

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Détection et distribution tissulaire chez le cnidaire *Renilla koellikeri* d'une protéine apparentée aux récepteurs à oestrogènes

Par

Mathieu Collette

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et sciences

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

Juin 2004



© droits réservés de Mathieu Collette 2004.

QH

302

U54

2004

V. 003

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Détection et distribution tissulaire chez le cnidaire
Renilla koellikeri d'une protéine apparentée aux
récepteurs à oestrogènes

Présenté par Mathieu Collette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Stéphane Molotchnikoff (Président rapporteur)

Dr. Michel Anctil (Directeur de recherche)

Dr. Annie Angers (Membre du jury)

Mémoire accepté le : _____

Sommaire

La présence d'hormones stéroïdiennes telles que les oestrogènes a récemment été rapportée chez la pensée de mer, *Renilla koellikeri*, de même que chez d'autres anthozoaires (coraux). Bien qu'un rôle dans la reproduction de la pensée de mer et des coraux scléactiniens ait été suggéré pour les oestrogènes, aucune preuve directe pour un tel rôle n'a encore été obtenue.

Afin de vérifier la possibilité qu'un récepteur aux oestrogènes existe chez la pensée de mer, nous avons tout d'abord utilisé une technique d'immunobuvardage de type Western. Le but était de déterminer si une bande réagissant avec un anticorps dirigé contre une séquence d'acides aminés (18-32 ou 578-595) du récepteur à oestrogènes alpha de l'humain se rapprochait du poids moléculaire du récepteur humain aux oestrogènes (67 kDa). Étant donné que les résultats de la technique d'immunobuvardage de type Western se sont avérés positifs, nous avons donc tenté d'identifier des cibles fonctionnelles potentielles pour les oestrogènes au niveau cellulaire. Nous avons alors utilisé des anticorps générés contre un récepteur à oestrogènes mammalien pour visualiser la distribution des protéines s'apparentant au récepteur à oestrogènes par immunohistochimie (immunofluorescence et immunoperoxydase). En utilisant des

anticorps générés contre deux fragments peptidiques différents du récepteur à oestrogènes humain (hER), nous avons visualisé de l'immunoréactivité dans des cellules interstitielles et glandulaires de l'ectoderme, dans des scléroblastes et des neurones mésogléens près de l'endoderme ainsi que dans l'endoderme des mésentères. Le patron de distribution du marquage était très semblable pour les deux anticorps et les deux techniques d'immunohistochimie. Aucune immunoréactivité n'a été observée dans les tissus des gonades.

Plutôt qu'un rôle dans la reproduction, ces résultats suggèrent un rôle neurotrophique pour les oestrogènes, du moins pour certains sous-groupes de cellules nerveuses ainsi qu'un rôle dans le développement général et la formation du squelette interne (spicules) tel que rapporté pour les mammifères. Du fait que la pensée de mer appartient à l'embranchement le plus primitif possédant un système nerveux, ces résultats semblent suggérer que les récepteurs aux oestrogènes associés aux neurones sont apparus très tôt dans l'évolution.

Mots clés: anthozoaire, ectoderme, endoderme, immunohistochimie, mésoglée, neurone, octocoralliaire, oestradiol, scléroblaste, stéroïde.

Summary

Steroid hormones such as estrogens were recently reported in the sea pansy, *Renilla koellikeri*, and in other anthozoans (corals). Although a role for estrogens in the reproduction of the sea pansy and of scleractinian corals has been proposed, no direct evidence for such a role has yet been produced.

To verify the possibility that an estrogen receptor may exist in the sea pansy, we first used mammalian oestrogen receptor antibody in Western blots to see if a band near the molecular weight of the human estrogen receptor (67 kDa) was present. As the results of the Western blot technique were positive, we then used antibodies against mammalian estrogen receptors to map the distribution of the sea pansy estrogen-like receptors by immunohistochemistry (immunoperoxidase and immunofluorescence) in an attempt to identify potential functional targets for an estrogen at the cellular level. By using antibodies against two different peptide fragments of the human estrogen receptor (hER), we visualized hER-like immunoreactivity in interstitial and glandular cells of the ectoderm, in scleroblasts and in mesogleal neurons proximal to the endoderm and in the endodermal musculo-epithelial cells of the mesenteries. The distribution of the

immunoreactivity was very similar for both antibodies and both immunochemistry techniques. No immunoreactivity was found in gonad tissues.

Instead of a role in reproduction, these results suggest a neurotrophic role for estrogens, at least in some subsets of sea pansy neurons as well as in general development and internal skeleton (spicules) formation such as has been previously reported for the mammalian. As the sea pansy belongs to the most primitive phylum in which nervous systems are present, these results seem to suggest that estrogen receptors associated with neurons appeared very early in evolution.

Key words: anthozoan, ectoderm, endoderm, immunohistochemistry, mesoglea, neuron, octocorallian, estradiol, scleroblast, steroid.

Table des matières

Sommaire	i
Summary	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	xi
Dédicace	xiv
Remerciements	xv
1 Introduction	1
1.1 Les hormones et la reproduction	2
1.1.1 Les différents types d'hormones	3
1.1.2 Les stéroïdes	4
1.1.2.1 Stéroïdes sexuels chez les vertébrés	5
1.1.2.2 Stéroïdes sexuels chez les invertébrés	7
1.1.2.3 Stéroïdes en dehors du règne animal	9
1.2 Les récepteurs	10
1.2.1 La superfamille des récepteurs nucléaires	12
1.2.1.1 Le récepteur nucléaire	14

1.2.1.2	Mode d'action du récepteur nucléaire	17
1.2.1.3	Évolution des récepteurs nucléaires et plus particulièrement ceux de la sous-famille III	20
1.3	Portrait du modèle expérimental utilisé	24
1.3.1	Organisation tissulaire	28
1.3.2	Diversité cellulaire	32
1.3.2.1	De l'ectoderme	32
1.3.2.2	De la mésoglée	34
1.3.2.3	De l'endoderme	35
1.4	Buts de l'étude et hypothèse de travail	37
2	Méthodologie	39
2.1	Les animaux	39
2.2	Électrophorèse et immunobuvardage	40
2.2.1	Préparation de l'extrait de la rénille	40
2.2.2	Préparation de l'extrait d'ovaires et d'utérus de rat	41
2.2.3	Migration des protéines sur gel de polyacrylamide	41
2.2.4	Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose	42
2.2.5	Marquage des protéines sur une membrane de nitrocellulose	44
2.2.6	Révélation des sites de liaison par réaction de chimiluminescence	48
2.3	Immunohistochimie	49
2.3.1	Préparation des coupes	49
2.3.2	Immunofluorescence	50
2.3.3	Immunoperoxydase	51
3	Résultats	53
3.1	Électrophorèse et immunobuvardage	53

3.1.1 Bandes détectées par immunobuvardage des extraits	54
3.2 Immunohistochimie	58
3.2.1 Au niveau de l'ectoderme	59
3.2.2 Au niveau de la mésoglée	70
3.2.3 Au niveau de l'endoderme	74
4 Discussion	81
4.1 Pourquoi le marquage serait-il associé à un récepteur à oestrogènes?	81
4.1.1 Contrôle avec un extrait d'ovaires et d'utérus de rat	82
4.1.2 Évolutionnairement possible ou pas?	83
4.2 Distribution surprenante du marquage au niveau intracellulaire	87
4.2.1 Est-ce que la méthode pourrait être en cause?	88
4.2.2 Est-ce que nos observations représentent la vraie distribution intracellulaire <i>in vivo</i> ?	89
4.3 Immunobuvardage de type western	92
4.4 Que nous révèlent les types cellulaires marqués?	96
4.4.1 Cellules interstitielles et cellules engagées	96
4.4.2 Cellules glandulaires	98
4.4.3 Structures nerveuses	99
4.4.4 Les scléroblastes	101
4.4.5 Les cellules musculo-épithéliales	105
Conclusion	108
Références	111

Liste des tableaux

I	Tableau synoptique de la présence chez divers invertébrés de stéroïdes généralement associés à la reproduction des vertébrés	8
II	Tableau représentant les sous-familles de la superfamille des récepteurs nucléaires mammaliens	13
III	Tableau des divers variants du transcrit primaire du récepteur à oestrogènes alpha se retrouvant chez des tissus normaux de mammifères	95

Liste des figures

1.1	Domaines fonctionnels conservés des récepteurs nucléaires	15
1.2	Mode d'action des récepteurs nucléaires à oestradiol-17 β	18
1.3	Arbre phylogénétique montrant la distribution des récepteurs nucléaires parmi les eucaryotes	22
1.4	Vue d'ensemble d'une colonie de <i>Renilla koellikeri</i>	25
1.5	Anatomie d'un autozoïde de <i>Renilla koellikeri</i>	27
1.6	Coupe transversale d'ectoderme d'un pennatulide	28
1.7	Mésoglée d'un pennatulide	29
1.8	Cellules ectodermermiques d'un pennatulide	32
1.9	Couches tissulaires de l'hydre représentant bien les types cellulaires endodermiques de <i>Renilla</i>	35
2.1	Composantes et assemblage du module Mini Trans-Blot pour le transfert des protéines	43
2.2	Séquence des acides aminés constituant le récepteur à oestrogènes alpha de l'humain	47
3.1	Immunobuvardage de type Western avec l'extrait d'ovaire et d'utérus de rat et de <i>Renilla</i>	57
3.2	Immunoréactivité dans divers types cellulaires au niveau de l'ectoderme du rachis	65
3.3	Immunoréactivité au niveau de l'ectoderme du rachis et des tentacules	67
3.4	Immunoréactivité au niveau de l'ectoderme dorsal et ventral du rachis et de la mésoglée	69

3.5	Immunofluorescence au niveau de la mésoglye du rachis	73
3.6	Immunoréactivité au niveau de l'endoderme des mésentères	78
3.7	Immunoréactivité au niveau de l'endoderme des mésentères	80

Liste des sigles et abréviations

ADN :	Acide Désoxyribo Nucléique
AF-1 :	Activation Function-1
AF-2 :	Activation Function-2
AMP _c :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
C. cal. :	Cellule caliciforme
C. g. :	Cavité gastrique
C. gl. :	Cellule glandulaire
C. i. :	Cellule interstitielle
C. m. :	Cellule myoépithéliale
C. més. :	Cellule mésenchymateuse
C. n. :	Cellule nerveuse
C. r. :	Cellule de revêtement
C. s. :	Cellule sensorielle
C. u. :	Cellule urticante
Cni. :	Cnidoblaste
COUP-TF :	Chicken Ovalbumin Upstream Promotor- Transcription Factor
Cut. :	Cuticule
DAB :	DiAminoBenzidine
DBD :	DNA Binding Domain

D-Box :	Distal Box
DNA :	Desoxyribo Nucleic Acid
E ₁ :	Estrone
E ₂ :	Estradiol
Ecto :	Ectoderme
End. :	Endoderme
Endo :	Endoderme
ER :	Estrogen Receptor
ER-1 :	Estrogen Receptor alpha
ERE :	Estrogen Response Element
ERR :	Estrogen Related-Receptor
ER α :	Estrogen Receptor alpha
ER β :	Estrogen Receptor beta
ER γ :	Etsrogen Receptor gamma
F. m. et M. f. :	Fibre musculaire
FITC :	Fluorescein IsoThyoCyanate
FTZ-F1 :	Fushi TaraZu- Factor 1
GnRH :	Gonadotropin Releasing Hormone
hCG :	human Chorionic Gonadotropin
HRP :	HorseRadish Peroxydase
HSP :	Heat Shock Protein
LBD :	Ligand Binding Domain
LH :	Luteinizing Hormone
M. :	Mésoglée
mA :	milli Ampère

MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
Méso :	Mésoglée
mM :	milli Molaire
mOsm :	milli Osmole
NTD :	N-Terminal Domain
P-Box :	Proximal Box
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PBS+T :	Phosphate Buffered Saline + Triton-X-100
RXR :	Retinoid X Receptor
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SF-1 :	Steroidogenic Factor-1
SFRE :	SF-1 Response Element
Spic :	Spicule
TBST :	Tris Buffer Saline Tween
TRH :	Thyrotropin-Releasing Hormone
W/V :	Weight/Volume

À mes parents pour m'avoir
fourni l'environnement et les
moyens de trouver ma voie et à
toi Marie-Ève pour t'y être
retrouvée et pour tout ce que tu
y ajoute de merveilleux...

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, M. Anctil qui m'a accueilli dans son laboratoire. Je le remercie aussi de m'avoir permis de vivre l'expérience d'un congrès scientifique et pour sa rapidité à faire les corrections dans le processus de correction de ce mémoire.

Je veux aussi remercier tout le personnel du département et en particulier Hélène Lavigne, Jean-Luc Verville, Louise Cloutier, Louise Pelletier et la gang du cubicule pour... un peu tout: disponibilité, conseils, sourires, etc....

Mes derniers remerciements vont à ma famille, mes parents pour m'avoir aidé à me rendre où je suis maintenant, ma blonde en or pour m'avoir soutenu, aidé, enduré et aimé toute cette période là et finalement, à toi Benjamin, d'exister et d'être en santé.

Merci à vous tous!

Chapitre 1

Introduction

L'objet de ce mémoire de maîtrise est une recherche de sites récepteurs aux oestrogènes chez un cnidaire (coraux, anémones, hydres, méduses). Le type de récepteur aux oestrogènes ciblé est nucléaire et les cnidaires sont les animaux les plus primitifs chez qui la présence de ce type de récepteur fut rapporté car il n'ont pas encore été détectés chez les spongiaires (éponges) (Escriva et al., 1997; Laudet, 1997).

Cette introduction vise à passer en revue les connaissances actuelles sur les récepteurs à oestrogènes (ER) et sur la morphologie et les structures histologiques de l'organisme chez lequel ces récepteurs seront recherchés. Du fait que les oestrogènes sont des hormones stéroïdiennes aux rôles multiples, une description des différents types d'hormones, en insistant sur les stéroïdes, sera faite. Une brève revue des rôles connus pour les oestrogènes chez les vertébrés de même qu'un relevé représentatif de la grande distribution et des rôles effectifs ou présomptifs des stéroïdes parmi les invertébrés suivra. Par la suite, on trouvera une bonne description de la superfamille des récepteurs

nucléaires, la composition d'un récepteur nucléaire typique, le mode d'action du récepteur nucléaire aux oestrogènes ainsi que son évolution.

Ensuite, dû à l'utilisation de techniques immunohistochimiques sur coupes histologiques, il est impératif qu'une description assez détaillée du modèle expérimental utilisé, incluant l'organisation tissulaire et la diversité cellulaire qu'on y retrouve, soit présentée afin que le lecteur non-spécialiste des anthozoaires puisse avoir une meilleure préparation mentale pour mieux se repérer, en particulier dans la section des résultats. Finalement, viendra le but et l'hypothèse de travail.

1.1 Les hormones et la reproduction

La fonction hormonale implique quatre grands domaines : (1) la croissance et le développement, (2) le maintien de l'homéostasie, (3) la production, l'utilisation et l'entreposage de l'énergie et (4) la reproduction (Wilson et al., 1998).

Il est bien connu chez les vertébrés que les hormones (et plus particulièrement les stéroïdes) et la reproduction sont intimement reliées. Cependant, ce lien devient moins évident en ce qui concerne les invertébrés. Par exemple, on a démontré que certaines substances agissant au niveau du système nerveux chez certains invertébrés n'étaient pas nécessairement les mêmes utilisées pour le même type de rôle chez les vertébrés malgré qu'elles y soient présentes. Il semble donc que de manière intuitive, le lien entre

reproduction et hormones stéroïdiennes ne doit pas se faire d'emblée chez les invertébrés. Cependant, depuis les 10 dernières années, plusieurs stéroïdes découverts à l'origine chez les vertébrés ont été identifiés chez des espèces très primitives dont entre autres plusieurs espèces d'invertébrés comme des crustacés, échinodermes, mollusques, cnidaires. Par contre, la présence de l'hormone stéroïde ne signifie pas qu'elle y est active ou qu'elle a un rôle sous la forme détectée car, plus particulièrement pour les hormones stéroïdes, elles dérivent souvent l'une de l'autre et ne se retrouvent parfois chez l'individu qu'en tant qu'intermédiaire vers une autre forme ou comme produit résultant de réactions de catabolisme ou d'anabolisme. Cependant, pour plusieurs de ces hormones stéroïdiennes, des récepteurs ont été identifiés révélant ainsi leur plus grande importance et très souvent leur rôle n'est pas très éloigné du rôle identifié chez les vertébrés.

1.1.1 Les différents types d'hormones

Il existe une très grande panoplie d'hormones, sans compter celles qui n'ont pas encore été identifiées, que l'on peut classer en deux catégories chimiques. La plupart font partie de la catégorie des peptides ou des dérivés d'acides aminés qui comprend les polypeptides complexes (luteinizing hormone [LH], human chorionic gonadotropin [hCG]), les polypeptides de taille intermédiaire (insuline et glucagon), les petits peptides (thyrotropin-releasing hormone [TRH]), les dipeptides (T_4 et T_3) et les dérivés d'acides aminés simples (catécholamines, sérotonine et histamine). Les autres sont tous des

stéroïdes dérivés du cholestérol (Wilson et al., 1998). En ce qui concerne ce travail, nous nous intéresseront exclusivement aux hormones stéroïdes.

1.1.2 Les stéroïdes

Tout comme les graisses neutres (triglycérides), les phospholipides et plusieurs autres substances lipoides (ex : vitamines liposolubles A, E, K, les prostaglandines et les lipoprotéines), les stéroïdes (ex : vitamine D, hormones thyroïdiennes, hormones sexuelles et corticosurrénales) font partie du groupe de composés organiques des lipides (Wilson et al., 1998). Étant extrêmement polymorphes, les lipides sont plutôt définis d'un point de vue opérationnel que structurel. Les lipides, dont les stéroïdes, sont des composés organiques que l'on trouve dans les systèmes biologiques et qui sont peu ou pas solubles dans l'eau mais solubles dans d'autres lipides et dans les solvants organiques comme l'alcool, le chloroforme et l'éther (Horton et al., 1994). De plus, tout comme les glucides, tous les lipides contiennent du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène (Marieb, 1993).

Les stéroïdes sont synthétisés à partir d'une molécule à cinq carbones nommée «isoprène» et c'est à partir de cette molécule que se formeront les 4 cycles (A,B,C,D) ou anneaux fusionnés caractéristiques du noyau des stéroïdes nommé cyclopentanoperhydrophenanthrene. Selon leurs propriétés, les stéroïdes peuvent être divisés en deux catégories : (1) ceux dont le noyau du stéroïde est intact (stéroïdes surrénaux et gonadiens) et (2) ceux dont l'anneau B du stéroïde a été clivé (vitamine D

et divers métabolites) (Wilson et al., 1998). Chez les vertébrés, les stéroïdes sont principalement produits par les glandes surrénales et les gonades mâle et femelle. Ceux produits par les glandes surrénales sont séparés en quatre grandes classes : les minéralocorticoïdes (ex: aldostérone), les glucocorticoïdes (ex: cortisol, cortisone, corticostérone), les gonadocorticoïdes (ex: androgènes, oestrogènes, progestogènes) qui sont identiques à ceux produits par les gonades mais en moins grande quantité et les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) qui, contrairement aux 3 premières classes, ne sont pas produites par la corticosurrénale mais par la médullosurrénale. Ceux produits par les gonades sont principalement les oestrogènes (ex : oestrone, oestradiol, oestriol) et les progestogènes chez la femelle et les androgènes (surtout la testostérone) chez le mâle.

Tout comme chez les vertébrés, chez les invertébrés les stéroïdes sont élaborés de façon prédominante par les tissus reproducteurs et les glandes qui leur sont associées mais aussi par des glandes comme la glande prothoracique des insectes, l'organe X et Y des crustacés impliqués dans la mue (Barrington, 1979).

1.1.2.1 Stéroïdes sexuels chez les vertébrés

C'est chez les mammifères et plus particulièrement chez l'homme et les rongeurs de laboratoire que la présence et les rôles des stéroïdes sexuels ont tout d'abord été établis. Vers les années 50, les recherches se sont étendues aux autres groupes de vertébrés (Barrington, 1979). Au cours des dernières années, plusieurs membres de

l'embranchement des vertébrés (tant aquatiques que terrestres) se sont ajoutés à la liste des espèces où ces stéroïdes ont été détectés, et cette liste ne cesse de s'allonger.

Chez les vertébrés, on connaît relativement bien les différents stéroïdes sexuels, leur métabolisme et leurs fonctions mais il reste tout de même des points d'interrogation. Bien qu'ils agissent tôt dans le développement général de l'individu et qu'ils continuent d'être actifs après la période sexuellement active de l'animal (chez ceux disposant d'une telle période), ils sont généralement associés à la reproduction pour le développement des caractères sexuels mâles et femelles (appareil reproducteur, production des gamètes, pilosité, mue de la voix, seins).

Cependant, ces stéroïdes ont un spectre d'action beaucoup plus grand et n'influencent pas seulement la reproduction. Par exemple, les oestrogènes ont des fonctions physiologiques importantes au niveau du système cardiovasculaire (ex : protection cardiovasculaire), du système immunitaire (ex : réponse immunitaire humorale), du système nerveux central (ex : neuroprotection, facteur de croissance), du système squelettique (ex : modélage des os, homéostasie et métabolisme des os), etc... Si l'on considère le système nerveux central, plusieurs chercheurs ont démontré l'implication des oestrogènes à divers niveaux. L'oestradiol serait un facteur important dans le contrôle de la différenciation de sous-populations de cellules nerveuses (Beyer, 1999). De plus, des effets promoteurs de l'oestradiol sur la croissance ont été décrits pour plusieurs régions du cerveau dont l'hypothalamus (Toran-Allerand, 1976), l'hippocampe (Gould et al., 1990), le mésencéphale (Beyer et al., 2000; Reisert et al.,

1987) et le cortex (Garcia-segura et al., 1989). L'oestradiol est aussi impliqué dans le développement neural au stade de la neurogénèse (Dodson et al., 1988). Il module la mort cellulaire apoptotique (Arai et al., 1996) et plus tard dans le développement, une fois que les circuits neuronaux deviennent fonctionnellement établis, il favorise la formation des synapses (Matsumoto et al., 1976).

Chez le mâle, les stéroïdes sexuels actifs sont principalement les androgènes (surtout la testostérone et la dihydrotestostérone) et sont majoritairement produits par les testicules alors que chez la femelle les oestrogènes (oestrone, oestradiol et oestriol) et les progestogènes (progestérone) le sont surtout par les ovaires.

1.1.2.2 Stéroïdes sexuels chez les invertébrés

La présence de plusieurs androgènes et oestrogènes est maintenant sans équivoque chez plusieurs embranchements d'invertébrés (Tableau I) incluant les arthropodes, mollusques, échinodermes et cnidaires (hydres, coraux, anémones). Plusieurs de ces stéroïdes ont été identifiés chez deux coraux mous de l'Antarctique, *Alcyonium paessleri* et *Clavularia frankliniana* et le corail dur *Montipora verrucosa* (Slattery et al., 1997; Tarrant et al., 1999). Tout récemment, l'oestradiol-17 β a été dosé chez un cnidaire octocorallien, *Renilla koellikeri* (Pernet et al., 2002). Les résultats ont révélé des variations saisonnières et inter-sexuelles des quantités d'oestradiol-17 β pouvant être corrélées avec des événements de la reproduction. Une première augmentation marquée de la concentration d'oestradiol apparaît au mois de mars et coïnciderait avec la reprise

de la maturation des gamètes. Au cours des mois d'avril et mai elle revient à un niveau plus basal puis au mois de juin une deuxième augmentation plus marquée, particulièrement chez les femelles, survient au moment de l'initiation de la ponte. Ceci suggère que l'oestradiol participerait à la synchronisation de la maturation des oocytes avec la période de la ponte afin d'optimiser les chances de fertilisation. Les niveaux d'oestradiol plus élevés dans les tissus somatiques (pédoncule et polype) que dans les œufs durant le pic de mars révèle une origine non-reproductive de l'oestradiol et suppose la nécessité qu'il soit transporté jusqu'aux tissus reproducteurs.

Type d'organisme	Substance présente	Rôle suspecté	Référence
Arthropode Insecte <i>Bombix Mori</i>	Oestradiol-17 β	Affecte la synthèse des protéines de la soie par les cellules de la glande à soie.	(Keshan et al., 2001)
Arthropode Crustacé <i>Uca arcuata</i>	Oestradiol-like Progesterone-like	Reproduction	(Shih, 1992)
Mollusque Bivalve <i>Mytilus edulis</i>	Oestradiol-17 β Oestrone Testostérone Progesterone	Rôles possibles dans la reproduction	(Reis-Henriques et al., 1990)
Mollusque Céphalopode <i>Octopus vulgaris</i>	Oestradiol-17 β Progesterone Testostérone	Contrôle hormonal du système reproducteur	(D'Aniello et al., 1996)
Échinoderme Astéride <i>Asterias rubens</i>	Oestrone Progesterone	Impliqués dans divers événements de la reproduction	(Voogt et al., 1984)
Échinoderme Astéride <i>Sclerasterias mollis</i>	Oestradiol-17 β Oestrone	Promouvoir l'oogénèse et synthèse protéique dans les ovaires.	(Xu et al., 1990)
	Progesterone	Fonction inhibitrice	

Échinoderme Échinide <i>Lytechinus variegatus</i>	Oestradiol-17 β Progesterone Testostérone Androstenedione	Impliqués dans divers événements de la reproduction.	(Wasson et al., 2000)
Cnidaire Anthozoaire <i>Montipora verrucosa</i>	Oestrone (E ₁) Oestradiol-17 β	Biorégulateurs de la gamétogénèse. Affectent la synthèse protéique.	(Tarrant et al., 1999)
Cnidaire Anthozoaire <i>Renilla koellikeri</i>	GnRH-like	Modulation du péristaltisme	(Anctil, 2000)
Cnidaire Anthozoaire <i>Renilla koellikeri</i>	Oestradiol-17 β	Reprise de la maturation des gamètes. Synchronisation de la maturation des oocytes autour de la ponte	(Pernet et al., 2002)
Cnidaire Anthozoaire <i>Alcyonium paessleri</i> et <i>Clavularia frankliniana</i>	Oestradiol-17 β Progesterone Testostérone Androstenedione	Aucun en particulier	(Slattery et al., 1997)
Cnidaire Anthozoaire <i>Simularia polydactyla</i>	Oestradiol-17 β Progesterone Testostérone	Contrôle hormonal de la gamétogénèse et de la ponte.	(Slattery et al., 1999)

Tableau I Tableau synoptique de la présence de stéroïdes généralement associés à la reproduction des vertébrés chez divers invertébrés.

1.1.2.3 Les stéroïdes en dehors du règne animal

Plusieurs stéroïdes (cholestérol, glucocorticoïdes, androgènes, oestrogènes, progestogènes, ecdystéroïdes, etc...) ayant longtemps été seulement associés aux mammifères, aux vertébrés et par la suite au règne animal, ont été détectés dans plusieurs organismes vivants très éloignés du règne animal.

Par exemple, l'oestrone, l'oestriol et la progestérone ont respectivement été détectés chez le palmier, le saule et le pommier mais ce ne sont que quelques exemples d'une longue liste de végétaux comportant des stéroïdes. Un autre exemple intéressant est la présence, chez certaines plantes supérieures, de l'ecdystéroïde présent chez les arthropodes. Bien que les plantes et les arthropodes soient très éloignés l'un de l'autre sur le plan évolutif, ils sont tous des eucaryotes et ceci pourrait nous laisser supposer que la biosynthèse de stéroïdes est une propriété des eucaryotes. Il est important de noter que la plupart des stéroïdes traditionnellement associés aux vertébrés isolés chez des végétaux sont soit des oestrogènes (C_{18}) ou des androgènes (C_{19}), et que la majorité des réactions de catabolisme de stéroïdes identifiées implique ces mêmes stéroïdes (Barrington, 1979). Ces stéroïdes sont donc largement distribués et ont été actifs très tôt dans l'évolution. La présence de phytoestrogènes chez certaines plantes ne semble cependant pas reliée à la reproduction de ces dernières mais servirait plutôt comme moyen de défense contre le stress oxydatif.

Contre toute attente, la biosynthèse de stéroïdes n'est pas limitée aux eucaryotes car le cholestérol et plusieurs stérols ont été détectés chez des procaryotes comme les bactéries, les algues procaryotes et les virus (Agarwal, 1993; Barrington, 1979).

1.2 Les récepteurs

Les récepteurs de stéroïdes sont principalement nucléaires mais ils peuvent aussi être membranaires ou les deux à la fois pour un même stéroïde. À titre d'exemple,

l'oestradiol-17 β possède trois types de récepteurs nucléaires (α , β et γ) (Hawkins et al., 2000), en plus de récepteurs membranaires qui, chez les vertébrés, semblent fortement localisés au niveau du cerveau (Beyer et al., 2003; Watson et al., 2002). Les trois types de récepteurs nucléaires à oestrogènes sont synthétisés à partir de gènes différents et sont structurellement et fonctionnellement distincts (Hawkins et al., 2000; Ho et al. 2002). Ils peuvent être activés par des concentrations de ligands différentes, avoir des distributions différentes ainsi que des effets différents, parfois même opposés.

Longtemps ignorés, les récepteurs membranaires à stéroïdes semblent maintenant de plus en plus étudiés. En ce qui concerne les récepteurs à oestrogènes, il y a donc des formes membranaires des récepteurs nucléaires α et β qui permettent une action rapide, non-génomique (Moss et al., 1999; Watson et al., 1999b), de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes contrairement aux formes nucléaires qui elles, par leur action génomique, prennent beaucoup plus de temps. D'après les résultats de Razandi et al. (1999) obtenus chez des hamsters transfectés, les récepteurs à oestrogènes membranaires seraient obtenus à partir du même transcrit, auraient une taille très similaire et des affinités presque identiques pour l'oestradiol-17 β , que leur forme nucléaire. Par contre, selon eux, les formes nucléaires seraient prédominantes puisqu'ils ont évalué à 3% et 2% la proportion de la forme membranaire des récepteurs à oestrogènes α et β respectivement. D'après leurs résultats, les deux formes (α et β) de récepteurs membranaires seraient en mesure de stimuler des voies de signalisation en interagissant avec des protéines G ce qui mènerait à l'activation de la phospholipase C et

de l'adenylyl cyclase et entraînerait respectivement l'augmentation des niveaux d'inositol-1,4,5-trisphosphate et d'AMPc. On en sait très peu sur la structure des formes membranaires des récepteurs à oestrogènes mais on suppose que leur séquence d'acides aminés est similaire à la forme nucléaire. En effet, plusieurs anticorps générés contre différents domaines des formes nucléaires des récepteurs à oestrogènes reconnaissent dans plusieurs cellules, la forme membranaire (Levin, 1999; Razandi et al., 1999). Plusieurs effets ont donc été attribués à ces récepteurs membranaires comme la décharge de vésicules sécrétrices (Watson et al., 1999a), l'activation de MAP-kinases, la production d'AMPc et la génération d'inositol phosphate (Dechering et al., 2000). Les formes membranaires des récepteurs à oestrogènes peuvent aussi ultimement aller affecter l'expression des gènes. Il est à noter que l'oestradiol-17 β peut aussi se lier à une multitude d'autres sites comme sur des canaux potassiques, des récepteurs adrénergiques, calciques et GABAergiques, ce qui entraînera une panoplie d'effets (Levin, 1999; Nadal et al., 2001).

1.2.1 La superfamille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs des hormones stéroïdes font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires qui comprend aussi les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, aux rétinoïdes (formes actives de la vitamine A), à la vitamine D en plus d'une vaste gamme de récepteurs orphelins nommés ainsi parce qu'aucun ligand n'existe ou n'a été encore identifié pour eux (Tableau II). Certains de ceux qui ne possèdent pas de ligand auraient une activité constitutive alors que d'autres pourraient être activés par d'autres moyens

comme par exemple par phosphorylation (Aranda et al., 2001; Weigel, 1996). On dit d'un récepteur possédant une activité constitutive qu'il peut être actif en l'absence d'agoniste.

Sous-familles	Récepteurs	Sous-types	Noms	Ligands
I	TR	α, β	Thyroid hormone receptor	Thyroid hormone (T_3)
	RAR	α, β, γ	Retinoic acid receptor	Retinoic acid
	VDR		Vitamin D receptor	1-25(OH) $_2$ vitamin D $_3$
	PPAR	α, β, γ	Peroxisome proliferator activated receptor	Benzoflone BE Wy 14643 Eicosanoids; thiazolidinediones (TZD) $_2$; 15-deoxy-12,11-prostaglandin J $_2$ polyunsaturated fatty acids
	PXR		Pregnane X receptor	Pregnanes; C21 steroids
	CAR/MD67	α, β	Constitutive androstane receptor	Androstanes; 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene
	LXR	α, β	Liver X receptor	Oxysterols
	FXR		Farnesoid X receptor	Bile acids
	RevErb	α, β	Reverse ErbA	Unknown
	RZR/ROR	α, β, γ	Retinoid Z receptor/retinoic acid-related orphan receptor	Unknown
II	UR		Ubiquitous receptor	Unknown
	RXR	α, β, γ	Retinoid X receptor	13- <i>trans</i> -retinoic acid
	COUP-TF	α, β, γ	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor	Unknown
	HNF-1	α, β, γ	Hepatocyte nuclear factor 1	Fatty acyl-CoA thioesters
	TLX PNR		Tailless-related receptor Photoreceptor-specific nuclear receptor	Unknown Unknown
III	TR2	α, β	Testis receptor	Unknown
	GR		Glucocorticoid receptor	Glucocorticoids
	AR		Androgen receptor	Androgens
	PR		Progesterone receptor	Progestins
	ER	α, β, γ	Estrigen receptor	Estradiol
IV	ERR	α, β, γ	Estrigen-related receptor	Unknown
	NGF1B	α, β, γ	NGF-induced clone B	Unknown
V	SF-1/FTZ-F1	α, β	Steroidogenic factor 1 Fushi Tarazu factor 1	Oxysterols
VI 0	GCNF		Germ cell nuclear factor	Unknown
	SHP		Small heterodimeric partner	Unknown
	DAX-1		Dosage-sensitive sex reversal	Unknown

Tableau II Tableau représentant les sous-familles de la superfamille des récepteurs nucléaires mammaliens à l'exception du ER γ qui provient d'un poisson. Tiré et adapté de Aranda et al. 2001.

Au cours des 15 dernières années, ce domaine d'étude fût très prolifique et plusieurs groupes de recherche ont travaillé à identifier ces récepteurs nucléaires, ce qui a mené à l'identification de plus de 300 séquences de récepteurs nucléaires sans que la nomenclature soit uniformisée, causant ainsi un obstacle à la compréhension des nouvelles connaissances acquises (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Il y a environ 5 ans, dans le but de simplifier les choses, quatre chercheurs dans le domaine se sont regroupés pour former un comité dont la mission est de produire un système unifié pour la nomenclature des récepteurs nucléaires (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Ce système est basé sur l'évolution de deux domaines bien conservés des récepteurs nucléaires soit le domaine C de liaison à l'ADN et le domaine E de liaison au ligand (Figure 1.1). cette nomenclature, par la suite endossée par quelques 40 chercheurs actifs dans le domaine, est composée de 6 sous-familles (Tableau II) pour un total de plus de 60 membres (Enmark et al., 1999; Laudet, 1997). Celle à laquelle nous nous intéressons est la sous-famille 3 qui comprend les récepteurs nucléaires à oestrogènes, androgènes et progestogènes, glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes (Escriva et al., 2000).

1.2.1.1 Le récepteur nucléaire

Le récepteur nucléaire est une protéine généralement située dans le noyau dont le nombre d'acides aminés (généralement entre 400 et 1200) varie d'un type de récepteur à l'autre que ce soit pour deux récepteurs à des substances différentes ou deux récepteurs à la même substance chez deux espèces différentes (Owen et al., 2000). Malgré cette

grande variabilité du nombre d'acides aminés, les récepteurs nucléaires ont en commun des domaines fonctionnels et structuraux.

Un récepteur nucléaire type est composé de 5 ou 6 domaines (A à F), celui aux oestrogènes en compte six (Figure 1.1). La région N-terminale constituée des domaines

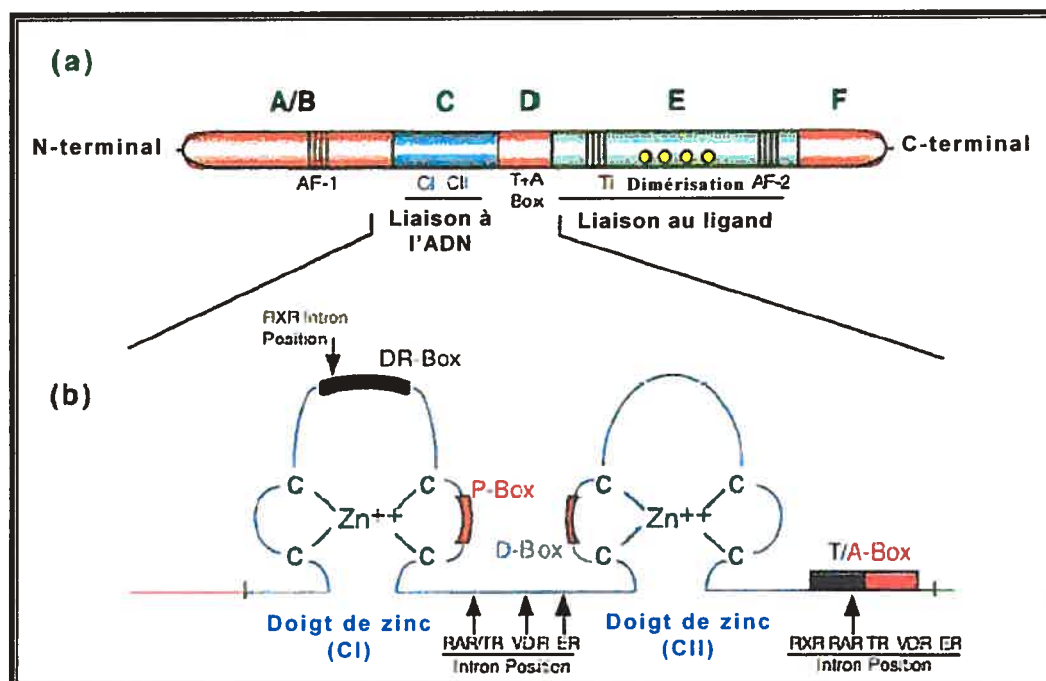


Figure 1.1 Domaines fonctionnels conservés des récepteurs nucléaires. a) Le domaine A/B N-terminal, le domaine (C) de liaison à l'ADN, un domaine charnière variable (D), le domaine (E) de liaison au ligand (LBD) et le domaine c-terminal (F). b) Détails des deux doigts de zinc (C1 et C2). Tiré et adapté de (Owen et al., 2000).

A et B est très variable et comporte une fonction de transactivation de la transcription indépendante du ligand (AF-1), mais dépendante du promoteur et du type cellulaire. Vient ensuite le domaine C qui est le plus conservé des six et qui est le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA binding domain) qui se liera aux ERE (estrogen response element). Il comporte deux motifs en doigt de zinc riches en cystéine dont le premier (n-

terminal) possède une boîte proximal ou «P-box» responsable de la spécificité ou sélectivité de la séquence du site de liaison à l'ADN et le deuxième une boîte distale ou «D-box» servant à discriminer les ERE ayant des séquences similaires. Le domaine D est peu conservé et sert en quelque sorte de charnière ou de pivot permettant au récepteur (protéine) de changer de conformation. En outre, une portion de ce domaine serait nécessaire à la liaison d'un ligand avec un maximum d'affinité. Concernant le domaine E (domaine de liaison au ligand, LBD) il est le deuxième domaine le plus conservé et il comporte lui aussi une fonction de transactivation de la transcription (AF-2) en plus d'inclure des régions impliquées dans la dimérisation du récepteur, dans des interactions avec les HSP (Heat Shock Protein) et les cofacteurs. Le LBD (ligand binding domain) est constitué de 12 hélices α et de 2 courts feuilletts β . Finalement, le domaine F (parfois absent mais présent chez le ER) situé à l'extrémité C-terminale est important pour l'activation de la transcription et pour les activités répressives des antioestrogènes, et pourrait jouer un rôle dans le maintien de la conformation du récepteur pour les interactions protéine-protéine requises pour la transcription et moduler les interactions avec les co-activateurs (Enmark et al., 1999; Owen et al., 2000; Rollerova et al., 2000).

Ce projet d'étude est lié de très près aux récepteurs à oestrogènes. Pour cette raison, nous ne pourrions pas clore cette section sur les récepteurs nucléaires sans glisser un mot sur les récepteurs apparentés aux récepteurs à oestrogènes (ERR, estrogen related-receptor). Ces récepteurs sont des récepteurs orphelins ayant un certain degré de

similitude au point de vue de leur séquence d'acides aminés et de leurs domaines avec le récepteur à oestrogènes humain. En ce qui concerne le LBD, la similitude est plutôt modérée soit environ 36 % ce qui explique pourquoi les ERR ne se lient pas à l'oestradiol mais pour ce qui est du DBD, le pourcentage de similitude est beaucoup plus considérable soit 68 % (Vanacker et al., 1999c). Il existe plusieurs ERR (ERR_{α} , ERR_{β} , $ERR_{\gamma 1}$, $ERR_{\gamma 2}$) et ils ont des patrons de distribution qui peuvent varier entre eux. Ces récepteurs orphelins peuvent agir sur la transcription de diverses façons comme par exemple en se liant au ERE, en se liant comme homodimère au SFRE (SF-1 response element, SF-1 étant un récepteur orphelin) ou par des contacts protéine-protéine (Rollerova et al., 2000). Bien qu'ils soient encore considérés comme orphelins, les récepteurs ERR_{α} et ERR_{β} vont probablement devenir des récepteurs à part entière car il semble qu'un facteur présent dans le sérum soit nécessaire à leur action (Vanacker et al., 1999a; Vanacker et al., 1999c).

1.2.1.2 Mode d'action du récepteur nucléaire

Étant donné son lien plus intime avec le projet, le mode d'action du récepteur nucléaire qui sera décrit est celui pour le récepteur nucléaire à oestrogènes. Cependant, mis à part quelques détails comme les modes d'activation possibles du récepteur, les différents types de dimères qui peuvent être formés ou encore les sites de fixation à l'ADN, le mode d'action est très similaire d'un récepteur nucléaire à l'autre. Le récepteur nucléaire est un facteur de transcription qui agit au niveau du noyau en

modulant (activation ou inhibition) la transcription de certains gènes en se liant à des sites spécifiques sur l'ADN.

Les cellules peuvent répondre aux oestrogènes de différentes façons et parfois même de manière opposée et ce, en raison de la présence de deux récepteurs à oestrogènes (ER, estrogen receptor) fonctionnellement distincts (ER_{α} et ER_{β}) et aussi, à cause de leurs aptitudes à interagir avec différents co-facteurs et protéines de signalisation. Ces deux

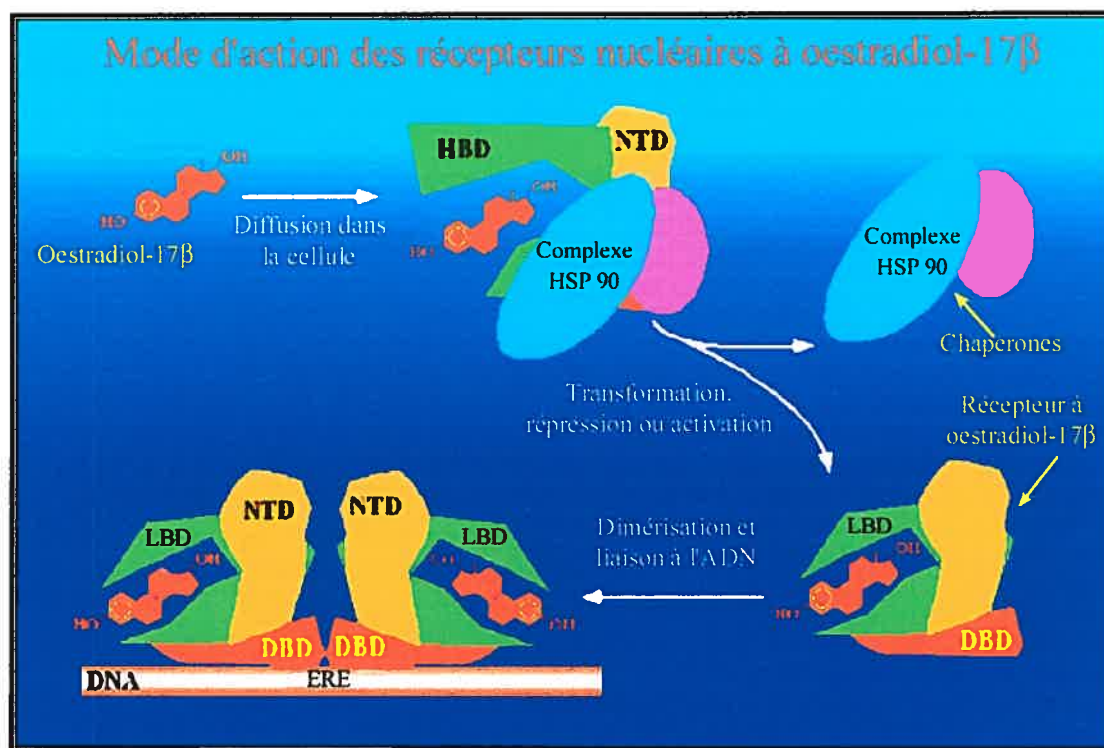


Figure 1.2 Mode d'action des récepteurs nucléaires à oestradiol-17 β . LBD, ligand-binding domain; NTD, N-terminal domain; DBD, DNA-binding domain; ERE, estrogen response element. Tiré et adapté de (www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_4/Page_2.htm).

récepteurs ont pour ligand l'oestradiol-17 β (E₂) mais peuvent se comporter différemment car, par exemple, ER α lié à son ligand peut activer la transcription alors

que ER β lui aussi lié au ligand peut l'inhiber et cette différence dans la réponse s'observe également avec des ligands synthétiques (McDowall, 2003).

En l'absence de ligand, le ER se situe dans le noyau (et non pas dans le cytoplasme), imbriqué dans un complexe de protéines de choc thermique (heat shock protein, HSP 90) qui inhibe son action. Lorsque l'oestradiol-17 β est présent, il se lie au ER, le domaine de liaison au ligand (LBD) change de conformation afin de déplacer les protéines de choc thermique et faciliter la liaison des cofacteurs qui promouvoient (coactivateurs) ou inhibent (corépresseurs) l'interaction du récepteur avec ses gènes cibles. Le ER peut affecter l'expression des gènes en se liant sous forme de dimère (homo ou hétéro) directement aux gènes cibles sur l'ADN par l'entremise d'un élément spécifique (palindrome) de réponse aux oestrogènes (ERE) ou en se liant à d'autres facteurs de transcription déjà liés à l'ADN (Rollerova et al., 2000). Le ER peut aussi être activé d'une manière indépendante du ligand via une variété de voies de signalisation intracellulaires comme la protéine kinase mitogène-activée (MAPK). Ces voies de signalisation exercent leurs effets par la phosphorylation du ER par des protéines kinases ou de manière plus indirecte par régulation de cofacteurs liés au récepteur.

1.2.1.3 Évolution des récepteurs nucléaires et plus particulièrement ceux de la sous-famille III

Pratiquement deux décennies ont passé depuis le premier clonage d'un récepteur nucléaire à hormones stéroïdiennes (Aranda et al., 2001; Owen et al., 2000). En 1986, le premier récepteur à oestradiol (ER_{α}) est cloné puis 10 ans plus tard, en 1996, un deuxième (ER_{β}) (Fannon et al., 2001). À peine deux années se sont écoulées (1998) avant qu'on entende parler d'un autre isoforme (ER_{γ}) isolé et purifié à partir du foie de souris (Rao, 1998). Ce troisième isoforme tout d'abord qualifié de putatif fut confirmé entre autres chez un poisson téléostéen (Hawkins et al., 2000). Comme la figure 1.3 le démontre, les récepteurs nucléaires sont loin d'être l'apanage des vertébrés et sont largement distribués chez les invertébrés. Cependant, l'accumulation des données de séquençage tend à montrer que les récepteurs nucléaires sont limités aux métazoaires, exceptés les spongiaires (éponges), et seraient donc absents chez les plantes et les levures (Escriva et al., 1997; Laudet, 1997; Owen et al., 2000).

Bien qu'il y ait des récepteurs nucléaires chez les invertébrés, il apparaît plus difficile d'identifier leurs ligand ou d'associer des récepteurs à un ligand particulier tel les récepteurs à hormones stéroïdiennes. Tout de même, ce type de récepteur semble être présent chez les invertébrés. En 1982, on découvrait pour l'une des premières fois chez un invertébré (échinoderme) une protéine cytoplasmique se liant spécifiquement à l'oestradiol (De Waal et al., 1982). Ce même type de protéine fut aussi trouvé chez un *Bombix Mori* (vers à soie) (Keshan et al., 2001) mais encore là, on ne peut lui donner

officiellement le nom de récepteur faute de ligand. Entre 1998 et 2002, un groupe de chercheurs d'Italie a été très prolifique dans ce domaine en détectant un récepteur à progestérone et à oestradiol-17 β chez le céphalopode *Octopus vulgaris* (Di Cosmo et al., 2002; Di Cosmo et al., 1998) ainsi qu'en visualisant de l'immunoréactivité pour ces mêmes récepteurs chez l'écrevisse *Austropotamobius pallipes* (Paolucci et al., 2002). Un récepteur à oestrogènes a aussi été caractérisé pharmacologiquement, cloné et séquencé chez un autre mollusque (un bivalve) soit le pétoncle de mer *Placopecten magellanicus* et ses sites de liaisons aux oestrogènes possèdent une affinité et une spécificité très similaires au récepteur à oestrogènes des vertébrés (Wang, 2000).

Jusqu'à maintenant, les cnidaires seraient les animaux les plus primitifs chez lesquels des récepteurs nucléaires ont été identifiés (COUP, FTZ-F1, RXR), mais mis à part le récepteur à l'acide rétinoïque (RXR), ces récepteurs sont tous orphelins et appartiennent aux sous-familles II et V ce qui laisse supposer que l'ancêtre des récepteurs nucléaires est un précurseur de ces deux sous-familles. Chez l'hydre, on note la présence d'une séquence d'un récepteur nucléaire orphelin COUP et chez l'anémone, un cnidaire de la classe des anthozoaires, on en connaît quatre (Escriva et al., 1997). Le premier récepteur nucléaire à être identifié chez un corail dur est le récepteur orphelin COUP-TF (chicken ovalbumine upstream promoter transcription factor (Tarrant, 2002). Peu de temps après, chez le corail dur *Acropora millepora*, on a identifié 10 gènes de récepteurs nucléaires dont au moins trois codent pour des protéines complètes faisant ainsi passer le nombre de séquences codantes pour des récepteurs nucléaires chez un

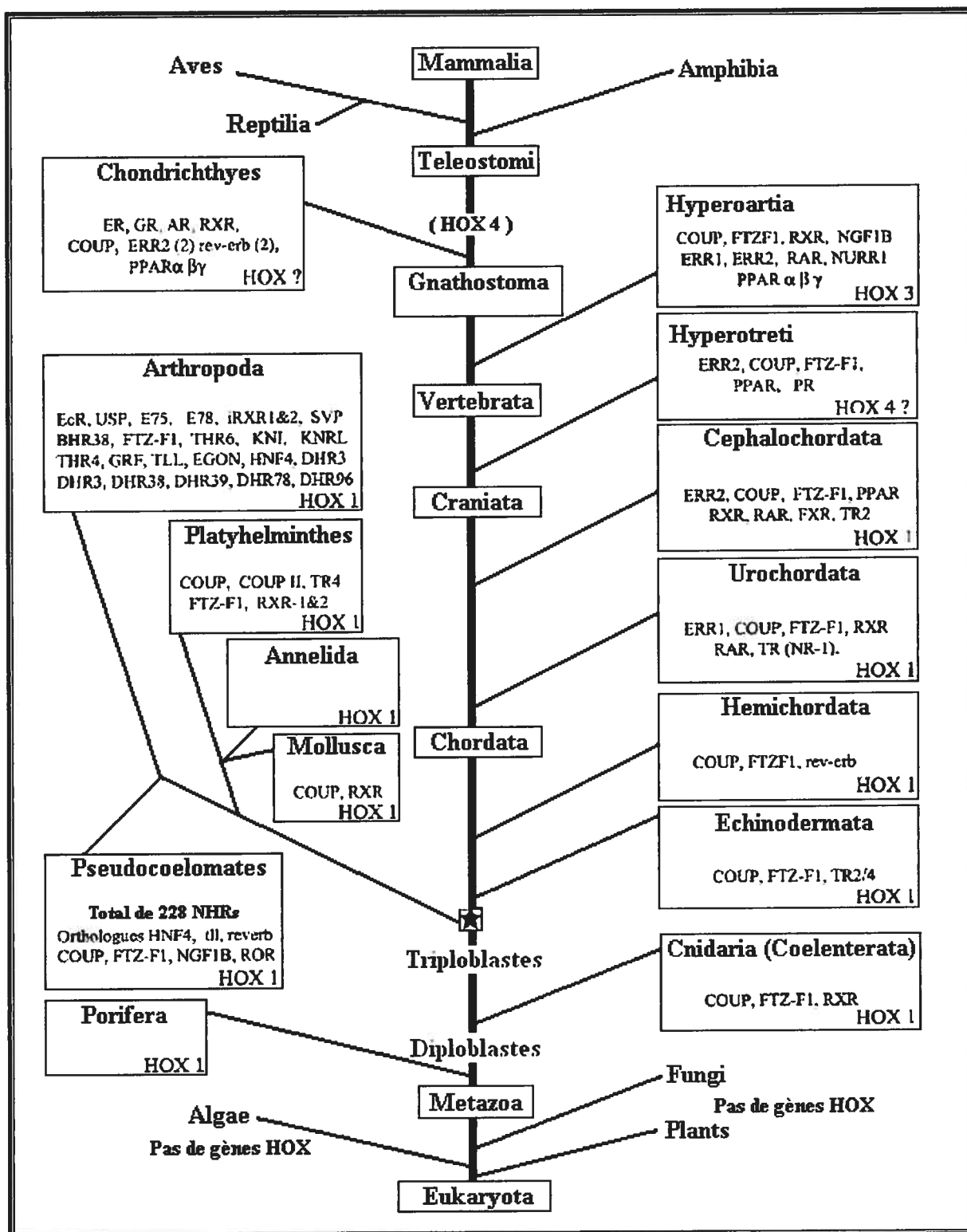


Figure 1.3 Arbre phylogénétique montrant la distribution des récepteurs nucléaires parmi les eucaryotes. Cette figure n'est pas à l'échelle et il est à noter que seul les récepteurs nucléaires identifiés jusqu'à la date de l'article y sont indiqués et ne suggèrent pas l'absence de quelques récepteurs nucléaires que ce soit dans les différentes classes. Tiré et adapté de (Owen et al., 2000).

cnidaire de 1 à 4 (Grasso et al., 2001). Au point de vue de la séquence d'acides aminés dérivée de ces gènes, plusieurs ont des forts pourcentages de similitude avec des récepteurs connus et certains possèdent même les motifs nécessaires à une activation par un ligand. Cependant, aucun ligand n'a encore été identifié pour ces récepteurs. Chez *Tripedalia cystophora*, une méduse de la classe des cubozoaires, on a trouvé une séquence codant pour un récepteur à l'acide rétinoïque X (RXR) (Kostrouch et al., 1998).

Il est généralement admis que les premiers récepteurs à stéroïdes à avoir existé seraient ceux aux oestrogènes suivis par ceux de la progestérone et des corticostéroïdes. Leur ancêtre serait un récepteur orphelin se liant à l'ADN sous forme d'homodimère (Baker, 2002; Laudet, 1997; Thornton, 2001) ayant acquis au cours de l'évolution la capacité de lier un ligand. Par contre, les divers types de récepteurs nucléaires activés par un ligand auraient acquis indépendamment cette capacité ce qui implique qu'elle soit apparue plusieurs fois dans l'évolution (Escriva et al., 1997).

Comme il le sera davantage détaillé dans la discussion à la section 4.1.3, plusieurs indices nous laissent croire qu'il serait vraisemblable qu'un récepteur apparenté au récepteur à oestrogènes alpha des vertébrés se retrouve chez *Renilla koellikeri*. Thornton (2001) a affirmé que l'ancêtre du récepteur à stéroïdes serait à 71% identique au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain et en 2003 (Thornton et al.) ont isolé et amplifié une séquence d'un récepteur à oestrogènes chez *Aplysia californica* qui avait plusieurs similarités avec les récepteurs à oestrogènes des vertébrés. De plus, les

résultats de Kortschak et al. (2003) indiquent que le génome d'*Acropora millepora* (un cnidaire) est plus similaire à celui de l'humain qu'à celui de *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans*. Ensembles, ces indices tendent à démontrer que les cnidaires sont moins éloignés ou génétiquement différents des humains qu'on ne le croyait.

1.3 Portrait du modèle expérimental utilisé

La rénille, ou pensée de mer (figure 1.4), fait partie de la classe des anthozoaires (anémones, coraux). Donc comme les hydrozoaires (les hydres), les scyphozoaires (les hydroméduses) et les cubozoaires (cuboméduses), elle appartient à l'embranchement des cnidaires. Sa classe est celle des octocoralliaires car les polypes possèdent 8 cloisons et 8 tentacules et sa symétrie est à première vue radiaire octamérique (d'ordre 8). Un examen plus approfondi montre que bien des caractères, tels que l'aplatissement latéral du pharynx et la présence d'un seul siphonoglyphe ou sulcus (gouttière ciliée située au niveau du pharynx des autozoïdes servant à créer un courant inhalant dans la cavité gastrique chez les anthozoaires) transforment la symétrie octoradiaire en une symétrie bilatérale. On parlera donc d'une symétrie radiobilatérale.

C'est un animal colonial dont la colonie mâle ou femelle est issue d'un polype primaire ou axial (ayant la forme d'une feuille) sur lequel bourgeonnera des polypes secondaires sur la surface supérieure du rachis seulement. La colonie est composée de deux types d'individus (polypes secondaires); les autozoïdes (polypes servant à

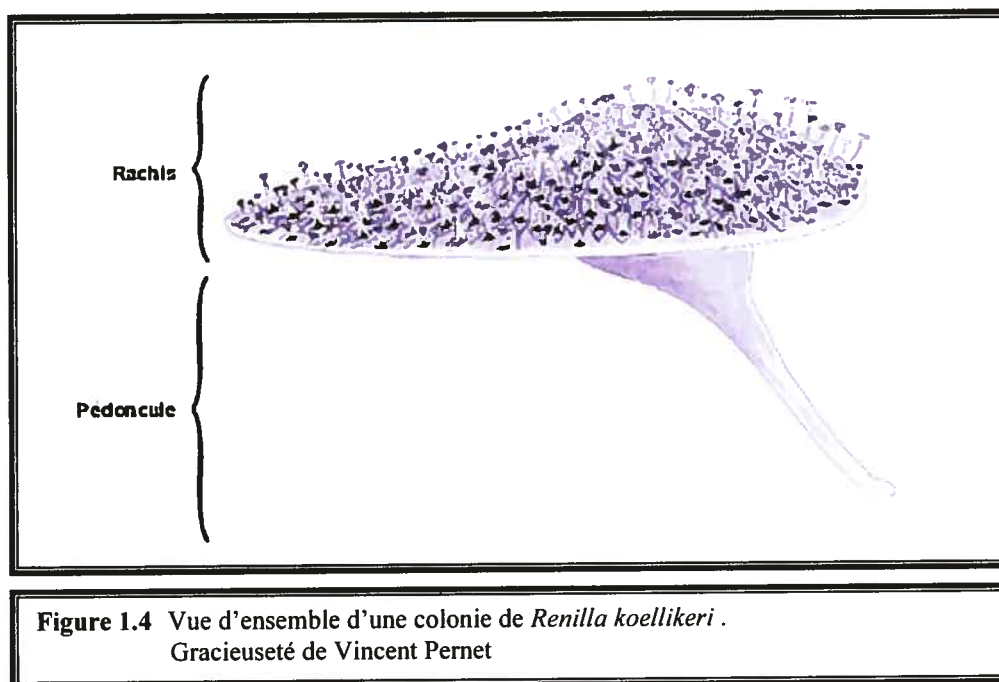


Figure 1.4 Vue d'ensemble d'une colonie de *Renilla koellikeri*.
Gracieuseté de Vincent Pernet

l'alimentation, la reproduction et à la défense) et les siphonozoïdes (polypes servant à pomper l'eau dans la colonie). Les autozoïdes mesurent de 1 à 3 cm, ont huit tentacules pinnulés et, lorsqu'ils sont complètement sortis de leur chambre, sont beaucoup plus grands que les siphonozoïdes (2-3 mm), qui eux, n'ont pas de chambre dans le rachis.

Contrairement à certains cnidaires où deux générations alternent (polype et méduse), la pensée de mer ne possède que le stade polype. Aussi, à la différence des coraux durs qui possèdent un squelette externe fortement calcifié et dont la forme de la colonie peut varier beaucoup pour une même espèce, la rénille est un corail mou ayant toujours la forme d'une feuille et dont la faible calcification est constituée d'un treillis de spicules calcaires situés dans la mésoglée. Elle est de couleur violet et mesure environ 10 cm de diamètre sur 1 cm d'épaisseur.

Sur le plan évolutif, les cnidaires viennent juste après les spongiaires (éponges) et, comme ces derniers, ils sont caractérisés par l'apparition de deux couches (organisation diploblaste) de tissus véritables : l'ectoderme (épiderme) qui couvre l'extérieur de l'animal et la lumière du pharynx et l'endoderme (gastroderme) qui tapisse l'appareil digestif. Ces deux couches de tissus sont séparées par une couche gélatineuse nommée mésoglée qui varie beaucoup en épaisseur selon les espèces et selon la région de l'animal (Beauvais et al., 1987). Les cnidaires sont parmi les animaux les plus primitifs à posséder une ébauche de système nerveux. Ce système nerveux synaptique possède une conduction diffuse et non-polarisée (Barnes, 1987). Il est principalement localisé au niveau de l'ectoderme et de la mésoglée mais il est tout de même présent dans l'endoderme (Beauvais et al., 1987 ; Lyke, 1965). Il est composé de véritables cellules nerveuses (uni-, bi- et multipolaires) qui peuvent être classées sur le plan fonctionnel en cellules sensorielles et ganglionnaires .

Comme son nom l'indique, la pensée de mer vit en eau salée. On la retrouve près du littoral dans des courants modérés où elle demeure généralement ancrée sur les fonds (benthique) sablonneux à l'aide d'un pédoncule. Ce pédoncule est cependant rétractable et sous le contrôle de la colonie et peut donc à tout moment être rétracté afin de permettre à l'animal de se laisser transporter par les courants marins, ce qui constitue son seul moyen de locomotion. Le péristaltisme que l'on peut observer au niveau du rachis sert à la circulation de l'eau dans la colonie ainsi qu'à faire émerger la colonie du substrat (sable) qui peut la recouvrir et non comme moyen de locomotion.

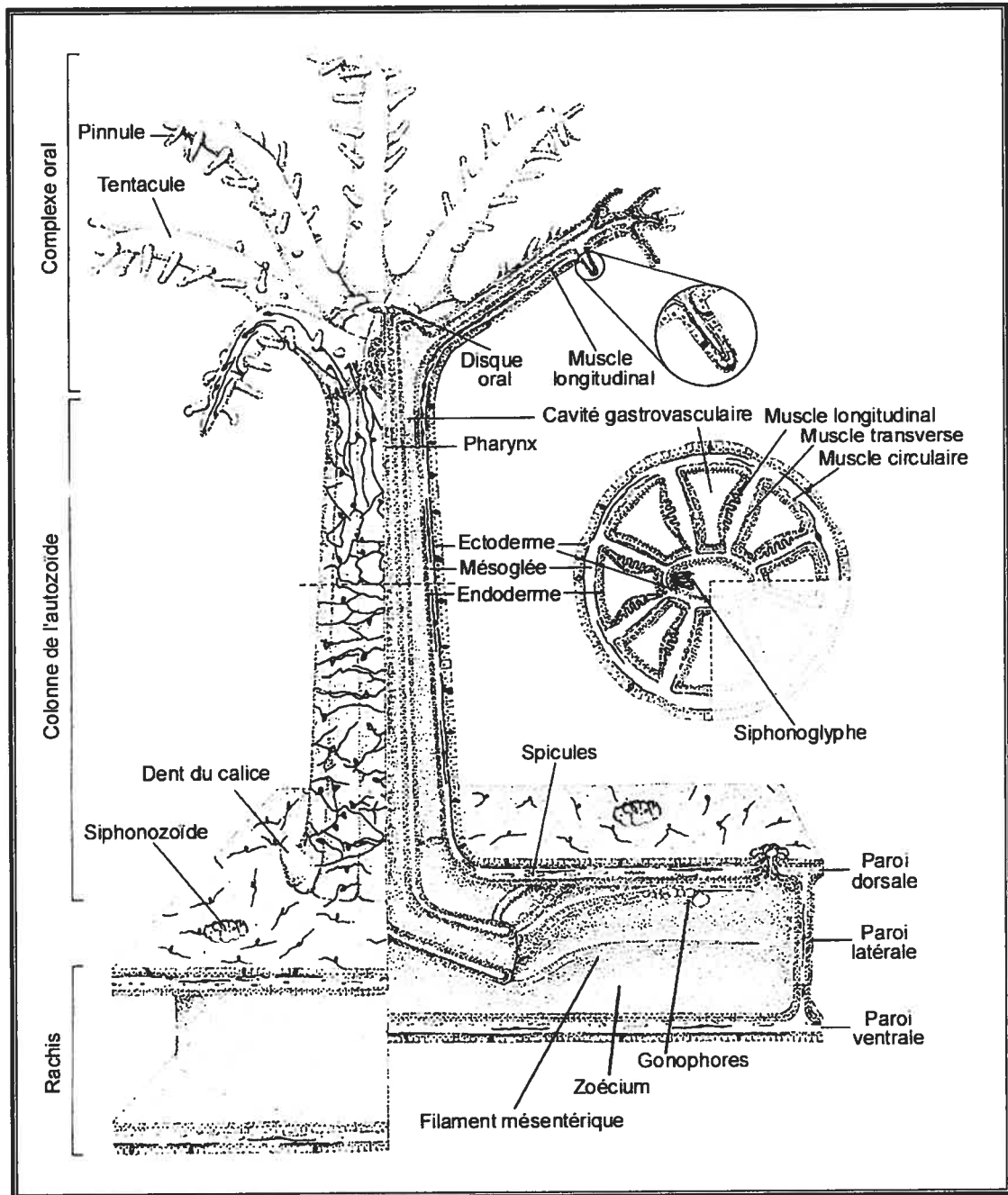


Figure 1.5 Anatomie d'un autozoïde de *Renilla koellikeri*.
Tiré et adapté de (Umbriaco et al., 1990)

1.3.1 Organisation tissulaire

Tel que mentionné précédemment, la rénille est constituée de deux véritables couches cellulaires (épithéliales) entre lesquelles s'insère une gelée moins bien organisée nommée mésogée, mais contenant plusieurs cellules (Beauvais et al., 1987). Chez les triploblastiques, c'est le mésoderme qui remplace la mésogée.

L'ectoderme recouvre l'extérieur de l'animal (rachis et pédoncule) ainsi que les polypes secondaires (autozoïdes et siphonozoïdes). Dans le cas des polypes secondaires, l'ectoderme de la surface supérieure du rachis est en continuité avec celui du polype et se poursuit jusque dans le pharynx, donc la paroi du pharynx est ectodermique (Beauvais et al., 1987 ; Lyke, 1965). Au niveau du rachis il est recouvert d'une mince couche, la cuticule. Sur la face dorsale de la colonie, l'ectoderme a parfois tendance à former des renforcements ou crevasses plus ou moins profonds (Beauvais et al., 1987). L'ectoderme assure principalement des rôles de protection (sécrétion de mucus), de défense et de capture de proies (nématocystes).

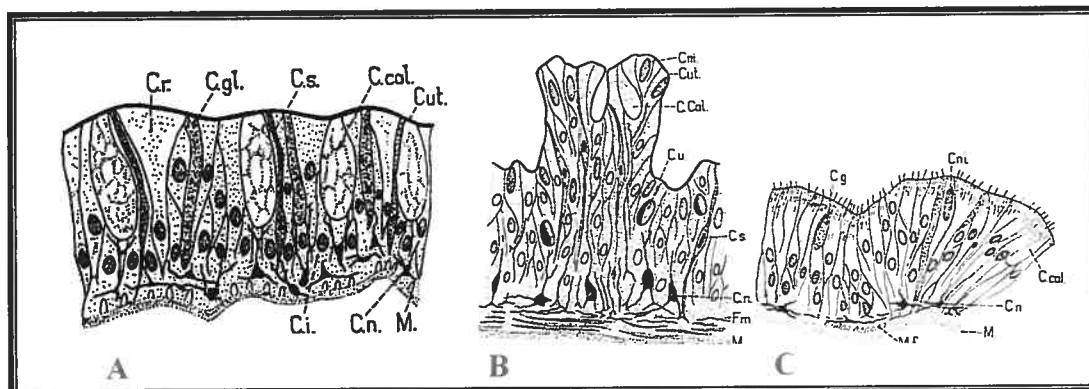


Figure 1.6 Coupe transversale d'ectoderme d'un pennatulide. Au niveau du rachis (A), d'un tentacule d'autozoïde (B) et du pharynx (C). C.r., cellule de revêtement; C.gl., cellule glandulaire; C.s., cellule sensorielle; C.cal., cellule caliciforme; Cut., cuticule; C.i., cellule interstitielle; M., mésogée; Cni., cninoblaste; C.u., cellule urticante; F.m.et M.f., fibre musculaire. Tiré et adapté de (Beauvais et al., 1987).

La mésogée, qui n'est pas considérée comme une couche tissulaire, est cependant très importante. Située entre l'ectoderme et l'endoderme ou entre deux couches d'endoderme, elle sert en quelque sorte de matrice d'ancrage pour les prolongements musculaires des cellules musculo-épithéliales de l'endoderme et de l'ectoderme (Figures 1.5 et 1.6) (Buisson et al., 1969). C'est aussi dans la mésogée que l'on retrouve le squelette interne de l'animal, c'est-à-dire les spicules calcaires de forme allongée composés de calcite qui assurent une certaine rigidité à la colonie (Buisson et al., 1969; Lyke, 1965). La mésogée du rachis est en continuité avec celle des polypes secondaires et peu importe où l'on se situe dans la rénille, il y a

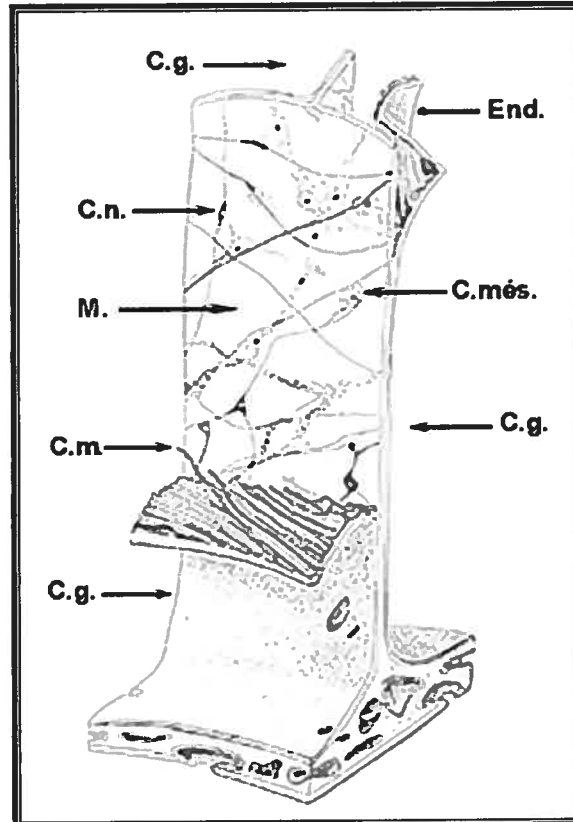


Figure 1.7 Mésogée d'un pennatulide. Au niveau du rachis. C.g., cavité gastrique d'un autozoïde; C.n., cellule nerveuse; M., mésogée; C.m., cellule myoépithéliale; End., endoderme; C.més., cellule mésoenchymateuse. À noter que les spicules ne sont pas présents afin de mieux voir les autres types cellulaires. Tiré et adapté de (Buisson et al., 1969).

toujours de la mésogée entre l'ectoderme et l'endoderme mais son épaisseur et sa composition peuvent changer. Dans le rachis et le pédoncule, la mésogée contient beaucoup de spicules calcaires et elle est très épaisse (3-4 fois l'épaisseur de l'ectoderme) mais dans les autozoïdes elle est très mince (1/3-1/4 de l'épaisseur de

l'ectoderme) et sans spicule. Sur des coupes histologiques, la présence ou l'absence de spicules sert de moyen de repère.

L'endoderme, forme les murs internes de la colonie et des polypes secondaires. Il est le siège des principales couches musculaires et il est grandement responsable de la digestion (Beauvais et al., 1987). Tous les muscles de la colonie, sauf exception au niveau des tentacules autozoïdes, sont endodermiques. En effet, on retrouve une musculature longitudinale d'origine ectodermique au niveau du disque oral et des tentacules des autozoïdes. La musculature de la colonie entière est subdivisée en trois groupes : la musculature des parois de la colonie, la musculature de l'axe et la musculature des polypes (Beauvais et al., 1987).

La musculature des parois de la colonie est essentiellement composée d'une couche externe de fibres longitudinales et d'une couche plus profonde de fibres transversales souvent circulaires. Les fibres longitudinales se retrouvent sur les faces ventrales et dorsales du rachis mais sont plus abondantes sur la face ventrale, et elles se situent juste en-dessous de l'ectoderme et séparent en deux l'épaisse couche de mésogée. Cette musculature sert à la rétraction et à la protraction des autozoïdes, à la contraction et l'extension du rachis ainsi qu'à la circulation de l'eau dans la colonie (Beauvais et al., 1987). Les fibres transversales, plus profondes, sont situées sur les murs internes du rachis (parois latérales) (Figures 1.5 et 1.7) ainsi que dans le pédoncule et contribuent principalement au péristaltisme du rachis et aux contractions et dilatations du pédoncule servant au contrôle du volume et à la circulation de l'eau (Beauvais et al., 1987).

La musculature de l'axe (ligne médiane du rachis et pédoncule) est composée de deux séries de muscles : une musculature apicale et une oblique. La musculature apicale est localisée dans le rachis et supporte la portion supérieure et l'extrémité apicale de l'axe. La musculature oblique, elle, est limitée au pédoncule et supporte la portion inférieure et l'extrémité distale de l'axe. Ensemble, ces deux séries de muscles servent à l'étirement et à la contraction de l'axe ainsi qu'à une torsion spirale du pédoncule lui permettant de creuser dans le sable pour ancrer la colonie (Beauvais et al., 1987).

La musculature des polypes secondaires (seulement les autozoïdes) est constituée de trois groupes de muscles : les muscles longitudinaux, transverses et circulaires (Figures 1.5 et 1.6) (Beauvais et al., 1987). Les muscles longitudinaux sont responsables de la contraction de l'autozoïde et leurs fibres musculaires (portion contractile des cellules myoépithéliales) sont parallèles à l'axe de la colonne. Les muscles transverses, eux, servent à faire courber la colonne et leurs fibres sont perpendiculaires à l'axe de la colonne. Enfin, les muscles circulaires dont les fibres forme pratiquement deux anneaux, l'un externe autour de l'ensemble des 8 chambres radiaires de la cavité gastrovasculaire l'autre interne autour du pharynx ont pour fonction la constriction de la colonne (Beauvais et al., 1987). Toutes les parois des chambres du rachis sont constituées d'endoderme avec de la mésoglée entre les cloisons de deux chambres juxtaposées (Buisson et al., 1969). De la même manière, les septums (au nombre de 8) des cavités gastrovasculaires des autozoïdes sont constitués d'endoderme ainsi que les filaments mésentériques qui sont les prolongements des septes et dont quatre (2 paires latérales) portent les gamètes (Beauvais et al., 1987).

1.3.2 Diversité cellulaire

1.3.2.1 De l'ectoderme

De façon générale, l'ectoderme (15-25 μm d'épaisseur) est principalement composé d'un épithélium monostratifié à cellules de revêtement hautes (15-30 μm) et assez

étroites (6-10 μm) dont la surface libre est recouverte d'une formation cuticulaire sécrétée par la cellule et dont le noyau à protoplasme granuleux est de forme elliptique et situé dans la moitié inférieure

(ectoderme du rachis) ou au centre (ectoderme des autozoïdes) du cytoplasme (Beauvais et al., 1987;

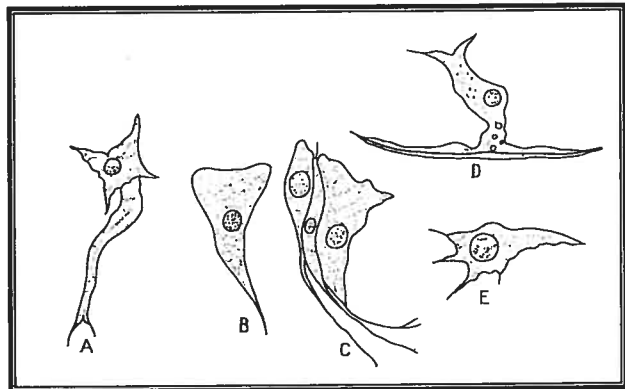


Figure 1.8 Cellules ectodermiques d'un pennatulide. A,B, cellules de revêtement de la paroi polypaire; C, cellules ectodermiques tentaculaires (une cellule sensorielle entre deux cellules de revêtement); D, cellule musculaire; E, cellule interstitielle. Tiré de Beauvais et al. (1987).

Buisson, 1970). Il y a ensuite les cellules interstitielles, plus petites de formes assez irrégulières, situées près de la mésoglée, et n'atteignant pas la cuticule. Au niveau des autozoïdes, ces cellules sont de formes arrondies et beaucoup plus abondantes que dans le rachis ou le pédoncule. Ce sont des cellules indifférenciées pouvant devenir presque n'importe quel type de cellules sauf des cellules épithéliales. Aussi, il y a une panoplie de cellules davantage spécialisées tel que : les cellules glandulaires, sensorielles, nerveuses, musculaires et urticantes (Figure 1.8). Les cellules glandulaires sont de deux types. Un premier constitue les cellules à mucus qui possèdent un large cytoplasme de forme ovale ayant l'apparence d'un réseau et un petit noyau accolé sur un côté de la

cellule (Lyke, 1965). Ce sont les plus grosses cellules de l'ectoderme avec leurs 10-16 μm de largeur et leurs 15-30 μm de hauteur et sont présentes partout mais de façon plus marquée dans l'ectoderme de la face dorsale du rachis de même que sur la colonne des autozoïdes. L'autre type de cellules glandulaires possède un cytoplasme granuleux acidophile, mesure 8-16 μm de largeur et 12-20 de hauteur et est de forme plutôt ovale ou rectangulaire et beaucoup moins abondant que le précédent (Lyke, 1965). Sur la surface dorsale du rachis, on reconnaît des cellules glandulaires à microvilli. Les cellules sensorielles sont minces et fusiformes et traversent toute l'épaisseur de l'ectoderme. Du côté mésogléen, les cellules sensorielles ont de courts prolongements leur permettant de se connecter aux réseaux nerveux et du côté libre, elles ont parfois un cône sensoriel servant à capter les stimuli externes. Les cellules nerveuses sont de formes assez variées, uni, bi ou multipolaires et dans l'ectoderme elles sont plus abondantes près de la mésoglée. Les cellules musculaires ou plutôt myoépithéliales (= musculo-épithéliale) sont en quelque sorte un hybride entre une cellule musculaire et une cellule épithéliale car elles ont la forme classique en colonne des cellules épithéliales mais aussi des prolongements ayant des propriétés contractiles. Ces prolongements sont localisés près de la mésoglée où ils s'ancrent en projetant de petites ramifications et sont parallèles au plan de cette dernière. Dans l'ectoderme, ces cellules sont plutôt rares et localisées. On en retrouve en abondance dans les tentacules et le disque oral des autozoïdes et sont absentes dans l'ectoderme du rachis (Buisson, 1970). Un autre type cellulaire situé au niveau de l'ectoderme sont les cellules urticantes ou cnidocytes (= nématocytes) qui sont une caractéristique de l'embranchement. Ces cellules sont très petites (6-10 μm par

3-4 μm), de formes variables et situées à la surface libre de l'ectoderme surtout au niveau des tentacules des autozoïdes mais leur présence a aussi été rapportée au niveau du rachis autour des polypes secondaires (Lyke, 1965). Ces cellules sont en quelque sorte de petits harpons empoisonnés et encapsulés, parfois rassemblés en batteries qui arment surtout les tentacules et qui se déclenchent, mécaniquement et/ou chimiquement. La composition de l'ectoderme en ces divers types cellulaires varie beaucoup selon la région où l'on se situe dans l'animal.

1.3.2.2 De la mésoglée

La mésoglée est moins diversifiée en type cellulaire que l'ectoderme et l'endoderme mais elle est loin d'être une simple couche gélatineuse acellulaire. Elle est de nature fibreuse (peut-être du collagène) et on y retrouve principalement des cellules mésenchymateuses (amoebocytes), des cellules nerveuses (Figure 1.7), des scléroblastes et des spicules. Les cellules mésenchymateuses ont un petit noyau rond et des prolongements pseudopodiques d'où leur nom d'amoebocytes. Ces cellules seraient susceptibles de se transformer en cellules hyalines, de donner des spicules, des cnidoblastes, des cellules à mucus et de posséder un pouvoir phagocytaire. Elles auraient donc une potentialité supérieure aux cellules interstitielles (Buisson et al., 1969). Elles se présentent sous deux patrons d'organisation : formation en réseaux à mailles lâches longeant les plexus nerveux intramésogléens ou groupement de cellules entassées à la base des autozoïdes (Buisson et al., 1969). Les cellules nerveuses sont principalement de deux types : cellules ganglionnaires de grande dimension et cellules de petite dimension

à activité sécrétrice (Buisson et al., 1969). Les scléroblastes sont les cellules-mères des spicules et proviendraient des cellules interstitielles de l'ectoderme ayant migré dans la mésoglée (Dunkelberger et al., 1974). Les spicules sont de deux types chez *Renilla*, l'un beaucoup plus abondant de forme allongée (167-556 μm par 20-40 μm) et lisse de couleur mauve ou blanche, l'autre de forme plutôt variable (5-20 μm), souvent étoilée et aussi de couleur mauve ou incolore, plutôt localisé dans le pédoncule (Lyke, 1965).

1.3.2.3 De l'endoderme

L'endoderme est constitué d'un épithélium assez régulier et présentant une seule couche cellulaire même si l'empilement des cellules peut à l'occasion laisser croire à plusieurs couches. À ces cellules épithéliales endodermiques s'ajoutent des cellules glandulaires, sensorielles, urticantes, musculo-épithéliales et nerveuses (Figure 1.9) ayant à peu près les mêmes dimensions et propriétés que celles retrouvées dans l'ectoderme mais avec

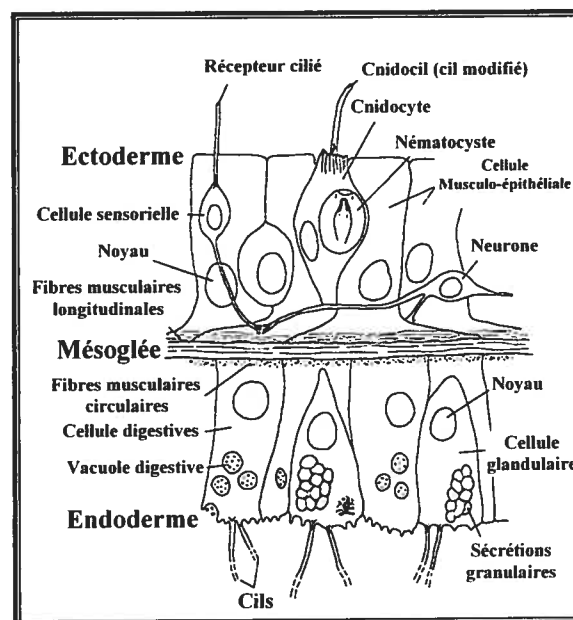


Figure 1.9 Couches tissulaires de l'hydre représentant bien les types cellulaires endodermiques de *Renilla*. L'endoderme peut aussi être appelé gastroderme. Tiré et adapté de (Barnes, 1987).

parfois de nouveaux rôles (Barnes, 1987). De plus, on retrouvera aussi des cellules toutes nouvelles comme les cellules reproductrices et les cellules lumineuses. Les

cellules glandulaires enzymatiques déchargent leurs enzymes protéolytiques dans les cavités gastrovasculaires pour entamer la digestion des grosses particules nécessitant une pré-digestion extracellulaire (Barnes, 1987). Ensuite, les cellules musculo-épithéliales ou plutôt glandulo-musculaires, qui sont beaucoup plus nombreuses dans l'endoderme que dans l'ectoderme, poursuivent la digestion dans le cas des grosses particules ou la commence pour les petites car leurs corps cellulaires auront ici un rôle dans la digestion en absorbant des aliments via des vacuoles. Concernant les cellules reproductrices, elles sont situées au niveau des filaments mésentériques dans la cavité gastrovasculaire. Les cellules lumineuses, elles, ont des granules blancs dans leur cytoplasme et on les retrouve à trois endroits dans l'endoderme. Le premier et le plus important est à la base des autozoïdes dans la paroi de la colonne, le deuxième est au niveau du disque oral et le troisième est dans les siphonozoïdes (Lyke, 1965).

Une particularité de l'endoderme des autozoïdes est l'accumulation d'algues unicellulaires symbiotiques, les zooxanthelles. Ces algues, intracellulaires, sont principalement situées à la base des tentacules ainsi que dans une bande circulaire au niveau de la colonne sous le disque oral mais on les retrouve aussi sur la longueur de la colonne et des tentacules en plus faible quantité (Beauvais et al., 1987; Lyke, 1965). Parfois, elles peuvent être observées dans la mésogée à la base de l'endoderme. Ces algues sont importantes pour le métabolisme de plusieurs coraux car, à partir de la lumière et des déchets azotés et phosphorés produits par l'hôte, les zooxanthelles produisent de l'oxygène gazeux, du carbone organique, des vitamines, des hormones,

glycérol, glucose, acides aminés et des peptides qui sont alors récupérés par *Renilla* (Beauvais et al., 1987; Lyke, 1965).

1.4 Buts de l'étude et hypothèse de travail

Malgré que les processus de la reproduction et du développement sont bien documentés chez les cnidaires, les mécanismes de contrôle neurohormonaux qui les sous-tendent sont toujours peu ou pas connus. Chez la pensée de mer *Renilla koellikeri*, un cnidaire de la classe des anthozoaires, des travaux antérieurs ont mené à l'extraction et à la visualisation dans des neurones de facteurs immunologiquement reliés à la famille de peptides des hormones de libération des gonadotropines (GnRH) chez les vertébrés (Ancil, 2000). Cependant, le rôle de ces peptides semblables aux GnRHs dans la reproduction de la pensée de mer reste à déterminer.

D'autres travaux ont révélé la présence de l'oestradiol-17 β chez la pensée de mer et tel que mentionné précédemment, les niveaux de cet œstrogène atteignent leur maximum au cours de la saison de la ponte et ce particulièrement chez les femelles (Pernet et al., 2002). Dans d'autres laboratoire, la présence de récepteurs aux oestrogènes semblables à ceux des vertébrés a été rapportée chez des invertébrés tel que *Octopus vulgaris* (Di Cosmo et al., 2002) et chez l'écrevisse *Austropotamobius pallipes* (Paolucci et al., 2002). Chez ces deux espèces, le récepteur semblable au récepteur à oestrogènes est localisé dans les ovaires pour le céphalopode et dans l'hépatopancréas

pour le crustacé. D'après ces observations, une implication des oestrogènes dans la reproduction est fortement suggérée.

Il y a donc une accumulation de preuves concernant la présence d'oestrogènes et de leurs récepteurs nucléaires de même qu'une tendance à les associer à la reproduction chez les invertébrés. Devant ces faits, nous avons formulé l'hypothèse qu'il y aurait lieu d'anticiper la présence de récepteurs à oestrogènes et qu'ils seraient possiblement associés entre autres à la reproduction de la rénille. Dans le but de vérifier cette hypothèse nous avons entrepris des études d'immunohistochimie et d'immunobuvardage afin de sonder la présence de récepteurs à l'oestradiol-17 β dans les tissus de la pensée de mer. Pour ce faire, nous avons utilisé des anticorps élevés contre deux différents fragments du récepteurs à oestrogènes humain (ER1). Notre but était de visualiser la distribution de l'immunoréactivité dans les différentes couches tissulaires de notre animal (mésoglée incluse) et de déterminer si les tissus reproducteurs seraient marqués.

Chapitre 2

Méthodologie

2.1 Les animaux

Les pensées de mer nous ont été fournies par Marinus Inc. (Long Beach, Californie) et envoyées par avion dans des sacs d'eau de mer conservés au frais. Dès leur arrivée, les sacs fermés sont déposés dans l'aquarium pour que les pensées de mer s'acclimatent à la température de l'aquarium. Par la suite, le contenu des sacs est vidé dans l'aquarium d'eau de mer artificielle ($\cong 1080$ mOsm) fait à partir de sels de mer synthétiques (Instant Ocean), dont la température suit le plus fidèlement possible, selon les saisons, celle de l'eau de mer de la côte ouest californienne (14 à 22°C). Elles sont exposées à un cycle de 12 heures de lumière, 12 heures de noirceur, ne sont pas nourries et sont utilisées dans les deux semaines suivant leur arrivée afin qu'elles soient en bon état pour les expérimentations.

2.2 Électrophorèse et Immunobuvardage

2.2.1 Préparation de l'extrait de la rénille

Quelques rénilles ayant été préalablement congelées (04/06/03) dans l'azote liquide, conservées au congélateur à -84°C , ont été coupées en morceaux (55 g au total). Ces morceaux ont été répartis également dans 5 tubes, puis homogénéisés avec un polytron (4x20 secondes chaque tube à 4°C) dans du tampon d'homogénéisation (2 :1, W/V) (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM EDTA, 5 mM Dithiothreitol, 0,01 mM molybdate de sodium et 10% (v/v) de glycérol) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, # P 2714). L'homogénat de chacun des tubes a ensuite été cumulé dans un bécher puis a subi durant 4 minutes la sonification (Fisher Scientific, ultrasonic dismembrator, modèle 500) au rythme de 1 seconde à intervalle de 59 secondes à 4°C (donc 240 fois 1 seconde) pour éviter que l'homogénat surchauffe et que les protéases s'activent. L'homogénat sonifié a par la suite été centrifugé 60 minutes à 105 000g (39 200 rpm) dans une ultracentrifugeuse Beckman Coulter (Optima Le-80K) avec un rotor à angle fixe Beckman 70.1 Ti toujours à 4°C ; le surnageant seulement fut récupéré. Un dosage de protéines selon la méthode de Bradford a ensuite été effectué sur ce dernier (11,47 μg de protéines/ μL d'homogénat) qui a ensuite été congelé en aliquots de 1 mL à -84°C .

2.2.2 Préparation de l'extrait d'ovaires et d'utérus de rat

Pour le rat, l'homogénat était exclusivement composé d'ovaires et d'utérus prélevés chez des rates adultes euthanasiées au maximum 24 heures avant le prélèvement. Les ovaire et les utérus ont été congelés dans l'azote liquide puis transférés au congélateur à -84°C jusqu'à leur utilisation pour faire l'extrait. Vu la concentration de protéines plus élevée, la présence de protéases possiblement plus marquée et la composition différente des tissus du rat (un vertébré) par rapport à la pensée de mer, le protocole d'homogénéisation à priori établi pour la pensée de mer (un invertébré) fut légèrement modifié. On a placé 2 g de tissus de rat (ovaires et utérus confondus) dans 20 mL de tampon d'homogénéisation (1:10, W/V) comprenant 1 mL de cocktail d'inhibiteurs de protéases. Le patron d'homogénéisation est resté le même mais celui de la sonification a été ajusté par une diminution du temps de sonification (2 min. plutôt que 4) car les tissus étaient plus mous.

2.2.3 Migration des protéines sur gel de polyacrylamide

Avant d'effectuer l'électrophorèse, l'extrait de rat ou rénille a été dilué aux concentrations désirées (rat : $44\ \mu\text{g}/30\ \mu\text{L}$ et rénille : 20 et $5\ \mu\text{g}/30\ \mu\text{L}$) avec de l'eau distillée (il aurait été mieux que ce soit avec le tampon d'homogénéisation) en considérant qu'il sera par la suite dilué par 2 avec du tampon Laemmli (Bio-Rad, #16-0737) additionné de β -mercaptoéthanol ($50\ \mu\text{L}$ de β -mercaptoéthanol pour 950 de tampon Laemmli) avant d'être dénaturé en le placant dans un bloc chauffant à 95°C

pendant 7 minutes. Les gels de polyacrylamide (gradient linéaire de 4 à 15%, 10 puits) utilisés pour l'électrophorèse ont été obtenus chez Bio-Rad (#161-1104) et conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation. Le volume des échantillons chargés dans les puits était de 30 μL et de 10 μL pour le standard de protéines (Precision Plus unstained standards, Bio-Rad, #161-0363) et aucun puit n'était laissé vide pour l'électrophorèse. L'électrophorèse fût effectuée dans un module Mini-PROTEAN 3 (200 W constant, \cong 40 minutes) avec un tampon Tris/Glycine/SDS (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% (W/V) SDS, pH 8,3). Le compartiment intérieur était rempli au maximum alors que celui à l'extérieur avait du tampon couvrant la base du gel. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel fût récupéré puis transféré dans un contenant rempli de tampon de transfert afin de faire le sandwich pour le transfert des protéines.

2.2.4 Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

Lorsque l'assemblage du sandwich est terminé et la cassette refermée, on a placé la cassette dans le module Mini Trans-Blot (Bio-Rad) puis on a ajouté l'unité de refroidissement (glace) prévue à cet effet car le transfert produit de la chaleur (Figure 2.1). Puisque le transfert des protéines du gel se fait de la borne négative à la borne positive et que le gel dans la cassette se situe plus près du côté noir et la membrane de nitrocellulose (0,45 μm) près du côté transparent de la cassette on s'est assuré de placer le côté noir de la cassette près du côté noir du module afin que le transfert s'exécute

correctement. Dès que tous les éléments étaient en place, on a rempli le module avec le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% v/v Méthanol) et on a débuté le transfert, 1h30 à 300 mA constant. Lorsque le transfert fut complété, on a conservé uniquement la membrane de nitrocellulose contenant les protéines. Afin de bloquer les sites non-spécifiques, on l'a déposée dans un récipient contenant la solution de blocage composée de lait en poudre écrémé dilué (5%) dans du tampon de lavage (TBST, Tris

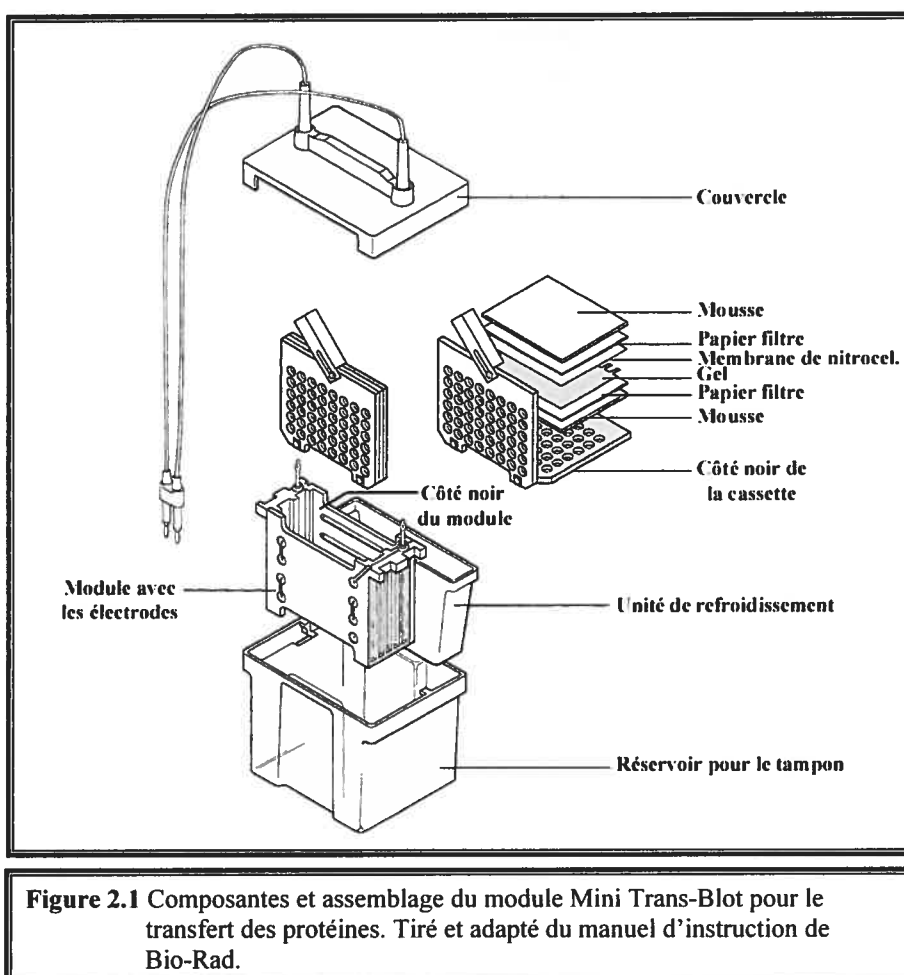


Figure 2.1 Composantes et assemblage du module Mini Trans-Blot pour le transfert des protéines. Tiré et adapté du manuel d'instruction de Bio-Rad.

Buffer Saline Tween; Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,5). Le blocage a été fait à 4°C sur un agitateur orbital pendant toute la nuit.

2.2.5 Marquage des protéines sur la membrane de nitrocellulose

Deux anticorps primaires différents ont été utilisés, soit celui généré chez le lapin contre un peptide synthétique qui consiste en la séquence d'acides aminés 18 à 32 du récepteur à oestrogènes alpha humain (Sigma-Aldrich, # E 0521) ou celui généré aussi chez le lapin mais contre la séquence d'acides aminés 578 à 595 (Sigma-Aldrich, # E 0646) du même récepteur (Figure 2.2). Les séquences d'acides aminés contre lesquelles les anticorps primaires ont été générés sont situées dans le domaine A/B (pour anti-hER 18-32) du récepteur à oestrogènes ou dans le domaine F (pour anti-hER 578-595). Ces domaines, contrairement aux domaines C et E, sont très peu conservés dans l'évolution des récepteurs nucléaires donc leur séquence d'acides aminés l'est également. Étant peu conservées, ces séquences d'acides aminés deviennent alors davantage spécifiques au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain ou des vertébrés. En d'autres mots, il est peu probable que ces séquences d'acides aminés soient présentes dans un autre récepteur nucléaire. De plus, il serait aussi peu probable, quoique possible, que ces séquences relativement courtes, 15 acides aminés pour l'anti-hER 18-32 et 18 pour l'anti-hER 578-595, puissent se retrouver intégralement dans une autre protéine.

Les deux antigènes, contre lesquels étaient générés les anticorps, étaient couplés à une protéine porteuse provenant d'un mollusque (KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin) dont le rôle était d'amplifier la réponse immunitaire servant à leur production. Les anticorps ont ensuite subi une purification mais pas par affinité, ils contiennent donc des

épitopes dirigés contre la KLH. Les épitopes non-spécifiques produits n'ont normalement que peu ou pas d'affinité pour d'autres protéines, du moins chez les vertébrés. Dans le cas de la rénille, il y a des précédents qui nous permettent de croire que l'utilisation de la KLH ne devraient pas causer de problème. Tout d'abord, Anctil et al. (1994) ont utilisé chez une anémone (cnidaire, anthozoaire) un anticorps contre le glutamate (Incstar) obtenu par couplage de l'antigène à la KLH. Comme contrôle, ils ont entre autres fait un test de préabsorption en incubant l'anticorps primaire avec du glutamate et aucun marquage détectable n'avait été obtenu. Ce même anticorps généré contre le glutamate a aussi été utilisé chez la rénille mais les résultats d'immunohistochimie s'étaient avérés négatifs (communication personnelle de Michel Anctil). De plus, Di Cosmo et al. (2002) ont même utilisé l'anticorps anti ER (578-595) chez un mollusque (céphalopode) et la substitution de l'anticorps primaire par une immunoglobuline de souris ne donnait aucune immunoréactivité tant pour l'immunohistochimie que pour l'immunobuvardage de type Western. Contrairement à la séquence d'acides aminés 18-32 qui est identique chez l'humain et le rat, la séquence d'acides aminés 578-595 du récepteur à oestrogènes alpha du rat (possédant seulement 560 acides aminés) est absente et ne se retrouve nulle part dans le récepteur. Cette particularité a été utilisée comme contrôle positif. Une fois le blocage terminé, on a décanté la solution de blocage puis on a incubé la membrane avec l'un ou l'autre des anticorps primaires dilué dans du TBST (1 :500, TBST : solution d'anticorps primaire 1 mg/ml). L'incubation était d'une durée de 60 minutes sur un agitateur orbital à la température de la pièce. La solution d'anticorps primaire fût ensuite décantée puis la membrane lavée à 6 reprises de 10 minutes chacune avec du TBST avec une forte

agitation. Pour le standard, l'anticorps secondaire (Precision StrepTactin-HRP conjugate, Bio-Rad, # 161-0380) reconnaissait une séquence d'acides aminés (Strep-tag) insérée dans les protéines du standard. Dû à un problème avec l'anticorps secondaire du standard qui réagissait avec les échantillons, la membrane a dû être coupée en deux sections afin de séparer le standard des échantillons. Les deux sections de membrane ont ensuite été incubées 50 minutes à la température de la pièce sur un agitateur orbital avec leur anticorps secondaire respectif dilué 1 dans 10 000 dans du TBST. Pour les échantillons, l'anticorps secondaire (Bio-Rad, #170-5046) était généré chez la chèvre contre les immunoglobulines du lapin et était conjugué à une peroxydase (HRP, HorseRadish Peroxydase, peroxydase de raifort). La solution d'anticorps secondaire fût ensuite décantée puis les sections de membrane lavées à 6 reprises de 10 minutes chacune avec du TBST avec une forte agitation.

10	20	30	40	50	60	
MTMTLHTKAS	GMALLHQIQG	NELEPLNRPQ	LKIPLERPLG	EVYLDSSKPA	VYNYPEGAAY	
70	80	90	100	110	120	
EFNAAAAANA	QVYGQTGLPY	GPGSEAAAFG	SNGLGGFPPL	NSVSPSPML	LHPPPQLSPF	
130	140	150	160	170	180	
LQPHGQQVPY	YLENEPSGYT	VREAGPPAFY	RPNSDNRQ	GRERLASTND	KGSMAMESAK	
190	200	210	220	230	240	
ETRY	CAVCND	YASGYHYGVW	SCEGCKAFFK	RSIQGHNDYM	CPATNQCTID	KNRRKSCQAG
250	260	270	280	290	300	
RLRKCIEVGM	MKGGIRKDRR	GGRMLKHKRQ	RDDGEGRGEV	GSAGDMRAAN	LWPSPLMIKR	
310	320	330	340	350	360	
SKKNSLALS	TADQMVSALL	DAEPPILYSE	YDPTRPFSEA	SMMGLLTNLA	DRELVHMINW	
370	380	390	400	410	420	
AKRVPGFVDL	TLHDQVHLL	CAWLEILMIG	LVWRSMEHPG	KLLFAPNLLL	DRNQGKCV	
430	440	450	460	470	480	
MVEIFDMLLA	TSSRFRMMNL	QGEEFVCLKS	IILLNSGVYT	FLSSTLKSLE	EKDHIHRVLD	
490	500	510	520	530	540	
KITDTLIHLM	AKAGLTLQQQ	HQLAQLLLI	LSHIRHMSNK	GMEHLYSMKC	KNVPLYDLL	
550	560	570	580	590		
LEMLDAHRLH	APTSRGGASV	EETDQSHLAT	AGSTSSH	SLO	KYYITGEAEG	FPATV

Figure 2.2 Séquence des acides aminés constituant le récepteur à oestrogènes alpha de l'humain. La région en vert (18-32) est l'une des séquences d'acides aminés ciblée par un des deux anticorps et celle en mauve (578-595) est celle ciblée par l'autre anticorps. En bleu, domaine C de liaison à l'ADN et en jaune domaine E de liaison au ligand. Swiss-Prot: P03372

2.2.6 Révélation des sites de liaison par réaction de chimiluminescence

Les deux sections de membranes ont ensuite été incubées 3-5 minutes à l'obscurité à la température de la pièce dans la solution de substrat (luminol/renforceur et tampon de peroxyde, 1:1) provenant du kit de détection de chemiluminescence (Immun-StarTM HRP Chemiluminescent Kit, Bio-Rad). Ici, la HRP (peroxydase de raifort) attachée à l'anticorps secondaire, catalyse, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'oxydation du substrat (le luminol) produisant ainsi une émission de lumière localisée à l'endroit où l'anticorps secondaire s'est fixé, en théorie sur l'anticorps primaire.

La dernière étape consistait à exposer un film à rayon X (X-OMAT Blue Film 13 cm x 18 cm, Perkin Elmer, # NEF 586001) avec la lumière émise par le luminol provenant des régions marquées de la membrane. Pour ce faire, la membrane a été placée entre deux couches de membrane plastique mince en prenant soin de ne pas laisser de bulles d'air puis le tout placé dans une cassette à autoradiographie. Les films ont été exposés, en chambre noire, à la membrane pour des périodes de temps qui variaient généralement de 5 à 60 secondes. Une expérience d'immunobuvardage identique a été faite mais en omettant seulement l'anticorps primaire afin d'avoir un contrôle négatif.

2.3 Immunohistochimie

2.3.1 Préparation des coupes

Des rénilles femelles (3 colonies composées d'au moins 120 individus chacune) obtenues durant le mois de mai ont été prélevées directement de l'aquarium, épongées pour retirer le plus d'eau possible puis coupées en lanières d'environ 5 mm de largeur. Ces lanières ont ensuite été fixées toute la nuit à 4°C dans une solution saline de tampon phosphate (PBS : phosphate buffered saline, 0,1 M de tampon phosphate de sodium, 2,4% de NaCl, pH 7,4) contenant 4% de paraformaldehyde et 0,5% de glutaraldehyde, puis lavées à trois reprises de 15 minutes chacune dans du PBS 0,1 M. Les lanières ont ensuite été cryoprotégées 30 minutes dans du PBS 0,1 M contenant 15% de sucrose et 30 minutes dans du PBS 0,1 M contenant 30% de sucrose, puis déposées dans du milieu d'enrobage (Shandon Cryomatrix, Thermo electron corporation, # 6769006) avant d'être gelées dans un bain d'isopentane refroidi avec de la glace sèche. Les lanières ont par la suite été placées au congélateur à -84°C. Toutes les coupes d'une épaisseur de 16 µm ont été faites à l'aide d'un cryostat Leica modèle CM 3050 S à -25°C, ont été montées sur des lames gélatinisées ayant par la suite été laissée à l'air libre pour une période de séchage d'environ 2 heures. Ce séchage est essentiel pour que les coupes restent bien collées aux lames tout au long des expériences d'immunohistochimie qui nécessitent plusieurs rinçages.

2.3.2 Immunofluorescence

Après la période de séchage, les lames ont été lavées à deux reprises de 15 minutes chacune dans du PBS 0,1M. Pour les expériences d'immunofluorescence, les coupes ont été traitées 15 minutes avec du sodium borohydrure à 1% dans du PBS 0,1 M afin de bloquer le plus possible la fluorescence non-spécifique puis lavées à deux reprises de 10 minutes chacune dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%). Ensuite, les sites de liaisons non-spécifiques ont été bloqués avec de l'albumine de sérum bovin (1%) diluée dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%) contenant aussi l'un ou l'autre des anticorps primaire (1:200) qui sont les mêmes que ceux utilisés pour l'immunobuvardage (voir section 2.2.5). Les coupes ont incubées toute la nuit à 4°C entre lame et lamelle scellées avec de la vaseline. Après la période d'incubation de l'anticorps primaire, les lames ont été lavées à trois reprises de 10 minutes chacune avec du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%). Les coupes histologiques ont par la suite été exposées à l'anticorps secondaire (1:100) dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%) durant 1 heure à la température de la pièce et à l'obscurité. L'anticorps secondaire généré chez la chèvre contre les immunoglobulines du lapin était conjugué à une molécule fluorescente, la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Suite à l'incubation de l'anticorps secondaire, les coupes ont été lavées à trois reprises de 10 minutes chacune dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%). Les lames ont été montées avec un milieu de montage aidant à conserver la fluorescence (Immuno-Fluore, IGN, #622701) et scellées avec un vernis à ongle transparent. Certaines lames servant comme contrôle négatif ont subi les mêmes traitements et ont été exposées aux mêmes substances que

les autres à l'exception de l'anticorps primaire. Les lames furent visualisées avec un microscope inversé à fluorescence (Nikon Eclipse TE300) équipé d'une lampe au Xénon.

2.3.3 Immunoperoxydase

Pour la technique d'immunoperoxydase, une trousse Super ABC de BioStain (immunoglobuline de lapin couplée à un complexe Avidine-Biotine) fût utilisé. Après la période de séchage, les lames ont été lavées à deux reprises de 15 minutes chacune dans du PBS 0,1M. Ensuite, afin d'éliminer les peroxydases endogènes, les coupes ont été incubées 15 minutes avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 1% dans du PBS 0,1M puis lavées à deux reprises de 10 minutes chacune dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%). Ensuite, le bloqueur de protéines de la trousse a été badigeonné sur chaque lames et après 5 minutes les lames ont été lavées 15 minutes dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%). Les coupes ont ensuite été placées à incuber avec l'un des anticorps primaires utilisés pour l'immunobuvardage et l'immunofluorescence soit celui généré contre le segment d'acides aminés 578 à 595 (voir section 2.2.5) et dans les mêmes conditions. Après l'incubation avec l'anticorps primaire, les coupes ont été lavées à trois reprises de 10 minutes dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%) puis incubées 30 minutes à la température de la pièce avec la solution d'anticorps secondaire composée d'un anticorps secondaire biotinylé anti-lapin et d'un stabilisateur tous deux dilués dans du PBS 0,1M. Ont suivi ensuite trois lavages de 10 minutes dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%) avant l'incubation d'une heure avec le détecteur du complexe

constitué du réactif d'Avidine (qui se lie à la Biotine) conjugué à une peroxydase et d'un stabilisateur, dilués dans du PBS 0,1M. Les coupes furent à nouveau lavées 15 minutes dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%) avant d'être immergées dans une solution de diaminobenzidine (DAB, 0,06%) diluée dans de l'eau distillée pendant 10 minutes puis un autre 10 minutes dans la même solution additionnée de peroxyde d'hydrogène à une concentration finale de 0,01%. Finalement, les coupes ont subi trois dernier lavages de 15 minutes dans du PBS (0,1M) + T (Triton-X-100, 0,2%) avant d'être montées entre lame et lamelle avec du glycérol-PBS 0,1M (1:2) puis scellées avec un vernis transparent. Certaines lames servant comme contrôle négatif ont subit les mêmes traitements et ont été exposées aux mêmes substances que les autres à l'exception de l'anticorps primaire. Les coupes ont été visualisées avec un microscope inversé (Nikon Eclipse TE300) avec la lumière visible ordinaire.

Ici, la HRP (l'enzyme de type peroxydase) attachée à l'avidine se liant à la biotine, catalyse, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'oxydation du substrat (la DAB) produisant ainsi un polymère insoluble d'une coloration brunâtre localisée à l'endroit où l'anticorps secondaie s'est fixé, en principe sur l'anticorps primaire.

Chapitre 3

Résultats

3.1 Électrophorèse et Immunobuvardage

Suite aux expériences d'immunobuvardage de type Western faites avec les extraits de *Renilla* et les extraits d'ovaire et d'utérus de rat, plusieurs bandes ont été détectées avec les deux anticorps utilisés comme l'illustre la figure 3.1. Plusieurs immunobuvardages de type Western ont été effectués et la figure 3.1 en est un exemple très représentatif. Les gels utilisés comportaient dix puits mais sur la figure 3.1A-B on n'en trouve que neuf car, étant donné que deux puits avaient été chargés avec le standard, on en a retiré un pour l'illustration. Le puit à l'extrême gauche constitue l'étalonnage des poids moléculaires des protéines de référence. Il est ensuite suivi par deux puits identiques contenant 44 µg de protéines/ 30 µL d'extrait d'ovaire et d'utérus de rat, ensuite 20 µg et 5 µg de protéines/ 30 µL d'extrait de *Renilla*. Finalement, les quatres derniers puits ont été chargés de la même façon que les puits 2 à 5 précédemment décrits. Les puits 2 à

5 ont été marqués avec l'anticorps primaire anti-hER (578-595) alors que les puits 6 à 9 l'ont été avec l'anticorps primaire anti-hER (18-32).

3.1.1 Bandes détectées par immunobuvardage des extraits

Débutons avec les bandes détectées avec les extraits d'ovaire et d'utérus de rats qui servaient de validation de la méthode, de référence ainsi que de contrôle positif. Avec l'anticorps primaire anti-hER (18-32) nous avons obtenu (Figure 3.1A-B) une bande très intense (vis-à-vis la flèche jaune) au poids moléculaire correspondant à la forme complète du récepteur à oestrogènes alpha du rat qui est de 67,030 kDa, soit à peu près la même valeur que celle de la forme humaine (66,216 kDa). Bien que cette bande soit prédominante, d'autres bandes (alignées avec les têtes de flèches jaunes) moins intenses mais très claires ont été détectées (Figure 3.1A-C) avec cet anticorps primaire et ont des poids moléculaires d'environ 50, 40, 25, 18 et 13 kDa. Par contre, avec l'anticorps anti-hER (578-595) une seule bande a été détectée (Figure 3.1A-B) mais son poids moléculaire est d'environ 80 kDa et ne correspond pas à celui de la forme complète du récepteur à oestrogènes alpha du rat.

Avec l'extrait de *Renilla*, pour l'anticorps primaire anti-hER (18-32), des bandes de poids moléculaires très semblables (Figure 3.1A-C) à celles obtenues avec les extraits d'ovaire et d'utérus de rat pour le même anticorps ont été détectées, soit: 67, 50, 40, 25 et 18 kDa. Cependant, aucune bande de 13 et 80 kDa n'ont pu être observées (Figure

3.1A-C). En ce qui concerne l'anticorps anti-hER (578-595), une bande correspondant au poids moléculaire du récepteur à oestrogènes alpha du rat ou de l'humain a été observée à 67 kDa (Figure 3.1A-B). Contrairement aux extraits d'ovaire et d'utérus de rat, nous avons en plus détecté une bande à 50, à environ 40 et 25 kDa avec cet anticorps primaire (Figure 3.1A-C). Les bandes obtenues avec les extraits de *Renilla* sont plus intenses dans les puits contenant 20 µg de protéines que celles obtenues avec seulement 5 µg de protéines, où elles sont pratiquement invisibles.

Suite aux expériences d'immunobuvardage de type Western, nous avons déterminé que les résultats étaient assez concluants pour poursuivre l'étude sur des coupes histologiques de tissus avec ces anticorps.

Figure 3.1 Immunobuvardage de type Western avec l'extrait d'ovaire et d'utérus de rat et de *Renilla*. En A, on voit la totalité du film ayant été exposé 20 secondes à la membrane marquée dans une cassette autoradiographique avec le couvercle ouvert. En B, on voit la zone comprise entre 50 et 75 kDa où le récepteur à oestrogènes devrait se situer (67 kDa). En C, on voit seulement la partie inférieure (25 kDa et moins) du film ayant été aussi exposé 20 secondes à la membrane marquée mais dont le couvercle était, dans ce cas-ci, fermé pour obtenir une meilleure sensibilité de détection. Les deux anticorps utilisés y sont clairement indiqués de même que l'échelle de poids moléculaires en kiloDaltons (kDa) à l'extrême gauche.

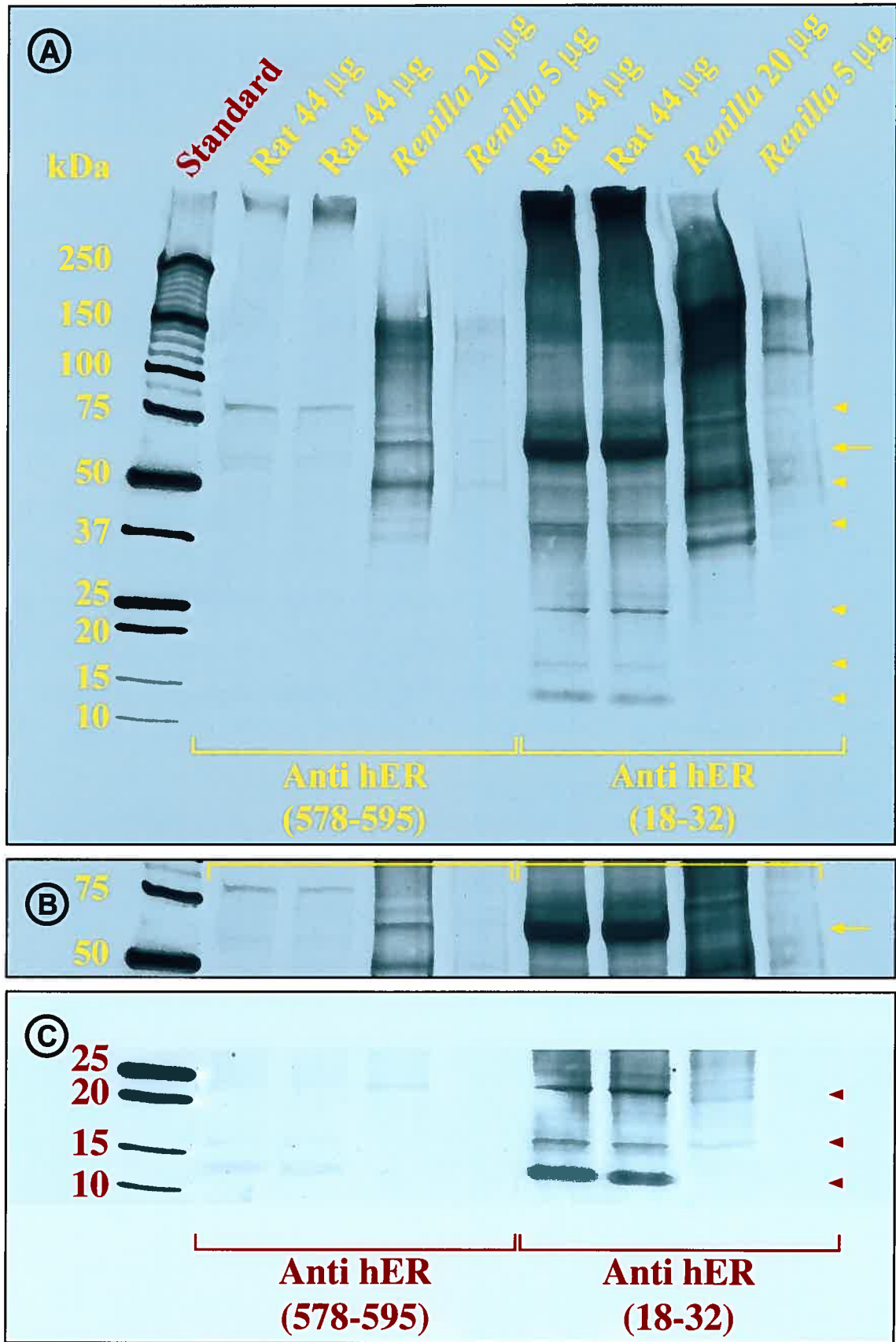


Figure 3.1

3.2 Immunohistochimie

Pour les expériences d'immunohistochimie, nous avons obtenu de l'immunoréactivité au niveau de divers types cellulaires situés dans l'ectoderme, dans la mésoglée et également dans l'endoderme. Par contre, suite à l'observation de plusieurs coupes histologiques, il est apparu clairement que l'immunoréactivité dans l'ectoderme était beaucoup plus abondante et consistante que celle de l'endoderme et de la mésoglée. En effet, on obtenait systématiquement du marquage sur les coupes où il y avait de l'ectoderme alors que dans la mésoglée et l'endoderme, quoique intense, le marquage était plus rare et semblait représenter des cas plus isolés et particuliers.

Les patrons de marquage obtenus avec les deux anticorps générés contre deux fragments différents d'acides aminés du récepteur aux oestrogènes alpha de l'humain étaient les mêmes et les contrôles négatifs où l'on omettait l'anticorps primaire ne montraient aucune immunoréactivité tant pour la technique d'immunofluorescence que pour la technique d'immunoperoxydase.

Puisque nous avons travaillé sur des coupes histologiques, des cellules difficilement identifiables contenant du marquage sont présentes sur la plupart des coupes. Ceci est dû au fait que les coupes ne peuvent pas passer au meilleur niveau ni au meilleur angle nous permettant une bonne identification pour toutes les cellules présentes dans une même coupe. Par ailleurs, ceci ne signifie pas que le marquage est non-spécifique.

3.2.1 Au niveau de l'ectoderme

C'est dans l'ectoderme que nous avons obtenu le plus de marquage et surtout la plus grande diversité de cellules marquées comme le démontre la figure 3.2. Effectivement, des cellules interstitielles, des cellules paraissant en cours de différenciation, des cellules glandulaires ainsi que des structures d'apparence nerveuses (neurones, neurites) semblent avoir été marquées spécifiquement par nos anticorps primaires.

Que ce soit avec la technique d'immunoperoxydase ou d'immunofluorescence et l'un ou l'autre des anticorps primaires, des cellules interstitielles du rachis ont été marquées comme le montrent les flèches blanches sur les figures 3.2A-B. Ceci témoigne d'une très bonne concordance du marquage. Comme on le constate, ces cellules de formes irrégulières, souvent étoilées, sont situées à la base des autres cellules ectodermiques (Beauvais et al., 1987; Lyke, 1965) et n'atteignent pas la surface libre de l'ectoderme. On voit aussi que ces cellules ont un corps cellulaire central et qu'elles émettent des prolongements cytoplasmiques principalement près de la mésoglée en nombre et en longueur variable (Beauvais et al., 1987). On remarque aussi qu'une région du corps cellulaire (probablement associée au noyau) des cellules interstitielles semble être moins marquée (figures 3.2A-B). Cette région moins marquée est sombre en immunofluorescence et claire avec la technique d'immunoperoxydase. Des cellules présumément interstitielles ont aussi été marquées au niveau des tentacules des autozoïdes (flèche blanche sur la figure 3.3B). Celle de la figure 3.3B adopte une forme plutôt ronde et la région qui correspond au noyau est moins marquée. Les cellules

interstitielles situées au niveau de l'ectoderme des tentacules d'autozoïdes ont été décrites comme étant petites et arrondies et situées à la base de l'ectoderme (Lyke, 1965). Ceci correspond au marquage obtenu.

Tel que mentionné précédemment, les cellules interstitielles sont des cellules germinales pouvant se différencier en plusieurs types cellulaires différents. Plusieurs cellules présumément en cours de différenciation ont été marquées avec les deux techniques immunohistochimiques (têtes de flèches sur les figures 3.2B-D et 3.4 A-B). Certaines d'entre elles, dont la base près de la mésoglée apparaît plus large et ronde et qui émettent un prolongement vers la surface de l'ectoderme ont été marquées (têtes de flèches jaunes sur les figures 3.2B-D). Encore une fois, le centre de ces cellules pouvant correspondre au noyau démontre souvent moins de marquage. Ce type de cellule couvrant toute l'épaisseur de l'ectoderme avec un prolongement vers la surface a la morphologie des cellules sensorielles (Beauvais et al., 1987). D'autres cellules, fortement marquées (tête de flèche blanche sur la figure 3.2D et têtes de flèches noires sur la figure 3.4) et ne reposant plus à la base de la mésoglée, pourraient être associées aux cellules interstitielles en différenciation. Cependant, dû au manque d'information quant au type cellulaire présumément en devenir, nous préférons ne pas les classer dans un type cellulaire en particulier.

Un autre type cellulaire où nous avons constaté du marquage concerne les cellules glandulaires (flèche blanche sur la figure 3.2C). La forme plutôt rectangulaire ($\cong 21 \mu\text{m} \times 9 \mu\text{m}$) et trapue de ces cellules et le fait qu'elles traversent tout l'ectoderme sont des

caractéristiques qui concordent avec les cellules glandulaires. De plus, en regardant avec attention, on décèle la présence de ce qui semble être des granules de sécrétions ($\cong 0,7 \mu\text{m}$) ce qui constitue un caractère très distinctif (Fautin et al., 1991). On remarque aussi une zone sombre plus ou moins bien délimitée qui semble correspondre à la région périnucléaire. Lyke (1965) fait mention d'un type de cellule glandulaire ovale ou rectangulaire présent dans l'ectoderme du rachis qui n'est pas les cellules glandulaires à mucus. Il décrit ce type de cellule glandulaire comme étant plus rare et plus petit (8-16 μm de largeur par 12-20 μm de hauteur) que les cellules à mucus (10-16 μm de largeur par 15-30 μm de hauteur) et possédant un cytoplasme granuleux. Les granules mesureraient de 0,5 μm à 1,5 μm . D'après ces informations, c'est à ce type de cellule glandulaire que nous attribuons le marquage obtenu mais nous n'éliminons pas la possibilité que l'autre type de cellule glandulaire (à mucus) puisse être aussi marqué.

Un autre endroit où nous avons constaté de l'immunoréactivité est dans certains neurones de l'ectoderme du rachis. Dans la figure 3.2D, on voit un neurone d'apparence bipolaire basi-ectodermique (flèche blanche) marqué en fluorescence avec l'anticorps primaire anti-hER (578-595) où il est possible de bien voir les deux prolongements neuritiques de part et d'autre du corps cellulaire qui sont parallèles à l'interface entre l'ectoderme et la mésoglée. Une fois de plus, une zone sombre moins marquée est présente dans le corps cellulaire et semble être associée à la région périnucléaire. La présence de neurones de divers types mais entre autres bipolaires à la base de l'ectoderme est depuis longtemps très bien connue et documentée chez les cnidaires

(Barnes, 1987; Beauvais et al., 1987; Buisson, 1970; Umbriaco et al., 1990). D'autre marquage possiblement d'origine nerveuse a été obtenu en immunofluorescence (Figure 3.3B) mais cette fois-ci avec l'anticorps primaire anti-hER (18-32) et sur une coupe transversale d'un tentacule d'autozoïde. Avant de décrire ce marquage, il est important de constater qu'il est possible de déceler sur la figure 3.3B la présence de cnidocytes non marqués représentés par les zones sombres (fantômes) de forme ovale dont plusieurs sont situés entre les flèches rouges. Concernant le marquage en question (têtes de flèches jaunes sur la figure 3.3B), il prend la forme d'une cupule ou d'un panier entourant la base des cnidocytes (zone sombre de forme ovale). Ce marquage coïncide avec le réseau nerveux associé aux batteries de cnidocytes qui, tel que déjà décrit chez un autre cnidaire, consiste en de fins prolongements adoptant une forme similaire à un panier qui enveloppe la base des cnidocytes (Anderson et al., 1992). L'attribution de l'origine nerveuse à ce marquage est davantage dû à sa position et à sa morphologie qu'à l'identification du type cellulaire même. On observe aussi d'autre marquage présumément d'origine nerveuse sur la figure 3.3B. On y voit de fins neurites (têtes de flèche rouge) qui semblent être originaires du basi-ectoderme. Il est cependant difficile de dire si ce marquage ne serait pas aussi associé au réseau d'innervation des cnidocytes mentionné plus haut. Une autre information que nous livre la figure 3.3B est la présence plus forte de marquage à la base de l'ectoderme (têtes de flèches blanches), près de la mince couche de mésoglée. Avec la technique d'immunoperoxydase, on obtient aussi ces fins prolongements d'apparence nerveuse (les têtes de flèches bleues sur la figure 3.4B) décrits pour la figure 3.3B mais au niveau de l'ectoderme ventral du rachis là où il n'y a pas de cnidocytes (Lyke, 1965).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le marquage dans l'ectoderme était systématiquement présent sur les coupes contenant de l'ectoderme. On voit sur la figure 3.3A la distribution de l'immunoréactivité (flèches blanches) sur une coupe tangentielle de l'ectoderme du rachis obtenue avec l'anticorps primaire anti-hER (18-32). Ces cellules paraissent surtout rondes car la coupe est tangentielle à l'ectoderme, donc les cellules sont coupées transversalement par rapport à leur axe long. Nous avons aussi remarqué que le marquage au niveau de l'ectoderme des tentacules des autozoïdes était plus abondant dans le basi-ectoderme (entre les têtes de flèches blanches de la figure 3.3B), ce qui ne semble pas être le cas au niveau de l'ectoderme du rachis. Le marquage obtenu avec la technique d'immunoperoxydase et l'anticorps primaire anti-hER (578-595) au niveau de l'ectoderme dorsal (A) et ventral (B) du rachis couvre toute l'épaisseur. Que ce soit dans l'ectoderme dorsal ou ventral, le marquage est intense rendant ainsi l'identification des types cellulaires marqués très difficile.

Figure 3.2 Immunoréactivité dans divers types cellulaires au niveau de l'ectoderme du rachis. Immunofluorescence (A, C, D) et immunoperoxydase (B) avec l'anticorps primaire anti-hER (18-32) en A ou l'anticorps anti-hER (578-595) en B, C et D. En A et B on voit des cellules présumément interstitielles marquées (flèches blanches) et en B, C et D on distingue ce même type de cellule mais à des stades de différenciation plus avancés (têtes de flèches) dont certaines deviendront probablement des cellules sensorielles (têtes de flèches jaunes). En C on peut observer du marquage au niveau d'une cellule glandulaire (flèche blanche) et en D un neurone bipolaire (flèche blanche). Ecto, ectoderme ; méso, mésoglée ; Spic, spicule.

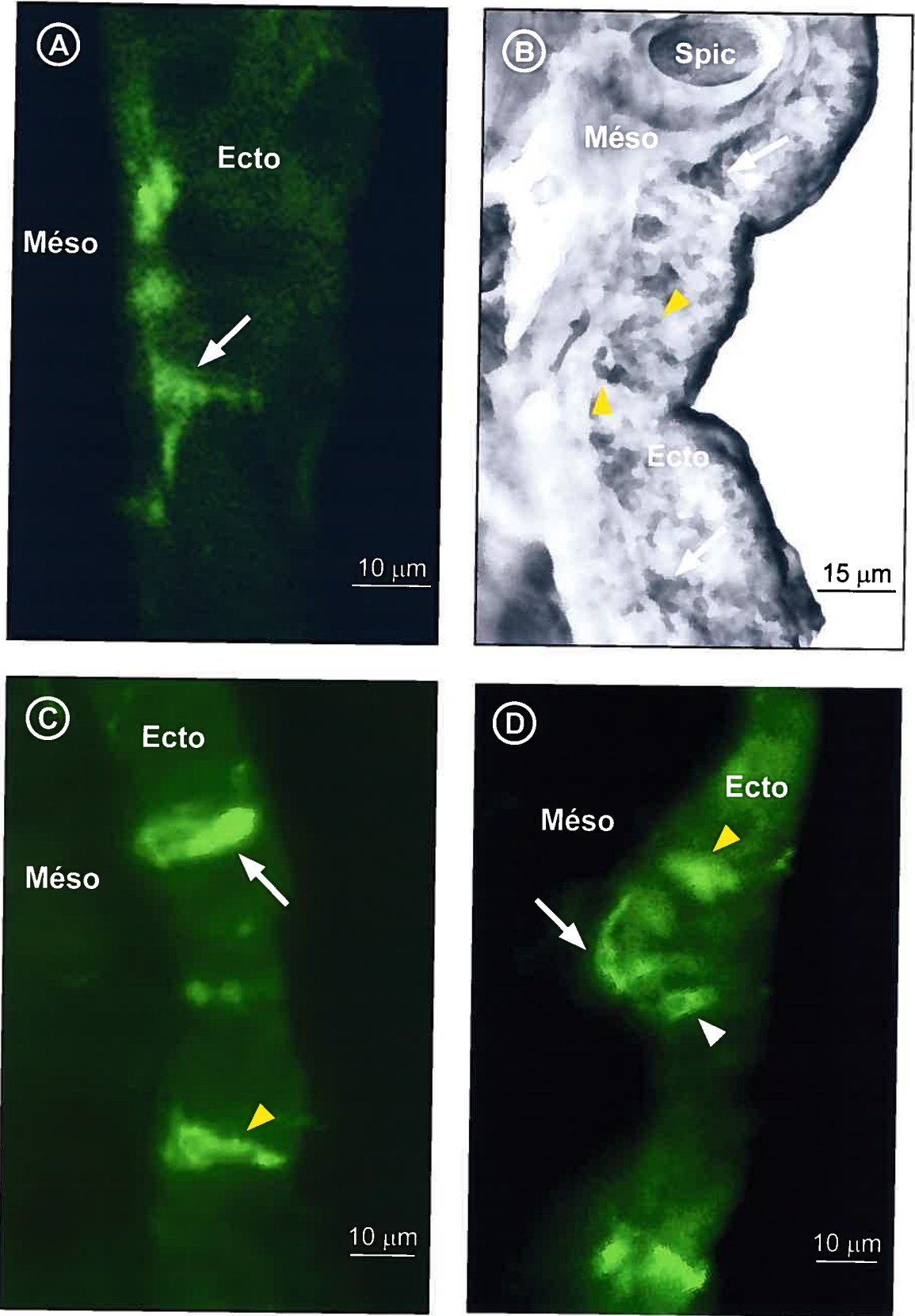


Figure 3.2

Figure 3.3 Immunoréactivité au niveau de l'ectoderme du rachis et des tentacules.

En A, marquage fluorescent (flèches blanches) obtenu avec l'anticorps primaire anti-hER (18-32) sur une coupe tangentielle à l'ectoderme du rachis et en B sur une coupe transversale d'un tentacule avec l'anticorps anti-hER (578-595). On peut voir en B (entre les flèches rouges) la présence de fantômes de cnidocytes (zones noires et non marquées) de même que de courts neurites marqués (tête de flèche rouge) et une cellule présumément interstitielle (flèche blanche). Il est à noter qu'en B le marquage est plus abondant à la base de l'ectoderme qui ceinture l'endoderme (têtes de flèches blanches).

Ecto, ectoderme ; endo, endoderme ; Méso, mésoglée.

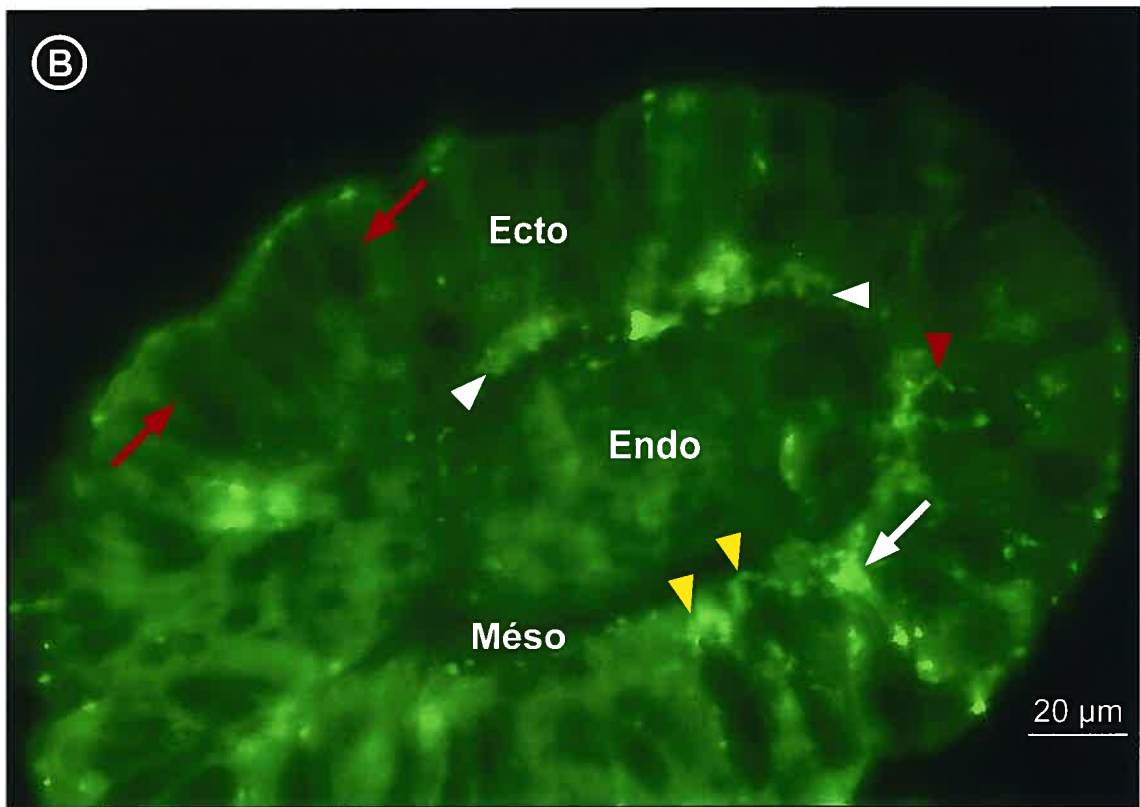
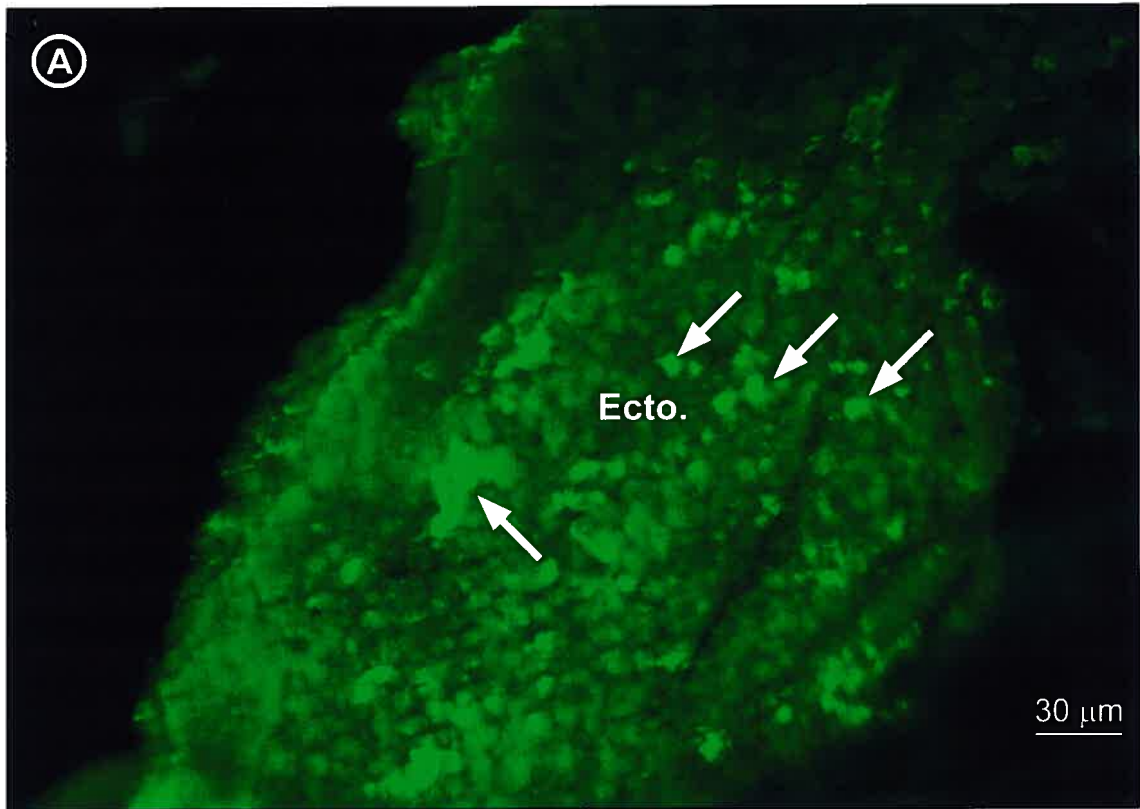


Figure 3.3

Figure 3.4 Immunoréactivité au niveau de l'ectoderme dorsal et ventral du rachis et de la mésoglé. Plusieurs cellules (têtes de flèches noires) ont été marquées dans l'ectoderme par l'anticorps primaire anti-hER (578-595) avec la technique d'immunoperoxydase tant au niveau dorsal (A) que ventral (B). Toujours dans l'ectoderme, plusieurs éléments sont marqués mais restent difficiles à identifier avec certitude (têtes de flèches bleues). On peut aussi constater (A et B) dans la mésoglé un fort marquage au niveau du cytoplasme des scléroblastes (flèches noires) entourant les spicules calcaires en formation ainsi que dans une bande près de l'ectoderme (zone entourée). Toujours dans la mésoglé, on voit (A et B) des cellules mésenchymateuses marquées (flèches bleues) près de l'ectoderme. Ecto, ectoderme ; Méso, mésoglé ; spic, spicule.

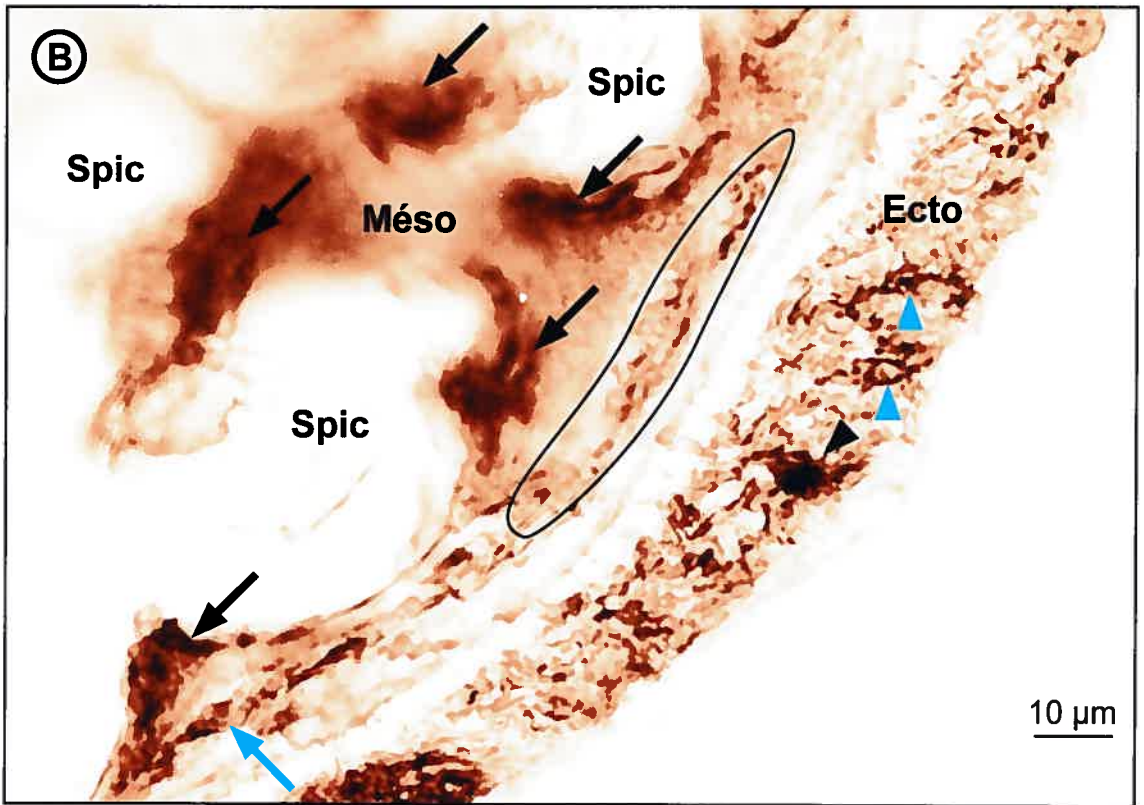
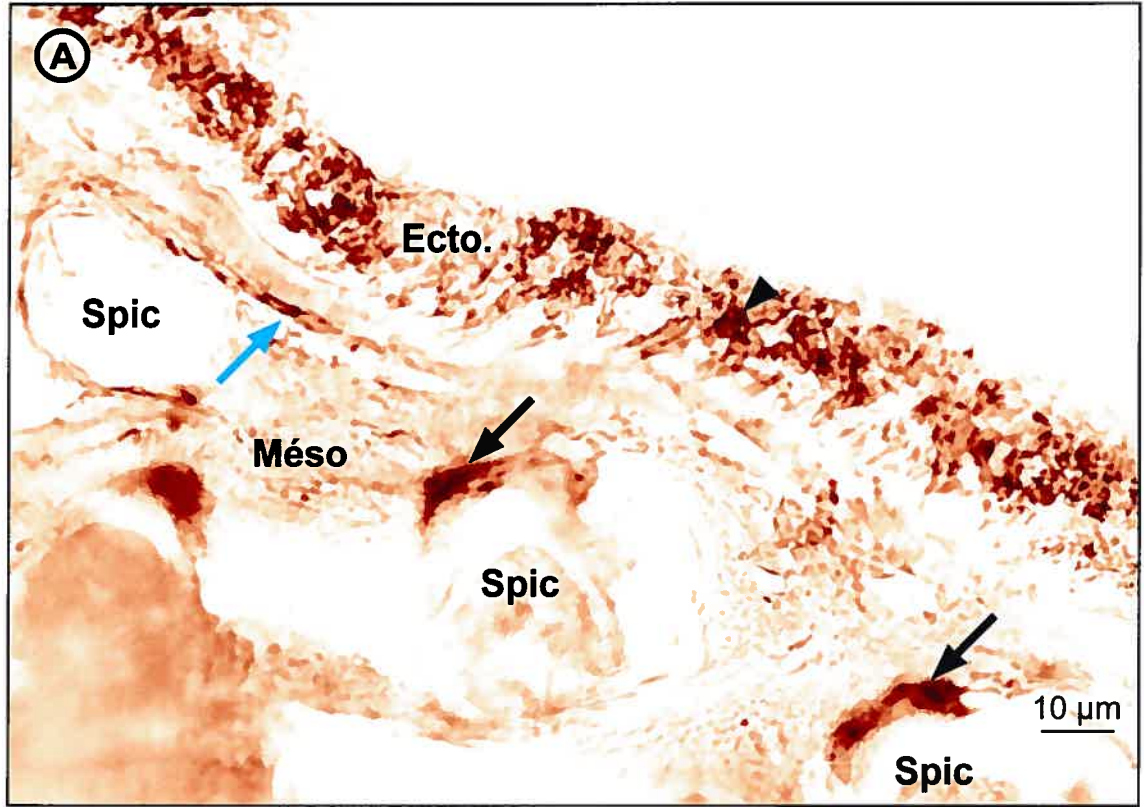


Figure 3.4

3.2.2 Au niveau de la mésoglée

Malgré que la mésoglée soit beaucoup moins diversifiée en types cellulaires que l'ectoderme, nous y avons obtenu du marquage avec les deux techniques immunohistochimiques. Ce marquage était principalement localisé au niveau de scléroblastes, de neurites, de cellules mésenchymateuses et de structures difficilement identifiables. La figure 3.4 illustre un marquage très intense et délimité situé au niveau du cytoplasme résiduel (flèches noires) des scléroblastes qui sont les cellules produisant les spicules calcaires (Dunkelberger et al., 1974; Imsiecke et al., 1995). Ce marquage par immunoperoxydase peut être facilement constaté sur la figure 3.4A ou 3.4B. Sur ces mêmes figures on remarque aussi que des cellules mésenchymateuses (amoebocytes) ont été marquées (flèches bleues). L'apparence de ces cellules mésenchymateuses concorde avec la description précédemment faite chez *Renilla koellikeri* (Anctil et al., 2002; Pani et al., 1995) et *Veretillum cynomorium* (Buisson, 1970; Buisson et al., 1969). Sur la cellule mésenchymateuse marquée de la figure 3.4B on voit la région du noyau qui apparaît moins marquée avec un prolongement épais qui émerge de chaque côté alors que pour celle de la figure 3.4A on voit seulement un prolongement. De plus, il y a aussi la présence d'une bande (zone entourée) dans la mésoglée près de l'ectoderme où il y a aussi de l'immunoréactivité. Malheureusement, une identification précise de la provenance de ce marquage est quasi impossible. Soit parce que le marquage est très localisé à l'intérieur des cellules ou soit parce que la coupe ne couvre pas une surface assez grande des cellules. De l'immunoréactivité a également été observée par immunofluorescence dans la mésoglée très près de l'endoderme (Figure 3.5A) au niveau

du rachis. Sur cette figure on voit bien les spicules (rond sombres) situés dans la mésogée et à droite, l'endoderme qui ne comporte pas de spicules. Les cellules marquées apparaissent comme des neurites (flèche blanche) s'étendant vers l'endoderme. Dans la figure 3.5B on peut encore voir des neurites fluorescents de nature nerveuse qui traversent la mésogée dans différents plans.

Figure 3.5 Immunofluorescence au niveau de la mésogée du rachis. En A on voit des neurones présumés marqués avec l'anticorps primaire anti-hER (578-595) dont les prolongements sont orientés vers l'endoderme. En B on observe d'autres de ces prolongements qui courent dans la mésogée. End; endoderme, Méso, mésogée ; spic, spicule.

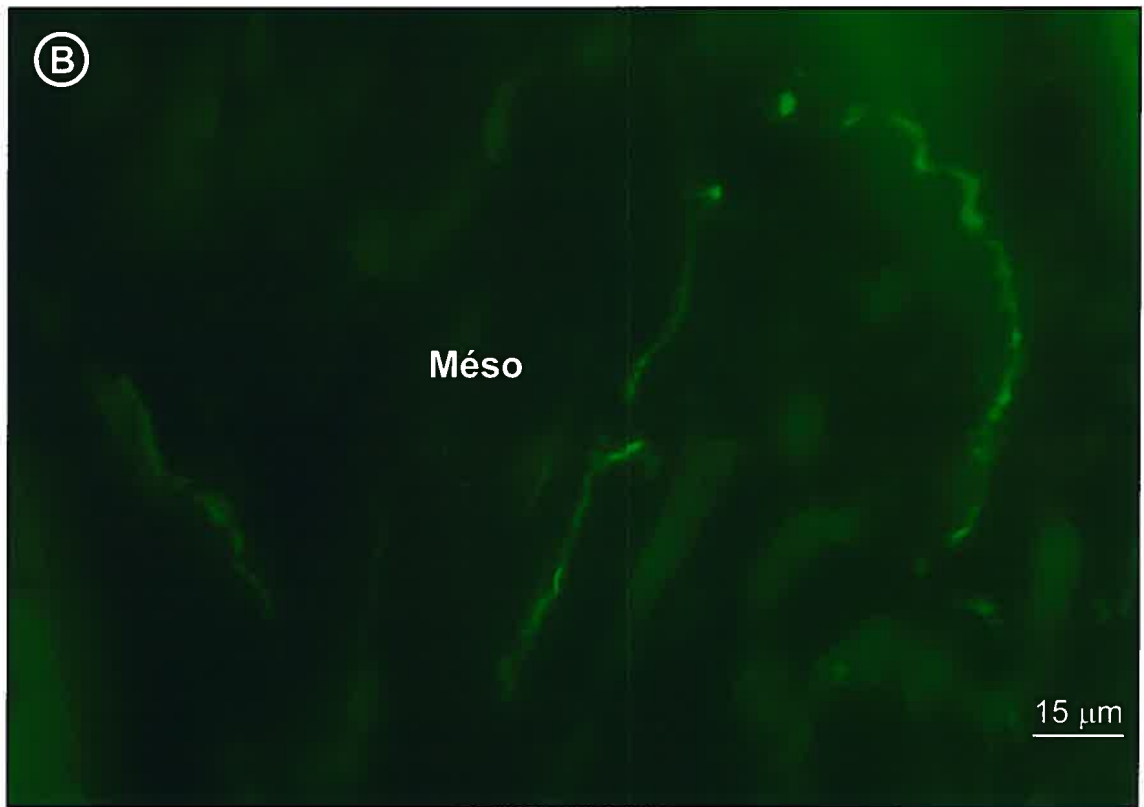
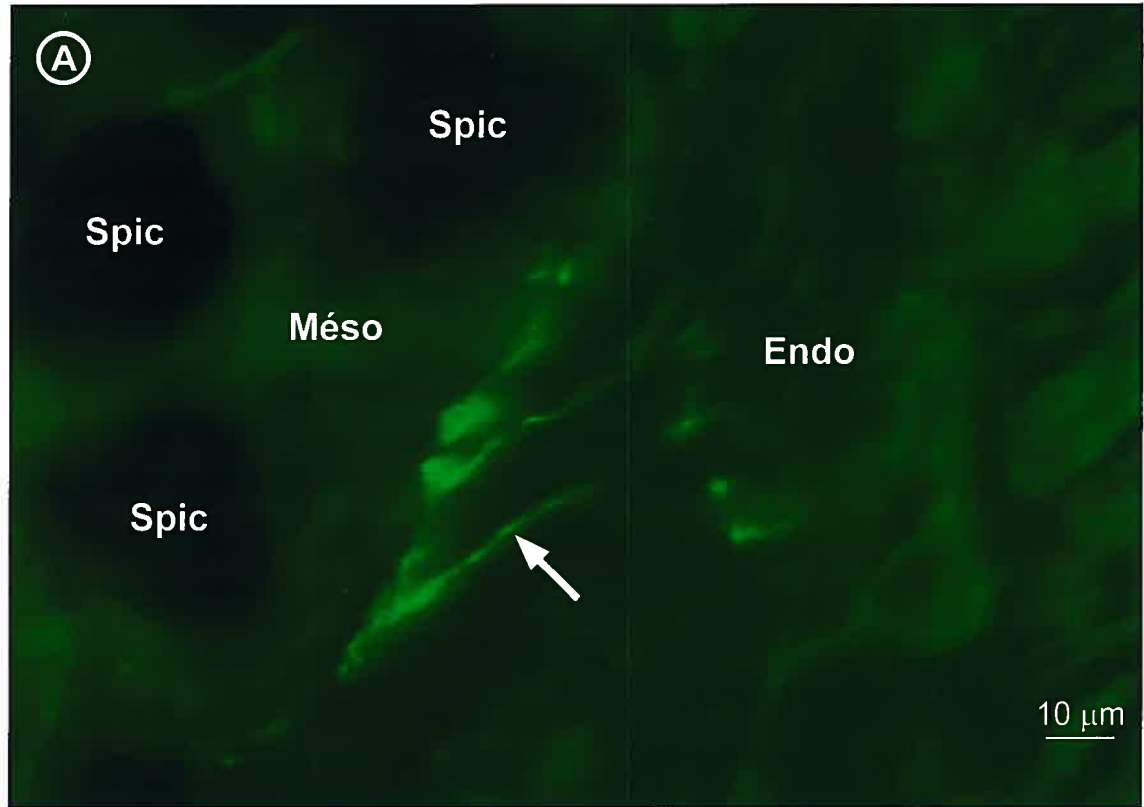


Figure 3.5

3.2.3 Au niveau de l'endoderme

Le marquage que nous avons obtenu au niveau de l'endoderme, quoique très intense et contrasté, nous apparaît limité aux mésentères du rachis particulièrement au niveau des cellules musculo-épithéliales.

Effectivement, peu importe la technique d'immunohistochimie ou l'anticorps primaire utilisé (Figures 3.6 et 3.7), l'immunoréactivité était localisée dans l'endoderme des mésentères mais dans la portion près de la mésoglée. La technique d'immunofluorescence s'est avérée plus efficace pour identifier l'origine du marquage car avec la technique d'immunoperoxydase, il était difficile d'identifier avec précision le ou les types cellulaires marqués. Cependant, elle nous permet tout de même d'en apprécier la distribution et de voir qu'elle est similaire pour les deux techniques d'immunohistochimie, c'est-à-dire plus particulièrement près de la mésoglée (Figure 3.6B). Si l'on compare l'immunofluorescence de la figure 3.6A avec celle de la figure 3.7A obtenue avec l'anticorps primaire anti-hER (18-32) on constate qu'elle est située au même endroit et que leur apparence est différente. Sur l'une d'entre elles (Figure 3.6A) le marquage prend la forme de petites boules ou sphères alors que sur l'autre (Figure 3.7A), on obtient plutôt une bande lisse et très uniforme. Dû au fait que les mésentères comprennent entre autres des couches musculaires, leur degré de contraction peut changer l'apparence des tissus qui la composent et par le fait même, celle des cellules. L'apparence sphérique du marquage (Figure 3.6 A) reflète un degré de contraction plus élevé que la bande mince et bien étalée (Figure 3.7A) qui nous montre

un mésentère peu contracté ou même étiré. On constate aussi que, contrairement à la portion musculaire, la portion épithéliale des cellules musculo-épithéliales (située sous la bande immunoréactive) est peu marquée (Figure 3.7A) et ce faible marquage est peut-être simplement causé par des reflets de l'immunoréactivité de la partie musculaire dans la partie épithéliale. Là où l'immunoréactivité est située (portion musculaire), aucune zone sombre non-marquée n'a été observée. Le noyau de ces cellules est situé dans la portion épithéliale (portion non-marquée) (Barnes, 1987; Beauvais et al., 1987; Lyke, 1965).

En plus des cellules musculo-épithéliales, il est possible de voir des cellules mésenchymateuses (amoebocytes) non marquées (Figure 3.7B) situées dans la mésoglée ainsi qu'une grande surface d'endoderme éclairée par l'immunofluorescence des cellules musculo-épithéliales où aucun marquage n'est apparent. On remarque que la mince couche de mésoglée du mésentère (Figure 3.7B) est en continuité avec une masse de mésoglée plus épaisse (située dans la partie supérieure de la figure). Cette observation nous confirme que la coupe est bel et bien au niveau du rachis puisqu'une couche de mésoglée épaisse ne peut se retrouver qu'au niveau du rachis. On observe aussi la présence de deux types de musculature ayant été marquées de part et d'autre de la mésoglée (Figure 3.7B) soit la musculature longitudinale et la musculature transversale. La musculature longitudinale montre une plus grande surface marquée que la transversale et c'est probablement parce qu'elle est plus importante en terme d'épaisseur puisqu'elle est responsable de la rétraction de l'autozoïde dans sa chambre. Un autre renseignement qui nous est fourni par la figure 3.7B est le marquage de petits

prolongements ou crochets (tête de flèche blanche) qui s'insèrent comme des têtes de ponts dans la mésogée et qui sont un caractère distinctif des cellules musculo-épithéliales (Fautin et al., 1991; Germain et al., 1988). En effet, ces petits prolongements servent à ancrer la partie musculaire des cellules musculo-épithéliales dans la mésogée afin que leur contraction soit efficace. Ces prolongements agissent un peu comme des tendons qui s'attachent aux os pour que la contraction musculaire produise un déplacement. Tous ces indices rassemblés ne nous laissent aucun doute sur la nature musculaire de l'immunoréactivité obtenue dans l'endoderme.

Figure 3.6 Immunoréactivité au niveau de l'endoderme des mésentères. Plusieurs cellules ont été fortement marquées près de la mésoglée (A et B) aussi bien par immunofluorescence (A) que par immunoperoxydase (B) avec l'anticorps primaire anti-hER (578-595). En A on peut bien voir que ce sont des cellules musculo-épithéliales mais surtout leur portion musculaire (flèches blanches) près de la mésoglée qui sont très marquées. End, endoderme; Méso, mésoglée ; spic, spicule.

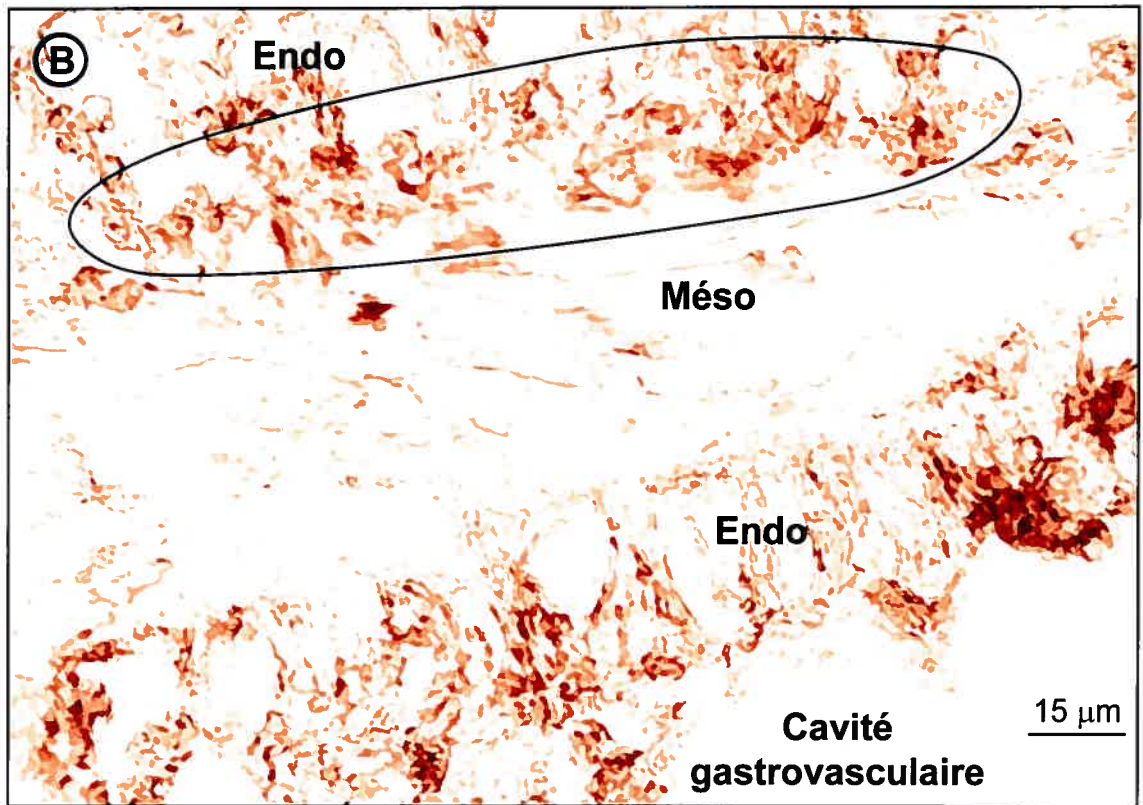
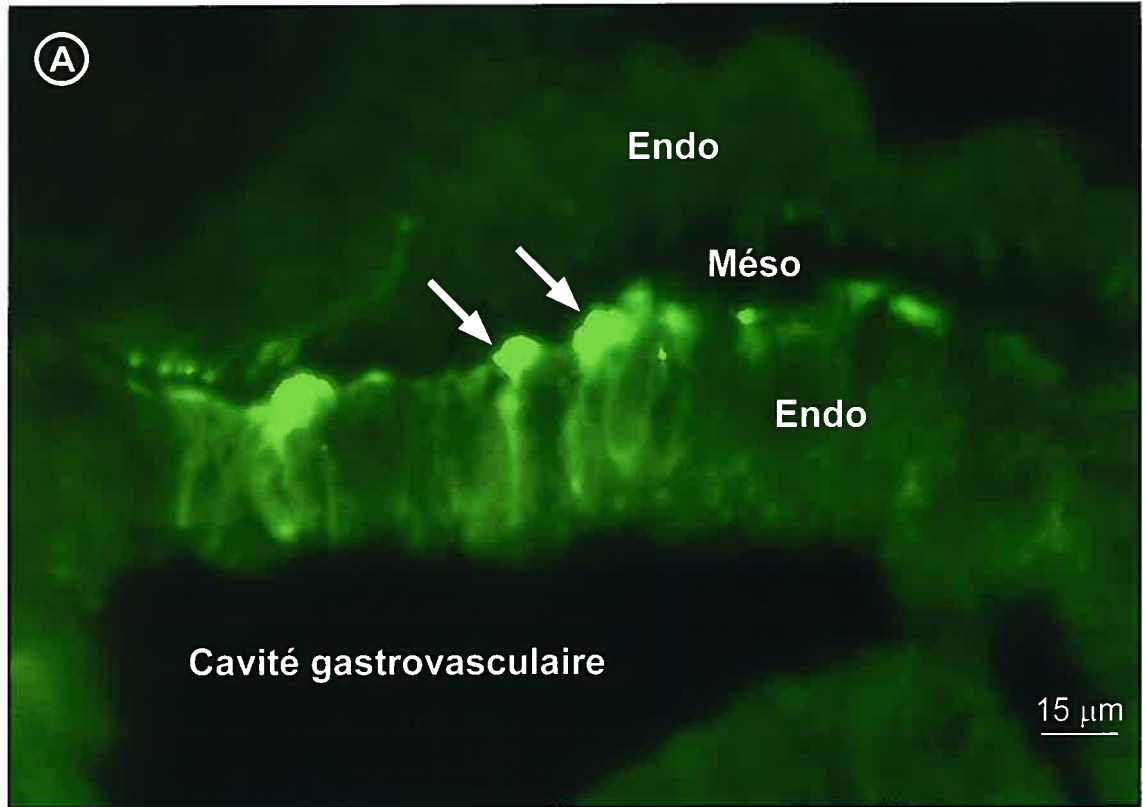


Figure 3.6

Figure 3.7 Immunoréactivité au niveau de l'endoderme des mésentères. En A, cellules musculo-épithéliales (flèches blanches) marquées avec l'anticorps primaire anti-hER (18-32) dont la majorité du marquage localisé dans la partie musculaire est bien représentée par une bande immunofluorescente (têtes de flèches blanches). En B, marquage de cellules musculo-épithéliales avec l'anticorps primaire anti-hER (578-595). Le marquage semble correspondre à la musculature longitudinale et radiale et on peut voir les petits prolongements (tête de flèche blanche) typiques des cellules musculo-épithéliales qui leur permettent de s'ancrer dans la mésoglée. End, endoderme; Méso, mésoglée ; spic, spicule.

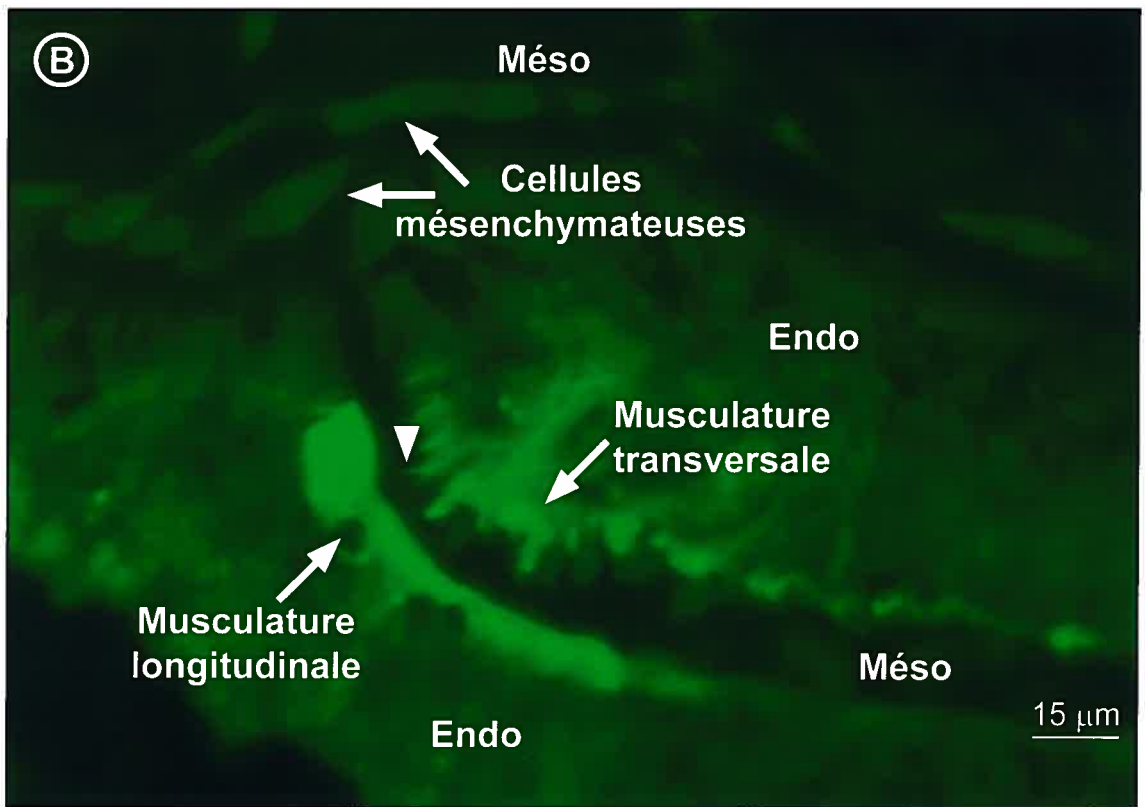
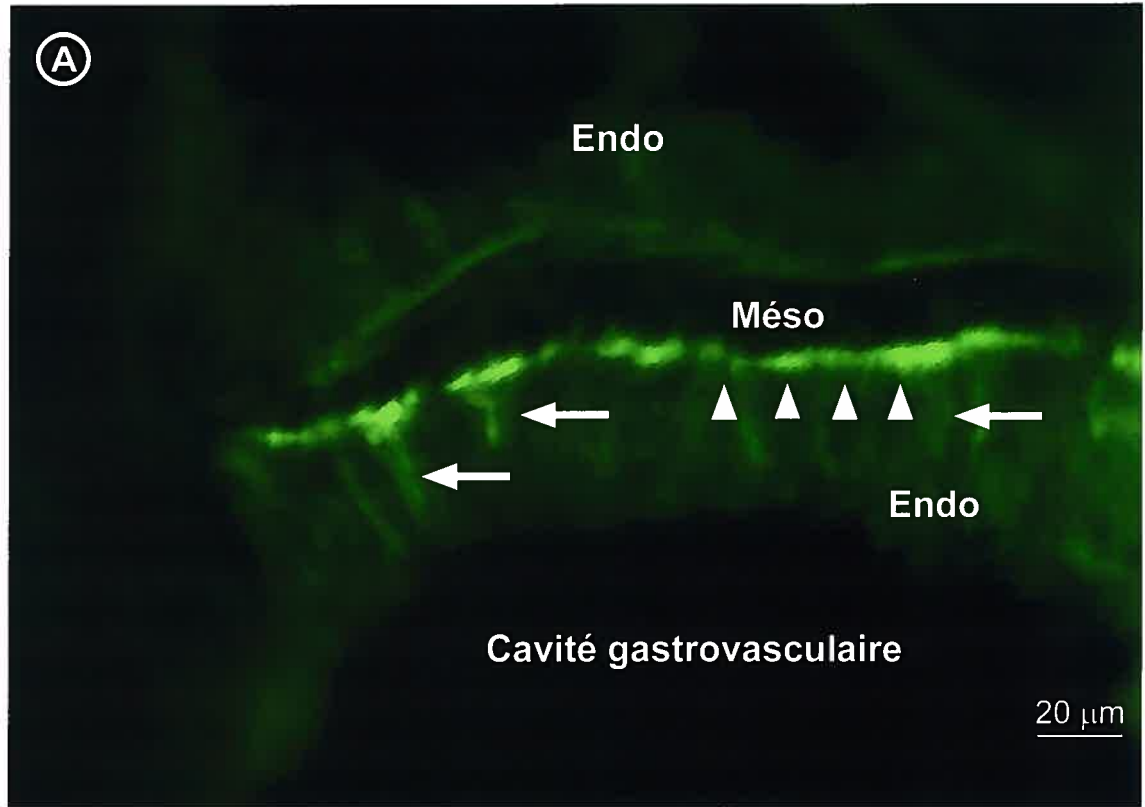


Figure 3.7

Chapitre 4

Discussion

4.1 Pourquoi le marquage serait-il associé à un récepteur à oestrogènes?

En théorie, les anticorps primaires utilisés dans cette étude devraient être spécifiques aux séquences d'acides aminés ciblées (18-32 et 578-595) du récepteur à oestrogènes alpha de l'humain et les anticorps secondaires, eux, sont supposés ne reconnaître dans l'échantillon que les anticorps primaires. Cependant, ne sachant pas si une autre protéine dans l'échantillon pourrait contenir exactement ces mêmes séquences d'acides aminés, il est nécessaire de faire un immunobuvardage de type Western. Cette technique nous permet alors de voir si une bande correspondant au poids moléculaire de la protéine visée est bel et bien présente et si elle est marquée. D'autres moyens de contrôle additionnels peuvent aussi être pris afin de valider les résultats obtenus comme de faire l'immunobuvardage de type Western avec un extrait provenant d'un autre animal où la

présence du récepteur à oestrogènes est connue. Finalement, si l'on se base sur ce que l'on sait de l'évolution des récepteurs nucléaires, est-ce que ces résultats sont possibles?

4.1.1 Contrôle avec un extrait d'ovaires et d'utérus de rat

Suite aux expériences d'immunobuvardage de type Western avec l'extrait de *Renilla*, nous avons effectivement obtenu une bande marquée au poids moléculaire correspondant au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain. Afin de vérifier si la méthode était à point, des expériences d'immunobuvardage de type Western ont été faites sur un autre extrait fait à partir de tissus où les récepteurs à oestrogènes sont reconnus pour y être en forte concentration. C'est la raison pour laquelle nous avons obtenu les extraits d'ovaires et d'utérus de rat. En utilisant cet extrait pour faire des expériences d'immunobuvardage de type Western, nous avons pu savoir si notre protocole fonctionnait car nous devions obtenir une forte bande marquée au poids moléculaire du récepteur à oestrogènes. Tel que souhaité, nous avons obtenu cette forte bande marquée mais seulement avec l'un des deux anticorps primaires soit l'anti-hER 18-32. Comme il fut mentionné précédemment dans la méthodologie, le récepteur à oestrogènes alpha du rat ne possède pas la séquence d'acides aminés 578-595 ciblé par l'un des anticorps primaires puisqu'il ne possède que 560 acides aminés. Cependant, nous nous sommes assurés que les acides aminés que comporte la séquence d'acides aminés 578-595 du récepteur à oestrogènes alpha de l'humain ne se retrouve nulle part

ailleurs dans le récepteur à oestrogènes alpha du rat. Donc, le fait que la bande marquée au poids moléculaire du récepteur à oestrogènes alpha chez le rat avec l'anticorps primaire anti-hER 18-32 ne soit pas visible avec l'autre anticorps primaire (tel qu'attendu) constitue un bon contrôle positif. Ceci nous confirme que la bande marquée au bon poids moléculaire ($\cong 67$ kDa) dans l'extrait d'ovaires et d'utérus de rat est vraisemblablement composée de récepteur à oestrogènes alpha. Ainsi, toute bande marquée à ce poids moléculaire obtenue à partir d'un extrait de nature différente et dans les mêmes conditions serait susceptible d'être associée à un récepteur à oestrogènes alpha. Comme on le constate sur la figure 3.1, nous avons de très bonnes raisons de croire que les bandes obtenues avec l'extrait de *Renilla* vis-à-vis du poids moléculaire du récepteur à oestrogènes alpha (rat ou humain, $\cong 67$ kDa) soit une protéine très similaire au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain.

4.1.2 Évolutionnairement possible ou pas?

Proposer qu'une protéine très apparentée au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain serait présente chez *Renilla koellikeri*, un cnidaire ayant davantage l'apparence d'un végétal et situé à la base de l'arbre évolutif, paraît quelque peu étonnant. Cependant, depuis quelques années, plusieurs chercheurs dans ce domaine publient des résultats qui appuient ceux que nous avons obtenus.

Tout d'abord, il est reconnu que le récepteur à oestrogènes serait le premier récepteur à stéroïdes à être apparu et qu'il serait suivi par le récepteur à progestérone.

Toutefois, on ne sait pas quand ce premier récepteur serait apparu. Thornton (2001), suite à des expériences visant à reconstruire l'ancêtre du récepteur à stéroïdes, a affirmé que cet ancêtre était à 71% identique au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain et qu'en plus d'être fonctionnel, sa séquence aurait été conservée. De plus, dans son domaine de liaison à l'ADN (DBD), le récepteur ancestral partage 61 des 66 acides aminés présents chez le récepteur à oestrogènes alpha de l'humain et la séquence de sa boîte proximale (P-box), responsable de la spécificité du récepteur pour son élément de réponse, serait identique. Cependant, cette forte similarité n'est pas partagée avec les autres récepteurs nucléaires, incluant les récepteurs à la progestérone, aux androgènes, aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes. Fort de ces constats, Thornton (2001) conclut que l'ancêtre des récepteurs à stéroïdes se lierait aux oestrogènes et qu'il activerait les gènes cibles via un élément de réponse aux oestrogènes classique. Trois ans plus tard Thornton et al. (2003) ont publié un article dans la revue Science qui va probablement influencer la façon dont nous allons considérer l'évolution et l'origine des récepteurs à stéroïdes. Ils ont isolé et amplifié une séquence d'un récepteur à oestrogènes chez le mollusque *Aplysia californica* et ont constaté plusieurs similarités avec les récepteurs à oestrogènes des vertébrés. La séquence d'acides aminées de la boîte proximale (P-box) était identique, celle du domaine de liaison à l'ADN (DBD) s'est avérée très similaire (85-88%) et celle de la fonction (AF-2) d'activation de la transcription à 75% identique à celles des récepteurs à oestrogènes de l'humain et pas à celles des autres récepteurs nucléaires, incluant les ERR. La fonction d'activation de la transcription (AF-2) située dans le domaine de liaison au ligand (LBD) est essentielle à la transcription activée par le ligand. Cependant, des études de radioliation ont démontré

que le domaine de liaison au ligand (LBD) de *Aplysia* ne se liait pas spécifiquement à l'oestradiol et qu'il activait la transcription sans la présence de ligand. Donc, la seule présence du domaine de liaison au ligand serait suffisante pour activer la transcription. Ceci suggère que le récepteur à oestrogènes de *Aplysia* active de manière constitutive l'expression des gènes via un élément de réponse aux oestrogènes (ERE). Des expériences ont aussi été faites avec le domaine de liaison au ligand (LBD) de l'ancêtre des récepteurs à stéroïdes (AncSR-1) qu'ils ont reconstitué. Ils ont obtenu une activation de la transcription dose-dépendante du ligand avec trois oestrogènes. Des études de dose-réponse ont révélé que ce présumé récepteur ancestral est de 107 à 30 000 fois moins sensible à d'autres stéroïdes (progestérone, testostérone, cortisol, etc...) que les oestrogènes. Selon Thornton et ses collègues, le gène du récepteur qui serait l'ancêtre des récepteurs à stéroïdes et qui serait activé par un ligand (AncSR-1) aurait été perdu dans la lignée menant aux ecdysozoaires (arthropodes, nématodes). L'activation dépendante des oestrogènes pour sa part n'aurait été perdue que récemment et uniquement chez les opisthobranches (sous-classe des gastéropodes), la lignée menant au récepteur à oestrogènes de *Aplysia californica*. Les résultats de Kortschak et al.(2003) vont aussi dans le même sens. Ils ont affirmé que dans le génome de *Acropora millepora* (un cnidaire), 10% des séquences répertoriées au hasard (EST : expressed sequence tags) avaient clairement un homologue chez l'humain mais aucun chez *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans*. Ce 10% comprenait une diversité surprenante de facteurs de transcription et de protéines métaboliques que l'on croyait limités aux vertébrés. De plus, ils ont constaté que pour l'ensemble de ces séquences répertoriées, il y avait plus de similarités avec le génome de l'humain qu'avec celui de *D. melanogaster*

ou de *C. elegans*. Il y aurait donc, selon eux, une meilleure conservation des gènes entre *A. millepora* et l'humain qu'entre *A. millepora* et *D. melanogaster* ou *C. elegans*. Lorsqu'ils ont comparé les séquences de *A. millepora* avec l'ensemble des séquences présentes dans la base de données, la majorité des séquences de *A. millepora* étaient plus similaires à celles de vertébrés qu'à celles de n'importe quel invertébré. Ils en déduisent donc que l'absence d'homologues clairs chez *D. melanogaster* et *C. elegans* pour plusieurs gènes représentés chez le corail *A. millepora* et l'humain reflète une perte secondaire des gènes dans la lignée menant à ces deux d'invertébrés.

Jusqu'à il y a de cela quelques années, le fait qu'aucun orthologue (gènes apparentés dans des génomes différents obtenus par spéciation) des gènes des récepteurs à oestrogènes, androgènes, progestérone, minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes n'avait été trouvé chez l'insecte *Drosophila melanogaster*, le nématode *Caenorhabditis elegans* ou l'urochordé *Ciona intestinalis* (Dehal et al., 2002; Maglich et al., 2001), des organismes dont tout le génome a été séquencé, nous laissait croire que les récepteurs à stéroïdes avaient évolué à partir des chordés il y a environ 400 à 500 millions d'années. Cependant, les travaux de Thornton et de ses collègues suggèrent fortement que la séquence chez *Aplysia californica* est un orthologue des récepteurs à oestrogènes des vertébrés, reculant ainsi l'origine des récepteurs à stéroïdes entre 200 à 700 millions d'années. De plus, Kortschak (2003) a démontré que les cnidaires et les humains sont génétiquement plus apparentés que les modèles d'invertébrés (*D. melanogaster* et *C. elegans*) et les humains. Une fois de plus, les vertébrés sont considérés moins innovateurs qu'on ne le croyait. Si l'on considère que les cnidaires sont apparus il y a

environ 700 millions d'années, il est donc possible qu'il y ait chez *Renilla koellikeri*, un récepteur à oestrogènes très similaire au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain et qu'il soit proche de l'ancêtre des récepteurs à stéroïdes. Si tel est le cas, il serait, selon les dires de Thornton (2003), activé par un ligand.

4.2 Distribution surprenante du marquage au niveau intracellulaire

La littérature concernant les récepteurs à hormones stéroïdes (ex: oestrogènes, testostérone, progestérone) associe automatiquement ces récepteurs à une localisation au noyau, d'où leur classement dans la superfamille des récepteurs nucléaires. À plusieurs reprises dans la section des résultats, nous faisons mention de zones sombres moins marquées présumément associées au noyau ou à la zone périnucléaire. Si l'on parle de zones moins marquées, cela implique donc, en plus d'un noyau présumément moins marqué, que le cytoplasme l'est fortement. Dans le contexte actuel, où la présence de récepteur à oestrogènes est davantage associée au noyau, ceci peut paraître étrange. Cependant, ce qui peut paraître le plus étrange n'est pas qu'il y ait du marquage dans le cytoplasme mais plutôt qu'il semble plus important dans le cytoplasme que dans le noyau. Nous avons donc tenté de trouver différentes interprétations plausibles à ce phénomène.

4.2.1 Est-ce que la méthode pourrait être en cause?

Il serait possible que les procédures de fixation des tissus aient rendu le facteur de transcription (le récepteur à oestrogènes) instable et qu'il aurait migré ou diffusé plus qu'à l'habitude dans le cytoplasme. Il est connu que la présence des récepteurs à oestrogènes au niveau nucléaire est assurée par un transport actif (énergie-dépendant) des récepteurs présents dans le cytoplasme vers le noyau. À l'inverse, les récepteurs présents dans le noyau diffusent (transport passif énergie-indépendant) constamment vers le cytoplasme. Ce transport de part et d'autres de la membrane constitue la navette nucléocytoplasmique (Dauvois et al., 1993; Guiochon-Mantel et al., 1991; Maruvada et al., 2003). Il est donc facile d'imaginer que le moindre événement (produits utilisés, procédés, etc...) nuisant au transport actif puisse entraîner une localisation davantage cytoplasmique du récepteur puisqu'il ne peut plus être pompé dans le noyau mais peut toujours diffuser vers le cytoplasme. Donc, tout ce qui aurait pu empêcher ou limiter la production d'énergie ou encore la rendre inaccessible de même que tout ce qui aurait pu altérer la machinerie responsable de ce transport pourrait avoir causé cette distribution. Il se pourrait que l'étape de la fixation des lanières de *Renilla* ait favorisé cette distribution surprenante. Tel que mentionné dans la méthodologie, les lanières de *Renilla* ont été fixées toute la nuit à 4°C. Le fait de fixer à 4°C permet d'éviter une détérioration des tissus mais ralentit la pénétration du fixateur. Il a déjà été rapporté (Guiochon-Mantel et al., 1991; Newmeyer et al., 1988; Richardson et al., 1988) que le transport actif du récepteur à oestrogènes vers le noyau est inhibé lorsque la température baisse (même à partir de 4°C). Il serait donc possible que le refroidissement des lanières ait arrêté le

transport actif mais que la diffusion (passive) vers le cytoplasme se soit poursuivie assez longtemps avant que la fixation soit totale. Toutes ces possibilités pourraient avoir été favorisées et accentuées par le fait que les cellules de *Renilla koellikeri* sont petites et que généralement leur noyau est très petit. Évidemment, un noyau très petit aura un rapport surface/volume plus élevé ce qui favorisera la diffusion des éléments qui le composent vers le cytoplasme.

4.2.2 Est-ce que nos observations représentent la vraie distribution intracellulaire *in vivo*?

Il est connu que plusieurs récepteurs nucléaires dont le récepteur à oestrogènes alpha, font la navette entre le cytoplasme et le noyau (Dauvois et al., 1993; Maruvada et al., 2003). Cependant, avec ou sans oestradiol, la majorité des récepteurs sont localisés dans le noyau, mais davantage s'il y a de l'oestradiol. Dans le cas du récepteur aux oestrogènes, c'est le récepteur non lié au ligand qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme. L'entrée du récepteur dans le noyau serait un transport actif qui implique donc de l'énergie alors que la sortie du noyau, elle, serait passive. Donc, la présence de marquage dans le cytoplasme est tout à fait possible et normale. D'ailleurs, la présence de marquage spécifique aux récepteurs à oestrogènes alpha uniquement ou principalement localisé dans le cytoplasme fut rapportée pour divers types cellulaires au niveau de l'hypophyse et du cerveau (Blaustein, 1992; Pasqualini et al., 2001; Pasqualini et al., 1999).

Comme le montre la figure 3.1, d'autres bandes ne correspondant pas au poids moléculaire du récepteur à oestrogènes alpha de l'humain ($\cong 67$ kDa) ont été détectées. Plusieurs auteurs font référence à diverses formes du récepteur à oestrogènes alpha des vertébrés qui seraient obtenues soit par une altération secondaire du récepteur complet ou soit par la synthèse directement à partir d'un transcrit (épissage alternatif). Certains de ces isoformes sont principalement localisés dans le noyau, d'autres se retrouvent plutôt dans le cytoplasme et d'autres, dans les deux. Concernant les formes obtenues par une altération secondaire ou post-traductionnelle du récepteur complet, on implique généralement la protéolyse. Elle peut être causée par la libération des enzymes protéolytiques (protéases) lors de la manipulation des tissus comme lors de l'homogénéisation des tissus en particulier s'ils ne sont pas maintenus à 4 °C, car la chaleur favorise l'action des enzymes protéolytiques, et si des inhibiteurs de protéases n'ont pas été ajoutés au tampon d'homogénéisation. Ces altérations secondaires peuvent aussi être causées par une protéolyse intracellulaire avant même l'homogénéisation (Kirschner, 1999; Maaroufi et al., 2000). En ce qui nous concerne, nous avons pris les mesures nécessaires pour limiter la protéolyse lors des processus d'homogénéisation et de préparation des coupes histologiques car nous avons maintenu les tissus au frais et nous avons utilisé des inhibiteurs de protéases. Donc, si les altérations post-traductionnelles sont impliquées dans la présence de formes tronquées du récepteur complet, elles sont probablement causées par une protéolyse intracellulaire avant l'homogénéisation des tissus.

Concernant les isoformes résultant non pas de modifications secondaires d'un récepteur complet mais plutôt d'une synthèse à partir du gène, ils sont obtenus par épissage alternatif du transcrit primaire. Généralement, l'épissage sert à retirer les introns (régions non-codantes) et à rabouter les exons (régions codantes) afin de former le transcrit mature qui va, suite à d'autres modifications, être envoyé dans le cytoplasme pour être traduit. Cependant, il existe aussi une forme d'épissage où des exons peuvent être retirés; c'est le cas de l'épissage alternatif. Donc à partir d'un même transcrit primaire, des ARN messagers matures différents peuvent être obtenus, entraînant par le fait même la synthèse de protéines différentes. Ce mécanisme est une autre source possible d'isoformes du récepteur à oestrogènes alpha et malgré qu'ils aient tout d'abord été détectés dans des tumeurs cancéreuses, ils sont aussi présents dans des tissus normaux (Ferro et al., 2003; Leygue et al., 1996; Pasqualini et al., 2001; Pasqualini et al., 1999; Pfeffer et al., 1996). Évidemment, puisque certains exons ont été enlevés, la protéine qui sera synthétisée n'aura pas le même poids moléculaire que le récepteur complet mais pourra tout de même avoir une séquence très similaire. Cette forte ressemblance de séquences est probablement une des causes pour laquelle plusieurs bandes ont été détectées sur l'immunobuvardage de type Western. Cependant, il nous apparaît moins probable que ces différents isoformes soient présents en quantité suffisamment élevée pour produire un marquage principalement cytoplasmique au niveau de certaines cellules. Il est important de signaler que ce n'est pas systématiquement chez toutes les cellules et/ou les types cellulaires que le noyau semblait moins marqué. Il est aussi possible que dû au caractère primitif de la rénille, d'autres isoformes de diverses sources puissent exister.

4.3 Immunobuvardage de type Western

Il est clair que l'intention première de faire de l'immunobuvardage de type Western était de voir si nous obtenions, avec l'extrait de *Renilla*, une bande marquée correspondant au poids moléculaire du récepteur à oestrogènes alpha de l'humain (\cong 67 kDa). Cependant, en plus de détecter cette bande, on pouvait aussi détecter d'autres bandes marquées à des poids moléculaires différents tout comme avec l'extrait d'ovaires et d'utérus de rat. Le fait d'avoir plusieurs bandes marquées autres que celle visée est un phénomène fréquent et même normal. Nous aurions pu simplement nous en tenir à la bande de 67 kDa et dire que les autres ne sont pas spécifiques ou qu'elles sont dues à une dégradation (protéolyse) de l'échantillon (ce qui est toujours possible). Cependant, sachant qu'il est bien connu que la population normale des récepteurs à oestrogènes soit assez hétérogène (Maaroufi et al., 2000; Navarro et al., 1998; Pasqualini et al., 2001; Pfeffer et al., 1996), nous avons tenté de trouver une justification possible à la présence de ces bandes. Puisque la forme complète du récepteur à oestrogènes alpha de l'humain a déjà été bien décrite précédemment, nous ne nous attarderons donc pas à la bande correspondant à son poids moléculaire. L'intention ici n'est pas de caractériser chacune des bandes observables sur la figure 3.1 mais plutôt de démontrer que plusieurs isoformes peuvent être obtenus par différents phénomènes et que plusieurs des bandes marquées ne correspondant pas au récepteur complet pourraient tirer leur origine de ces isoformes.

Concernant les isoformes obtenus suite à une protéolyse, Maaroufi et al. (2000) ont détecté des isoformes de 28, 31, 33, 35, 37 et 50 kDa qui, selon eux, seraient obtenus par une protéolyse intracellulaire naturelle. D'autres chercheurs (Fritsch et al., 1993) ont obtenu à peu près les mêmes isoformes en provoquant une protéolyse avec de la trypsine (protéase). Ils avaient des poids moléculaires de 10, 28, 29, 31, 35, 37 et 50 kDa. Afin d'évaluer les possibilités de détection de ces isoformes par nos anticorps primaires, il faut se rappeler que nos deux anticorps primaires sont générés contre des séquences d'acides aminés situées aux deux extrémités de la séquence du récepteur à oestrogènes alpha. L'isoforme de 50 kDa conserve la séquence d'acides aminés 18-32 et pourrait être détecté par l'anticorps généré contre cette séquence. Cependant, nous pouvons supposer que d'autres isoformes ayant conservé la séquence d'acides aminés 18-32 (N-terminale) existent puisque la plupart des isoformes connus proviennent du côté C-terminal et que leur(s) partie(s) complémentaire(s) ne sont certainement pas disparue(s). Concernant les autres isoformes connus, en se basant sur leur origine (Fritsch et al., 1993; Maaroufi et al., 2000), seuls ceux de 33, 35 et peut-être 37 kDa auraient les acides aminés 578-595 contre lesquels est généré l'autre anticorps primaire. Les isoformes produits par un épissage alternatif sont, eux aussi, assez variés (Tableau III). Il existe aussi d'autres isoformes mais ils n'ont pas été retenus pour le tableau III puisque leur présence fut détectée seulement dans des tissus anormaux (tumeur cancéreuse). Le transcrit primaire du récepteur à oestrogènes comporte 8 exons (régions codantes) et les exons 1 et 8 sont toujours présents chez les isoformes répertoriés. Étant donné que nos deux anticorps primaires sont générés contre des séquences d'acides aminés situées aux deux extrémités de la séquence du récepteur à oestrogènes alpha, l'absence de certains exons situés entre

ces deux séquences ne devrait pas affecter leur liaison aux séquences ciblées. Dès lors, nos anticorps pourraient détecter la plupart des isoformes produits par épissage alternatif présents dans le tableau III. Évidemment, nous n'excluons pas la possibilité que les bandes de poids moléculaires différents de 67 kDa puissent provenir d'une autre source ou encore, qu'elles soient non-spécifiques. Cependant, elles peuvent toutes être expliquées, exceptée celle de 80 kDa chez le rat, par les isoformes connus si l'on considère que les poids moléculaires de nos bandes sont des approximations et qu'elles sont sujettes à une certaine marge d'erreur.

Le ou les exons manquants	Poids moléculaire de l'isoforme (kDa)	Références
2	16,3	(Pfeffer et al., 1996) (Leygue et al., 1996) (van Dijk et al., 2000)
3	61,8	(Leygue et al., 1996) (Pasqualini et al., 1999) (van Dijk et al., 2000) (Pasqualini et al., 2001)
2 et 3	?	(Leygue et al., 1996)
4	53,7	(Pfeffer et al., 1996) (Pasqualini et al., 1999) (van Dijk et al., 2000) (Pasqualini et al., 2001)
3 et 4	45	(Pasqualini et al., 1999) (Pasqualini et al., 2001)
5	41	(Fuqua et al., 1993) (Leygue et al., 1996) (Pfeffer et al., 1996) (van Dijk et al., 2000)
7	51,8	(Leygue et al., 1996) (Pfeffer et al., 1996) (van Dijk et al., 2000)
4 et 7	39,3	(Pfeffer et al., 1996)

Tableau III Tableau des divers variants du transcript primaire du récepteur à oestrogènes alpha se retrouvant chez des tissus normaux de mammifères.

4.4 Que nous révèlent les types cellulaires marqués?

Plusieurs types cellulaires ont été marqués par les deux techniques d'immunohistochimie et les deux anticorps primaires. En se basant sur la littérature actuelle, nous tenterons d'établir des parallèles entre les résultats que nous avons obtenus pour les divers types cellulaires et ceux connus pour des types cellulaires équivalents. De plus, en tenant compte des types cellulaires marqués et de leur localisation, nous tenterons d'établir des liens avec des fonctions potentielles pour cette protéine apparentée au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain.

4.4.1 Cellules interstitielles et cellules engagées

Comme il a été mentionné précédemment, en se basant sur le modèle de l'hydre, les cellules interstitielles de *Renilla* sont des cellules souches multipotentes. Elles sont indifférenciées et peuvent donner naissance à trois classes de produits somatiques ainsi qu'aux deux types de gamètes. Les classes de produits somatiques sont les cellules sécrétrices (cellules glandulaires et à mucus), les neurones (cellules sensorielles et ganglionnaires) et les nématocytes. Évidemment, les cellules interstitielles doivent passer par un processus de différenciation avant de devenir un type cellulaire fonctionnel. Dès qu'une cellule interstitielle entame une différenciation vers un type cellulaire particulier, elle devient une cellule dite engagée.

Comme il fut décrit dans les résultats, plusieurs cellules souches interstitielles multipotentes ont été marquées dans l'ectoderme ainsi que plusieurs cellules engagées (Figures 3.2 à 3.4), et ce, avec l'une ou l'autre des techniques d'immunohistochimie. Ces cellules sont responsables du renouvellement constant des divers types cellulaires, à l'exception des cellules épithéliales (selon le modèle de l'hydre), et sont donc un site important de prolifération et de différenciation cellulaire. Il est reconnu depuis relativement longtemps que les oestrogènes sont fortement impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Par exemple, au niveau du vagin, l'oestradiol-17 β promouvoit la prolifération, la cytodifférenciation, la stratification et la cornification (kératine) épithéliale via les récepteurs à oestrogènes alpha (Buchanan et al., 1998). Cependant, il est de plus connu que les oestrogènes sont essentiels à la reproduction chez les mammifères mâles. L'absence de récepteurs à oestrogènes alpha au niveau des testicules de souris entraîne une atrophie des testicules, une réduction du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes et cause ainsi l'infertilité (Eddy et al., 1996; Hess et al., 1997). Le récepteur à oestrogènes alpha a été rapporté au niveau des cellules de Leydig chez les mammifères (Fisher et al., 1997) et au niveau des fibroblastes interstitiels (précurseurs des cellules de Leydig) chez la truite arc-en-ciel (Bouma et al., 2001). Comme il en sera aussi fait mention un peu plus loin dans la discussion, les oestrogènes sont impliqués dans la formation des structures calcifiées. Ils agiraient entre autres sur la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Ernst et al., 1988).

La présence de récepteurs présumés à oestrogènes au niveau de divers types de cellules souches, germinales ou précurseurs suggère que les oestrogènes sont impliqués dans les processus de prolifération, de croissance et de différenciation cellulaire de manière générale et dans plusieurs embranchements du règne animal. Le marquage obtenu (Figures 3.2 à 3.4) au niveau des cellules interstitielles multipotentes ainsi que plusieurs cellules engagées semble suggérer que les oestrogènes sont aussi impliqués dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaire chez *Renilla koellikeri*.

4.4.2 Les cellules glandulaires

La présence de récepteurs à oestrogènes fut rapportée pour plusieurs glandes comme les glandes mammaires (Leygue et al., 1996), l'hypophyse (Pasqualini et al., 1999), la prostate et les glandes accessoires (Kuiper et al., 1997), les muqueuses orales et les glandes salivaires (Valimaa et al., 2004) et le vagin (Odeblad, 2002). Cependant, l'analogie la plus plausible avec les cellules glandulaires marquées (Figure 3.2C) chez *Renilla* serait avec les cellules produisant du mucus comme les muqueuses orales et le vagin. Puisque les cellules marquées étaient situées dans l'ectoderme, elles ne sont pas impliquées dans la digestion (ce rôle est attribué à des cellules endodermiques), donc sécrètent possiblement du mucus. Les cellules glandulaires sont issues des cellules interstitielles de l'ectoderme. Il est donc possible que le présumé récepteur à oestrogènes tel que montré par la présence de marquage pour le récepteur à oestrogènes alpha au

niveau de cellules glandulaires soit simplement impliqué dans la prolifération, la croissance ou la différenciation cellulaire.

4.4.3 Les structures nerveuses

Tel que mentionné dans l'introduction, les cellules nerveuses chez *Renilla koellikeri* sont issues des cellules interstitielles de l'ectoderme qui donnent aussi naissance à plusieurs autres types de cellules spécialisées. Puisqu'il a été démontré que les cellules interstitielles avaient été marquées (Figure 3.2) et qu'il y a un lien de parenté entre les cellules interstitielles et les cellules nerveuses, la présence de marquage au niveau des cellules nerveuses est peu étonnant.

La présence de récepteurs à oestrogènes alpha au niveau de divers types de cellules nerveuses et le rôle des oestrogènes chez ces cellules sont bien documentés. Les oestrogènes auraient un rôle dans la synaptogénèse au niveau de l'hippocampe chez le rat femelle (McEwen et al., 2001). Ils seraient impliqués dans les processus cycliques de formation de synapses excitatrices sur les épines dendritiques de l'hippocampe. La présence de récepteurs à oestrogènes alpha a été rapportée au niveau d'interneurones inhibiteurs dispersés dans l'hippocampe (Wolley et al., 1990) ainsi qu'au niveau des épines dendritiques et des terminaisons pré-synaptiques (McEwen et al., 2001). Bien que leur localisation ait souvent été rapportée au niveau du noyau, ils sont aussi de plus en plus rapportés au niveau du cytoplasme, en particulier au niveau des épines dendritiques et des terminaisons pré-synaptiques. En plus d'être nucléaires et cytoplasmiques, les

récepteurs à oestrogènes seraient aussi membranaires au niveau du cerveau (Beyer et al., 2003). De plus, leur distribution non-nucléaire a été aussi rapportée dans des astrocytes (McEwen et al., 2001). Plusieurs rôles ont été démontrés ou avancés pour les oestrogènes : formation d'épines dendritiques et régulation locale du calcium disponible (McEwen et al., 2001), contrôle de la libération et du recaptage de neurotransmetteurs (Blaustein, 1992), facteur neuroprotecteur (Garcia-segura et al., 2001), promotion de la survie neuronale et coordination de la différenciation cellulaire (Beyer et al., 2000; Naftolin et al., 1996; Sawada et al., 2000), induction de la différenciation sexuelle des cellules du cerveau et des circuits neuronaux dans le système nerveux central en développement (Beyer, 1999).

Une fois de plus nous pouvons constater le large spectre d'action des oestrogènes et entre autres leur implication récurrente dans le développement et la différenciation cellulaire. Suite à ce bref survol de la littérature concernant les oestrogènes et leurs récepteurs au niveau de cellules nerveuses, le marquage (nucléaire ou cytoplasmique) obtenu au niveau de différentes structures nerveuses n'est pas tellement surprenant. Il est difficile à ce stade-ci de déterminer la raison d'être de cette protéine apparentée au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain chez certaines cellules nerveuses de *Renilla koellikeri* mais une implication plutôt générale comme dans le développement, croissance ou la différenciation cellulaire pourrait être soupçonnée.

4.4.4 Les scléroblastes

On a vu sur la figure 3.4 que les scléroblastes avaient été fortement marqués au niveau du cytoplasme résiduel. Chez *Renilla koellikeri*, ce type cellulaire se trouve à être un analogue des ostéoblastes puisqu'il est responsable de la production des spicules calcaires qui constituent le squelette interne de l'animal. Tout comme les ostéoblastes, ils doivent pouvoir absorber les minéraux (calcium, phosphate) nécessaires à la minéralisation. Par contre, un analogue des ostéoclastes n'est pas encore connu chez les cnidaires. Il est possible qu'un mécanisme de résorption du squelette ne soit pas requis et qu'un simple contrôle du taux de production des spicules soit suffisant. La présence de marquage au niveau des cellules mésenchymateuses situées près de l'ectoderme et des scléroblastes semble en accord avec l'hypothèse émise par Dunkelberger (1974) sur l'origine des scléroblastes. Son hypothèse était que les cellules interstitielles baso-ectodermiques migraient dans la mésogée et se différenciaient en cellules mésenchymateuses (amoebocytes) puis en scléroblastes. Le fait que nous ayons obtenu du marquage au niveau de ces trois types cellulaires suggère un lien de parenté et des caractéristiques communes. Cependant, la présence de cellules mésenchymateuses non marquées avait été relevée (Figure 3.7B) dans les résultats. Par contre, elles n'étaient pas situées près de l'ectoderme mais plutôt dans une région près des mésentères où il y a peu de spicules et de scléroblastes. Il se pourrait que les cellules mésenchymateuses marquées, le soient parce qu'elles étaient soit en voie de devenir des scléroblastes ou soit parce qu'elles étaient simplement en différenciation cellulaire. Une autre possibilité qui pourrait expliquer les cellules mésenchymateuses non-marquées (Figure 3.7B) est que la

technique utilisée (immunofluorescence) était moins sensible que la technique d'immunoperoxydase.

Les propriétés de régulation de la croissance et du remodelage osseux des oestrogènes sont très bien documentées. Nous n'avons qu'à penser aux femmes ménopausées qui sont sujettes à souffrir d'ostéoporose due à une baisse d'oestrogènes causée par l'inactivation des fonctions reproductrices. Bien évidemment, ces rôles sont davantage connus pour les mammifères en particulier l'humain mais sont de plus en plus étudiés chez d'autres animaux comme les oiseaux et les poissons. Chez les mammifères et les oiseaux, les oestrogènes agiraient directement, via des récepteurs à oestrogènes α et/ou β nucléaires et/ou membranaires (Brubaker et al., 1994), sur les cellules de la lignée des ostéoblastes (Eriksen et al., 1988; Komm et al., 1988) et des ostéoclastes (Oursler et al., 1991). Sur les ostéoblastes, ils favoriseraient l'activation de la prolifération, l'induction de la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire osseuse et la sécrétion de facteur de croissance qui à leur tour sont responsables d'une augmentation de la multiplication cellulaire et de la différenciation (Ernst et al., 1988). De plus, ils induiraient des effets antirésorptifs indirects en inhibant la production par les ostéoblastes, de cytokines intervenant dans le recrutement des ostéoclastes (Fiorelli et al., 1995; Vanacker et al., 1999b). Tel que rapporté par Bonnelye (1997), le ERR α serait aussi fortement exprimé au cours du développement embryonnaire de la souris au niveau de différentes zones d'ossification (Bonnelye et al., 1997). Pour que les ostéoclastes puissent causer une résorption osseuse, ils doivent sécréter des enzymes

lysosomales et des acides métaboliques. Pour se faire ils utiliseront différents moyens pour produire de l'acidité comme la pompe à protons et l'anhydrase carbonique qui permettra de faire passer les sels de calcium sous une forme soluble (Marieb, 1993). L'oestradiol aurait le même effet inhibiteur que la calcitonine en inhibant la production d'acide dans les ostéoclastes et de plus, il inhiberait la pompe à protons (Brubaker et al., 1994; Gay et al., 1993). Il a aussi été rapporté (Lieberherr et al., 1993) chez des ostéoblastes de rat femelle que l'oestradiol-17 β avait des effets rapides (5-120 s) et probablement non-génomiques sur la concentration intracellulaire de calcium via probablement un récepteur membranaire. Il augmenterait la concentration intracellulaire du calcium en causant un influx de Ca²⁺ à partir du milieu extracellulaire et en mobilisant le calcium du réticulum endoplasmique.

La présence d'ARNm du récepteur à oestrogènes de même qu'un site de liaison à l'oestradiol-17 β ont été détectés dans les écailles et les os de la truite arc-en-ciel et l'exposition de ces tissus à l'oestradiol-17 β causait une diminution du contenu en calcium et en phosphate au niveau des écailles (Armour et al., 1997; Persson et al., 2000). L'oestradiol-17 β agirait donc directement sur les écailles en augmentant l'activité des ostéoclastes. Cette résorption aurait pour but de répondre à une demande de calcium plus élevée durant la production des oocytes car ces derniers accumulent le calcium fixé à la vitellogénine. Ce calcium est essentiel au bon développement de l'embryon (Persson et al., 2000). Donc, contrairement à un effet inhibiteur sur les

ostéoclastes, il semble que l'oestradiol peut aussi favoriser leur activité, donc la résorption osseuse.

L'idée de recrutement de calcium pour la calcification des octocoralliaires a été émise par Watabe et Kingsley (1992). Leur hypothèse implique l'importation d'ions par les polypes jusqu'à l'axe calcifié et le recrutement ou la mobilisation du calcium de l'axe pour être utilisé par les scléroblastes dans le processus de formation des spicules. Il serait possible que l'oestradiol-17 β ait un rôle dans cette mobilisation et que des récepteurs à oestrogènes se retrouvent au niveau des scléroblastes. De plus, il a été rapporté (Tarrant et al., 2004) que lorsqu'on exposait le corail *Porites compressa* à un oestrogène pour une période allant jusqu'à huit semaines, le taux de croissance du squelette était réduit de 13 à 24% mais les tissus mous devenaient plus épais. Ces résultats étaient en accord avec les effets positifs connus des oestrogènes sur la prolifération cellulaire. Ils ont donc proposé que les oestrogènes causaient une prolifération cellulaire au dépend de la croissance du squelette. Par contre, il serait possible que les oestrogènes soient un signal servant à ralentir la croissance du squelette durant la période de production des gamètes. Ceci dans le but de favoriser la prolifération cellulaire nécessaire pour la production de ces gamètes ainsi que de laisser plus de calcium libre disponible pour l'accumulation dans ces gamètes. Cependant, les oestrogènes sont aussi connus de manière générale pour favoriser la croissance du squelette. Le mécanisme de contrôle des os par les oestrogènes semble assez complexe et n'est pas encore totalement élucidé. La présence de divers types de récepteurs à

oestrogènes pouvant être nucléaires et membranaires ainsi que leurs isoformes exprimés de façon différentielle dans plusieurs cellules impliquées dans la croissance et la résorption des os suggère un système de contrôle très complexe et ayant de nombreuses possibilités de modulation. Il est aussi connu que les récepteurs à oestrogènes peuvent être activés d'une manière ligand-indépendante (ex : phosphorylation), que leur réponse peut varier selon la concentration du ligand et que les différents récepteurs à oestrogènes (α , β , γ) peuvent avoir des réponses opposées. Une faible concentration peut activer un récepteur alors qu'une forte n'aura pas d'effet. Nous pouvons supposer que selon la période de l'année, les oestrogènes aient des effets différents entre autres dans la minéralisation du squelette chez les coraux.

À la lumière de tous ces constats, il serait possible qu'un récepteur à oestrogènes soit effectivement présent et ait une raison d'être dans les scléroblastes de *Renilla koellikeri*.

4.4.5 Les cellules musculo-épithéliales

Un autre type cellulaire où nous avons observé du marquage est la portion musculaire des cellules musculo-épithéliales. L'agencement des cellules musculo-épithéliales constitue les couches musculaires chez *Renilla* et elles sont entre autres responsables de son péristaltisme constant (Beauvais et al., 1987; Lyke, 1965). Étant considérées comme étant lisses (Lyke, 1965), ces cellules sont donc mononuclées, non-striées et possèdent des jonctions ouvertes (Marieb, 1993).

La présence de récepteurs à oestrogènes dans des muscles lisses a été rapportée à maintes reprises en particulier pour les systèmes reproducteur et circulatoire (Karas et al., 1995; Wang et al., 2000). L'oestradiol-17 β induirait des effets vasodilatateurs rapides non-génomiques ainsi que des effets génomiques à plus long terme sur les vaisseaux sanguins en agissant entre autres sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires (Mendelsohn et al., 1999). À des concentrations physiologiques l'oestradiol-17 β stimule l'ouverture des canaux potassique calcium dépendant par l'intermédiaire d'une voie de signalisation dépendante de l'oxyde nitrique et d'une guanosine monophosphate cyclique (GMP cyclique) (Mendelsohn et al., 1999). L'effet obtenu est une hyperpolarisation des cellules et une relaxation de la musculature lisse (vasodilatation). Cependant, il a aussi été rapporté chez des cellules musculaires lisses de l'aorte du rat qu'une faible concentration d'oestradiol-17 β pouvait produire une contraction musculaire. Il activerait, de manière rapide et non-génomique et via les voies de signalisation PKC et MAPK, les échangeurs d'ions Na⁺/H⁺, ce qui causerait une élévation du pH intracellulaire et favoriserait la contraction musculaire (Incerpi et al., 2003). *Renilla koellikeri* pourrait facilement être comparée à un système vasculaire (en terme de canalisation) avec tous ses canaux et ses cavités gastrovasculaires servant à faire circuler l'eau, les nutriments et les gamètes et tapissé de musculatures lisses servant à leur contraction. L'effet de l'oxyde nitrique (NO) a été testé chez *Renilla koellikeri* (Anctil et al., 2003) et semblait induire une contraction chez un spécimen relâché et le relâchement chez un spécimen contracté. De plus ce NO agirait via une guanosine monophosphate cyclique (GMP cyclique) pour l'effet de relâchement. Un rôle dans le

contrôle de la contraction musculaire par l'intermédiaire des oestrogènes et de leurs récepteurs serait possible chez *Renilla koellikeri* tel que démontré par la présence de marquage au niveau des cellules musculo-épithéliales (Figures 3.6 et 3.7) constituant la musculature lisse.

Conclusion

Cette étude a porté sur la détection et la distribution tissulaire d'une protéine apparentée aux récepteurs à oestrogènes chez le cnidaire *Renilla koellikeri*. Elle faisait suite aux travaux de Pernet et Anctil (2002) où on a dosé l'oestradiol-17 β dans différents tissus de *Renilla koellikeri* sur une période de temps suffisamment longue pour pouvoir constater des variations saisonnières et inter-sexuelles de la concentration d'oestradiol-17 β . Afin d'évaluer si l'oestradiol-17 β est potentiellement actif dans les tissus de *Renilla koellikeri*, nous avons voulu savoir si il y avait des indices de la présence d'un récepteur à oestrogènes chez cet animal.

Les résultats des immunobuvardages de type Western ont montré qu'une bande marquée correspondant au poids moléculaire du récepteur à oestrogènes des vertébrés était présente dans l'extrait de *Renilla koellikeri*. En plus de cette bande d'environ 67 kDa, plusieurs autres bandes ont aussi été marquées tant au niveau de l'extrait de *Renilla koellikeri* qu'au niveau de celui fait d'ovaires et d'utérus de rat. Plusieurs de ces bandes chez *Renilla koellikeri* avaient leur équivalent chez le rat et nous avons montré que plusieurs d'entre elles pouvaient présument être associées à divers types d'isoformes connus pour le récepteur à oestrogènes alpha des vertébrés.

Avec deux techniques d'immunohistochimie différentes (immunoperoxydase et immunofluorescence) nous avons obtenu du marquage pour une protéine apparentée au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain au niveau de plusieurs types cellulaires différents chez *Renilla koellikeri*. Le marquage était principalement localisé au niveau des cellules interstitielles et engagées, des cellules mésenchymateuses, des cellules glandulaires, des cellules nerveuses, des scléroblastes et de cellules musculo-épithéliales. Fait à noter, toutes ces cellules marquées sont dites spécialisées (à l'exception peut-être des cellules musculo-épithéliales) et tirent leur origine des cellules interstitielles de l'ectoderme. Ce lien de parenté est particulièrement documenté dans le cas des scléroblastes. Dunkelberger, (1974) avait émis une hypothèse sur l'origine des scléroblastes. Selon lui, les cellules interstitielles baso-ectodermiques migraient dans la mésoglée et se différenciaient en cellules mésenchymateuses (amoebocytes) puis en scléroblastes. Nous avons effectivement obtenu du marquage pour ces trois types cellulaires, suggérant ainsi un lien de parenté.

D'après la distribution du marquage, nous pouvons proposer que cette protéine apparentée au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain chez *Renilla koellikeri* semble être davantage impliquée dans la différenciation, la croissance et la prolifération cellulaire. Cependant, des rôles plus précis au niveau de fonctions physiologiques ne sont pas écartés, en particulier pour les cellules musculo-épithéliales et les scléroblastes. En effet, il serait possible que cette protéine apparentée au récepteur à oestrogènes alpha de l'humain ait un rôle dans la contraction des cellules musculo-épithéliales et dans la calcification au niveau des scléroblastes.

Comme suite à donner à cette étude, il serait intéressant de refaire le même type d'étude mais sur du tissus composé en majorité de jeunes individus; ceux situés en périphérie de la colonie. Nous pourrions déterminer et voir si cette protéine est plus exprimée chez des individus en développement intense. Ils serait aussi bon de savoir si des domaines plus conservés (C et E) sont présents en utilisant des anticorps spécifiques à ces domaines. Évidemment, l'idéal serait de pouvoir isoler cette protéine, de la cloner ou encore de séquencer le génome complet de *Renilla koellikeri*. Si l'immunoréactivité est effectivement associée à un récepteur à oestrogènes, une alternative possible au séquençage du génome serait de recourir à la réactivité des anticorps utilisés pour isoler cette protéine.

Références

- AGARWAL, M. K. (1993). Receptors for mammalian steroid hormones in microbes and plants. *FEBS Letters* **322**, 207-210.
- ANCTIL, M. (2000). Evidence for Gonadotropin-Releasing Hormone-like Peptides in a Cnidarian Nervous System. *General and Comparative Endocrinology* **119**, 317-328.
- ANCTIL, M., HURTUBISE, P. & GILLIS, M.-A. (2002). Tyrosine hydroxylase and dopamine- β -hydroxylase immunoreactivities in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *Cell Tissue Research* **310**, 109-117.
- ANCTIL, M. & POULIN, I. (2003). Evidence of nitric oxide involvement in muscle systems of the octocorallian *Renilla koellikeri*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **134A**, S51.
- ANDERSON, P. A. V., MOOSLER, A. & GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. (1992). The presence and distribution of Antho-RFamide-like material in scyphomedusae. *Cell and Tissue Research* **267**, 67-74.
- ARAI, Y., SEKINE, Y. & MURAKAMI, S. (1996). Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neuroscience Research* **25**, 403-407.

- ARANDA, A. & PASCUAL, A. (2001). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* **81**, 1269-1304.
- ARMOUR, K. J., et al. (1997). Estrogen receptor mRNA in mineralized tissues of rainbow trout: calcium mobilization by estrogen. *FEBS Letters* **411**, 145-148.
- BAKER, M. E. (2002). Recent insights into the origins of adrenal and sex steroid receptors. *Journal of Molecular Endocrinology* **28**, 149-152.
- BARNES, R. D. (1987). *Invertebrate Zoology*, 5 edition. CBS College Publishing, New York.
- BARRINGTON, E. J. W. (1979). Hormones and evolution, vol. 1, pp. 491. Academic Press, New York.
- BEAUBAIS, L., et al. (1987). Cnidaires anthozoaires. In *Traité de zoologie*, vol. 3, pp. 859. Masson, Paris.
- BEYER, C. (1999). Estrogen and the developing mammalian brain. *Anatomy and Embryology* **199**, 379-390.
- BEYER, C. & KAROLCZAK, M. (2000). Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *Journal of Neuroscience Research* **59**, 107-116.
- BEYER, C., PAWLAK, J. & KAROLCZAK, M. (2003). Membrane receptors for oestrogen in the brain. *Journal of neurochemistry* **87**, 545-550.
- BLAUSTEIN, J. D. (1992). Cytoplasmic estrogen receptor in rat brain: immunocytochemical evidence using three antibodies with distinct epitopes. *Endocrinology* **131**, 1336-1342.

- BONNELYE, E., et al. (1997). The ERR-1 orphan receptor is a transcriptional activator expressed during bone development. *Molecular Endocrinology* **11**, 905-916.
- BOUMA, J. & NAGLER, J. J. (2001). Estrogen receptor- α protein localization in the testis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle. *Biology of Reproduction* **65**, 60-65.
- BRUBAKER, K. D. & GAY, C. V. (1994). Specific binding of estrogen to osteoclast surfaces. *Biochemical and Biophysical research communications* **200**, 899-907.
- BUCHANAN, D. L., et al. (1998). Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification. *Endocrinology* **139**, 4345-4352.
- BUISSON, B. (1970). Les supports morphologiques de l'intégration dans la colonie de *Veretillum cyanomorium* Pall. (Cnidaria, Penntularia). *Z. Morph. Tiere* **68**, 1-36.
- BUISSON, B. & FRANC, S. (1969). Structure et ultrastructure des cellules mésenchymateuses et nerveuses intramésogléennes de *Veretillum cynomorium* Pall (cnidaire, pennatulidae). *Vie et Milieu* **20**, 279-292.
- D'ANIELLO, A., et al. (1996). Occurrence of Sex Steroid Hormones and Their Binding Proteins in *Octopus vulgaris* Lam. *Biochemical and Biophysical research communications* **227**, 782-788.
- DAUVOIS, S., WHITE, R. & PARKER, M. G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *Journal of Cell Science* **106**, 1377-1388.

- DE WAAL, M., POORTMAN, J. & VOOGT, P. A. (1982). Steroid receptors in invertebrates. A specific 17 β -oestradiol binding protein in a seastar. *Marine Biology Letters* **3**, 317-323.
- DECHERING, K., BOERSMA, C. & MOSSELMAN, S. (2000). Estrogen receptor alpha and beta: Two receptors of a kind? *Current Medicinal Chemistry* **7**, 561-576.
- DEHAL, P., et al. (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: Insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-2167.
- DI COSMO, A., DI CRISTO, C. & PAOLUCCI, M. (2002). A Estradiol-17 β Receptor in the Reproduction System of the Female of *Octopus vulgaris*: Characterization and Immunolocalization. *Molecular Reproduction and Development* **61**, 367-375.
- DI COSMO, A., PAOLUCCI, M., DI CRISTO, C., BOTTE, V. & CIARCIA, G. (1998). Progesterone Receptor in the Reproductive System of the Female of *Octopus vulgaris*: Characterization and Immunolocalization. *Molecular Reproduction and Development* **50**, 451-460.
- DODSON, R. E., SHRYNE, J. E. & GORSKI, R. A. (1988). Hormonal modification of the number of total and late-arising neurons in culture: Sex differences and estrogen effects. *Journal of Neuroscience Research* **33**, 266-281.
- DUNKELBERGER, D. G. & WATABE, N. (1974). An ultrastructural study on spicule formation in the pennatulid colony *Renilla reniformis*. *Tissus & Cell* **6**, 573-586.
- EDDY, E. M., et al. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* **137**, 4796-4805.

- ENMARK, E. & GUSTAFSSON, J.-A. (1999). Oestrogen receptors- an overview. *Journal of Internal Medicine* **246**, 133-138.
- ERIKSEN, E. F., et al. (1988). Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* **241**, 84-86.
- ERNST, M., SCHMID, C. & FROESCH, E. R. (1988). Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **85**, 2307-2310.
- ESCRIVA, H., DELAUNAY, F. & LAUDET, V. (2000). Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays* **22**, 717-727.
- ESCRIVA, H., et al. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proceedings of the National Academy of sciences* **94**, 6803-6808.
- FANNON, S. A., VIDAVER, R. M. & MARTS, S. A. (2001). *Genome and Hormones: gender differences in physiology* historical perspectives: An abridged history of sex steroid hormone receptor action. *Journal of Applied Physiology* **91**, 1854-1859.
- FAUTIN, D. G. & MARISCAL, R. N. (1991). Cnidaria: Anthozoa. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, vol. 2 (ed. F. W. Harrison and J. A. Westfall), pp. 436. Wiley-Liss, New York.
- FERRO, P., FORLANI, A., MUSELLI, M. & PFEFFER, U. (2003). Alternative splicing of the human estrogen receptor a primary transcript: mechanisms of exon skipping. *International Journal of Molecular Medicine* **12**, 355-363.
- FIGIELLI, G., et al. (1995). Functional estrogen receptors in a human preosteoclastic cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 2672-2676.

- FISHER, J. S., et al. (1997). Immunolocalisation of oestrogen receptor- α within the testis and excurrent duct of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *Journal of Endocrinology* **153**, 485-495.
- FRITSCH, M., ANDERSON, I. & GORSKI, J. (1993). Structural characterization of the trypsinized estrogen receptor. *Biochemistry* **32**, 14000-14008.
- FUQUA, S. A. W., ALLRED, D. C. & AUCHUS, R. J. (1993). Expression of estrogen receptor variants. *Journal of Cellular Biochemistry* **17G**, 194-197.
- GARCIA-SEGURA, L. M., AZCOITIA, I. & DONCARLOS, L. L. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology* **63**, 29-60.
- GARCIA-SEGURA, L. M., et al. (1989). Estradiol induces rapid remodelling of plasma membranes in developing rat cerebrocortical neurons in culture. *Brain Research* **498**, 339-343.
- GAY, C. V., KIEF, N. L. & BEKKER, P. J. (1993). Effect of estrogen on acidification in osteoclasts. *Biochemical and Biophysical research communications* **192**, 1251-1259.
- GERMAIN, G. & ANCTIL, M. (1988). Luminescent activity and ultrastructural characterization of photocytes dissociated from the coelenterate *Renilla köllikeri*. *Tissus & Cell* **20**, 710-720.
- GOULD, E., WOOLLEY, C. S., FRANKFURT, M. & MCEWEN, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells. *Journal of Neuroscience* **10**, 1286-1291.
- GRASSO, L. C., et al. (2001). The evolution of the nuclear receptors: evidence from the coral *Acropora*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**, 93-102.

- GUIOCHON-MANTEL, A., et al. (1991). Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *The EMBO Journal* **10**, 3851-3859.
- HAWKINS, M. B., et al. (2000). Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 10751-10756.
- HESS, R. A., et al. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* **390**, 509-512.
- HO, K. J., LIAO, J. K. (2002). Nonnuclear actions of estrogens. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **22**, 1952-1961.
- HORTON, H. R., MORAN, L. A., OCHS, R. S., RAWN, J. D. & SCRIMGEOUR, K. G. (1994). *Principes de biochimie*, 1^{ère} edition. DeBoeck Université, Bruxelles.
- IMSIECKE, G., STEFFEN, R., CUSTODIO, M., BOROJEVIC, R. & MULLER, W., E.G. (1995). Formation of spicules by sclerocytes from the freshwater sponge *Ephydata muelleri* in short-term cultures in vitro. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Animal* **31**, 528-535.
- INCERPI, S., et al. (2003). Short-term activation by low 17 β -estradiol concentrations of the Na⁺/H⁺ exchanger in rat aortic smooth muscle cells: physiological implications. *Endocrinology* **144**, 4315-4324.
- KARAS, R. H., BAUR, W. E., EICKLES, M. V. & MENDELSON, M. E. (1995). Human vascular smooth muscle cells express an estrogen receptor isoform. *FEBS Letters* **377**, 103-108.

- KESHAN, B. & RAY, A. K. (2001). The presence of Estradiol-17 β and Its Specific Binding Sites in Posterior Silk Gland of *Bombix mori*. *General and Comparative Endocrinology* **123**, 23-30.
- KIRSCHNER, M. (1999). Intracellular proteolysis. *Trends in Cell Biology* **9**, M42-M45.
- KOMM, B. S., et al. (1988). Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* **241**, 81-84.
- KOSTROUCH, Z., et al. (1998). Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 13442-13447.
- KUIPER, G. G. J. M., et al. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of the estrogen receptors α and β . *Endocrinology* **138**, 863-870.
- LAUDET, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* **19**, 207-226.
- LEVIN, E. R. (1999). Cellular functions of the plasma membrane estrogen receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **10**, 374-377.
- LEYGUE, E. R., WATSON, P. H. & MURPHY, L. C. (1996). Estrogen receptor variants in normal human mammary tissue. *Journal of the National Cancer Institute* **88**, 284-290.
- LIEBERHERR, M., GROSSE, B., KACHKACHE, M. & BALSAN, S. (1993). Cell signaling and estrogens in female rat osteoblast. A possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. *Journal of Bone and Mineral Research* **8**, 1365-1376.

- LYKE, E. B. (1965). The histology of the sea pansies Renilla reniformis (Pallas) and Renilla köllikeri Pfeffer with a note on the fine structure of the latter species. Ph.D. thesis, University of Wisconsin.
- MAAROUFI, Y., et al. (2000). Estrogen receptor of primary breast cancers: evidence for intracellular proteolysis. *Breast cancer Research* **2**, 444-454.
- MAGLICH, J. M., et al. (2001). Comparison of complete nuclear receptor sets from the human *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biology* **2**, 29.1-29.7.
- MARIEB, E. N. (1993). *Anatomie et physiologie humaine*, 2 edition. Erpi.
- MARUVADA, P., BAUMANN, C. T., HAGERS, G. L. & YEN, P. M. (2003). Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 12425-12432.
- MATSUMOTO, A. & ARAI, Y. (1976). Effect of estrogen on early postnatal development of synaptic formation in the hypothalamic arcuate nucleus of female rats. *Neuroscience Letters* **2**, 79-82.
- MCDOWALL, J. (2003). Oestrogen receptors, vol. 2003. European Bioinformatics Institute.
- MCEWEN, B., et al. (2001). Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 7093-7100.
- MENDELSON, M. E. & KARAS, R. H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Mechanisms of disease* **340**, 1801-1811.

- MOSS, R. L. & GU, Q. (1999). Estrogen: mechanisms for rapid action in CA1 hippocampal neurons. *Steroids* **64**, 1-2.
- NADAL, A., et al. (2001). The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News in Physiological Sciences* **16**, 251-255.
- NAFTOLIN, F., LERANTH, C., HORVATH, T. L. & GARCIA-SEGURA, L. M. (1996). Potential neuronal mechanisms of estrogen actions in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology* **16**, 231-233.
- NAVARRO, D., et al. (1998). The two native estrogen receptor forms of 8S and 4S present in cytosol from human uterine tissues display opposite reactivities with the antiestrogen tamoxifen aziridine and the estrogen responsive element. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **64**, 49-58.
- NEWMAYER, D. D. & FORBES, D. J. (1988). Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell* **52**, 641-653.
- NUCLEAR RECEPTORS NOMENCLATURE COMMITTEE, N. R. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161-163.
- ODEBLAD, E. (2002). Investigations on the physiological basis for fertility awareness. *Bulletin of the Ovulation Method Research and Reference* **29**, 2-11.
- OURSLEER, M. J., OSDOBY, P., PYFFEROEN, J., RIGGS, B. L. & SPELSBERG, T. C. (1991). Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 6613-6617.
- OWEN, G. I. & ZELENT, A. (2000). Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 809-827.

- PANI, A. K., ANCTIL, M. & UMBRIACO, D. (1995). Neuronal localization and evoked released of norepinephrine in the cnidarian *Renilla köllikeri*. *J. Exp. Zool.* **272**, 1-12.
- PAOLUCCI, M., DI CRISTO, C. & DI COSMO, A. (2002). Immunological Evidence for Progesterone and Estradiol Receptors in the Freshwater Crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Molecular Reproduction and Development* **63**, 55-62.
- PASQUALINI, C., et al. (2001). Differential subcellular distribution and transcriptional activity of SE3, SE4, and SE3-4 isoforms of the rat estrogen receptor- α . *Molecular Endocrinology* **15**, 894-908.
- PASQUALINI, C., et al. (1999). Stage- and region-specific expression of estrogen receptor α isoforms during ontogeny of the pituitary gland. *Endocrinology* **140**, 2781-2789.
- PERNET, V. & ANCTIL, M. (2002). Annual variations and sex-related differences of estradiol-17 β levels in the anthozoan *Renilla köllikeri*. *General and Comparative Endocrinology* **129**, 63-68.
- PERSSON, P., SHRIMPTON, J. M., MCCORMICK, S. D. & BJÖRNSSON, B. T. (2000). The presence of high-affinity, low capacity estradiol-17 β binding in rainbow trout scale indicates a possible endocrine route for the regulation of scale resorption. *General and Comparative Endocrinology* **120**, 35-43.
- PFEFFER, U., FECAROTTA, E., ARENA, G., FORLANI, A. & VIDALI, G. (1996). Alternative splicing of the estrogen receptor primary transcript normally occurs in estrogen

- receptor positive tissues and cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **56**, 99-105.
- RAO, B. R. (1998). Isolation and characterization of an estrogen binding protein which may integrate the plethora of estrogenic actions in non-reproductive organs. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **65**, 3-41.
- RAZANDI, M., PEDRAM, A., GREENE, G. L., LEVIN, E. R. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. *Molecular endocrinology*, **13**, 307-319.
- REISERT, I., et al. (1987). Sex steroids promote neurite growth in mesencephalic tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons *in vitro*. *International Journal of Developmental Neuroscience* **5**, 91-98.
- REIS-HENRIQUES, M. A., LE GUELLEC, D., REMY-MARTIN, J. P. & ADESSI, G. L. (1990). Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. by gas chromatography and mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology* **95B**, 303-309.
- RICHARDSON, W. D., MILLS, A. D., DILWORTH, S. M., LASKEY, R. A. & DINGWALL, C. (1988). Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores. *Cell* **52**, 655-664.
- ROLLEROVA, E. & URBANCIKOVA, M. (2000). Intracellular estrogen receptors, their characterization and function(review). *Endocrine Regulations* **34**, 203-218.

- SAWADA, H., et al. (2000). Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB Journal* **14**, 1202-1202.
- SHIH, J. T. (1992). Annual pattern of sex steroid-like substance levels in the hemolymph of female *Uca arcuata*. *Bulletin of the institute of zoology, Academia Sinica*, **31**, 47-56.
- SLATTERY, M., HINES G. A., STARMER, J. & PAUL, V. J. (1999). Chemical signals in gametogenesis, spawning, and larval settlement and defense of the soft coral *Simularia polydactyla*. *Corals Reefs* **18**, 75-84.
- SLATTERY, M., HINES, G. A. & WATTS, S. A. (1997). Steroid metabolism in Antarctic soft corals. *Polar Biology* **18**.
- TARRANT, A. M. (2002). Estrogen action in scleractinian corals: sources, metabolism and physiological effects. Ph. D. thesis, University of Hawaii.
- TARRANT, A. M., ATKINSON, M. J. & ATKINSON, S. (2004). Effects of steroidal estrogens on coral growth and reproduction. *Marine ecology progress series* **269**, 121-129.
- TARRANT, A. M., ATKINSON, S. & ATKINSON, M. J. (1999). Estrone and estradiol-17b concentration in tissue of the scleractinian coral, *Montipora verrucosa*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **122**, 85-92.
- THORNTON, J. W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 5671-5676.
- THORNTON, J. W., NEED, E. & CREWS, D. (2003). Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* **301**, 1714-1717.

- TORAN-ALLERAND, C. D. (1976). Sex steroids and the development of the newborn hypothalamus and preoptic area *in vitro*: Implications for sexual differentiation. *Brain Research* **106**, 407-412.
- UMBRIACO, D., ANCTIL, M. & DESCARRIES, L. (1990). Serotonin-Immunoreactive Neurons in the Cnidarian *Renilla koellikeri*. *The journal of Comparative Neurology* **291**, 167-178.
- VALIMAA, H., et al. (2004). Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. *Journal of Endocrinology* **180**, 55-62.
- VAN DIJK, M. A. J., HART, A., A.M. & VAN'T VEER, L. J. (2000). Differences in estrogen receptor a variant messenger RNAs between normal human breast tissue and primary breast carcinomas. *Cancer Research* **60**, 530-533.
- VANACKER, J.-M., et al. (1999a). Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERRa (estrogen receptor-related receptor-a). *Molecular Endocrinology* **13**, 764-773.
- VANACKER, J.-M., BONNELYE, E., FOURNIER, B. & LAUDET, V. (1999b). L'effet des oestrogènes sur l'os: une histoire de famille. *médecine/sciences* **15**, 538-544.
- VANACKER, J.-M., PETTERSSON, K., GUSTAFSSON, J.-A. & LAUDET, V. (1999c). Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) a, but not by ERb. *The EMBO Journal* **18**, 4270-4279.
- VOOGT, P. A. & DIELEMAN, S. J. (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. *Comparative Biochemistry and Physiology* **79A**, 635-639.
- WANG, C. (2000). Roles of sex steroids in reproduction of the sea scallop. Ph.D. thesis, Dalhousie University.
- WANG, H., ERIKSSON, H. & SAHLIN, L. (2000). Estrogen receptor a and b in the female reproductive tract of the rat during the oestrus cycle. *Biology of Reproduction* **63**, 1331-1340.
- WASSON, K. M., GOWER, B. A., A., H. G. & WATTS, S. A. (2000). Levels of progesterone, testosterone, and estradiol, and androstenedione metabolism in the gonads of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comparative Biochemistry and Physiology C* **126**, 153-165.
- WATABE, N. & KINGSLEY, R. J. (1992). Calcification in octocorals. In *Hard tissue mineralization and demineralization* (ed. S. Suga and N. Watabe), pp. 127-147. Springer-Verlag, Tokyo.
- WATSON, C. S., CAMPBELL, C. H. & GAMETCHU, B. (2002). The dynamic and elusive membrane estrogen receptor-a. *Steroids* **67**, 429-437.
- WATSON, C. S. & GAMETCHU, B. (1999a). Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **220**, 9-19.
- WATSON, C. S., NORFLEET, A. M. & PAPPAS, T. C. (1999b). Rapid actions of estrogens in GH(3)/6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha. *Steroids* **64**, 1-2.

- WEIGEL, N. L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Journal of Biochemistry* **319**, 657-667.
- WILSON, J. D., FOSTER, D. W., KRONENBERG, H. M. & LARSEN, R. P. (1998). *Williams Textbook of Endocrinology*, 9 edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- WOLLEY, C., GOULD, E., FRANKFURT, M. & MCEWEN, B. (1990). Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience* **10**, 4035-4039.
- XU, R. A. & BARKER, M. F. (1990). Annual changes in the steroid levels in the ovaries and the pyloric caeca of *Sclerasterias mollis* (Echinodermata: Asteroidea) during the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* **95A**, 127-133.

