

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Variations saisonnières de la composition en acides gras et de
l'estradiol chez *Renilla koellikeri*

Par

Vincent Pernet

Département de physiologie

Faculté de médecine

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

Août 2001

© Vincent Pernet, 2001



W

4

U58

2002

v.005

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Variations saisonnières de la composition en acides gras et de l'estradiol chez *Renilla koellikeri*

présenté par Vincent Pernet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Vincent Castellucci

(Président-rapporteur)

Dr. Michel Anctil

(Directeur de recherche)

Dr. Beatriz Tuchweber Farbstein

(Membre du jury)

Mémoire accepté le:-----

A Sandrine, Papa, Maman, Florian et Laurence

Sommaire

L'analyse saisonnière des lipides a été réalisée chez la pensée de mer afin de mieux définir son cycle reproducteur, et l'estradiol-17 β a été dosé simultanément pour déterminer son rôle éventuel dans la reproduction.

Les gonades sont les tissus de la colonie qui étaient les plus riches en lipides, et dans les colonies les fluctuations de lipides totaux (LT) et d'acides gras totaux (AGT) suivaient un patron saisonnier. Dans un premier temps, les LT et les AGT augmentent faiblement entre mars et avril, puis de façon abrupte entre avril et mai, où LT et AGT culminent. Les quantités de LT et d'AGT diminuent d'abord lentement pendant les mois de ponte, de juin à août, puis plus rapidement après la saison de reproduction, en septembre et octobre, où ils retournent à leurs niveaux de base. Les variations de lipides indiquent que la reprise de la croissance sexuelle a lieu vers le mois de mars. Une accélération de la maturation sexuelle se produit entre avril et mai, juste avant la ponte qui débute en juin. Malgré la baisse de LT et d'AGT en juin et août, le haut niveau de maturation semblent se maintenir. La chute plus marquée de LT et AGT en septembre et en octobre marque l'arrêt de la maturation des gonades et la fin de la ponte.

L'analyse des acides gras (AG) par chromatographie en phase gazeuse a révélé, d'une part des variations saisonnières avec des spécificités liées au sexe, et d'autre part des différences de composition d'AG entre tissus somatiques et reproducteurs. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) dominaient la composition des AGT de la colonie, incluant principalement l'acide arachidonique (AA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA). En dépit de la prépondérance de l'AA, le pourcentage d'EPA par rapport aux AGT était le plus variable au cours de l'année, et était corrélé avec le développement sexuel. Les variations du rapport des acides gras ω 6 sur les acides gras ω 3

dans les colonies sont inversement corrélées avec l'accumulation de LT et d'AGT pendant l'année. Par conséquent, le rapport ω_6/ω_3 semble être un bon indicateur de l'état de maturité sexuelle chez la pensée de mer. L'EPA était incorporé en grande quantité dans les spermatophores le mois précédant l'atteinte de la maturité, alors qu'à la même période, les œufs accumulaient surtout de l'AA et secondairement de l'EPA. Les différences de composition en acides gras observées entre les gamétophores étaient reflétées dans la composition en acides gras des colonies entières.

L'estradiol-17 β (E₂) a été détecté à des niveaux variables selon la saison. L'implication d'E₂ dans la reproduction de la pensée de mer est fortement suggérée par l'augmentation de sa concentration à deux moments critiques du cycle sexuel: au début de la maturation sexuelle en mars, et au moment de la ponte. Cependant, l'élévation du niveau d'E₂ en juin était de loin supérieure dans les colonies femelles à celle rencontrée dans les colonies mâles. Il est possible qu'E₂ stimule la reprise de la gamétogénèse en mars et accélère plus spécifiquement la maturation finale des œufs autour de la période de ponte. La concentration d'E₂ plus élevée dans les tissus somatiques que dans les œufs au mois de mars, suggère que la synthèse d'E₂ pourrait avoir lieu à l'extérieur des tissus reproducteurs. Sur ce point, une conclusion définitive ne pourra être tirée qu'en connaissant l'évolution du niveau d'E₂ dans les différents tissus sur toute la période reproductrice.

Cette étude est la première à avoir utilisé les lipides comme baromètre de la maturation sexuelle chez un anthozoaire (anémones et coraux). La présence d'estradiol-17 β chez la pensée de mer, et ses différences de sécrétions en fonction du sexe, apporte de nouvelles données sur la neuroendocrinologie des systèmes nerveux les plus primitifs. Les fluctuations d'acides gras sont utilisées comme étalon chimique pour apprécier l'implication de l'E₂ dans la maturation sexuelle.

Table des matières

Sommaire	ii
Table des matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des sigles et des abréviations	ix
I- Introduction	1
1- Reproduction chez les cnidaires	1
1.1- Modes de reproduction dans le cycles vital des cnidaires	1
1.2- La lignée cellulaire des cellules reproductrices : exemple de l'hydre	2
1.3- La spermatogénèse	3
1.4- L'ovogénèse	3
2 - Contrôle hormonal de la gamétogénèse	4
2.1- Conservation des hormones reproductrices chez les vertébrés	4
2.2- La fonction reproductrice du GnRH dans le règne animal	5
2.3- Les hormones LH et FSH	5
2.4- Les stéroïdes	6
2.4.1- Métabolisme général des stéroïdes sexuels chez les mammifères	6
2.4.2- La diversité des stéroïdes chez les invertébrés	7
2.4.3- Rôle des stéroïdes chez les invertébrés	8
2.4.3.1- Rôle de défense des stéroïdes	8
2.4.3.2- Les stéroïdes sexuels	8

3- Importance des acides gras dans le développement sexuel des invertébrés	10
3.1- Définition des acides gras essentiels	10
3.2- Les acides gras polyinsaturés chez les cnidaires	10
3.3- Facteurs modifiant le profil des acides gras des invertébrés marins	11
3.3.1- La nourriture	11
3.3.2- Les algues symbiotiques chez les anthozoaires	12
3.4- Les variations de la composition d'acides gras liées à la reproduction	12
3.4.1- Variations cycliques des acides gras	12
3.4.2- Les acides gras polyinsaturés dans les gonades	13
4- Présentation du modèle expérimental, <i>Renilla koellikeri</i>	14
4.1-Description générale de la pensée de mer <i>Renilla koellikeri</i>	14
4.2- Reproduction de la pensée de mer	14
4.2.1- La gamétogénèse chez la pensée de mer	14
4.2.2- Le comportement de ponte	15
4.3- Hormones de la pensée de mer potentiellement actives sur sa reproduction	16
4.3.1- Le GnRH	16
4.3.2- L'antho-RFamide	17
4.3.3- La mélatonine et la sérotonine	18
5-Objectifs de l'étude	19
5.1- Recherche de 17 β -estradiol	19
5.2- Étude des lipides et des acides gras	19

II- Articles	21
1- Article 1 : “Variations du contenu lipidique et des acides gras au cours du cycle reproducteur de l’anthozoaire <i>Renilla koellikeri</i> ”	21
“Variations of lipid and fatty acid contents during the reproductive cycle of the anthozoan <i>Renilla koellikeri</i> ”	22
-Abstract	23
-Introduction	24
-Material and methods	26
-Results	30
-Discussion	33
-References	40
2- Article 2 : “Variations annuelles du 17 β -estradiol chez l’anthozoaire <i>Renilla koellikeri</i> ”	57
“Annual variations of estradiol-17 β in the anthozoan <i>Renilla koellikeri</i> ”	58
-Abstract	59
-Introduction	60
-Material and methods	62
-Results	65
-Discussion	66
-References	69
III- Discussion et conclusions générales du mémoire	80
-Références (introduction et discussion)	89
- Annexe	103
-Remerciements	xi

Liste des figures

- Article 1

- Fig. 1 : Représentation Schématique de la pensée de mer 50
- Fig. 2 : Coloration des lipides dans les tissus de pensée de mer sur coupe 51
- Fig. 3 : Variations des acides gras, des lipides totaux et du rapport $\omega 6/ \omega 3$ des colonies sur l'année 52
- Fig. 4 : Variations des classes d'acides gras dans les gonades pendant la vitellogénèse 53
- Fig. 5 : Variations des principaux acides gras dans les gonades 54

- Article 2

- Fig. 1 : Courbe de dosage EIA montrant la réactivité de E_2 extrait de la pensée de mer à différentes concentrations 76
- Fig. 2 : Relation entre le poids des colonies entières et le niveaux d' E_2 77
- Fig. 3 : Variations saisonnières des niveaux d' E_2 chez la pensée de mer 78

- Annexe

- Fig. 1 : Effet du LHRH sur le niveau d' E_2 dans des tissus de pensée de mer 104

Liste des tableaux

- Article 1

Tableau 1 : Proportions des acides gras dans les colonies de pensée de mer 46

Tableau 2 : Variations annuelles des principaux acides gras dans la pensée de mer 48

Tableau 3 : Comparaison des acides gras entre les tissus somatiques et reproducteurs 49

- Article 2

Tableau 1 : Comparaison des niveaux d'E₂ entre les colonies mâles et femelles 74

Tableau 2 : Comparaison des niveaux d'E₂ entre les tissus somatiques et les œufs 75

Liste des sigles et des abréviations

AA : Acide Arachidonique
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AGM : Acide Gras Monoinsaturé
AGP : Acide Gras Polyinsaturé
AGT : Acide Gras Totaux
AL : Acide Linoléique, 18:2 ω 6
ALN : Acide Linoléique, 18:3 ω 3
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARMm : Acide RiboNucléique messenger
ASW : "Artificial Sea Water"
CG : "Chorionic Gonadotropin"
DHA : "DocosaHexaenoic Acid", 22:6 ω 3
DHT : DiHydroTestostérone
DPA : "DocosaPentaenoic Acid ", 22:5 ω 3
E₁ : Estrone
E₂ : 17 β -Estradiol
EIA : Enzyme ImmunoAssay
EPA : "EicosaPentaenoic Acid", 20:5 ω 3
FAME : "Fatty Acid Methyl Ester"
FSH : "Follicle Stimulating Hormone"
GC : Chromatographie en phase gazeuse
GnRH : "Gonadotropin Releasing Hormone"
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclic
LH : "Luteinizing Hormone"
LHRH : "Luteinizing Hormone Releasing Hormone"
MUFA : "MonoUnsaturated Fatty Acid"
PBS : "Phosphate Buffer Saline"
PGE : Prostaglandine E

PUFA : "PolyUnsaturated Fatty Acid"

SEM : "Standard Error Mean"

SFA : "Saturated Fatty Acid"

SHBG : "Sex Hormone Binding Globulin"

TFA : "Total Fatty Acids"

TL : "Total Lipids"

TSH : "Thyroid Stimulating Hormone"

YMF : "Yeast Mating Factor"

I- Introduction

1-Reproduction chez les cnidaires

1.1- Modes de reproduction dans le cycle vital des cnidaires (Ruppert et Barnes, 1994)

Les cnidaires sont divisés en quatre grandes classes (hydrozoaires, cubozoaires, scyphozoaires et anthozoaires) chez lesquelles deux plans corporels s'alternent au cours de leur cycle vital. Le polype, ou forme polypoïde est la forme benthique, c'est-à-dire fixée au fond de l'eau alors que la méduse, ou forme médusoïde, est pélagique, libre de se déplacer. La planula, issue de la reproduction sexuée, est le stade larvaire transitoire entre le polype et la méduse. Entre les classes et entre les espèces d'une même classe, il peut y avoir de grandes différences dans l'importance de la représentation des formes méduses et polypes. De plus, il existe une grande variabilité dans le mode de reproduction.

Chez les hydrozoaires, certaines espèces présentent la forme méduse ou polype ou encore les deux; donc l'une ou l'autre peut être sexuée. De plus, certains hydrozoaires sont hermaphrodites alors que chez d'autres, les sexes sont séparés.

La forme méduse, très prédominante dans le cycle vital des scyphozoaires et des cubozoaires (ce qui explique leurs noms courants de « méduses »), est capable de produire sexuellement des planulas qui se transforment en polypes. A leur tour, les polypes libèrent un grand nombre de jeunes méduses par un type de reproduction asexuée appelé strobilation.

A l'inverse des scyphozoaires et des cubozoaires, la forme méduse est complètement absente du cycle de vie des anthozoaires; donc, les polypes assument la reproduction sexuée et asexuée. Par exemple, les anthozoaires solitaires comme l'anémone de mer peuvent générer des gamètes pour la

reproduction sexuée et produire de nouveaux individus de façon asexuée (tels que par la lacération du pied, la fission longitudinale et transverse). Chez les anthozoaires coloniaux, tels que les coraux, le bourgeonnement est le mode de reproduction asexuée qui permet d'agrandir la colonie ; leur dimension peut alors atteindre plusieurs centaines de mètres. La Grande Barrière de corail sur la côte nord-est de l'Australie s'étend sur environ 1.600 kms.

1.2. Le lignage cellulaire des cellules reproductrices : exemple de l'hydre (Bode, 1996)

La reproduction sexuée requiert la formation de cellules reproductrices par une voie de différenciation des cellules souches qui diffère de celle des cellules somatiques. Le lignage cellulaire a été décrit en détail chez l'hydre. Les cellules reproductrices sont issues de cellules souches qui ont initialement le potentiel de devenir tous les types de cellules interstitielles (neurones, cellules glandulaires, nématocytes, gamètes). Avant de s'engager dans un déterminisme cellulaire irréversible, les cellules souches multipotentielles se divisent plusieurs fois. Après différenciation, les cellules interstitielles sont insérées entre les cellules des épithélia ectodermique et endodermique où elles exercent une fonction relativement prédominante dans une partie de l'animal sans que la notion « d'organe » ne s'y applique.

La formation des gamètes n'est donc pas dépendante d'un organe permanent consacré à cette fonction; néanmoins les gamètes se développent à des endroits spécifiques dans l'animal. Dans un premier temps, les cellules souches deviennent des gonies capables de se multiplier par mitoses, puis, les processus classiques de l'ovogénèse et de la spermatogénèse s'enchaînent comme ceux d'autres embranchements.

1.3. La spermatogénèse

Les stades de la spermatogénèse ont été décrits chez les hydrozoaires, les scyphozoaires et les anthozoaires (Conn, 1991). Les cellules germinales se développent dans l'ectoderme chez les hydrozoaires, et dans l'endoderme chez les scyphozoaires et les anthozoaires (Miller, 1983; Conn, 1991). Les spermatogonies, spermatocytes I et II, spermatides et spermatozoïdes forment des couches concentriques dans la mésoglée qui rappellent les tubes séminifères des animaux plus évolués (Miller, 1983). En se multipliant et en se divisant, les spermatogonies créent une protubérance sphéroïde (dans l'endoderme ou l'ectoderme) qui est appelée spermatophore. Donc, la grande taille des gonades reflète un état de maturité sexuelle avancé. À l'époque de la reproduction, les gonades cèdent et libèrent les spermatozoïdes qui nagent jusqu'aux ovules à féconder.

La morphologie et la cytologie des spermatozoïdes sont aussi très conservées. Les mitochondries et le flagelle propulseur sont organisés de la même façon que chez les autres animaux. La seule différence notable est l'absence d'acrosome du côté apical de la tête du spermatozoïde, dont la fonction pourrait être assurée par des vésicules observés à cet endroit (Miller, 1983).

1.4. L'ovogénèse

Les ovogonies se différencient suivant le même schéma général que chez les autres animaux, bien que la méiose des cnidaires soit terminée au moment de la fertilisation. L'ovogénèse est le siège de plus d'interactions cellulaires par rapport à la spermatogénèse et semble préfigurer l'organisation des follicules des animaux supérieurs par la présence de cellules nourricières chez l'hydre et l'anémone. Chez l'hydre, les cellules nourricières (« nurse cells ») sont des cellules germinales qui dégénèrent pour soutenir la croissance de l'ovocyte unique du gonophore (Conn, 1991). Chez les

scyphozoaires et des anthozoaires tels que *Aurelia aurita* et *Epiactis prolifera* respectivement, des trophocytes dans les cordons mésentériques du gastroderme remplissent un rôle vitellogénique qui sert à la mise en réserve dans l'ovocyte (Dunn, 1975; Beams et Kessel, 1983). Outre la coopération des cellules nourricières proches, on ne connaît pas de contribution hormonale au développement de l'ovocyte comme il en existe chez les mammifères, c'est-à-dire des étapes de sécrétion hormonale qui conduisent à la maturation de l'œuf. Pourtant, plusieurs études tendent à démontrer que les cnidaires synthétisent différentes hormones peptidergiques et stéroïdiennes, dont certaines sont ou pourraient être impliquées dans le contrôle de la reproduction.

2- Contrôle hormonal de la gamétogénèse

2.1- Conservation des hormones reproductrices chez les vertébrés

Chez les vertébrés, l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique contrôle la reproduction par interactions hormonales entre le système nerveux central et l'appareil reproducteur. Le GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) de l'hypothalamus stimule la libération de LH (Luteinizing Hormone) et de FSH (Follicle Stimulating Hormone) de l'hypophyse antérieure qui agissent via la circulation systémique sur les gonades où ils déclenchent la synthèse des stéroïdes sexuels et la gamétogénèse. Les stéroïdes agissent par rétro-contrôle sur l'hypophyse et l'hypothalamus pour ajuster les sécrétions de GnRH, LH et FSH (Sherwood, 2000). Néanmoins, l'existence des hormones hypothalamiques, hypophysaires et stéroïdiennes des animaux dans lesquels le système nerveux et l'appareil reproducteur ne sont pas séparés, suggère un contrôle neuro-hormonal de la reproduction très conservé.

2.2- La fonction reproductrice du GnRH dans le règne animal

Le GnRH, un décapeptide sécrété principalement par l'hypothalamus chez les vertébrés, a gardé une grande homologie de séquence et sa fonction reproductrice chez les chordés (Sherwood *et al.*, 1993; King et Millar, 1995). La découverte de certaines formes de GnRH chez les poissons (Pati et Habibi, 1998; Habibi et Pati, 1994; Nabissi *et al.*, 1997), mollusques (Pazos et Mathieu, 1998; Zhang *et al.*, 2000) tunicés (Powel *et al.*, 1996; Craig *et al.*, 1997), et récemment chez un cnidaire (Anctil, 2000), appuie l'existence d'une phylogénie du GnRH qui remonterait même jusqu'aux unicellulaires (levure) (Loumaye *et al.*, 1982).

Le Yeast Mating Factor (YMF, équivalent au GnRH des vertébrés) de *Saccharomyces cerevisiae* de type sexuel (α) arrête les cellules haploïdes de types sexuels opposés en phase G1 du cycle cellulaire, et stimule la formation de gamète pour qu'il y ait production d'un zygote diploïde. Par ailleurs, l'application du YMF sur des cellules hypophysaires de rat en culture cause la libération du LH en se liant aux récepteurs mammaliens. Réciproquement, le GnRH mammalien mime les effets du YMF sur des levures. La partie N-terminale du YMF présente une grande ressemblance celle du GnRH mammalien.

Chez les moules *C. gigas* et *M. edulis*, différentes sortes de GnRH de vertébrés augmentent la synthèse d'ADN sur les cellules gonadiques en suspension (Pazos et Mathieu, 1999). Mais l'action du GnRH sur les tissus reproducteurs pourrait être indirecte et passer par la libération d'hormones intermédiaires comme LH et FSH.

2.3- Les hormones LH et FSH

L'apparition de glycoprotéines de la famille de FSH, LH, CG (Chorionic Gonodotrope) et TSH (Thyroid Stimulating Hormone) avait sûrement déjà eu

lieu chez les invertébrés. Certains récepteurs clonés chez l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* (Nothacker et Grimmelikhuijzen, 1993), les mollusques (Tensen *et al.*, 1994) et la drosophile (Hauser *et al.*, 1997) sont apparentés aux récepteurs des glycoprotéines FSH, LH, CG et TSH. De plus, tel que mentionné précédemment, le YMF provoque la libération le LH à partir de cellules gonadotropes de mammifères (Loumaye *et al.*, 1982).

Toutefois, la séquence de libération : GnRH → LH/FSH → œstrogènes/androgènes, n'est peut être pas aussi ancienne que les hormones en jeu. La production de GnRH dans les cellules d'ovaire de rat a été démontrée par la présence de l'ARNm codant pour le GnRH (Oikawa *et al.*, 1990). Le GnRH produit localement peut se fixer à des récepteurs du GnRH qui ont été découverts sur les gonades (Clayton *et al.*, 1979; Clayton *et al.*, 1980). La possibilité que des stéroïdes sexuels soient libérés sous l'influence d'hormones GnRH ou LH/FSH demeure très intéressante chez les invertébrés pour comprendre comment les systèmes neuro-endocriniens étaient organisés à leur apparition.

2.4- Les stéroïdes

2.4.1- Métabolisme général des stéroïdes sexuels chez les mammifères (Braunstein, 1997; Goldfien, 1997)

Les stéroïdes sexuels dérivent tous du cholestérol. Chez le mâle, le métabolisme stéroïdien dans les cellules de Leydig du testicule conduit à la synthèse des androgènes dont principalement la testostérone, et en moindre quantité, à la dihydrotestostérone (DHT) et à l'estradiol (E₂). Dans les organes périphériques, l'enzyme 5 α -réductase convertit la testostérone en DHT qui est l'androgène le plus actif. La testostérone avec la FSH stimulent la production de spermatozoïdes dans les cellules de Sertoli.

Dans l'ovaire, l'E₂ est l'œstrogène majeur qui contrôle le développement du follicule ovarien (œuf). Le pic pré-ovulatoire d'E₂ est

responsable de la croissance rapide du follicule et déclenche le pic pré-ovulatoire de LH (par rétro-contrôle positif sur les cellules de l'hypophyse antérieure) nécessaire à la ponte ovarienne. La FSH stimule la conversion de testostérone en E_2 par l'action d'enzymes aromatasés dans les cellules de la granulosa qui entourent directement l'ovocyte (il faut noter que le lieu exact de production d' E_2 dans le follicule reste ambigu). La progestérone est un autre stéroïde produit par le corps lutéinique (follicule sans ovocyte résultant de la ponte), qui prépare l'endomètre de l'utérus à accueillir l'œuf fécondé, et agit sur les organes périphériques pour développer et entretenir les caractères sexuels secondaires (par exemple les seins chez la femme).

Les stéroïdes stimulent la croissance cellulaire et la synthèse protéique par l'activation de récepteurs nucléaires. Le caractère liposoluble des stéroïdes les rend diffusibles à travers les membranes. Cependant, la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) et non-spécifiquement l'albumine sont des transporteurs protéiques nécessaires pour acheminer les stéroïdes des testicules et des ovaires jusqu'à leurs tissus cibles. Les stéroïdes arrivent dans le noyau où ils se lient à leur récepteur, et forment des dimères ligand-récepteur activant la transcription de gènes et la production d'ARNm.

2.4.2- La diversité des stéroïdes chez les invertébrés

En 1979, Sandor et Mehdi ont passé en revue les stéroïdes, leur métabolisme et leur site de synthèse parmi plusieurs grandes classes d'invertébrés. Les ecdystéroïdes sont de bons exemples qui démontrent la conservation des stéroïdes dans le règne animal et illustrent leur importance dans le développement. L'ecdysone chez les insectes et son homologue chez les crustacés (crustecdysone) sont des stéroïdes (ecdystéroïdes) qui contrôlent la mue. L'ecdysone est sécrété par la glande prothoracique des insectes à partir du cholestérol d'origine alimentaire.

Les stéroïdes sexuels existent chez les platelminthes, les échinodermes, les mollusques, et les insectes. De plus, chez les coraux mous, des stéroïdes C₂₁ ont été découverts. Mais depuis Sandor et Mehdi (1979) d'autres études sont venues confirmer la présence des stéroïdes sexuels chez les invertébrés et leur action dans la reproduction se clarifie progressivement.

2.4.3- Rôle des stéroïdes

2.4.3.1- Rôle de défense des stéroïdes chez les invertébrés

Kanazawa *et al.* (1977) ont fait état d'une grande diversité des stéroïdes chez 22 espèces d'anthozoaires et de scyphozoaires. Garrido *et al.* (2000) ont établi la structure de quatre stéroïdes chez la gorgone *Leptogorgia sarmentosa* et ont démontré leurs effets cytotoxiques sur des lignées de cellules cancéreuses *in vitro*. Mais, le manque de spécificité de deux d'entre eux n'a pas permis une conclusion claire. Chez les coraux mous de la classe des anthozoaires, plusieurs stéroïdes ont été mis en évidence dont certains ont eu des effets cytotoxiques (Kobayashi *et al.*, 1984; Igushi *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1996; Iwashima *et al.*, 2000). Certains invertébrés utilisent les stéroïdes pour se défendre contre les prédateurs, comme dans le cas de la coccinelle évoqué par Sandor et Mehdi (1979).

2.4.3.2- Les stéroïdes sexuels dans la reproduction des invertébrés marins

Des stéroïdes sexuels ont été trouvés chez des invertébrés et dosés saisonnièrement pour mieux appréhender leur fonction au cours du cycle reproducteur. Xu et Barker (1990) ont ainsi observé que les niveaux accrus d'estrone (E₁, un œstrogène proche de l'estradiol), de progestérone et d'estradiol précédaient la reprise annuelle du développement des ovocytes chez l'étoile de mer *Sclerasteria mollis*. En mesurant les variations d'estrone

et de progestérone chez l'étoile de mer mâle d'*Asterias rubens*, Voogt et Dieleman (1984) ont montré l'implication probable de ces stéroïdes dans la gamétogénèse, et permis de constater des différences avec les sécrétions rapportées par Schoenmakers et Dieleman (1981) chez la femelle. Plus directement, Schoenmakers *et al.* (1981) ont démontré que le traitement de l'étoile de mer *Asterias rubens* avec de l'estradiol augmentait le diamètre des ovaires en accélérant l'incorporation de protéines.

Différentes études menées chez l'étoile de mer *Asterias rubens* tendent à prouver qu'un métabolisme endogène complexe des stéroïdes existe chez des invertébrés (Schoenmakers, 1979; Schoenmakers et Voogt, 1980; Schoenmakers *et al.*, 1981; Schoenmakers et Voogt, 1981). En outre plusieurs auteurs (Ciereszko *et al.*, 1968; Kanazawa *et al.*, 1977) ont mis en doute la capacité des cnidaires à synthétiser les stérols (qui n'étaient pas sexuels dans les études concernées) et ont suggérer que ces derniers seraient apportés de manière exogène par la nourriture et les algues symbiotiques.

Dernièrement, Tarrant *et al.* (1999) ont montré que l'estradiol et l'estrone variaient de façon saisonnière chez le corail dur *Montipora verrucosa* (un anthozoaire). L'E₂ et l'E₁ sont des stimulateurs possibles de la gamétogénèse et de la ponte chez ce corail. L'alternance des fortes concentrations des deux œstrogènes suggère que la réaction d'interconversion entre E₁ et E₂ existe chez les cnidaires. Slattery *et al.* (1997) ont découvert de la progestérone, de l'androsténédione, de la testostérone, et de l'E₂ chez les coraux mou *Alcyonium paessleri* et *Clavularia krankliniana*. Des voies de transformation des stéroïdes sexuels endogènes à ce corail ont été démontrées par l'utilisation de progestérone tritiée et d'androsténédione tritiée. Cela a permis de conclure que des activités enzymatiques telles que celle de la 5 α -réductase, la 3 β -hydroystéroïde déshydrogénase, la 17 β -hydroystéroïde déshydrogénase et l'acyltransférase étaient assurées dans des cellules de cet animal (Slattery *et al.*, 1997). Slattery *et al.* (1999) ont observé chez le corail mou *Sinularia polydactyla* des variations annuelles de

testostérone, de progestérone et d'E₂ susceptibles d'influencer la reproduction, et ont mis en évidence des différences de sécrétion liées au sexe pour les deux premiers stéroïdes.

Craig *et al.* (1997) ont provoqué une élévation d'E₂ chez le tunicidé *Chelyosoma productum* suite à des stimulations avec du GnRH extrait de l'animal et du GnRH mammalien. C'est la preuve que le GnRH peut contrôler la sécrétion de stéroïdes sexuels chez les invertébrés.

3- Importance des acides gras dans le développement sexuel des invertébrés

3.1- Définition des acides gras essentiels

Les acides gras polyinsaturés (AGP) sont considérés comme essentiels pour les animaux car ces derniers ne peuvent les synthétiser de façon endogène (Holland, 1978; Tinoco, 1982). On distingue dans les AGP la famille ω 3 et la famille ω 6, où l'acide linoléique (ALN) et l'acide linoléique (AL) sont les précurseurs respectifs (la nomenclature « ω » situe la première insaturation en partant de l'extrémité méthyl de l'acide gras, opposé au groupe carboxylique). Un acide gras ω 3 ne peut se transformer en ω 6 et vice-versa. Les AGP apportés par la nourriture peuvent cependant être modifiés (allongés par portions de deux carbones ou insaturés par les enzymes désaturases) une fois absorbés à partir de la nourriture.

3.2- Les AGP chez les cnidaires

En 1979, Joseph a comparé les compositions des acides gras d'espèces venant des quatre classes de cnidaire. En règle générale, les AGP comptent pour une partie importante des acides gras totaux (AGT). L'acide arachidonique (AA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA), l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'acide docosapentaénoïque (DPA) sont

abondants chez les cnidaires. Depuis, d'autres études ont apporté des données supplémentaires confirmant la prédominance de ces AGP chez des espèces de coraux et d'anémones (Latyshev *et al.*, 1991; Pollero, 1983) et des scyphozoaires (Reinhardt et van Vleet, 1986; Nelson, 2000; Fukuda et Naganuma, 2001). Néanmoins, il en ressort que les proportions des acides gras sont variables d'une classe à l'autre et pour une même espèce soumise à des conditions environnementales différentes.

3.3- Facteurs modifiant le profil des acides gras des invertébrés marins

3.3.1- La nourriture

Les acides gras venant de la nourriture servent de marqueurs pour établir des relations trophiques entre les organismes marins. Certains producteurs primaires possèdent le métabolisme requis pour produire les AGP. Les algues unicellulaires sont capables de produire les AGP (principalement des ω 3) retrouvés chez les animaux qui les consomment (Sargent *et al.*, 1987). Certains AGP sont même suffisamment caractéristiques pour déterminer quelles sont les algues qui sont préférentiellement ingérées par un prédateur (Sargent *et al.*, 1987).

Les diatomées (algues unicellulaires) sont caractérisées par leur richesse en EPA et en $16:1\omega$ 7 (un acide gras monoinsaturé, AGM), qui transmis directement au prédateur, influence sa composition en acides gras de manière différente par rapport à une diète dominée par des bactéries par exemple (Kharlamenko *et al.*, 1995; Graeve *et al.*, 1994). Fukuda et Naganuma (2001) ont récemment démontré que la diète modifiée du scyphozoaire *Aurelia aurita* changeait son profil en acides gras par rapport aux spécimens maintenus dans leur habitat naturel. Le déplacement d'un organisme hors de son habitat naturel peut être la cause d'un changement de la qualité de son alimentation et se répercuter sur sa propre composition d'acides gras (Pollero et Brenner, 1981).

3.3.2- Les algues symbiotiques chez les anthozoaires

Beaucoup d'anthozoaires possèdent des algues symbiotiques (zooxanthelles) susceptibles de fournir à leur hôte certains acides gras. La biosynthèse des acides gras, étudiées à l'aide de traceurs radioactifs (acétate et bicarbonate marqués au carbone 14), est très active chez les zooxanthelles (Patton *et al.*, 1983; Kellogg et Patton, 1983). Patton et Buris (1983), ont observé que les zooxanthelles, que l'on trouve habituellement chez les coraux mous *Sarcophyton sp.* et *Lobophyton sp.*, libéraient de très grosses vésicules lipidiques (de taille comparable à la cellule de la zooxanthelle) pouvant bénéficier à leur hôte. De plus, la comparaison de 40 espèces de coraux a indiqué que les coraux avec zooxanthelles avaient une composition lipidique différente de celle des coraux chez qui les zooxanthelles sont absentes (Kellogg et Patton, 1983). La richesse des algues symbiotiques en certains acides gras est semblable à celle des coraux qui sont naturellement leur hôte (Bishop et Kenrick., 1980). Kellogg et Patton (1983) ont proposé que les zooxanthelles situées dans les tentacules de l'anémone de mer libéraient des gouttelettes lipidiques dans la cavité gastrovasculaire qui peuvent être récupérées et stockées par les tissus gonadiques.

3.4- Les variations de la composition d'acides gras liées à la reproduction

3.4.1- Variations cycliques des acides gras

La disponibilité des acides gras dépendant de l'alimentation et des algues symbiotiques pourrait contrôler le développement sexuel saisonnier des invertébrés (Tinoco, 1982). Pollero (1983) a remarqué une forte augmentation de l'EPA et du DHA chez l'anémone de mer *Phymactis clematis* entre l'automne et le printemps. Fukuda et Naganuma (2001) ont mis en

évidence des variations saisonnières d'AA, d'EPA et de DHA chez *Aurelia aurita*.

3.4.2- Les AGP dans les gonades

Les tissus reproducteurs et notamment les œufs lécithotrophes des invertébrés marins ont besoin d'accumuler des réserves lipidiques fournissant l'énergie nécessaire lors du développement de l'embryon (Holland, 1978). Lors de son développement, la larve de crevette *Macrobrachium borelli* (non lécithotrophe) accumule du DHA et de l'EPA dans la fraction phospholipidique (Heras *et al.*, 2000).

Joseph (1979) a suggéré que les importantes différences de proportions en AA chez quatre méduses (scyphozoaires) étaient attribuables au stade de développement sexuel et à la prépondérance du sexe des animaux échantillonnés. Pour étayer cette hypothèse, Joseph (1979) s'est basé sur l'observation d'AA, deux fois plus élevé dans les gonades femelles (25.5% du poids des AGT) que dans les gonades mâles (12.3% du poids des AGT) d'*Aurelia aurita*. Müller-Navarra *et al.* (2000) ont établi une corrélation positive entre l'abondance d'EPA fourni par le phytoplancton et la croissance et la production des œufs d'*Artemia* qui le consomment.

La diminution de DHA chez la coquerelle est liée à la baisse de fertilité du mâle qui survient habituellement avec l'âge (Kelso *et al.*, 1997). En dehors des invertébrés, plusieurs études menées chez les mammifères montrent que les acides gras C22 sont très abondants dans les testicules (Tinoco, 1982). L'alimentation enrichie en certains acides gras peut améliorer la production et la qualité des spermatozoïdes (Surai *et al.*, 2000; Rooke *et al.*, 2001).

En somme, les acides gras ω 3 et ω 6 chez les invertébrés, et dans le cas plus précis qui nous intéresse chez les cnidaires, influencent certainement les processus de gamétogénèse et de vitellogénèse. Les AGP, jusque là plutôt utilisés comme des marqueurs trophiques, pourraient être étudiés pour leur implication dans la reproduction.

4- Présentation du modèle expérimental, *Renilla koellikeri*

4.1- Description générale de la pensée de mer *Renilla koellikeri*

La pensée de mer est un anthozoaire colonial de l'ordre des octocoralliaires dont la forme fait penser à un rein ou un cœur aplati (voir dessin anatomique de la Fig. 1 dans l'article 1). La pensée de mer est formée de deux lobes symétriques composant le plancher colonial (ou rachis) et d'un pédoncule, perpendiculaire au rachis, qui ancre la colonie au fond de l'eau (en creusant dans le sable ou la vase) (Kastendiek, 1976; Parker, 1920a). La colonie est constituée de nombreuses chambres appelées zooécia communicant entre elles par des orifices appelés ooécia. Chaque zooécium possède un autozoïde et plusieurs siphonozoïdes sur la face dorsale (la face dorsale se réfère au côté exposé au courant marin selon Wilson (1883), alors que la face ventrale repose sur le fond). Il existe pour chaque chambre de la colonie un polype ou autozoïde qui permet la capture de proies planctoniques et de débris organiques et la ponte des gamètes. Les siphonozoïdes sont les entrées d'eau vers l'intérieur de la colonie.

4.2- La reproduction de la pensée de mer

4.2.1- La gamétogénèse chez la pensée de mer

La gamétogénèse de la pensée de mer semble similaire à celle de la plupart des métazoaires d'après la description faite par Lyke (1965). Ce dernier a partiellement suivi la croissance des gamétophores mâles et a observé les stades spermatocytes primaires et secondaires. Les spermatozoïdes matures se retrouvent dans la cavité centrale du spermatophore comme chez d'autres cnidaires tels que l'anémone de mer, un

hexacoralliaire. Comme chez d'autres anthozoaires, chaque gamétophore femelle de couleur brune abritent un seul ovocyte alors que les gamétophores mâles renferment des milliers de cellules spermatiques et sont blancs.

Les polypes sont divisés en huit septa (particularité qui définit l'ordre octocoralliaires) qui se prolongent à l'intérieur du zooecium par huit filaments mésentériques dont quatre portent les gamètes. Les cordons mésentériques ont des fonctions déterminées par la présence de cellules interstitielles spécialisées. Lyke (1965) a déterminé que les septa ventraux (selon la nomenclature employée par Wilson) étaient impliqués dans une fonction digestive principalement grâce aux cellules à zymogène. Quant aux quatre septa latéraux, ils arborent les gamétophores. La répartition de différentes cellules interstitielles sur les septa fait penser qu'un linéage cellulaire semblable à celui étudié chez l'hydre existe chez la pensée de mer. Le lignage des cellules germinales chez la pensée de mer puis les stades de développement ultérieurs, sont probablement déterminés par des facteurs hormonaux qui restent à élucider.

4.2.2- Le comportement de ponte

Les colonies, soit mâles soit femelles (gonochorisme), libèrent leurs gamètes entre le mois de mai et la fin du mois de juillet grâce à la contraction des autozoïdes. La ponte n'est pas synchronisée entre les colonies et les individus d'une même colonie pondent indépendamment les uns des autres. L'explication de cette ponte asynchrone au sein d'une même colonie réside peut être dans le fait que les individus les plus matures sont situés au centre de la colonie et que la maturité des autozoïdes en périphérie est retardée. Les spermatophores éclatent dans le milieu extérieur après la ponte ou dans la cavité gastrovasculaire, les spermatozoïdes sont ensuite entraînés par le flux d'eau circulant entre les siphonozoïdes latéraux et le siphonozoïde axial (Parker, 1920a). La fertilisation des ovocytes a lieu à l'intérieur des colonies femelles grâce à l'entrée des spermatozoïdes par les siphonozoïdes latéraux

(Satterlie et Case, 1979), ou bien à l'extérieur de la colonies femelles, une fois que les ovocytes ont été pondus.

La ponte consiste en la contraction des polypes latéraux et semble favorisée par les contractions péristaltiques de la colonie entière (Parker, 1920b; Satterlie et Case, 1979). Les contractions des polypes latéraux font progresser le gamétophore dans le pharynx jusqu'à l'émission dans le milieu extérieur (Parker, 1920a). À tout moment de l'année, le rachis des colonies ondule par vagues successives qui partent de la partie distale du pédoncule et se termine dans la partie antérieure de la colonie, il s'agit du péristaltisme rachidien. Parker (1920a) y voyait un moyen pour la colonie de se surélever de son substrat sableux et de faire circuler l'eau dans la colonie. Cependant, Satterlie et Case (1979) ont noté que la vitesse du péristaltisme rachidien était plus rapide pour les colonies en train de pondre. Le péristaltisme rachidien amplifié a donc été interprété comme une sorte de comportement de ponte qui aiderait au détachement des follicules portés par les filament mésentériques et à la sortie des gamètes hors de la colonie.

4.3- Hormones chez la pensée de mer potentiellement actives sur sa reproduction

4.3.1- Le GnRH

Deux formes de GnRH détectées récemment chez la pensée de mer ont eu des effets inhibiteurs sur la contraction musculaire de la pensée des mers (Anctil, 2000). Le GnRH est localisé dans différentes parties de l'animal mais pas dans les gonades même. De plus, l'action du LHRH (GnRH mammalien) sur les contractions musculaires de la pensée de mer suggère une conservation du GnRH entre les cnidaires et les vertébrés supérieurs. Par contre cela ne veut pas dire que le GnRH de la pensée de mer joue un rôle reproducteur car plusieurs GnRH existent chez les animaux et certains n'ont peut être pas de lien avec la reproduction. De plus, les connaissances

actuelles concernant les hormones reproductrices des cnidaires sont trop minces pour appuyer une fonction reproductrice du GnRH.

4.3.2- L'antho-RFamide.

L'antho-RFamide est un tétrapeptide (Glu-Gly-Arg-Phe) protégé par un groupe pyroglutamate à l'extrémité amino terminale et un groupe amide à l'extrémité carboxy terminale. Ce peptide appartient à la famille des RFamides. Le premier RFamide à avoir été isolé et identifié est le FMRFamide chez un mollusque par Price et Greenberg en 1977. Par la suite, l'utilisation d'anticorps reconnaissant le motif RFamide a permis de mettre à jour un grand nombre de molécules apparentées au FMRFamide chez les cnidaires, qui ont été subdivisées en plusieurs classes (pour plus de détails, on peut se référer à l'article de revue de Grimmelikhuijzen *et al.*, 1996).

Une de ces classes est celle de l'antho-RFamide dont le préfixe « antho » fait référence à son abondance chez les cnidaires bien que de l'antho-RFamide ait été découvert chez le crabe bleu (Yasuda *et al.*, 1993). Chez les anthozoaires, d'autres peptides ont été affiliés à l'antho-RFamide tels que l'antho-RWamide I et II et l'antho-RNamide (Mc Farlane *et al.*, 1991; Mc Farlane *et al.*, 1992). Ultérieurement dans le texte, ces peptides sont repris sous le nom générique d'antho-RXamides.

Les antho-RXamides et le FMRFamide sont des neurotransmetteurs des jonctions neuromusculaires des cnidaires. Ces neurotransmetteurs sont stimulateurs ou inhibiteurs des contractions musculaires. Chez l'anémone de mer, l'antho-RNamide et les antho-RWamides I et II coordonnent le fonctionnement de muscles antagonistes en stimulant la contraction d'un muscle et en inhibant celle du muscle opposé. L'inhibition est réciproque grâce à l'action croisée des antho-RXamides sur les muscles antagonistes (Mc Farlane, 1991; Mc Farlane, 1992). Le FMRFamide agit dans la reproduction en stimulant la progression de l'œuf dans l'oviducte de *Sepia officinalis* (Henry *et al.*, 1999).

L'antho-RFamide est le seul RFamide synthétisé par la pensée de mer mais à une concentration « 100 fois supérieure à n'importe quel autre neuropeptide dans le cerveau de mammifère » (Grimmelikhuijzen et Groeger, 1987). Anctil et Grimmelikhuijzen (1989) ont démontré que l'antho-RFamide est un puissant stimulateur des jonctions neuromusculaires de la pensée de mer. L'antho-RFamide se trouve réparti dans tout l'animal y compris les mésentères et les gonades (observations immunohistochimiques personnelles non publiées). La sensibilité à l'antho-RFamide de la pensée de mer est 200 fois plus grande en été qu'en automne suggérant que le rôle de l'antho-RFamide dépend de la saison (Anctil et Grimmelikhuijzen, 1989). Les contractions péristaltiques accompagnant la ponte pourraient donc être placées sous le contrôle de l'antho-RFamide.

4.3.3- La mélatonine et la sérotonine

La mélatonine et la sérotonine ont été découverts chez la pensée de mer (Umbriaco *et al.*, 1990; Pani et Anctil, 1994). La mélatonine, considérée comme une hormone importante dans le contrôle des rythmes biologiques et de la reproduction en général, a montré des fluctuations saisonnières chez la pensée de mer (Mechawar et Anctil, 1997). De plus, Mechawar et Anctil (1997) ont co-localisé par immunohistochimie des neurones à mélatonine et à sérotonine sur des gamétophores de la pensée de mer.

Bien que la sérotonine et la mélatonine soient des molécules proches structurellement, ces hormones ont une action contraire sur la musculature de la pensée de mer. La mélatonine diminue l'amplitude des contractions rythmiques (péristaltisme) par l'intermédiaire de GMPc, alors que la sérotonine accroît l'amplitude de ces contractions par le biais du second messenger AMPc (Anctil, 1989). Les deux indoléamines présentées ici peuvent donc comme l'antho-RFamide influencer les contractions de la ponte.

5- Objectifs de l'étude

La pensée de mer est un modèle pertinent pour l'étude de l'évolution des systèmes neuroendocriniens car elle appartient au groupe possédant le système nerveux le plus primitif. De plus, la place particulière des anthozoaires coloniaux dans la phylogénie des métazoaires légitime une comparaison évolutive (Dewel, 2000).

5.1- Recherche de 17 β -estradiol

La présence de deux formes de GnRH nous a incités à rechercher la présence d'œstrogène chez la pensée de mer. Nous avons voulu savoir si l'estradiol était un stéroïde sexuel présent chez la pensée de mer, et s'il pouvait être libéré de façon coïncidente avec des événements de la gamétogénèse. Dans un premier temps, nous avons recherché la présence d'estradiol chez la pensée de mer. Ensuite, si l'estradiol se trouvait dans notre animal, il serait extrêmement intéressant de voir si le GnRH pouvait modifier le niveau d'estradiol.

5.2- Étude des lipides et des acides gras

Le cycle sexuel de la pensée de mer est mal connu. Pour que nous puissions faire des suggestions sur le rôle des hormones que nous allons étudier, il fallait trouver des repères. L'étude des variations de lipides totaux nous a paru être un bon indicateur de maturation sexuelle particulièrement pour les colonies femelles. Comme certains acides gras semblent varier de façon saisonnière chez les invertébrés et être impliqués dans la reproduction, nous avons suivi l'évolution du profil des acides gras au cours des saisons. Nous avons cherché à savoir si certains acides gras étaient spécifiques aux gonades par rapport à d'autres régions de l'animal. Il a été possible de séparer les colonies mâles et femelles de mars 2001 à juin 2001 pour affiner

notre étude. Comme les algues symbiotiques sont presque uniquement dans les autozoïdes, nous avons pu comparer les acides gras des gonades avec les autozoïdes comportant des zooxanthelles et avec un autre tissu somatique qui n'a pas de zooxanthelles, le pédoncule.

De plus, ces données sur les lipides permettront sûrement de faire des comparaisons avec d'autres études et de mieux comprendre le besoin des AGP chez les cnidaires.

Objet : Demande d'autorisation de rédiger par articles
Pernet Vincent, PERV19017703
Département de Physiologie, Faculté de médecine

15 août 2001, Montréal

Mr Kalaska,

Je viens par la présente solliciter l'autorisation de rédiger mon mémoire de maîtrise en sciences neurologiques par articles. Ma requête concerne les deux articles suivants avec les informations correspondantes :

- Article 1 :

Pernet V, Gavino V, Gavino G, Anctil M (2001)
"Variations of lipid and fatty acid contents during the reproductive cycle of *Renilla koellikeri*"
Sera soumis à "Journal of Comparative Physiology B"

Contribution de l'étudiant:

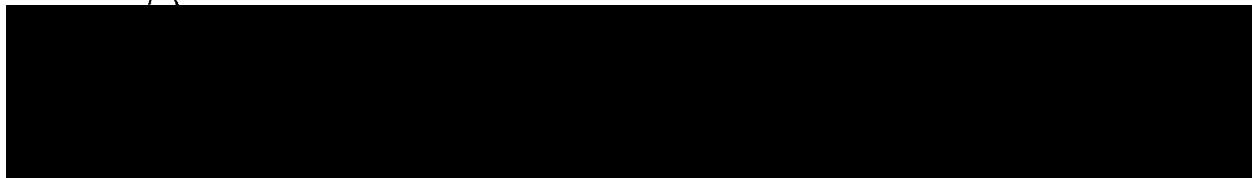
Idée originale de l'étude des lipides proposée par Vincent Pernet. Réalisation des expériences par Vincent Pernet avec la collaboration de Victor Gavino et de Grace Gavino du département de nutrition. Rédaction de l'article par Vincent Pernet sous la direction de son directeur de recherche Michel Anctil.

- Article 2 :

Pernet V, and Anctil M (2001)
"Annual variations and sex-related differences of estradiol-17 β in the anthozoan *Renilla koellikeri*"
Sera soumis à "General and Comparative Endocrinology"

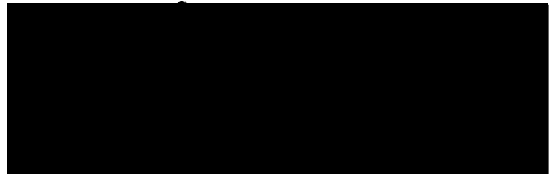
Contribution de l'étudiant:

Idée originale de l'étude de l'estradiol-17 β de Michel Anctil. Mise au point du protocole expérimental, exécution des expériences par Vincent Pernet. Rédaction de l'article par Vincent Pernet sous la direction de son directeur de recherche Michel Anctil.



Vincent Pernet	Victor Gavino	Grace Gavino	Michel Anctil
Le: 15 Août 2001	15 août 2001	15 août 2001	15 août 2001

approuvé
16-août 2001



II- Articles

1 -Article 1 : Pernet V, Gavino V, Gavino G, Anctil M (2001) Variations du contenu lipidique et des acides gras au cours du cycle reproducteur de l'anthozoaire *Renilla koellikeri* . (en préparation). Sera soumis à Journal of Comparative Physiology B.

Contribution de l'étudiant à l'article 1 : Idée originale de l'étude des lipides proposée par Vincent Pernet. Établissement du protocole expérimental, réalisation des expériences et analyses des données effectuées par Vincent Pernet sous les conseils de Victor Gavino du département de nutrition et avec le soutien de Grace Gavino rattachée au département de nutrition. Travail de rédaction de l'article par Vincent Pernet sous la direction de son directeur de recherche Michel Anctil.

**“Variations of lipid and fatty acid contents during the reproductive cycle
of the anthozoan *Renilla koellikeri*”**

By

Pernet V ⁽¹⁾, Gavino V ⁽²⁾, Gavino G ⁽²⁾, Anctil M ⁽¹⁾

(1) Département de sciences biologiques and Centre de recherche en sciences neurologiques, (2) Département de nutrition, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Address for Correspondence :

(1) Dr Michel Anctil, Département de sciences biologiques, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

(1) Tel : (514)-343-7691

Fax : (514)-343-2293

E-mail : michel.Anctil@umontreal.ca

Abstract

Lipid and fatty acid contents were monitored in the sea pansy *Renilla koellikeri* during its reproductive cycle. The fluctuations of lipids and fatty acids were closely related to sexual development and gonads represented the principal site of lipid storage in the colony. Between April and May, fatty acids and lipids greatly accumulated just prior to spawning. The subsequent decrease of lipid and fatty acid contents in June probably resulted from loss due to spawning. Fatty acid composition was assessed for the whole animal and was compared between male and female gonads, and between gonads and somatic tissues. Arachidonic acid (AA) was the principal fatty acid in the whole colony followed by palmitic acid and eicosapentaenoic acid (EPA). The examination of fatty acid variations in gonads showed that EPA and AA were highly incorporated in eggs during the month preceding spawning whereas in the same period, EPA was the only fatty acid to accumulate in spermatophores. The differences of fatty acid levels observed in gonads reflected sex differences observed in colonies. The seasonal variations of the $\omega 6/\omega 3$ ratio of the colonies were largely influenced by EPA and AA, and appeared as a reliable indicator of the sexual maturity of the sea pansy.

Keywords : Reproduction, Arachidonic acid, Eicosapentaenoic acid, Biomarkers, Anthozoan

Introduction

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) ω 3 and ω 6 are considered as essential fatty acids for marine invertebrates because of their inability to synthesise them endogenously (Holland 1978; Tinoco 1982). Some autotroph organisms can selectively synthesise and store high levels of PUFA (Ackman and Tocher 1968) required by animals. In addition, several ω 3 and ω 6 PUFA have been used as biomarkers to assess relationships between primary producers (diatoms, unicellular algae, phytodetritus, prokaryotic cells) and invertebrate consumers (Holland 1978; Pollero and Brenner 1981; Kharlamenko *et al.* 1995; Müller-Navarra *et al.* 2000).

In addition to their importance in trophic networks, food-derived PUFA are required for reproduction of both vertebrates and invertebrates. Food enriched in ω 3 and ω 6 PUFA can improve sperm quality in some vertebrates (Surai *et al.* 2000; Rooke *et al.* 2001). Even in humans, Ollero *et al.* (2000) demonstrated that docosahexaenoic acid (DHA), the most abundant PUFA in human sperm, decreases in absolute levels during sperm maturation, but its relative percentage of total fatty acid (TFA) remained unchanged.

Similarly, some studies indicated a requirement of PUFA for reproduction of aquatic invertebrates. Holland (1978) reported that lipids were stored for embryogenesis in crustacean eggs. Moreover, the availability of eicosapentaenoic acid (EPA) from phytoplankton diatoms has been positively correlated with growth and egg production in the zooplankton species *Daphnia magna* (Müller-Navarra *et al.* 2000). The decrease of DHA in cockerel has been linked to the age-related decrease of spermatozoan quality (Kelso *et al.* 1997). The embryo of the shrimp *Macrobrachium borelli* accumulates the ω 3 PUFA DHA and EPA in phospholipids during its development (Heras *et al.* 2000).

Fatty acids in cnidarians (hydrozoans, scyphozoans, cubozoans, and anthozoans) were reviewed by Joseph (1979). The ω 3 PUFA were present at high levels in all four classes of cnidarians, especially DHA, EPA, and docosapentaenoic acid (DPA). More recent studies have shown the same abundance of ω 3 in the scyphomedusae *Atolla wyvillei* (Reinhardt and van Vleet 1986) and *Aurelia aurita* (Fukuda and Naganuma 2001), and in zooplanktonic cnidarians (Nelson *et al.* 2000). Thus ω 3 (and also ω 6) PUFA seem to be major fatty acids in cnidarians and are assumed to be derived from the diet. Furthermore, Joseph (1979) suggested that the differences in relative levels of arachidonic acid (AA) between four species of scyphomedusae were likely due to gonadal development and the sex of the animals. Indeed, female gonads contained twice as much AA as male gonads in *Aurelia aurita*. In addition, seasonal variations of EPA were shown in *Aurelia aurita* (Fukuda and Naganuma 2001) but were not related by the authors to the levels observed in the gonads (Joseph 1979). Beyond the ecological interest of PUFA in marine trophic networks, there has been no attempt to link seasonal variations of PUFA levels with growth and reproduction in cnidarians. It is a relevant issue since marine organisms appear specifically to store several PUFA.

To approach this issue we used the sea pansy *Renilla koellikeri*. The sea pansy is a dioecious anthozoan in which reproduction is seasonal. When sexual maturity is reached in May and spawning begins to occur (Wilson 1883; Satterlie and Case 1979; and personal observations), the chambers of the colony (zooecia) are filled by the sexual tissues called gametophores. During the spawning period (May to late July), the gametophores are expelled through the autozooids (feeding polyps). Once fertilized, the egg becomes a planula, the freely-swimming larva, which lasts 5 days until metamorphosis into a primary polyp (Wilson 1883). The colony grows by clonal budding from the primary polyp but does not remain sessile contrary to stony corals.

Except for spawning, the involvement of other important reproductive events within the annual life cycle of the sea pansy is not well understood. In addition, feeding of colonies before spawning is known to be primordial for vitellogenesis. Satterlie and Case (1979) reported that “the lecithotrophic eggs permitted development to the primary polyp stage without feeding”. Therefore, the utility of PUFA as biomarkers should be investigated in order to better understand when and how the period of vitellogenesis occurs in this primitive metazoan.

The aims of this study were: (1) to analyse the fatty acid profile in whole colonies and to compare profiles in somatic versus germinal tissues; (2) to determine if the fatty acid compositional changes are seasonal, and if so, (3) whether they could be related to sexual maturity.

Material and methods

Maintenance

Colonies of *Renilla koellikeri* were obtained from Marinus Inc. (Long Beach, California, USA) and kept in artificial sea water (ASW, Instant Ocean), osmolarity adjusted to 1100 mOsm, pH to 8.0, temperature to 14-20°C and were maintained under a photoperiod of 12h:12h light:dark upon arrival. The animals were not fed within the 2-7 days preceding their handling.

Sample preparation

Whole animals. Sea pansies were quickly frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until lyophilization. The dried samples were then ground in an automated grinder and the resulting powder was stored at -80°C until total lipid extraction.

Tissues. Somatic (autozooids and peduncle) and gonadal tissues (gametophores, see fig. 1) were collected around the period of reproduction (the anatomy of the sea pansy is represented in Fig. 1). The animals were anaesthetised in 0.37 M MgCl₂ diluted 1:1 in ASW. The autozooids on the upper face of the colony were cut with scissors at the base of the column. The peduncle serving to anchor the colony in the sand was cut at the border with the rachis and the gametophores were collected by dissecting the rachis with a scalpel. The spermatophores (male gametophores) appeared as white balls whereas the eggs (female gametophores) were brown because of their yolk reserve. The tissues were frozen in liquid nitrogen, lyophilised and ground with a mortar and stored at -80°C.

Lipid staining on sections

Some colonies were used for section and lipid staining. The colonies were anaesthetised in 0.37 M MgCl₂ diluted 1:1 in ASW. A 1-cm-wide strips of tissue was cut longitudinally near the medial axis of the colony where gonadal maturity is at its highest. The strips were fixed in 4% paraformaldehyde (W/V) in PBS (0.1 M phosphate buffer, 2.4 % NaCl, pH 7.4) overnight at 4°C and washed in PBS 3 times for 15 min. The strips were then soaked successively in 15% and 30% sucrose in PBS. The specimens were embedded in OCT compound (Tissue-Tek), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until sectioned. Sections 30-µm thick were cut with a cryostat-microtome (Bright Instrument Company) and laid on microscope slides precoated with gelatin, then stored at -80°C.

The lipids on sections were stained with the lysochrome black Soudan B (Gabe 1968). The sections were stained for 10 min and rinsed with running water. Observations were made with a Leica DMR microscope and photographs were taken with a Leica MPS 60 camera.

Extraction of lipids

Samples of whole colonies were submitted to lipid extraction. Total lipids were extracted according to a method originally described by Bligh and Dyer (1959), modified as follows: 0.5 g of the powdered sample was weighed to the nearest tenth of a mg then placed into a 5-mL screw-cap tube containing 4.75 mL of solvent consisting of chloroform, methanol and water (1:2:0.8, v/v). The mixture was stirred constantly overnight at room temperature, after which the solids were sedimented by centrifugation for 10 min at 1000 rpm. The supernatant containing the lipids was transferred to a 15-mL test tube. The residue was extracted a second time with 4.75 mL of the same solvent and the extract was combined with the first. To the combined extracts were added 2.5 mL each of chloroform and water. After mixing, the mixture separated into 2 phases and the lower chloroform layer containing the extracted lipids was transferred quantitatively into a 5-mL test tube. The volume was reduced to ~ 2 mL under a stream of N₂, after which 2 mL of toluene was added to the extract and evaporation continued to dryness. The lipid residue was transferred with small volumes of chloroform into a pre-weighed 2.5-mL vial. Finally, the chloroform was completely removed under a stream of N₂ and the vial re-weighed in order to calculate by difference the weight of the lipid residue.

Fatty acid analysis

Lipids were transmethylated to fatty acid methyl esters (FAME) for analysis by gas chromatography using a procedure originally described by Lepage and Roy (1986). Dried lipid extracts were re-dissolved in 2 mL of solvent consisting of hexane and methanol (4:1, v/v) containing 0.01% (w/v) butylated hydroxytoluene as antioxidant in a 5-mL screw-cap test tube. For the analysis of the fatty acid composition of specific anatomical regions of the

colonies, 30 to 60 mg of the lyophilized powdered sample was directly suspended in 2 mL of the hexane-methanol solvent.

A known quantity of heneicosanoic acid as internal standard was added to the mixture after which the subsequent steps of the transmethylation procedure are as described by Lepage and Roy (1986). FAME were analyzed using a Restek Rtx-2330 100m, 0.25mm ID fused silica capillary column (Chromatographic Specialties, Brockville, Ontario, Canada) mounted on a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph equipped with a flame-ionization detector (Hewlett-Packard, Pointe Claire, Quebec, Canada). The carrier gas was H₂ at 1 mL/min. Injection was in split mode at a 50:1 split ratio. Temperature was programmed in 3 stages, from 60°C to 120°C, to 180°C, then to 210°C for a total analysis time of 3 h. Peaks were assigned by comparison with retention times of known FAME standards (NuChek Prep, Elysian Minnesota USA) and peak areas were calculated by a Hewlett-Packard 3396 electronic integrator. Instrument response was calibrated using known quantities of FAME standards (NuChek Prep) and calculated peak areas were corrected accordingly. Absolute amounts of each identified FAME were calculated using the internal standard method.

Statistical analysis

Values were expressed as mean \pm SEM. Significant changes in total lipids and fatty acids were determined by ANOVA and Newman-Keuls tests in GraphPad Prism software.

Results

Sexual development. Gametophores first appear by budding from mesenteric filaments and once budded gametophores remain clustered around the mesenteric filament from which they are formed. As shown by comparing Fig. 2A and Fig. 2B, the budding process is fairly similar in male and female. Budding involves the endodermal epithelium of mesenteric filaments which becomes the follicle epithelium of the gametophores. As gametophore diameter increases, the follicle epithelium becomes thinner. Both male and female gametophores grow to 400-500 μm in diameter.

Sexual maturity is attained in May when the clusters of gametophores have become so large that they are crowded together and form an apparent single mass. Mechawar and Anctil (1997) have shown that maturity in summer was characterised by the abundance of large gametophores whereas in winter only very few gametophores displayed a large size.

Moreover, summer clusters are composed of gametophores at different stages of development (Fig. 2A-B) supporting the hypothesis developed by Wilson (1883) that successive broods could occur within the three months of reproductive activity (May to July).

Fig. 2C shows the prominence of lipid droplets in the yolk of the egg and in the endodermal cells of the mesenteric filament. Heavy lipid staining in endodermal mesenteric filaments is not peculiar to the reproductive tissue since it is found in the endodermal epithelium of the entire polyp (Fig. 2D).

Total lipid content and fatty acid composition. Total lipids accounted for 2-4 % of colony dry weight. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) represented about 60 % of the total fatty acids (TFA) over the year followed by SFA (30%) and MUFA with values from 8 to 9%. The fatty acid composition in the sea pansy was dominated in descending rank order by arachidonic acid (20:4 ω 6, AA), eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3, EPA), palmitic acid (16:0), and stearic acid (18:0) (Table 1).

Seasonal lipids and fatty acid variations. Both total lipids (TL) and total fatty acids (TFA) gradually dropped from August to the lowest level in February, then steadily rose to the highest level in May when the spawning period is initiated. Concurrently, the $\omega 6/\omega 3$ ratio rose to its highest level in December-February, then dropped steadily to its lowest level in May. Data obtained during summer 2001 were in good agreement with those of August 2000. Interestingly, the evolution of the $\omega 6/\omega 3$ ratio well mirrored the variations of TFA and TL.

The relative contribution of each fatty acid category (SFA, MUFA, PUFA) remained similar over the year. In contrast, PUFA underwent marked changes in relative abundance (Table 2). AA accounted for up to 44 % of TFA in December, then dropped to 31 % in May. Inversely, EPA rose by 14 % in the same period. Other $\omega 6$ fatty acids followed the trend of AA to a lesser extent while other $\omega 3$ fatty acids similarly followed the trend of EPA. This shows that the inverse relationship in annual changes of AA versus EPA contributes significantly to the changes in the $\omega 6/\omega 3$ ratio described in Fig. 3.

As Table 2 illustrates, differences between male and female colonies in the relative abundance of the various fatty acids were observed. In the four consecutive months of sampling when sexes were separated, there was an accentuation of these differences from March to June when spawning is at its peak. For example, PUFA in female colonies represented 59 % of TFA in March and reached 66 % in June while male PUFA remained stable (57 %). Male EPA increased by 14 % from March to May while female EPA rose by 9 % only in the same period. Inversely to EPA, male AA decreased by 11 % and female AA by only 3 % between March and May (Table 2).

The saturated palmitic acid which relative abundance otherwise does not change over the year also displayed differences between male and female that became accentuated from March to June, from a 3 % difference to 8 % difference in June. The same trend holds for stearic acid but to a lesser extent (Table 2).

Fatty acid comparison between somatic and germinal tissues. In order to determine the relative contribution of fatty acids from germinal tissues to that of the whole animal, fatty acids from somatic tissues (autozooids and peduncle) were compared with gonad fatty acids in colonies processed in April (Table 3). Gonad tissue contained substantially more fatty acids than somatic tissues. Eggs contained up to 47 mg/g dry weight whereas peduncle had the lowest fatty acid content (5 mg/g dry weight). Spermatophores were also rich in fatty acids (39 mg/g dry weight) and autozooid fatty acid contents (19 mg/g dry weight) were intermediate between gonads and peduncle.

To allow comparisons between tissues, fatty acids were expressed in percent of TFA rather than in absolute values. The relative abundance of MUFA in eggs was generally greater than in other tissues. Eggs contained half as much palmitic acid (12 %) and stearic acid (5 %) as in other tissues including spermatophores (Table 3). In eggs and spermatophores, the relative abundance of AA was lower than in somatic tissues. All ω 3 fatty acids were relatively more abundant in gonad tissues than in somatic tissues except EPA in autozooids which was similar to that of eggs.

The relative abundances of SFA were similar in the polyp tissue and in the colonial tissue (peduncle), but MUFA relative abundances were lower in autozooids than in peduncle. The greatest difference between PUFA of the two somatic tissues was the higher relative abundance of EPA in autozooids than in peduncle.

Fatty acid changes in gametophores. To further investigate the contribution of gonad tissues to fatty acid composition in whole animals, variations of the fatty acid content in eggs and spermatophores were monitored from early April to June. TFA in eggs rose by 56 % in one month (early April to early May) due primarily to PUFA (Fig. 4A). In spermatophores, a more modest TFA increase occurred only in May, also due to PUFA. As shown in Fig. 5A, the sharp rises of AA and EPA accounted for most of the PUFA increase in eggs. DPA followed the same trends of variations as EPA. Consequently, the ω 6/ ω 3 ratio

did not change appreciably (Fig. 5A). In contrast, spermatophore PUFA increases were almost entirely caused by EPA (Fig. 4B). Furthermore, spermatophore AA levels decreased progressively in contrast to those of eggs. As a consequence, the $\omega 6/\omega 3$ ratio is greatly decreased during maturation of male spermatophores.

In addition, SFA in eggs slightly decreased whereas it increased slightly in spermatophores (Fig. 4). This was also apparent for the specific variations of palmitic and stearic acid levels shown in Fig. 5.

These changes of fatty acid composition in gonads account to a large extent for sex differences observed in whole animals (Table 2).

Discussion

Total lipids and TFA in the sea pansy underwent changes related to season, sex and tissue type. PUFA dominated the TFA content of the whole colony (Table 1). AA and EPA constitute the two principal PUFA which caused fatty acid variations over the year (Tables 2 and 3). Differences of relative abundance of EPA and AA between male and female colonies were related to fatty acid levels found in gonads (Table 1 and 3). The sharp increase of fatty acid and total lipid accumulation in colonies between April and May preceded the spawning period (Fig. 3). At the same time, the important fatty acid increase was due to EPA and AA in eggs and mainly to EPA in spermatophores (Figs 4-5). Therefore the $\omega 6/\omega 3$ ratio appeared as a good indicator of sexual maturity stages and was well correlated with lipid storage in colonies.

Lipid and fatty acid contents in sea pansy

The total lipid content of the sea pansy (2-4 % or 20-40 mg/g dry weight) is intermediate between those of sea anemones and stony corals. In stony corals, the total lipid content is quite variable, representing from 1.3

mg/g dry weight (0.13 %) in *Favia stelligera* to 83 mg/g dry weight (8.3 %) in *Tubipora musica* (Patton *et al.* 1983). In contrast, total lipids on a dry weight basis reached 43 % in the sea anemone *Condylactis gigantea* (Kellogg and Patton 1983) and 26 % in *Metridium senile* (Joseph 1979). As sea anemones are composed of soft tissues without a calcareous skeleton, these high levels of lipids exceed those of soft corals (non-ash-free dry weight) where calcareous spicules are embedded in the coenenchyme, as well as those of stony corals in which the epidermis secretes a thick calcium carbonate sheet covering the colony (Ruppert and Barnes 1994).

High levels of PUFA are commonly found in cnidarians with the possible exception of the stony coral *Porites lutea* in which PUFA can be as low as 29.3 % of TFA (Latyshev *et al.* 1991). To our knowledge, the high levels of AA found in the sea pansy have not been reported in any other cnidarian or higher animal. AA levels range from 1 to 21.9% in the different coral investigated by Latyshev *et al.* (1991), and from traces to 22.4% of TFA in other cnidarians (Mason 1972; Joseph 1979; Reinhardt and van Vleet 1986 ; Nelson *et al.* 2000). However, a high prevalence of a single fatty acid as seen in the case of the sea pansy can also occur for fatty acids other than AA as exemplified by the high levels of DHA (83.9 % of TFA) in the stony coral *Millepora sp.* (Latyshev *et al.* 1991). In contrast, the EPA levels of the sea pansy are similar to those found in other cnidarians where they range between 0.4 to 21% of TFA (Joseph 1979; Reinhardt and van Vleet 1986 ; Latyshev *et al.* 1991; Nelson *et al.* 2000; Fukuda and Naganuma 2001).

In the sea pansy, fatty acid levels varied according to seasonal patterns of their abundance (Fig. 2). AA and EPA are the principal fatty acids of the sea pansy which determined the changes observed in the $\omega 6/\omega 3$ ratios (Table 2). Fukuda and Naganuma (2001) observed an inverse relationship of the variations of EPA and AA between April and June in *Aurelia aurita* as we did in the sea pansy. In *Aurelia aurita*, EPA reached 16 % of TFA in June and

decreased to 10 % in September. In the same period, AA increased to a lesser extent, from 3 to 6 % of TFA. The $\omega 6/\omega 3$ ratio was the lowest in June (0.22) and the highest in September (0.65). In the sea anemone *Phymactis clemaytis*, Pollero (1983) has reported an increase of EPA (8.2 % to 13.9 %) and DPA (8.7 % to 16.6 %) between autumn and spring, but little change of AA levels. Therefore, contrary to the sea pansy, $\omega 3$ fatty acids dominated over $\omega 6$ fatty acids in sea anemones during summer.

Source of fatty acids

Food availability may determine lipid variations specific to the sea pansy and the presence of specific fatty acids may reflect the diet. The sea pansy diet usually includes algae in suspension, protozoans and larvae of small crustaceans with limited motility (Lyke 1965; Kastendiek 1976). It is possible to assess prey-predator relationship by using fatty acids as biomarkers (Sargent *et al.* 1987). Fatty acids of the $\omega 3$ class and especially EPA have been found to a large extent in unicellular algae which are available to filter-feeders (Ackman and Tocher 1968). Diatoms are known to contain high levels of EPA (Sargent *et al.* 1987; Graeve *et al.* 1994) and hence may be a source of EPA for the sea pansy as suggested for *Aurelia aurita* (Fukuda and Naganuma 2001). However, Kharlamenko *et al.* (1995) regarded a 16:0/16:1 $\omega 7$ ratio close to one as an indicator of a diet based on diatoms, whereas in the sea pansy this ratio largely exceeded a value of one (8.7 ± 0.3 , \pm SEM, $n=36$).

The high abundance of AA in the sea pansy (Table 1) is not likely to originate from unicellular algae in which it is usually low (Ackman and Tocher 1968; Kharlamenko *et al.* 1995). Instead it may derive from macroalgal detritus where AA is reported as a major PUFA (Johns *et al.* 1979; Kharlamenko *et al.* 1995). In addition, macroalgae had elevated 16:0/16:1 $\omega 7$ ratios (1.7-8.3) and in some of them EPA levels were as high as 39.2 % of TFA (Johns *et al.* 1979;

Kharlamenko *et al.* 1995). Because macroalgae cannot be directly ingested by the sea pansy, phytodetritus emanating from macroalgae are more readily captured by the feeding polyps.

Comparisons between autozooids and peduncle allowed us to determine whether fatty acid composition differed between symbiont-filled polyps (autozooids) and purely colonial tissues devoid of symbiotic algae. The higher levels of TFA in autozooids (18.9 mg/g dry weight) compared with peduncle (5.3 mg/g dry weight) may be due to the presence of zooxanthellae. Zooxanthellae were reported as the principal sites of fatty acid synthesis in symbiotic anthozoans where fatty acids are incorporated in triglycerides (Patton and Burris 1983; Kellogg and Patton 1983; Patton *et al.* 1983). Patton and Burris (1983) observed the release of large lipid vesicles from zooxanthellae isolated from the coral *Stylopora pistillata* which, according to Patton *et al.* (1983), appear to be translocated to the host. The possibility that such a translocation occurs in the sea pansy needs to be tested experimentally.

EPA abundance accounted for the most marked difference in the fatty acid composition between autozooids (10 % of TFA) and peduncle (2 % of TFA). That this finding may point to algal symbionts as the source of EPA is supported by Bishop and Kenrick (1980) showing that zooxanthellae isolated from reef coral secreted large amounts of EPA (9-22.8 % of TFA). It is also possible that fluctuations of EPA levels observed in the sea pansy (Table 2) were related to seasonal variations of the photosynthetic activity of the zooxanthellae. Lipogenesis by zooxanthellae in anthozoans is known to be highly stimulated by light (Kellogg and Patton 1983; Patton and Burris 1983). This may be why *Stylopora pistillata* displayed significantly lower EPA levels when encountered at greater ocean depth (Latyshev *et al.* 1991).

The sea pansy gonads appear to store substantial lipid reserves (Fig. 2) which may also be supplied by polyp zooxanthellae. On the other hand, the sea pansy gonads grow on mesenteric filaments in which zymogen cells (digestive cells) are concentrated. Therefore, the sea pansy gonads in the gastrovascular cavity occupy a privileged location to receive lipids from both zooxanthellae and food. At this stage of the investigation it is difficult to distinguish the contribution of these two sources of lipid.

Association of lipid changes with sexual development

The sea pansy fatty acids appeared to be heavily incorporated in gonads (Table 3) but in a different manner between the two sexes (Fig. 4 and 5). This is consistent with observations in jellyfish where lipids in male gonads represented 6.1 % of fresh body weight and in females 5.5 %, compared with a mean lipid percentage of 0.2 % in the whole animal (Joseph 1979). Kellogg and Patton (1983) proposed that the bulk of lipids in sea anemones was stored in mesenteries to support gonadal growth.

The annual variations of total lipids and TFA contents were temporally related to the sexual cycle. Total lipid levels were twice as high in summer as in winter in the sea pansy. The net increase in May preceded spawning (Fig. 3), then total lipids decreased steadily after the spawning period from August (34 mg/g dry weight) to a minimum in October (22 mg/g dry weight), with intermediate values in September (28 mg/g dry weight). Similarly, variations in total lipids have been reported in *Metridium senile* between November (0.67 %) and June (5.15 %) (Joseph 1979). In contrast, in another sea anemone, *Phymactis clematis*, the magnitude of changes in total lipids between autumn (1.9 %) and spring (2.35 %) was smaller, or not observable (Pollero 1983).

Our results do not address directly how gamete maturation may be affected by lipid changes. The fluctuations of TFA levels in sea pansy

spermatophores (Fig. 4) may be attributed to the proliferation of spermatocyte cells in May, which then become spermatozooids resulting in a drop of TFA levels in June. Furthermore, TFA changes in male gonads (Fig. 4B and 5B) were corroborated by the results in whole colonies (Table 2). Thus, it can be suggested that spermatophores were mainly filled with spermatocytes in May and, after a rapid spermiation some of them were expelled for the fertilisation of eggs in June. Since EPA was the principal fatty acid to increase in May, it may be involved in sperm cell maturation.

High TFA levels in oocytes are probably due to accumulation of lipid reserves up to the beginning of spawning (Fig. 4A). The large sea pansy eggs, up to 400-500µm in diameter (see Fig. 2), were considered as lecithotrophic by Satterlie and Case (1979) since no external nutrients seem to be required to bring larvae to metamorphosis. In general, eggs of marine invertebrates are important sites of lipid storage to supply energy for the upcoming larvae (Holland 1978). Upon spawning, the remaining sea pansy egg clusters would be mostly composed of eggs with less vitellus. Therefore, one may envisage a direct loss of lipids simply due to colony-wide spawning.

Possible role of EPA and AA in reproduction

The occurrence of high AA and EPA levels does not seem restricted to the sea pansy. High AA levels appear to be characteristic of some invertebrate ovaries, including jellyfish ovaries (Joseph 1979) but its role has not been elucidated. EPA was also reported as an important PUFA related to crustacean reproduction (Müller-Navarra *et al.* 2000). In the sea bass, AA may induce oocyte maturation after being transformed into prostaglandins PGE₂ and PGF_{2α} (Sorbera *et al.* 2001). EPA was proposed to reduce AA effects by competing for cyclooxygenase, forming PGE₃, an ineffective prostaglandin on maturation. *Hydra* has the capacity to transform AA in isomers of HETE prostaglandins that appear to be involved in control of asexual reproduction

(Leitz *et al.* 1994). In *Hydra*, AA is released by the neuropeptide antho-RFamide to promote mouth closure (Pierobon *et al.* 1997). In the sea pansy antho-RFamide is a highly abundant peptide (Grimmelikhuijzen and Groeger 1987) and immunoreactive antho-RFamide is widespread throughout the nervous system of the colony (Pernet and Anctil, unpublished data). Antho-RFamide is known to stimulate muscle contraction in the sea pansy (Anctil and Grimmelikhuijzen 1989). Given the unusually large amount of AA in the sea pansy, the possibility that it is used as a second messenger in the antho-RFamide activation pathway remains to be examined. Moreover, the presence of AA (Table 3) and of antho-RFamide in different tissues of the sea pansy suggest that their action may be more far-reaching than just for reproduction.

Our work has shown a temporal correlation between lipid variations and sexual development in the sea pansy. The origin of fatty acids in food and symbiotic algae has not been fully investigated in our study. The peculiar prevalence of AA and EPA deserves further investigation to determine their potential role in signalling pathways as prostaglandin precursors.

Acknowledgements

We thank Louise Pelletier for her help with lipid staining and Sandrine Joly for her technical support in animal handling. This work was supported by grants from NSERC of Canada and FCAR-Quebec to M. A., and by a grant from NSERC to V. G.

References

- Ancil M and Grimmelikhuijzen CJP (1989) Excitatory action of the native neuropeptide antho-RFamide on muscles in the pennatulid *Renilla köllikeri*. *Gen Pharmac* 20:381-384
- Ackman RG, Tocher CS and Mc Lachlan J (1968) Marine phytoplankter fatty acids. *J Fish Res Bd Canada* 25:1603-1620
- Beams HW and Kessel RG (1983) Cnidaria. In: Adiyodi KG and Adiyodi RG (eds) *Reproductive Biology of Invertebrates*, volume I. John Wiley and Sons, pp 31-67
- Fukuda Y and Naganuma T (2001) Potential dietary effects on the fatty acid composition of the common jellyfish *Aurelia aurita*. *Mar Biol* 138:1029-1035
- Gabe M (1968) *Techniques histologiques*. Masson et Cie (eds)
- Graeve M, Kattner G, Hagen W (1994) Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: Experimental evidence of trophic markers. *J Exp Mar Biol Ecol* 182:97-110
- Grimmelikhuijzen CJP, and Groeger A (1987) Isolation of the neuropeptide pGlu-Gly-Arg-Phe-amide from the pennatulid *Renilla köllikeri*. *FEBS Lett* 211:105-108
- Heras H, Gonzalez-Baró MR, and Pollero RJ (2000) Lipid and fatty acid composition and energy partitioning during embryo development in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids* 35:645-651

- Holland DL (1978) Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In: Malins DC and Sargent JR (eds) *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, volume IV. Academic Press, London New York San Francisco, pp 85-123
- Johns RB, Nichols PD and Perry GJ (1979) Fatty acid composition of ten marine algae from Australian water. *Phytochemistry* 18:799-802
- Joseph JD (1979) Lipid composition of marine and estuarine invertebrates: Porifera and Cnidaria. *Prog Lipid Res* 18:1-30
- Kastendiek J (1976) Behaviour of the sea pansy *Renilla kollikeri* Pfeffer (Coelenterata:Pennatulacea) and its influence on the distribution and biological interactions of the species. *Biol Bull* 151:518-537
- Kellogg RB and Patton JS (1983) Lipids droplets, medium of energy exchange in the symbiotic anemone *Condylactis gigantea*: a model coral polyp. *Mar Biol* 75:137-149
- Kelso KA, Cerolini S, Speake BK, Cavalchini LG and Noble RC (1997) Effects of dietary supplementation with α -linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. *J Reprod Fert* 110:53-59
- Kharlamenko VI, Zhukova NV, Khotimchenko SV, Svetashev VI, Kamenev GM (1995) Fatty acids as markers of food sources in a shallow-water hydrothermal ecosystem (Kraternaya Bight, Yankich Island, Kurile Islands). *Mar Ecol Prog Ser* 120:231-241

- Latyshev NA, Naumenko NV, Svetashev VI, Latypov Ya (1991) Fatty acids of reef-building corals. *Mar Ecol Prog Ser* 76:295-301
- Leitz T, Muller V, De Petrocellis L, Di Marzo V (1994) Enantiospecific synthesis of bioactive hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) in *Hydra magnipapillata*. *Biochim Biophys Acta* 1213:215-223
- Lepage G, Roy CC (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *J Lip Res* 27 :114-120
- Lyke EB (1965) The histology of sea pansies, *Renilla reniformis* (Pallas) and *Renilla koellikeri* (Pfeffer) with a note on the fine structure of the latter species. Ph.D. thesis, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin
- Mason WT (1972) Isolation and characterization of the lipids of the sea anemone, *Metridium senile*. *Biochim Biophys Acta* 280: 538-544
- Mechawar N and Anctil M (1997) Melatonin in a primitive metazoan: seasonal changes of levels and immunohistochemical visualization in neurons. *J Comp Neurol* 387: 243-254
- Miller RL (1983) Cnidaria. In: Adiyodi KG and Adiyodi RG (eds) *Reproductive Biology of Invertebrates*, volume II. John Wiley and Sons, Chichester, pp 23-73
- Müller-Navarra DC, Brett MT, Liston AM and Goldman CR (2000) A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403:74-77

- Nelson MM, Phleger CF, Mooney BD, and Nichols PD (2000) Lipids of gelatinous antarctic zooplankton: Cnidaria and Ctenophora. *Lipids* 35:551-559
- Ollero M, Powers RD, and Alvarez JG (2000) Variation of docosahexaenoic content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. *Mol Reprod Dev* 55:326-334
- Orczyk GP, Caldwell BV and Behrman HR (1974) Estrogens : Estradiol, Estrone, Estriol. In : Jaffe BM and Behrman HR (eds) *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. Academic Press New York San Francisco London
- Patton JS, Battey JF, Rigler MW, Porter JW, Black CC and Burriss JE (1983) A comparison of the metabolism of bicarbonate ^{14}C and acetate $1\text{-}^{14}\text{C}$ and the variability of species lipid compositions in reef corals. *Mar Biol* 75:121-130
- Patton JS and Burriss JE (1983) Lipids synthesis and extrusion by freshly isolated zooxanthellae (symbiotic algae). *Mar Biol* 75:131-136
- Pierobon P, De Petrocellis L, Minei R, and Di Marzo V (1997) Arachidonic acid as an endogenous signal for the glutathione-induced feeding response in *Hydra*. *Cell Mol Life Sci* 53:61-68
- Pollero RJ and Brenner RR (1981) Effects of the environment and fasting on the lipid and fatty acid composition of *Diplodom patagonicus*. *Lipids* 16:685-690

- Pollero RJ (1983) Lipid and fatty acid characterization and metabolism in the sea anemone *Phymactis clematis* (Dana). *Lipids* 18:12-17
- Reinhardt SB and van Vleet ES (1986) Lipid composition of twenty-two species of Antarctic midwater zooplankton and fish. *Mar Biol* 91:149-159
- Rooke JA, Shao C-C, and Speake BK (2001) Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and *in vitro* characteristics of semen. *Reproduction* 121:315-322
- Ruppert EE and Barnes RD (1994) Cnidarians and ctenophores. In: Ruppert EE and Barnes RD (eds) *Invertebrate Zoology*, 6th edition. Saunders College Publishing, Chapter 4
- Sargent JR, Falk-Petersen I-B and Calder AG (1983) Fatty acid compositions of neutral glycerides from the ovaries of the asteroids *Ctenodiscus crispatus*, *Asterias lincki* and *Pteraster millitaris* from Balsfjorden, Northern Norway. *Mar Biol* 72:257-264
- Sargent JR, Parkes RJ, Mueller-Harvey I and Henderson RJ (1987) Lipid biomarkers in marine ecology. In: Sleight MA (ed) *Microbes in the Sea*. Ellis Horwood Limited, Chichester, pp 119-138
- Satterlie RA and Case JF (1979) Development of bioluminescence and other effector responses in the pennatulid coelenterate *Renilla köllikeri*. *Biol Bull* 157:506-523
- Sorbera LA, Asturiano JF, Carrillo M, and Zanuy S (2001) Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in

a marine teleost, the european sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). Biol
Reprod 64:382-389

Surai PF, Noble RC, Sparks NHC and Speake BK (2000) Effect of long-term
supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm
production in the broiler chicken. J Reprod Fert 120:257-264

Tinoco J (1982) Dietary requirements and functions of α -linolenic acid in
animals. Prog Lipid Res 21:1-45

Wilson EB (1883) The development of Renilla. Phil Trans R Soc Lond
B174:723-815

Table 1. Ranges of fatty acid percentages by weight of TFA (minimum-maximum) found in sea pansy over the year.

	% TFA weight n=3-6
SFA	30.0 - 32.9
16:0	16.1 - 17.7
17:0	2.2 - 3.0
18:0	8.0 - 9.5
19:0	0.7 - 1.3
20:0	1.0 - 2.3
22:0	0.3 - 0.7
MUFA	8.3 - 9.9
16:1 ω 7	1.6 - 2.3
18:1 ω 9	1.8 - 2.2
18:1 ω 7	3.3 - 4.2
20:1 ω 9	0.9 - 1.8
PUFA	57.7 - 61.0
18:2 ω 6	0.7 - 0.9
18:3 ω 6	0.9 - 2.1
18:3 ω 3	0.2 - 0.3
22:2 ω 6	0.7 - 1.3
20:4 ω 6	31.4 - 41.9
22:4 ω 6	2.8 - 4.7
20:5 ω 3	4.4 - 18.3
22:5 ω 3	1.0 - 1.9
22:6 ω 3	2.0 - 3.7
TL (mg/g dry weight)	21.8-38.9

TFA, total fatty acids; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

Table 2. Annual variations of the principal fatty acids of the sea pansy (mean percent \pm SEM). SFA, MUFA and PUFA were as defined in Table 1.

	Mar 2000 n=3 sexes combined	Aug 2000 n=3 sexes combined	Dec 2000 n=3 sexes combined	Feb 2001 n=3 sexes combined	Mar 2001 n=3 sexes separated n=6 sexes combined	Apr 2001 n=3 sexes separated n=6 sexes combined	May 2001 n=3 sexes separated n=6 sexes combined	Jun 2001 n=3 sexes separated n=6 sexes combined
16:0	16.7 ± 0.2	16.7 ± 0.2	16.5 ± 0.1	16.5 ± 1.2	15.6 ± 0.5 ♂ 18.1 ± 0.3	16.1 ± 0.1 ♂ 18.7 ± 0.3	15.1 ± 0.3 ♂ 20.2 ± 0.2	12.0 ± 0.1 ♂ 20.1 ± 0.1
18:0	8.2 ± 0.1	9.0 ± 0.0	8.6 ± 0.2	9.5 ± 0.3	♀ 8.7 ± 1.1 ♂ 9.6 ± 0.2	♀ 8.7 ± 1.2 ♂ 8.5 ± 0.0	♀ 7.1 ± 0.1 ♂ 8.9 ± 0.4	♀ 7.1 ± 0.0 ♂ 10.1 ± 0.1
20:4 ₀₆	41.9 ± 0.8	39.6 ± 0.2	44.2 ± 1.6	41.6 ± 1.3	♀ 40.0 ± 1.0 ♂ 36.3 ± 0.6	♀ 41.0 ± 1.0 ♂ 37.2 ± 0.3	♀ 37.3 ± 1.0 ♂ 25.5 ± 0.2	♀ 45.3 ± 0.4 ♂ 29.7 ± 0.3
22:2 ₀₆	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.0	♀ 1.5 ± 0.2 ♂ 0.9 ± 0.0	♀ 1.6 ± 0.3 ♂ 1.0 ± 0.0	♀ 0.9 ± 0.0 ♂ 0.6 ± 0.0	♀ 1.2 ± 0.0 ♂ 0.7 ± 0.0
22:4 ₀₆	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.0	4.3 ± 0.1	4.7 ± 0.1	♀ 4.0 ± 0.2 ♂ 4.4 ± 0.1	♀ 4.0 ± 0.1 ♂ 3.8 ± 0.0	♀ 2.9 ± 0.1 ♂ 2.6 ± 0.0	♀ 3.6 ± 0.0 ♂ 2.5 ± 0.0
20:5 ₀₃	7.5 ± 0.1	7.0 ± 0.1	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.1	♀ 6.5 ± 0.1 ♂ 7.6 ± 0.2	♀ 6.7 ± 0.2 ♂ 10.1 ± 0.1	♀ 15.1 ± 0.1 ♂ 21.5 ± 0.2	♀ 7.4 ± 0.1 ♂ 17.1 ± 0.0
22:5 ₀₃	1.2 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	♀ 1.4 ± 0.0 ♂ 1.2 ± 0.0	♀ 1.3 ± 0.0 ♂ 0.9 ± 0.0	♀ 2.2 ± 0.1 ♂ 1.5 ± 0.0	♀ 2.3 ± 0.0 ♂ 1.2 ± 0.0
22:6 ₀₃	2.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.1	♀ 3.4 ± 0.1 ♂ 3.5 ± 0.1	♀ 3.1 ± 0.1 ♂ 3.2 ± 0.0	♀ 3.4 ± 0.1 ♂ 3.9 ± 0.1	♀ 3.4 ± 0.1 ♂ 3.6 ± 0.0
SFA	30.7 ± 0.1	31.9 ± 0.3	38.0 ± 0.1	32.9 ± 1.1	♀ 30.4 ± 1.3 ♂ 34.4 ± 0.6	♀ 30.7 ± 1.3 ♂ 33.4 ± 0.4	♀ 26.5 ± 0.4 ♂ 33.4 ± 0.4	♀ 24.4 ± 0.1 ♂ 36.0 ± 0.2
MUFA	8.7 ± 0.3	9.6 ± 0.1	8.3 ± 0.9	9.4 ± 0.2	♀ 10.4 ± 0.1 ♂ 9.3 ± 0.2	♀ 9.4 ± 0.1 ♂ 8.2 ± 0.1	♀ 9.5 ± 0.7 ♂ 9.3 ± 0.1	♀ 10.1 ± 0.3 ♂ 7.5 ± 0.1
PUFA	60.6 ± 0.2	58.5 ± 0.3	59.6 ± 0.9	57.7 ± 1.3	♀ 59.2 ± 1.4 ♂ 56.3 ± 0.7	♀ 59.9 ± 1.2 ♂ 58.4 ± 0.4	♀ 64.0 ± 0.6 ♂ 57.3 ± 0.5	♀ 65.6 ± 0.3 ♂ 56.5 ± 0.2

Table 2

Table 3. Fatty acid compositions of somatic and reproductive tissues collected in April 2001 (mean percent \pm SEM).

FA	Eggs n=5	Spermatophores n=3	Autozooids n=3	Peduncle n=3
SFA	21.2 \pm 0.2	36.0 \pm 0.2	38.1 \pm 0.2	36.2 \pm 0.0
16:0	11.7 \pm 0.1	21.0 \pm 0.1	20.7 \pm 0.2	17.7 \pm 0.1
17:0	2.4 \pm 0.0	2.6 \pm 0.0	3.2 \pm 0.0	3.3 \pm 0.0
18:0	5.1 \pm 0.0	9.7 \pm 0.3	10.1 \pm 0.0	9.5 \pm 0.1
19:0	0.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0	1.6 \pm 0.0
20:0	1.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0	2.4 \pm 0.0	2.8 \pm 0.0
22:0	0.6 \pm 0.0	0.6 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0
MUFA	19.7 \pm 0.1	12.0 \pm 0.9	4.5 \pm 0.0	7.2 \pm 0.0
16:1 ω 7	4.4 \pm 0.1	2.8 \pm 0.4	0.5 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0
18:1 ω 9	5.6 \pm 0.0	2.9 \pm 0.4	0.7 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0
18:1 ω 7	7.4 \pm 0.0	4.6 \pm 0.1	1.7 \pm 0.0	2.8 \pm 0.0
20:1 ω 9	2.3 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	1.6 \pm 0.0	1.8 \pm 0.0
PUFA	59.2 \pm 0.3	52.0 \pm 0.9	57.4 \pm 0.2	56.6 \pm 0.0
18:2 ω 6	2.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
18:3 ω 6	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0
18:3 ω 3	0.9 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	ND	ND
22:2 ω 6	2.3 \pm 0.6	1.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0
20:4 ω 6	31.2 \pm 0.4	22.7 \pm 0.3	38.5 \pm 0.2	43.9 \pm 0.0
22:4 ω 6	2.8 \pm 0.6	2.2 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1	5.7 \pm 0.0
20:5 ω 3	9.2 \pm 0.4	17.2 \pm 2.0	10.4 \pm 0.1	2.0 \pm 0.0
22:5 ω 3	3.7 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
22:6 ω 3	6.5 \pm 0.2	4.8 \pm 0.5	1.8 \pm 0.0	2.0 \pm 0.0
TFA (mg/g dry weight)	47.1 \pm 3.4	38.5 \pm 0.9	18.9 \pm 2.1	5.3 \pm 0.0
ω6/ω3	1.9 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	3.5 \pm 0.0	11.5 \pm 0.1

ND, non-detected

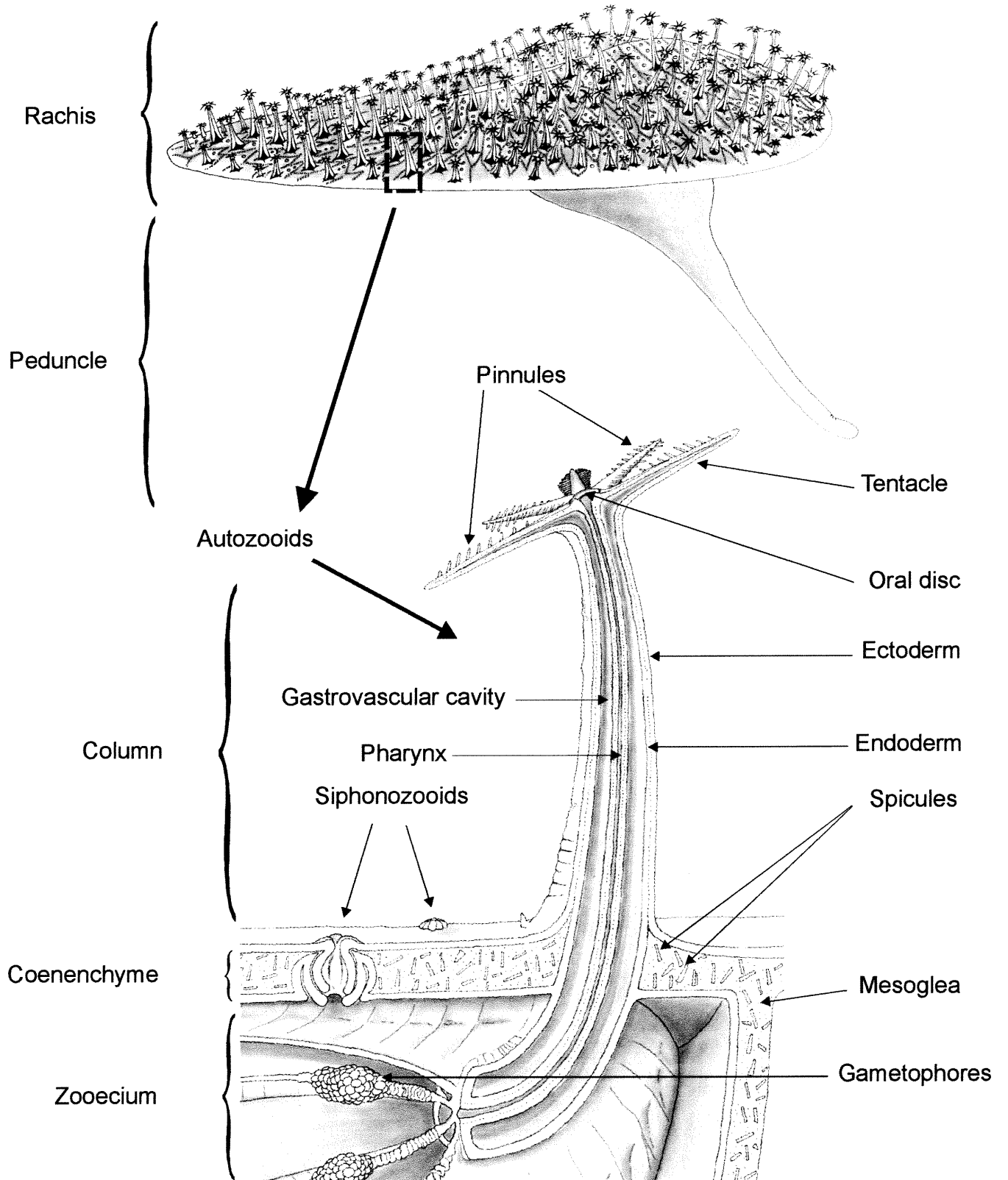


Fig. 1

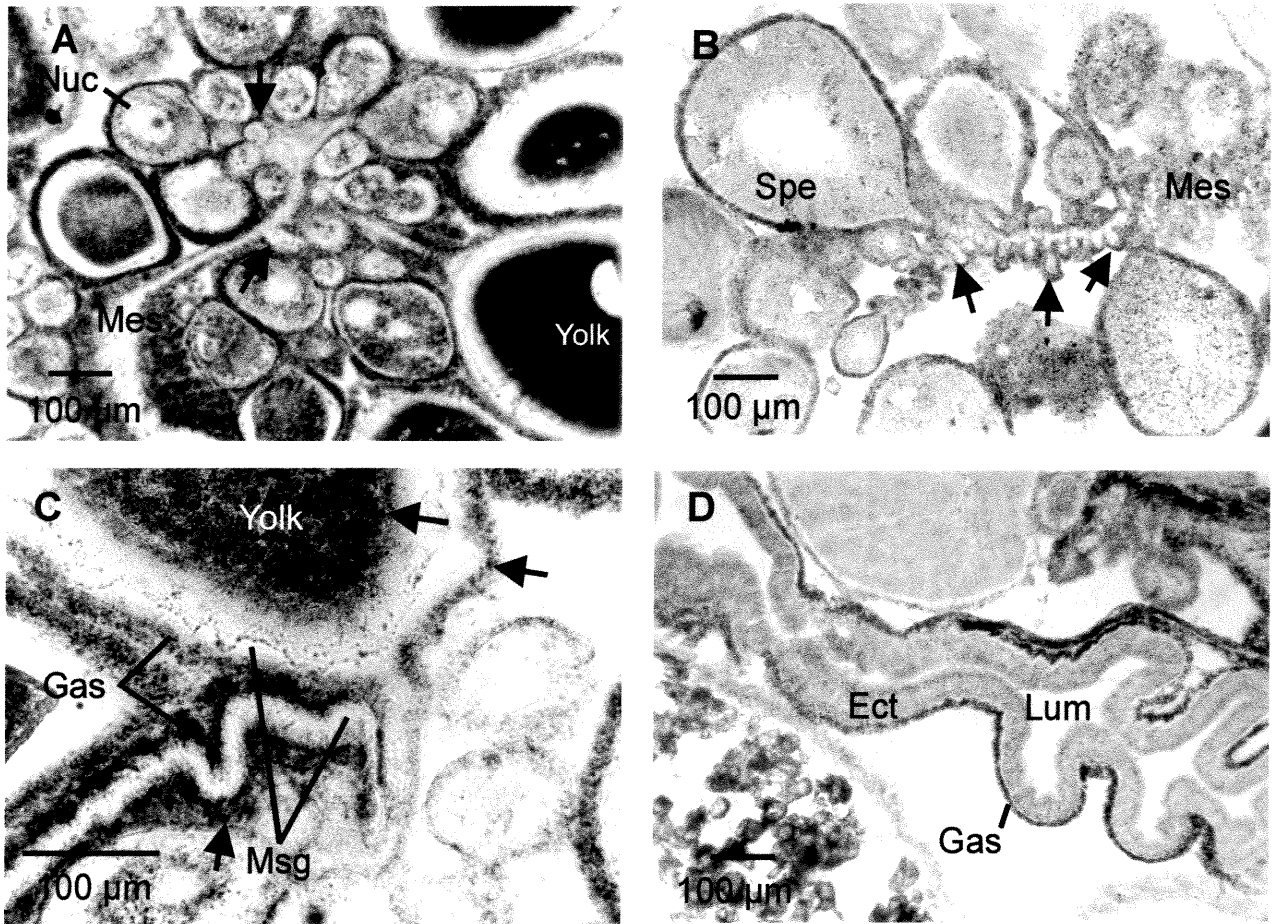


Fig. 2

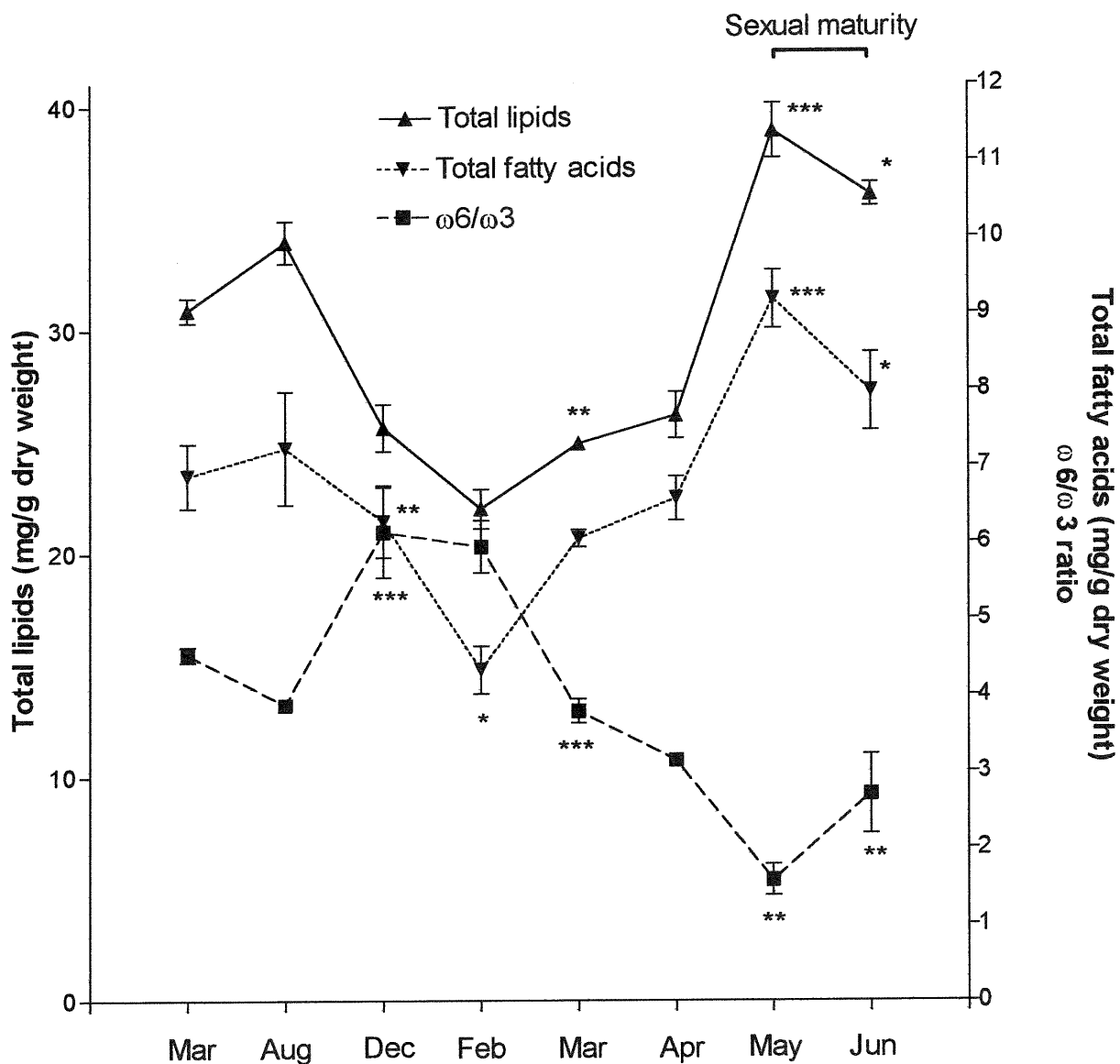


Fig. 3

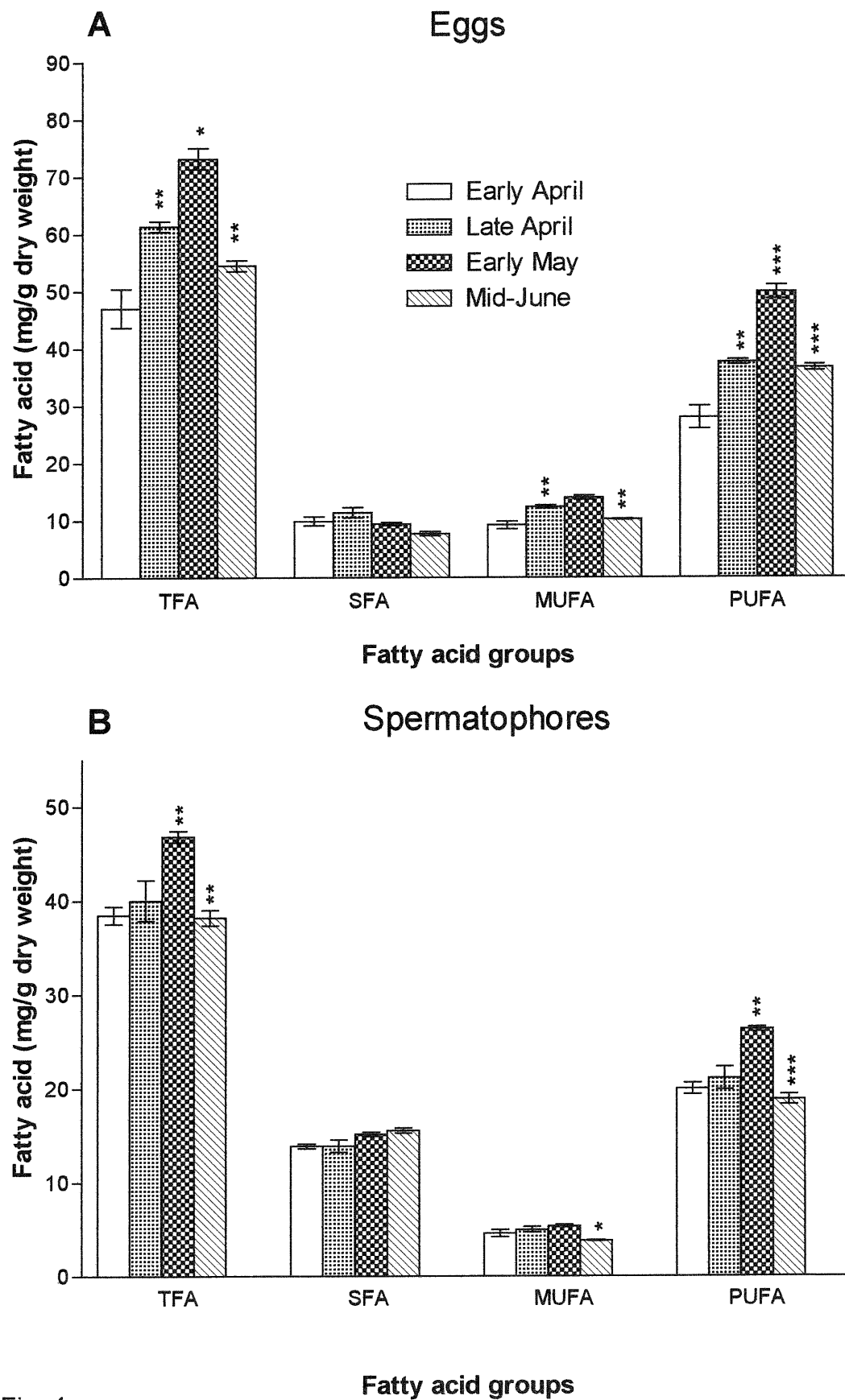


Fig. 4

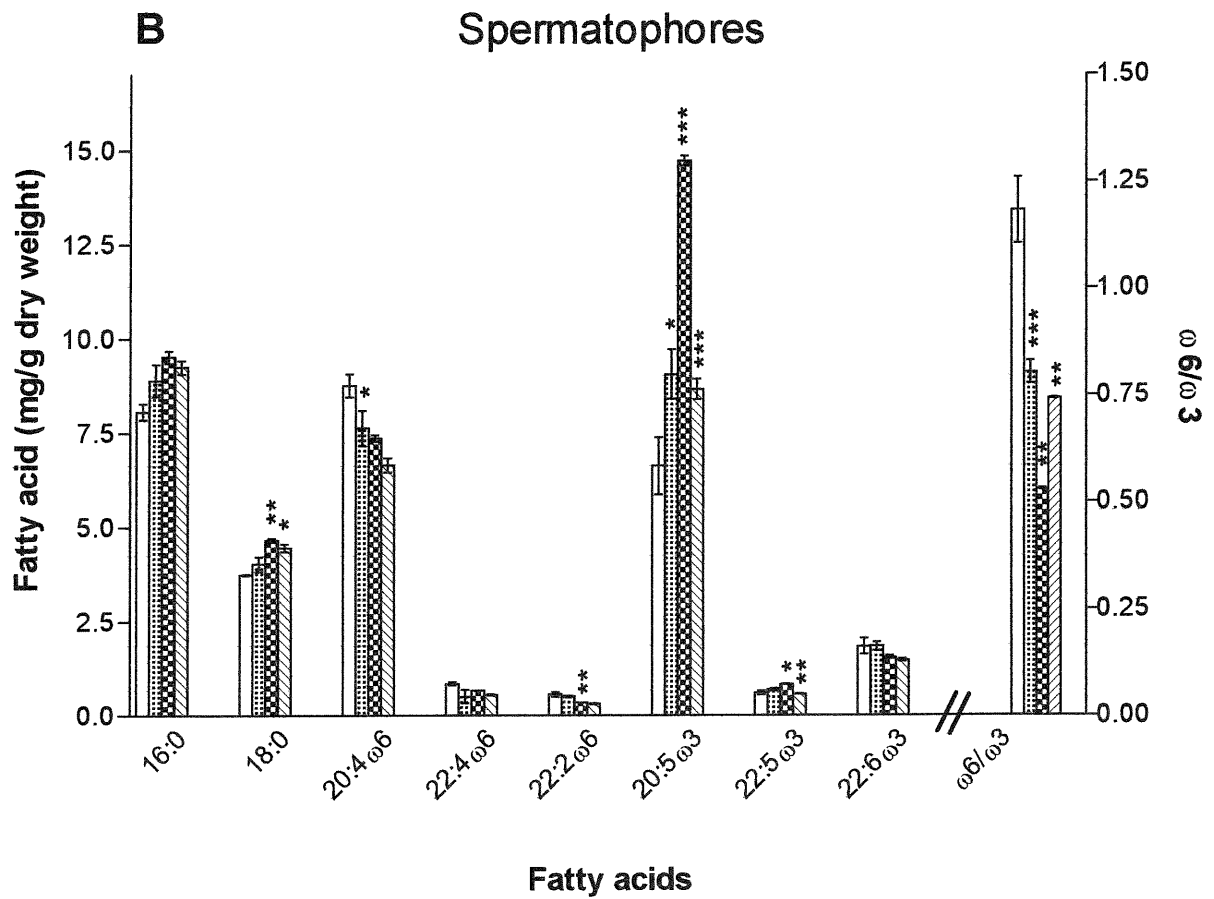
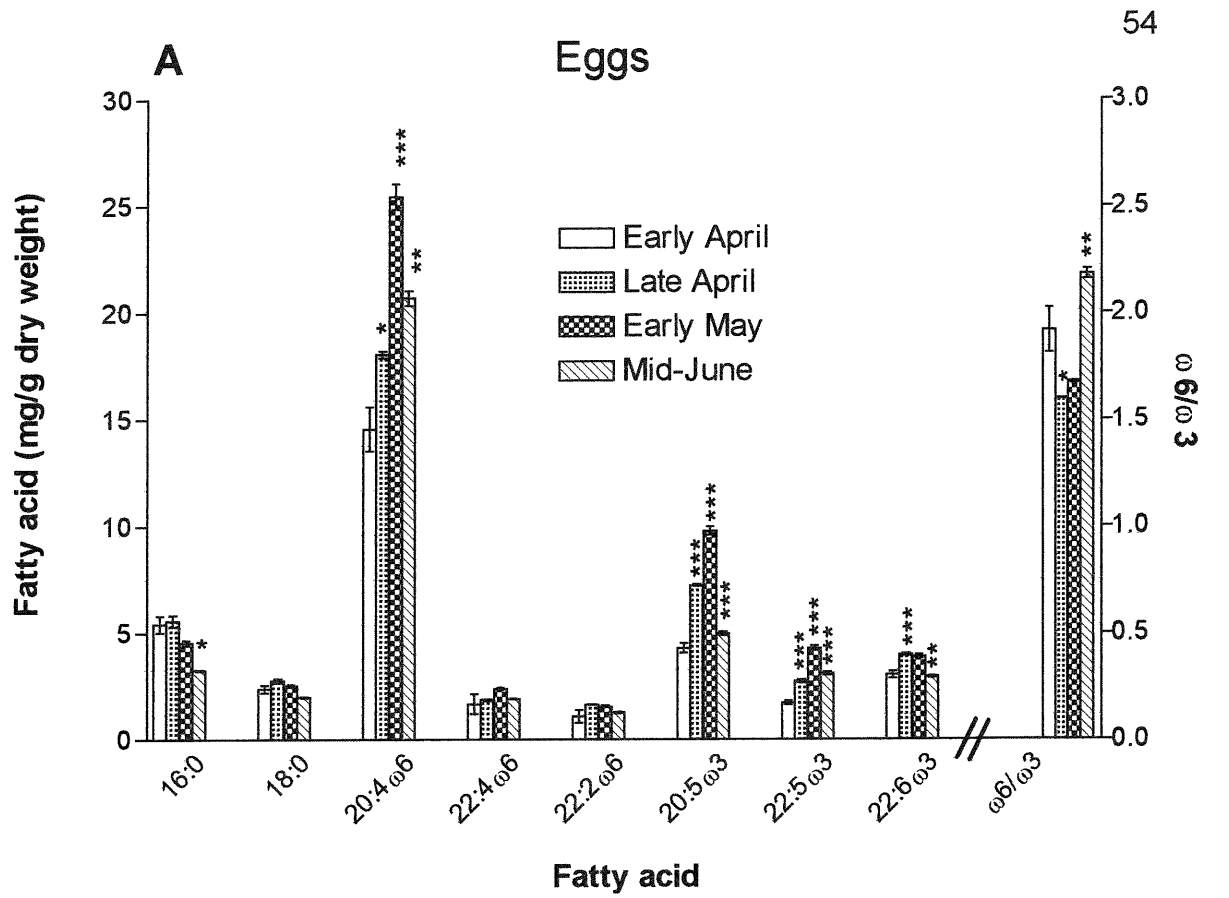


Fig. 5

Legends to figures

Fig. 1. Schematic representation of the colony of *Renilla koellikeri* (upper cartoon), and of the organisation of an individual chamber in section (B).

Fig. 2A-D. Sudan Black B lipid staining in histological sections of sea pansy rachis. (A-B) Female (A) and male (B) gametophores are organized in clusters showing different stages of ripeness in the mesoglea (Mes) of mesenteric filaments. Budding gametophores in the mesoglea are indicated by arrows. (C) Close-up of a female egg showing the granular aspect of lipid materials (arrows). (D) Retracted autozoid shown inside-out in the gastrovascular cavity of a zooecium. Ect, ectoderm; Gas, gastroderm; Lum, lumen; Msg, mesoglea; Nuc, nucleus; Spe, spermatophore.

Fig. 3. Annual variations of total lipids, total fatty acids and $\omega 6/\omega 3$ ratios in sea pansy colonies (mean \pm SEM, n=3 from March 2001 to February 2001 and n=6 for the remainder). Significant differences were determined month-to-month with ANOVA and Newman-Keuls tests (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

Fig. 4A-B. Variations in categories of fatty acids in eggs (A) and in spermatophores (B) during vitellogenesis (April and May 2001) and spawning season (June 2001) (mean \pm SEM). Significant differences were determined with ANOVA and Newman-Keuls tests by comparing each month with the previous one (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

Fig. 5A-B. Variations in major fatty acids in eggs (A) and spermatophores (B) during vitellogenesis (April and May 2001) and spawning season (June 2001) (mean \pm SEM). Significant differences were determined with ANOVA and Newman-Keuls tests by comparing each month with the previous one (*

$p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). ω_6/ω_3 ratio is shown to allow comparison with whole animal (Fig. 3).

2-Article 2 : Pernet V, and Anctil M (2001) Variations annuelles du 17 β -estradiol dans l'anthozoaire *Renilla koellikeri*. (en préparation) sera soumis à General and Comparative Endocrinology

Contribution de l'étudiant à l'article 2 : Idée originale de l'étude de l'estradiol-17 β de Michel Anctil. Mise au point du protocole expérimental, exécution des expériences, traitement des données par Vincent Pernet. Rédaction de l'article par Vincent Pernet sous la direction de Michel Anctil.

**“Annual variations and sex-related differences of estradiol-
17 β levels in the anthozoan *Renilla koellikeri*”**

By

Vincent Pernet , and Michel Anctil *

Département de sciences biologiques and Centre de recherche en sciences
neurologiques, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville,
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

* To whom correspondence should be addressed as above

Tel : (514)-343-7691

Fax : (514)-343-2293

E-mail : Michel.Anctil@umontreal.ca

Abstract

In the sea pansy *Renilla koellikeri*, estradiol-17 β (E₂) levels exhibited an annual pattern of secretion that correlated with the reproductive cycle, and displayed sex-specific and tissue-specific differences. The E₂ levels were low during the non-reproductive period extending from autumn to winter. A first rise of E₂ concentrations occurred in March when gonad maturation resumed, as indicated by an increase in lipid storage. This suggests that E₂ may influence the beginning of gonad maturation in the sea pansy. Estradiol-17 β returned to basal levels in April and May when lipids rose sharply. A second, more significant surge of E₂ levels occurred in June when spawning was initiated, and it was more marked in female than in male colonies. This suggests that E₂ may participate in synchronising of oocyte maturation around spawning time in order to optimise the probability of fertilisation. The higher E₂ levels in somatic tissues (peduncle and polyps) than in eggs during the March peak revealed a non-reproductive origin for E₂ and the need for transport of E₂ through the gastrovascular cavity to reach reproductive tissues. Further analyses are required to determine the relative contribution of E₂ to reproductive events and its pathway of synthesis in this colonial anthozoan.

Keywords : Estradiol-17 β , Anthozoan, Reproduction, Lipids, Enzyme immuno-assay

Introduction

Sex steroids are widespread in animals from unicellulars to mammals. In invertebrates such as echinoderms, molluscs and insects, these steroids are synthesised in reproductive tissues and secondary sexual organs (Sandor and Mehdi, 1979). It has been suggested that estrone (E_1), estradiol- 17β (E_2), and progesterone participate in the gametogenetic cycle of the starfish *Sclerasterias mollis* (Xu and Barker, 1990). Voogt and Dieleman (1984) found annual variations of steroid levels in males of *Asterias rubens* and observed sex differences relative to female steroid variations previously reported by Schoenmakers and Dieleman (1981). Several studies documented the ability of *Asterias rubens* to endogenously metabolise steroids (Schoenmakers, 1979; Schoenmakers and Voogt, 1980; Schoenmakers *et al.*, 1981; Schoenmakers and Voogt, 1981).

Although a great variety of steroids were initially reported in several cnidarian species (Kanazawa *et al.*, 1977) none of them was a sex steroid. Only recently have sex steroids been reported in cnidarians of the class Anthozoa class, namely the soft corals *Alcyonium paessleri*, *Clavularia frankliniana* (Slattery *et al.*, 1997), and *Sinularia polydactyla* (Slattery *et al.*, 1999), and the stony coral *Montipora verrucosa* (Atkinson and Atkinson, 1992; Tarrant *et al.*, 1999). Measurements of enzymatic activities have suggested that biosynthesis of sex steroids occurs endogenously in *A. paessleri* and in *C. frankliniana* (Slattery *et al.*, 1997). In addition, Tarrant *et al.* (1999) reported changes in oestrogen levels associated with the reproductive cycle of *M. verrucosa*. Slattery *et al.* (1999) have recently assessed sex-related differences in the pattern of variations of progesterone and testosterone in *S. polydactyla*. However, no study has compared oestrogen levels between somatic and reproductive tissues in any cnidarian. These findings may further strengthen the case for the involvement of sex steroids in cnidarian reproduction.

The sea pansy *Renilla koellikeri* is a dioecious octocorallian of the sea pen family in which it is possible to separate male from female colonies on the one hand, and somatic tissues from reproductive tissues on the other to obtain valuable information on handling of estrogens related to sex and tissue type. Spawning of the sea pansy occurs between early May and late July (Wilson, 1883, Satterlie and Case, 1979; personal observations). Gonadal tissues are atrophied during winter and grow prominent follicle clusters in colonial chambers during late spring and early summer (Mechawar and Anctil, 1997). The sea pansy accumulates lipids in gonadal tissues from March to May for vitellogenesis and gamete maturation (Pernet *et al.*, in preparation).

Although the neurohormonal basis of reproductive control is still unknown in cnidarians, several putative transmitters such as serotonin, melatonin, and antho-RFamide have been associated with neurons innervating the gametophores and the mesenteric filaments giving rise to the gametophores (Mechawar and Anctil, 1997; unpublished data). In addition, measurements of sea pansy melatonin levels showed a pattern of annual variations that was closely related to reproductive cycle. The presence of GnRH-like peptides and their immunoreactivity in neurons of the sea pansy, including neurons on gametophore-bearing mesenteric filaments (Anctil, 2000), suggested that a hormonal cascade somewhat analogous to the vertebrate hypothalamo-hypophysio-gonadal axis may exist in the sea pansy.

This prompted us to examine whether the major vertebrate oestrogen, E₂, is present in the sea pansy, and if so, whether this oestrogen displays variations in its levels that are related to season, sex and tissue type. This information may serve as a foundation to eventually elucidate the involvement of vertebrate-like hormones in cnidarian reproduction.

Material and methods

Maintenance

Renilla koellikeri sea pansies were purchased from Marinus Inc. (Long Beach, California, USA) and kept in artificial sea water (ASW, Instant Ocean). Osmolarity was adjusted to 1100 mOsm, temperature in accordance with annual variations in the natural habitat, and pH to 8. Upon arrival, specimens were maintained under a 12h:12h light:dark cycle and were unfed before being handled.

Sample preparation

Sea pansies were processed throughout the year to determine E_2 levels in whole animals. The sexes of colonies were identified and separated on the basis of inspection of gametophore morphology around the reproductive period from March to June, in order to determine whether E_2 variations were different between male and female animals. The animals were frozen in liquid nitrogen and lyophilised before being ground in a coffee grinder. The powdered samples were stored at -80°C until E_2 extraction.

Female gonad tissues, somatic autozooids and peduncle tissues were sampled during winter and in March. The animals were anaesthetised in MgCl_2 diluted 1:1 in ASW. Autozooids and peduncles were cut from the colony with scissors while eggs were collected by dissecting the rachis with a scalpel. The tissues were lyophilised as for whole animal, then ground with a mortar and stored at -80°C .

E_2 extraction

0.5-1 g of the powdered sample was extracted with 3 mL of diethyl ether in 10-mL screw-cap tubes. [2, 4, 6, 7- ^3H]estradiol (Amersham Pharmacia Biotech, Montreal, QC, TRK 322) was added in each tube to calculate the recovery of E_2

after the whole extraction. The tubes were vortexed for 10 min. The liquid phase was centrifuged for 10 min at 3000 rpm and the clear supernatant was transferred to a 10-mL screw-cap tube while the residue was re-extracted with 3 mL of diethyl ether and was then centrifuged. The two supernatants were pooled and dried under a gentle stream of nitrogen gas. The resulting dried extract appeared as a yellowish oil and was stored at -80°C until separation with chromatography Sephadex LH-20.

E₂ separation

The preparation of the Sephadex LH-20 column and the isolation of E₂ were undertaken according to Orczyk *et al.*, (1973). The Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech., Sweden, 17-0090-10) was swollen and stored in benzene:methanol (90:10). The column containing the slurry of Sephadex LH-20 was rinsed with 8 mL of eluting solvent (isooctane:benzene:methanol, 62:20:18). The dried extract was dissolved in 200 μl of eluting solvent and applied to the column, and the tube was rinsed with 100 μl of eluting solvent to complete the transfer.

The LH-20 column was calibrated by using [2,4,6,7-³H]estradiol prior to adding sea pansy extracts. Only fractions corresponding to E₂ were conserved. Elutions of the two other estrogens, estrone and estriol were not tested but were expected to have been discarded from the E₂ fraction (see Orczyk *et al.*, 1973). E₂ extract was dried and kept at -80°C until used for enzyme immunoassay (EIA).

E₂ assay

The E₂ levels were determined by EIA with an EIA kit (Assay Dessigns). In brief, the immuno-assay consisted of the competition between standards or unknown E₂ and estradiol-17 β attached to alkaline phosphatase, to bind to the polyclonal antibody to estradiol-17 β . The alkaline phosphatase bound to the antibody was allowed to catalyse the transformation of p-nitrophenyl phosphate

into a yellow product, the absorbance of which was measured at 405 nm (Microplate Auto-Reader, Bio-Tek, Instruments ; Power Wave X, Bio-Tek Instruments). Therefore, untagged E₂ from extract or standard proportionally decreased the absorbance intensity.

Calculations and validations of assays

Standard curves with known amounts of E₂ were plotted with GraphPad Prism software and unknown E₂ was calculated from the optic density values. Non-specific binding (NSB) of the samples was subtracted for E₂ calculations although it differed little from blank values throughout the yearlong assays. The recovery was estimated by counting the tritiated E₂ in the extract assessed. To achieve this, a small volume (100 µl) of the reconstituted aqueous sample was added to BCS scintillation cocktail (Amersham Pharmacia Biotech, Montréal, QC, NBCS 104) and counted in a beta counter. The mean recovery of E₂ was 81 %.

The EIA method was further validated by serial dilution of E₂ contained in sea pansy extracts. The E₂ found in sea pansy bound to the antibody similarly to E₂ used for standard curve (Fig. 1).

Significant changes of the E₂ level between monthly values was determined by Newman-Keuls ANOVA test. The E₂ levels between tissues were analysed by t-test.

Results

The relationship between colony weight and E_2 levels was investigated to determine whether E_2 abundance was correlated with colony size. The 21 animals sampled during the fall (October and November) did not show any significant correlation between E_2 levels and colony weight (Fig. 2).

E_2 was determined over 11 months in whole colonies and total lipid contents were obtained from the same samples because lipid changes appear to be reliable markers for sex maturation (Pernet *et al.*, in preparation). E_2 was detected in all colonies and was observed to fluctuate through the reproductive cycle (Fig. 3). The E_2 levels were low before the beginning of the sexual maturation processes as shown by the low lipid contents in February. The 4-7 fold elevation of E_2 over basal levels in March was correlated with the beginning of gonadal maturation as indicated by a small and gradual increase of lipid levels from March to April. The sharp rise of lipid contents between April and May occurred when E_2 levels dropped to their basal values. In contrast, a E_2 surge occurred in June, representing a 20-30 fold increase over basal values, while the lipid content was slightly decreased. The E_2 levels immediately returned to basal levels after the spawning period in August and remained low during autumn and winter months. Lipid contents steadily decreased from August to October, after the spawning period. The general decrease of lipid contents was likely due to the loss of lipid-rich gametophores during spawning (see Pernet *et al.*, in preparation).

The E_2 levels increased concurrently in both male and female colonies in March and in June (Table 1). However, the March rise was higher in male than in female colonies although the difference was not statistically significant, whereas the E_2 surge in June was significantly higher in female than in male colonies by a factor of 15.

The E₂ concentrations were measured in somatic tissues (autozoid polyps and peduncles) and in eggs. The levels of E₂ in eggs appeared twice higher than those of somatic tissues, although their difference was not significant during the winter period (Table 2). In contrast, March E₂ levels in somatic tissues appeared sharply higher than those of eggs although the significance of the difference could not be determined because of the small sample size. The apparent discrepancy of March values for somatic tissues between Table 2 and Fig. 3 (whole colonies) may be due to the abundance of skeletal material in the non-ash free dry weight powdered tissues, thus causing a dilution of E₂ levels expressed in dry weight. The polyp-bearing rachis of the colony included in whole colony samples contains a high proportion of calcareous spicules compared with autozooids in which no spicules occur at all and compared with peduncles in which spicules are less abundant than in the rachis.

Discussion

We wanted to know if E₂ levels experienced changes over the year and between sexes that were compatible with a possible involvement in reproductive control. We found a bimodal pattern of annual variation in E₂ levels, and this is the first report in a cnidarian of differences in E₂ levels between sexes as well as between somatic and gonadal tissues. The two significant rises of E₂ levels during critical periods of the reproductive cycle strongly suggest a role for E₂ in reproductive events.

Our range of detected E₂ levels from basal to a June maximum appears to be in the same order of magnitude as that of the soft corals *Alcyonium paessleri* and *Clavularia frankliniana* (Slattery *et al.*, 1997), but possibly below that of the soft coral *Sinularia polydactyla* where E₂ fluctuated between 5 and 19 ng/g wet weight, and that of the stony coral *M. verrucosa* where Tarrant *et al.* (1999) showed values up to 25 ng/g (ash free dry weight). Although it is difficult to

compare hormonal levels between species that were handled differently, the large variability of measured levels may partly be due to factors other than methodological. For instance, in the case of hard corals it may represent a concentration effect due to the smaller mass of soft tissue relative to calcareous skeleton than in soft corals. Alternatively, there may be interspecific differences in steroid biosynthetic activity or in steroid storage capability.

The two rises of E₂ levels in March and June occur at critical moments of the sea pansy reproductive cycle: the onsets of sexual maturation and of the spawning period. The rise of E₂ levels in March coincides with the rise of lipid levels in the colony (Fig. 3). Mechawar and Anctil (1997) reported that sexual maturation was initiated in April based on the increase of mature gametophores in the sea pansy at that time. Schoenmakers *et al.* (1981) showed that E₂ stimulated protein synthesis in the ovaries of the starfish *Asterias rubens*. E₂ could stimulate gonadal growth in the sea pansy through actions on protein and lipid metabolism. The sea pansy E₂ levels returned to basal levels in April and May when lipid storage was accelerated. Similarly, Xu and Barker (1990) noted in the starfish *Sclerasterias mollis* that a rise in E₂ levels preceded the onset of gametogenesis but also that those levels quickly returned to basal values. This suggests that a surge secretion of E₂ may participate in the initiation of the gametogenetic cycle in the sea pansy. In contrast, progesterone and testosterone rather than E₂ variations in *Sinularia polydactyla* were correlated with reproduction (Slattery *et al.*, 1999)

The second and greater rise of sea pansy E₂ levels in June coincides with the spawning period (Fig. 3). This rise was strikingly higher in female than in male colonies (Table 1). Similar sex-related differences in the pattern of secretion of E₁ and progesterone were noted in the starfish *A. rubens* (Schoenmakers and Dieleman, 1981; Voogt and Dieleman, 1984). In the soft coral *Sinularia polydactyla*, Slattery *et al.* (1999) also reported sex-related differences in progesterone and testosterone variations, but not in those of E₂. The June surge

in sea pansy females may be involved in accelerating egg maturation to synchronise spawning. Sea pansy oocytes accumulate large amounts of fatty acids in the month preceding spawning (Pernet *et al.*, in preparation). Vitellogenesis is critical to the sea pansy because oocytes need to contain sufficient lipid reserves at maturity to support larval development (Satterlie and Case, 1979). However, gametogenesis appears to be relatively asynchronous in the sea pansy, as well as in soft corals (Farrant, 1986 ; Benayahu, 1991, Cordes *et al.*, 2001; Ben-David-Zaslow *et al.*, 1999). This is supported by reports of the presence of mesenteric filaments bearing gametophores at various stages of development in the sea pansy (Wilson, 1883 ; Lyke, 1965 ; Pernet *et al.*, in preparation), thus suggesting that gametophore maturation occurs in several successive waves within the same gonad tissue throughout the reproductive season. Nevertheless, spawning episodes being more concentrated in June, gametophore maturation may reach a measure of synchrony at that period, and the observed surge of E_2 levels may contribute to this synchrony. This interpretation does not exclude the involvement of other factors such as terpenoid metabolites or unsaturated fatty acid alcohols which were reported to act as sperm chemoattractants or as egg release stimulants in soft corals (Pass *et al.*, 1989 ; Coll *et al.*, 1994 ; Coll *et al.*, 1995). These pheromone-like actions have not yet been reported in the sea pansy.

Although somatic tissues in the sea pansy contained higher E_2 levels than female gametophores in March (Table 2), it does not follow that E_2 has no role in sexual development at that time. It is possible that somatic tissues produce steroids that are subsequently transported to the gonad tissues. In starfish pyloric caeca contain higher levels of progesterone than the ovaries and testes (Schoenmakers and Dieleman, 1981 ; Voogt and Dieleman, 1984). Similarly Xu and Barker (1990) have reported higher levels of E_2 , E_1 and progesterone in pyloric caeca of the starfish *Sclerasterias mollis* than in ovaries. These authors proposed that these sex steroids may be transported to the ovaries during oogenesis. It is difficult to envisage a transport mechanism for steroids in the

sea pansy in which the gastrovascular canals hardly meet the criteria for efficient circulatory hormonal transport (Lyke, 1965). However, Slattery *et al.* (1999) have showed that E₂ could be measured at high levels in the vicinity of female colony just prior to spawning. In addition, Tarrant *et al.* (2001) demonstrated the capacity of corals to incorporate E₁ from the water column. This suggests that the gastrovascular cavity linking colonial chambers and peduncle (Parker, 1920) may serve as a medium for steroid transport in the sea pansy.

The presence of E₂ in cnidarians is significant for our eventual understanding of the evolution of hormonal systems. The endogenous metabolism of steroids has been examined in soft corals (Slattery *et al.*, 1997). To gain a better understanding of the hormonal system of the sea pansy related to sex steroids, a screening of the various sex steroids should be undertaken as well as their potential actions on such activities as protein synthesis, cell division and differentiation, and lipid absorption by cnidarian tissues.

Acknowledgements

We thank Gaetan Thibault for allowing us to use his plate reader and Sandrine Joly for her technical assistance in EIA experiments. This work was supported by grants from NSERC of Canada and FCAR-Quebec to M. A.

References

- Anctil M (2000) Evidence for gonadotropin-releasing hormone-like peptides in a cnidarian nervous system. *Gen Comp Endocrinol* 119: 317-328
- Atkinson S, Atkinson MJ (1992) Detection of estradiol-17 β during a mass coral spawn. *Coral reefs* 11: 33-35

- Ben-David-Zaslow R, Henning G, Hofmann DK, Benayahu Y (1999) Reproduction in the Red Sea soft coral *Heteroxenia fuscescens*: seasonality and long-term record (1991 to 1997). *Mar Biol* 133: 553-559
- Benayahu Y (1991) Reproduction and developmental pathways of Red Sea Xeniidae (Octocorallia, Alcyonacea). *Hydrobiologia* 216/217: 125-130
- Coll JC, Bowden BF, Meehan GV, König GM, Carroll AR, Tapiolas DM, Aliño PM, Heaton A, De Nys R, Leone PA, Maida M, Aceret TL, Willis RH, Babcock RC, Willis BL, Florian Z, Clayton MN, Miller RL (1994) Chemical aspects of mass spawning in corals. I. Sperm-attractant molecules in the eggs in the scleratinian coral *Montipora digitata*. *Mar Biol* 118: 177-182
- Coll JC, Leone PA, Bowden BF, Carroll AR, König GM, Heaton A, De Nys R, Maida M, Aliño PM, Willis RH, Babcock RC, Florian Z, Clayton MN, Miller RL, Alderslade PN (1995) II. (-)-Epi-thunbergol, the sperm attractant in the eggs of the soft coral *Lobophytum crassum* (Cnidaria: Octocorallia). *Mar Biol* 123: 137-143
- Cordes EE, Nybakken JW, VanDykhuisen G (2001) Reproduction and growth of *Anthomastus ritteri* (Octocorallia: Alcyonacea) from Monterey Bay, California, USA. *Mar Biol* 138: 491-501
- Farrant PA (1986) Gonad development and the planulae of the temperate Australian soft coral *Capnella gaboensis*. *Mar Biol* 92: 381-392
- Kanazawa A, Teshima S-I and Ando T (1977) Sterols of coelenterates. *Comp Biochem Physiol* 57B: 317-323

- Lyke EB (1965) The histology of sea pansies, *Renilla reniformis* (Pallas) and *Renilla koellikeri* (Pfeffer) with a note on the fine structure of the latter species. Ph.D. thesis, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin
- Mechawar N and Anctil M (1997) Melatonin in a primitive metazoan: seasonal changes of levels and immunohistochemical visualization in neurons. *J Comp Neurol* 387: 243-254
- Parker GH (1920) Activities of colonial animals. I. Circulation of water in *Renilla*. *J Exp Zool* 31: 343-365
- Pass MA, Capra MF, Carlisle CH, Lawn I, Coll JC (1989) Stimulation of contractions in the polyps of the soft coral *Xenia elongata* by compounds extracted from other alcyonacean soft corals. *Comp Biochem Physiol* 94-C: 677-681
- Pernet V, Gavino V, Gavino G, Anctil M (2001) Variations of lipid and fatty acid contents during the reproductive cycle of the anthozoan *Renilla koellikeri* (in preparation)
- Sandor T and Mehdi AZ (1979) Steroids and evolution. In: Barrington EJW (ed) *Hormones and evolution, volume I*. Academic Press, New York San Francisco London, pp 1-72
- Satterlie RA and Case JF (1979) Development of bioluminescence and other effector responses in the pennatulid coelenterate *Renilla koellikeri*. *Biol Bull* 157: 506-523
- Schoenmakers HJN (1979) *In vitro* biosynthesis of steroids from cholesterol by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Gen Comp Endocrinol* 63B: 179-184

- Schoenmakers HJN and Voogt PA (1980) *In vitro* biosynthesis of steroids from progesterone by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. Gen Comp Endocrinol 41: 408-416
- Schoenmakers HJN and Dieleman SJ (1981) Progesterone and estrone levels in the ovaries, pyloric caeca, and perivisceral fluid during the annual reproductive cycle of starfish, *Asterias rubens*. Gen Comp Endocrinol 43: 63-70
- Schoenmakers HJN and Voogt PA (1981) *In vitro* biosynthesis of steroids from androstenedione by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. Gen Comp Endocrinol 45: 242-248
- Schoenmakers HJN, Bohemen CGV, Dieleman SJ (1981) Effects of oestradiol-17 β on the ovaries of the star fish *Asterias rubens*. Dev Growth Differ 23: 125-135
- Slattery M, Hines GA, Watts SA (1997) Steroid metabolism in Antarctic soft corals. Polar Biol 18: 76-82
- Slattery M, Hines GA, Starmer J, Paul VJ (1999) Chemical signals in gametogenesis, spawning, and larval settlement and defends of the soft coral *Sinularia polydactyla*. Coral Reefs 18: 75-84
- Tarrant AM, Atkinson S, Atkinson MJ (1999) Estrone and estradiol-17 β concentration in tissue of the scleratinian coral, *Montipora verrucosa*. Comp Biochem Physiol 122A: 85-92
- Tarrant AM, Atkinson MJ, Atkinson S (2001) Uptake of estrone from the water column by a coral community. Mar Biol 139: 321-325

Voogt PA and Dieleman SJ (1984) Progesterone and oestrone levels in the gonads and pyloric caeca of the male sea star *Asterias rubens*: a comparison with the corresponding levels in the female sea star. *Comp Biochem Physiol* 79A: 635-639

Wilson EB (1883) The development of *Renilla*. *Phil Trans R Soc Lond B* 174: 723-815

Xu RA and Barker MF (1990) Annual changes in the steroid levels in the ovaries and the pyloric caeca of *Sclerasterias mollis* (echinodermata:asteroidea) during the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol* 95A: 127-133

Table 1. Comparison of E₂ levels as means \pm SEM (N) between male and female colonies around the reproductive period.

	Female colony (pg/g dry weight)	Male colony (pg/g dry weight)
March	578.3 \pm 94.9 (3)	930.9 \pm 89.6 (2)
April	122.5 \pm 14.8 (4)	97.9 \pm 14.9 (4)
May	95.1 \pm 9.8 (5)	87.7 \pm 11.3 (4)
June	6347.2 \pm 2735.5 (3) *	436.5 \pm 46.0 (3) *

* Only June values were significantly different between the two sexes as determined by t-test (P=0.0003).

Table 2. Comparison of E₂ levels as mean ± SEM (N) in eggs and in somatic tissues in winter (from November to February) and during the March increase.

	Eggs (pg/g dry weight)	Autozooids (pg/g dry weight)	Peduncle (pg/g dry weight)
Winter	419.4 ± 48.5 (4)	215.5 ± 23.2 (4)	215.8 ± 39.7 (5)
March	339.5 (1)	1161.2 (1)	807.8 ± 41.0 (2)

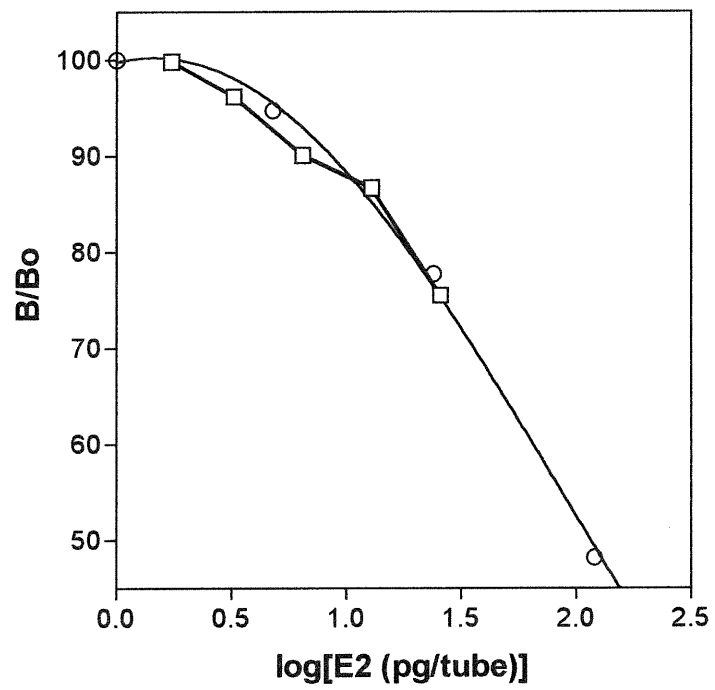


Fig. 1

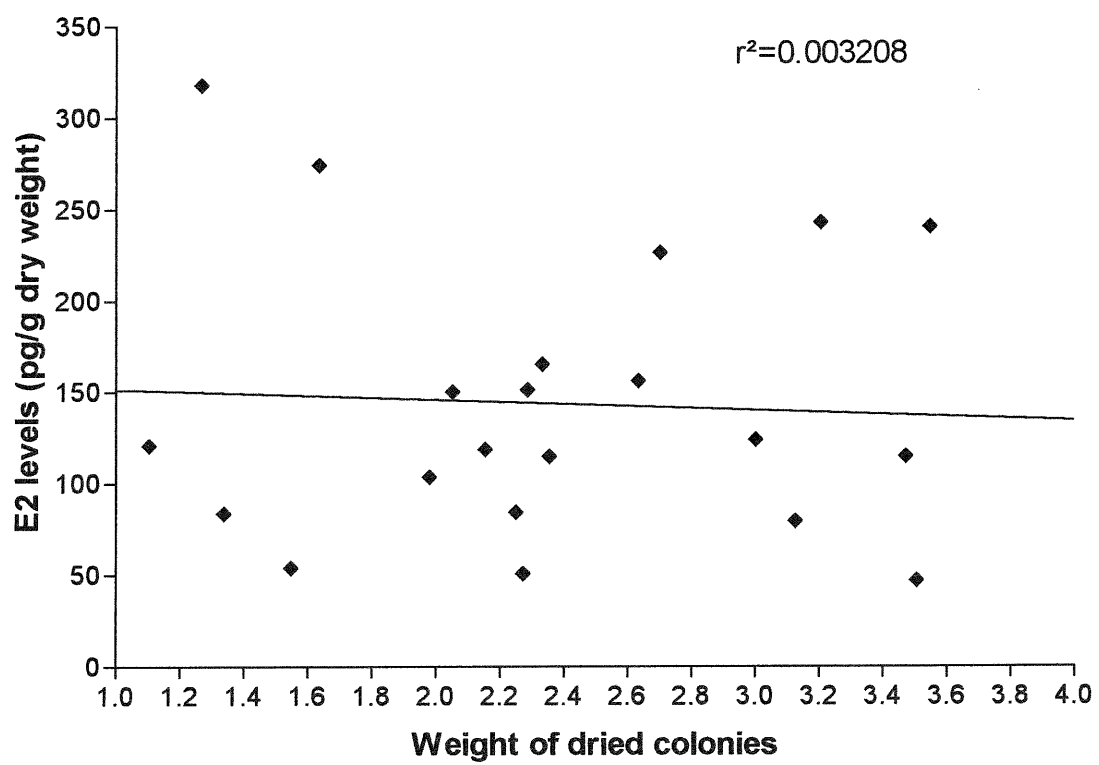


Fig. 2

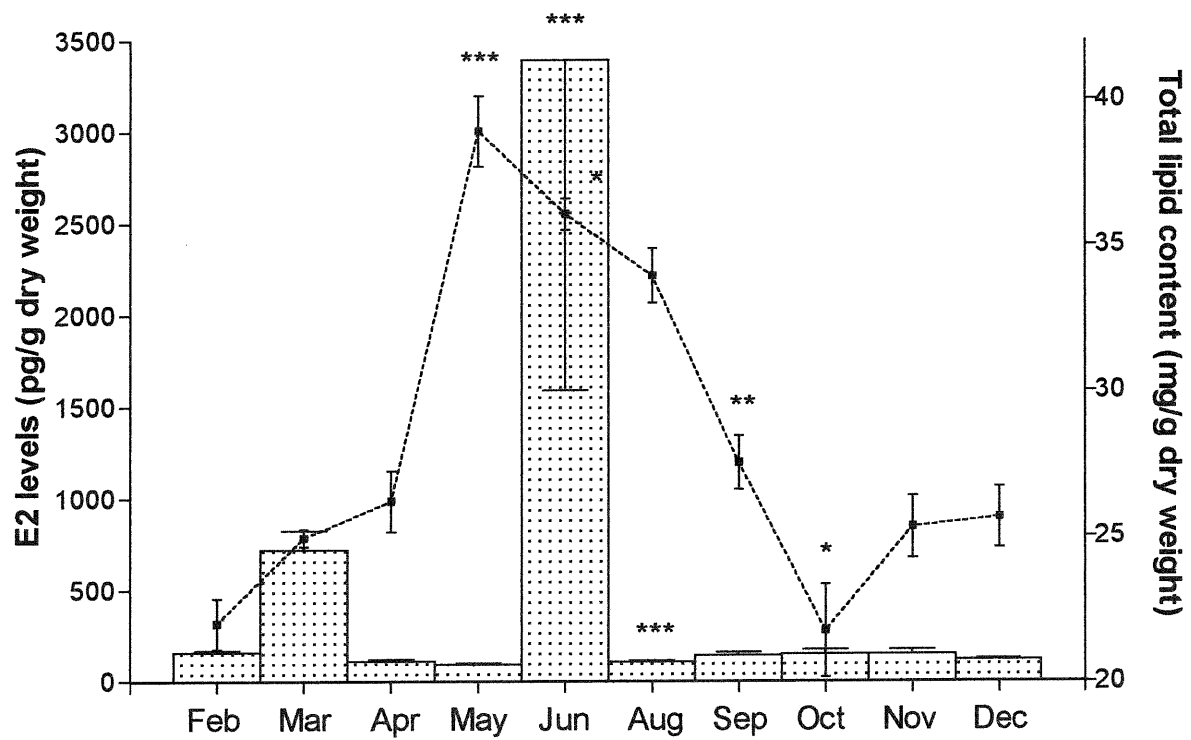


Fig. 3

Legends

Fig. 1. EIA competition curves showing similar reactivity of serially diluted E₂ from sea pansy extract (open squares) and standard E₂ (open circles) to the antibody to E₂. The B/Bo ratio represents the signal intensity in absence of unlabeled E₂ (Bo) and in presence of various levels of unlabeled E₂ from standard or extracts.

Fig. 2. Relationship between the dry weight of colonies and E₂ levels (data collected from October and November specimens).

Fig. 3: Histogram illustrating seasonal variations of E₂ levels (means ± SEM, N = 5-11) in sea pansy colonies relative to variations of total lipid content illustrated by dotted line. Significant differences were determined with ANOVA and Newman-Keuls tests by comparing each month with the previous one (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001). Lipid values derived from data by Pernet *et al.* (in preparation).

Discussion et conclusion générales du mémoire

Pour la première fois l'analyse des lipides à été employée chez un anthozoaire (coraux et anémones de mer) pour étudier son cycle reproducteur. Les fluctuations de lipides totaux dans les colonies semblent dues au développement sexuel car les lipides se concentrent dans les gonades. Tarrant *et al.* (1999) se sont fiés aux variations du taux de protéines dans les tissus coloniaux pour suivre le développement reproducteur de coraux durs, mais nous pensons que c'est inapproprié. En effet, un besoin de synthèse protéique accru peut venir de la croissance des tissus reproducteurs mais aussi somatiques comme lors du bourgeonnement clonal de la colonie. En revanche le niveau de protéine mesuré directement dans le tissu reproducteur peut également être une bonne référence pour la maturation. L'avantage de l'étude des lipides, tel que rapporté chez la pensée de mer, est de renseigner sur l'état de maturité de l'animal entier, ce qui est d'autant plus important pour un anthozoaire colonial où les chambres des individus ne semblent pas toutes au même degré de développement sexuel.

Chez la pensée de mer, le niveau de lipides totaux est assez stable pendant l'hiver et augmente d'abord lentement à partir de février (22 mg/g poids sec), puis très rapidement entre avril (26 mg/g poids sec) et mai (39 mg/g poids sec) juste avant que ne débute la période de ponte. De plus, l'augmentation d'acides gras dans les gonades, et plus particulièrement les ovocytes, était très grande au cours du mois d'avril. Donc, la maturation sexuelle semble commencer à partir du mois de mars et devient plus rapide au mois d'avril, juste avant la période de la ponte initiée dans le courant du mois de mai. Une fois la période de ponte passée, entre août et octobre, le niveau de lipides totaux rejoint régulièrement son niveau de base. En outre, la baisse des taux de lipides à partir de juin n'est pas le reflet d'un arrêt de la maturation sexuelle. La chute de lipides en septembre et octobre est plus

certainement causée par l'arrêt de la gamétogénèse. Les filaments mésentériques qui ont été observés à cette période, ne portaient que des grappes de gamétophores de taille très réduite, ou même en étaient complètement dépourvus.

La ponte et la maturation sexuelle des coraux doivent être synchronisées pour que la fertilisation soit rendue possible dans le milieu marin. La pensée de mer, bien que présentée avec un certain degré d'asynchronie dans le développement de ses gonades (Wilson, 1883; Lyke, 1965; observations personnelles), semble avoir une reproduction saisonnière. Plusieurs autres coraux mous présentent des maturations sexuelles en apparence asynchrones (Farrant, 1986; Kruger *et al.*, 1998) et pour certains même, la production de gamètes est continue tout au long de l'année (Benayahu, 1991; Cordes *et al.*, 2001). Si la maturation des gamètes était aussi désorganisée, la fertilisation serait très peu efficace et serait un véritable gâchis énergétique. En règle générale, même si la synchronisation de la maturation des gamètes n'est pas parfaite, plusieurs coraux montrent une plus grande activité reproductrice à un moment précis de l'année. De plus, les pontes multiples sont aussi un avantage pour se prémunir d'imprévisibles conditions défavorables à la fécondation (Richmond et Hunter, 1990). Pour synchroniser la maturation et la libération des gamètes dans le milieu marin, plusieurs stratégies sont employées.

La plupart du temps, des changements environnementaux (température, photopériode, influence lunaire, marées, nourriture) semblent être corrélés avec les événements de la reproduction (Richmond et Hunter, 1990). Chez la pensée de mer, nous avons proposé que la disponibilité en nourriture dans le milieu (phytoplancton et débris organiques) et l'activité photopériodique des zooxanthelles pouvaient être les causes des variations annuelles des lipides. De façon similaire, Ben-David-Zaslow *et al.* (1999) ont suggéré que les variations saisonnières de la reproduction du corail mou

Heteroxenia fuscescens pourraient dépendre de la production de nutriments dans le milieu. Nous pensons donc que l'abondance de nourriture peut être envisagée comme un facteur qui contrôle le développement sexuel de la pensée de mer. Pour s'en assurer, il faudrait déterminer la période d'expansion du plancton nourricier dans l'entourage de la pensée de mer, et rechercher un lien avec par exemple la reprise de la gamétogénèse de mars. Les acides gras pourraient également servir à établir une corrélation entre la production de certains acides gras, tels que l'EPA, dans la nourriture (algues unicellulaires, phytodétritus, etc) avec leur accumulation dans les tissus de la pensée de mer. Néanmoins, la disponibilité des nutriments ne constitue pas un régulateur assez fin pour synchroniser la maturation d'un grand nombre de gonades vers la ponte. Richmond et Hunter (1990) évoquent la température comme étant un indicateur saisonnier du développement des gamètes alors que le cycle lunaire serait un régulateur plus fin de la ponte par exemple. Chez la pensée de mer, Wilson (1883) avait remarqué que la ponte se produisait à heure fixe (six heures du matin). Nous n'avons pas constaté d'heure régulière pour la ponte, mais cela peut être dû au décalage horaire ou aux conditionnement des animaux dans l'aquarium (densité des animaux, photopériode, etc). Par ailleurs, Mechawar et Anctil (1997) ont constaté que la mélatonine, une hormone importante dans les rythmes biologiques des vertébrés, affichait des variations saisonnières en relation avec le cycle sexuel de la pensée de mer. L'élévation de mélatonine entre le mois d'avril et de juin, pourrait déclencher la maturation des tissus reproducteurs. Il n'est pas exclu que des facteurs environnementaux, comme la photopériode, entraînent des modifications de sécrétions hormonales, directement impliquées dans les changements physiologiques. Malgré l'absence de cellules photoréceptrices, la sensibilité des anthozoaires à la lumière pourrait être fondée sur des protéines du type de la rhodopsine (Musio *et al.*, 2001).

Chez les coraux mous, de nombreuses substances chimiques de la famille des diterpènes sont utilisées comme moyens de défense, ou lors de la

reproduction (Sammarco et Coll, 1992). Par exemple, on a démontré que certaines molécules terpénoïdes avaient un rôle chimioattracteur sur le sperme (Coll *et al.*, 1994; Coll *et al.*, 1995). En outre, la présence d'estrogènes chez les coraux, ainsi que leur patron de variations saisonnières indiquent que les stéroïdes sexuels pourrait diriger la reproduction (Atkinson et Atkinson, 1992; Slattery *et al.*, 1997, 1999; Tarrant *et al.*, 1999). La brutale augmentation d'E₂ chez la pensée de mer pourrait être un facteur qui synchronise la maturation sexuelle autour de la période de ponte. Chez *Sinularia polydactyla*, la libération d'E₂ par les coraux femelles juste avant la ponte et sa diffusion dans le milieu marin, suggèrent que le rôle d'E₂ pourrait être semblable à celui d'une phéromone (Slattery *et al.*, 1999). D'autre part, Tarrant *et al.* (2001) ont récemment montré que les coraux pouvaient absorber l'E₁ se trouvant dans le milieu ambiant (colonne d'eau). Donc, chez la pensée de mer, E₂ pourrait activer de façon endogène la croissance sexuelle des femelles (et des mâles?), et être un signal de communication entre les colonies pour coordonner la reproduction. Mais à ce stade, nous disposons de plus d'informations sur les hormones chez la pensée de mer pour envisager le contrôle endogène du développement sexuel. Par ailleurs, si la fécondation se déroulait dans les colonies femelles par l'intrusion des spermatozoïdes à travers les siphonozoïdes, comme l'ont rapporté Satterlie et Case (1979), la régulation de la maturation des ovocytes serait le processus prévalent pour la fertilisation devant le phénomène de ponte.

La détection d'estradiol-17 β ajoute une nouvelle famille d'hormones reproductrices chez la pensée de mer: les stéroïdes sexuels. Les données réunies sur les hormones chez la pensée de mer soutiennent qu'un système neuroendocrinien ressemblant à celui des vertébrés pourrait être apparu chez les cnidaires. Anctil (2000) a découvert la présence de deux formes de GnRH chez la pensée de mer et a montré des effets stimulateurs de ces peptides et du LHRH (GnRH mammalien) sur les contractions musculaires. Pour essayer de mieux comprendre les interactions qui pourraient exister entre GnRH et E₂,

nous avons exposé des pensée de mer au LHRH et nous avons dosé la concentration d'E₂ (voir annexe). En décembre, nous avons constaté un effet stimulateur du LHRH sur la libération d'E₂. Malheureusement, cette expérience reproduite en mars n'a pas confirmé l'influence du LHRH sur la sécrétion d'E₂. Nous pensons que la différence d'effet du LHRH peut être dû à la sensibilité des tissus au LHRH (expression des récepteurs) variable selon la saison. Ces résultats restent encourageants et doivent être poussés plus loin pour établir les relations entre LHRH, estrogènes et mélatonine.

L'augmentation de la concentration d'E₂ en mars et au mois de juin n'est pas directement corrélée avec l'augmentation de lipides et d'acides gras entre mars et mai. Cependant, nous n'avons pas recherché la présence d'estrone (E₁) qui pourrait être impliquée dans le développement sexuel de la rênille telle que cela a été suggéré chez le corail dur *Montipora verrucosa* (Tarrant *et al.*, 1999). Le mieux serait encore d'établir un profil des stéroïdes sexuels présents chez la pensée de mer par HPLC et chromatographie en phase gazeuse pour considérer d'autres stéroïdes comme la testostérone et la progestérone. Par ailleurs, l'étude sur les acides gras a fait apparaître de nouvelles questions sur la régulation hormonale du développement sexuel de la pensée de mer.

Bien que les mâles et les femelles accèdent à priori aux mêmes ressources lipidiques (zooxanthelles et nourriture), la quantité d'acides gras totaux est plus élevée dans les follicules femelles que dans les follicules mâles, et les acides gras ne s'accumulent pas de la même façon dans les deux types de gonades. Les acides gras peuvent sélectivement se retrouver dans les gonades de deux façons, qui du reste ne s'excluent pas mutuellement : l'absorption des lipides est très sélective à certains acides gras tels que l'AA et l'EPA, et/ou il existe dans l'animal des voies de transformation des acides gras absorbés en acides gras "utiles". Latyshev *et al.* (1991) ont proposé que l'accumulation de certains acides gras ω 3 pouvait être liée à

l'activité d'enzymes désaturantes chez les coraux de récifs. En envisageant cette possibilité chez la pensée de mer, l'abondance d'AA et d'EPA pourrait être due à l'activité de l'enzyme désaturante $\Delta 5$ qui les métabolise habituellement à partir de 20:3 ω 6 et de 20:4 ω 3 respectivement. L'hypothèse d'un métabolisme orienté vers la production d'AA et d'EPA pourrait être vérifiée en suivant le devenir des acides gras 20:3 ω 6 et 20:4 ω 3 radioactifs *in vivo* ou bien dans des broyats de tissus de rénille. De manière plus générale, l'acide linoléique (18:2 ω 6) et linoléique (18:3 ω 3) radioactifs pourraient être utilisés pour déterminer si ces précurseurs des PUFA d'origine végétale, sont métabolisables dans notre animal, et quels seraient alors les chemins de biosynthèse empruntés.

Les spermatophores semblent accumuler surtout l'EPA lors de leur développement alors que les oeufs accumulent principalement l'AA et secondairement l'EPA. L'EPA et l'AA peuvent être des précurseurs pour différentes prostaglandines dont les effets sont opposés. Sur des fibroblastes en culture l'AA converti en PGE₂ s'est avéré être un stimulateur de la division cellulaire et de la transcription d'ARNm (Sellmayer *et al.*, 1996). Non seulement l'EPA et le DHA ne sont pas actifs directement sur la mitose et la transcription, mais ils réduiraient les effets de l'AA en empêchant la synthèse de PGE₂ (Sellmayer *et al.*, 1996). Chez le bar, les prostaglandines issues de l'AA stimulent la maturation de l'ovocyte (Sorbera *et al.*, 2001). Mais l'EPA peut partiellement empêcher la transformation de l'AA en faisant compétition pour la cyclooxygénase (l'enzyme de biosynthèse des prostaglandines PGE), et de cette façon inhiber l'induction de la maturation de l'ovocyte. L'étude des prostaglandines chez la pensée de mer pourrait s'avérer très intéressante dans le contrôle de la reproduction. L'augmentation d'EPA dans les spermatophores pourrait provoquer la synthèse de PGE₃ alors que la prédominance d'AA dans les oeufs stimulerait la synthèse de PGE₂ par exemple. Les prostaglandines peuvent augmenter la libération de LHRH chez le rat, ce qui suggère des interactions entre acides gras et hormones

reproductrice (Dray, 1991). Chez la pensée de mer, si les effets du GnRH sur l'E₂ se confirmaient, des interactions encore plus complexes entre LHRH/E₂/acides gras pourraient être envisagées. Chez les mammifères, des interactions entre acides gras/prostaglandines et l'E₂ contrôleraient la durée du corps lutéinique (Staples *et al.*, 1998). La diète enrichie en AGP augmenterait la production de progestérone et diminuerait celle d'E₂. Ces modifications des taux de stéroïdes sexuels contribueraient à prolonger la durée du corps lutéinique.

L'augmentation du rapport $\omega 6/\omega 3$ accompagnant la maturation gonadique des colonies suggère une prévalence du rôle des acides gras $\omega 3$ sur les $\omega 6$ au moment du développement sexuel. Les acides gras $\omega 3$ sont importants chez les animaux en général, mais leur rôle physiologique exact demeure peu clair (Tinoco, 1982). Néanmoins, la forte concentration d'acides gras $\omega 3$ dans les testicules suggère qu'ils pourraient jouer un rôle important dans les processus de spermatogénèse.

L'EPA semble être un acide gras important dans la spermatogénèse chez la pensée de mer alors que le DHA est l'acide gras $\omega 3$ prédominant dans les cellules spermatiques chez de nombreux mammifères dont l'Homme (Tinoco, 1982). Cependant, l'étude faite chez la pensée de mer ne fait état des acides gras qu'au niveau de la masse des tissus reproducteurs mâles. Comme tous les types de cellules spermatiques à différents stades de maturité coexistent dans les spermatophores collectés, nos résultats sont plutôt représentatifs des niveaux moyens d'acides gras dans les gonades mâles. Une étude plus fine pourrait établir l'évolution des concentrations des acides gras, et notamment de l'EPA, dans les différents types de cellules spermatiques séparés par gradient de percoll. On serait en mesure de voir par exemple si l'EPA se comporte de façon analogue au DHA chez l'Homme en étant incorporé dans les spermatogonies et en diminuant au cours de la spermatogénèse (Ollero *et al.*, 2000). Les connaissances sur la

spermatogénèse chez la pensée de mer sont incomplètes, Lyke (1965) n'a pas observé les cellules spermatiques dans les spermatophores matures. Une étude cytologique des spermatophores à différents stades de développement, permettrait de mieux comprendre l'implication des acides gras dans la spermatogénèse.

Les niveaux d'E₂, dans les tissus somatiques de la pensée de mer et dans les gonades, ont une grande importance concernant la fonction reproductrice de cette hormone dans les premiers systèmes nerveux. Chez les métazoaires où les organes n'existent pas, les stéroïdes pourraient être synthétisés dans les tissus somatiques et être transportés jusqu'aux gonades. Les invertébrés ne possèdent pas d'équivalent des cellules de surrénale qui existent chez les chordés. Donc, les gonades ont été considérées comme étant les tissus de choix pour étudier les stéroïdes chez les invertébrés (Lehoux et Sandor, 1970). Pour des animaux aussi primitifs que les cnidaires où le système nerveux est diffus et où l'organisation des tissus reproducteurs est très simple, il n'y a pas de raison de privilégier un rôle hormonal dans les gonades. En effet, l'organisation des gonades est assez simple. Par exemple, l'ovocyte est recouvert par une seule couche de cellules endodermiques en continuité avec les filaments mésentériques. Dewel (2000) qualifie les anthozoaires coloniaux de "superorganismes coloniaux" qui seraient au cours de l'évolution devenus un individu unique. Selon cette théorie, la cavité gastrovasculaire préfigurerait l'intestin et la cavité coelomique naissante. Parker (1920a) a décrit la circulation d'eau dans la colonie entre les siphonozoides latéraux et le siphonozoïde exhalant. Cette circulation met en relation les différentes chambres qui composent la colonies et le pédoncule. Il est donc possible que la cavité gastrovasculaire, où l'absorption de nutriments a lieu et où les tissus reproducteurs se développent, puisse aussi être le lieu d'échanges hormonaux. Les stéroïdes pourraient donc être transportés depuis les tissus somatiques à travers la colonie de la pensée de mer et atteindre les gonades. Pour tester cette théorie, il sera nécessaire de mesurer la

concentration d'E₂ dans les tissus somatiques et dans les gonades en juin où son niveau était le plus haut chez les colonies femelles.

Même si les sécrétions d'E₂ (et de mélatonine) semblent être liées temporellement aux changements physiologiques qui caractérisent le développement sexuel, comme ici les lipides, les preuves demeurent très indirectes. Pour démontrer l'influence réelle de ces hormones, des expériences de "stimulations" devront montrer les changements attendus, que ce soit la synthèse protéique ou lipidique, ou encore la division cellulaire.

Références de l'introduction et de la discussion

- Anctil M (1989) Modulation of a rhythmic activity by serotonin via cyclic AMP in the coelenterate *Renilla köllikeri*. J Comp Physiol B 159: 491-500
- Anctil M (2000) Evidence for gonadotropin-releasing hormone-like peptides in a cnidarian nervous system. Gen Comp Endocrinol 119: 317-328
- Anctil M and Grimmelikhuijzen CJP (1989) Excitatory action of the native neuropeptide antho-RFamide on muscles in the pennatulid *Renilla köllikeri*. Gen Pharmac 20: 381-384
- Atkinson S, Atkinson MJ (1992) Detection of estradiol-17 β during a mass coral spawn. Coral reefs 11: 33-35
- Beams HW and Kessel RG (1983) Cnidaria. In: Adiyodi KG and Adiyodi RG (eds) Reproductive biology of invertebrates, volume I. John Wiley and Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, pp 31-67
- Ben-David-Zaslow R, Henning G, Hofmann DK, Benayahu Y (1999) Reproduction in the Red Sea soft coral *Heteroxenia fuscescens*: seasonality and long-term record (1991 to 1997). Mar Biol 133: 553-559
- Benayahu Y (1991) Reproduction and developmental pathways of Red Sea Xeniidae (Octocorallia, Alcyonacea). Hydrobiologia 216/217: 125-130
- Bishop DG and Kenrick JR (1980) Fatty acid composition of symbiotic zooxanthellae in relation to their hosts. Lipids 15: 799-804

- Bode HR (1996) The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J Cell Sci* 109: 1155-1164
- Braunstein GD (1997) Chap 12 Testes. In: Greenspan FS et Strewler GJ (eds) *Basic and clinical endocrinology*, 5th edition. Appleton and lange, stamford Connecticut, pp 403-433
- Ciereszko LS, Johnson MA, Schmidt RW and Koons CB (1968) Chemistry of coelenterates-VI. Occurrence of gorgosterol, a C₃₀ sterol, in coelenterates and their zooxanthellae. *Comp Biochem Physiol* 24: 899-904
- Clayton RN, Harwood JP, Catt KJ (1979) Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 282: 90-92
- Clayton RN, Katikineni M, Chan V, Dufau ML, Catt KJ (1980) Direct inhibition of testicular function by gonadotropin-releasing hormone:mediation by specific gonadotropin-releasing hormone receptors in interstitial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4459-4463
- Coll JC, Bowden BF, Meehan GV, König GM, Carroll AR, Tapiolas DM, Aliño PM, Heaton A, De Nys R, Leone PA, Maida M, Aceret TL, Willis RH, Babcock RC, Willis BL, Florian Z, Clayton MN, Miller RL (1994) Chemical aspects of mass spawning in corals. I. Sperm-attractant molecules in the eggs in the scleratinian coral *Montipora digitata*. *Mar Biol* 118: 177-182
- Coll JC, Leone PA, Bowden BF, Carroll AR, König GM, Heaton A, De Nys R, Maida M, Aliño PM, Willis RH, Babcock RC, Florian Z, Clayton MN, Miller RL, Alderslade PN (1995) II. (-)-Epi-thunbergol, the sperm

attractant in the eggs of the soft coral *Lobophytum crassum* (Cnidaria: Octocorallia). *Mar Biol* 123: 137-143

Conn DB (1991) Phylum Cnidaria (Coelenterata). In: Conn DB (ed) Atlas of invertebrate reproduction and development. Wiley-Liss, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore, pp 15-18

Cordes EE, Nybakken JW, VanDykhuisen G (2001) Reproduction and growth of *Anthomastus ritteri* (Octocorallia: Alcyonacea) from Monterey Bay, California, USA. *Mar Biol* 138: 491-501

Craig AG, Fisher WH, Park M, Rivier JE, Musselman BD, Powell JFF, Reska-Skinner SM, Prakash MO, Mackie GO, Sherwood NM (1997) Sequence of two gonadotropin releasing hormones from tunicate suggest an important role of conformation in receptor activation. *FEBS Letters* 413: 214-225

Dewel RA (2000) Colonial origin for eumetazoa: major morphological transitions and the origin bilaterian complexity. *J Morphol* 243: 35-74

Dray F (1991) Prostaglandines et reproduction. I. Aspects physiologiques. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 20: 7-17

Dunn DF (1975) Reproduction of the externally brooding sea anemone *Epiactis prolifera* verrill, 1869. *Biol Bull* 148: 199-218

Farrant PA (1986) Gonad development and the planulae of the temperate Australian soft coral *Capnella gaboensis*. *Mar Biol* 92: 381-392

- Fukuda Y and Naganuma T (2001) Potential dietary effects on the fatty acid composition of the common jellyfish *Aurelia aurita*. *Mar Biol* 138: 1029-1035
- Garrido L, Zubiá E, Ortega MJ, Salvá J (2000) Isolation and structure elucidation of new cytotoxic steroids from the gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*. *Steroids* 65: 85-88
- Goldfien A (1997) Chap 13 Ovaries. In: Greenspan FS et Strewler GJ (eds) *Basic and clinical endocrinology*, 5th edition. Appleton and lange, stamford Connecticut, pp 434-486
- Graeve M, Kattner G, Hagen W (1994) Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: Experimental evidence of trophic markers. *J Exp Mar Biol Ecol* 182: 97-110
- Grimmelikhuijzen CJP and Groeger A (1987) Isolation of the neuropeptide pGlu-Gly-Arg-Phe-amide from the pennatulid *Renilla köllikeri*. *FEBS Letters* 211: 105-108
- Grimmelikhuijzen CJP, Leviev I, and Carstensen K (1996) peptides in the nervous systems of cnidarians. *Int Rev Cytol* 167: 37-88
- Habibi HR, Pati D, Ouwens M, and Goos HJT (1994) Presence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites and compounds with GnRH-like activity in the ovary of african catfish, *Clarias gariepinus*. *Biol Reprod* 50: 643-652
- Hauser F, Nothacker H-P, and Grimmelikhuijzen CJP (1997) Molecular cloning, genomic organization, and developmental regulation of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to members

of the thyroid-stimulating hormone, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor family from mammals. *J Biol Chem* 272: 1002-1010

Henry J, Zatylny C, Boucaud-Camou E (1999) Peptidergic control of egg-lying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides* 20: 1061-1070

Heras H, Gonzalez-Baró MR, and Pollero RJ (2000) Lipid and fatty acid composition and energy partitioning during embryo development in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids* 35: 645-651

Holland DL (1978) Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In: Malins DC and Sargent JR (eds) *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology, volume IV*. Academic Press, London New York San Francisco, pp 85-123

Iguchi K, Iwashima M, Watanabe K (1995) Stoloniolide I, and II, new marine lactonic steroids with an unprecedented 1,10-Secoergostane skeleton, isolated from the Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*. *Chem Lett* 1109-1110

Iwashima M, Nara K, Iguchi K (2000) New marine steroids, Yonarasterols, isolated from the Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*. *Steroids* 65: 130-137

Joseph JD (1979) Lipid composition of marine and estuarine invertebrates: Porifera and Cnidaria. *Prog Lipid Res* 18: 1-30

Kanazawa A, Teshima S-I and Ando T (1977) Sterols of coelenterates. *Comp Biochem Physiol* 57B: 317-323

- Kastendiek J (1976) Behaviour of the sea pansy *Renilla kollikeri* Pfeffer (coelenterata:pennatulacea) and its influence on the distribution and biological interactions of the species. *Biol Bull* 151: 518-537
- Kellogg RB and Patton JS (1983) Lipids droplets, medium of energy exchange in the symbiotic anemone *Condylactis gigantea*: a model coral polyp. *Mar Biol* 75: 137-149
- Kelso KA, Cerolini S, Speake BK, Cavalchini LG and Noble RC (1997) Effects of dietary supplementation with α -linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. *J Reprod Fert* 110: 53-59
- Kharlamenko VI, Zhukova NV, Khotimchenko SV, Svetashev VI, Kamenev GM (1995) Fatty acids as markers of food sources in a shallow-water hydrothermal ecosystem (Kraternaya Bight, Yankich Island, Kurile Islands). *Mar Ecol Prog Ser* 120: 231-241
- King JA and Millar RP (1995) Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell Mol Neurobiol* 15 : 5-23
- Kobayashi M, Lee NK, Son BW, Yanagi K, Kyogoku Y, Kitagawa I (1984) Stoloniferone-a, -b, -c, and -d, for new cytotoxic steroids from the Okinawan soft coral *Clavularia viridis*. *Tetrahedron Lett* 25: 5925-5928
- Kruger A, Schleyer MH, Benayahu Y (1998) Reproduction in *Anthelia glauca* (Octocorallia:Xeniidae). I. Gametogenesis and larval brooding. *Mar Biol* 131: 423-432

- Latyshev NA, Naumenko NV, Svetashev VI, Latypov Ya (1991) Fatty acids of reef-building corals. *Mar Ecol Prog Ser* 76: 295-301
- Lehoux J-G and Sandor T (1970) The occurrence of steroids and steroid metabolizing enzyme systems in invertebrates. A review. *Steroids* 16: 141-171
- Loumaye E, Thorner J, Catt KJ (1982) Yeast mating pheromone activates mammalian gonadotrophs: evolutionary conservation of a reproductive hormone? *Science* 218: 1323-1325
- Lyke EB (1965) The histology of sea pansies, *Renilla reniformis* (Pallas) and *Renilla koellikeri* (Pfeffer) with a note on the fine structure of the latter species. Ph.D. thesis, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin
- Mc Farlane ID, Anderson PAV and Grimmelikhuijzen CJP (1991) Effects of three anthozoan neuropeptides, antho-RWamide I, antho-RWamide II and antho-RFamide, on slow muscles from sea anemones. *J Exp Biol* 156: 419-431
- Mc Farlane ID, Reinscheid RK and Grimmelikhuijzen CJP (1992) Opposite actions of the anthozoan neuropeptide antho-RNamide on antagonistic muscle groups in sea anemones. *J Exp Biol* 164: 295-299
- Mechawar N and Anctil M (1997) Melatonin in a primitive metazoan: seasonal changes of levels and immunohistochemical visualization in neurons. *J Comp Neurol* 387: 243-254
- Miller RL (1983) Cnidaria. In: Adiyodi KG and Adiyodi RG (eds) *Reproductive biology of invertebrates, volume II*. John Wiley and Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore, pp 23-73

- Müller-Navarra DC, Brett MT, Liston AM and Goldman CR (2000) A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403: 74-77
- Musio C, Santillo S, Taddei-Ferretti C, Robles LJ, Vismara R, Barsanti L, Gualtieri P (2001) First identification and localisation of a visual pigment in *Hydra* (Cnidaria, Hydrozoa). *J Comp Physiol* 187A: 79-81
- Nabissi M, Pati D, Polzonetti-Magni AM, and Habibi HR (1997) Presence and activity of compounds with GnRH-like activity in the ovary of seabream *Sparus aurata*. *Am J Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol)* 41: 272: R111-R117
- Nelson MM, Phleger CF, Mooney BD, and Nichols PD (2000) Lipids of gelatinous antarctic zooplankton: Cnidaria and Ctenophora. *Lipids* 35: 551-559
- Nothacker HP, and Grimmlikhuijzen CJP (1993) Molecular cloning of a novel, putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 1062-1069
- Oikawa M, Dargam C, Ny T, Hsueh AJW (1990) Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin- α -messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* 127: 2350-2356
- Ollero M, Powers RD, and Alvarez JG (2000) Variation of docosahexaenoic content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. *Mol Reprod Dev* 55: 326-334

- Pani AK and Anctil M (1994) Evidence for biosynthesis and catabolism of monoamines in the sea pansy *Renilla koellikeri* (cnidaria). *Neurochem Int* 25: 465-474
- Parker GH (1920a) Activities of colonial animals. I. Circulation of water in *Renilla*. *J Exp Zool* 31: 343-365
- Parker GH (1920b) Activities of colonial animals. II. Neuromuscular movements and phosphorescence in *Renilla*. *J Exp Zool* 31: 475-513
- Pati D and Habibi HR (1998) Presence of salmon GnRH and compounds with GnRH-like activity in the ovary of goldfish. *Endocrinology* 139 : 2015-2024
- Patton JS and Burris JE (1983) Lipids synthesis and extrusion by freshly isolated zooxanthellae (symbiotic algae). *Mar Biol* 75: 131-136
- Patton JS, Battey JF, Rigler MW, Porter JW, Black CC and Burris JE (1983) A comparison of the metabolism of bicarbonate ^{14}C and acetate $1\text{-}^{14}\text{C}$ and the variability of species lipid compositions in reef corals. *Mar Biol* 75: 121-130
- Pazos AJ and Mathieu M (1999) Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen Comp Endocrinol* 113: 112-120
- Pollero RJ, and Brenner RR (1981) Effect of the environment and fasting on the lipid and fatty acid composition of *Diplodom patagonicus*. *Lipids* 16: 685-690

- Pollero RJ (1983) lipid and fatty acid characterisation and metabolism in the sea anemone *Phymactis clematis* (Dana). *Lipids* 18: 12-17
- Powell JFF, Reska-Skinner SM, Prakash MO, Fischer WH, Park M, Rivier JE, Craig AG, Mackie GO, and Sherwood NM (1996) The new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10461-10464
- Price DA, and Greenberg L, (1977) Structure of a molluscan neuropeptide. *Science* 197: 670-671
- Reinhardt SB and Van Vleet ES (1986) Lipid composition of twenty-two species of Antarctic midwater zooplankton and fish. *Mar Biol* 91: 149-159
- Richmond RH, Hunter CL (1990) Reproduction and recruitment of corals: comparisons among the Caribbean, the Tropical Pacific, and the Red Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 60: 185-203
- Rooke JA, Shao C-C, and Speake BK (2001) Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and *in vitro* characteristics of semen. *Reproduction* 121: 315-322
- Ruppert EE and Barnes RD (1994) Cnidarians and ctenophores. In: Ruppert EE and Barnes RD (eds) *Invertebrate zoology*, 6th edition. Saunders College Publishing, Chapter 4
- Sammarco PW, Coll JC (1992) Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Mar Ecol Prog Ser* 88: 93-104

- Sandor T and Mehdi AZ (1979) Steroids and evolution. In: Barrington EJW (ed) Hormones and evolution, volume I. Academic Press, New York San Francisco London, pp 1-72
- Sargent JR, Parkes RJ, Mueller-Harvey I, and Henderson RJ (1987) Lipid biomarkers in marine ecology. In: Sleigh MA (ed) Microbes in the sea. John Wiley and sons, New York Chichester Brisbane Toronto, pp 119-138
- Satterlie RA and Case JF (1979) Development of bioluminescence and other effector responses in the pennatulid coelenterate *Renilla köllikeri*. Biol Bull 157: 506-523
- Schoenmakers HJN (1979) *In vitro* biosynthesis of steroids from cholesterol by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. Gen Comp Endocrinol 63B: 179-184
- Schoenmakers HJN and Voogt PA (1980) *In vitro* biosynthesis of steroids from progesterone by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. Gen Comp Endocrinol 41: 408-416
- Schoenmakers HJN, Bohemen CGV, Dieleman SJ (1981) Effects of oestradiol-17 β on the ovaries of the star fish *Asterias rubens*. Dev Growth Differ 23: 125-135
- Schoenmakers HJN and Dieleman SJ (1981) Progesterone and estrone levels in the ovaries, pyloric ceca, and perivisceral fluid during the annual reproductive cycle of starfish, *Asterias rubens*. Gen Comp Endocrinol 43: 63-70

- Schoenmakers HJN and Voogt PA (1981) *In vitro* biosynthesis of steroids from androstenedione by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. *Gen Comp Endocrinol* 45: 242-248
- Sellmayer A, Danesch U, and Weber PC (1996) Effects of different polyunsaturated fatty acids on growth-related early gene expression and cell growth. *Lipids* 31: S37-S40
- Sherwood L (2000) Chap 16 Système reproducteur. Dans: Sherwood L (ed), *Physiologie Humaine*. De Boeck Université, pp 531-572
- Sherwood NM, Lovejoy DA, and Coe IE (1993) Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocr Rev* 14: 241-254
- Slattery M, Hines GA, Watts SA (1997) Steroid metabolism in Antarctic soft corals. *Polar Biol* 18: 76-82
- Slattery M, Hines GA, Starmer J, Paul VJ (1999) Chemical signals in gametogenesis, spawning, and larval settlement and defend of the sift coral *Sinularia polydactyla*. *Coral reefs* 18: 75-84
- Sorbera LA, Asturiano JF, Carrillo M, and Zanuy S (2001) Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the european sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod* 64: 382-389
- Staples CR, Burke JM, Thatcher WW (1998) Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J Dairy Sci* 81: 856-871

- Surai PF, Noble RC, Sparks NHC and Speake BK (2000) Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. *J Reprod Fert* 120: 257-264
- Tarrant AM, Atkinson S, Atkinson MJ (1999) Estrone and estradiol-17 β concentration in tissue of the scleratinian coral, *Montipora verrucosa*. *Comp Biochem Physiol* 122A: 85-92
- Tarrant AM, Atkinson MJ, Atkinson S (2001) Uptake of estrone from the water column by a coral community. *Mar Biol* 139: 321-325
- Tensen CP, van Kesteren ER, Planta RG, Cox KJA, Burke JF, van Heerikhuizen H, and Vreugdenhil E (1994) A G protein-coupled receptor with low density lipoprotein-binding motives suggests a role for lipoprotein in G-linked signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4816-4820
- Tinoco J (1982) Dietary requirements and functions of α -linolenic acid in animals. *Prog Lipid Res* 21: 1-45
- Umbriaco D, Anctil M, and Descarries L (1990) Serotonin-immunoreactive neurons in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J Comp Neurol* 291: 167-178
- Voogt PA and Dieleman SJ (1984) Progesterone and oestrone levels in the gonads and pyloric caeca of the male sea star *Asterias rubens*: a comparison with the corresponding levels in the female sea star. *Comp Biochem Physiol* 79A: 635-639
- Watanabe k, Iwashima M, Iguchi K (1996) New bioactive marine steroids from the Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*. *Steroids* 61: 439-446

Wilson EB (1883) The development of *Renilla*. Phil Trans R Soc Lond 174B: 723-815

Xu RA and Barker MF (1990) Annual changes in the steroid levels in the ovaries and the pyloric caeca of *Sclerasterias mollis* (echinodermata:asteroidea) during the reproductive cycle. Comp Biochem Physiol 95A: 127-133

Yasuda A, Naya Y, and Nakanishi K (1993) Isolation of antho-RFamide related peptides from the eyestalks of blue crab. Comp Biochem Physiol 104B: 235-240

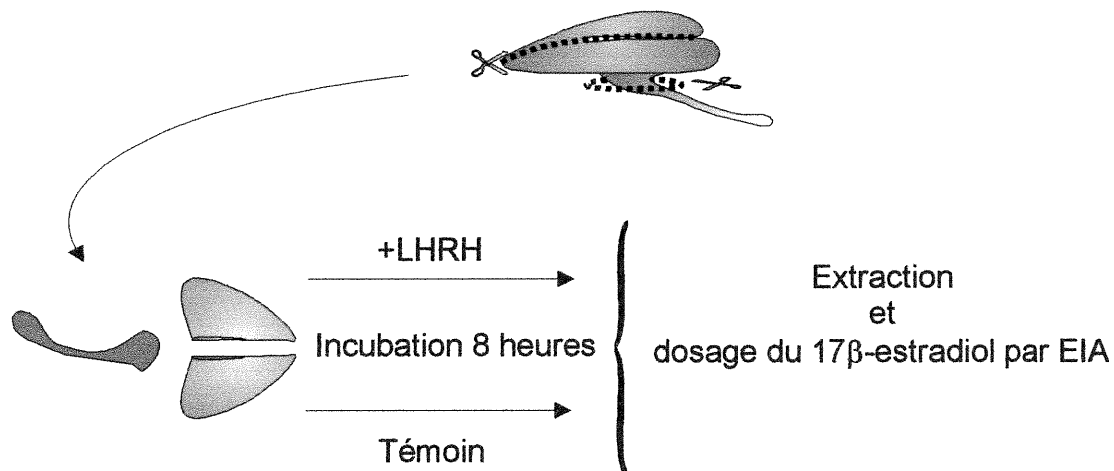
Zhang L, Wayne NL, Sherwood NM, Postigo HR, and Tsai P-S (2000) Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. Gen Comp Endocrinol 118: 77-89

Annexe

Effet du LHRH sur le niveau d'E₂ dans les tissus de pensée de mer

-Protocole

Les animaux furent coupés au niveau de l'axe séparant les deux lobes symétriques. Une première moitié fut placée dans un récipient contenant de l'eau de mer artificielle et servit de témoin. L'autre moitié de l'animal fut mise dans le même volume d'eau de mer artificielle contenant du LHRH. Les animaux furent exposés pendant huit heures dans ces conditions à 15°C, puis furent congelés dans de l'azote liquide et lyophilisés. Le 17 β -estradiol fut extrait comme précédemment décrit (p 62 à 64).



-Résultats :

La différence entre le niveau d'E₂ dans la moitié de pensée de mer stimulée avec le LHRH et l'autre moitié servant de témoin a été présentée dans la figure 1 pour différentes concentrations de LHRH. On peut voir d'après le contrôle (Ctrl) que les deux lobes symétriques d'un même animal semblent avoir un niveau d'E₂ très proche. Le LHRH semble augmenter le niveau d'E₂ de manière dose-dépendante.

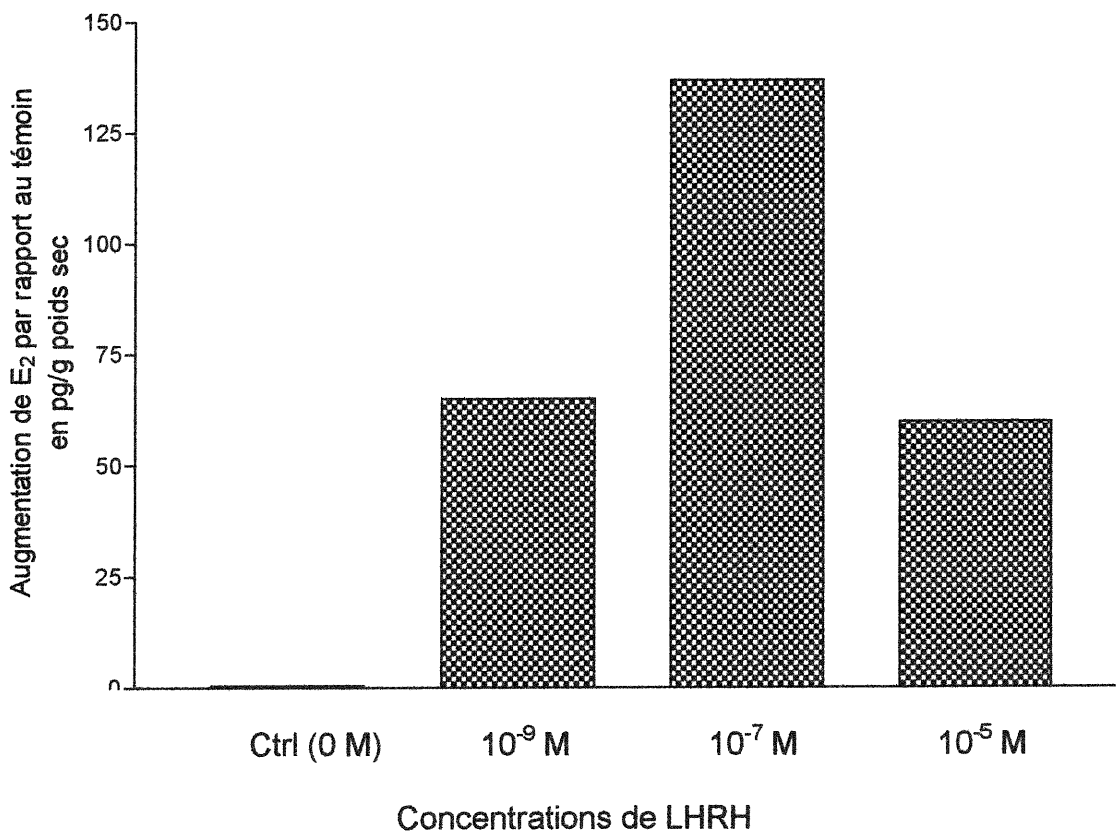


Fig. 1. Effet stimulateur du LHRH sur le niveau d'E₂ dans les tissus de pensée de mer (N=1).

Remerciements

Je remercie Mr Anctil de ses commentaires critiques au cours de mon travail de maîtrise, de sa disponibilité et de la qualité de ses conseils durant la rédaction de ce mémoire.

Je suis reconnaissant à Hélène Lavigne et Louise Pelletier d'avoir été durant mon passage au Département de biologie des personnes agréables, serviables et de bonnes conseillères.

Sandrine m'a beaucoup aidé pendant ces deux années d'études. Elle a accepté les contraintes de mes expériences et s'est intéressée à mon projet avec un esprit très ouvert.