BIBLIOGRAPHIE.....	81
REMERCIEMENTS	IX

LISTE DES FIGURES

1.0 Introduction

Fig. 1 4
Anatomie de la palourde.

Fig. 2 10
Le système nerveux de la palourde.

2.0 Article

Fig. 1 56
Sections of gonads at the different stages of surf clam gametogenetic cycle.

Fig. 2 58
HPLC-ED detection of serotonin in surf clam tissue extracts.

Fig. 3 60
Average serotonin concentration in surf clam gonads during the gametogenetic cycle.

Fig. 4 62
Average serotonin concentration in surf clam gonads during female and male gametogenetic cycle.

Fig. 5 64
Average gonad wet weight in surf clam gonads during the gametogenetic cycle.

Fig. 6 66
Localization of serotonin immunoreactivity in surf clam female gonads during the gametogenetic cycle.

Fig. 7 68
Localization of serotonin immunoreactivity in surf clam male gonads during the gametogenetic cycle.

Fig. 8 70
Epifluorescence micrographs of serotonin immunoreactivity and DNA stain (Hoechst 33258) in surf clam female gonads during the gametogenetic cycle.

LISTE DES TABLEAUX

Table 1	72
Analysis of serotonin concentration in surf clam gonads during the gametogenetic cycle.	
Table 2	73
Comparison of serotonin concentrations between gonadal stages in surf clam gonads.	
Table 3	74
Comparison of gonad wet weight between gonadal stages in surf clam gonads.	

1.0 INTRODUCTION

Ce mémoire a pour objet de définir l'implication de la sérotonine dans la reproduction de la palourde, *Spisula solidissima*. Ce travail fait suite aux nombreuses études sur la biologie de la fécondation et sur le cycle de reproduction dont la palourde a fait l'objet jusqu'à maintenant. Tout d'abord, nous décrivons brièvement la biologie de ce mollusque. Ensuite, nous aborderons les effets de la sérotonine sur la ponte et sur la reprise de la méiose. Puis nous nous attarderons sur les études réalisées chez d'autres mollusques, chez lesquels la sérotonine a été localisée et quantifiée au sein des systèmes nerveux et reproducteur. Nous terminerons avec la présentation de nos recherches visant à mieux comprendre les rôles physiologiques de la sérotonine dans la reproduction.

1.1 Description de la palourde, *Spisula solidissima*

1.1.1 Distribution et aquiculture

La palourde de l'Atlantique est l'un des plus gros mollusques bivalves marins que l'on retrouve abondamment distribué dans les eaux continentales de la côte Atlantique est, à partir du Golfe St-Laurent jusqu'au Cap Hatteras en Caroline du Nord (Merrill et Ropes, 1969; Ropes, 1980; Jones, 1981). Dans l'est du Canada, la palourde est surtout présente sur la côte est du Nouveau-Brunswick, aux Iles-de-la-Madeleine (Medcof et MacPhail, 1955) et à l'Ile-du-Prince-Édouard (Sephton et Bryan, 1990). La pêche de cet animal a débuté vers la fin des années 1940 (Serchuk *et al.*, 1979). Par la suite, la pêche abusive a entraîné son déclin. Depuis la fin des années 1970, la pêche est contrôlée sur la côte nord-est des États-Unis (Sephton, 1987) et cela a entraîné l'exploitation d'une voie alternative, l'aquiculture, afin de répondre aux besoins du

marché et de réensemencer les zones de pêche surexploitées. Cette voie a donné lieu à plusieurs études sur la biologie de l'animal (Goldberg, 1980; 1989; Goldberg et Walker, 1990; Clotteau et Dubé, 1993).

1.1.2 Biologie et écologie

La palourde habite les eaux marines superficielles jusqu'à une profondeur d'environ 60 m (Jones, 1981). Elle s'enfouit dans les fonds sablonneux ou graveleux contenant parfois des fragments de coquilles. Dans le Golfe du St-Laurent, on la retrouve sur les bancs de sable le long de la côte sud (Caddy et Billard, 1976), dans un environnement énergétiquement riche (Pearce *et al.*, 1976). L'adulte tolère des températures allant de 4°C à 27°C et une salinité variant entre 13 ‰ et 35 ‰ (Malouf et Bricelj, 1989).

La jeune palourde utilise son pied pour se déplacer. À maturité, elle devient sédentaire et s'enfouit dans le sable. Elle se nourrit en filtrant l'eau et en retenant les particules alimentaires en suspension, surtout microscopiques. Les deux valves symétriques (bivalve), liées par un ligament élastique, font figure d'exosquelette. À l'intérieur, le corps mou de la palourde se divise en deux grandes régions, soit: le pied en forme de hache ainsi que la masse viscérale contenant les organes. La tête est pratiquement absente. La masse viscérale est enveloppée d'un manteau sécrétant la coquille et délimitant une cavité palléale où s'effectue la circulation d'eau permettant l'apport d'oxygène, l'excrétion des déchets ainsi que le transport des cellules sexuelles vers l'extérieur.

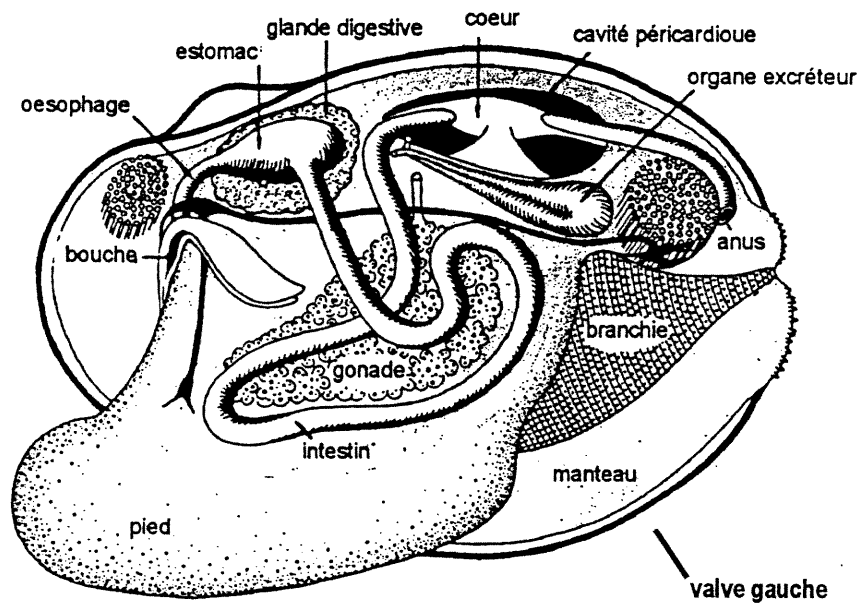
Les milliers de cellules sexuelles sont produites par un système reproducteur simple, dépourvu d'organes sexuels accessoires (ex: organe copulateur), dont l'anatomie et la physiologie sont importantes à connaître afin de comprendre le rôle que la sérotonine peut jouer sur les mécanismes de régulation de la ponte et la méiose.

1.1.3 Anatomie du système reproducteur

Pendant l'organogénèse, la gonade primaire se développe à partir d'une paire de bourgeons germinaux mésodermiques, chacun étant situé de part et d'autre du plan médian au niveau de la partie postérieure de la masse corporelle, près du ganglion viscéral et des organes rénaux. Les deux bourgeons se développent en un système d'arborescences de follicules, aussi appelés acini ou alvéoles, surplombant la glande digestive et entourant l'intestin dans la masse viscérale (Fig. 1; Coe, 1943). La cavité interne des acini correspond au coelome. Lors du développement de la gonade, les constituants de chaque acinus se différencient en cellules nutritives et en gonies primaires (Coe, 1943). Les acini qui composent la gonade s'ouvrent dans un canal court et cilié, le gonoducte. Celui-ci est dépourvu de glandes et sert de conduit au transport des cellules sexuelles vers la cavité palléale. Les gonoductes (un de chaque côté du plan médian) se terminent à l'ouverture génitale sur une fine papille de chaque côté de l'apex dorsal de la masse viscérale et antérieure au muscle rétracteur du pied (Ropes, 1968). Ces papilles génitales sont de forme et de taille semblables chez les deux sexes (Stickney, 1963).

Lors de l'émission des gamètes, les cellules sexuelles sont expulsées dans le milieu externe, où a lieu la fécondation. La ponte est souvent accompagnée de contractions rythmiques des muscles adducteurs qui poussent les valves ensemble

Figure 1. Anatomie de la palourde. Localisation de la gonade chez une palourde dont le manteau, la branchie et une partie du pied situés sur la partie gauche de l'animal ont été enlevés. Adapté de Pearce et al. (1987).



(Galtsoff, 1961). La maturation des ovocytes se poursuit après la ponte et la fécondation. Chez les mâles, la méiose s'effectue entièrement dans la gonade, ce qui permet la libération de spermatozoïdes compétents (Costello *et al.*, 1957; Ropes, 1968).

L'absence de caractères sexuels secondaires rend la détermination du sexe impossible par simple examen externe (Cox, 1969). La gonade femelle mûre de la palourde apparaît parfois rose pêche, mais peut aussi afficher une couleur blanche comme celle mâle (Schechter, 1941). Des parasites peuvent être présents dans la gonade, ajoutant un facteur confondant à l'observation de la couleur (Ropes, 1968). La détermination sexuelle nécessite donc un examen microscopique. À l'Ile-du-Prince-Édouard, Sephton et Bryan (1990) ont montré, à l'aide de cet examen microscopique, qu'il est possible de définir le sexe de palourdes âgées de quatre ans et mesurant environ 80 mm (Golfe St-Laurent) à 95 mm (Baie de Cardigan) alors qu'il est difficilement reconnaissable chez des palourdes de trois ans. Étant normalement unisexuée, la palourde produit et libère un seul type de gamètes et conserve le même sexe durant toute sa vie. Quelques rares cas d'hermaphrodisme ont été rapportés (Ropes, 1968). Les deux sexes sont également représentés dans la population.

1.1.4 Cycle de reproduction

Le cycle de reproduction se définit comme la série d'événements à partir du temps d'activation, de croissance, et de différenciation des gamètes dans la gonade jusqu'à leur émission et la réduction de l'activité gonadique à un niveau minimum avant la prochaine activation de la gonade. À notre latitude, le cycle de reproduction est annuel. La palourde expulse ses gamètes une fois la maturité sexuelle atteinte, soit entre deux et quatre ans d'âge selon la latitude où vit l'animal.

À l'examen microscopique, Ropes (1968) a décrit quatre grands stades reproductifs. La gamétogénèse est représentée par les stades de phase active et de maturité. Ceux-ci sont suivis des stades de ponte, soit de ponte partielle et de ponte complétée. C'est la définition des divers stades de la reproduction qui a été utilisée au cours de ce travail. Des figures illustrant chacun des stades sont présentées au Chapitre 2.

À l'aide de coupes histologiques, il est possible d'observer la multiplication et la croissance des cellules sexuelles au cours de la gamétogénèse chez la palourde aussi bien mâle que femelle. Chez le mâle, à ces phénomènes observés s'ajoute la maturation des gamètes. Chez ce dernier, durant la **phase active** (Fig. 1A), les spermatogonies sont accolées à la membrane de l'acinus. Les spermatocytes primaires, de 3-4 μm de diamètre, prolifèrent vers la lumière. Leur différenciation caractéristique s'observe facilement par l'apparence de colonnes radiales dans l'acinus. Les spermatocytes secondaires, de 2-3 μm de diamètre affichent des filaments de chromatine foncée basophile. Des petits spermatides basophiles d'environ 1,5 μm de diamètre forment des masses denses près de la lumière de l'acinus. Quelques spermatozoïdes formés à partir des spermatides ont leur queue orientée vers la lumière de l'alvéole. La tête du spermatozoïde mesure environ 1 μm de diamètre.

Chez les femelles en **phase active** (Fig. 1E), des ovogonies et des ovocytes sont présents dans l'acinus. Les ovogonies sont accolées à la membrane acineuse. Leur noyau ovale contient un nucléole basophile distinct et le nucléoplasme affiche des fils minces, foncés et irréguliers. Les ovocytes ont pour la plupart un noyau rond ou ovale contenant un nucléole basophile, mais le nucléoplasme est homogène et transparent. Pouvant être de forme irrégulière, ils sont attachés à la membrane acineuse par un

pédoncule mince, et leur cytoplasme s'étend vers la lumière de l'acinus. Plusieurs ovocytes peuvent être libres dans la lumière. La membrane acineuse apparaît très mince, à cause d'une augmentation du volume des cellules de l'acinus.

Durant le **stade de maturité** (Fig. 1B, F), la gonade de la palourde occupe presque toute la masse viscérale. En effet, les acini sont nombreux, rapprochés les uns des autres, et contiennent une multitude de cellules sexuelles qui, à maturité, étirent et amincissent les membranes acineuses. Dans la gonade femelle, les ovocytes de forme régulièrement ovoïde sont libres dans la lumière de l'alvéole. La membrane acineuse lisse et régulière, ne contient plus d'ovogonies en formation. Les ovocytes présentent un noyau large. Ils se différencient des ovogonies du stade précédent par la présence d'un amphinucléole proéminent (Allen, 1953). Dans la gonade mâle, les spermatozoïdes mûrs forment des masses denses dans les acini. L'orientation de leur queue apparaît à l'observateur comme un tourbillon dans la lumière de l'acinus. Quelques cellules sexuelles moins différenciées sont visibles en périphérie de l'acinus.

Chez les deux sexes, la période de ponte correspond à la libération des gamètes dans l'eau de mer. Les gamètes sont libérés à intervalles de quelques jours sur une période de temps variant d'année en année, probablement en réponse à des facteurs environnementaux (Jones, 1981). Aux Iles-de-la-Madeleine et à l'Ile-du-Prince-Édouard, cette période s'échelonne de la mi-juillet (Iles-de-la-Madeleine) ou de la fin juillet (Ile-du-Prince-Édouard) jusqu'au mois d'octobre (Dubé, non-publié; Sephton, 1987). Lorsque la ponte est partiellement amorcée, la **ponte partielle** (Fig. 1C, G), quelques gros ovocytes ou spermatozoïdes demeurent libres dans la lumière de certains acini. Chez les deux sexes, des gonies et cytes primaires apparaissent dans l'épithélium germinatif. Ce dernier est épaissi suite à la diminution du volume occupé par les

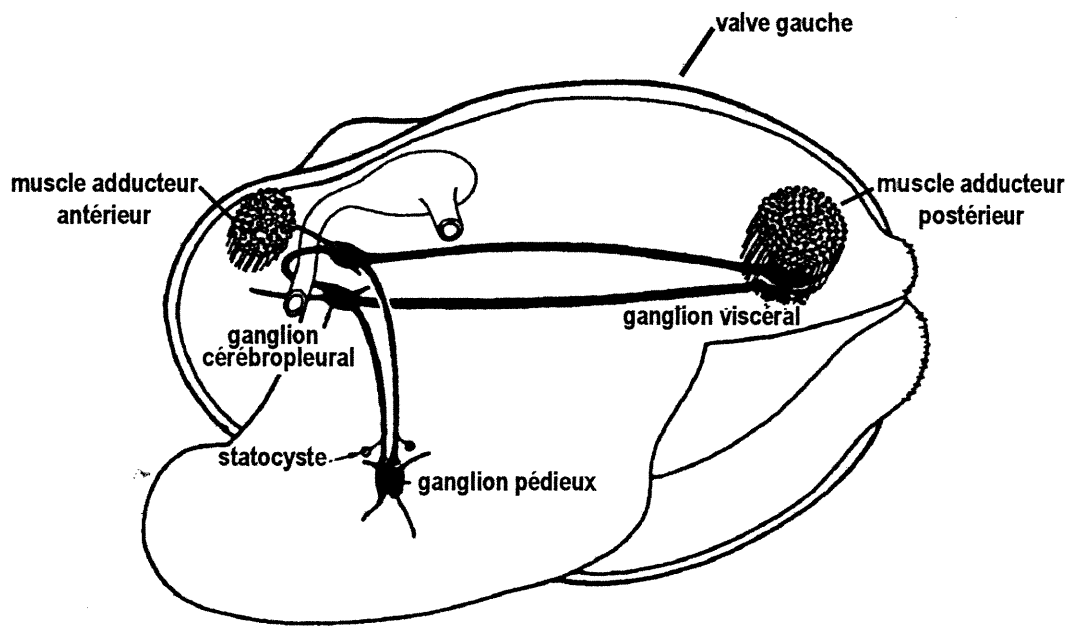
cellules sexuelles et sa compression vers la lumière. Certains acini sont même détruits et du tissu membranaire peut être observé entre les acini. Lorsque la ponte est terminée (**ponte complétée**, Fig. 1D, H), aussi bien dans la gonade mâle que femelle, les acini ne contiennent pratiquement plus de cellules sexuelles mûres et des gonies primaires prolifèrent à partir de l'épithélium germinatif. Les gamètes mûrs qui demeurent dans les acini sont détruits par des macrophages. La gonade est alors réduite à quelques îlots d'épithélium germinatif (Ropes, 1968).

1.1.5 Système nerveux

Le système nerveux des bivalves est simple. Une partie en position centrale est paire et forme un collier pré-oesophagien comprenant trois ganglions de chaque côté, soit: 1) les ganglions cérébropleuraux supraoesophagiens; 2) les ganglions pédieux sont situés à la base du pied et 3) les ganglions viscéraux sont localisés en arrière du pied et ventralement par rapport à l'intestin (Fig. 2). Par comparaison aux gastéropodes chez lesquels les fonctions sensorielles et d'intégration sont concentrées dans la tête, ces fonctions sont effectuées par les ganglions cérébropleuraux et viscéraux chez les bivalves. Les organes sensoriels sont localisés dans la masse viscérale et non dans la tête comme chez les gastéropodes.

Les ganglions cérébropleuraux supraoesophagiens (cérébraux) sont reliés l'un à l'autre par une commissure s'étendant à la base des palpes labiaux internes. De chacun de ces ganglions émergent cinq nerfs, soit: le nerf adducteur antérieur, le nerf palléal antérieur, le petit nerf labial, le connectif cérébroviscéral et le connectif cérébropédieux. Ces nerfs innervent les palpes labiaux, les statocystes (organes sensoriels), le muscle adducteur antérieur et la partie antérieure du manteau. Liés aux ganglions cérébraux

Figure 2. Le système nerveux de la palourde. Représentation du système nerveux constitué de trois paires de ganglions, plus ou moins fusionnés, reliés par des connectifs. Adapté de Pearce et al. (1987).



par le connectif cérébro-pédieux, les deux ganglions pédieux apparaissent comme une masse fusionnée et s'étendent dans la partie dorsale du pied près de la masse viscérale. Ces ganglions pédieux fusionnés donnent naissance à plusieurs paires de nerfs se rendant au pied. Les deux ganglions viscéraux, reliés aux ganglions cérébraux par les connectifs cérébroviscéraux, sont fusionnés sur la surface ventrale du muscle adducteur postérieur (Nagabhushanam, 1963). Ils sont superficiels et à peine recouverts par l'épithélium tégumentaire. Selon Pearse et ses collaborateurs (1987), les ganglions viscéraux projettent leurs nerfs au système digestif, aux branchies, au cœur, aux gonades, aux organes excréteurs, aux siphons, au muscle adducteur postérieur et à la partie postérieure du manteau. Il n'est pas mentionné si la gonade est innervée par un nerf provenant directement du ganglion viscéral et indépendant du connectif cérébroviscéral. Chez la palourde *Mya arenaria* une paire de nerfs venant du connectif cérébroviscéral passe directement sous les gonoductes terminaux, en y projetant plusieurs ramifications qui envahissent le tissu conjonctif de cette région; une branche plus large de chaque nerf suit le gonoducte à partir de la vésicule génitale (réserve de gamètes située antérieurement à la gonade dans laquelle débouchent les gonoductes) jusqu'à la gonade elle-même (Stickney, 1963). Chez *Spisula solidissima*, l'élargissement du gonoducte effectue la fonction de réservoir de gamètes et occupe la même région.

1.2 Facteurs influençant le cycle reproducteur et la ponte

Dans les mers tempérées, la plupart des invertébrés manifestent un cycle de reproduction généralement basé sur une rythmicité circannuelle (basée environ sur une année). Ceci est spécialement vrai pour les espèces, comme plusieurs bivalves, ayant

un stade larvaire planctotrophique, dont la palourde *Spisula solidissima* (Paulet *et al.*, 1993).

Chez ces espèces, la maturation des gamètes est contrôlée par divers facteurs exogènes ainsi que des facteurs endogènes d'ordre génétique ou hormonal et la saison de reproduction est de durée variable selon la latitude. Ces facteurs assurent une synchronisation de la saison de reproduction afin d'augmenter les chances de survie des larves produites.

1.2.1 Facteurs exogènes

De tous les facteurs externes, la température est probablement le plus important (Giese, 1959; Loosanoff et Davis, 1963; Mackie, 1984). Même si la température n'a pas d'effet stimulateur sur la ponte (Jones, 1981), la maturation des gamètes est intimement liée aux fluctuations annuelles de température ou aux seuils de température (Mackie, 1984). Elle peut être retardée en gardant l'animal à de faibles températures. À l'inverse, une température élevée constante contribue à l'accélération de la gamétogénèse (Ropes, 1968).

La ponte peut aussi être influencée par d'autres facteurs. Les plus importants sont: la photopériode, la salinité, le cycle lunaire, l'abondance et l'accessibilité alimentaire, la présence de gamètes de sexe opposé et les substances chimiques (rev. par Mackie, 1984). Pour plusieurs de ces facteurs, il a été rapporté que l'animal répond facilement aux déclencheurs de ponte lorsqu'il est au stade de maturité (Galtsoff, 1940; Young, 1942; 1946; Stickney, 1964; Walz, 1978; Sprung, 1987, 1989; Stefano et Gould, 1988).

D'après Giese (1959), il est probable que plusieurs facteurs agissent ensemble ou en succession. Ils contribuent à assurer la présence synchronisée des spermatozoïdes et des ovocytes afin que la fécondation puisse se produire, que la température est adéquate pour le développement larvaire et que les produits alimentaires sont abondants (Giese, 1959; Ram *et al.*, 1993).

1.2.2 Facteurs endogènes

Chez les bivalves, les produits de neurosécrétion libérés par les ganglions cérébraux contrôleraient la reproduction (Lubet, 1956, 1965; Nagabhushanam, 1964). L'ablation des ganglions cérébraux provoque la ponte. Par contre, l'ablation effectuée après la ponte et au début de la phase active retarde la gamétogénèse. Quelques jours avant la ponte, les cellules neurosécrétrices (neurones ayant une activité glandulaire et produisant des hormones) disparaissent, permettant le déroulement de la ponte (Ropes, 1968; Grassé, 1970). D'autre part, lorsqu'on procède à l'ablation des ganglions viscéraux, le frai est retardé ou inhibé totalement (Grassé, 1970). Chez *Spisula*, les ganglions cérébraux et viscéraux contiennent deux types de cellules neurosécrétrices pouvant être distinguées morphologiquement mais dont la fonction demeure inconnue (Nagabhushanam, 1963).

Ainsi, les facteurs environnementaux déclencheraient, par l'intermédiaire de cellules neurosécrétrices, des mécanismes physiologiques associés à la reproduction, soit le développement des gonades et l'activité gamétogénétique tels que le métabolisme du glycogène, l'accumulation et la mobilisation de réserves nutritives et le rendement de filtration (Mackie, 1984). La substance qui pourrait être neurosécrétée et

jouer un rôle neurohormonal sur les processus reproducteurs chez les bivalves est la sérotonine.

1.3 Distribution et fonctions connues de la sérotonine dans le règne animal

La sérotonine est une amine biogène que l'on retrouve dans les microorganismes, les plantes et les animaux. Au sein du règne animal, elle se comporte comme un neurotransmetteur, un neuromodulateur et/ou une neurohormone, à la fois chez les vertébrés (Fozard, 1987; Peroutka, 1988) et les invertébrés (Walker, 1984) dont les mollusques (Welsh et Moorhead, 1960; Fujii et Takeda, 1988; Sandeman *et al.*, 1988; Linn et Roelofs, 1993).

La sérotonine est trouvée dans le système nerveux de la plupart des invertébrés et vertébrés examinés incluant le système nerveux très primitif d'espèces de Cnidaires (Umbriaco *et al.*, 1990). Chez les bivalves, les neurones sérotoninergiques sont connus comme innervant plusieurs organes dont les branchies (Welsh, 1960; Aiello, 1962; Gosselin *et al.*, 1962; Sweeney, 1963; Malanga *et al.*, 1972; Hiripi et Osborne, 1976; Smith, 1982; Smith et Sleet, 1982; Stefano, 1990; Dietz *et al.*, 1992). Grâce à cette innervation, la sérotonine est impliquée dans une grande variété d'actions physiologiques, dont l'activité musculaire (Twarog, 1967; Twarog et Hidaka, 1971; Salanki *et al.*, 1974; Twarog *et al.*, 1977), et la stimulation des battements cardiaques et ciliaires des branchies chez les bivalves (Aiello, 1957; Gosselin, 1961; Leake et Walker, 1980; Catapane, 1983). Elle est aussi connue pour être un important régulateur de la locomotion ciliaire chez les larves et les adultes gastéropodes (Audesirk *et al.*, 1979; Arkett *et al.*, 1987).

1.4 Rôle de la sérotonine dans la reproduction des bivalves

De plus, la sérotonine est grandement reconnue comme ayant des effets neurohormonaux sur le système reproducteur des bivalves, incluant la ponte (section 1.4.1), la maturation de l'ovocyte (section 1.4.3), la fécondabilité (section 1.4.4) et l'émission des gamètes à partir d'extraits gonadiques (Matsutani et Nomura, 1987).

1.4.1 Induction de la ponte par la sérotonine

Un des premiers indices laissant supposer que la sérotonine joue un rôle important dans la reproduction des bivalves est sans contredit sa capacité de déclencher la ponte. Il est connu que l'induction de la ponte par les algues chez *Mytilus* exige des connexions entre les ganglions pédieux et viscéral (Smith, 1982), ganglions qui renferment de la sérotonine (Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 1991). De plus, Matsutani et Nomura (1982) ont démontré que le principe actif responsable de l'induction de la ponte chez le pétoncle *Patinopecten yessoensis* doit être un neurotransmetteur, plutôt qu'un neuropeptide, qui serait contenu dans les ganglions nerveux puisque des homogénats de ceux-ci déclenchent la ponte. Or, sachant que les gonades sont innervées soit par des neurones soit par des cellules neurosécrétrices contenant de la sérotonine, cette dernière s'avère susceptible de jouer le rôle de neurotransmetteur médiateur ou de neurohormone ayant comme effet d'induire la ponte (Antheunisse, 1963).

Ainsi, la sérotonine, lorsqu'injectée ou appliquée de façon exogène, induit la ponte chez plusieurs bivalves tel que les pétoncles (Matsutani et Nomura, 1982; Gibbons et Castagna, 1984; Tanaka et Murakoshi, 1985; Belda et del Norte, 1988;

Malachowski, 1988; Matsutani, 1990; Vélez *et al.*, 1990; Lefort, 1992; O'Connor et Heasman, 1995; Martinez *et al.*, 1996), les huîtres (Gibbons et Castagna, 1984), les moules (Gibbons et Castagna, 1984; Ram *et al.*, 1992) et particulièrement les palourdes (Gibbons et Castagna, 1984; 1985; Braley, 1985; Crawford *et al.*, 1986; Alcazar *et al.*, 1987; Alvarado-Alvarez *et al.*, 1996). Chez les palourdes, *Spisula solidissima* et *S. sachalinensis*, Hirai *et al.* (1988) ont aussi montré que la sérotonine induit la ponte des gamètes alors que d'autres neurotransmetteurs conventionnels sont inefficaces.

Chez plusieurs des nombreuses espèces de bivalves chez qui la sérotonine induit la ponte, les mâles sont davantage susceptibles de libérer leurs spermatozoïdes que les femelles de libérer leurs ovocytes (Ram *et al.*, 1993). Toutefois, des divergences de réponse à la sérotonine ont été rapportées chez la palourde *Tridacna gigas* (Crawford *et al.*, 1986) et la moule zébrée (Ram *et al.*, 1993). Chez cette dernière, on a montré que même si les femelles peuvent être considérées mûres d'après l'apparence morphologique des ovocytes, des changements ultérieurs dans le développement doivent avoir lieu pour rendre l'animal sensible à la sérotonine (Ram *et al.*, 1993).

1.4.2 Induction de la ponte par des analogues de la sérotonine

Chez le pétoncle, la ponte a pu être induite par des agonistes pour les récepteurs de type 5-HT₁ (8-OH-DPAT, piperazine, TFMPP), 5-HT₂ (α -méthyl-5-HT) ou des deux types 5-HT₁/5-HT₂ (métergoline; ergotamine; Nelson, 1988; Ram *et al.*, 1992; Fong *et al.*, 1993; 1994a; 1996; Ram *et al.*, 1996a,b). L'induction de la ponte par la sérotonine a pu être inhibée par des antagonistes pour ces mêmes types de récepteurs (5-HT₁/5-HT₂: méthiotépine; 5-HT₂: cyproheptadine, miansérine; méthysergide) (Matsutani et

Nomura, 1986; Ram *et al.*, 1992; 1993; Fong *et al.*, 1993; 1994a,b; 1996; Sugamori *et al.*, 1993). Ceci suggère que la sérotonine agit directement sur la gonade en se liant à des récepteurs gonadiques dont les propriétés seraient de type mixte 5-HT₁/5-HT₂ et différents de tous les types et sous-types de récepteurs à sérotonine connus chez les vertébrés (Ram *et al.*, 1992; 1993; Fong *et al.*, 1993). Ces récepteurs différeraient aussi des récepteurs sérotoninergiques des gastéropodes *Lymnaea stagnalis* (Sugamori *et al.*, 1993; Gerhardt *et al.*, 1996) et *Aplysia californica* (Li *et al.*, 1995; Angers *et al.*, 1998), bien que partageant des propriétés de liaison similaires. De plus, l'efficacité des analogues de la sérotonine varie d'une espèce à l'autre. Ces données, ajoutées à celles de Krantic *et al.* (1991; 1993a,b), suggèrent que certains comportements de reproduction (ponte et reprise de la méiose) chez les bivalves pourraient être modulés par plusieurs types ou sous-types de récepteurs à sérotonine (Fong *et al.*, 1993).

1.4.3 Reprise de la méiose

Chez beaucoup d'animaux, la maturation méiotique des ovocytes arrêtés en prophase-1 est contrôlée par des substances hormonales ou activée suite à l'insémination. Celle-ci cause la production du facteur de promotion de la phase M (MPF) dans le cytoplasme, qui, en retour, déclenche la rupture de la vésicule germinative et initie la reprise de la méiose. Les hormones connues pour jouer le rôle de transducteur sont la 1-méthyladénine chez l'étoile de mer, la progestérone chez les grenouilles et la sérotonine chez certains mollusques bivalves (Colas et Guerrier, 1995).

Chez *Spisula solidissima*, la présence d'une vésicule germinative après libération de l'ovocyte implique que celui-ci est en prophase-1 de la méiose. Chez cette espèce, la reprise de la méiose des ovocytes isolés, normalement observée suite à la

fécondation par le spermatozoïde, peut être induite artificiellement par divers agents chimiques tels que le KCl (Allen, 1953), les esters de phorbol (Dubé *et al.*, 1987) et la sérotonine (10-100 μ M) (Hirai *et al.*, 1988). Dans le cas de la sérotonine, la réponse de réinitiation de la méïose est spécifique, car d'autres amines tels que l'acétylcholine, l'acide γ -aminobutyrique et la dopamine sont inefficaces (Hirai *et al.*, 1988; Krantic *et al.*, 1991). L'induction de la méïose par la sérotonine se manifeste sous forme de la rupture de la vésicule germinative, suivie de la condensation des chromosomes, de l'expulsion des premier et second globules polaires, et de la formation d'un pronucleus femelle dans le cas de la méïose déclenchée par la sérotonine.

Le spermatozoïde, de même que divers agents chimiques de maturation des ovocytes, provoqueraient un influx de Ca^{2+} à partir du milieu externe qui serait nécessaire à l'activation ultérieure des ovocytes arrêtés en prophase-1 (Colas et Dubé, 1998). Lors de l'induction par la sérotonine, l'influx de Ca^{2+} agirait probablement en activant des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage (Kadam *et al.*, 1990; Krantic *et al.*, 1991), tout comme le KCl, ce qui suggère que ces deux agents chimiques induisent la reprise de la méïose en utilisant le Ca^{2+} comme second messager via un récepteur ou une dépolarisation membranaires, dans le cas de la sérotonine et du KCl, respectivement (Krantic *et al.*, 1991).

Le fait que la sérotonine induise à la fois la reprise de la méïose et la ponte est contradictoire. En effet, lors de la ponte, on a montré que les ovocytes libérés conservent leur vésicule germinative et sont fécondables. D'un autre côté, deux facteurs isolés des fluides corporels (« *Spisula* body fluid factor (SBF) ») ainsi que des ganglions nerveux (« *Spisula* nerve ganglia factor (SNE) ») de *Spisula* induisent la reprise de la méïose de façon dose-dépendante. L'analyse chromatographique de ces

facteurs (SBF et SNE) indique un temps de rétention identique à celui de la sérotonine (Kadam et Koide, 1989). Ainsi, bien que la sérotonine puisse être présente de façon endogène et libérée lors de la ponte par un mécanisme inconnu, elle n'activerait pas la reprise de la méiose. Selon Hirai *et al.* (1988), la sérotonine injectée agirait rapidement sur le système neuromusculaire impliqué dans la ponte, et n'aurait pas le temps de pénétrer l'ovaire et/ou n'atteindrait pas le seuil critique nécessaire à l'induction de la maturation.

Dans quelques cas exceptionnels, dont celui de la palourde japonaise *Macra chinensis*, la sérotonine induit la ponte mais s'avère inefficace à déclencher la reprise de la méiose chez les ovocytes récoltés dans l'ovaire ou libérés par la ponte (Fong *et al.*, 1996). La sérotonine serait libérée de façon endogène par les terminaisons nerveuses et se lierait à des récepteurs pour initier la ponte. Par contre, les ovocytes seraient insensibles à la sérotonine (Fong *et al.*, 1996).

1.4.4 Facilitation de la fécondation

Chez la palourde, la sensibilité des ovocytes à la sérotonine facilite la fécondation. En effet, à forte concentration (>500 nM), la sérotonine induit la reprise de la méiose. Par contre, lorsqu'elle est présente en plus faible concentration (10-500 nM), elle accroît la fécondabilité de l'ovocyte. Cette facilitation de la fécondation pourrait s'expliquer par un changement de conformation ou d'électropotential de la membrane plasmique favorisant l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovocyte, ainsi que sa maturation (Juneja *et al.*, 1993). Ainsi, lors de la ponte, la sérotonine pourrait être libérée de façon endogène par les terminaisons nerveuses dans la gonade de *Spisula*. Elle se lierait alors aux récepteurs sérotoninergiques des ovocytes et faciliterait la fécondation par le spermatozoïde (Fong *et al.*, 1996).

1.4.5 Récepteurs à sérotonine sur les ovocytes

Les récepteurs sérotoninergiques, qui permettent la reprise de la méiose et, possiblement, l'activation de l'ovocyte par le spermatozoïde, ont été mis en évidence par des études pharmacologiques réalisées chez *Spisula solidissima* (Hirai *et al.*, 1988; Kadam *et al.*, 1991; Krantic *et al.*, 1991), la moule zébrée (Fong *et al.*, 1993) et la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Gobet *et al.*, 1994), ainsi que de radioliation chez *S. solidissima* (Krantic *et al.*, 1993a,b). Ces études suggèrent la présence d'une classe unique de sites de liaison spécifiques situés sur la membrane plasmique des ovocytes. Leur profil pharmacologique semble différent de celui des récepteurs 5-HT_{1, 2, 3, 4}. Il s'agirait donc d'un nouveau sous-type de récepteurs à sérotonine possédant un profil pharmacologique mixte 5-HT₁/5-HT₂ ou similaire à l'un de ceux-ci (Fong *et al.*, 1993; Krantic *et al.*, 1993a,b; Gobet *et al.*, 1994; Fong *et al.*, 1997; Osada *et al.*, 1998). Des études de caractérisation moléculaire des récepteurs à sérotonine des ovocytes sont présentement en cours chez *Spisula solidissima*.

1.4.6 Implication physiologique

Il a été vu précédemment que la sérotonine est susceptible d'être impliquée dans diverses fonctions reproductives chez les bivalves. Cependant, des mécanismes d'action différents de la sérotonine sont notés entre les espèces. D'une part, chez les espèces qui libèrent leurs ovocytes en prophase-1 lors de la ponte naturelle, soit les palourdes *Spisula solidissima*, *Barnea candida* et *Macra chinensis*, la sérotonine est susceptible de déclencher la ponte mais non la reprise de la méiose. D'autre part, chez les espèces telles que la moule *Mytilus edulis*, la moule zébrée *Dreissena polymorpha* et les palourdes *Ruditapes philippinarum* et *Tivela stultorum*, les ovocytes arrêtés en

prophase-1 reprennent leur méiose sous l'influence de neurohormones comme la sérotonine et sont libérés en métaphase-1 (Osanai et Kuraishi, 1988; Guerrier *et al.*, 1993; Alvarado-Alvarez *et al.* 1996). Chez l'huître *Crassostrea gigas*, les ovocytes arrêtés en prophase-1 ou en métaphase-1 sont fécondables alors qu'ils sont normalement libérés en métaphase-1 (Osanai et Kuraishi, 1988). Chez ces espèces, la sérotonine permettrait donc la reprise de la méiose jusqu'à un second arrêt en métaphase-1 où l'ovocyte libéré est fécondé. À l'opposé, chez *Spisula*, la reprise de la méiose induite par la sérotonine conduit à la formation d'un pronucleus femelle, un stade où l'ovotide est non fécondable (Hirai *et al.*, 1988). Cela suggère que le mécanisme de réponse intracellulaire de l'ovocyte vis-à-vis de la sérotonine est différent selon l'espèce. Il reste donc à confirmer si la sérotonine est libérée dans l'ovaire lors de la ponte, et si le blocage ou l'inhibition de liaison de la sérotonine aux ovocytes dans l'ovaire prévient la maturation des ovocytes libérés en prophase-1.

1.5 Localisation et quantification de la sérotonine au sein du système nerveux et du système reproducteur des mollusques

Chez les invertébrés, les indolamines et les catécholamines ont été détectées biochimiquement dans plusieurs groupes (Klemm, 1985). Leur présence a été rapportée chez les coelentérés (Pani et Anctil, 1994), les annélides (Anctil *et al.*, 1990), et les plathelminthes (Gustafsson et Erikson, 1990). Chez les mollusques, plusieurs études quantitatives et qualitatives de ces amines dont, entre autres, la dopamine, la sérotonine et l'octopamine, ont révélé que celles-ci seraient présentes dans toutes les classes et joueraient un rôle essentiel dans leur physiologie (Carpenter *et al.*, 1971; McCaman *et al.*, 1973; Saavedra *et al.*, 1974; Cardot, 1979; Smith, 1982; Walker, 1986; Kemenes *et al.*, 1989; Sloley *et al.*, 1990; Takeda, 1992).

La plupart des études sur la localisation et le métabolisme de la sérotonine chez les bivalves ont été réalisées à l'aide de l'immunohistochimie ou le dosage biochimique (Matsutani et Nomura, 1984; 1986; Ram *et al.*, 1992; Paulet *et al.*, 1993; Martinez et Rivera, 1994; Croll *et al.*, 1995; Pani et Croll, 1995). Les mesures biochimiques chez les bivalves ont révélé que la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline sont présentes. En général, la dopamine s'avère la plus abondante. Elle est suivie par la sérotonine et la noradrénaline ou l'inverse. Les trois monoamines, isolément ou ensemble, ont été détectées dans le système nerveux central, le coeur, les branchies, le pied et la gonade (Cottrell, 1967; Stefano *et al.*, 1978; Cardot, 1979; Smith, 1982; Paulet *et al.*, 1993; Martinez et Rivera, 1994; Pani et Croll, 1995).

Chez le pétoncle *Placopecten magellanicus*, la sérotonine est en plus grande quantité dans le pied, suivi du système nerveux central et de la gonade, laquelle contiendraient environ 1000 pg de sérotonine par mg de poids humide (Pani et Croll, 1995). Ces taux mesurés se compareraient à ceux d'autres bivalves (Smith, 1982; Stefano, 1990; Ono *et al.*, 1992).

1.5.1 Système nerveux

Les études de localisation de la sérotonine ont surtout été effectuées au niveau du système nerveux des bivalves, particulièrement chez le pétoncle et la moule. Chez *Mytilus*, la présence de sérotonine et de dopamine a été démontrée à l'aide de techniques histofluorométriques dans des neurones isolés du ganglion viscéral et dans les fibres du nerf branchial s'étendant du ganglion viscéral aux branchies (Stefano et Aiello, 1975).

Chez les pétoncles et chez *Mytilus galloprovincialis*, des cellules immunoréactives pour la sérotonine sont présentes dans le cortex des ganglions cérébraux, pédieux, et, selon les espèces, dans le ganglion pariétoviscéral (viscéral) ou accessoire. L'immunoréactivité à la sérotonine est aussi présente dans les nerfs reliant les ganglions entre eux. La sérotonine serait transportée du système nerveux central vers les tissus périphériques où plusieurs cellules immunoréactives ont été observées (Matsutani et Nomura, 1986; Vitellaro-Zuccarello *et al.*, 1991; Paulet *et al.*, 1993; Croll *et al.*, 1995). Chez *Pecten maximus*, de nombreuses fibres immunoréactives émergent de chaque ganglion cérébral et se dirigent à chacun des connectifs cérébroviscéraux. Un petit nombre de cellules immunoréactives à la sérotonine se retrouve dans le ganglion viscéral. Celles-ci sont confinées aux lobes accessoires, à la base des connectifs cérébroviscéraux (Paulet *et al.*, 1993).

Chez les palourdes, Welsh et Moorhead (1960) ont rapporté que la sérotonine est présente dans le ganglion viscéral de *Mercenaria mercenaria* et dans les ganglions et les connectifs interganglionnaires de *Spisula solidissima*. De plus, chez cette dernière espèce, on trouverait de la sérotonine dans les fluides corporels (Kadam *et al.*, 1987; Kadam et Koide, 1989).

1.5.2 Système reproducteur

1.5.2.1 Localisation

Chez plusieurs bivalves, particulièrement les pétoncles et la moule zébrée, la présence de fibres sérotoninergiques dans la gonade, localisées autour des gonoductes et le long de l'épithélium germinale, concorde avec l'hypothèse que la sérotonine puisse être physiologiquement importante pour la régulation de la ponte (Matsutani et

Nomura, 1986; Matsutani, 1990; Kadam *et al.*, 1991; Ram *et al.*, 1992; 1993; Paulet *et al.*, 1993). Au printemps, avant la ponte, la sérotonine, même si elle est présente autour des acini gonadiques, est davantage concentrée autour des tubules collecteurs. En automne, après la ponte, la gonade est vide et les fibres immunoréactives variqueuses abondent autour des acini germinaux et le long des tubules collecteurs (Croll *et al.*, 1995). Paulet et ses collaborateurs (1993) ont aussi observé des amas de fibres sérotoninergiques dans une couche sous-épithéliale des gonoductes.

Chez les moules zébrées femelles, la gonade serait innervée par un nerf provenant de ramifications du connectif cérébroviscéral (Antheunisse, 1963) et contenant des fibres immunoréactives à la sérotonine. Ce nerf traverserait la gonade et formerait à l'intérieur de celle-ci des plexus de fibres variqueuses entourant chacun des acini ovariens (Ram *et al.*, 1992). Un tel nerf a aussi été observé dans la gonade de *Sphaerium sulcatum* (Sweeney, 1968). La présence de plusieurs fibres immunoréactives à la sérotonine dans les connectifs cérébroviscéraux et la gonade pourrait indiquer que la sérotonine est transportée du ganglion cérébral vers le viscéral comme chez *Mytilus edulis* (Stefano et Aiello, 1990). Selon Croll *et al.* (1995), chez le pétoncle, la gonade serait innervée par un nerf provenant des lobes accessoires du ganglion pariétoviscéral où plusieurs corps cellulaires immunoréactifs à la sérotonine ont été observés (Matsutani et Nomura, 1986; Paulet *et al.*, 1993).

Chez la moule zébrée et chez le pétoncle de l'Atlantique, l'innervation sérotoninergique des follicules gonadiques des mâles et des femelles est semblable (Ram *et al.*, 1992; Croll *et al.*, 1995). Chez le pétoncle *Pecten maximus*, le marquage plus intense des fibres entourant les acini mâles comparativement à ceux de la femelle est en accord avec l'observation que, chez cette espèce, l'induction de ponte par la

sérotonine produit l'émission de spermatozoïdes mais non d'ovocytes (Paulet *et al.*, 1993).

1.5.2.2 Quantification

Étant donné l'effet de la sérotonine exogène sur l'induction de la ponte chez plusieurs bivalves (section 1.4.1), plusieurs études ont été effectuées pour détecter biochimiquement la présence de sérotonine au niveau du système reproducteur. Afin de comparer les niveaux de sérotonine détectés, ces études ont dû tenir compte des différences dans le statut de reproduction (Martinez et Rivera, 1994) et de variations saisonnières (Paulet *et al.*, 1993).

La sérotonine, la dopamine et la noradrénaline ont été identifiées dans les gonades de bivalves (Matsutani, 1990; Stefano, 1990; Ram *et al.*, 1992; Paulet *et al.*, 1993; Martinez et Rivera, 1994, Croll *et al.*, 1995). Chez le pétoncle, *Placopecten magellanicus*, la sérotonine est la deuxième monoamine en importance dans la gonade (1000 pg par mg de poids humide), sa concentration étant au moins deux fois supérieure à celles de la noradrénaline et de la dopamine. Chez la moule zébrée, la sérotonine est l'amine biogène majeure dans les gonades, mais l'étude ne mentionne pas quelles autres substances ont été détectées (Ram *et al.*, 1993). Néanmoins, selon Ram et ses collaborateurs (1992), d'après la courbe dose-réponse de la ponte induite par la sérotonine, la quantité de sérotonine dans les gonades serait insuffisante pour expliquer l'induction de la ponte par des extraits gonadiques (Walz, 1978; Sprung, 1987; 1989), même avec les niveaux les plus élevés de sérotonine mesurés dans toute la gonade. De plus, les variations du contenu tissulaire de sérotonine ne pourraient être directement liées à la production et la libération des gamètes (Croll *et al.*, 1995).

1.5.2.3 Variation saisonnière

Des variations saisonnières dans les niveaux de sérotonine ont été démontrées chez les mollusques gastéropodes (Cardot, 1971; Hiripi et Salanki, 1973) et les bivalves (Stefano et Catapane, 1977). Chez ces derniers, certaines études ont rapporté des changements dans les taux de monoamines qui concordent avec les saisons et la ponte (Stefano et Catapane, 1977; Osada *et al.*, 1987; Matsutani, 1990; Paulet *et al.* 1993; Martinez et Rivera, 1994).

Plusieurs travaux effectués chez les bivalves ont montré que le taux de sérotonine mesuré dans les ganglions et les gonades augmente souvent de façon très abrupte juste avant la ponte, alors qu'il reste plus faible pendant la gamétogénèse (York et Twarog, 1973) et après la ponte (Matsutani, 1990; Paulet *et al.*, 1993). Chez l'hermaphrodite *Argopecten purpuratus*, la sérotonine se mesure en faible quantité dans la gonade après la ponte, puis augmente, à la fois dans les portions mâles et, un peu plus tard, dans les portions femelles, lorsque l'activité gamétogénique est reprise. Ceci suggère que la sérotonine puisse être impliquée dans la mobilisation des éléments nutritifs nécessaires au déroulement des processus gamétogénétiques (Martinez et Rivera, 1994).

Chez *Pecten maximus*, le taux de sérotonine dans les ganglions cérébraux et pédieux diminue pendant la période de gamétogénèse et augmente rapidement à la ponte alors que ceux de la dopamine et de la noradrénaline restent stables. Dans le ganglion viscéral, la sérotonine diminue de novembre à mars alors que la dopamine augmente durant la même période, sauf en mars et à la fin d'avril (Paulet *et al.*, 1993).

La nature et le mode d'action de la sérotonine endogène au cours de la ponte des bivalves marins restent à être clarifiés (Matsutani et Nomura, 1982). Néanmoins, la plupart des études suggèrent que la sérotonine endogène agirait comme une neurohormone favorisant le déclenchement de la ponte, puisqu'elle est efficace à induire la ponte, et présente dans la gonade, le système nerveux et les connexions reliant ceux-ci chez plusieurs bivalves (Stefano et Aiello, 1975; Cardot, 1979; Stefano et Catapane, 1980; Matsutani et Nomura, 1984; 1986; Deridovich et Khotimchenko, 1985). D'ailleurs, le contenu en sérotonine des ganglions subit des variations saisonnières concordant avec le cycle reproducteur (Stefano et Catapane, 1977; Osada et Nomura, 1989; Khotimchenko et Deridovich, 1991) et la sérotonine active la maturation des ovocytes isolés (Hirai *et al.*, 1988). Si la sérotonine est un inducteur naturel durant le processus de ponte, elle pourrait agir soit directement sur les ovocytes, soit sur les cellules somatiques des gonades, ou encore sur des neurones (Alvarado-Alvarez *et al.*, 1996).

1.6 Objectifs de l'étude

Le but de l'étude vise à mieux comprendre l'implication de la sérotonine dans la reproduction des bivalves. La palourde constitue un modèle de choix puisque les effets de la sérotonine exogène sur la ponte (Gibbons et Castagna, 1984), la reprise de la méiose (Hirai *et al.*, 1988) et la fécondabilité (Juneja *et al.*, 1993) sont bien connus. De plus, son cycle gamétogénétique a été décrit en détail par Ropes (1968). Aussi, la palourde est unisexuée ce qui permet d'étudier chaque sexe individuellement.

Nous avons donc procédé à la mise en évidence de la sérotonine au cours de la gamétogénèse de la palourde. En présence de sérotonine, il s'agira d'étudier son patron

de distribution à différents stades de la gamétogénèse, tels que décrits par Ropes (1968) et d'observer s'il existe des différences de localisation entre les sexes. De façon complémentaire, les mêmes palourdes qui auront été examinées par immunohistochimie, et dont on aura prélevé tout le reste de la gonade, seront soumises à une quantification de leur contenu en sérotonine. Ensuite, il s'agira de comparer, comme pour les études de localisation, les taux de sérotonine mesurés, pour établir s'il existe une relation entre la localisation et le contenu en sérotonine selon les stades de gamétogénèse et les sexes.

2.0

Localisation et quantification de la sérotonine au cours de la gamétogénèse chez la palourde, *Spisula solidissima*.

(Traduction du titre de l'article « Localization and quantification of serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima* », soumis en juillet 1999 à Cell and Tissue Research.)

Accusé de réception de l'article:**CELL AND TISSUE RESEARCH**

Prof. J. R. Sladek
Department of Neuroscience
Chicago Medical School
3333 Green Bay Road
North Chicago, Illinois 60064
Tel.: (847) 578-3430
Fax: (847) 578-8529
Email: expn@finchcms.edu

Springer International

Editors
M. J. Cavey, Calgary
W. W. Franke, Heidelberg
J. F. Morris, Oxford
A. Oksche, Giessen
B. Russell, Chicago
J. R. Sladek, North Chicago
N. J. Strausfeld, Tucson
K. Unsicker, Heidelberg

November 4, 1999

Francois Dube
Centre de recherche du CHUM
Hopital Saint-Luc
264 Rene-Levesque Est
Montral, Quebec H2X 1P1
Canada

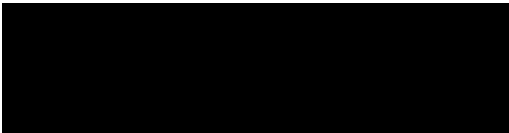
Dear Dr. Dube,

Your manuscript #99-016, entitled "Localization and quantification of serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima*," has now been reviewed for *Cell and Tissue Research*.

I have enclosed your manuscript, along with a copy of the reviews. The reviewers have identified the need for substantial revision prior to resubmission to the journal. In spite of these concerns, your contribution is judged of high enough significance to merit re-review. We are hopeful that you will be able to address these issues in a complete manner so that we may have the opportunity to reconsider this interesting contribution.

Please submit one original and two copies of your revised manuscript, and identify any changes in your cover letter to me.

Sincerely,



John R. Sladek, Jr., Ph.D.
Editor

JRS/ek
Enclosure

Localization and quantification of serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima*.

^{1,2}Masseau Isabelle, ²Bannon Pierre, ¹Anctil Michel and ²Dubé François

¹Département des sciences biologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec,
Canada H3C 3J7

²Département d'Obstétrique-Gynécologie, Université de Montréal, Centre de recherche
du CHUM, Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada H2X 1P1

Key words: spawning - immunohistochemistry - HPLC/ED - bivalve - mollusc

Corresponding author:

François Dubé, Centre de recherche du CHUM, Hôpital Saint-Luc, 264 René-Lévesque
Est, Montréal, Québec Canada H2X 1P1

Téléphone: 514-281-2444 # 5819

Fax: 514-281-2492

e-mail: dubefran@ere.umontreal.ca

Note : Dr Pierre Bannon dirige le laboratoire de biochimie clinique au pavillon Saint-Luc du CHUM. Il a collaboré à cette étude en participant à la mise au point des appareils et de la prise de données pour la quantification de la sérotonine par CLHP/DE.

Abstract

In the surf clam, *Spisula solidissima*, serotonin was reported to induce spawning when injected into the gonads. At nanomolar concentration, it facilitates the fertilizability of oocyte by sperm while, at micromolar concentration, it triggers the meiotic maturation of prophase 1-arrested oocytes, thus mimicking the effect of sperm. To further understand the implication of serotonin in the gametogenetic and spawning processes, serotonin was detected in the surf clam gonads using both immunohistochemistry and high-pressure liquid chromatography linked with electrochemical detection. Serotonin-containing varicose fibers were found covering the surface of the germinal epithelium in both sexes. The area occupied by the serotonergic innervation field encircling gonad acini was found to vary according to the gonadal stages (active phase, ripe phase, partially spawned phase, spent phase). We also found large variations in the serotonin concentration between specimens during the gametogenetic cycle that were correlated with gonad growth. The serotonin concentration was found to decrease in the ripe phase in comparison with the previous phase, the active phase. This decrease is believed to be attributable to the increase of total gonad mass in this stage. In contrast, as spawning begins, the total gonad mass declines while the gonad serotonin concentration increases to a similar level found in active phase. The presence of serotonin in gonads prior to spawning within fibers exhibiting distinct varicosities might suggest that it is implicated in spawning.

Introduction

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is believed to be implicated in the spawning process of bivalve molluscs since the pioneer work of Matsutani and Nomura (1982) who first reported that serotonin induces the release of gametes in the scallop *Patinopecten yessoensis*. Subsequently, serotonin was found to trigger spawning in several other pelecypods such as the bay scallop *Argopecten irradians* (Gibbons and Castagna 1984), the hard clam *Mercenaria mercenaria* (Gibbons and Castagna 1984), the ocean quahog *Arctica islandica* (Gibbons and Castagna 1984), the ribbed mussel *Geukensia demissa* (Gibbons and Castagna 1984), the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Ram et al. 1992), the doughboy scallop *Chlamys asperrima* (O'Connor and Heasman 1995), the pismo clam *Tivela stultorum* (Alvarado-Alvarez et al. 1996), the hen clam *Macra chinensis* (Fong et al. 1996) and particularly the surf clam, *Spisula solidissima* (Gibbons and Castagna 1984; Hirai et al. 1988). In this latter species (*Spisula solidissima*), serotonin, at high concentration (10-100 μM), also induces the reinitiation of meiotic maturation of isolated prophase 1-arrested oocytes (Hirai et al. 1988), whereas at lower concentration (<500 nM) it enhances the fertilizability of oocytes by sperm (Juneja et al. 1993; Clotteau and Dubé, unpublished). This suggests that serotonin might be present in the gonad where it would play a physiological role during the spawning process. Furthermore, this hypothesis is supported by radioligand binding studies revealing the presence of a new subtype of serotonin receptor on *Spisula* oocytes (Krantic et al. 1991; 1993). In agreement with the possibility that endogenous serotonin is a central neurochemical involved in surf clam reproduction, its presence in the animal's central nervous system (CNS) was reported long ago (Welsh and Moorhead 1960) and a serotonin-like substance was detected in its body fluids (Kadam

and Koide 1989). However, to date, no studies have reported the presence of serotonin in surf clam gonads.

In other molluscs, immunohistochemical and biochemical studies reported that serotonin was present in ganglia of *Mytilus edulis* (Welsh and Moorhead 1960; York and Twarog 1973; Stefano and Catapane 1977), *Artica islandica*, *Venus mercenaria*, *Ensis directus*, *Mya arenaria* (Welsh and Moorhead 1960) and *Mytilus galloprovincialis* (Vitellaro-Zuccarello et al. 1991). In other species, serotonin was detected both in ganglia and gonads of *Patinopecten yessoensis* (Matsutani and Nomura 1986), *Dreissena polymorpha* (Ram et al. 1992), *Pecten maximus* (Paulet et al. 1993), *Argopecten purpuratus* (Martinez and Rivera 1994; Martinez et al. 1996) and *Placopecten magellanicus* (Croll et al. 1995; Pani and Croll 1995). Therefore, it has been suggested that serotonin would be axonally transported from the CNS towards the gonads where several serotonin-immunoreactive fiber-like projections have been observed surrounding male and female acini (Matsutani and Nomura 1986; Ram et al. 1992; Paulet et al. 1993; Croll et al. 1995). On the other hand, in zebra mussels, it has been observed that female responsiveness (spawning) to serotonin varies during the gametogenetic cycle (Ram et al. 1993). In fact, serotonin fails to induce spawning of ripe females whereas a few weeks later, these same ripe females or less mature females may spawn upon injection of serotonin suggesting that endogenous serotonin might undergo modifications in the gonad, prior to spawning (Ram et al. 1993). Variations in serotonin localization have been described in the scallop *Placopecten magellanicus* in which abundant serotonin immunoreactive fibers were found surrounding gonad acini only a few weeks subsequent to spawning, whereas in spring, before spawning, they were occasionally detected around the germinal acini (Croll et al. 1995). Furthermore, in the ganglia of *Mytilus edulis* and the scallop *Pecten maximus* and both in ganglia and

gonads of the hermaphrodite *Argopecten purpuratus*, variations of serotonin content were reported that correlated with modifications occurring during the gametogenetic cycle (York and Twarog 1973; Stefano and Catapane 1977; Paulet et al. 1993; Martinez and Rivera 1994).

The precise involvement of serotonin in the control of spawning in bivalves remains unclear. To elucidate its implication in this process, the surf clam, *Spisula solidissima*, offers a good model for study since the effects of exogenous serotonin on spawning (Gibbons and Castagna 1984), oocyte maturation (Hirai et al. 1988) and fertilizability (Juneja et al. 1993) are well documented. In addition, surf clams have a well known gametogenetic cycle that has been described extensively by Ropes (1968). Finally, this pelecypod is a dioecious species that allows studies on both sexes individually. All these characteristics make the surf clam a good model to understand better the role played by serotonin in the reproduction of bivalve molluscs. The purpose of this study was to determine whether or not serotonin is present in surf clam gonads and to localize and quantify it through the gametogenetic cycle. To this end, the distribution of serotonin in gonads of the surf clam *Spisula solidissima* was determined by immunohistochemistry. The gonad serotonin concentration was also measured by high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC/ED). The results indicate that serotonin is present in the gonad of surf clam within fiber-like projections that surround both male and female germinal acini. In addition, these serotonin-containing fibers are present throughout the gametogenetic cycle, although some variations in their distribution and in gonad serotonin concentration are noted during this period, thus indicating that serotonin might be involved extensively throughout the gametogenetic cycle of the surf clam.

Materials and Methods

Handling of specimens

Surf clams (*Spisula solidissima*, over 80 mm) were collected at Iles-de-la-Madeleine (Québec, Canada) from April to September 1997 and shipped to the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Montréal, Canada) where they were kept in an aquarium at 8°C. Sixty-nine surf clams were used within two days for both immunolocalization and quantification of serotonin in gonads.

Immunohistochemistry

Pieces of gonad were excised and fixed in a solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 2.4% NaCl, overnight at 4°C. They were then washed thrice, 15 min each, in phosphate buffered saline (PBS), and transferred in a solution of 15% sucrose in PBS for 20 min in preparation for subsequent freezing. They were then immersed in PBS containing 30% sucrose until gonadal tissues settled on the bottom of the dish. Specimens were embedded with O.C.T. compound (Miles), frozen in chilled 2-methyl butane and stored at -80°C until used. Hacker cryostat sections, approximately 30 µm in thickness, were placed successively on different glass slides for further procedures of immunohistochemistry and histology.

After they were left to dry for 2 h on glass slides coated with 1 mg/ml L-polylysine (Sigma), tissue sections were washed 3 x 15 min in PBS at room temperature. They were incubated in 1% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.) containing 0.3% Triton X-100 in PBS for 20 min to reduce non-specific binding and increase permeability to antibodies. This was followed by incubation with rabbit anti-

serotonin antibody (Incstar: diluted 1:1750) and 0.2% Triton X-100 in PBS for 20-24 h at 4°C. Tissue sections were rinsed 3 x 10 min in PBS and incubated with Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.: diluted 1:100 in PBS) as the secondary antibody, for 1 h at room temperature. All subsequent procedures were performed at room temperature. After another rinse in PBS, sections were incubated, one hour, with 1 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma) for DNA staining. They were again washed three times, 10 min each, in PBS. Sections were mounted with Aquamount. Preparations were viewed and photographed using a Leitz Dialux EB epifluorescence microscope with two filter sets: for 5-HT detection, an excitation filter of 515-560 nm and an emission filter of 580 nm and for Hoechst detection, an excitation filter of 340-380 nm and an emission filter of 430 nm. The specificity of the anti-serotonin antibody was assessed by pre-absorbing 1 ml of diluted antibody with 200 µg of serotonin/bovine serum albumin conjugate (Incstar) over 16-24 h with gentle agitation at 4°C.

To determine the gonadal stages of surf clams, frozen tissue sections on gelatin-coated slides were processed for standard hematoxylin/eosin staining. Sections were then viewed using a Zeiss Axiomat microscope and the four different gonadal stages (active phase, ripe phase, partially spawned phase and spent phase) as defined by Ropes (1968) were determined (for more details see Results section). Light photomicrographs (shown in Fig. 1) were performed from standard hematoxylin/eosin-stained paraffin gonad sections of 10 µm in thickness that came from the entire visceral mass preserved in Bouin's fixative.

Measurement of serotonin content

After collecting small portions of gonadal tissues for immunohistochemistry, the remaining gonad was used for measurement of its serotonin content by high-pressure liquid chromatography (HPLC). After dissection, gonads were individually put in pre-weighed Eppendorf tubes containing 0.6-1.0 ml of ice-cold 0.1 N perchloric acid, weighed again and homogenized with a Kinematica Polytron. The homogenate was centrifuged at 16 000 g for 15 min at 4°C and the supernatant was stored at -80°C until processed. For measurement of serotonin recovery, a known amount of serotonin creatinine sulfate (Sigma) was added to half a gonadal specimen. The serotonin content of the other half gonad was measured and compared with the one containing exogenous serotonin.

The HPLC system consisted of a Waters pump (Model 590), equipped with a Waters Automatic Injection System (Model 710B). Amine detection was accomplished by means of a Waters M460 electrochemical detector with a potential of +0.85V applied across the electrode. Chromatographic separations were carried out on a Supelcosil LC-18-DB reverse-phase column (Supelco, 150 x 4.6 mm i.d.) packed with 5 µm particles, and equipped with a guard column (Supelguard LC-18-DB, 20 x 4.6 mm i.d.). Both columns were maintained at 40°C while the rest of the system was run at ambient temperature (22°C).

The mobile phase consisted of 300 mM phosphate buffer containing 4 mM 1-heptane sulfonic acid (Sigma), 0.2 g/l Na₂ EDTA (Fisher), and 5% acetonitrile (Baxter, Burdick and Jackson). The pH was adjusted to 2.5 with 85% o-phosphoric acid (Fisher). This solution was prepared with distilled and deionized water, and was

purified by a Norganic cartridge (Millipore) to remove any organic substances. The mobile phase was filtered through millipore membrane filters of 0.45 μm porosity under vacuum. The mobile phase was pumped at a rate of 1.3 ml/min, producing a background pressure of approximately 1000 psi.

The stock solutions of serotonin (Fisher) and of the internal standard 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA, Fisher) were prepared in 0.1 N perchloric acid at a concentration of 1 mM and stored at 4°C. The working standard solutions were prepared by diluting the stock solutions in 0.1 N perchloric acid. The standard retention times were 3.3 min for DHBA and 10.3 min for serotonin.

For each run, three serotonin and DHBA standards were processed to identify their retention times and confirm the serotonin elution peak from samples. This was followed by extracts containing the same amount of the DHBA standard. In all cases, 25 μl of samples and standards were injected in the column. The signal from the electrochemical detector was fed directly to a Waters Data Module 740 acquisition system. The serotonin content was determined by comparing serotonin/DHBA peak height ratios of unknown sample chromatograms with those of chromatograms from serotonin standards.

Statistical procedures

The data (ng of serotonin per gram of gonad wet weight) of combined male and female surf clams were tested for normality ($p < 0.01$) and heterocedasticity ($p < 0.001$). Since data were not normally distributed, and because of the small sample size, a non parametric test was used. There exists no such tests for two-way analysis of variance

(ANOVA). Therefore, all data were rank-transformed before computing a two way ANOVA (Shirley 1987). Pairwise comparisons were done using the Student-Newman-Keuls test. The accepted level of statistical significance was $p < 0.05$.

Next, female and male gonad serotonin concentrations (ng/g of gonad wet weight) were analyzed separately. As for the combined data, they were both tested for normality (female: $p > 0.05$; male: $p < 0.01$) and heterocedasticity (female: $p < 0.001$; male: $p > 0.05$). Since data from each sex were not normally distributed and comparison with combined data were necessary, all data were rank-transformed and a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed for each sex. Pairwise comparisons were done using the Student-Newman-Keuls test. The accepted level of statistical significance was $p < 0.05$.

The same statistical procedures were performed for the analysis of gonad wet weight (g) of combined female and male surf clams. A two-way ANOVA was performed on rank-transformed data since they were not normally distributed (normality: $p > 0.01$ and heterocedasticity: $p < 0.001$) and because of the small sample size. Subsequently, a one-way ANOVA was done on rank-transformed data from each sex separately since they were not normally distributed (normality: female, $p < 0.01$; male, $p > 0.2$; heterocedasticity: female, $p < 0.01$; male, $p < 0.01$). Pairwise comparisons were performed as above.

Results

Surf clams used for immunohistochemistry and HPLC were first examined to determine their gonadal stages. As shown in figure 1, we used specimens of every

stages of the gametogenetic cycle. Males in active phase (stage 1) of their gametogenetic cycle are easily distinguishable by the granular aspect of their acini (Fig. 1A). In this phase, spermatogonia proliferate from alveolar walls and early spermatocytes begin to occupy the lumen of acini forming radial columns. In the ripe phase (stage 2), acini exhibit, instead of a granular aspect, a braided shape as a result of sperm tails orienting toward the lumen of acini (Fig. 1B). When a lumen appears in the center of acini with some sperm tails still visible, spawning has begun and specimens are classified as partially spawned males (stage 3, Fig. 1C). At the end of the gametogenetic cycle, when males have released all of their gametes, acini are almost devoid of mature cells, with some spermatogonia proliferating in alveolar walls (stage 4, Fig. 1D). The female gametogenetic cycle follows almost the same pattern as males. In females in active phase (stage 1), oogonia and early oocytes appear in the periphery of acini, the latter being attached to the wall by a stalk (Fig. 1E). Afterwards, ripe females (stage 2) are easily recognizable by their large mature oocytes filling the lumen space of acini and by their thin alveolar wall (Fig. 1F). When spawning has begun, less mature oocytes are observed in the lumen of acini (stage 3, Fig. 1G). Finally, females in the last phase (stage 4) of their gametogenetic cycle have already released almost all ripe oocytes and oogenesis has already begun in the alveolar walls (Fig 1H).

Serotonin content

The specimens identified for their gametogenetic stage were used to measure their gonad serotonin content by high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC/ED). The HPLC/ED analysis of surf clam gonad extracts indicates the presence of a compound co-eluting with serotonin. The chromatogram (Fig. 2) illustrates the serotonin elution peak for both the standard and a

typical sample. From around 10.3 min of elution time onward, the serotonin elution peak is the only one present in all gonad extracts tested. We also found traces of compounds co-eluting with dopamine and 5-hydroxytryptophan in the majority of gonad extracts (not shown). Small elution peaks of unknown origin were commonly present in the extract chromatograms.

Serotonin was detected in all surf clam gonad extracts tested. We found large variations in gonad serotonin content among specimens, from 7.5 to 2117 ng per gram of gonad (wet weight). These results were further analyzed to verify whether these fluctuations were related to the sex and/or gonadal stage of the specimens. First, a two-way ANOVA analysis, using data transformed on ranks, shows that these variations of gonad serotonin concentration (ng/g) are observed in both male and female gonads (Table 1). Moreover, when we compare all males in the same gametogenetic stage with females in the corresponding phase, the two-way ANOVA indicates that for each gonadal stage, serotonin concentrations are not significantly different between males and females (Table 1). Since no difference between sexes was found, we tested the hypothesis that the variations in serotonin concentration during the gametogenetic cycle might be related to the gametogenetic stage of the gonad. As revealed by combined data analysis (Table 1), we find a significant difference ($p < 0.002$) of serotonin concentration (ng/g) between the different gonadal stages. In fact, all pairwise multiple comparison procedures (Student-Newman-Keuls Method) indicate that during the gametogenetic cycle, serotonin concentration in ripe phase (stage 2) differs greatly from the concentrations in active (stage 1) and spent phases (stage 4) when the data from both sexes are combined (Table 2). As shown in Fig. 3, a high gonad serotonin concentration is seen in active phase (stage 1), followed by an abrupt decline in ripe phase (stage 2), just before spawning. The gonad serotonin concentration seems to

increase again after spawning (stage 3) but this increase is not statistically significant (Fig. 3). A significantly higher gonad serotonin concentration is only reached when gametes have all been expelled from clams in the spent phase (stage 4, Table 2 and Fig. 3). Next, female and male clams were considered separately using one-way analysis of variance with rank-transformed data to test whether relationship between the gonadal stage and serotonin concentration was similar in both sexes. Indeed, female clams exhibit a significant difference between the gonadal stages for their serotonin concentrations ($p < 0.002$, Table 2 and Fig. 4). Moreover, all pairwise multiple comparison procedures (Student-Newman-Keuls Method) indicate that it corresponds closely to what has been observed with the sexes combined, whereas no significant difference emerged from analysis of male gonad serotonin concentrations (Table 2 and Fig. 4).

Subsequently, another two-way ANOVA analysis was performed to determine if the significant relation between the gonadal stage and the serotonin concentration is associated with the variations of gonad weight during the gametogenetic cycle. When the average gonad total weights were analyzed, no significant differences were noted between sexes when total specimens were considered as a whole or when they were subdivided according to their corresponding gonadal stages. However, a significant difference ($p < 0.001$) was noted when the gonad total weights, both sexes combined, were compared according to the different gonadal stages. Indeed, all pairwise multiple comparison procedures (Student-Newman-Keuls Method) indicate that the gonad weight increase significantly as the clams get ripe, thus between the active phase and the ripe phase (Table 3 and Fig. 5). This is followed by a little decrease as the clams begin to spawn that is not significantly different. When the clams have released all their gametes, a significant decrease is noted between the ripe phase or the partially spawned

phase and the spent phase (Table 3 and Fig. 5). We further verified, with a one-way ANOVA on ranked data, whether the relation between gonad weights and gonadal stages was similar when sexes were considered separately, and indeed found an identical trend for both females and males, as described above for the sexes combined (not shown).

Localization of serotonin immunoreactivity

To further support the quantitative analysis reported above, we undertook a qualitative analysis of serotonin immunoreactivity in gonad sections at different stages, using an anti-serotonin antibody.

In agreement with the detection of serotonin in gonads by HPLC/ED, serotonin immunoreactive (5-HT-IR) elements were detected in surf clam gonads of both sexes. Control sections (performed as described in Materials and Methods) were devoid of any staining in gonads (not shown). 5-HT-IR elements were observed in specimens from all gametogenetic stages. Transverse sections of acini show 5-HT-IR elements located at the periphery of each acinus with variations in their distribution among the gametogenetic stages as shown for both females (Fig. 6) and males (Fig. 7). Thus, in active phase females (Fig. 6A), 5-HT-IR elements are found surrounding each acinus where they form a thin discontinuous innervation field. At low magnification, little difference in 5-HT-IR staining could be noticed between the active and ripe phase females (Fig. 6A, B). However, in ripe females (Fig. 6B), the staining around acini is more frequently interrupted and appears concentrated to varicosities within fiber-like projections. In the following stage, when spawning has begun, and thus the acini contain fewer ripe oocytes in their lumen, different patterns of 5-HT-IR elements could be seen (Fig. 6C). Staining depended on the spawning condition of the acinus. Acini

that are still full of oocytes show the same immunoreactive staining than ripe females, whereas acini that have begun to expel some oocytes show an uninterrupted staining all around the acinus. As the spent phase is reached, almost all mature oocytes have been expelled and gonadal tissues began to disrupt. At this stage, some acini remain recognizable whereas others are completely disrupted or apparently shrunk (Fig. 6D). In non-disrupted acini, as well as in disrupted acini constituting the major part of the gonad, 5-HT-IR staining is still found over a large area of their periphery as an apparently more disorganized meshwork of numerous interconnecting fibers, as compared to the other stages. During the male gametogenetic cycle (Fig. 7), 5-HT-IR elements are found similarly distributed as in females. Thus, in active phase males (Fig. 7A), granular acini are surrounded by a few 5-HT-IR fiber-like projections that form a thin innervation field. As they reach the ripe phase (Fig. 7B), male acini display an interrupted staining pattern resulting mostly from varicosities within one serotonin-immunoreactive fiber-like projection. Next, in males that have already begun to spawn (Fig. 7C), several serotonin immunoreactive projections are observed occupying a larger innervation field around the acinus than in ripe phase. Furthermore, after sperm has been completely expelled from acini (Fig. 7D), similarly to females, the immunoreactive field around recognizable acini is amplified by numerous serotonin fiber-like projections, also found in disrupted acini.

Figure 8 provides a more detailed view of the serotonin immunoreactive staining patterns in female gonads in contrast with the pattern of cell distribution as revealed by the DNA stain, Hoechst 33258. In all gonadal stages, 5-HT-IR elements are always organized as fiber-like structures containing varicosities. Some of these fibers can be observed individually, allowing us to observe their various shapes, orientations and in some cases, to count them. No staining is observed on or in oocytes present in gonad

sections (Fig. 8B) or in isolated oocytes (not shown). More specifically, active phase (Fig. 8A) and ripe females (Fig. 8B) display a similar pattern of innervation compared to partially spawned stage (Fig. 8C) and spent stage (Fig. 8D). In the two former stages, serotonergic fibers run parallel to the alveolar wall. At the ripe stage, generally only one serotonergic fiber can be followed through the sections and usually only a few in active phase. In contrast, when the acini begin to have less oocytes in their lumen (spawning stage), several short fibers appear in the same plan of focus and cannot be individually distinguished on an appreciable length as much as in the ripe stage. At later stages, it becomes impossible to determine the number of fibers surrounding acini. In addition, these fibers display no specific orientation plan, sometimes being parallel to the alveolar wall, sometimes perpendicular or at any other angle. The shape of serotonergic fibers may also vary. In the two first stages, fibers display varicosities separated by relatively long intervaricose segments (Fig. 8B). In contrast, fibers in the following two stages display numerous varicosities with little intervaricose segment. This results in an irregular and denser meshwork of fibers.

Discussion

The present study provides immunohistochemical and biochemical evidence for the presence of serotonin within the gonad of the surf clam, *Spisula solidissima*. This is in agreement with previous immunohistochemical and biochemical investigations on other bivalves, such as scallops (Matsutani and Nomura 1986; Paulet et al. 1993; Martinez and Rivera 1994; Croll et al. 1995; Pani and Croll 1995) and the zebra mussel (Ram et al. 1992), which reported evidence of a serotonergic system within the gonad. Similarly to these other species, the surf clam gonad is innervated by plexuses of serotonin-containing varicose fibers covering the surface of the germinal epithelium.

According to Ram et al. (1992), serotonin immunoreactivity encircling acini had a similar appearance in both sexes in the zebra mussel, unlike that reported in *Pecten maximus* (Paulet et al. 1993). In *Spisula*, the similar pattern of gonadal serotonin immunoreactivity in both sexes agrees with the reported similar spawning responsiveness in both sexes after intragonadal injection of exogenous serotonin (Hirai et al. 1988).

The positive serotonergic immunoreactivity in the surf clam gonad is supported by evidence obtained by HPLC/ED. In agreement with previous measurements of serotonin in other bivalves, such as the zebra mussel (Ram et al. 1992) and the scallop *Placopecten magellanicus* (Croll et al. 1995; Pani and Croll 1995), the gonadal serotonin concentrations are largely at similar levels in both male and female surf clams, thus suggesting that gonadal serotonin has similar roles in the reproductive processes in both sexes. On the other hand, our results are in contrast with those reported for the hermaphrodite *Argopecten purpuratus* in which differences in the serotonin concentration between male and female gonad portions were reported (Martinez and Rivera 1994). Indeed, in other scallop species, male and female do not respond similarly following injection of exogenous serotonin. In addition, the gonadal serotonin concentration in active phase surf clam is quite similar to the levels reported for scallops collected in spring (before spawning) (Croll et al. 1995; Pani and Croll 1995).

Our work, however, is the first to report changes in the pattern of gonadal serotonin innervation during the various stages of the gametogenetic cycle. During the active phase (stage 1) when clam gonads contain small but recognizable gametes, some serotonin-containing fibers are detected covering the surface of the germinal acini, an observation also reported for scallops at a similar stage (Croll et al. 1995). However,

later in the season, in ripe gonads (stage 2), these varicose fibers conserve a similar shape and can be easily detected but they appear less numerous along the germinal acini than in the previous phase, an observation never reported for other bivalves. Concurrently, the gonadal serotonin concentration is, at this phase (ripe phase), significantly lower than in the active phase. This was also observed for the female gonad portion of the hermaphrodite *Argopecten purpuratus* in which the serotonin concentration decreases during the two weeks before the second annual spawning (Martinez and Rivera 1994). When spawning has begun and the total mass of gonads starts decreasing, a more extensive network of conspicuous serotonin-containing fibers is detected around the germinal epithelium. Croll et al. (1995) made similar qualitative observations with scallops that were not, however, supported by any parallel significant changes in quantitative measurements of serotonin levels. When surf clams have completed spawning (stage 4, spent phase), and almost all mature gametes have been expelled, leaving an almost empty, shrunken and lower-mass gonad, numerous serotonin-containing fibers encircle the acini, as also reported for the scallop *P. magellanicus* of the same gonadal stage (Croll et al. 1995). This observation is supported by a significantly higher serotonin concentration in comparison with values obtained from ripe clams (stage 2). Thus, unlike *Argopecten purpuratus* (Martinez and Rivera 1994), in which the serotonin concentration decreases after spawning, it increases in clams and it remains presumably high until the following ripe stage.

In contrast, even though similar qualitative changes could be observed in the serotonergic innervation in male gonads during the gametogenetic cycle, these observations are not paralleled by significant changes in serotonin concentrations between the various gametogenetic stages. This may be partly due to the great variations of serotonin concentrations between individual specimens and the small

sample size for the fourth phase (spent phase) of the gametogenetic cycle. Indeed, since overall immunohistochemical observations are similar between both male and female surf clams and the gonad mass varies in the same manner as in female, we would expect a similar regulation of the gonadal serotonergic network in both sexes.

Finally, it should be noted that no serotonin-containing somata could be detected in the gonads. Consequently, we believe that these serotonergic fibers are ramifications of neurites whose somata are located in the CNS. Since it is known that serotonin is present in the accessory lobes of the visceral ganglion and that the gonadal nerve arises from this ganglion in *Pecten maximus* (Paulet et al. 1993), it is likely that the serotonergic projections detected in the surf clam gonad originate from the corresponding region of its CNS. Full confirmation of the origin of serotonergic ramifications in clam gonads would require additional investigations such as double labelling with tract-tracing and serotonin immunohistochemistry.

Overall, we find that gonadal serotonin concentration is inversely correlated with the total gonad mass. Indeed, the significant decrease in serotonin concentration during the ripe phase (Fig. 3) most probably reflects the major increase in the total mass of gonads when they are ripe (Fig. 5). Since this increase in total mass of gonads is mostly due to multiplication and growth of gametes, which are devoid of serotonin, this results in a lower serotonin concentration when expressed in ng/g gonadal tissue. In contrast, when spawning is complete and the total gonad mass is low, the serotonin concentration is high. Therefore, the total serotonin content within gonads appears to remain rather stable and at substantial levels throughout the gametogenetic cycle. This may underlie an important role for serotonin in accomplishing different functions at various stages of the gametogenetic cycle [in addition to the roles discussed below].

Furthermore, since endogenous serotonin is present in the ripe phase gonad in *Spisula*, and since exogenous serotonin induces the release of sexual cells, serotonin is believed to be directly involved in the spawning process. In their natural habitat, the appropriate environmental conditions for reproduction, such as water temperature, food availability and salinity, would be detected by sensory receptors that might induce, via the CNS, the release of endogenous serotonin in the gonad. This would happen in ready-to-spawn ripe clams in which gonads exhibit a few serotonin-containing fibers with distinct varicosities. The latter are known to be the sites of serotonin release. Pharmacological investigations designed to characterize the possible receptor involved in spawning showed that serotonin antagonists could block the effect of serotonin on spawning in the zebra mussel (Fong et al. 1994a,b). Further investigations are needed to characterize this receptor in *Spisula*. Furthermore, it is not clear where this receptor is located in the gonad. Alvarado-Alvarez et al. (1996) suggested that serotonin receptors may be located on somatic tissue of the germinal epithelium and on the germ cells of bivalve molluscs.

At the time of spawning, the release of serotonin in the gonads could also enhance the fertilizability of oocyte by sperm *in vivo* as reported *in vitro* on isolated *Spisula* oocytes (Juneja et al. 1993). This could happen through the binding of serotonin to its receptor located on the oocytes, which is reported to be present by radioligand binding studies (Krantic et al. 1991; 1993).

Our present work clarifies the localization and pattern of serotonin and its quantitative fluctuations during the gametogenetic cycle in *Spisula*. This opens new avenues for further investigations, for example, on the neuronal regulation of serotonin release or on a possible regulation through receptor expression.

Acknowledgements.

We thank Ghislain Cummings for the collection and shipping of specimens. We are also grateful to Louise Pelletier and Gilles Clotteau for their technical support and to Dr. F.-J. Lapointe for statistical advice. This research was supported by a grant from FCAR-Equipes (Québec) to M. A. and F. D.

References

Alvarado-Alvarez R, Gould MC, Stephano JL (1996) Spawning, *in vitro* maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Tivela stultorum*. Biol Bull 190: 322-328

Croll RP, Too CKL, Pani AK, Nason J (1995) Distribution of serotonin in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. Invert Reprod Develop 28: 125-135

Fong PP, Duncan J, Ram JL (1994a) Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). Experientia 50: 506-509

Fong PP, Hardege JD, Ram JL (1994b) Long-lasting, sex-specific inhibition of serotonin-induced spawning by methiothepin in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). J Exp Zool 270: 314-320

Fong PP, Deguchi R, Kyojuka K (1996) Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from Central Japan. Biol Bull 191: 27-32

Gibbons MC, Castagna M (1984) Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. Aquaculture 40: 189-191

Hirai S, Kishimoto T, Kadam AL, Kanatani H, Koide SS (1988) Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. J Exp Zool 245: 318-321

Juneja R, Segal SJ, Koide SS (1993) Promotion of fertilizability of *Spisula* oocytes with 5-hydroxytryptamine. Invert Reprod Develop 24: 103-106

Kadam AL, Koide SS (1989) Characterization of a factor with oocyte maturation inducing activity in *Spisula*. Biol Bull 176: 8-13

Krantic S, Dubé F, Quirion R, Guerrier P (1991) Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes. Dev Biol 146: 491-498

Krantic S, Dubé F, Guerrier P (1993) Evidence for a new subtype of serotonin receptor in oocytes of the surf clam *Spisula solidissima*. Gen Comp Endocr 90: 125-131

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 (1996) Monoamines and the release of gametes by the scallop *Argopecten purpuratus*. *J Exp Zool* 274: 365-372

Matsutani T, Nomura T (1982) Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Mar Biol Lett* 3: 353-358

Matsutani T, Nomura T (1986) Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Cell Tissue Res* 244: 515-517

O'Connor WA, Heasman MP (1995) Spawning induction and fertilization in the doughboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperrima*. *Aquaculture* 136: 117-129

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

Paulet Y-M, Donval A, Bekhadra F (1993) Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Invert Reprod Develop* 23: 89-94

Ram JL, Croll RP, Nichols SJ, Wall D (1992) The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), a new pest in North America: Reproductive mechanisms as possible targets of control strategies. *Invert Reprod Develop* 22: 77-86

Ram JL, Crawford GW, Walker JU, Mojares JJ, Patel N, Fong PP, Kyojuka K (1993) Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *J Exp Zool* 265: 587-598

Ropes JW (1968) Reproductive cycle of the surf clam, *Spisula solidissima*, in offshore New Jersey. *Biol Bull* 135: 349-365

Shirley E (1987) Applications of ranking methods to multiple comparison procedures and factorial experiments. *Applied Statistics* 36: 205-213

Stefano GB, Catapane EJ (1977) Seasonal monoamine changes in the central nervous system of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Experientia* 33: 1341-1342

Vitellaro-Zuccarello L, De Biasi S, Bernardi P, Oggioni A (1991) Distribution of serotonin-, gamma-aminobutyric acid- and substance P-like immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of *Mytilus galloprovincialis*. *Tissue Cell* 23: 261-270

Welsh JH, Moorhead M (1960) The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates, especially in their nervous systems. *J Neurochem* 6: 146-169

York B, Twarog BM (1973) Evidence for the release of serotonin by relaxing nerves in molluscan muscle. *Comp Biochem Physiol* 44A: 423-430

Fig. 1 Sections of gonads at the different stages of surf clam gametogenetic cycle. A-D: males; E-H: females. The various stages depicted are: active phase (stage 1; **A, E**), ripe phase (stage 2; **B, F**), partially spawned phase (stage 3; **C, G**), and spent phase (stage 4; **D, H**). Note typical male (**A**) and female (**E**) acini that are surrounded by arrows. Also, note the thin alveolar wall (*between arrows*) in female partially spawned phase (**G**). Scale bars: 100 μm .

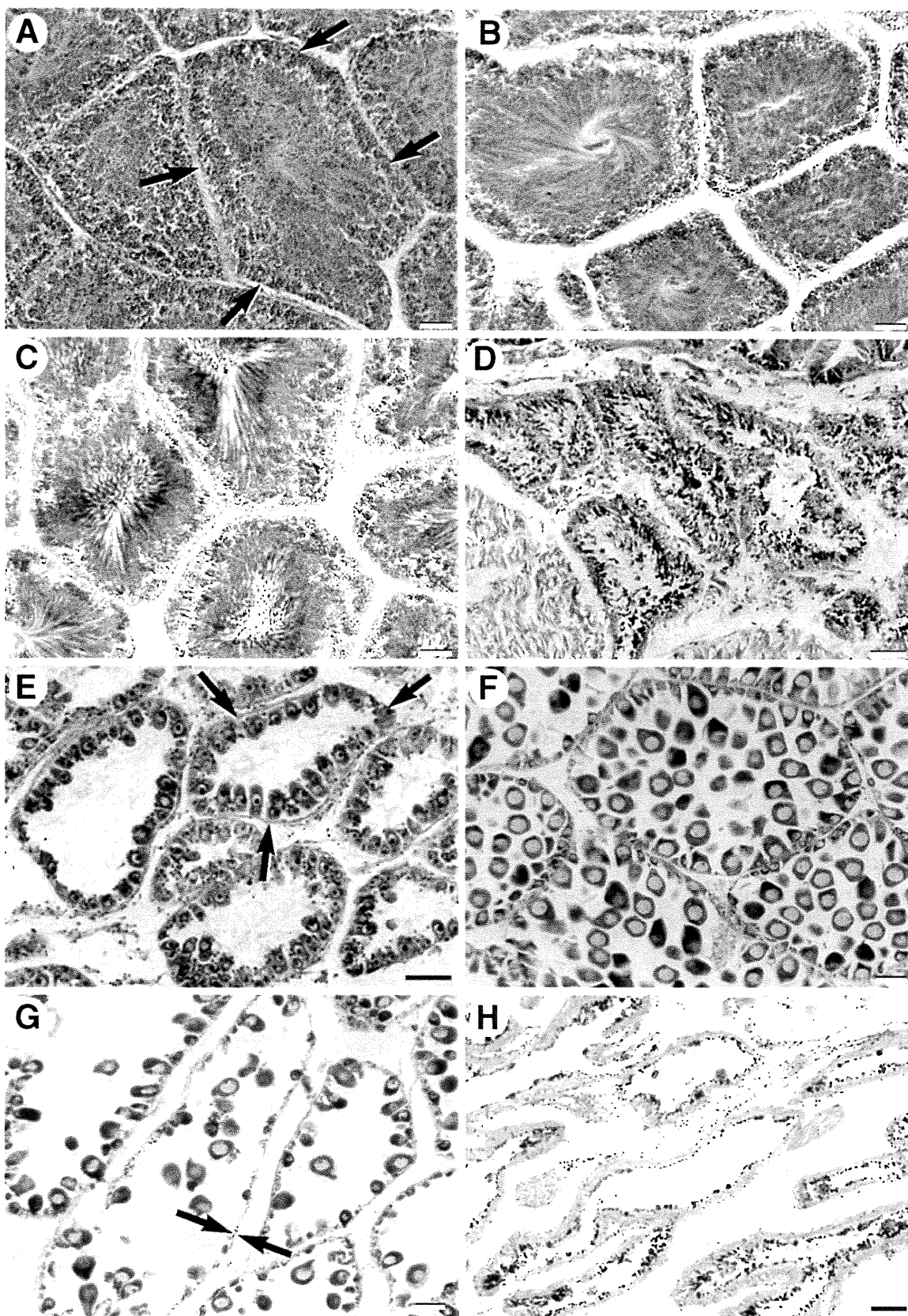


Fig. 2 HPLC-ED detection of serotonin in surf clam tissue extracts. **Left trace:** Detection of standards following injection (*arrow*) of 1 μ M of serotonin (5-HT) and 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA); **Right trace:** Chromatogram of surf clam gonad extract run consecutively to the standard. DHBA was used as an internal standard (see Materials and Methods). Note in the right trace that an unidentified peak is shown (?) that does not correspond to any other serotonin-related or catecholaminergic compounds tested, e. g. 5-hydroxy-3-indoleacetic acid, N-acetyl-serotonin, epinephrine, norepinephrine.

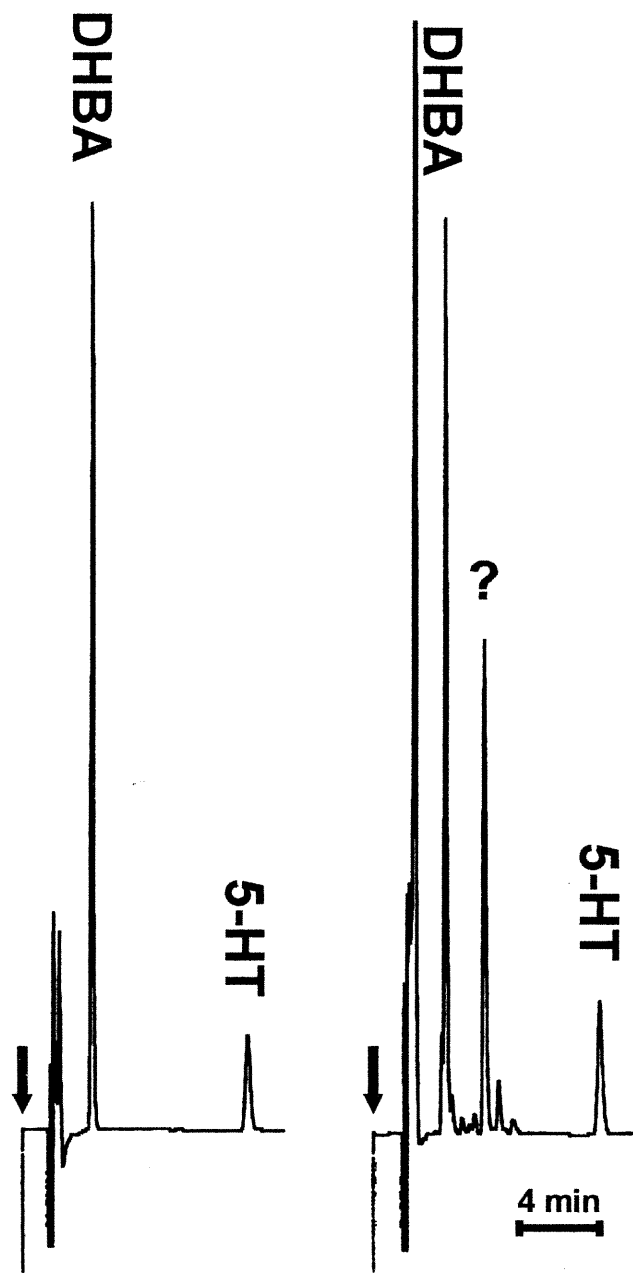


Fig. 3 Average serotonin concentration in surf clam gonads during the gametogenetic cycle. Data from both sexes are combined. The gametogenetic cycle was divided in four different stages: (1) active phase, (2) ripe phase, (3) partially spawned phase, and (4) spent phase. The letters a and b indicate which of the stages are significantly different from each other, or not. The two stages (1 and 4) that display an « a » are not different from each other whereas they significantly differ from the other stage (2) that display a « b ». The stage 3 marked by « ab » is not significantly different from any of the three other stages. Vertical error bars correspond to standard error of the means (SEM).

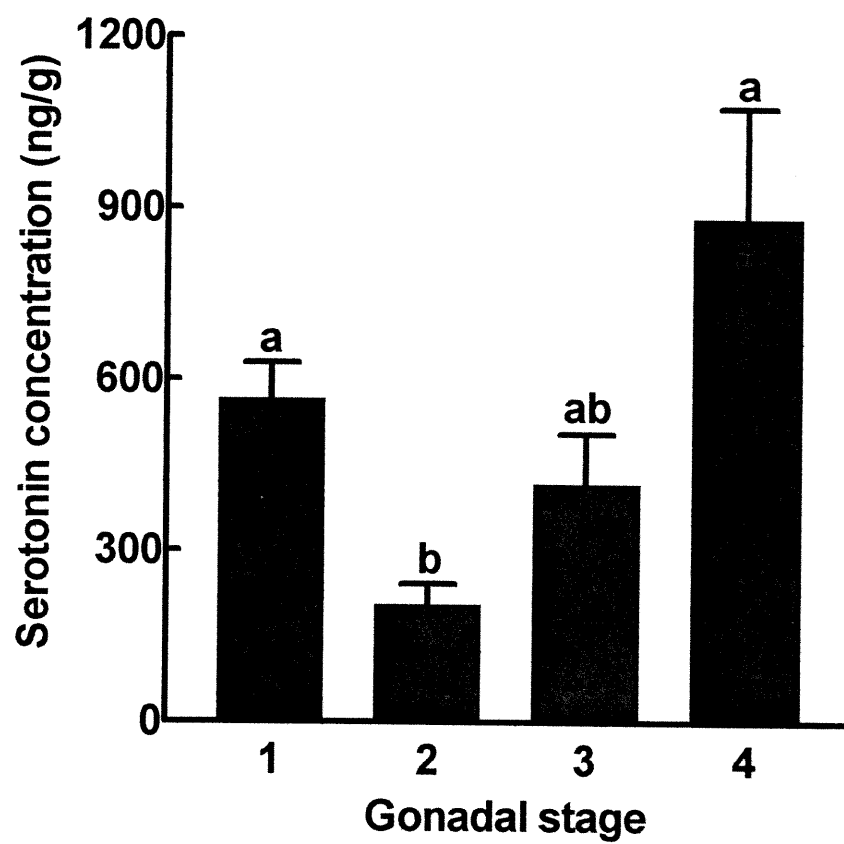


Fig. 4 Average serotonin concentration in surf clam gonads during female and male gametogenetic cycle. The gametogenetic cycle was divided in four different stages: (1) active phase, (2) ripe phase, (3) partially spawned phase, and (4) spent phase, for both females (♀) and males (♂). The only significant differences were found in females between gonadal stages 1 and 2, 1 and 3, 2 and 4, and 3 and 4. The letters a and b indicate which of the stages are significantly different from each other, or not. The two stages that display an « a » are not different from each other whereas they significantly differ from the other two stages that display a « b ». In males, none of the stages were significantly different one from another. Vertical error bars correspond to standard error of the means (SEM).

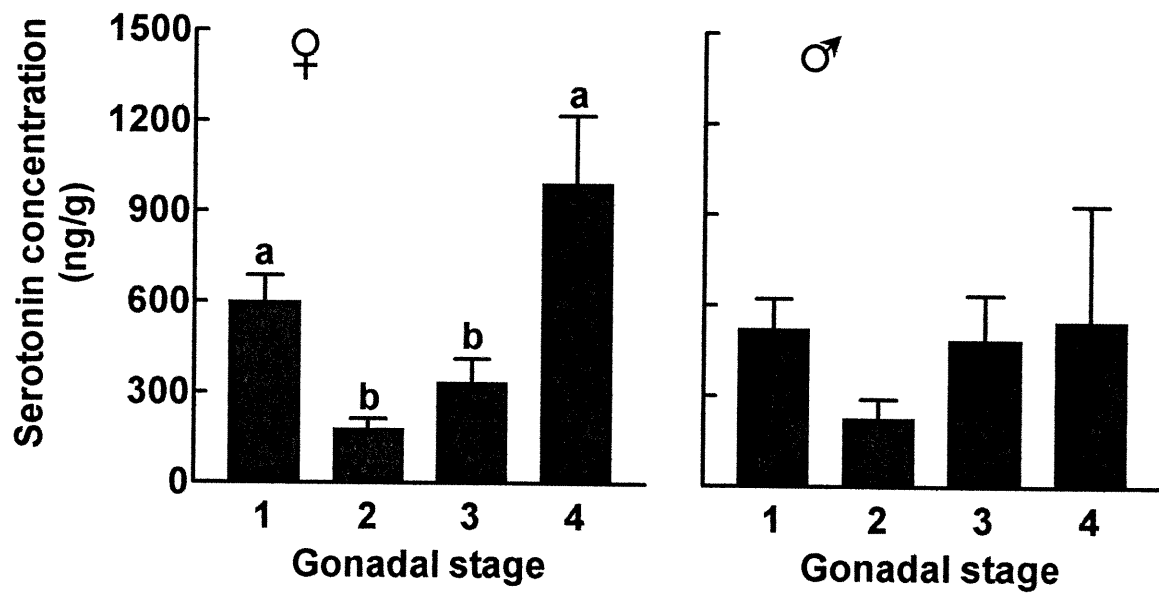


Fig. 5 Average gonad wet weight in surf clam gonads during the gametogenetic cycle. Data from both sexes are combined. The gametogenetic cycle was divided in four different stages: (1) active phase, (2) ripe phase, (3) partially spawned phase, and (4) spent phase. The letters a and b indicate which of the stages are significantly different from each other, or not. The two stages (1 and 4) that display an « a » are not different from each other whereas they significantly differ from the other two stages (2 and 3) that display a « b ». Vertical error bars correspond to standard error of the means (SEM).

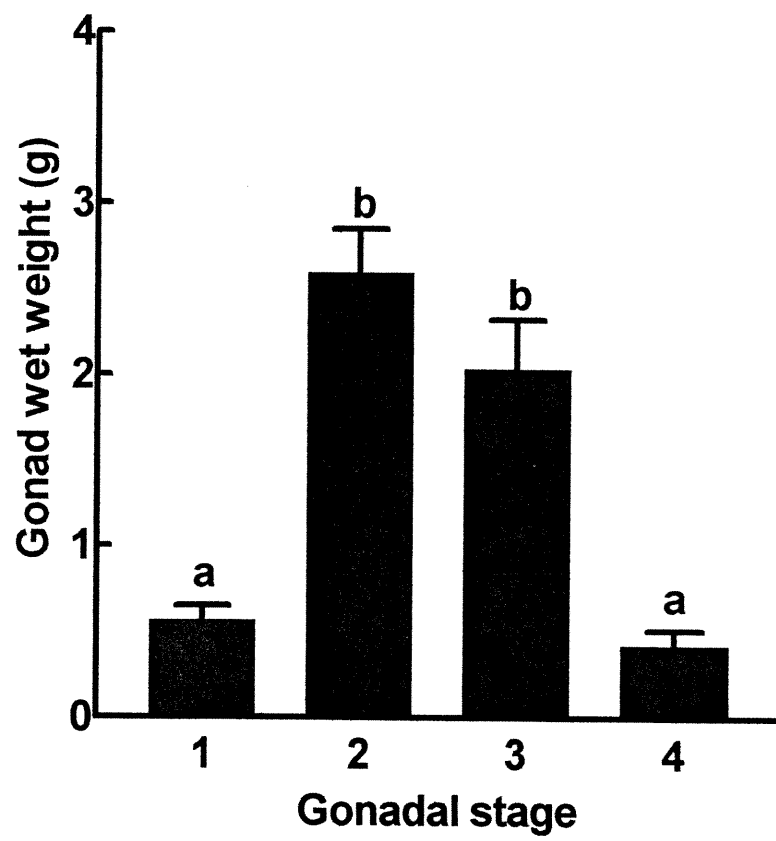


Fig. 6 Localization of serotonin immunoreactivity in surf clam female gonads during the gametogenetic cycle. The gametogenetic cycle was divided in four different stages: **(A)** active phase, **(B)** ripe phase, **(C)** partially spawned phase, and **(D)** spent phase. Note, in **A**, the localization of the staining indicated by arrows surrounding active phase acini. Note in **C** a meshwork of serotonin immunoreactive fibers in a tangential gonad section (*arrow*).

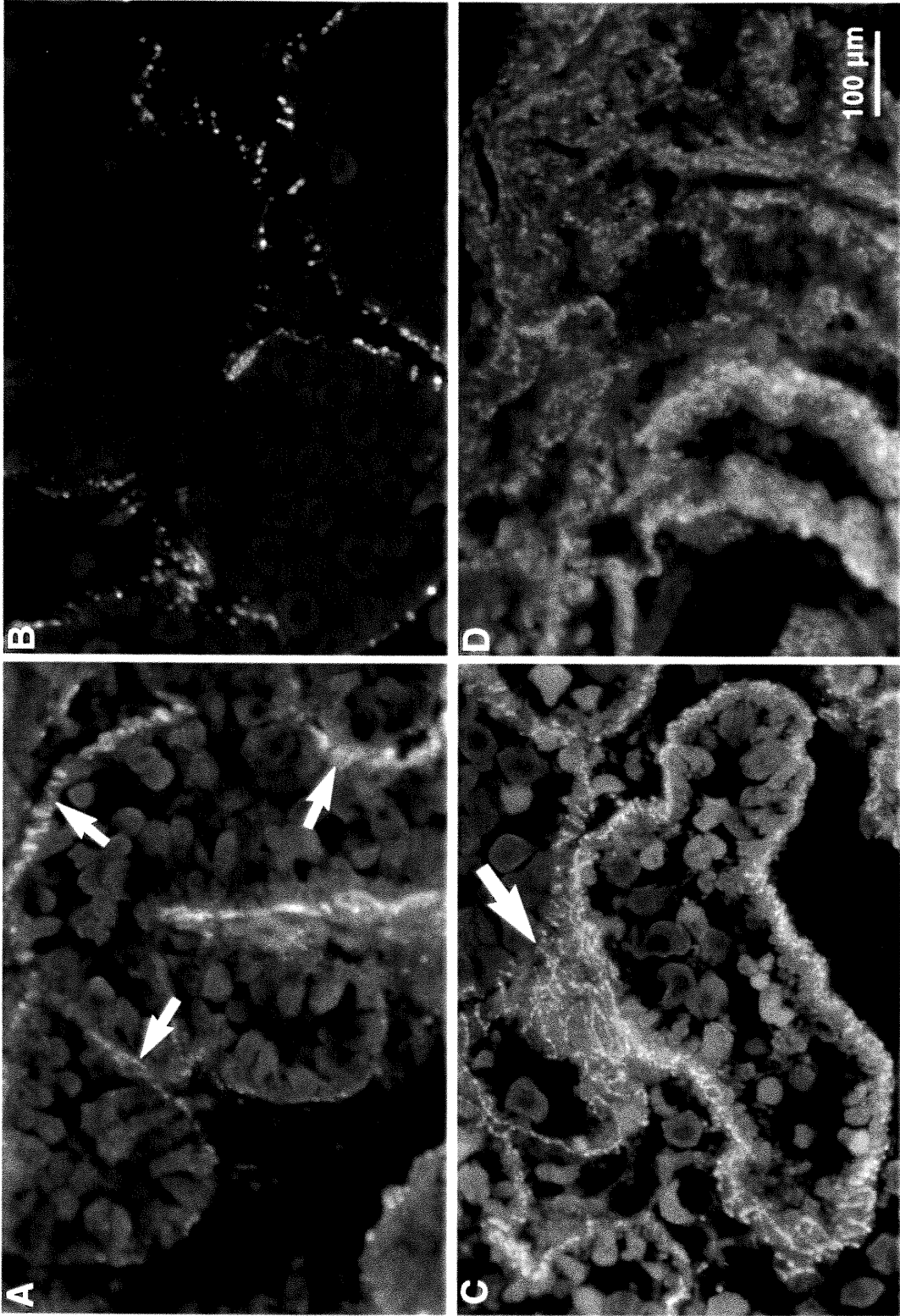


Fig. 7 Localization of serotonin immunoreactivity in surf clam male gonads during the gametogenetic cycle. The gametogenetic cycle was divided in four different stages: (A) active phase, (B) ripe phase, (C) partially spawned phase, and (D) spent phase. Note, in A, the localization of reactive fibers surrounding two acini (*arrows*).

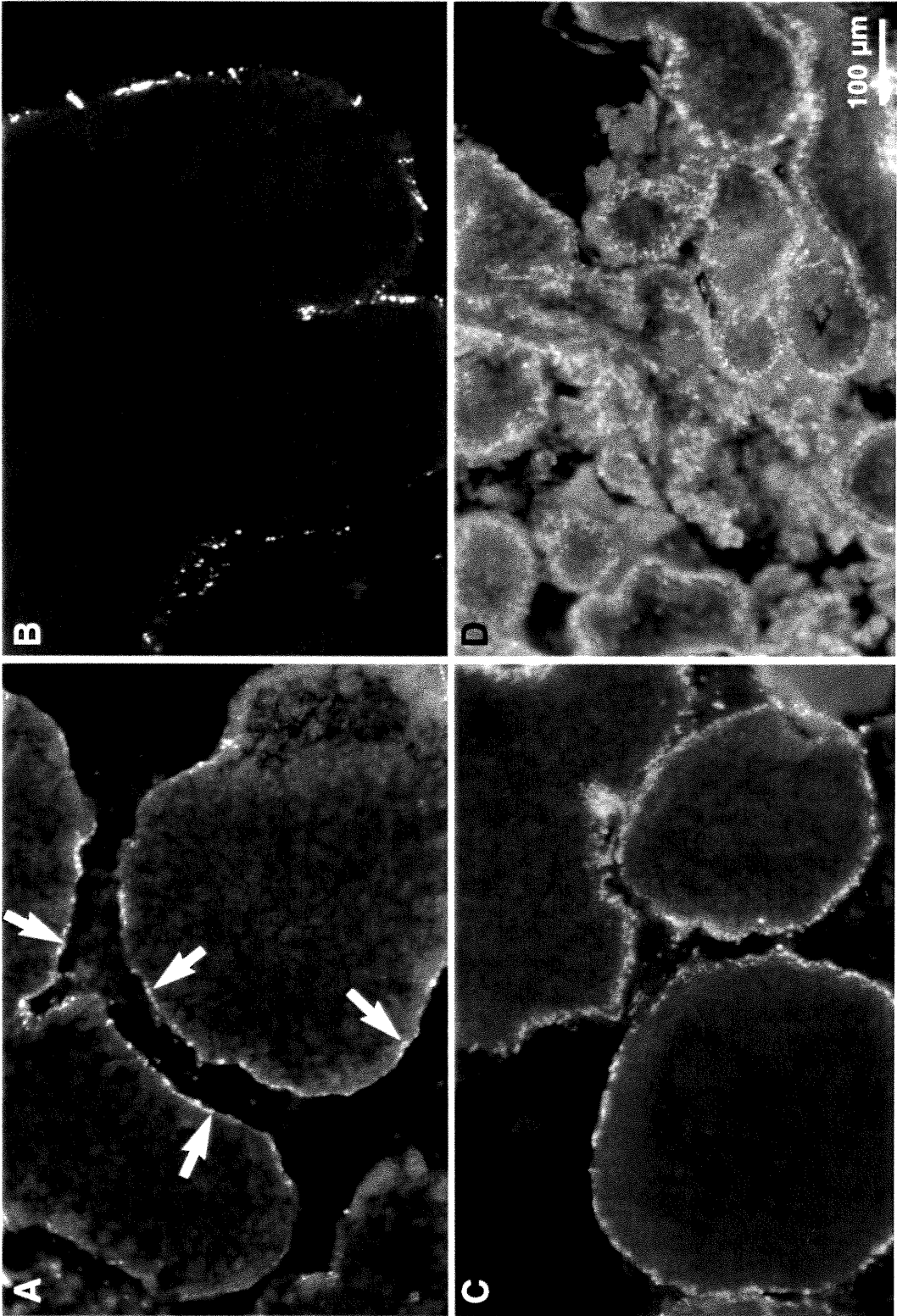


Fig. 8 Epifluorescence micrographs of serotonin immunoreactivity and DNA stain (Hoechst 33258) in surf clam female gonads during the gametogenetic cycle. Serotonin immunoreactive elements are stained in red whereas DNA stain (Hoechst 33258) is blue. The gametogenetic cycle was divided in four different stages: **(A)** active phase, **(B)** ripe phase, **(C)** partially spawned phase, and **(D)** spent phase. Note, in **A** and in **B**, the width of the alveolar wall (*between arrows*). Also, note in **B**, the two varicosities of serotonin immunoreactive projection (*open arrows*). GV: germinal vesicle of ripe oocytes.

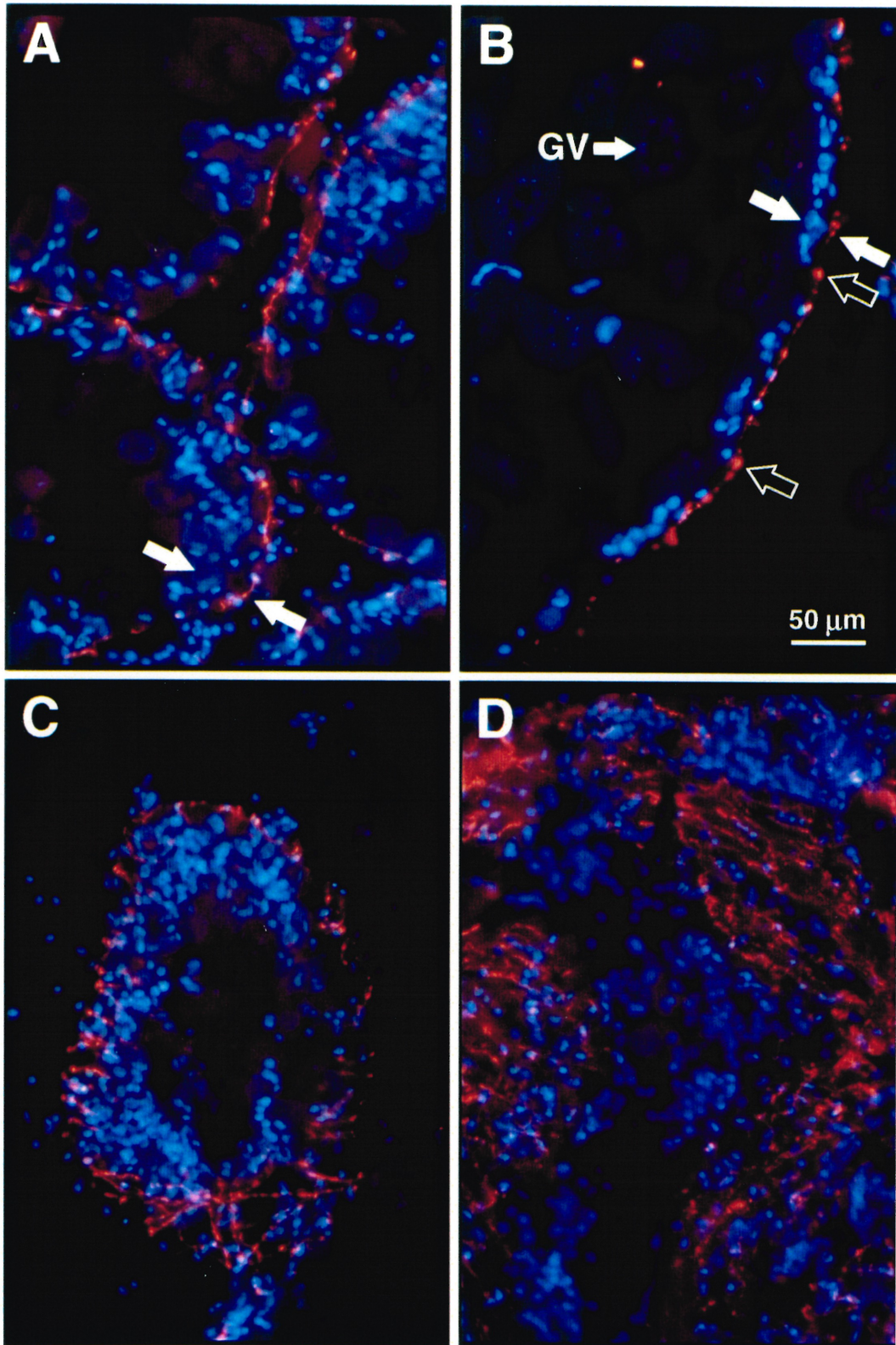


Table 1. Analysis of serotonin concentration in surf clam gonads during the gametogenetic cycle.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean squares	F test statistic	<i>P</i> value ¹
Sex	1	171.0	171.0	0.519	0.474
Gonadal stage	3	5292.5	1764.1	5.351	0.002*
Sex vs gonadal stage	3	813.3	271.1	0.822	0.487
Residual	61	20110.7	329.6	-	-
Total	68	27370.0	402.5		

¹The tissue serotonin concentrations are statistically analyzed by two-way ANOVA on ranked data; * significantly different at $p < 0.05$

Table 2. Comparison of serotonin concentrations between gonadal stages in surf clam gonads.

Gonadal stages comparison¹	P value		
	Sexes combined²	Females only³	Males only⁴
Active phase (1) vs ripe phase (2)	$p < 0.01$	$p < 0.01$	ns
Active phase (1) vs partially spawned phase (3)	ns	$p < 0.05$	ns
Active phase (1) vs spent phase (4)	ns	ns	ns
Ripe phase (2) vs partially spawned phase (3)	ns	ns	ns
Ripe phase (2) vs spent phase (4)	$p < 0.05$	$p < 0.01$	ns
Partially spawned phase (3) vs spent phase (4)	ns	$p < 0.05$	ns

¹Serotonin concentration in gonadal stages was analyzed by all pairwise multiple comparison procedures (Student-Newman-Keuls Method (S.N.K.)); ns: not significantly different

²The S.N.K. test was performed on ranked data from both male and female gonads

³The S.N.K. test was performed on ranked data from female gonads only.

⁴The S.N.K. test was performed on ranked data from male gonads only.

Table 3. Comparison of gonad wet weight between gonadal stages in surf clam gonads.

Gonadal stages comparison ¹	<i>P</i> value Sexes combined ²
Active phase (1) vs ripe phase (2)	<i>p</i> <0.001
Active phase (1) vs partially spawned phase (3)	<i>p</i> <0.001
Active phase (1) vs spent phase (4)	ns
Ripe phase (2) vs partially spawned phase (3)	ns
Ripe phase (2) vs spent phase (4)	<i>p</i> <0.001
Partially spawned phase (3) vs spent phase (4)	<i>p</i> <0.001

¹Gonad wet weight in gonadal stages was analyzed by all pairwise multiple comparison procedures (Student-Newman-Keuls Method (S.N.K.)); ns: not significantly different

²The S.N.K. test was performed on ranked data from both male and female gonad.

3.0 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Nous avons atteint nos objectifs initiaux qui étaient de mettre en évidence la présence de la sérotonine dans la gonade de la palourde, *Spisula solidissima* et de la quantifier. Pour ce faire, l'immunohistochimie s'est révélé une technique de choix puisqu'elle a permis également une description qualitative de la localisation de la sérotonine dans les gonades. Pour appuyer ces résultats, nous avons utilisé la chromatographie liquide à haute pression avec détection électrochimique (CLHP/DE). Cette deuxième technique apportait des données quantitatives complémentaires aux caractéristiques morphologiques de l'innervation sérotoninergique des gonades. Nous avons pu comparer directement les résultats des deux différentes techniques, toutes deux appliquées sur chacun des spécimens récoltés.

À l'aide d'un anticorps dirigé contre la sérotonine, nous avons montré que celle-ci est exclusivement localisée dans des projections nerveuses variqueuses couvrant l'épithélium germinatif des acini de tous les spécimens récoltés, mâles et femelles. Cette localisation concorde avec les observations rapportées chez d'autres bivalves (pétoncles: Matsutani et Nomura, 1986; Paulet *et al.*, 1993; Croll *et al.*, 1995; et la moule zébrée: Ram *et al.*, 1992). Aucune immunoréactivité à la sérotonine n'est présente à l'intérieur de l'acinus, que ce soit dans les ovocytes, isolés ou en coupes, ou dans les spermatozoïdes. Ainsi, la sérotonine qui serait disponible pour le tissu gonadique, quel que soit son rôle à jouer dans la gonade, proviendrait de ces fibres sérotoninergiques variqueuses, d'origine exogène, puisque aucun corps cellulaire sérotoninergique n'a été détecté. Par conséquent, les gonades seraient innervées par des ramifications de neurites dont les corps cellulaires seraient situés au niveau du système nerveux central. Où exactement ? Chez la palourde, les gonades sont innervées par un nerf émergent du

connectif cérébroviscéral (Nagabhushanam, 1963; Pearse *et al.*, 1987). Étant donné que ce connectif relie les ganglions cérébraux et viscéraux, que chez *Mytilus edulis* la sérotonine est transportée des ganglions cérébraux aux viscéraux (Stefano et Aiello, 1990, et que chez *Pecten maximus*, plusieurs fibres immunoréactives à la sérotonine ont été détectées dans les connectifs cérébroviscéraux (Paulet *et al.*, 1993), les corps cellulaires des neurites innervant les gonades pourraient être situés dans les ganglions cérébraux. Par contre, chez *Pecten maximus*, Paulet et ses collaborateurs (1993) ont aussi montré que deux lobes accessoires, situés à la base des connectifs cérébroviscéraux, donc adjacents aux ganglions viscéraux, envoient des nerfs directement aux gonades et contiennent une concentration appréciable de neurones immunoréactifs à la sérotonine. Chez *Spisula*, la localisation des corps cellulaires appartenant aux ramifications sérotoninergiques innervant les gonades demeure à être vérifiée. Pour ce faire, il s'agirait d'effectuer un double marquage en utilisant à la fois l'immunoréactivité à la sérotonine et un marqueur rétrograde.

Dans un deuxième temps, sachant que la sérotonine est présente dans les gonades, nous avons suivi l'état de l'innervation sérotoninergique des gonades, morphologiquement et quantitativement, pendant le cycle gamétogénétique. En se basant sur des travaux précédents effectués dans le laboratoire du Dr Dubé et ceux de Ropes (1968), nous connaissons bien le cycle gamétogénétique des palourdes provenant des Iles-de-la-Madeleine. Il était donc facile de distinguer, lors d'un examen microscopique, l'état de maturité gonadique de chaque spécimen et de le classer dans l'un ou l'autre des quatre stades du cycle gamétogénétique. Nous savions aussi approximativement à quelle période de l'année nous devions récolter les spécimens afin de s'assurer un nombre suffisant de spécimens de chaque stade.

Nos résultats montrent des changements dans le patron d'innervation sérotoninergique des gonades au cours des différents stades de la gamétogénèse. Ces changements, tout d'abord observés par immunohistochimie, concernent l'apparence des fibres immunoréactives à la sérotonine et l'aire occupée par le champ d'innervation de chaque acinus observé en coupe. Nous avons constaté que les différences de forme et d'espace occupé par le champ d'innervation sont reliées au volume occupé par les gamètes dans l'acinus, chez les deux sexes. En fait, lorsque les cellules sexuelles se multiplient et croissent, elles occupent tout l'intérieur de l'acinus et même plus, à maturité, la pression qu'elles exercent sur l'épithélium germinatif contribue à amincir ce dernier. Le champ d'innervation de fibres immunoréactives occupe alors une mince région autour de l'acinus observé en coupe. Une seule fibre sérotoninergique variqueuse distincte, recouvrant tout le pourtour de l'acinus, est généralement observée. Au fur et à mesure que la ponte se déroule, les gamètes quittent l'acinus, qui se replie alors vers l'intérieur. L'épithélium germinatif apparaît ainsi plus épais et est recouvert, à ce moment, d'un enchevêtrement de fibres variqueuses, orientées dans tous les plans et indistinctes individuellement. Ces résultats indiquent que les gonades de la palourde reçoivent une innervation sérotoninergique qui subit, passivement, les mouvements d'expansion et de déflation de la gonade suivant son état de maturité. Puisque la sérotonine est disponible durant tout le cycle gamétogénétique, cela suggère que le contrôle sérotoninergique de différentes fonctions possibles aux divers stades du cycle gamétogénétique s'effectue à un niveau autre que celui de l'étendue de l'innervation de l'organe.

Indirectement, les résultats de la quantification de la sérotonine dans les gonades de la palourde appuient ces affirmations. En effet, nos résultats montrent une relation étroite entre la concentration de sérotonine dans les gonades et leur masse totale durant

le cycle gamétogénétique. Puisque la masse totale des gonades varie selon la présence de gamètes plus ou moins mûrs durant le cycle gamétogénétique, et que ces mêmes cellules sexuelles sont dépourvues de sérotonine, tel que mentionné précédemment, la faible concentration de sérotonine durant le stade de maturité est attribuable à l'occupation d'un nombre important de gamètes mûrs dans les gonades. À l'inverse, lorsque la ponte est terminée, la masse totale des gonades est très réduite puisque exemptes de gamètes mûrs, et la concentration de sérotonine est alors plus élevée que durant le stade de maturité.

Par conséquent, nous pensons que la quantité de sérotonine dans les gonades demeurerait relativement stable durant le cycle gamétogénétique. Cette hypothèse reste à être vérifiée. Elle coïnciderait avec l'omniprésence de l'innervation sérotoninergique durant les divers stades du cycle et l'absence de régulation au niveau de l'étendue de l'innervation sérotoninergique de la gonade. Pour ce faire, il faudrait au départ connaître la masse totale des gonades de chacun des spécimens. Comme les gonades ne sont pas isolées de la masse viscérale et qu'il est impossible de tout récupérer le tissu pour le peser, un index de la masse totale des gonades par rapport à la masse viscérale ou à la longueur de la coquille faciliterait l'analyse. De plus, comme la masse totale des gonades dépend à la fois du stade de maturité et de l'âge de l'animal, et qu'il est difficile d'obtenir des sujets du même âge, un facteur de correction qui pourrait tenir compte de la longueur de la coquille devra être utilisé afin de pouvoir comparer des palourdes d'âge différent. Pour ce qui est du stade de maturité, il pourrait être identifié soit par un index de la masse viscérale par rapport à la longueur de la coquille ou par un examen microscopique standard. La sérotonine pourrait alors être quantifiée en utilisant la même technique que dans ce travail, la CLHP/ED.

En ce qui a trait à l'absence d'une relation significative entre la concentration de sérotonine et le stade de maturité chez les mâles, celle-ci a été attribuée à un nombre restreint de spécimens mâles au stade de ponte complétée. En fait, l'échantillonnage, qui s'effectue en milieu naturel¹, n'a pu être effectué après septembre vu le mauvais temps. Même si nous avons récolté un bon nombre de spécimens en septembre, ceux-ci étaient pour la plupart au stade de ponte partielle et les sexes également représentés de telle sorte que nous n'avons obtenu que quelques mâles au stade de ponte complétée. De plus, parmi ceux-ci, une variation importante de la concentration de sérotonine entre les individus a été constatée. Ces deux situations suffisent à expliquer l'absence de relation significative entre les quatre stades en ce qui a trait à la concentration de sérotonine. Ajoutée au fait que l'apparence de l'immunoréactivité à la sérotonine est identique entre les gonades mâles et femelles, cette interprétation suggère que l'innervation sérotoninergique de la gonade est similaire et, que la sérotonine pourrait effectuer les mêmes fonctions chez les deux sexes.

Nos résultats indiquent que la sérotonine pourrait jouer plusieurs rôles dans la reproduction de la palourde sur toute l'étendue du cycle gamétogénétique. En se basant sur les études effectuées jusqu'à maintenant chez les bivalves et le présent travail, on peut considérer la sérotonine comme une neurohormone inductrice de la ponte. Il s'agira maintenant de démontrer si la sérotonine produit cet effet en se liant à des récepteurs sérotoninergiques localisés sur les cellules somatiques du tissu gonadique et/ou sur les cellules sexuelles. De plus, la sérotonine pourrait faciliter l'activation de l'ovocyte par le spermatozoïde lors de la ponte, alors que la sérotonine libérée dans le

¹ L'élevage de palourdes en laboratoire n'a pas été envisagé pour cette étude puisque cela nécessitait une période de culture de plusieurs mois et qu'il aurait été nécessaire de vérifier son influence possible sur le cycle gamétogénétique de l'animal ce qui dépassait grandement les objectifs de ce projet.

milieu viendrait en contact avec les récepteurs à la sérotonine mis en évidence à la surface des ovocytes de la palourde (Krantic *et al.*, 1993a,b). Ce travail ouvre la voie à d'autres études qui permettront de déterminer de quelle façon la sérotonine réussit à effectuer indépendamment ses différents rôles dans les gonades à divers moments du cycle gamétogénétique. Il faudra alors comprendre de quelle façon s'effectue le contrôle sérotoninergique de ces diverses fonctions, soit par variation de la libération de la sérotonine à partir des projections nerveuses soit par une régulation de l'expression de ses récepteurs. En somme, ce travail confirme la palourde, parmi les bivalves, comme le système-modèle de choix dans l'étude de la régulation de la fonction reproductrice par la sérotonine. Cela s'explique par la bonne connaissance de son cycle gamétogénétique, le fait qu'elle soit unisexuée et permet l'étude des sexes individuellement, l'effet connu de la sérotonine sur la ponte, la facilitation de la fécondation et la reprise de la méiose, la mise en évidence de récepteurs sérotoninergiques à la surface des ovocytes, et maintenant, la localisation et la quantification de la sérotonine au cours de la gamétogénèse.

4.0 BIBLIOGRAPHIE

Aiello E (1957) The influence of the branchial nerve and of 5-hydroxytryptamine on the ciliary activity of *Mytilus edulis* gill. Biol. Bull. 133: 325

Aiello E (1962) Identification of the cilioexcitatory substance present in the gill of the mussel *Mytilus edulis*. J. Cell. Comp. Physiol. 60: 17-21

Alcazar SN, Solis EP, Alcala AC (1987) Serotonin-induced spawning and larval rearing of the China clam, *Hippopus porcellanus* Rosewater (Bivalvia: Tridacnidae). Aquaculture 66: 359-368

Allen RD (1953) Fertilization and artificial activation in the egg of the surf clam, *Spisula solidissima*. Biol. Bull. 105(2): 213-239

Alvarado-Alvarez R, Gould MC, Stephano JL (1996) Spawning *in vitro* maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Tivela stultorum*. Biol. Bull. 190: 322-328

Anctil M, De Waele J-P, Miron M-J, Pani AK (1990) Monoamines in the nervous system of the tube-worm *Chaetopterus variopedatus* (Polychaetra): biochemical detection and serotonin immunoreactivity. Cell Tissue Res. 259: 81-92

Angers A, Storozhuk MY, Duchaine T, Castellucci VF, Desgroseillers L (1998) Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. J. Neurosci. 18(15): 5586-5593

Antheunisse LJ (1963) Neurosecretory phenomena in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. Arch. Neerl. Zool. 15: 237-314

Arkett SA, Mackie GO, Singla CL (1987) Neuronal control of ciliary locomotion in a gastropod veliger (*Calliostoma*). Biol. Bull. 173: 513-526

Audesirk G, McCaman E, Willows AOD (1979) The role of serotonin in the control of pedal ciliary activity by identified neurons in *Tritonia diomedea*. Comp. Biochem. Physiol. 62C: 87-91

Belda CA, Del Norte AGC (1988) Notes on the induced spawning and larval rearing of the Asian Moon Scallop, *Amusium pleuronectes* (Linné), in the laboratory. Aquaculture 72: 173-179

Braley RD (1985) Serotonin-induced spawning in giant clams (Bivalvia: Tridacnidae). Aquaculture 47: 321-325

Caddy JF, Billard AR (1976) A first estimate from unexploited population of the bar clam, *Spisula solidissima*. Fish Mar. Serv. Res. Dev. Tech. Rep. 648:13p.

Cardot J (1971) Variations saisonnières de la 5-hydroxytryptamine dans les tissus nerveux et cardiaque chez le mollusque *Helix pomatia*. C. R. Séanc. Soc. Biol. 165: 338-341

Cardot J (1979) Les monoamines chez les mollusques-Les catécholamines: Biosynthèses, mise en place et inactivation. J. Physiol. Paris 75: 689-713

Carpenter D, Breese G, Schanberg S, Kopin I (1971) Serotonin and dopamine: distribution and accumulation in *Aplysia* nervous and nonnervous tissues. *Int. J. Neurosci.* 2: 49-56

Catapane EJ (1983) Comparative study of the control of lateral ciliary activity in marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.* 75C: 403-405

Clotteau G, Dubé F (1993) Optimization of fertilization parameters for rearing surf clams (*Spisula solidissima*). *Aquaculture* 114: 339-353

Coe WR (1943) Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *Quart. Rev. Biol.* 18: 154-164

Colas P, Dubé F (1998) Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Semin. Cell. Devel. Biol.* 9: 539-548

Colas P, Guerrier P (1995) The oocyte metaphase arrest. *Prog. Cell Cycle Res.* 1: 299-308

Costello DP, Davidson ME, Eggers A, Fox MH, Henley C (1957) Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. *Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts*, 247 pp.

Cottrell GA (1967) Occurrence of dopamine and noradrenaline in the nervous tissue of some invertebrate species. *Br. J. Pharmacol.* 29: 63-69

Cox LR (1969) General features of Bivalvia. Dans: Treatise on Invertebrate Paleontology. RC Moore (ed), Geol. Soc. Amer. Inc., Part N, (1) Mollusca, (6) Bivalvia. pp. N2-N129

Crawford CM, Nash WJ, Lucas JS (1986) Spawning induction, and larval and juvenile rearing of the giant clam, *Tridacna gigas*. *Aquaculture* 58: 281-295

Croll RP, Too CKL, Pani AK, Nason J (1995) Distribution of serotonin in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Inv. Reprod. Devel.* 28(2): 125-135

Deridovich II, Khotimchenko YS (1985) Biogenic monoamines in the central nervous system of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* and the mussel *Crenomytilus grayanus*. *Mar. Biol. Vladivostok* 3: 53-58

Dietz TH, Wilson JM, Silverman IT (1992) Changes in monoamine transmitter concentration in freshwater mussel tissues. *J. Exp. Zool.* 261: 355-358

Dubé F, Golsteyn R, Dufresne L (1987) Protein kinase C and meiotic maturation of surf clam oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 142: 1072-1076

Fong PP, Wall DM, Ram JI (1993) Characterization of serotonin receptor in the regulation of spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J. Exp. Zool.* 267: 475-482

- Fong PP, Duncan J, Ram JL (1994a)** Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Experientia* 50: 506-509
- Fong PP, Hardege JD, Ram JL (1994b)** Long-lasting, sex-specific inhibition of serotonin-induced spawning by methiothepin in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J. Exp. Zool.* 270: 314-320
- Fong PP, Deguchi R, Kyozyka K (1996)** Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from Central Japan. *Biol. Bull.* 191: 27-32
- Fong PP, Deguchi R, Kyozyka K (1997)** Characterization of serotonin receptor mediating intracellular calcium increase in meiosis-reinitiated oocytes of the bivalve *Ruditapes philippinarum* from Central Japan. *J. Exp. Zool.* 279(1): 89-101
- Fozard JR (1987)** 5-HT: The enigma variation. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 501-506
- Fujii K, Takeda N (1988)** Phylogenetic detection of serotonin immunoreactive cells in the central nervous system of invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 89C: 233-239
- Galtsoff PS (1940)** Physiology of reproduction of *Ostrea virginica*. III. Stimulation of spawning in the male oyster. *Biol. Bull.* 78: 117-135
- Galtsoff PS (1961)** Physiology of reproduction in molluscs. *Amer. Zool.* 1: 273-289

Gerhardt CC, Leysen JE, Planta RJ, Vreugdenhil E, Van Heerikhuizen H (1996) Functional characterization of a 5-HT₂ receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. Eur. J. Pharmacol. 311: 249-258

Gibbons MC, Castagna M (1984) Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. Aquaculture 40: 189-191

Gibbons MC, Castagna M (1985) Responses of the hard clam *Mercenaria mercenaria* (Linné) to induction of spawning by serotonin. J. Shellfish Res. 5(2): 65-67

Giese AC (1959) Comparative physiology: Annual reproductive cycles of marine invertebrates. Ann. Rev. Physiol. 21: 547-576

Gobet I, Durocher Y, Leclerc C, Moreau M, Guerrier P (1994) Reception and transduction of the serotonin signal responsible for meiosis reinitiation in oocytes of the Japanese clam *Ruditapes philippinarum*. Dev. Biol. 164: 540-549

Goldberg R (1980) Biological and technological studies on the aquaculture of yearling surf clams. Part 1: Aquacultural production. Proc. Natl. Shellf. Assoc. 70: 55-60

Goldberg R (1989) Biology and culture of the surf clam. Dans: Clam Mariculture in North America. JJ Manzi et M Castagna (eds), Elsevier, Amsterdam. pp. 263-276

Goldberg R, Walker RL (1990) Cage culture of yearling surf clam, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1817), in coastal Georgia. J. Shellfish Res. 9(1): 187-193

Gosselin RE (1961) The cilioexcitatory activity of serotonin. *J. Cell. Comp. Physiol.* 58: 17-25

Gosselin RE, Moore KE, Milton AS (1962) Physiological control of molluscan gill cilia by 5-hydroxytryptamine. *J. Gen. Physiol.* 46: 277-296

Grassé PP (1970) *Zoologie, Tome1. Invertébrés.* Masson et Cie éditeurs, Paris. p. 363

Guerrier P, Leclerc-David C, Moreau M (1993) Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalve mollusc *Ruditapes philippinarum*. *Dev. Biol.* 159: 474-484

Gustafsson MKS, Erikson K (1990) Localization and identification of catecholamines in the nervous system of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Parasitol. Res.* 77: 498-502

Hirai S, Kishimoto T, Kadam AL, Kanatani H, Koide SS (1988) Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J. Exp. Zool.* 245: 318-321

Hiripi L, Osborne NN (1976) Distribution of amino acids and serotonin in subcellular fractions of nervous tissue from *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol.* 53B: 549-553

Hiripi L, Salanki J (1973) Seasonal and activity-dependent changes of the serotonin level in the C.N.S. and heart of the snail (*Helix pomatia* L.). *Comp. Gen. Pharmacol.* 4: 285-292

Jones DS (1981) Reproductive cycles of the Atlantic surf clam *Spisula solidissima*, and the Ocean Quahog *Arctica islandica* off New Jersey. *J. Shellfish Res.* 1(1): 23-32

Juneja R, Segal SJ, Koide SS (1993) Promotion of fertilizability of *Spisula* oocytes with 5-hydroxytryptamine. *Inv. Reprod. Devel.* 24(2): 103-106

Kadam AL, Koide SS (1989) Characterization of a factor with oocyte maturation activity in *Spisula*. *Biol. Bull.* 176: 8-13

Kadam AL, Segal SJ, Koide SS (1987) Oocyte maturation inducing substance in *Spisula*. *Biol. Bull.* 173: 476

Kadam AL, Kadam PA, Koide SS (1990) Calcium requirement for 5-hydroxytryptamine-induced maturation of *Spisula* oocytes. *Inv. Reprod. Devel.* 18(3): 165-168

Kadam PA, Kadam AL, Segal SJ, Koide SS (1991) Functional serotonin receptor sites on Atlantic surf clam *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1817) oocytes and sperm. *J. Shellfish Res.* 10(1): 215-219

Kemenes G, Elekes K, Hiripi L, Benjamin PR (1989) A comparison of four techniques for mapping the distribution of serotonin and serotonin-containing neurons in fixed and living ganglia of the snail, *Lymnaea*. *J. Neurocytol.* 18: 193-208

Khotimchenko YS, Deridovich II (1991) Monoaminergic and cholinergic mechanism of reproduction control in the marine bivalve mollusc and echinoderms: a review. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 311-317

Klemm N (1985) The distribution of biogenic monoamines in invertebrates. Dans: *Neurobiology, Current Comparative Approaches.* R Gilles et J Basthazart (eds), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. pp. 280-296

Krantic S, Dubé F, Quirion R, Guerrier P (1991) Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes. *Dev. Biol.* 146: 491-498

Krantic S, Guerrier P, Dubé F (1993a) Meiosis reinitiation in surf clam oocytes is mediated via a serotonin 5 membrane receptor and a vitelline envelope-associated high affinity binding site. *J. Biol. Chem.* 268(11): 7983-7989

Krantic S, Dubé F, Guerrier P (1993b) Evidence for a new subtype of serotonin receptor in oocytes of the surf clam *Spisula solidissima*. *Gen. Comp. Endocr.* 90: 125-131

Leake LD, Walker RJ (1980) *Invertebrate Neuropharmacology.* John Wiley, New York, pp. 102-143

Lefort Y (1992) Larval development of the scallop, *Mimachlamys gloriosa* (Reeve, 1853) from South-West lagoon of New Caledonia. C. R. Acad. Sci. III 314: 601-607

Li X-C, Giot J-F, Kuhl D, Hen R, Kandel ER (1995) Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase Can. J. Neurosci. 15(11): 7585-7591

Linn CE, Roelofs WL (1993) Levels of biogenic-amines and peptides in individual corn earworm moths, *Helicoverpa zea*, using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Insect. Biochem. Mol. Biol. 23: 367-373

Loosanoff VL, Davis HC (1963) Rearing of bivalve Mollusks. Dans: Advances in Marine Biology. Vol. I. Acad. Press, New York. pp.1-136

Lubet P (1956) Effets de l'ablation des centres nerveux sur l'émission des gamètes chez *Mytilus edulis* L. et *Chlamys varia* L. (Mollusques Lamellibranches). Ann. Sci. Nat. Zool. 18: 175-183

Lubet P (1965) Incidences de l'ablation bilatérale des ganglions cérébroïdes sur la gamétogénèse et le développement du tissu conjonctif chez la moule *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Moll. Lamell.). C. R. Soc. Biol. 159: 397-399

Mackie GL (1984) Bivalves. Dans: The Mollusca. Vol 7: Reproduction. AS Tompa, NH Verdonk, JAM Van den Biggelaar (eds), Orlando Academic Press Inc. pp. 351-418

Malachowski M (1988) The reproductive cycle of the rock scallop *Hinnites giganteus* (Grey) in Humboldt Bay, California. *J. Shellfish Res.* 7: 341-348

Malanga CJ, Wenger GR, Aiello E (1972) Endogenous dopamine in bivalve gills. *Comp. Biochem. Physiol.* 43A: 825-830

Malouf RE, Bricelj VM (1989) Comparative biology of clams: environmental tolerances, feeding and growth. Dans: *Clam Mariculture in North America*. JJ Manzi et M Castagna (eds), Elsevier, Amsterdam. pp. 23-73

Martinez G, Rivera A (1994) Role of monoamines in the reproductive process of *Argopecten purpuratus*. *Inv. Reprod. Dev.* 25: 167-174

Martinez G, Garrote C, Mettigog L, Pérez H, Uribe E (1996) Monoamines and prostaglandines E2 as inducers of the spawning of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *J. Shellfish Res.* 15(2): 245-249

Matsutani T (1990) Endogenous factors controlling spawning in marine bivalves. Dans: *Advances in Invertebrate reproduction*. Vol. 5. M Hoshi et O Yamashita (eds), Elsevier Science, Amsterdam. pp. 231-237

Matsutani T, Nomura T (1982) Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Marine Biol. Lett.* 3: 353-358

Matsutani T, Nomura T (1984) Localization of monoamines in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Nippon Suisan Gakkaishi 50: 425-430

Matsutani T, Nomura T (1986) Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Cell Tissue Res. 244: 515-517

Matsutani T, Nomura T (1987) *In vivo* effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop *Patinopecten yessoensis*. Gen. Comp. Endocr. 67: 111-118

McCaman MW, Weinreich D, McCaman RE (1973) The determination of picomole levels of 5-hydroxytryptamine and dopamine in *Aplysia*, *Tritonia* and leech nervous tissues. Brain Res. 5: 129-137

Medcof JC, MacPhail JS (1955) Survey of bar clam resources of the maritime provinces. Bull. Fish. Res. Brd. 102: 6p.

Merrill AA, Ropes JW (1969) The general distribution of the surf clam and ocean quahog. Proc. Nat. Shellfish Assoc. 59: 40-45

Nagabhushanam R (1963) Observations on the neurosecretory cells in the Lamellibranch, *Spisula solidissima* (Dillwyn). The Nucleus 6: 99-102

Nagabhushanam R (1964) Neurosecretory changes in the nervous system of the oyster, *Crassostrea virginica*, induced by various experimental conditions. Indian J. Exp. Biol. 2: 1-4

Nelson DL (1988) Biochemistry and pharmacology of the 5-HT, serotonin binding sites. Dans: The serotonin receptors. E Sanders-Bush (ed), Humana Press, Clifton, New Jersey. pp. 23-57

O'connor WA, Heasman MP (1995) Spawning induction and fertilization in the doughboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperrima*. Aquaculture 136(1-2): 117-129

Ono JK, Iiampton JDR, Koch RA (1992) Immunohistochemical localization and radioenzymatic measurements of serotonin (5-hydroxytryptamine) in hearts of *Aplysia* and several bivalve mollusks. Cell Tissue Res. 269: 421-430

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

Osada M, Matsutani T, Nomura T (1987) Implication of catecholamines during spawning in marine bivalve molluscs. Int. J. Inv. Reprod. Dev. 12: 241-252

Osada M, Nakata A, Matsumoto T, Mori K (1998) Pharmacological characterization of serotonin receptor in the oocyte membrane of bivalve molluscs and its formation during oogenesis. J. Exp. Zool. 281: 124-131

Osanai K, Kuraishi R (1988) Response of oocytes to meiosis-inducing agents in pelecypods. *Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi* 18: 45-56

Pani AK, Anctil M (1994) Quantitative survey of biogenic monoamines, their precursors and metabolites in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *Biogenic Amines* 10: 161-180

Pani AK, Croll RP (1995) Distribution of catecholamines, indoleamines, and their precursors and metabolites in the scallop, *Placopecten magellanicus* (Bivalva, Pectinidae). *Cell Molec. Neurobiol.* 15(3): 371-385

Paulet Y-M, Donval A, Bekhadra F (1993) Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Invert. Reprod. Dev.* 23: 2-3

Pearce JB, Caracciolo JV, Halsey MB, Rogers LH (1976) Temporal and spatial distribution of benthic macroinvertebrates in the New York Bight. Dans: Middle Atlantic continental shelf and the New York Bight. MG Gross (ed), Amer. Soc. Limnol. Oceanogr., Spec. Symp. 2: 394-403

Pearse V, Pearse J, Buchsbaum M, Buchsbaum R (1987) Living invertebrates. Balckwell Scientific Publications, California. pp. 352-355

Peroutka SJ (1988) Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1C} binding sites in rat frontal cortex. *J. Neurochem.* 47: 529-540

Ram JL, Croll RP, Nichols SJ, Wall D (1992) The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), a new pest in North America: reproductive mechanisms as possible targets of control strategies. *Inv. Reprod. Dev.* 22: 77-86

Ram JL, Crawford GW, Walker JU, Mojares JJ, Patel N, Fong PP, Kyojuka K (1993) Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *J. Exp. Zool.* 265: 587-598

Ram JL, Fong PP, Kyojuka K (1996a) Serotonergic mechanisms mediating spawning and oocyte maturation in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Inv. Reprod. Devel.* 30(1-3): 29-37

Ram JL, Fong PP, Garton DW (1996b) Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning, and fertilization. *Amer. Zool.* 36: 326-338

Ropes JW (1968) Reproductive cycle of the surf clam, *Spisula solidissima*, in offshore New Jersey. *Biol Bull.* 135: 349-365

Ropes JW (1979) Shell length at sexual maturity of surf clams, *Spisula solidissima*, from an inshore habitat. *Proc. Nation. Shellfish Assoc.* 69: 85-91

Ropes JW (1980) Biological and fisheries data on the Atlantic surf clam, *Spisula solidissima* (Dillwyn). Northeast Fisheries Center. US Nat. Mar. Fish. Serv. Tech. Rep. Ser. No, 24: 88p.

Saavedra JM, Brownstein MJ, Carpenter DO, Axelrod J (1974) Octopamine: presence in single neurons of *Aplysia* suggests neurotransmitter function. *Science* 185: 364-365

Salanki J, Hiripi L, Nemcsok J (1974) Seasonal variations of activity and serotonin levels in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* L. *Zool. Jahrb Abt. Allg. Zool. Physiol Tiere* 78: 369-377

Sandeman DC, Sandeman RE, Aitkin AR (1988) Atlas of serotonin-containing neurons in the optic lobes and brain of the crayfish, *Cherax destructor*. *J. Comp. Neurol.* 269: 465-478

Schechter V (1941) Experimental studies upon the egg cells of the clam, *Macra solidissima*, with special reference to longevity. *J. Exp. Zool.* 86: 461-479

Sephton TW (1987) The reproductive strategy of the Atlantic surf clam, *Spisula solidissima*, in Prince Edward Island, Canada. *J. Shellfish Res.* 6(2): 97-102

Sephton TW, Bryan CF (1990) Age and growth determinations for the Atlantic surf clam, *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1817) in Prince Edward Island, Canada. *J. Shellfish Res.* 9(1): 177-186

Serchuk FM, Murawski SA, Henderson EM, Brown RBE (1979) The population dynamics basis for management of offshore surf clam populations in the Middle Atlantic.

Dans: Proc.of Northeast Clam Industries: Management for the future. Exten. Sea Grant Program, U. of Massachusetts and Massachusetts Institute of Technology. Sp 112. pp 83-100

Sloley BD, Juorio AV, Durden DA (1990) High-performance liquid chromatographic analysis of monoamines and some of their alpha-glutamyl conjugates produced by the brain and other tissues of *Helix aspersa* (Gastropoda). *Cell. Mol. Neurobiol.* 10: 175-191

Smith JR (1982) A survey of endogenous dopamine and serotonin in ciliated and nervous tissue of five species of marine bivalves, with evidence for specific, high-affinity dopamine receptors in ciliated tissue of *Mytilus californianus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 71: 57-61

Smith JR, Sleet RB (1982) The effects of laboratory environment, holding time and stimulated intertidal condition on dopamine and serotonin levels in ciliated and nervous tissues of the marine bivalve *Mytilus californianus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 73C: 115-119

Sprung M (1987) Ecological requirements of developing *Dreissena polymorpha* eggs. *Arch. Hydrobiol. Supp.* 79: 69-86

Sprung M (1989) Field and laboratory observation of *Dreissena polymorpha* larvae: Abundance, growth, mortality and food demands. *Arch Hydrobiol.* 115: 537-561

Stefano GB (1990) Neurobiology of *Mytilus edulis*. Manchester University Press, Manchester and New York.

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

Stefano GB, Aiello E (1990) Thermal acclimation during monoamine axonal transport in *Mytilus edulis*: pharmacological characteristics. Dans: Neurobiology of *Mytilus edulis*, GB Stefano (ed), Manchester University Press, Manchester et New York, pp. 175-188

Stefano GB, Catapane EJ (1977) Seasonal monoamine changes in the central nervous system of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Experientia* 33: 1341-1342

Stefano GB, Catapane EJ (1980) Norepinephrine: its presence in the central nervous system of the bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Exp. Zool.* 214: 209-213

Stefano GB, Hiripi L, Catapane EJ (1978) The effects of short- and long-term temperature stress on serotonin, dopamine and norepinephrine concentration in molluscan ganglia. *J. Therm. Biol.* 3: 79-83

Stefano JL, Gould M (1988) Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 73: 295-307

Stickney AP (1963) Histology of the reproductive system of the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *Biol. Bull.* 125: 344-351

Stickney AP (1964) Salinity, temperature, and food requirements of the soft-shell clam larvae in laboratory culture. *Ecol.* 45: 283-291

Sugamori KS, Sunahara RK, Guan H, Bulloch AG, Tensen CP, Seeman P, Niznik HB, Van Tol HHM (1993) Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11-15

Sweeney DC (1963) Dopamine: its occurrence in molluscan ganglia. Science 139: 1051

Sweeney DC (1968) The anatomical distribution of monoamines in a freshwater bivalve mollusc, *Sphaerium sulcatum* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 25: 601-613

Takeda N (1992) Biogenic monoamine levels in the central nervous system of the sea hare, *Aplysia kurodai*. Comp. Biochem. Physiol. 103C: 511-519

Tanaka Y, Murakoshi M (1985) Spawning induction of the hermaphroditic scallop, *Pecten albicus*, by injection with serotonin. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 7: 9-12

Twarog BM (1967) Review of regulation of catch in molluscan muscles. J. Gen. Physiol. 50: 157-169

Twarog BM, Hidaka T (1971) Effect of 5-HT on electrical properties of molluscan muscle fibers. J. Gen. Physiol. 52: 252-262

Twarog BM, Muneoka Y, Ledgere M (1977) Serotonin and dopamine as neurotransmitters in *Mytilus*: block of serotonin receptors by an organic mercurial. J. Pharmacol. Exp. Ther. 201: 350-356

Umbriaco D, Anctil M, Descarries L (1990) Serotonin-immunoreactive neurons in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Neurol.* 291: 167-178

Vélez A, Alifa A, Azuaje O (1990) Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic tropical scallop, *Pecten ziczac*. *Aquaculture* 84: 307-313

Vitellaro-Zuccarello L, De Biasi S, Bernardi P, Oggioni A (1991) Distribution of serotonin-, gamma-aminobutyric acid- and substance P-like immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of *Mytilus galloprovincialis*. *Tissue Cell* 23(2): 261-270

Walker RJ (1984) 5-Hydroxytryptamine in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 79C: 231-235

Walker RJ (1986) Transmitters and modulators. Dans: *The Mollusca*. Vol. 9. Academic Press, New York. pp. 279-485

Walz N (1978) The energy balance of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas) in laboratory experiments and in Lake Constance. II. Reproduction. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 55: 106-119

Welsh JH (1960) 5-Hydroxytryptamine in coelenterates. *Nature* 186: 811-812

Welsh JH, Moorhead M (1960) The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates especially in their nervous systems. *J. Neurochem.* 6: 146-149

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier François Dubé pour m'avoir permis de réaliser ce projet au sein de son laboratoire, pour son soutien, son encouragement et particulièrement, pour sa grande disponibilité. Un sincère merci à Michel Anctil pour ses précieux conseils et son support.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui m'ont encouragée et même supportée à quelques moments durant cette maîtrise, en particulier Claude Lamarre, pour son amour, à mes parents, à Louise Pelletier, pour sa précieuse aide technique et morale, sa sincérité, son amitié et pour m'avoir gâtée pendant ces années, à mes amies, Julie, Ariane et Jacinthe, à Louise Cloutier pour sa bonne humeur, à François-Joseph Lapointe et Pierre-Alexandre Landry pour leurs conseils statistiques, et tous les autres que je n'ai pas nommés mais qui ont participé d'une quelconque façon à la réalisation de ce projet.