

Université de Montréal

Étude autoradiographique de la distribution des sites de captage et des sites de liaison de la sérotonine chez le cnidaire: *Renilla koellikeri*

par

Pauline Boutros Dergham

Département des sciences biologiques  
Faculté des arts et des sciences

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

(Juillet 1997)

Pauline Dergham, 1997



2011 02 28

PH  
302  
U54  
1998  
v.002

Université de Montréal

Étude autecologique de la distribution des sites de capture et des sites de liaison de la scutenaire chez le caddis: *Trichoptera: Trichoptera*

par

Pauline Bontoux Desjardins

Département des sciences biologiques  
Faculté des arts et des sciences

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

(juillet 1997)



l'impression: Desjardins, 1997

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire de maîtrise intitulé:

« Étude autoradiographique de la distribution des sites de captage et des sites  
de liaison de la sérotonine chez le cnidaire: *Renilla koellikeri* »

Présenté par

Pauline Boutros Dergham

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Stéphane Molotchnikoff

---

(Président-rapporteur)

Dr. Michel Anctil

---

(Directeur de recherche)

Dr. Benoit Lussier

---

(membre de jury)

Mémoire accepté le: ~~20 février 1998~~

À la mémoire de ma soeur Najat,  
à mes parents Boutros et Georgette,  
à mes soeurs et mes frères,  
à tous mes amis au Liban et au Canada,  
à Allomapaulelsarofranfou

## SOMMAIRE

La présence des neurones sérotoninergiques et l'effet modulateur de la sérotonine sur les contractions péristaltiques ont été démontrés chez la pensée de mer, *Renilla koellikeri*, par des études antérieures. Ces contributions suggéraient la présence de récepteurs sérotoninergiques, et ceux-ci ont été révélés pharmacologiquement et par des expériences de radiolisation.

Le présent travail avait pour but de visualiser la distribution histologique des sites destinataires de la sérotonine libérée par les neurones sérotoninergiques, soit les sites de liaison aux récepteurs spécifiques et les sites de captage où la sérotonine est inactivée.

Pour ce faire on a poursuivi les objectifs suivants:

I. Etudier expérimentalement le captage de la sérotonine en utilisant la sonde radioactive [<sup>3</sup>H]5-HT. L'analyse cinétique du captage a montré la présence de deux composantes: la première représente le captage spécifique à haute affinité et manifestant une saturabilité, tandis que la deuxième correspond à la diffusion ou captage non spécifique de faible affinité et où la saturation est absente.

Le captage spécifique a été réduit en présence des bloqueurs spécifiques de captage des monoamines, et leur ordre décroissant d'efficacité était: clomipramine >> imipramine >désipramine. En l'absence de Na<sup>+</sup> le taux de captage est réduit de plus de 50%, ce qui implique un captage sodium-dépendant.

II. Localiser les sites de rétention de la sérotonine dus au captage par autoradiographie en utilisant la [ $^3\text{H}$ ]5-HT comme sonde. L'application de la clomipramine comme bloqueur des transporteurs membranaires sérotoninergiques a réduit le marquage au niveau de toutes les couches, mais surtout les couches ectodermique et endodermique. Le marquage était distribué d'une manière diffuse, étant plus prononcé au niveau ectodermique et endodermique. Dans l'endoderme le marquage était plus dense au niveau de la musculature circulaire et ne semble pas être associé à des types cellulaires particuliers. Ceci suggère que la sérotonine libérée peut circuler à travers le tissu selon un mode de transmission volumique plutôt que synaptique .

III. La distribution histologique des récepteurs sérotoninergiques a été examinée par autoradiographie en utilisant le [ $^3\text{H}$ ]5-HT comme radioligand. L'application de la sérotonine non marquée ainsi que l'agoniste 2-méthyl-5-HT a réduit considérablement la liaison de [ $^3\text{H}$ ]5-HT causant un déplacement presque total des sites de liaison.

La distribution du radioligand entre les trois couches diffère profondément de celle du captage. Le marquage est plus localisé et associé à des cellules spécifiques dont la morphologie et l'emplacement correspondent à des neurones connus de cet animal, soit les neurones des plexus nerveux sous-ectodermique, mésogléen et possiblement endodermique. Le marquage suggère donc que la sérotonine peut agir comme un neuromodulateur général chez la pensée de mer. En ce qui concerne l'endoderme, site de la musculature générant le péristaltisme modulé par la sérotonine, l'absence de neurones à sérotonine et de marquage des cellules musculaires suggère que

la sérotonine affecte le péristaltisme par l'intermédiaire des neurones non-sérotoninergiques contrôlant le péristaltisme plutôt que par une action directe sur les muscles.

La principale conclusion à tirer de ces résultats est l'absence de coïncidence entre la distribution des neurones à sérotonine et celle des sites de captage ou des sites de liaison, ce qui appuie l'hypothèse de la transmission volumique de la sérotonine. Il reste à vérifier cette hypothèse dans le futur par immunocytochimie en microscopie électronique des terminaisons sérotoninergiques et par l'analyse physiologique de la sécrétion neurale de sérotonine.

## TABLE DES MATIERES

|   |          |
|---|----------|
| -Sommaire.....  | iv       |
| -Table des matières.....  | vii      |
| -Liste des tableaux.....  | ix       |
| -Liste des figures.....   | x        |
| <b>1.0 Introduction générale.....</b>                                   | <b>1</b> |
| 1.1 Historique de la sérotonine .....                                   | 1        |
| 1.2 Synthèse et métabolisme de la sérotonine .....                      | 2        |
| 1.3 Présence de la sérotonine chez les animaux .....                    | 3        |
| 1.3.1 Vertébrés .....   | 3        |
| 1.3.2 Invertébrés.....  | 4        |
| 1.4 Rôles et effets de la sérotonine .....                              | 5        |
| 1.5 Les récepteurs sérotoninergiques .....                              | 7        |
| 1.6 Neurotransmission chez les Cnidaires.....                           | 9        |
| 1.6.1 Présence de cellules nerveuses chez les cnidaires.....            | 10       |
| 1.6.2 Présence de la sérotonine chez les cnidaires.....                 | 11       |
| 1.7 Description du modèle expérimental: <i>Renilla koellikeri</i> ..... | 12       |
| 1.7.1 Description morphologique .....                                   | 12       |
| 1.7.2 Organisation histologique.....                                    | 14       |
| 1.7.3 Système nerveux et neurotransmission dans la pensée de mer ...    | 14       |
| 1.7.4 La sérotonine chez la pensée de mer .....                         | 16       |
| 1.7.5 Localisation neurale .....  | 17       |
| 1.7.6 Effet de la sérotonine et son implication fonctionnelle .....     | 17       |



|  |           |
|--|-----------|
| 1.8 Problématique et objectifs du travail .....  | 19        |
| <b>2.0 Article:</b> « Etude autoradiographique de la distribution des sites de captage et des sites de liaison de la sérotonine chez le cnidaire: <i>Renilla koellikeri</i> »..... | 23        |
| « Distribution of serotonin uptake and binding sites in the cnidarian <i>Renilla koellikeri</i> : an autoradiographic study.....   | 24        |
| -Abstract.....   | 25        |
| -Introduction.....   | 26        |
| -Material and methods.....   | 28        |
| -Results.....  | 34        |
| -Discussion.....   | 39        |
| -References.....   | 46        |
| <b>3.0 Discussion générale et conclusions.....</b>   | <b>67</b> |
| -Bibliographie (Introduction et Discussion).....   | 79        |
| -Remerciements.....  | xiii      |

**LISTES DES TABLEAUX****Tableau 1**

Rapports tissu/milieu et taux d'accumulation  
de [<sup>3</sup>H]5-HT dans les tissus des polypes de  
*Renilla* à des concentrations variables de 5HT.....65

**Tableau 2**

Densités des graines d'argent dans les tissus  
de *Renilla koellikeri* après incubation dans [<sup>3</sup>H]-5HT  
avec ou sans clomipramine.....66

## LISTE DES FIGURES

|        |  |    |
|--------|--|----|
| Fig. A | Voies de biosynthèse et du métabolisme de la<br>sérotonine.....  | 22 |
| Fig. 1 | Points d'accumulation de [ <sup>3</sup> H]-5HT d'après Lineweaver-Burk<br>montrant la présence de deux composantes de captage 1 et 2<br>dans les polypes de la pensée de mer.....  | 52 |
| Fig. 2 | Rapports d'accumulation de [ <sup>3</sup> H]-5HT dans les polypes<br>de la pensée de mer par captage1 et captage2<br>pour des concentrations variables.....  | 54 |
| Fig. 3 | Histogramme représentant l'effet des bloqueurs<br>de captage des monoamines et des cations sur le taux<br>d'accumulation total de [ <sup>3</sup> H]-5HT dans les polypes<br>de la pensée de mer.....   | 56 |
| Fig. 4 | Organisation histologique du polype d'un octocorallien.<br>A. Représentation schématique d'une coupe transversale de la<br>colonne d'un polype; B et C. Photomicrographies d'une<br>section longitudinale et d'une coupe transversale<br>respectivement à travers la colonne d'un polype autozoïde de<br>la pensée de mer.....                   | 58 |
| Fig. 5 | Autoradiogrammes en microscope optique d'une tentacule (A<br>sur fond clair; B sur fond noir, coupe oblique) et de la colonne<br>(C coupe transversale; D coupe longitudinale) des polypes<br>de la pensée de mer après incubation dans [ <sup>3</sup> H]5-HT (5µM)<br>montrant le taux de captage dans les différentes<br>couches du tissu..... | 60 |
| Fig. 6 | Autoradiogrammes en microscope optique des polypes<br>de la pensée de mer après incubation dans [ <sup>3</sup> H]5-HT (5µM)<br>montrant le taux de captage dans les différentes couches du<br>tissu. A,B sans ou avec clomipramine, respectivement; C,D<br>coupes longitudinales à un grossissement plus<br>grand.....                           | 62 |

- Fig. 7      Autoradiogrammes des sites de liaison en microscope optique dans les sections des polypes de la pensée de mer après incubation dans [<sup>3</sup>H]5-HT (60nM) avec ou sans 5-HT froid montrant le taux de liaison dans les différentes couches du tissu et au niveau de nombreux neurones.....64
- Fig. B      Illustration schématique des mécanismes de synthèse, d'activation et d'inactivation impliqués dans la neurotransmission sérotoninergique.....78

## LISTES DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

|              |  |
|--------------|--|
| AMPc         | Adénosine monophosphate cyclique   |
| ASW          | Eau de mer artificielle (« Artificial Sea Water »)                         |
| 5-HT         | Sérotonine (5-hydroxytryptamine)   |
| 5-HTP        | 5-hydroxytryptophane   |
| 5-HIAA       | Acide 5-hydroxy-indoleacétique   |
| GMPc         | Guanosine monophosphate cyclique   |
| HPLC-ED      | Chromatographie liquide à haute performance avec détection électrochimique |
| LSD          | Acide lysergique diethylamide  |
| MAO          | Monoamine oxidase  |
| SNC          | Système nerveux central  |
| $^3\text{H}$ | Tritium  |
| TRP          | Tryptophane  |

## **1.0 INTRODUCTION GENERALE**

### **1.1 Historique de la sérotonine**

La sérotonine est l'une des monoamines les plus importantes étant donné sa présence chez tous les animaux possédant un système nerveux et son effet sur d'importants comportements. Elle est classifiée parmi les indoleamines qui sont dérivées du noyau indole (Csaba 1981).

Elle est probablement impliquée dans presque tous les phénomènes physiologiques et comportementaux à titre de neurotransmetteur ou neuromodulateur. Avant de l'identifier, on avait découvert un facteur endogène qui causait la constriction des vaisseaux sanguins et qui augmentait le débit vasculaire (Stevens et Lee 1884; Brodie 1900). Elle a été identifiée et nommée par Rapport (1948) qui avait isolé une substance vasoconstrictrice sous sa forme cristalline (Rapport 1949). Plus tard on l'a considérée comme un neurotransmetteur grâce à des enregistrements extracellulaires et des injections microiontophorétiques de drogues (Bloom et al. 1972). On a ensuite confirmé son rôle de neurotransmetteur (inhibiteur) dans le système nerveux central (SNC) des Vertébrés (voir Vandermaelen 1985, pp.203-207; Falk et al. 1962).

La première démonstration de la présence de la sérotonine (5-HT) dans le SNC a été obtenue par des méthodes biochimiques (Amin et al. 1954; Twarog et Page 1953). Subséquemment plusieurs types d'études

(histofluorescentes, autoradiographiques, immunocytochimiques) qui visaient la localisation cellulaire de la 5-HT ont permis la détection de 5-HT (Beaudet et Descarries 1976; Steinbusch 1984) ainsi que l'isolation et la visualisation des corps cellulaires des neurones à 5-HT, leurs axones et leurs terminaisons dans le SNC (Müller et al. 1977). Ces études ont montré la présence de neurones à 5-HT dans le cerveau du rat (Dahlström et Fuxe 1964); ainsi que chez le lapin (Cummings et Felten 1979), le chat (Poitras et Parent 1975, Léger et al. 1979), chez le fœtus humain (Olson et al. 1973) et d'autres mammifères.

## **1.2 Synthèse et métabolisme de la sérotonine**

La synthèse de la sérotonine implique plusieurs étapes : captage de l'acide aminé précurseur (tryptophane) dans les terminaisons, conversion du précurseur disponible en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par hydroxylation en présence de tryptophane hydroxylase, et de la 5-HTP en 5-HT par décarboxylation sous l'effet catalytique de l'acide aromatique L-amino décarboxylase (voir références dans Müller et al. 1977) (Fig A).

La sérotonine est métabolisée et inactivée par la monoamine oxydase (MAO) qui est une enzyme fortement liée à la membrane externe des mitochondries et qui est présente dans les cellules présynaptiques (Fillenz 1990; Müller et Nisticò 1989) et l'aldéhyde déshydrogénase pour former le métabolite majeur, l'acide 5-hydroxy-indoleacétique (5-HIAA) (Fillion 1985). En outre, la 5-HT est le précurseur de la mélatonine (Grahame-Smith 1988) (Fig A).

L'accumulation de la sérotonine se fait au niveau de petites vésicules granulaires et la sécrétion est bien contrôlée comme pour l'adrénaline et d'autres neurotransmetteurs dont elle se fait par exocytose et non pas d'une façon continue comme pour la mélatonine (Müller et al. 1977; Müller et Nisticò 1989).

La biosynthèse des indoleamines chez les invertébrés suit la même voie métabolique que celle des vertébrés (Evans et Fox 1975, Livingstone et Tempel 1983; Pani et Anctil, 1994b). Les indoleamines et leurs enzymes sont donc des composés conservés au cours de l'évolution.

### **1.3 Présence de la sérotonine chez les animaux**

#### **1.3.1 Vertébrés**

Chez les vertébrés les neurones sérotoninergiques se trouvent dans le système nerveux central ainsi que dans le système nerveux périphérique. Des neurones à 5-HT ont été détectés chez les oiseaux (Parent 1981), les reptiles (Braak et al. 1968; Parent 1979), les amphibiens (Braak 1970; Parent 1973), les poissons (Johnston et al. 1990; Stuess et al. 1990; Bolliet et Ali 1992; Bolliet et al. 1994). L'influence de ces neurones est vaste et elle n'est pas limitée à des contacts synaptiques spécialisés (Beaudet et Descarries 1978).

Chez les mammifères la sérotonine est présente dans le système nerveux central, la glande pinéale, les cellules entérochromafines du tractus intestinal, les mastocytes et les plaquettes (Müller et Nisticò 1989); on la



trouve également chez les poissons dans les cellules glandulaires sacciformes (Zaccone et al. 1986, Fasulo et al. 1993), dans les cellules épithéliales pulmonaires (Zaccone et al. 1989).

### **1.3.2 Invertébrés**

Comme chez les vertébrés, la sérotonine joue le rôle de neurotransmetteur chez les invertébrés. Elle exerce ses effets en agissant selon trois modes de base : en neurotransmetteur classique (un régulateur chimique sécrété par des neurones dans la fente synaptique à travers laquelle il diffuse et va agir sur les cellules postsynaptiques où il se lie à des récepteurs spécifiques), en neuromodulateur (un régulateur sécrété par les neurones dans les synapses et qui n'a aucun effet par lui même mais change la réponse d'une cellule postsynaptique à un neurotransmetteur typique), ou comme une neurohormone (un régulateur neuronal sécrété comme une hormone dans le sang) (Norris 1997). Elle est localisée dans des neurones chez les insectes (Nassel 1988), chez les mollusques (McCaman 1984; Cottrell et Osborne 1970; Walker 1984; Kadan et Hartig 1988), chez l'Ascaris (Johnson et al. 1996) et d'autres vers nématodes (Croll 1975; Horvitz et al. 1982; Mansour 1984), chez les vers annélides (Spörhase-Eichmann et al. 1987; Miron et Anctil 1988) et chez plusieurs vers planaires (Welsh et Williams 1970).

Des observations de plusieurs chercheurs ont suggéré la présence de la 5-HT dans des neurones moteurs en plus des neurones sensoriels, contrairement aux catécholamines qui se trouvent dans des cellules sensorielles (Parent 1981; Miron 1987; Miron et Anctil 1988).

## 1.4 Rôles et effets de la sérotonine

L'activité neurale, sensorielle, motrice ou autonome ainsi que l'influence de la 5-HT sur des réponses musculaires ne se limitent pas au SNC des vertébrés. Elle est présente et peut agir aussi au niveau des plaquettes sanguines, des cellules entérochromaffines de l'intestin et d'autres cibles périphériques (Erspamer 1954; Pletcher 1968; Stolz 1985).

La sérotonine peut jouer plusieurs rôles au niveau physiologique ainsi qu'au niveau comportemental, tels que la modulation de la douleur et les régulations de la température corporelle, de la motricité intestinale, de la pression sanguine, de la locomotion, de l'agressivité, du comportement sexuel, du sommeil, de l'apprentissage, de l'anxiété, de la dépression (Hoyer et al. 1994; Zifa et al. 1992).

L'action de la 5-HT peut être inhibitrice ainsi qu'excitatrice, l'effet inhibiteur étant exercé par des neurones du SNC impliqués dans la transmission des informations sensorielles tandis que l'effet excitateur est produit par les neurones moteurs (Vandermaelen 1985). Chez l'humain la 5-HT est impliquée dans la pathogénèse et le traitement de la dépression ainsi qu'au niveau de l'humeur, l'émotion, la conscience, les fonctions motrices, le rythme circadien, l'activité reproductrice, le cycle du sommeil et l'anxiété (Meltzer et Lowy 1987; Coppen et Doogan 1988; Delgado et al. 1990; Blier et de Montigny 1994; Heils et al. 1996; Graeff et al. 1996).

De même, la 5-HT chez les invertébrés peut être associée à plusieurs activités telles que l'activité natatoire et l'alimentation chez la

sangsue (Lent 1985; Leake 1986). C'est un modulateur de tension dans les muscles de la sangsue. La 5-HT agit aussi sur plusieurs fonctions du nématode *Caenorhabditis elegans* telles que la locomotion, la ponte, l'activité de la pompe pharyngienne, et le comportement sexuel (Avery et Horvitz 1990; Horvitz et al. 1982; Loer et Kenyon 1993). La sérotonine peut aussi participer aux activités physiologiques chez les plathelminthes où se manifeste une vaste distribution des neurones sérotoninergiques dans le SNC (Mansour 1979; Hillman 1983; Webb et Mizukawa 1985; Ribeiro et Webb 1986). La 5-HT est impliquée aussi dans la régulation de la locomotion chez un autre nématode, *Ascaris sum* (Buchaman et Stretton 1991; Reinitz et Stretton 1996). Parmi les mollusques, la 5-HT a un effet accélérateur sur le rythme cardiaque (Welsh 1957; Chase et al. 1968) et un effet relaxateur sur les muscles (Twarog 1967) de quelques bivalves, en plus d'un rôle modulateur sur le système alimentaire du gastéropode *Lymnaea* (Yeoman et al. 1996) et sur le pacemaker circadien dans l'œil de l'aplysie (Colwell 1990; Jacklet 1991). La sérotonine agit aussi sur le comportement agressif et sur la musculature posturale des crustacés (Scrivener 1971; Huber et Kravitz 1995; pour revue voir Kravitz 1988); elle agit aussi sur le système circulatoire et digestif ainsi que sur le rythme endogène du ganglion cardiaque par sécrétion synaptique (Battelle et Kravitz 1978; Hartline 1979).

## 1.5 Les récepteurs sérotoninergiques

Comme tous les systèmes des neurotransmetteurs que l'on connaît, celui de la sérotonine a été l'objet de plusieurs études biochimiques, physiologiques et pharmacologiques et les récepteurs impliqués dans son fonctionnement ont plus particulièrement retenu l'attention de nombreux chercheurs.

La présence des récepteurs à 5-HT a été suggérée pour la première fois par Gaddum et Picarelli (1957) lors d'études pharmacologiques chez le cobaye (cochon d'Inde). Subséquemment, plusieurs études ont montré la présence de récepteurs à 5-HT chez plusieurs vertébrés et invertébrés (Gerschenfeld et Paupardin-Tritsch 1974; Rogawski et Aghajanian 1981). L'acide lysergique diéthylamide (LSD) était le ligand le plus puissant pour mettre en évidence ces récepteurs par la méthode de la radioliation sur extrait de membranes cellulaires (Farrow et Van Vumakis 1972).

Ces récepteurs sont nombreux et divers et sont classifiés selon trois types de classification (Roth et Chuang 1987):

- Classification selon la fonction
- Classification selon la liaison à un radioligand et sur la base de leur affinité de liaison avec la [<sup>3</sup>H]5-HT (Peroutka et Snyder 1979)
- Classification biochimique basée sur les mécanismes de transduction du signal (Roth et Chuang 1987).

Les récepteurs sérotoninergiques sont d'au moins 3 types de structures moléculaires différentes: les récepteurs couplés à la protéine G, les récepteurs à base des canaux ioniques ou des transporteurs (Peroutka 1994; Vernier et al. 1995). Les différents types de récepteurs sérotoninergiques sont identifiés pharmacologiquement. Ainsi l'analyse des récepteurs par clonage, l'étude de l'affinité aux différentes drogues ou la classification fonctionnelle, pourra caractériser les différents sous-types de récepteurs. Cependant des contraintes peuvent limiter l'information selon la comparaison des séquences par l'augmentation des sites informatifs dans les séquences ou par le nombre des séquences disponibles pour cette comparaison. De plus, une saturation est atteinte quand les séquences partagent un bas niveau d'identité. Donc jusqu'à présent les informations sont très dispersées et controversées dans ce domaine (Vernier et al. 1995).

Les récepteurs à 5-HT sont divisés en 7 classes pharmacologiques en plus de nombreux récepteurs fonctionnels (Hoyer et al 1994). La plupart de ces récepteurs se lient et interagissent avec une protéine G, les récepteurs de la drosophile étant un exemple (Saudou et al. 1992), et d'autres différents types de récepteurs sérotoninergiques comme les récepteurs 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, et 5-HT<sub>4</sub> qui sont métabotropes et liés à la protéine G; le récepteur 5-HT<sub>3</sub> est ionotrope et non lié à la protéine G. Les 2 types de récepteurs 5-HT<sub>1</sub> et 5-HT<sub>2</sub> ont divergé du même gène ancestral, mais les récepteurs 5-HT<sub>1</sub> sont liés à une activation ou une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase alors que les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> sont couplés à l'activation des phospholipases C, ce qui aboutit à une augmentation de phosphatidyl inositol, à une accumulation des inositophosphates et à une mobilisation du calcium

intracellulaire ou accumulation de diacylglycérol avec une activation des protéine kinases (Peroutka 1994).

La liaison spécifique de la 5-HT attribuée à la présence d'un récepteur a été rapportée dans les animaux et les tissus suivants: au niveau du SNC de l'escargot *Helix pomatia* (Drummond et al.1980) et chez *Helix aspersa* et *Aplysia californica* (Gerschenfeld et Paupardin-Tritsch 1974), chez l'insecte *Locusta migratoria* (Hiripi et Downer 1993), chez le platyhelminthe *Hymenolepis diminuta* (Ribeiro et Webb 1987), dans le système nerveux (SN) des mollusques (Walker 1985).

Donc les effets de la sérotonine s'effectuent par l'intermédiaire de l'activation de plusieurs types de récepteurs qui sont classifiés selon leurs propriétés pharmacologiques et leurs structures moléculaires.

## **1.6 Neurotransmission chez les Cnidaires**

L'étude de la neurotransmission chez les Cnidaires tire son importance du fait que ceux-ci possèdent les plus anciens systèmes nerveux et qu'on doit orienter les recherches vers eux pour élucider comment la neurotransmission est apparue au cours de l'évolution, et pour comprendre les propriétés des SN primitifs (Satterlie et Spencer 1987; Anderson et Schwab 1982; Anderson et Spencer 1989). Plusieurs études neuropharmacologiques peuvent aider à élucider l'origine évolutive de la neurotransmission chimique chez ces animaux.

Des techniques d'enregistrements électrophysiologiques intracellulaires chez l'hydroméduse, *Polyorchis*, ont permis l'élucidation des

mécanismes de la communication synaptique entre les cellules nerveuses (Spencer et Schwab 1982).

En général les neurotransmetteurs sont les facteurs qui peuvent interagir dans une synapse chimique, et pour qu'une molécule soit considérée comme un neurotransmetteur, elle doit satisfaire aux critères suivants:

- 1- Sa présence dans le tissu et sa localisation dans des neurones.
- 2- Synthèse, donc présence de l'enzyme nécessaire pour sa synthèse.
- 3- Sa libération dans le milieu en stimulant les neurones présynaptiques.
- 4- Son interaction avec des récepteurs spécifiques.
- 5- L'effet de l'application exogène doit être identique à celui résultant de l'excitation des neurones contenant le neurotransmetteur (Bell 1983; Martin et Spencer 1983; Shepherd 1988).

### **1.6.1 Présence de cellules nerveuses chez les cnidaires**

Plusieurs travaux ont démontré la présence de neurones chez les cnidaires (Westfall 1973a; Westfall et Kinnamon 1978). La multifonctionnalité caractéristique des neurones d'un SN primitif tel que celui des cnidaires les distingue des neurones plus spécialisés d'un SN plus évolué, tout en gardant les mêmes traits morphologiques et fonctionnels (Satterlie et Spencer 1987).

Des études ultrastructurales ont montré la présence de synapses interneuronales chez les hydrozoaires (Jha et Mackie 1967; Westfall 1969, 1970; Westfall et al 1971; Stokes 1974; Spencer 1979; Kinnamon et Westfall 1982), les scyphozoaires (Horridge et al 1962; Horridge et Mackay 1962; Westfall, 1973b; Anderson et Schwab 1981) et les anthozoaires

(Satterlie et Case 1980; Satterlie et al 1980) qui sont les trois classes des cnidaires. Des synapses neuromusculaires sont également présentes chez de nombreux cnidaires comme *Hydra littoralis*, *Muricea californica*, *Lopgorgia chilensis* et *Polyorchis* (Westfall 1970, 1973b; Satterlie et Case 1978; Singla 1978; Spencer 1979) ainsi que des synapses neuronématocytaires chez les cnidaires *Hydra littoralis*, *Muricea californica* et l'anémone de mer *Aiptasia pallida* (Westfall 1969, 1970, 1973a,b; Satterlie et Case 1978; Westfall et al. 1997). Les critères qui identifient les synapses chimiques dans les embranchements évolués sont ceux-là mêmes qui sont utilisés pour les coelentérés (Cobb et Pentreath 1978).

### 1.6.2 Présence de la sérotonine chez les cnidaires

La sérotonine a été détectée chez les anthozoaires (Welsh 1960), les hydrozoaires (Kline et Weissbach 1965) et les scyphozoaires (Carlberg et Rosengren 1985). Plus spécifiquement, elle est présente chez l'hydre *Hydra oligactis* et les anémones de mer *Sagartia luciae* et *Metridium senile* (Welsh 1960; Castano et Rossi 1978), chez l'anémone de mer *Calliactis parasitica* (Mathias et al. 1960), et l'hydre *Hydra littoralis* (Wood et Lentz 1964). Des études par chromatographie liquide à haute performance avec détection électrochimique (HPLC-ED, Pani et Anctil 1994a,b) ont montré la présence de 5-HT chez l'anthozoaire *Renilla koellikeri* tandis que des études immunohistochimiques faites par Umbriaco et al. (1990) ont montré la présence de neurones 5-HT-immunoréactifs chez cet animal.



## 1.7 Description du modèle expérimental: *Renilla Koellikeri*

La pensée de mer est un animal marin, bioluminescent, que l'on trouve dans la zone littorale de la côte ouest américaine (Lyke 1965). Elle appartient à l'embranchement des Cnidaires, classe des Anthozoaires, sous-classe des Octocoralliaires, ordre des Pennatulacés, sous-ordre Sessilifloral, famille des Pennatulidés.

### 1.7.1 Description morphologique

C'est un animal colonial ayant la forme d'un rein aplati, avec un sinus profond où est inséré le pédoncule qui permet à la colonie de s'ancrer dans le sable pour éviter d'être entraîné par les courants marins (Kastendiek 1975). Elle est caractérisée par une symétrie biradiaire selon un plan sagittal et avec des caractères radiaires externes et la présence de la forme polypoïde (Fig. 4A de l'article).

Les polypes sont les individus de la colonie, portés sur la face dorsale d'une masse tissulaire, le rachis, dont la face ventrale reçoit le pédoncule musculueux. Les polypes, appelés anthozoïdes et siphonozoïdes, sont dimorphes.

Les autozoïdes sont des polypes typiques de forme tubulaire, ayant 8 mésentères et 8 filaments gastriques, avec l'extrémité orale dirigée vers le haut, s'ouvrant sur une bouche ovale qui porte les 8 tentacules pinnées avec le coelentéron divisé en 8 chambres ou cavités gastrovasculaires par des

parois (septa) qui se prolongent dans le rachis sous forme de filaments septaux. Des tubes gastrodermiques du rachis relient les cavités gastrovasculaires de chacun de différents autozoïdes entre elles; ces polypes ont le pouvoir de se rétracter complètement dans le coenenchyme du rachis. On remarque à la base des tentacules l'accumulation d'algues symbiotiques, et l'accumulation du matériel granuleux blanc sur le disque oral et au long du septa et du pharynx. Les deux septa latéraux portent les organes reproducteurs mâles ou femelles. Les muscles longitudinaux rétracteurs des polypes sont du côté ventral du septum latéral, donc la chambre gastrique dorsale est dépourvue des muscles ce qui montre la symétrie bilatérale dans l'arrangement de tous les organes internes (Wilson 1983). Le nombre des autozoïdes dépend de l'âge de la colonie. Leurs fonctions sont la capture et l'ingestion de nourriture et la reproduction (Parker 1920a).

Les autres polypes sont les siphonozoïdes, des individus rudimentaires de taille microscopique sans tentacules ou filaments mésentériques, possédant seulement des septa, une bouche et le pharynx. Ce sont des polypes modifiés qui ont perdu le pouvoir de se rétracter dans le coenenchyme; ils sont présents comme les autozoïdes sur la face dorsale du rachis en petites grappes, chacun étant caractérisé par la présence d'un peigne de flagelles (siphonoglyphe) bien développé. Leur fonction est de pomper ou de siphonner l'eau de mer à l'intérieur de toute la colonie afin de faire circuler l'oxygène, les aliments et les déchets métaboliques et d'ajuster le tonus hydrostatique de la colonie (Parker 1920a,b). Ces polypes modifiés sont aussi pourvus d'une symétrie radiaire externe camouflant la symétrie bilatérale interne (Chapman 1974; Hyman 1940). Il n'y a qu'un seul siphonozoïde exhalant près du point d'insertion du pédoncule et tous les

autres sont des siphonozoïdes inhalants. Le rythme de gonflement et de dégonflement de la colonie est relié à l'activité de ces polypes (Parker 1920a).

### **1.7.2 Organisation histologique**

L'histologie de la colonie montre deux couches tissulaires, l'ectoderme (épithélium avec cellules sensorielles, nématocytes) et l'endoderme (épithélium avec cellules glandulaires, digestives et musculaires) qui sont séparées par la mésoglée, gelée de fibres conjonctives dans laquelle baignent des amoebocytes et des neurones. Les deux couches des polypes sont repliées sur elles-mêmes, l'ectoderme interne (épithélium du pharynx) étant séparé de l'ectoderme externe par les couches épithéliales endodermiques du pharynx, des cloisons (septa) et de la paroi externe. Il existe deux feuilletts musculaires endodermiques dans les septa (muscles longitudinaux et muscles radiaires) en plus de la musculature circulaire dans l'endoderme de la paroi externe et du pharynx. Le squelette de la colonie se compose de spicules de carbonate de calcium (Dunkelburger et Watabe 1974) qui sont dissiminés à travers la mésoglée (Lyke 1965).

### **1.7.3 Système nerveux et neurotransmission dans la pensée de mer**

Le système nerveux est un réseau nerveux diffus formé de trois composantes: ectodermique, mésogléenne et endodermique. Il est non polarisé et formé de véritables cellules nerveuses (Anderson et Schwab 1982) qui projettent des neurites vers les muscles et qui entrent en contact avec la

composante endodermique peu développée par rapport aux deux composantes ectodermique et mésogléenne (Satterlie et al. 1976, 1980).

Ce système nerveux est impliqué dans des fonctions physiologiques et comportementales (Parker 1920b; Nicol 1955; Buck 1973). Les neurones des cnidaires en général produisent des potentiels d'action semblables à ceux des vertébrés supérieurs (Anderson et Mackie 1977; Roberts et Mackie 1980; Spencer et Satterlie 1981). Jusqu'à récemment, on avait peu d'information sur la nature des substances neuroactives impliquées dans la régulation de ces activités (Martin et Spencer 1983).

Le réseau nerveux de *Renilla koellikeri* joue donc un rôle de coordination de plusieurs activités de défense dans la colonie: retrait des polypes, bioluminescence et les contractions rachidiennes (Parker 1920a,b; Nicol 1955; Buck 1973; Anderson et Case 1975; Satterlie et al. 1976, 1980). Cependant la nature des substances neuroactives impliquées dans chacune de ces activités coloniales reste peu connue.

La présence de la neurotransmission chez la pensée de mer suggère la présence de neurotransmetteurs et/ou de neuromodulateurs ainsi que la présence de synapses chimiques (Umbriaco et al. 1990), malgré qu'aucune des études qui ont été effectuées ne permette d'affirmer la présence de la neurotransmission chez la renille. Anctil et al. (1982) et Awad et Anctil (1993a,1994) ont mis en évidence le rôle des catécholamines dans la bioluminescence. Un neuropeptide, l'anthoRFamide, a aussi été identifié dans la pensée de mer et on a montré par immunohistochimie sa présence dans de nombreux neurones, dont plusieurs innervent des muscles (Grimmelikhuijzen et Groeger, 1987). Des expériences physiologiques ont montré que ce neuropeptide semble être un transmetteur neuromusculaire

chez la pensée de mer (Anctil, 1987; Anctil et Grimmelikhuijzen, 1989). Anctil et Ngo Minh (1997) ont détecté par HPLC-ED une grande quantité de taurine, un acide aminé, et des neurones immunoréactifs à la taurine qui semblent jouer un rôle dans la capture des aliments par les autozoïdes. En outre, sa forte immunoréactivité dans les nématocytes et d'autres cellules ectodermiques et dans les corps cellulaires des cellules myoépithéliales de l'endoderme et sa distribution neurale limitée à la chaîne nerveuse associée au système musculaire responsable de la rétraction des autozoïdes supportent son rôle dans ce réflexe de protection et dans la réponse au stress métabolique ou osmotique (Anctil et NgoMinh 1997).

#### **1.7.4 La sérotonine chez la pensée de mer**

Des neurones 5-HT immunoréactifs ont été détectés par immunohistochimie (Umbriaco et al. 1990) et Pani et Anctil (1994a,b) ont détecté biochimiquement la présence de la sérotonine. En plus de la détection de substances apparentées aux catécholamines, l'analyse des extraits de tissus de la pensée de mer par HPLC-ED a permis la détection de 5 autres substances apparentées aux indoleamines comme la tryptophane (TRP), la 5-hydroxytryptophane (5-HTP), l'acide 5-hydroxy-3-indoleacétique, la N-acétyl-5-hydroxytryptamine et la 5-HT, les plus abondantes étant les précurseurs de la 5-HT, soit la TRP et la 5-HTP. Ceci implique la présence chez ces animaux de différentes étapes de synthèse et de métabolisme de la 5-HT similaires à celles des vertébrés, ainsi que les étapes d'oxydation impliquées dans son inactivation (Carlberg et Anctil 1993; Pani et Anctil 1994b).

### **1.7.5 Localisation neurale de la sérotonine**

D'après l'étude immunohistochimique de Umbriaco et al. (1990), la sérotonine est associée à des neurones surtout au niveau ectodermique et sous-ectodermique. Ces neurones ectodermiques possèdent un cône cilié apical qui les classifie parmi les neurones mécanosensoriels. Les neurites ou prolongements des neurones ectodermiques se trouvent à proximité de neurones mésogléens bipolaires, parmi lesquels se trouvent des neurones 5-HT-immunoréactifs, avec corps cellulaires adjacents au myoépithélium endodermique du muscle circulaire impliqué dans l'activité péristaltique (voir ci-dessous). Cependant, il n'y a pas d'immunoréactivité à la 5-HT dans la couche endodermique même de *Renilla koellikeri*.

### **1.7.6 Effet de la sérotonine et son implication fonctionnelle**

La pensée de mer vit sur des substrats sablonneux soumis à l'action des courants. Pour fuir ses prédateurs ou pour déloger le sable encombrant les autozoïdes cet animal utilise les contractions péristaltiques (Kastendiek 1976). Lorsque les courants sont lents, le rachis est enflé et les polypes sont exposés pour la nutrition (le mode de nutrition chez cet animal est celui dont les aliments sont les substances en suspension dans l'eau); par contre, en présence de forts courants, le rachis se dégonfle, les polypes se rétractent et le pédoncule s'enfonce dans le sable pour fixer ou ancrer la colonie (Anctil 1989). Le péristaltisme est plus fortement exprimé dans la colonie enflée que dans la colonie dégonflée (Brafield et Chapman 1967). Une augmentation

forte du courant implique le dégonflement du rachis, donc une réduction de l'amplitude des ondes péristaltiques; mais une augmentation plus petite et moins soudaine du courant donne lieu plutôt à une augmentation de l'amplitude de ces ondes péristaltiques.

La sérotonine peut exercer le même effet sur le péristaltisme qu'une légère augmentation du courant, induisant ainsi une augmentation de l'amplitude des contractions péristaltiques du rachis (Anctil 1989). Cet effet de la 5-HT s'exerce surtout sur l'activité phasique, et non pas tonique, des muscles. Les antagonistes des récepteurs sérotoninergiques peuvent inhiber l'effet de l'augmentation du courant et celui de la 5-HT sur les contractions péristaltiques.

Des expériences additionnelles ont montré la spécificité de l'implication des neurones sérotoninergiques dans la modulation du péristaltisme (Anctil 1989). Des traitements avec une neurotoxine spécifique des neurones sérotoninergiques, la 5,7-dihydroxytryptamine, ainsi qu'avec l'inhibiteur de l'enzyme de synthèse de la 5-HT, la p-chlorophénylalanine, réduisent les contractions rythmiques du rachis. Par contre, l'application de 6-hydroxydopamine, une neurotoxine des neurones catécholaminergiques, n'a aucun effet sur les contractions (Anctil et al. 1982), ce qui confirme l'implication du système sérotoninergique dans la modulation des contractions rythmiques. La sérotonine module ces contractions en activant l'AMP cyclique (Anctil 1989). Cet effet de la sérotonine est opposé par l'effet de la mélatonine, un dérivé de la 5-HT, qui diminue l'amplitude des contractions péristaltiques par l'intermédiaire du GMP cyclique (Anctil et al. 1991).

Enfin, une analyse des sites de radioliation de la 5-HT sur les membranes cellulaires de *Renilla koellikeri* a révélé la présence d'un récepteur sérotoninergique (Hajj-Ali et Anctil 1997). Cette étude a montré la haute affinité de la 5-HT froide et de l'agoniste 2-méthyl-5-HT pour ce récepteur. La pharmacologie de ce récepteur est conforme à celle de l'action modulatrice de la 5-HT sur le péristaltisme, mais n'est pas conforme avec celle des sous-types des récepteurs sérotoninergiques déjà connus, en particulier l'absence d'affinité de la LSD. Ces sites de liaison semblent représenter un précurseur évolutif des classes de récepteurs sérotoninergiques tels qu'on les connaît maintenant.

## **1.8 Problématique et objectifs du travail**

Nous savons donc que la 5-HT est un modulateur du péristaltisme chez la pensée de mer, mais nous ne connaissons pas la ou les voies employées par la 5-HT ou les neurones sérotoninergiques pour exercer cette modulation. Umbriaco et al. (1990) avaient déjà suggéré que les neurones mécanosensoriels à 5-HT de l'ectoderme étaient stratégiquement bien placés pour détecter les changements du courant d'eau en surface et y répondre en libérant la 5-HT. La mésogée a un réseau nerveux dont certains neurones contiennent de la 5-HT et qui est susceptible de conduire l'influx ou le signal de la sérotonine des neurones ectodermiques mécanosensoriels à la musculature endodermique (Satterlie et al. 1980; Anctil 1989) qui est responsable des contractions rythmiques chez les anthozoaires (McFarlane 1973,1974). Cependant, il n'y a pas de neurones sérotoninergiques dans la



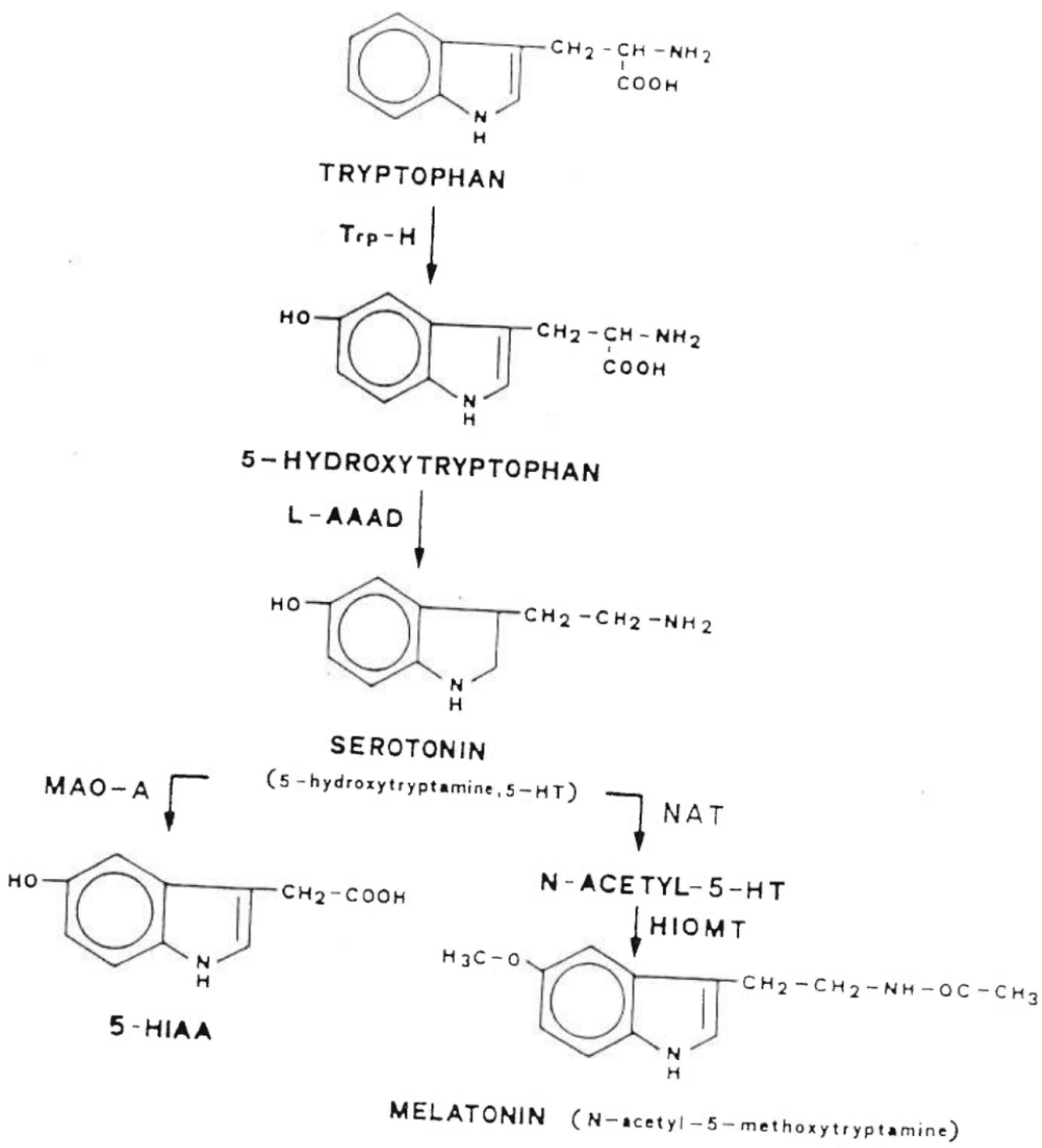
musculature endodermique même. Est-ce que la 5-HT exerce son effet indirectement, sur des neurones contrôlant la musculature, ou directement sur la musculature?

Pour répondre à cette question, on ne peut pas prendre une approche expérimentale conventionnelle parce que la distribution des cellules nerveuses et musculaires est trop diffuse dans ces animaux primitifs. Une approche alternative est d'examiner la distribution des sites de destination de la 5-HT dans le tissu après sa libération neurale. Pour simuler cette situation, on charge le tissu de la pensée de mer avec de faibles concentrations de 5-HT marquée et on détermine sa destination par autoradiographie. La destination de la 5-HT peut prendre deux formes: la première est celle du recaptage de la 5-HT par les neurones sérotoninergiques eux-mêmes ou par d'autres cellules ou la deuxième celle des sites de liaison de la 5-HT (les récepteurs) où s'exerce son action.

Le premier objectif de ce travail est donc de mettre en évidence l'existence du phénomène de captage spécifique de la sérotonine par l'intermédiaire de transporteurs membranaires, en utilisant la 5-HT tritiée comme sonde et en effectuant une analyse cinétique et pharmacologique. Ensuite nous utilisons ces connaissances pour établir les conditions d'incubation du tissu avec la sonde pour visualiser les sites de captage par autoradiographie.

Le deuxième objectif est d'étudier la distribution des sites de liaison de la 5-HT à son récepteur dans les polypes. Pour ce faire également, une étude autoradiographique a été faite en utilisant la 5-HT tritiée comme radioligand et les conditions optimales de sensibilité et de spécificité de liaison obtenues par Hajj-Ali et Anctil (1997) pour ce récepteur.

**Figure A:** Voies de biosynthèse et du métabolisme de la sérotonine. Trp-H, tryptophane hydroxylase; L-AAAD, acide aminé L-aromatique decarboxylase; 5-HIAA, acide 5-hydroxyindoleacétique; HIOMT, hydroxyindole-O-méthyltransferase; MAO-A, monoamine oxidase A; NAT, N-acetyltransferase. Adaptée de Müller et Nisticò (1989)



## 2.0

Etude autoradiographique de la distribution des sites de captage et des sites de liaison de la sérotonine chez le cnidaire: *Renilla koellikeri*.

(Traduction du titre de l'article « Distribution of serotonin uptake and binding sites in the cnidarian *Renilla koellikeri*: an autoradiographic study », soumis en juin 1997 au journal Tissue and Cell.)

**Distribution of serotonin uptake and binding sites in the cnidarian  
*Renilla koellikeri*: an autoradiographic study**

Pauline Dergham and Michel Anctil\*

Département de sciences biologiques and Centre de recherche en sciences  
neurologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Number of text pages: 21

Number of figures: 4 plates

Number of graphs: 3

Number of tables: 2

Abbreviated title: Serotonin uptake and binding sites in a cnidarian

Keywords: Serotonin - autoradiography - uptake - receptors - Cnidaria -  
Renilla.

\* Address for Correspondence: Dr. Michel Anctil, Département de  
sciences biologiques, Université de Montréal, Case postale 6128,  
Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Fax: (514) 343-2293

### Abstract

Using [ $^3\text{H}$ ]serotonin ([ $^3\text{H}$ ]5-HT) as radiolabel and autoradiography, we have mapped the distribution of 5-HT uptake and binding sites in the sea pansy *Renilla koellikeri* in order to identify potential cellular pathways of 5-HT inactivation and to identify cellular substrates for the previously characterized 5-HT receptor involved in the modulation of peristaltic behavior. Uptake measured in fresh polyp tissues was resolved in two processes: a high affinity (uptake<sub>1</sub>), clomipramine-sensitive process with a  $K_m$  of 0.45  $\mu\text{M}$ , and another of lower affinity (uptake<sub>2</sub>) with a  $K_m$  of 11.6  $\mu\text{M}$ . Autoradiograms of high-affinity uptake sites revealed a diffuse distribution of label with higher density in the ectoderm and endoderm, and lower density in the mesoglea. No subsets of cells, including serotonergic neurons, appeared to retain label preferentially, thus suggesting that removal of 5-HT and its chemical conversion is a general property of sea pansy tissues. Under incubation conditions identical to those used in a previous radiobinding analysis (Hajj-Ali and Anctil, 1997), autoradiograms of binding sites were generated on sections from lightly fixed and cryosectioned polyps. In contrast to uptake sites, binding sites appeared as aggregations of label around neurons of the subectodermal, mesogleal and endodermal nerve nets. In the endoderm where the myoepithelia subtend peristalsis, myoepithelial cells appeared unlabelled, suggesting that 5-HT exerts its modulatory effect on peristalsis principally via neurons. Taken together, these results indicate that 5-HT is released as a neurohormone in the sea pansy and that it may act as a broad-range neuromodulator.

## Introduction

The modulation of neurally patterned motor activities appears to be the most widespread function of serotonin (5-HT) in phylogeny (Weiger, 1997). In particular, rhythmic motor outputs are commonly modulated by serotonergic neurons in many invertebrate groups (Harris-Warrick, 1988). This function appears to be almost as old as nervous systems since 5-HT was reported to enhance peristaltic contractions in a modern representative of the earliest animals with nervous systems (Anctil, 1989).

This cnidarian animal is the sea pansy *Renilla koellikeri*, an octocorallian of the sea pen family living on sandy bottoms of sublittoral waters subjected to strong currents. Its colonial mass, the rachis, undergoes peristalsis to shed away from the feeding polyps sediments tossed on the colony by heavy currents (Kastendiek, 1976). Peristalsis is potentiated by increases in water flow, a modulatory action that is mimicked by 5-HT (Anctil, 1989). Putative serotonergic neurons possibly involved in modulation of peristalsis were visualized by immunohistochemistry in the ectodermal epithelium and mesoglea of the sea pansy (Umbriaco et al., 1990). The ectodermal 5-HT-immunoreactive neurons are classified as sensory because of the presence in each of an apical ciliary process and long neuritic processes. They appear especially suited to directly transduce changes in current speed into 5-HT release, resulting in adjustments throughout the animal of the motor pattern underlying peristalsis. To test this

hypothesis and to understand the mechanisms involved, we need first to locate sites of action of 5-HT.

In attempting to unravel the circuitry and to identify the cellular targets of serotonin's action in the sea pansy, one is held back by the diffuse tissue organization and small cell sizes that are hallmarks of anthozoan body plans (Fautin and Mariscal, 1991). In these conditions, *in situ* electrophysiological approaches become intractable. To circumvent these roadblocks, less direct approaches may be used such as *in vitro* electrophysiology in cell culture or functional mapping with 5-HT probes. The latter approach was chosen in the present study. We used tritiated 5-HT as a probe to visualize sites of uptake and of receptor binding sites, reasoning that mapping these sites would point to cells accessible to 5-HT for storage and as functional targets. Specific uptake sites for other biogenic amines (noradrenaline and adrenaline) have been reported previously in the sea pansy (Ancil et al., 1984) so that it can be assumed that 5-HT uptake sites for transmitter recycling or catabolism are also present. As for 5-HT receptors, a recent radiobinding study on membrane preparations has uncovered in the sea pansy one population of 5-HT binding sites with a pharmacological profile unlike that of any other known 5-HT receptor (Hajj-Ali and Ancil, 1997).

The present autoradiographic study of [<sup>3</sup>H]5-HT uptake and binding sites in the sea pansy was undertaken to answer the following questions. Is there a match between the distribution of 5-HT uptake sites and that of the previously described 5-HT immunoreactivity that would be consistent with neuronal reuptake as a 5-HT inactivation and recycling mechanism in the sea



pansy? Is there a match between uptake and binding sites that would be suggestive of focal synaptic release and action? Does the distribution of 5-HT binding sites favor either one of two hypotheses regarding the modulatory action of 5-HT on peristalsis: indirect action via a neuronal pacemaker of peristalsis or direct action on muscles participating in peristalsis?

## **Materials and Methods**

### **Specimen preparation**

Colonies of *Renilla koellikeri* Pfeffer were purchased from Marinus Inc. (Long Beach, California) and shipped to Montreal where they were maintained in aerated, filtered and recirculated sea water at 12-14°C (pH 7.6-8.0). They were unfed and exposed to a daily 12:12 light-dark cycle. Specimens were processed within 7 days of arrival.

Prior to each experiment, the colonies were anesthetized in 0.37M MgCl<sub>2</sub> mixed with sea water (1:1) and autozoid (feeding) polyps were excised. The remaining constituents of the colonies (siphonozoid polyps, colonial mass and peduncle) were discarded because they contain numerous calcareous spicules which hinder histological processing. Hajj-Ali and Anctil (1997) previously determined that there was no significant difference in 5-HT binding parameters between autozooids and other parts of the colony. Twenty colonies were used in this study.

### Quantitative uptake assays

Polyps were pre-incubated for 30 min at room temperature in artificial sea water (ASW: 395 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 8) containing the monoamine oxidase inhibitor pargyline (Sigma Chemicals, 1 μM). This was followed by incubation in the same medium to which was added varying concentrations of [<sup>3</sup>H]5-HT (New England Nuclear, specific activity 29.7 Ci/mM) and other substances according to experiments (see below). The duration of the incubations was determined in preliminary experiments in which polyps were incubated up to 60 min in the ASW medium containing 0.2 μM [<sup>3</sup>H]5-HT. Tracer accumulation in polyps was found to increase linearly with time and to stabilize to a plateau in 30 min (data not shown), therefore this duration of incubation was chosen for all subsequent experiments.

All incubations were followed by three 10-min rinses in ASW. The tissues were blotted with absorbent paper, weighed and solubilized in scintillation vials containing 1 ml Protosol (New England Nuclear). Solubilization proceeded for 24 h at 60°C and released pigment was bleached by adding 100 μl of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the next 2 h. Before counting radioactivity in a LKB 1217 scintillation counter, 10 ml of Universol scintillation cocktail (ICN Radiochemicals) was added to the vials. Counting was measured as disintegrations/min (dpm) at an efficiency of 64%.

For kinetic and saturation analysis, polyps were exposed to tracer concentrations between 10 nM and 20  $\mu$ M. Tissue-medium ratios (T/M) were calculated as dpm of tracer in 1 mg of tissue per dpm of tracer in 1  $\mu$ l of incubation medium. Rates of tracer accumulation in tissues were determined from the T/M ratios, and the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) and optimal rate of accumulation ( $V_m$ ) were derived from Lineweaver-Burk plots (Lineweaver and Burk, 1934). Knowing the estimated  $K_m$  of net high-affinity uptake allowed the selection of a similar tracer concentration for experiments designed to examine the effect of ions ( $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ ) and monoamine uptake blockers on [ $^3\text{H}$ ]5-HT accumulation in polyps. The effect of ions was examined by substituting  $\text{Na}^+$ -free or  $\text{Ca}^{2+}$ -free ASW to the regular ASW in both pre-incubation and incubation media, according to Holman and Anderson (1991). The effect of uptake blockers was examined by adding desipramine, imipramine or clomipramine (Research Biochemicals International) in both pre-incubation and incubation media at the desired concentrations.

### **Autoradiography of uptake**

Polyps were pre-incubated in ASW with pargyline as above, followed by incubation in ASW-pargyline with 5  $\mu$ M [ $^3\text{H}$ ]5-HT for 2 h. This tracer concentration was chosen in order to optimize uptake signals by reaching a concentration  $\sim$  tenfold above the high-affinity  $K_m$  value. After rinsing the tissues as above, they were fixed for 2 h at room temperature in 3.5% glutaraldehyde prepared in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). Tissues were

postfixed for 1 h in 1% OsO<sub>2</sub> prepared in the same buffer. The osmolality of the fixatives and buffers were adjusted with NaCl according to Satterlie and Case (1978). The polyps were dehydrated in increasing ethanol grades and critically cleared in propylene oxide. They were embedded in Epon which was then polymerized at 55°C for 24 h. Sections of 1 µm were cut with a Sorvall ultramicrotome, directly mounted and adhered on slides with heat, and autoradiograms were prepared (see below).

### **Autoradiography of binding sites**

The procedure described by Awad and Anctil (1994) was followed. Polyps were washed in Tris buffer (50 mM Tris-HCl with 20g/l NaCl, pH adjusted to 7.4), followed by immersion for 30 min in 0.04% paraformaldehyde freshly prepared in Tris buffer. Polyps were rinsed again in Tris buffer alone, followed successively by 10 min each in Tris buffer with 15% and 30% sucrose. They were immersed in Tissue-Tek embedding medium (Miles Laboratories), frozen with dry ice-chilled isopentane and stored at -80°C until sectioned. Frozen sections of 15 µm were cut on a Hacker-Bright cryotome, thaw-mounted on chromalum gelatin-coated slides and stored at -20°C for 24 h for optimal adhesion of sections to the slides.

Slides were pre-incubated in fresh assay buffer (Tris buffer without NaCl) for 10 min to eliminate endogenous 5-HT from the tissue which could compete with the radioligand for binding sites. The incubation medium containing the assay buffer and [<sup>3</sup>H]5-HT as radioligand with or without competing drugs was pipetted onto the tissue sections for 1 h. The choice of

radioligand and of its concentration (~ twice the  $K_D$  value) was based on the radiobinding study of Hajj-Ali and Anctil (1997) in which 5-HT itself was found to be the most potent competitor for [ $^3$ H]5-HT binding sites on sea pansy membranes and in which a  $K_D$  of 23 nM was estimated for polyps. All incubations were performed with the assay buffer containing 2  $\mu$ M pargyline to prevent monoamine oxidase activity and 20  $\mu$ M trifluoperazine to bind catecholaminergic binding sites also recognized by [ $^3$ H]5-HT (Hajj-Ali and Anctil, 1997). All tissue sections on a given slide were incubated under identical conditions and incubations were carried out in dim light to avoid any photodecomposition of the radioligand.

Adjacent sections were alternately placed on 3 different slides designed to undergo different treatments for comparison. Thus one slide was exposed to the radioligand alone, the next slide to the radioligand with cold 10  $\mu$ M 5-HT to reveal nonspecific binding or to 20  $\mu$ M of 2-methyl-5-HT, a potent agonist of specific binding sites (Hajj-Ali and Anctil, 1997), and the next slide was directly processed for histology (see below). To quantify differences in labeling between the different treatments, some sections were wiped from the slide with a glass fiber filter (GF/C, 24 mm; Whatman) after post-incubation washing and solubilized in Protosol in scintillation vials. Betamax scintillation cocktail (10 ml, ICN Radiochemicals) was added in the vials and radioactivity counted.

After incubations, sections were washed twice for 15 min each in ice-cold assay buffer and the slides plunged for a few seconds in  $H_2O$  at 4°C.

Slides were then immediately blown dry under a stream of cold air and kept overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Generation of autoradiograms**

Liquid emulsion autoradiography was used to prepare autoradiograms (Descarries and Beaudet, 1983). Slides with tissue sections labeled with [ $^3\text{H}$ ]5-HT were dipped in Ilford K-5D emulsion (Polysciences Inc.) maintained at  $40^{\circ}\text{C}$  in a darkroom lit by a 15-watt light bulb through a Kodak 2A red filter. The coated sections were placed in a light-proof box containing silica gel and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  usually for 3 weeks (optimal time for best signal-to-background ratio). The slides were developed in Kodak D-19 at  $20^{\circ}\text{C}$  for 5 min, rinsed in water and fixed in 30% sodium thiosulfate for 5-10 min. They were washed in water 3 x 10 min and stained with toluidine blue (autoradiograms of uptake) or with hematoxylin-eosin Y (autoradiograms of binding sites). Sections were dehydrated, cleared in xylene and mounted in Permount.

Uptake autoradiograms were assessed quantitatively by scoring silver grains within an area delimited by an ocular micrometer grid viewed at a magnification of 630 x with a Leitz-Wild Dialux 20 microscope. All measurements were made on slides subjected to identical emulsion exposure and conditions of development. Background silver grain signals were scored in the gastrovascular cavities (see Results for definition) of the sections in which tissue was scored, and the background values were subtracted from those of tissues.

## Results

### Quantitative analysis of [<sup>3</sup>H]5-HT uptake

Polyps were incubated in increasing concentrations of [<sup>3</sup>H]5-HT (0.01-20  $\mu$ M) and net rates of accumulation of tracer in tissues were determined from T/M ratios (Table 1; see Materials and Methods). From these values Lineweaver-Burk plots were derived (Fig. 1) which indicated the presence of two uptake processes, a high-affinity process (uptake<sub>1</sub>) with a Km of 0.45  $\mu$ M and a Vmax of 0.15 nM/g/30 min, and a low-affinity process (uptake<sub>2</sub>) with a Km of 11.6  $\mu$ M and a Vmax of 2.4 nM/g/30 min. These parameters were used to construct curves representing Michaelis-Menten kinetics for uptake<sub>1</sub> and uptake<sub>2</sub> (Fig. 2). Uptake<sub>1</sub> saturated at 10  $\mu$ M and at a tracer concentration equivalent to its Km value, it represented 50% of total accumulations. Uptake<sub>2</sub> did not completely saturate. Figure 3 shows that Na<sup>+</sup>-free ASW reduced total accumulation of label by 50% in polyps incubated in [<sup>3</sup>H]5-HT at a concentration close to the Km value of uptake<sub>1</sub>. In contrast, Ca<sup>2+</sup>-free ASW had no significant effect on [<sup>3</sup>H]5-HT accumulations. Clomipramine was the most potent of the monoamine uptake blockers used, reducing total label accumulations to 25% of controls (Fig. 3). Imipramine and desipramine were relatively ineffective, reducing accumulations to 75% and 86% of controls, respectively (Fig. 3).

### **Histological organization of the sea pansy**

Understanding the peculiar organization of anthozoan tissues is a prerequisite to the description of [ $^3\text{H}$ ]5-HT autoradiograms in the sea pansy. For more information on the histology of anthozoans, see Fautin and Mariscal (1991), and for that of the sea pansy, see Lyke (1964). The schema in figure 4A shows a representative cross-section of an octocorallian polyp. The body plan is a cylindrical column with an apical oral complex from which radiate eight tentacles. The body wall of either column or tentacles consists of two tissue layers, ectoderm and endoderm, separated by a jelly-like material called mesoglea. In the column, the endoderm with accompanying mesoglea extends inwards in the form of eight septa, and abuts the pharynx at the center of the polyp. The spaces delimited by the body wall, septa and pharynx wall are the gastrovascular cavities in which sea water with food particles circulates. The septa are so organized that a thin mesogleal lamella separates the longitudinal (retractor) muscle on one side from the radial muscle on the other. The endodermal lining of both body wall and pharynx includes the circular musculature.

In the body wall of the sea pansy, the ectoderm forms a monolayered epithelium with several cell types, the mesoglea includes islands of cells called amoebocytes that are associated with a mesogleal nerve-net, and the endoderm includes myoepithelial cells whose cell bodies line the gastrovascular cavity and whose contractile part forms thin extensions



anchored in the mesoglea (Fig. 4B). In septa (Fig. 4C), the muscles are also myoepithelia.

### **Autoradiographic localization of [<sup>3</sup>H]5-HT uptake sites**

Autoradiograms of the body wall and tentacles of polyps revealed differences in labelling between the tissue layers. Labelling appeared heavier in ectoderm and endoderm than in the mesoglea (Figs. 5A,B, 6A), and this observation was supported by silver grain quantitation where counts in ectoderm and endoderm were similar and approximately twice those in mesoglea (Table 2). In tentacles, the ectodermal epithelium was labelled more heavily than the underlying ectodermal muscle (Fig. 5A,B) in which label density resembled that of the adjacent mesoglea (Table 2). This ectodermal muscle is absent in the body wall of the column where labeling in the ectoderm was more uniform (Fig. 6A). The label appeared to be distributed homogenously throughout the layers, with no evidence of specific labelling of cell types. In the mesoglea labeling was associated with amoebocytes as well as with the collagenous matrix (Fig. 6).

In contrast to control autoradiograms (Figs. 5A,B and 6A), autoradiograms of clomipramine-treated polyps revealed no difference in labelling between tissue layers (Fig. 6B; Table 2). Clomipramine-treated polyps also showed a reduction of overall density of labelling compared to control autoradiograms (Fig. 6A,B). This reduction was significant and amounted to 40% of controls (Table 2), an effect largely consistent with the effect of clomipramine on total accumulations of [<sup>3</sup>H]5-HT (Fig. 3).

Within the endoderm, labelling of the circular myoepithelium (Fig. 5A,B) was heavier than that of the septal musculature (Fig. 5C,D; Table 2). Although cross-sections of septa failed to reveal a pattern of labelling over longitudinal muscles (Fig. 5C), sagittal sections through the same muscle showed the presence of discreet lines of silver grains over muscle processes (Fig. 5D). Several of these lines of grains were oriented in such a way as to intersect a few muscle processes.

Ectodermal neurons resembling in size and shape previously characterized 5-HT-immunoreactive sea pansy neurons (Umbriaco et al., 1990) were heavily stained with toluidine blue (Fig. 6C,D). None exhibited labelling any heavier than that of surrounding ectodermal cells, including nematocytes (Fig. 6D). No labelling of mesogleal neurons, some of which had been found to be 5-HT-immunoreactive (Umbriaco et al., 1990), was apparent (Fig. 6C,D). Mesogleal amoebocytes displayed sparse labelling as in the mesogleal acellular matrix (Fig. 6D).

### **Autoradiographic localization of [<sup>3</sup>H]5-HT binding sites**

Autoradiograms revealed heavy labelling in all three layers of the body wall, although the occurrence of dense aggregations of silver grains was greater in the ectoderm and endoderm (Fig. 7A). All labellings were highly specific as demonstrated by their virtual disappearance in autoradiograms of sections incubated with excess cold 5-HT (Fig. 7B) or with excess of the receptor agonist 2-methyl-5-HT (not shown). When sections were processed

for spectrometer counting, it was found that radiocounts were reduced to 26% and 14% of controls in the presence of 10  $\mu\text{M}$  5-HT and 20  $\mu\text{M}$  2-methyl-5-HT, respectively.

Ectodermal labelling was heavier in the basiectoderm where the subectodermal nerve-net lies (Fig. 7A). In the mesoglea labelling was characterized by grain aggregations outlining small cells that correspond in size and morphology (including neuritic extensions) to neurons of the mesogleal nerve-net (Pani et al., 1995; Buisson and Franc, 1969) (Fig. 7A).

In the endoderm, dense aggregations of silver grains were seen around numerous cellular elements associated with the circular myoepithelium (Fig. 7A,E) and the septal musculature (Fig. 7C-E). The outlined cells ranged in diameter between 3 and 6  $\mu\text{m}$ . The larger myoepithelial cells appeared largely or entirely devoid of labelling. In favorable sections, fine labelled processes were seen to extend from the labelled cells to varying distances and even to bifurcate (Fig. 7D,E). The limits of light microscopic resolution precluded the identification of these processes as neurite or muscle processes, or both.

## Discussion

Radiolabelled 5-HT flux studies demonstrated that a high-affinity, sodium-dependent uptake process exists for 5-HT in the sea pansy and autoradiography showed that the sites of uptake of [<sup>3</sup>H]5-HT were widely distributed throughout the tissue layers of the sea pansy without preferential association to specific cell types. In contrast, the [<sup>3</sup>H]5-HT binding sites of a previously characterized sea pansy 5-HT receptor (Hajj-Ali and Anctil, 1997), while also widely distributed, appeared to be associated with cellular elements resembling neurons described in the anthozoan literature (Umbriaco et al., 1990; Fautin and Mariscal, 1991; Pani et al., 1995; Saripalli and Westfall, 1996). As discussed below, these findings have implications for our understanding of the mode of functioning of sea pansy serotonergic neurons and for the identification of cellular mediators of serotonin's modulation of sea pansy peristalsis.

The kinetic analysis of [<sup>3</sup>H]5-HT uptake revealed two uptake components, one of which (uptake<sub>2</sub>) failed to show marked saturation in the radiolabel concentration range used. Uptake<sub>2</sub> may represent a diffusional process as suggested by its poor saturability and large capacity (V<sub>m</sub>), although an active process cannot be ruled out, as suggested by its relatively low K<sub>m</sub> (11.6 μM). The high-affinity component (uptake<sub>1</sub>) had a K<sub>m</sub> value (4.5 × 10<sup>-7</sup> M) very similar to that of other vertebrate and invertebrate serotonergic uptake systems (Shaskan and Snyder, 1970; Osborne et al., 1975; Osborne, 1982; Ali and Orchard, 1996). Sodium dependence of

monoamine uptake systems is the rule, and the 5-HT uptake system of the sea pansy is no exception. However only half of the total uptake was depressed in the sodium-free ASW, and it is not clear from our results whether both uptake processes were affected, or only one, by sodium depletion. The sea pansy serotonergic uptake system differs from that of other invertebrates, however, in its pharmacological selectivity. As in vertebrates (Shaskan and Snyder, 1970; Osborne, 1982), clomipramine was considerably more potent than imipramine and DMI in reducing net uptake (Fig. 3), whereas all three uptake blockers exhibit equivalent potencies in other invertebrate preparations (Osborne et al., 1975; Ali and Orchard, 1996).

Autoradiography of [ $^3\text{H}$ ]5-HT uptake sites revealed a diffuse distribution of label throughout the tissues, with heavier labelling in the ectoderm and endoderm. In generating autoradiograms of uptake sites, we used a [ $^3\text{H}$ ]5-HT concentration ten times higher than the  $K_m$  value for uptake<sub>1</sub>, thus resulting in a dominant contribution of uptake<sub>2</sub> to total uptake. This is consistent with the 40 % reduction of autoradiogram labelling density in the presence of clomipramine (Table 2). However, the pattern of distribution of label was not altered in clomipramine-treated polyps, thus indicating that labelling reflecting high-affinity uptake is also diffusely distributed.

We wanted to know if the distribution of [ $^3\text{H}$ ]5-HT uptake sites matches that of the 5-HT-containing neurons in sea pansy polyps. Umbriaco et al. (1990) found 5-HT-immunoreactive neurons in the ectoderm and in the

mesoglea, but not in the endoderm, whereas uptake labelling was at least as heavy in the endoderm as in the ectoderm. Thus there appears to be a partial mismatch between the two distributions. Immunolabelled bipolar neurons with long neurites were seen in mesoglea alongside the endodermal circular myoepithelium, but the neurites did not penetrate the endoderm (Umbriaco et al., 1990). Therefore it is likely that 5-HT uptake in the endoderm results from diffusion of 5-HT released from nearby mesogleal neurons. The observations (1) that 5-HT-immunoreactive neurons are not assembled into localized cell masses but instead are interspersed throughout the ectoderm and mesoglea (Umbriaco et al., 1990), and (2) that uptake label is distributed evenly within tissue layers, are consistent with the existence of a volumic (Fuxe and Agnati, 1991; Zoli and Agnati, 1996), rather than a synaptic, system of 5-HT delivery. Electron microscopic immunocytochemistry of serotonergic neurons is underway to test this proposal. The retention of label in the mesoglea at a density significantly above background levels also favors this proposal, because the mesoglea is an obligatory pathway through which metabolites and neurohormonal substances flow between cell layers (Chapman, 1966). Most if not all cells in the sea pansy, by implication, appear capable of taking up 5-HT actively. Whether all cells taking up 5-HT are capable of converting it into the inactive metabolites previously reported to be formed in the sea pansy (Pani and Anctil, 1994a,b), cannot be determined from the present results.

We next asked whether the results pointed to a match between 5-HT uptake and binding sites. Both categories of sites are spread wide over all three tissue layers, and both label the ectoderm and endoderm more heavily

than the mesoglea. In contrast, the pattern of distribution differs between uptake and binding sites. Contrary to the uptake sites which appeared evenly distributed, the binding sites were aggregated around specific cellular elements in a manner compatible with ligand binding to cell membranes. While these findings reinforce the proposal that neuronal 5-HT, once released, diffuses to more or less distant targets, they also suggest that sea pansy 5-HT receptors are confined to a limited set of cell types. In higher invertebrates such as the mollusc *Aplysia* (Kadan and Hartig, 1988) and the blowfly (Schmid et al., 1993), 5-HT binding sites are also widely distributed within the central nervous system, especially in neuropiles. Autoradiographic mapping of 5-HT receptors also revealed a heterogeneous distribution of binding sites in numerous areas of the mammalian brain (Pazos and Palacios, 1985; Pazos et al., 1985), thus reflecting the wide-ranging modulatory actions of 5-HT on cerebral functions. In the case of the sea pansy, the diffuse distribution of 5-HT binding sites is best accounted for by the lack of a centralized nervous system and by the tissue-level design of the animal's body.

The almost complete displacement of label from our autoradiograms in the presence of the two most potent agonists identified by Hajj-Ali and Anctil (1997) in their radiobinding study of the sea pansy 5-HT receptor, is consistent with the binding sites representing the 5-HT receptor characterized by these authors. The possibility that some of the binding sites represent binding of tracer to a specific membrane transport protein involved in 5-HT uptake is unlikely because the tracer concentration used to visualize binding sites (60 nM) is two orders of magnitude lower than the tracer

concentration necessary to visualize uptake sites (5  $\mu$ M). Therefore, the distribution of binding sites may provide hints about the functional targets of 5-HT in the sea pansy. In the ectoderm of the polyp column, the binding site label was concentrated over the basiectoderm where the subectodermal nerve net lies including neurites from the ectodermal serotonergic neurons, and where muscle processes are absent (Fig. 7A). As this represents a match between the serotonergic innervation and the 5-HT receptor localization, it raises the possibility that 5-HT modulates the activity of this nerve net. In the mesoglea the label is aggregated around small cell bodies and their proximal processes that resemble in size and shape typical cnidarian bipolar and multipolar neurons (Saripalli and Westfall, 1996). Because the only cellular elements in the mesoglea of the sea pansy and other pennatulids are small neurons of the mesogleal nerve net and the larger amoebocytes (Buisson and Franc, 1969; Satterlie et al., 1980), it can be safely concluded that the labeling is associated with the mesogleal nerve net. The latter is involved in the coordination of colonial behaviors in pennatulids (Satterlie et al., 1980). Thus as in the ectoderm the binding sites are located in such a way as to be able to mediate modulatory actions of 5-HT on nerve net-based behaviors.

We wanted to know if the autoradiographic localization of [ $^3$ H]5-HT binding sites could provide support for either a direct (on muscle cells) or indirect pathway for the modulatory effect of 5-HT on sea pansy peristalsis (Anctil, 1989). Peristaltic contractions are generated primarily by the circular musculature of the endoderm (McFarlane 1973, 1974) and assist in feeding and other activities (Parker, 1920a,b; Kastendiek, 1976; Anctil, 1994). While the autoradiograms showed no clear evidence of labelling on myoepithelial



cells, there were dense aggregates of label around small cells very similar in outline to the labelled mesogleal neurons. Hence we propose that 5-HT receptors mediate the modulatory action of 5-HT on peristalsis indirectly, through non-serotonergic neurons innervating the myoepithelial cells. Although labelling of muscle processes near the endodermal neurons cannot be ruled out, the absence of labelling on the cell bodies of these processes suggests that labelling in the vicinity of muscle processes reflects merely the presence of neurites in close proximity to these processes. Thus the proposed indirect pathway would include transmission of sensory signals from ectodermal and mesogleal serotonergic neurons to the endodermal neurons bearing serotonin binding sites, which neurons in turn would connect with myoepithelial cells contributing to peristaltic contractions. Whether the labelled endodermal neurons constitute the pacemaker driving the peristalsis is not clear. The observation that magnesium chloride anesthesia abolishes peristalsis suggests strongly that the pacemaker is neuronal (Anctil, 1989). The pacemaker may be remote from the muscle effector which it may control through relay neurons, or pacemaking may be a diffuse property of several subsets of neurons throughout the animal. As the binding sites seem to be present only on neurons in all three tissue layers, 5-HT may act as a neuromodulator of several nerve nets participating in the shaping of the peristalsis motor program.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant OGP-6447 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M.A

## REFERENCES

- Ali, D.W. and Ochard, I. (1996) The uptake and release of serotonin and dopamine associated with locust (*Locusta migratoria*) salivary glands. *J. Exp. Biol.*, 199, 699-709.
- Anctil, M. (1989) Modulation of a rhythmic activity by serotonin via cyclic AMP in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Physiol.*, B 159, 491-500.
- Anctil, M. (1994) Monoamines and elementary behaviour in a coelenterate. In: *Perspectives in Comparative Endocrinology* (eds. K.G. Davey, R.E. Peter and S.S. Tobe), National Research Council of Canada, Ottawa, 449-454.
- Anctil, M., Germain, G. and LaRivière, L. (1984) Catecholamines in the coelenterate *Renilla koellikeri*. Uptake and radioautographic localization. *Cell Tissue Res.*, 238, 69-80.
- Awad, E.W. and Anctil, M. (1994) Distribution of  $\beta$ 2-like adrenergic receptors in the cnidarian *Renilla koellikeri* as revealed by autoradiography and in situ hybridization. *Cell Tissue Res.*, 278, 207-215.
- Buisson, B. and Franc, S. (1969) Structure et ultrastructure des cellules mésenchymateuses et nerveuses intramésogléennes de *Veretillum cynomorium* Pall. (Cnidaire, Pennatulidae). *Vie & Milieu*, 20, 279-292.
- Chapman, G. (1966) The structure and functions of the mesoglea. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 16, 147-168.

- Descarries, L. and Beaudet, L. (1983) The use of radioautography for investigating transmitter-specific neurons. In: Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 1 (eds. T. Hokfelt and J. Bjorklund), Elsevier, Amsterdam, 286-364.
- Fautin, D.G. and Mariscal, R.N. (1991) Cnidaria: Anthozoa. In: Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria and Ctenophora (eds. F.W. Harrison and J.A. Westfall), Wiley-Liss, New York, 267-358.
- Fuxe, K., and Agnati, L.F. (1991) Two principal modes of electrochemical communication in the brain : volume versus wiring transmission. In: Volume Transmission in the Brain (eds. K. Fuxe and L.F. Agnati), Raven Press, New York, 1-9.
- Hajj-Ali, I. and Anctil, M. (1997) Characterization of a serotonin receptor in the cnidarian *Renilla koellikeri*: a radiobinding analysis. *Neurochem. Int.*, 31, 83-93.
- Harris-Warrick, R.M. (1988) Chemical modulation of central pattern generators. In: Neural Control of Rhythmic Movements (eds. A.H. Cohen, S. Rossignol and S. Grillner), Wiley, New York, 285-331.
- Holman, M.A. and Anderson, P.A.V. (1991) Voltage activated ionic currents in myoepithelial cells isolated from the sea anemone *Calliactis tricolor*. *J. Exp. Biol.*, 161, 333-346.
- Kadan, M.J. and Hartig, P.R. (1988) Autoradiographic localization and characterization of [<sup>125</sup>I] lysergic acid diethylamide in *Aplysia*. *Neuroscience*, 24, 1089-1102.
- Kastendiek, J. (1976) Behavior of the sea pansy *Renilla koellikeri* Pfeffer (Coelenterata: Pennatulacea) and its influence on the distribution and

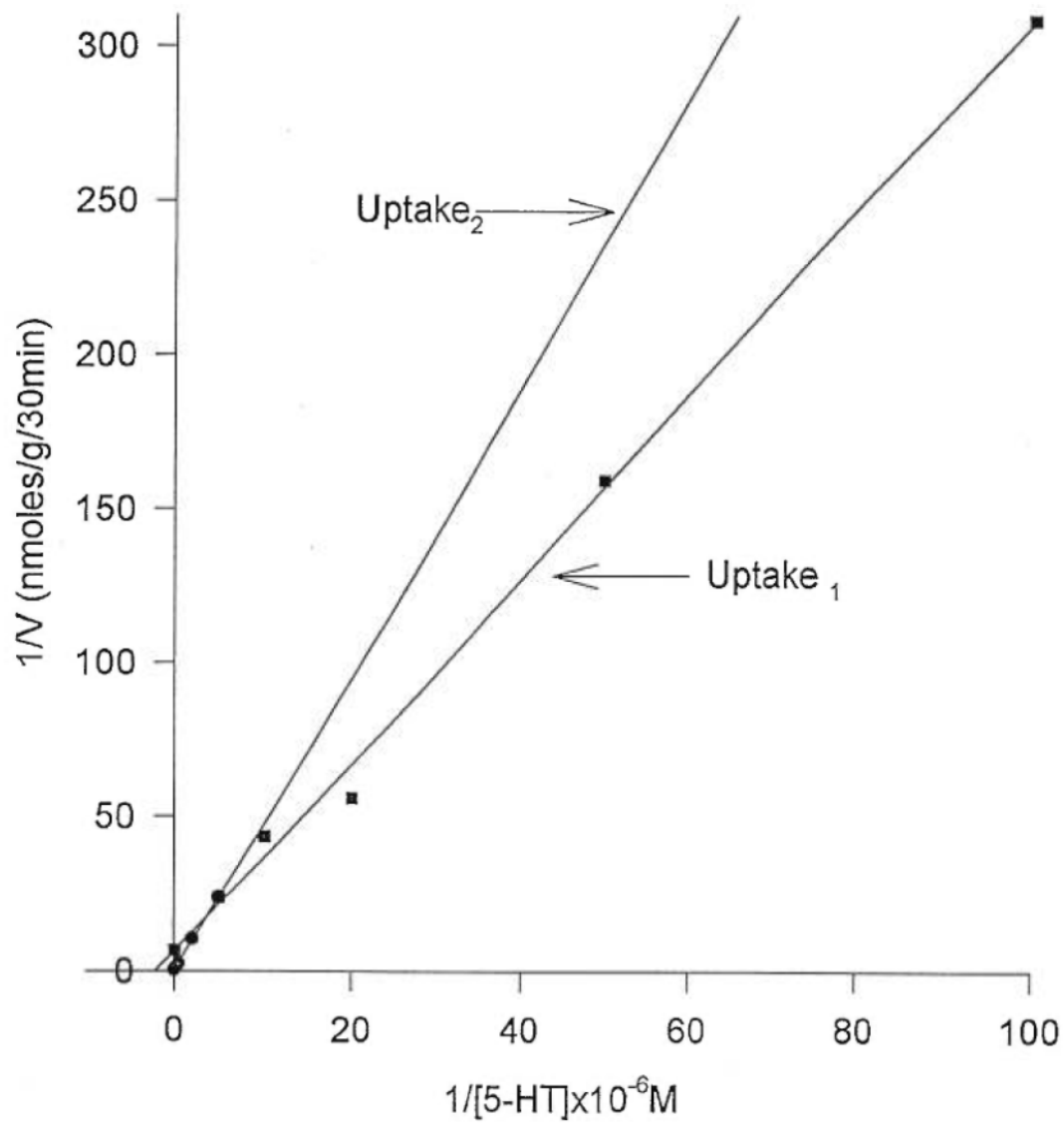
- biological interactions of the species. Biol. Bull. (Woods Hole), 151, 518-537.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56, 658-666.
- Lyke, E.B. (1964) The histology of the sea pansies *Renilla reniformis* (Pallas) and *Renilla köllikeri* (Pfeffer) with a note on the fine structure of the latter species. Ph.D. thesis, University of Wisconsin, Madison.
- McFarlane, I.D. (1973) Spontaneous contractions and nerve net activity in the sea anemone *Calliactis parasitica*. Mar. Behav. Physiol., 2, 97-113.
- McFarlane, I.D. (1974) Excitatory and inhibitory control of inherent contractions in the sea anemone *Calliactis parasitica*. J. Exp. Biol., 60, 397-422.
- Osborne, N.N. (1982) Uptake, localization and release of serotonin in the chick retina. J. Physiol. (Lond.), 331, 469-479.
- Osborne, N.N., Hiripi, L. and Neuhoff, V. (1975) The in vitro uptake of biogenic amines by snail (*Helix pomatia*) nervous tissue. Biochem. Pharmacol., 24, 2141-2148.
- Pani, A.K. and Anctil, M. (1994a) Quantitative survey of biogenic monoamines, their precursors and metabolites in the coelenterate *Renilla koellikeri*. Biogenic Amines, 10, 161-180.
- Pani, A.K. and Anctil, M. (1994b) Evidence for biosynthesis and catabolism of monoamines in the sea pansy *Renilla koellikeri* (Cnidaria). Neurochem. Int., 25, 465-474.
- Pani, A.K., Anctil, M. and Umbriaco, D. (1995) Neuronal localization and evoked release of norepinephrine in the cnidarian *Renilla koellikeri*. J. Exp. Zool., 272, 1-12.

- Parker, G.H. (1920a) Activities of colonial animals. I. Circulation of water in *Renilla*. J. Exp. Zool., 31, 343-365.
- Parker, G.H. (1920b) Activities of colonial animals. II. Neuromuscular movements and phosphorescence in *Renilla*. J. Exp. Zool., 31, 475-515.
- Pazos, A. and Palacios, J.M. (1985) Quantitative autoradiographic mapping of receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. Brain Res., 346, 205-230.
- Pazos, A., Cortes, R. and Palacios, J.M. (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. Brain Res., 346, 231-249.
- Pearse, V., Pearse, J., Buchsbaum, M. and Buchsbaum, R. (1987) Living Invertebrates. Boxwood Press, Pacific Grove, CA.
- Saripalli, L.D., and Westfall, J.A. (1996) Classification of nerve cells dissociated from tentacles of the sea anemone *Calliactis parasitica*. Biol. Bull. (Woods Hole), 190, 111-124.
- Satterlie, R.A., Anderson, P.A.V. and Case, J.F. (1980) Colonial coordination in anthozoans: Pennatulacea. Mar. Behav. Physiol., 7, 25-46.
- Satterlie, R.A., and Case, J.F. (1978) Neurobiology of the gorgonian coelenterates, *Muricea californica* and *Lophogorgia chilensis*. II. Morphology. Cell Tissue Res., 187, 379-396.
- Schmid, A., Scheidler, A., Kaulen, P. and Bruning, G. (1993) Serotonin immunoreactivity and serotonin binding sites in the brain of the blowfly *Calliphora erythrocephala*: a combined immunohistochemical and autoradiographic study. Comp. Biochem. Physiol., 104C, 193-197.

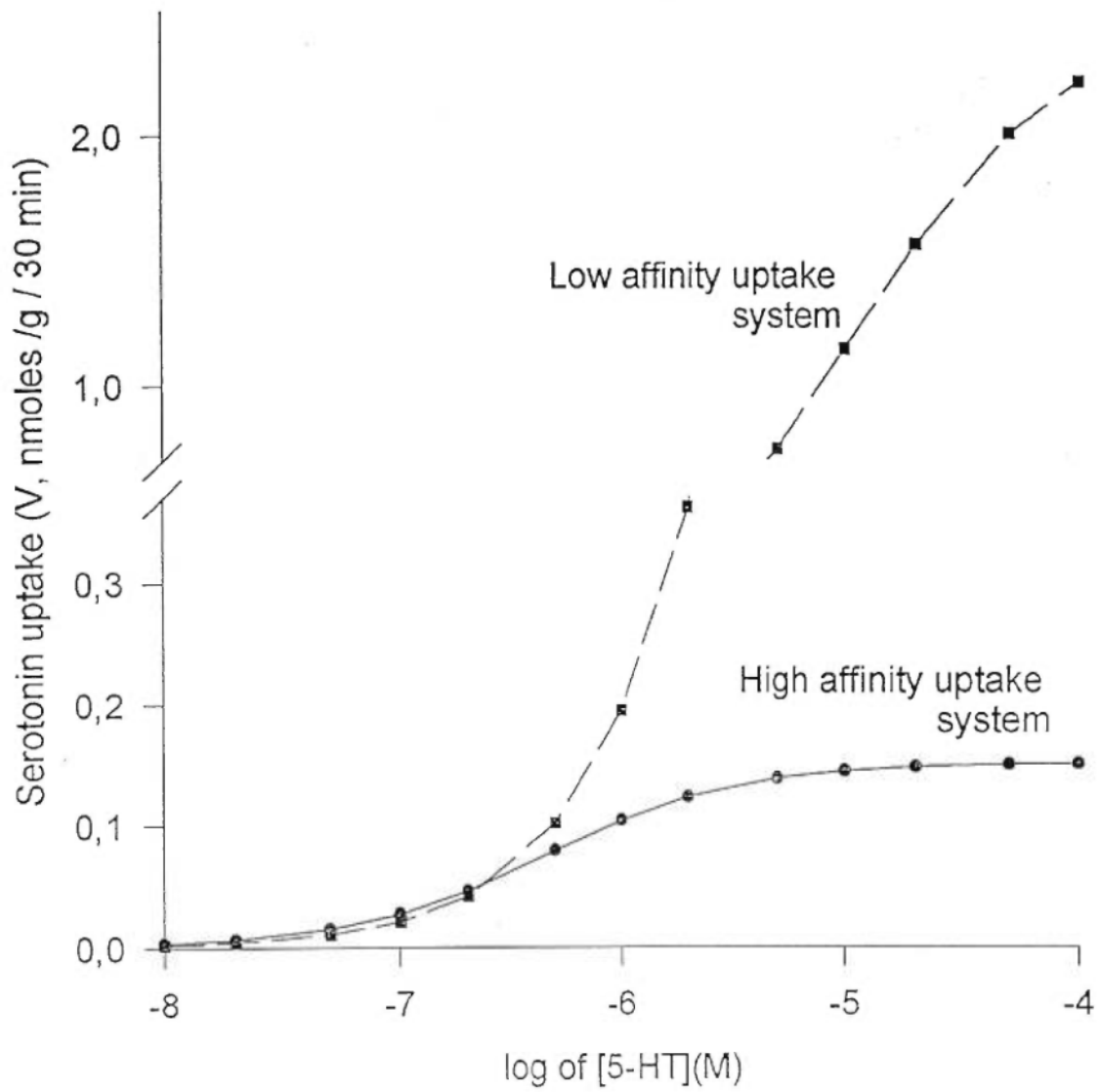
- Shaskan, E.G. and Snyder, S.H. (1970) Kinetics of serotonin accumulation into slices from rat brain: relationship to catecholamine uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 175, 404-418.
- Umbriaco, D., Anctil, M. and Descarries, L. (1990) Serotonin-immunoreactive neurons in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Neurol.*, 291, 167-178.
- Weiger, W.A.(1997) Serotonergic modulation of behavior: a phylogenetic overview. *Biol. Rev.*, 72, 61-95.
- Zoli, M. and Agnati, L.F. (1996) Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses. *Progr. Neurobiol.*, 49, 363-380.

**Figure 1:** Lineweaver-Burk plots of [<sup>3</sup>H]5-HT accumulations in sea pansy polyps. Polyps were incubated for 30 min in tracer concentrations ranging from 0.01 to 20 μM. Tracer accumulation (V) was calculated by multiplying the mean T/M ratios (N =6) by the corresponding concentration of tracer in incubating medium (see Table 1). Two components were resolved, referred to as uptake<sub>1</sub> (high-affinity) and uptake<sub>2</sub>(low-affinity).

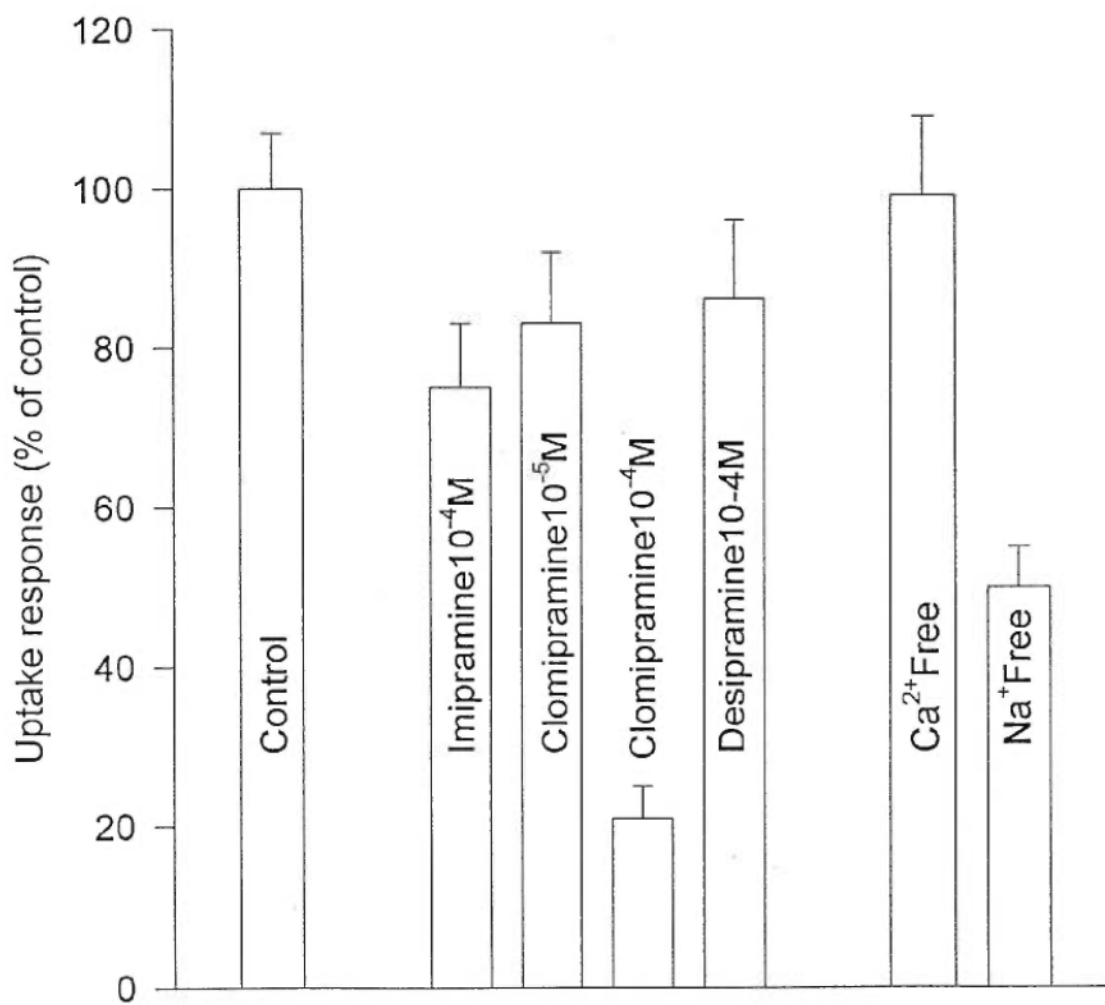




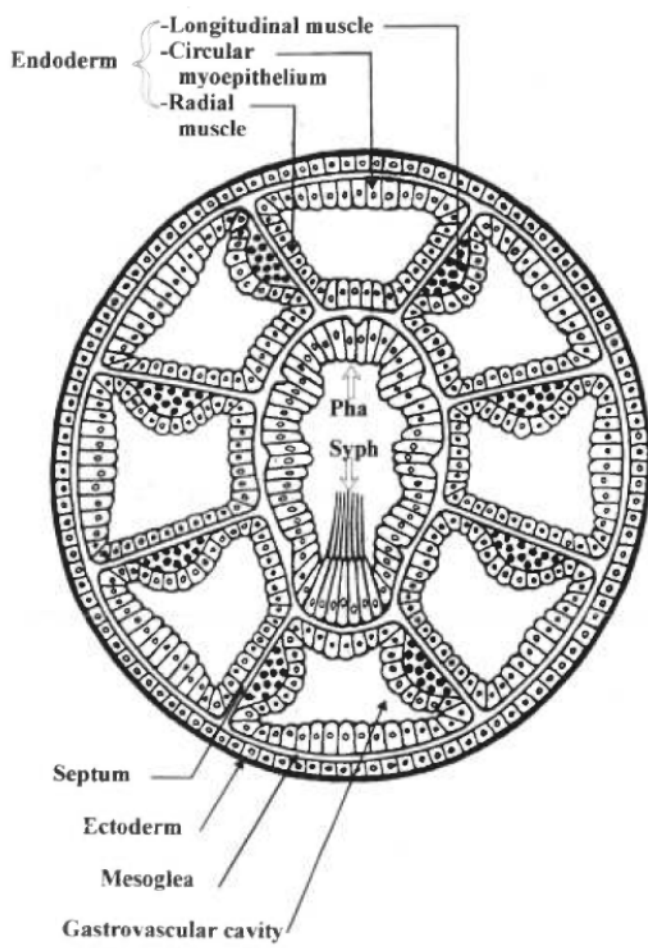
**Figure 2.** Derived rates of [<sup>3</sup>H]5-HT accumulation in sea pansy polyps by uptake<sub>1</sub> and uptake<sub>2</sub> for various concentrations of tracer. The kinetic constants determined from the Lineweaver-Burk plots for the two uptake systems were substituted in the Michaelis-Menten equation to calculate the relative contribution of the two uptake processes. Break in curves corresponds to change of scale on the ordinate.



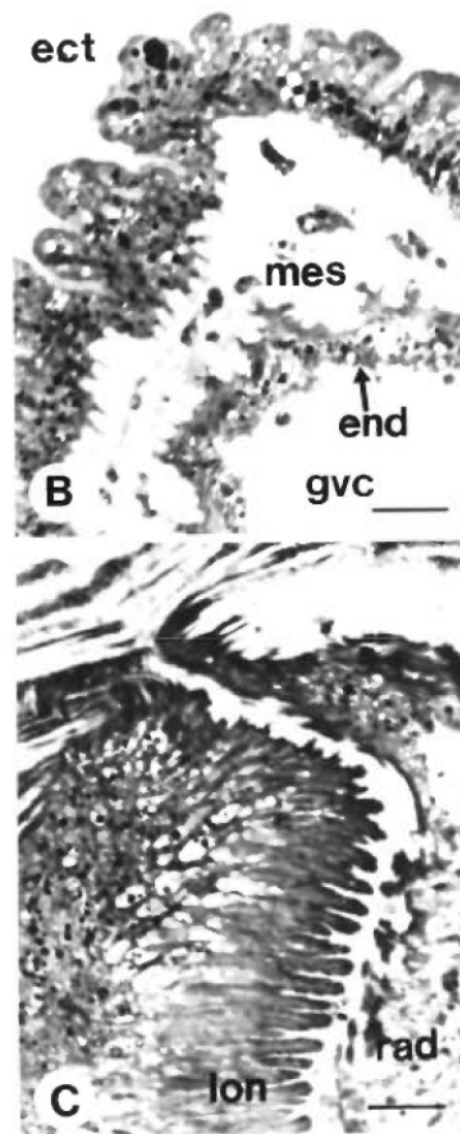
**Figure 3:** Histogram representing the effect of monoamine uptake blockers and cations on total accumulations of [<sup>3</sup>H]5-HT in sea pansy polyps. Accumulations were expressed as percent of controls (mean ± SEM). Tissues were incubated in 0.5 μM of tracer for 30 min. All experimental conditions except calcium-free medium were significantly different from controls at P < 0.05 (Student's t-test).



**Figure 4:** Histological organization of the octocorallian polyp. **A.** Schematic representation of a cross-section through the column of a polyp, highlighting its biradial symmetry defined by the position of the siphonoglyph (syph), a tuft of flagella moving fluids into the lumen of the pharynx (pha). Note that both body wall and pharyngeal wall include ectodermal, mesogleal and endodermal (circular myoepithelium) layers, and that the remaining endoderm bridges the two walls in the form of eight radially oriented septa. The latter are formed by longitudinal (retractor) and radial myoepithelia, separated by a thin mesogleal layer, and they separate eight gastrovascular cavities. Adapted from Pearse et al. (1987). **B.** Photomicrograph of a longitudinal section through the column of a sea pansy autozoid polyp showing the ectoderm (ect), mesoglea (mes) and endoderm (end) of the body wall that encloses one gastrovascular cavity (gvc). **C.** Photomicrograph of a cross-section through the column of a sea pansy autozoid showing a septum with radial (rad) and longitudinal (lon) myoepithelia. Bars = 20  $\mu\text{m}$ .



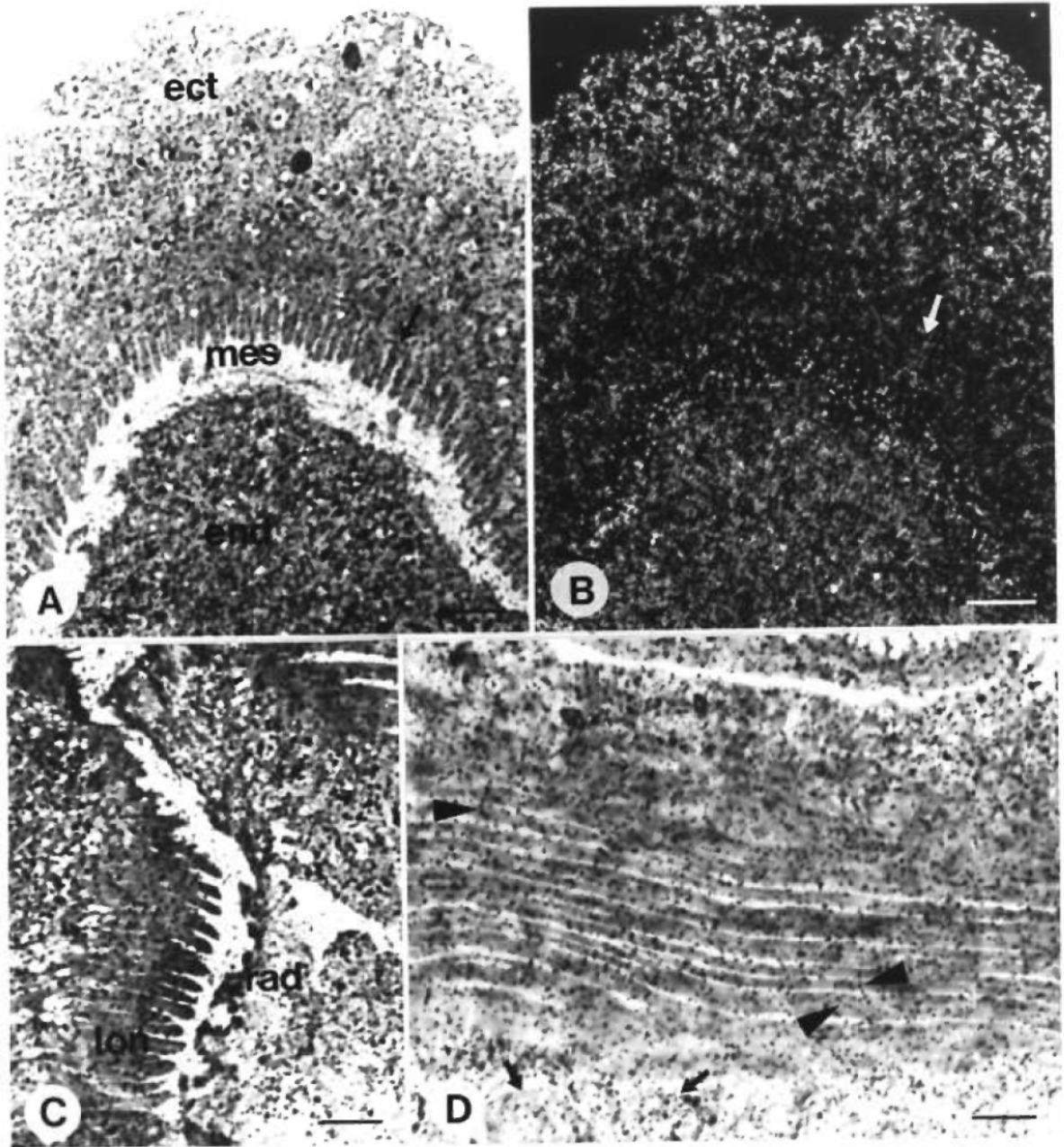
A



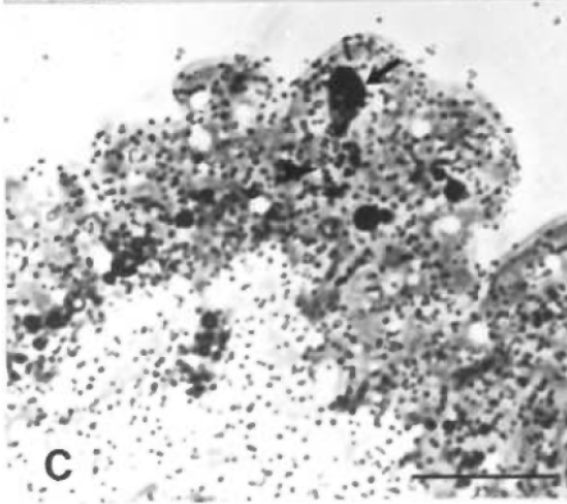
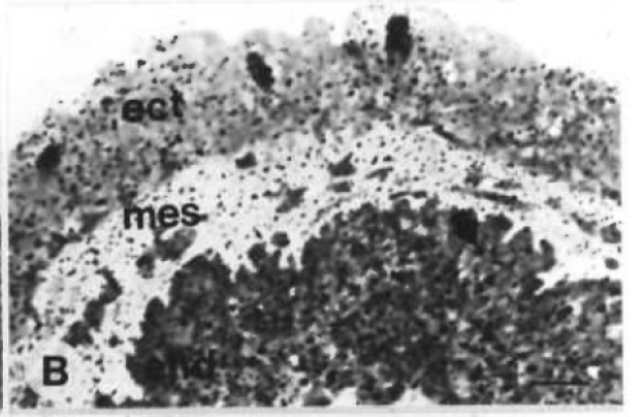
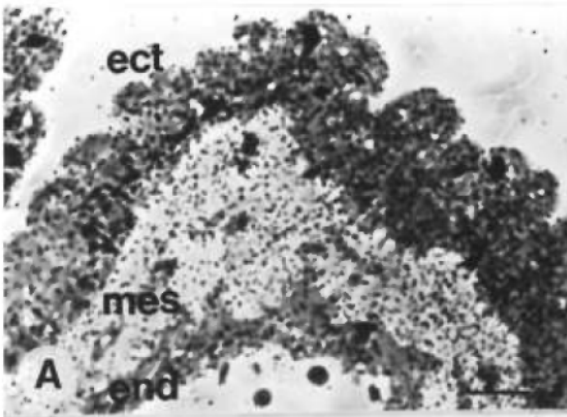
C

**Figure 5.** Light microscopic autoradiograms of uptake sites in sea pansy tentacle (A,B) and polyp column (C,D) incubated in 5  $\mu$ M [ $^3$ H]5-HT. **A,B.** Bright- (A) and dark-field (B) views of autoradiogram of obliquely sectioned tentacle showing the heavier labeling of regular ectoderm (ect) and endoderm (end) compared with the ectodermal muscle layer (arrow) and mesoglea (mes). **C,D.** Autoradiograms of cross- (C) and longitudinal (D) sections through septa showing relatively sparse labelings of longitudinal (lon) and radial (rad) myoepithelia. Note in D the lines of grains crossing over longitudinal muscle processes (arrowheads) and the large cell bodies of longitudinal myoepithelium (arrows). Bars = 20  $\mu$ m.

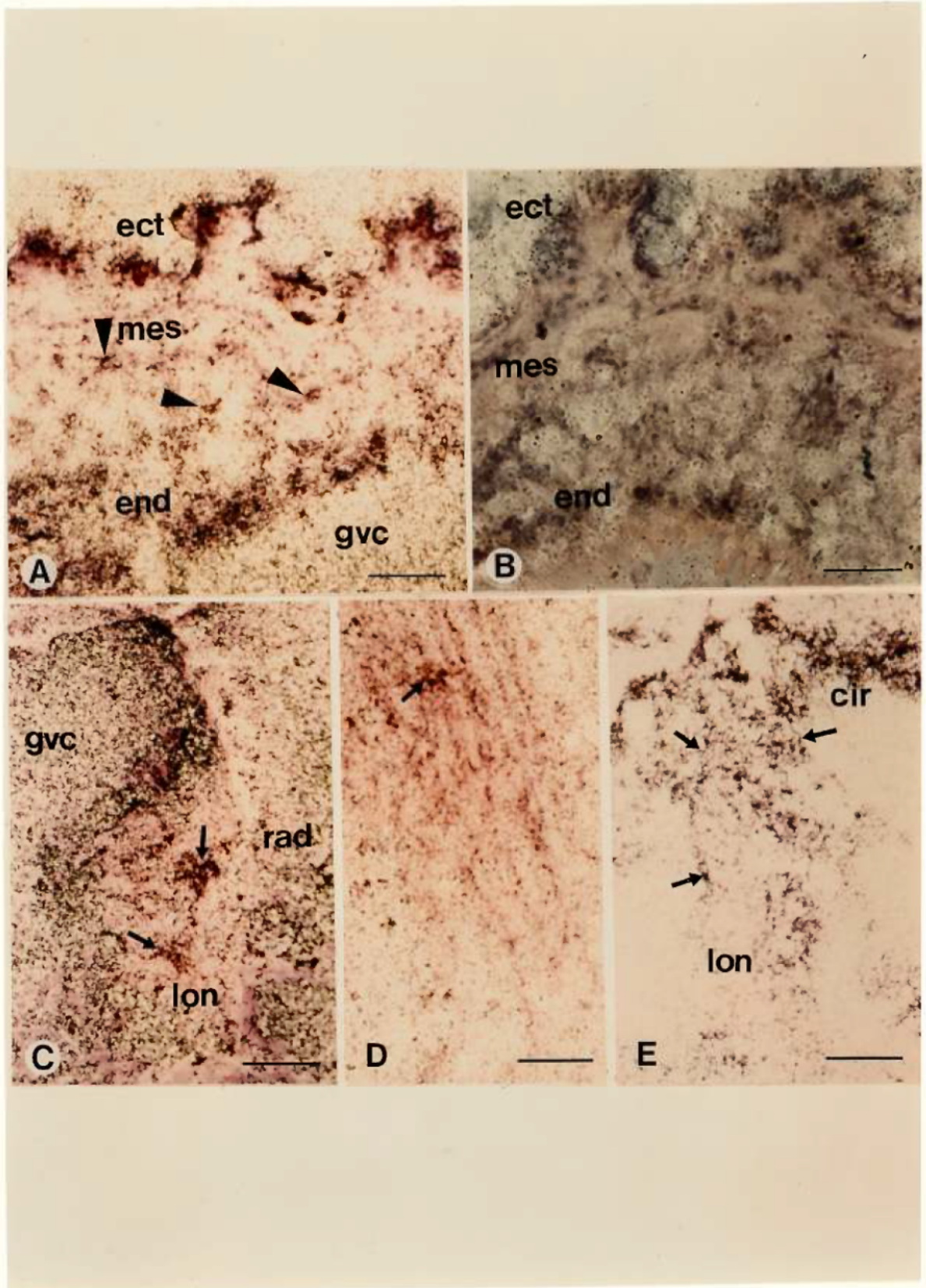




**Figure 6.** Light-microscopic autoradiograms of uptake sites in sea pansy polyps incubated in 5  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]5-HT. **A,B.** Autoradiograms of longitudinal sections of autozooid polyps incubated in tracer without (A) or with 100  $\mu\text{M}$  clomipramine (B). Note the reduced label density in ectoderm (ect), mesoglea (mes) and endoderm (end) of clomipramine-treated polyps compared with control (A). Note also large endogenous granules in endoderm (arrow). **C,D.** Enlarged views of autoradiograms of longitudinal sections of body wall showing sparsely labeled ectodermal neurons (small arrows) with their axonal process (arrowheads) and mesogleal amoebocytes (large arrow). Bars = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 7.** Light-microscopic autoradiograms of binding sites in sea pansy polyp sections incubated in 60 nM [<sup>3</sup>H]5-HT. **A.** Autoradiogram of longitudinal section through body wall showing specific radioligand binding. Note strong labeling at the base of the ectoderm (ect) and in the endoderm (end), and lighter labeling around small neurons of the mesoglea (mes, arrowheads). Apparent labeling in gastrovascular cavity (gvc) and outside tissues is artifact due to unwashable tracer stuck in chromalum gelatin coating used to ensure adhesion of sections on slides. Tissue counterstaining confers a brownish colour reflected on silver grain aggregations. **B.** Autoradiogram of a section adjacent to that in A which has been treated with 10 μM unlabeled 5-HT. Note that labeling largely vanished throughout the body wall layers. **C-E.** Autoradiograms of cross- (C,E) and longitudinal (D) sections through septa, showing numerous small labeled neurons (arrows) similar to those seen in mesoglea. Note that their labeled neuritic processes are especially prominent in E. Bars = 30μm.



**Table 2.** Silver grain densities reflecting uptake in selected tissues of *R. koellikeri* after incubation in [<sup>3</sup>H]-5HT ( $5 \times 10^{-6}$ M) with or without clomipramine ( $10^{-4}$ M)

| Tissue analyzed             | Grain Counts |
|-----------------------------|--------------|
| <u>Without clomipramine</u> |              |
| Polyp column                |              |
| Ectoderm                    | 385±22       |
| Endoderm                    | 407±27       |
| Mesoglea                    | 229±28       |
| Septa                       | 233±14       |
| Longitudinal muscles        | 203±13       |
| Tentacle                    |              |
| Ectoderm                    | 294±19       |
| Ectodermic muscles          | 188±14       |
| Mesoglea                    | 157±13       |
| Endoderm                    | 388±17       |
| <u>With clomipramine</u>    |              |
| Polyp column                |              |
| Ectoderm                    | 206±13       |
| Mesoglea                    | 200±8        |
| Endoderm                    | 206±23       |
| Longitudinal muscle         | 164±22       |

Grain counts per  $1500 \mu\text{m}^2$  represented as means  $\pm$ S.E.M. (n=4 comparable areas in adjacent tissue sections)

### 3.0 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

La rénille est morphologiquement adaptée à vivre dans une zone littorale turbulente, possédant un rachis aplati horizontalement qui offre moins de résistance au courant d'eau. En outre la colonie est ancrée par le pédoncule extensible et flexible qui est le plus large parmi ceux des pennatulacés. On observe aussi des adaptations comportementales pour que la pensée de mer puisse vivre dans cette eau turbulente et maintenir ou non sa position sur le fond si elle cherche à fuir un prédateur ou à se nourrir: changement de la courbure du rachis pour augmenter la résistance et déplacer le rachis comme un voile, péristaltisme du pédoncule pour l'enfoncer dans le sable, changement du degré de dégonflement du rachis en relation inverse avec la vitesse de fluctuation de l'eau, rétraction des polypes (autozoïdes), expulsion de l'eau de la colonie et dégonflement du rachis, péristaltisme balayant le rachis pour dégager les autozoïdes du sable apporté par les courants et qui empêchent les polypes de se nourrir (Kastendiek 1976).

Les contractions rythmiques à la base des ondes péristaltiques constituent donc une activité physiologique importante pour les comportements impliquant le rachis et le pédoncule de la colonie. L'onde péristaltique débute dans la partie distale du pédoncule et s'étend jusqu'à la jonction avec le rachis; cette onde se divise en deux composantes qui se propagent le long du rachis de part et d'autre jusqu'à ce qu'elles se

rencontrent. Le rachis, au passage de cette onde, se fléchit et forme un sillon où le sable peut s'écouler. Ces ondes péristaltiques balayent la colonie à la vitesse de 1 à 1.3 mm/seconde à toutes les 3 à 6 minutes(Parker 1920b).

Cette activité rythmique est modulée par la sérotonine via un mécanisme de transduction faisant intervenir l'AMP cyclique (Anctil,1989). Cette modulation des activités motrices neurales semble être la fonction la plus importante de la 5-HT à travers la phylogénie (Weiger,1997; Harris-Warrick,1988). Ce rôle semble avoir émergé tôt après l'apparition des premiers systèmes nerveux si on en juge par les observations sur la pensée de mer.

D'après l'étude immunohistochimique de Umbriaco et al. (1990), les neurones 5-HT immunoréactifs ectodermiques sont classifiés comme des neurones sensoriels car ils ont un appareil ciliaire apical typique des cellules sensorielles de cnidaires (Peteya 1975). Les neurones 5-HT immunoréactifs de la mésogée peuvent avoir aussi une fonction sensorielle, probablement proprioceptive, à cause de la présence d'un appendice somatique identifié chez l'hydre comme un cil et jouant un rôle sensoriel (Peteya 1975; David 1983). Curieusement, ce type de neurones est absent au niveau de l'endoderme où les cellules musculaires sont localisées.

Anctil (1989) a montré que cette activité modulatrice de la 5-HT est réduite en présence de la réserpine, un bloqueur d'accumulation vésiculaire des monoamines dans les terminaisons neurales. Ceci suggère fortement que la 5-HT détectée biochimiquement par Pani et Anctil (1994a), et visualisée



immunohistochimiquement dans des neurones par Umbriaco et al. (1990) est en fait accumulée dans des vésicules et susceptible d'être libérée d'une façon bien réglée et contrôlée.

La sérotonine libérée par les cellules présynaptiques peut suivre plusieurs voies. Elle peut être inactivée par captage cellulaire à partir de la fente synaptique, suivi ou non par une conversion enzymatique (monoamine oxydases, par exemple). Elle peut aussi diffuser loin de l'aire synaptique (Pentreath et Cottrell 1972). Elle peut se lier à des sites spécifiques postsynaptiques (récepteurs à 5-HT) ou même à des autorécepteurs (Fig B). Pour suivre à la trace ce qu'il advient de la 5-HT libérée et ainsi pouvoir identifier les cibles cellulaires de son action et de son inactivation, il faut localiser ses sites spécifiques de liaison et d'inactivation dans les tissus de la pensée de mer qui sous-tendent son effet sur l'activité rythmique contractile.

La méthode d'incubation avec la sonde radioactive [<sup>3</sup>H]5-HT est suffisante pour mettre en évidence le captage quantitatif. Deux mécanismes semblent être impliqués dans ce processus d'accumulation : (1) transport de 5-HT à travers la membrane neurale et (2) captage et liaison de 5-HT dans les granules d'accumulation et de sécrétion intraneurales (Ross 1980). Pour éviter tout genre d'artefacts dûs aux sous-produits du métabolisme de la 5-HT, des précautions ont été prises et toutes les expériences ont été faites en présence de la pargyline qui est capable d'inhiber l'activité des monoamines oxydases à une concentration  $10^{-6}$  M. De plus, les études de Pani et Anctil 1994, ont révélé la présence de NA-5-HT, mais ce produit apparaissait après une longue durée d'incubation et en très faible quantité.

L'analyse cinétique du captage de [ $^3\text{H}$ ]5-HT montre la présence de 2 composantes, dont l'une (captage 2) manifeste peu de saturation aux concentrations utilisées et correspond probablement en partie à un phénomène de diffusion, tandis que l'autre manifeste une haute affinité avec une constante d'accumulation ( $K_m$ ) de  $4.5 \times 10^{-7} \text{M}$  qui est une valeur proche de celle des systèmes sérotoninergiques des vertébrés et des invertébrés (Shaskan et Snyder 1970; Osborne et al. 1975; Osborne 1982; Ali et Orchard 1996). Le captage est en partie sodium-dépendant comme le sont tous les systèmes de captage sérotoninergique, incluant celui des poissons (LaRivière et Anctil 1984) et des mammifères (Iversen 1974). Ce qui le distingue des systèmes de captage de 5-HT chez la renille est sa sélectivité pharmacologique qui est très semblable à celle des vertébrés (Shaskan et Snyder 1970; Osborne 1982) et qui montre une efficacité décroissante des bloqueurs de captage comme suit: clomipramine  $\gg$  imipramine  $>$  désipramine.

Si on compare le système de captage de 5-HT à d'autres systèmes de captage de la pensée de mer comme ceux de l'adrénaline et de la noradrénaline (Anctil et al., 1984), on s'aperçoit qu'il y a une grande similarité au niveau de la cinétique de la composante à haute affinité (les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  sont presque égales, la valeur de  $K_m \sim 4.5 \times 10^{-7} \text{M}$ ). Toutefois, contrairement au système de captage de 5-HT qui est sodium-dépendant, celui des catécholamines est calcium-dépendant (Anctil et al. 1984). Cette divergence importante pour des membres de la même famille des monoamines demeure inexplicée.

L'étude autoradiographique de l'accumulation de 5-HT montre que la sérotonine tritiée est répandue non spécifiquement dans plusieurs types de cellules de toutes les couches histologiques. Ceci suggère que l'inactivation de la 5-HT est une fonction générale à travers tout le tissu de la pensée de mer, contrairement à la capacité de captage de la sérotonine chez d'autres animaux qui est réservée à des types cellulaires spécifiques (Schich et Weinstein 1981; Yang et al. 1996).

L'autoradiographie des sites de captage de la [<sup>3</sup>H]5-HT montre que la sonde est largement distribuée à travers les différentes couches du tissu mais présente un marquage plus dense dans l'ectoderme et l'endoderme; ce marquage est réduit en présence de la clomipramine mais cette drogue ne modifie pas le patron de distribution diffuse. Les neurones 5-HT immunoréactifs se trouvent au niveau de l'ectoderme et de la mésoglée et sont absents dans l'endoderme (Umbriaco et al. 1990), ce qui démontre une absence au moins partielle de coïncidence entre la distribution des sites de captage de 5-HT et celle des neurones 5-HT-immunoréactifs. En outre l'immunohistochimie avait mis en évidence des neurones bipolaires dans la mésoglée adjacente au myoépithélium circulaire endodermique mais les prolongements neuritiques de ces neurones ne pénètrent pas dans l'endoderme, ce qui suggère que le captage de 5-HT dans l'endoderme est dû à la diffusion de 5-HT libérée à partir des neurones mésogléens voisins.

Cette large distribution de la sonde dans toutes les couches est comparable à celle des sites de liaison, et dans les deux cas le marquage est

plus en relief au niveau ectodermique et endodermique qu'au niveau de la mésoglée. Contrairement aux sites de captage, cependant, la distribution des sites de liaison paraît être associée à des cellules spécifiques qui semblent être des neurones. Cette large distribution de sites de liaison de la 5-HT est similaire à celle observée dans le SNC des invertébrés supérieurs comme les mollusques (Kadan et Hartig 1988) et les insectes (Schmid et al. 1993). On remarque cette distribution vaste et hétérogène même dans le cerveau des mammifères (Pazos et Palacios 1985; Pazos et al. 1985; Biegon et al. 1982; Deshmukh et al. 1983; Marcinkewicz et al. 1994; Palacios et al. 1983).

En présence des deux agonistes identifiés comme étant les plus puissants par Hajj-Ali et Anctil (1997) dans leur étude de radioliation des récepteurs sérotoninergiques, il y a déplacement presque complet de marquage au niveau de toutes les couches tissulaires. Donc notre marquage est très spécifique et donne une idée juste sur la distribution des sites de liaison fonctionnels dans la pensée de mer.

Dans l'ectoderme le marquage montre un chevauchement presque complet entre la localisation des récepteurs à 5-HT et l'innervation sérotoninergique basiectodermique. Comme les prolongements des neurones sérotoninergiques de l'ectoderme s'entrecroisent à ce niveau, la présence de récepteurs à 5-HT à cet endroit suggère que tous ces neurones forment un réseau synaptique et que la sérotonine module l'activité du réseau dont les neurones sérotoninergiques font partie. Le marquage est associé à des corps cellulaires dans la mésoglée ressemblant par leur taille et leur forme aux neurones bipolaires typiques des cnidaires (Saripalli et Westfall 1996).

Puisqu'il n'y a que des amœbocytes en plus des neurones dans la mésoglée (Satterlie et al. 1980) et que les cellules marquées sont trop petites pour être des amœbocytes, il est pratiquement certain que les cellules marquées sont des neurones. Cette association des sites de liaison au plexus nerveux de la mésoglée suggère leur implication dans la modulation des activités du réseau nerveux mésogléen, soit de manière à affecter les comportements coloniaux contrôlés par ce réseau (Satterlie et al. 1980) ou en affectant la conduction dans le réseau mésogléen des signaux transmis par les neurones sérotoninergiques.

D'après le patron de localisation autoradiographique des sites de liaison et particulièrement la dense aggrégation des sites autour des neurones mésogléens près de l'endoderme myoépithélial, et d'après la distribution des chapelets de grains d'argent qui s'apparentent à des neurites innervant les cellules myoépithéliales, on peut maintenant répondre à la question concernant l'action directe ou indirecte de la sérotonine sur les cellules musculaires pour moduler le péristaltisme de la pensée de mer (Anctil 1989). On peut maintenant conclure que l'action de 5-HT sur le péristaltisme s'effectue indirectement, par l'intermédiaire de récepteurs à 5-HT sur des neurones non sérotoninergiques innervant les cellules myoépithéliales. Ces neurones endodermiques non marqués font probablement partie d'un pacemaker des mouvements péristaltiques. L'hypothèse d'un pacemaker neural est soutenue par l'élimination du péristaltisme en présence de chlorure de magnésium (Anctil 1989), un anesthésiant de la neurotransmission chimique chez les Cnidaires (Del Castillo et Engback 1954; Passano 1965; Roberts et Mackie 1980).

Les deux études autoradiographiques des sites de captage et de liaison, nous ont aidés à comprendre le mode de fonctionnement des neurones sérotoninergiques ainsi qu'à identifier les médiateurs cellulaires de la modulation du péristaltisme par la sérotonine chez la pensée de mer. Les observations résultant de ces études (la distribution dans la mésogée et l'ectoderme des neurones 5-HT, la distribution du marquage du captage d'une façon presque égale et la présence des sites de liaison dans des neurones dans les différentes couches) suggèrent la présence d'une transmission volumique (Fuxe et Agnati 1991b) plutôt que conventionnellement synaptique du système sérotoninergique, et que la 5-HT agit comme un neuromodulateur de plusieurs plexus nerveux participant à la génération du programme moteur du péristaltisme.

Il s'agit donc de synapses ouvertes qui diffèrent de la transmission synaptique, laquelle est caractérisée par un canal de transmission singulier dans une région de discontinuité étroite, pas plus large que la fente synaptique et conduisant les signaux rapidement. Par contre, la transmission volumique est caractérisée par la diffusion à partir d'une source cellulaire d'un signal chimique dans le fluide extracellulaire sur une distance plus longue que la fente synaptique (Agnati et al. 1992; Fuxe et Agnati 1991b). La transmission volumique ressemble beaucoup à une transmission endocrine où le neuromodulateur est aussi une neurohormone. Il s'agit donc d'une fuite du signal chimique hors du site de sécrétion, d'une conduction d'information lente et d'une action à long terme (Olson et al. 1991; Grimaldi et al. 1991); ce type de transmission peut être démontré par des méthodes de

neuroanatomie fonctionnelle comme la localisation des sites de captage et de liaison du transmetteur (Zoli et Agnati 1996).

Plusieurs études sur le système nerveux central des mammifères ont été faites pour finalement aboutir à l'hypothèse d'une transmission par diffusion (Bach y Rita 1993; Bach y Rita 1994; Beaudet et Descarries 1976). Subséquemment les études d'Agnatti et al. (1986,1990,1995) ont soutenu cette hypothèse et même l'existence de transmissions doubles en changeant la quantité de transmetteur libérée et en montrant que la même synapse qui contient plusieurs transmetteurs peut fonctionner comme une synapse ouverte pour un transmetteur et une synapse fermée pour un autre (Zoli et Agnati 1996; Fuxe et Agnati 1991).

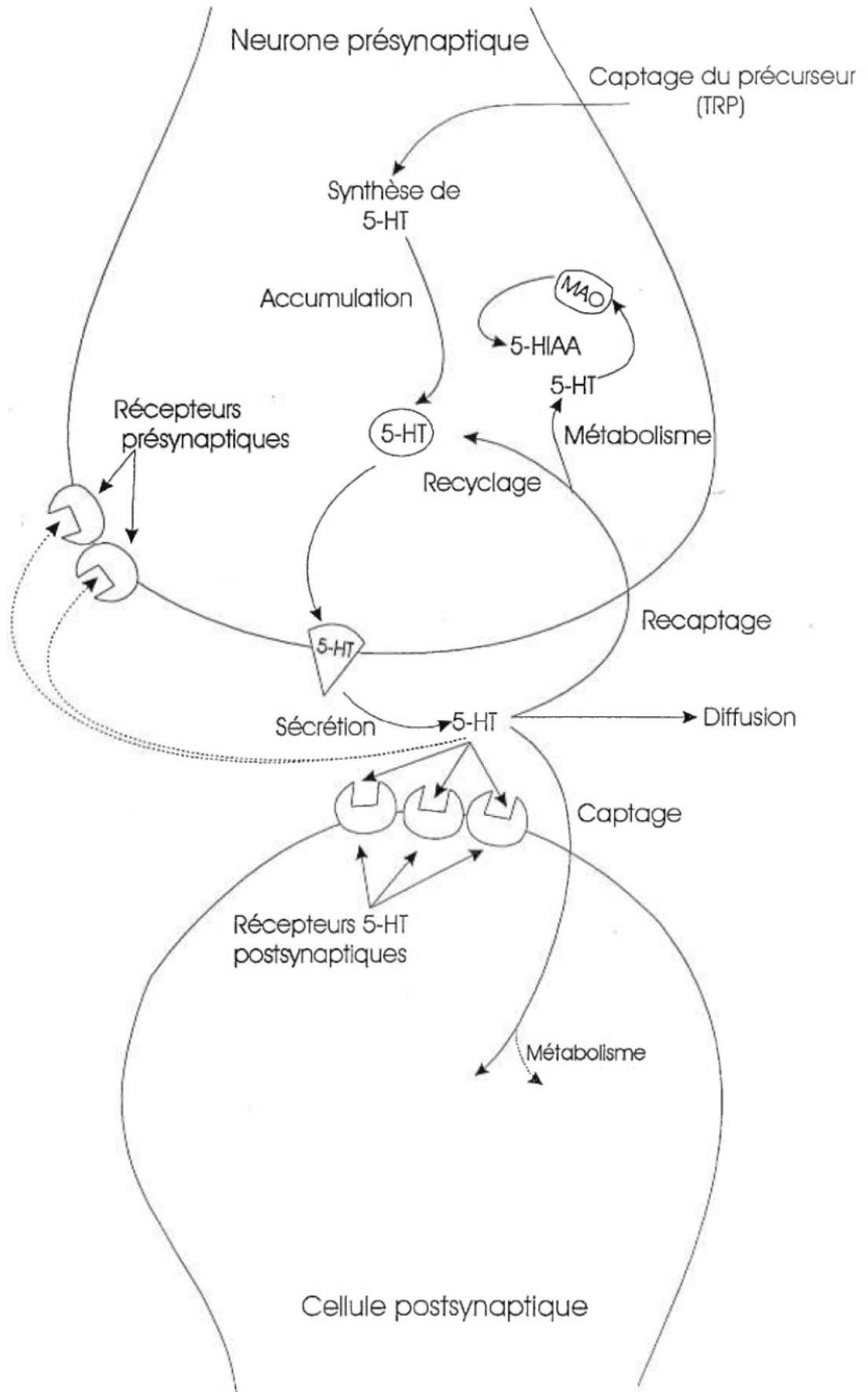
Dans le système de transmission volumique, n'importe quelle cellule présente dans le tissu peut être cible de cette transmission. Dans le système nerveux central, les astroglies sont connues pour avoir des récepteurs couplés à la protéine G avec une haute affinité pour les monoamines (pour revue, voir Hansson 1991; Hölsi et Hölsi 1993; Shao et al. 1994) et l'activation de ces récepteurs peut conduire au changement dans la forme cellulaire (Narumi et al. 1978), à la régulation du métabolisme énergétique (Hölsi et Hölsi 1993; Magistretti et al. 1993; Stone et Ariano 1989), à la stimulation de la libération et au captage du transmetteur (Hansson 1991; Stone et Ariano 1989)... Donc les monoamines peuvent indirectement influencer plusieurs fonctions neurales via des signaux d'origine astrogliale.

En outre, des études au microscope électronique montrant la localisation synaptique des récepteurs (Hunt et Schmidt 1978; Kuhar et al. 1981; Möhler et al. 1981) ont été suivies par d'autres études infirmant cette localisation synaptique. Cependant, l'utilisation d'un radioligand pour localiser les récepteurs au niveau ultrastructural est controversée si on veut s'en servir pour montrer une distribution synaptique versus volumique, car la résolution du signal est limitée par la dispersion de la radiation (Kuhar et al. 1986).

Nos résultats sont donc compatibles avec l'hypothèse que la sérotonine agit comme une neurohormone diffusant dans un grand rayon d'action à travers plusieurs couches tissulaires de la pensée de mer. Ces résultats sont aussi compatibles avec l'idée que la sérotonine est un neuromodulateur chez la pensée de mer, n'agissant que sur des cellules nerveuses. Ces deux attributs étant présents dans tous les métazoaires possédant des systèmes sérotoninergiques, incluant les mammifères, on peut conclure qu'ils ont été bien conservés au cours de l'évolution. Il reste cependant à donner encore plus de poids à ces hypothèses en examinant l'organisation des terminaisons neuritiques des neurones sérotoninergiques de la pensée de mer par immunocytochimie en microscopie électronique, afin de déterminer si elles sont organisées ou non pour la neurosécrétion et pour la transmission volumique.



**Figure B:** Illustration schématique des mécanismes de synthèse, d'activation et d'inactivation impliqués dans la neurotransmission sérotoninergique (TRP: tryptophane, 5-HT: sérotonine, 5-HIAA: acide 5-hydroxyindoleacétique, MAO: monoamine oxidase); les flèches pointillées représentent la liaison de la sérotonine libérée aux autorécepteurs.



## **BIBLIOGRAPHIE (INTRODUCTION ET DISCUSSION)**

Agnati, L. F., K. Fuxe, M. Zoli, E. Merlo Pich, F. Benfenati, I. Zini et M. Goldstein (1986) Aspects on the information handling by the central nervous system: focus on cotransmission in the aged rat brain. *Prog. Brain Res.* 68: 291-301.

Agnati, L. F., M. Zoli, E. Merlo Pich, F. Benfenati et K. Fuxe (1990) Aspects of neural plasticity in the central nervous system. VII. Theoretical aspects of brain communication and computation. *Neurochem. Int.* 16: 479-500.

Agnati, L. F., B. Bjelke et K. Fuxe (1992) Volume transmission in the brain. Do brain cells communicate solely through synapses? A new theory proposes that information also flows in the extracellular space. *Am. Sci.* 80: 362-374.

Agnati, L. F., M. Zoli, I. Strömberg et K. Fuxe (1995) Intracellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69: 711-726.

Ali, D. W. et I. Ochard (1996) The uptake and release of serotonin and dopamine associated with locust (*Locusta migratoria*) salivary glands. *J. Exp. Biol.* 199: 699-709.

- Amin, A. H., T. B. B. Crawford et J. K. Gaddum (1954) The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J. Physiol. (London)* 126: 596-618.
- Ancil, M. (1987) Bioactivity of FMRFamide and related peptides on a contractile system of the coelenterate *Renilla köllikeri*. *J. Comp. Physiol. B* 157: 31-38.
- Ancil, M. (1989) Modulation of a rhythmic activity by serotonin via cyclic AMP in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Physiol. B* 159: 491-500.
- Ancil, M. et C. J. P. Grimmelikhuijzen (1989) Excitatory action of the native neuropeptide Antho-RFamide on muscles in the pennatulid *Renilla köllikeri*. *Gen. Pharmac.* 20: 381-384.
- Ancil, M. et C. Ngo Minh (1997) Neuronal and nonneuronal taurine-like immunoreactivity in the sea pansy, *Renilla koellikeri* (Cnidarian, Anthozoa). *Cell Tissue Res.* 288: 127-134.
- Ancil, M., D. Boulay, et L. Larivière (1982) Monoaminergic mechanisms associated with control of luminescence and contractile activities in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Zool.* 223: 11-24.

- Anctil, M., G. Germain et L. Larivière (1984) Catecholamines in the coelenterate *Renilla koellikeri*. Uptake and radioautographic localization. *Cell Tiss. Res.* 238: 69-80.
- Anctil, M., A. K. Pani et M. A. Ali (1991) Modulation of rhythmic contractions by melatonin via cyclic GMP in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Physiol. B* 161: 569-575.
- Anderson, P. A. V. et J. F. Case (1975) Electrical activity associate with luminescence and other colonial behaviour in the pennatulid *Renilla koellikeri*. *Biol. Bull.* 149:80-95.
- Anderson, P. A. V. et G. O. Mackie (1977) Electrical coupled, photosensitive neurons control swimming in a jellyfish. *Science* 197: 186-188.
- Anderson, P. A. V. et W. E. Schwab (1981) The organization and structure of nerve and muscle in the jellyfish *Cyanea capillata* (Coelenterata:Scyphosoa). *J. Morphol.* 170: 383-399.
- Anderson, P. A. V. et W. E. Schwab (1982) Recent advances and model systems in Coelenterate neurobiology. *Progr. Neurobiol.* 19: 213-236.
- Anderson, P. A. V. et A. N. Spencer (1989) The importance of cnidarian synapses for neurobiology. *J. Neurobiol.* 20: 435-457.

- Avery, L. et H. R. Horvitz (1990) Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. J. Exp. Zool. 253: 263-270.
- Awad, E. W. et M. Anctil (1993a) Identification of Beta-like adrenoceptors associated with bioluminescence in the sea pansy *Renilla koellikeri*. J. Exp. Biol. 182: 131-146.
- Awad, E. W. et M. Anctil (1993b) Positive coupling of beta-like adrenergic receptors with adenylate cyclase in the cnidarian *Renilla koellikeri*. J. Exp. Biol. 182: 131-146.
- Awad, E. W. et M. Anctil (1994) Distribution of  $\beta_2$ -like adrenergic receptors in the cnidarian *Renilla koellikeri* as revealed by autoradiography and in situ hybridization. Cell Tissue Res. 278: 207-215.
- Bach Y, R. P. (1993) Neurotransmission in the brain by diffusion through the extracellular fluid: a review. Neuroreport 4: 343-350.
- Bach Y, R. P. (1994) The brain beyond the synapse: a review. Neuroreport 5: 1553-1557.
- Battelle, B. A. et E. A. Kravitz (1978) Targets of octopamine action in the lobster: Cyclic nucleotide changes and physiological effects in

hemolymph, heart and exoskeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205: 438-481.

Beaudet, A. et L. Descarries (1976) Quantitative data on serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res.* 11: 301-309.

Beaudet, A. et L. Descarries (1978) The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and non-synaptic axon terminals. *Neuroscience* 3: 851-860.

Bell, C. (1983) Problems and ambiguities in the identification of autonomic neurotransmitters. *J. Auto. Nerv. Syst.* 8: 79-87.

Biegon, A., T. Rainbow, J. Mann et B. McEwen (1982) Neurotransmitter receptor sites in human hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* 247: 379-382.

Blier, P. et C. De Montigny (1994) Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 220-226.

Bloom, F. E., B. J. Hoffer, G. R. Siggins, J. L. Barker et R. A. Nicoll (1972) Effects of serotonin on central neurons: Microiontophoretic administration. *Fed. Proc.* 31(1): 97-106.

- Bolliet, V. et M. A. Ali (1992) Immunocytochemical study of the development of serotonergic neurons in the brain of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Brain Behaviour and Evolution* 40: 234-249.
- Bolliet, V., S. Perreault et M. A. Ali (1994) Development of serotonergic neurons in the brain of the mackerel, *Scomber scombrus*. An immunohistochemical study. *J. Fish Biol.* 44: 241-253.
- Braak, H. (1970) Biogenic amines in *Rana esculenta*. *Z. Zellforsch.* 106: 269-308.
- Braak, H., H. G. Baumgarten et B. Falck (1968) 5-Hydroxytryptamine in *Lacerta viridis* and *Lacerta muralis*. *Z. Zellforsch.* 90: 161-185.
- Brafield, A. E. et G. Chapman (1967) The respiration of *Pteroides griseum*. *J. Exp.Biol.* 46: 97-104.
- Brodie, T. G. (1900) The immediate action of an intravenous injection of blood serum. *J. Physiol.* 26: 48-71.
- Buchanan, C. A. et A. O. W. Stretton (1991) The effects of biogenic amines on *Ascaris* locomotion. *Soc. Neurosci. Abstr.* 17: 279.
- Buck, J. (1973) Bioluminescence behaviour in *Renilla*. I. Colonial responses. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole* 144: 19-42.



- Carlberg, M. et M. Anctil (1993) Biogenic amines in coelenterates. *Comp. Biochem. Physiol.* 106 C (1): 1-9.
- Carlberg, M. et E. Rosengren (1985) Biochemical basis for adrenergic neurotransmission in coelenterates. *J. Comp. Physiol. B* 155: 251-255.
- Case, J. F. et J. Morin (1966) Glutamate suppression of neuroeffector processes in coelenterates. *Amer. Zool.* 6: 525.
- Castano, P. et S. Rossi (1978) Cytochemical, ultrastructure and fluorescence study of the nervous net of *Hydra sp.* *J. Submicr. Cytol.* 10: 381-395.
- Chapman, D. M. (1974) Cnidarian histology. In: *Coelenterate biology*. L. Muscatine et H. M. Lenhoff (eds). Reviews and perspectives. New York: Academic Press, pp. 1-92.
- Chase, T. N., G. R. Breese, D. O. Carpenter, S. M. Schanberg et I. Kopin (1968) Stimulation-induced release of serotonin. *J. Adv. Pharmac.* 6A: 351-364.
- Cobb, J. L. S. et V. W. Pentreath (1978) Comparison of the morphology of synapses in invertebrate and vertebrate nervous systems: analysis of the significance of the anatomical differences and interpretation of the morphological specializations. *Prog. Neurobiol.* 10: 231-252.

- Colwell, C. S. (1990) Light and serotonin interact in affecting the circadian system of *Aplysia*. *J. Comp. Physiol. A* 167: 841-845.
- Coppen, A. J. et D. P. Doogan (1988) Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. *J. Clin. Psychiatry* 49: S4-S11.
- Cottrell, G. A. et N. N. Osborne (1970) Subcellular localization of serotonin in an identified serotonin neuron. *Nature*, 225: 470-472.
- Croll, N. A. (1975) Indolealkylamines and nematode behavior. *Can. J. Zool.* 53: 894-903.
- Csaba, G. (1981) Ontogeny and phylogeny of hormone receptors. In: *Monographs in developmental Biology*. A. Wolsky, B. M. Carlson, P. S. Chen, T. A. Dettlaff, G. Reverberi and J. G. Scandalios (Eds), V.15, Karger, New York.
- Cummings, J. P. et D. L. Felten (1979) A raphe dendrite bundle in the rabbit medulla. *J. Comp. Neurol.* 183: 1-24.
- Dalhström, A. et K. Fuxe (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta. Physiol. Scand.* 62 (suppl.232) : 1-55.
- David, C. N. (1983) Stem cell proliferation and differentiation in *Hydra*. In:

C. S. Potten (ed): Stem Cells, their identification and characterization. Edinburgh, London, Melbourne, and New York: Churchill Livingstone, pp. 12-27.

Del Castillo, J. et L. Engbaek (1954) The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J. Physiol. (Lond.)* 124: 370-384.

Delgado, P. L., D. S. Charney, L. H. Price, G. K. Aghajanian, H. Landis et G. R. Heninger (1990) Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. *Arch. Gen. Psychiatry* 47: 411-418.

Deshmukh, P., H. Yamamura, L. Woods et D. Nelson (1983) Computer-assisted autoradiographic localization of subtypes of serotonin<sub>1</sub> receptors in rat brain. *Brain Res.* 288: 338-343.

Drummond, A. H., F. Bucher et I. B. Levitan (1980) [<sup>3</sup>H]Lysergic Acid Diethylamide binding to serotonin receptors in the molluscan nervous system. *J. Biol. Chem.* 255: 6679-6686.

Dunkelburger, DG. et N. Watabe (1974) An ultrastructural study on spicule formation in the pennatulid colony *Renilla reniformis*. *Tissue Cell* 6: 573-586.

Elofsson, R. et M. Carlberg (1989) Gland cells in tentacles of the jelly fish *Cyanea lamarcki* reactive with an antibody against 5-hydroxytryptamine. *Cell Tiss. Res.* 255: 419-422.

- Erspamer, V. (1954) Pharmacology of indole alkylamines. *Pharmacol. Rev.* 6: 425-487.
- Evans, P. D. et P. M. Fox (1975) Enzymatic N-acetylation of indolekylamines by brain homogenates of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect. Physiol.* 21: 343-353.
- Falck, B., N. A. Hillarp, G. Thieme et A. Thorp (1962) Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formalehyde. *J. Histochem. Cytochem.* 10: 348-354.
- Farrow, J. T. et H. Van Vumakis (1972) Binding of d-lysergic acid diethylamide to subcellular fractions from rat brain. *Nature* 237: 164-166.
- Fasulo, S., G. Tagliafierro, A. Contini, L. Ainis, M. B. Ricca, N. Yanaihara et G. Zaccone (1993) Ectopic expression of bioactive peptides and serotonin in the Sacciform gland cells of Teleost skin. *Arch. Histol. Cytol.* 56 (2): 117-125.
- Fillenz, M. (1990) Noradrenaline synthesis and metabolism. In : *Noradrenergic neurons*. Ed. M. Fillenz. Chap.(5). Cambridge University Press, United states of America.

Fillion, G. (1985) Les récepteurs centraux de la sérotonine. *Path. Biol.* 33 (4): 221-226.

Fuxe, K. et L. F. Agnati (Eds) (1991a) Volume transmission in the brain. Novel mechanisms for neural transmission. In: Volume transmission in the brain. Novel mechanisms for neural transmission. *Advances in neuroscience Vol. 1.* Raven Press: New York.

Fuxe, K. et L. F. Agnati (1991b) Two principal modes of electrochemical communication in the brain: Volume versus wiring transmission. In: Volume transmission in the brain. Novel mechanisms for neural transmission. *Advances in Neuroscience Vol. 1*, pp. 1-9. Eds. K. Fuxe and L. F. Agnati. Raven Press: New York.

Gaddum, J. H. et Z. P. Picarelli (1957) Two kinds of tryptamine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 12: 323-328.

Gerschenfeld, H. M. et D. Paupardin-Tritsch (1974) Ionic mechanisms and receptor properties underlying the responses of molluscan neurones to 5-hydroxytryptamine. *J. Physiol. (Lond.)* 243: 427-456.

Graeff, F. G., F. S. Guimaraes, T. G. C. S. De Andrade et J. F. W. Deaken (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54 (1): 129-141.

- Grahame-Smith, D. G. (1988) Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT). *Quarterly J. Med.* 67 (254): 459-466.
- Grimaldi, R., I. Zini, M. Zoli, E. Merlo Pich, F. Ferraguti, P. Davalli, A. Toffano. K. Fuxe et L. F. Agnati (1991) Neuron-Astroglia interactions in physiopathological conditions: Possible role of volume transmission. In: *Volume transmission in the brain. Novel mechanisms for neural transmission. Advances in Neuroscience Vol. 1*, pp.247-256. Eds. K. Fuxe and L. F. Agnati. Raven Press: New York.
- Grimmelikhuijzen, C. J. P. et A. Groeger (1987) Isolation of the neuropeptide pGlu- Gly-Arg-Phe-amide from the pennatulid *Renilla koellikeri*. *FEBS. Lett.* 211: 105-108.
- Hajj-Ali, I. et M., Anctil (1997) Characterization of a serotonin receptor in the cnidarian *Renilla koellikeri*: a radiobinding analysis. *Neurochem. Int.* 31: 83-93.
- Hansson, E. (1991) Transmitter receptors on astroglial cells. In: *Volume transmission in the brain. Novel mechanisms for neural transmission. Advances in Neuroscience Vol. 1*, pp.257-265. Eds. K. Fuxe and L. F. Agnati. Raven Press: New York.
- Harris-Warrick, R. M. (1988) Chemical modulation of central pattern generators. In: *Neural Control of Rhythmic Movements* (eds. A. H. Cohen, S. Rossignol and S. Grillner), Wiley, New York, 285-331.

- Hartline, D. K. (1979) Integrative neurophysiology of the lobster cardiac ganglion. *Am. Zoo.* 19: 53-65.
- Heils, A., A. Teufel, S. Petri, G. Stober, P. Riederer, D. Bengel et K. P. Lesch (1996) Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J. Neurochem.* 66 (6): 2621-2624.
- Hen, R. (1992) Of mice and flies: commonalities among 5HT receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 160-165.
- Herkenham, M. (1991) Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations: Implications for endocrine functions in brain. In: *Volume transmission in the brain. Novel mechanisms for neural transmission. Advances in Neuroscience Vol. 1*, pp.63-87. Eds. K. Fuxe and L. F. Agnati. Raven Press: New York.
- Hillman, G. R. (1983) The neuropharmacology of schistosomes. *Pharmac. Ther.* 22: 103-115.
- Hiripi, L. et R. G. H. Downer (1993) Characterization of serotonin binding sites in insect (*Locusta migratoria*) brain. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23 (2): 303-307.

- Hölsi, E. et L. Hölsi (1993) Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 40: 477-506.
- Horridge, G. A. et B. Mackay (1962) Naked axons and symmetrical synapses in coelenterates. *Q. J. Microsc. Sci.* 105: 531-541.
- Horridge, G. A., D. M. Chapman et B. Mackay (1962) Naked axons and symmetrical synapses in an elementary nervous system. *Nature.* 193: 899-900.
- Horvitz, H. R., M. Chalfie, C. Trent, J. E. Sulston et P. D. Evans (1982) Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 216: 1012-1014.
- Hoyer, D., D. E. Clake, J. R. Fozard, P. R. Hartig, G. R. Martin, E. J. Mylecharane, P. R. Saxena et P. A. Humphrey (1994) VII. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacological reviews.* 46 (2): 157-203.
- Huber, R. et E. A. Kravitz (1995) A quantitative analysis of agonistic behavior in juvenila american lobsters (*Homarus americanus* L.). *Brain, Behavior and Evolution* 46: 72-83.



- Hunt, S. P. et J. Schmidt (1978) The electron microscopic autoradiographic localization of  $\alpha$ -bungaro-toxin binding sites within the central nervous system of the rat. *Brain Res.* 142: 152-159.
- Hyman, L. H. (1940) *The invertebrates. Protozoa through Ctenophora* Vol. 1. New York: McGraw-Hill, pp. 365-696.
- Iversen, L. L. (1974) Commentary. Uptake mechanisms for neurotransmitter amines. *Biochem. Pharmacol.* 23: 1927-1935.
- Jacklet, J. W. (1991) Photoresponsiveness of *Aplysia* eye is modulated by ocular circadian pace-maker and serotonin. *Biol. Bull.* 180: 284-294.
- Jha, R. K. et G. O. Mackie (1967) The recognition, distribution and ultrastructure of hydrozoan nerve elements. *J. Morphol.* 123: 43-62.
- Johnson, C. D., C. A. Reinitz, P. Sithigorngul et A. O. W. Stretton (1996) Neuronal localization of serotonin in the nematode *Ascaris suum*. *J. Comp. Neurol.* 367: 352-360.
- Johnston, S. A., L. Maler et B. Tinner (1990) the distribution of 5-HT in the brain of *Apterionotus leptorhynchus*: an immunocytochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* 3: 429-465.

- Kadan, M. J. et P. R. Hartig (1988) Autoradiographic localization and characterization of [<sup>125</sup>I]-LSD binding to serotonin receptors in *Aplysia*. *Neuroscience* 24: 1089-1102.
- Kastendiek, J. (1975) The role of behaviour and interspecific interactions in determining the distribution and abundance of *Renilla koellikeri* pfeffer, a member of subtidal sand bottom community. Thèse de doctorat, Université de Californie à Los Angeles.
- Kastendiek, J. (1976) Behaviour of the sea pansy *Renilla koellikeri* Pfeffer (Coelenterata: Pennatulacea) and its influence on the distribution and biological interactions of the species. *Biol. Bull.* 151: 518-537.
- Kinnamon, J. C. et J. A. Westfall (1982) Type of neurons and synaptic connections at hypostome-tentacle junctions in *Hydra*. *J. Morphol.* 173: 119-128.
- Kline, E. S. et H. Weissbach (1965) Hydroxyindolamines in the nematocyst of *Hydra littoralis*. *Life Sci.* 4: 63-67.
- Kravitz, E. A. (1988) Hormonal control of behavior: amines and the biasing of behavioral output in lobsters. *Science* 241: 1775-1781.
- Kuhar, M. J., N. Taylor, J. K. Wamsley, E. C. Hulme et N. J. M. Birdsall (1981) Muscarinic cholinergic receptor localization in brain by electron microscopic autoradiography. *Brain. Res.* 216: 1-10.

- Kuhar, M. J., E. B. DeSouza et J. R. Unnerstall (1986) Neurotransmitter receptor mapping by autoradiography and other methods. *Annu. Rev. Neurosci.* 9: 27-59.
- LaRivière, L. et M. Anctil (1984) Uptake and release of [<sup>3</sup>H]-serotonin in photophores of the midshipman fish, *Porichthys notatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 78C (1): 231-239.
- Leake, L. D. (1986) *Leech* Retzius cells and 5-HT, minireview. *Comp. Biochem. Physiol.* 83C: 229-239.
- Léger, L., L. Wiklund, L. Descarries et M. Person (1979) Description of an indolaminergic cell component in the cat *Locus coeruleus*: A fluorescence histochemical and radioautographic study. *Brain Res.* 168: 43-56.
- Lent, C. M. (1985) Serotonergic modulation of the feeding behavior of the medicinal *leech*. *Brain Res. Bull.* 14: 643-655.
- Livingstone, M. et B. Tempel (1983) Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. *Nature* 303:67-70.
- Loer, C. M. et C. J. Kenyon (1993) Serotonin-deficient mutants and male mating behavior in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 13: 5407-5417.

- Lyke, E. B. (1965) The histology of the sea pansies *Renilla reniformis* (Pallas) and *Renilla koellikeri* (Pfeffer) with a note on the fine structure of the latter species. Thèse de doctorat, Université de Wisconsin.
- Magistretti, P. J., O. Sorg, N. C. Yu, J. L. Martin et L. Pellerin (1993) Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes. Implications for the metabolic trafficking between neural cells. *Develop. Neurosci.* 15: 306-312.
- Mansour, T. E. (1979) Chemotherapy of parasitic worms: new biochemical strategies. *Science* 205: 462-469.
- Mansour, T. (1984) Serotonin receptors in parasitic worms. *Adv. Parasitol.* 23: 1-36.
- Marcinkiewicz, M., D. Verge, H. Gozlan, L. Pichat et M. Hamon (1984) Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT<sub>1</sub> sites in the rat brain. *Brain Res.* 291: 159-163.
- Martin, S. M. et A. N. Spencer (1983) Neurotransmitters in coelenterates. *Comp. Biochem. Physiol.* 74C: 1-14.

- Mathias, A. P., D. M. Ross et M. Schachter (1960) The distribution of 5-hydroxytryptamine, tetramethylammonium, homarine and other substances in the sea anemones. *J. Physiol.* 151: 296-311.
- McCall, R. B. et G. K. Aghajanian (1979) Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Res.* 169: 11-27.
- McCaman, M. W. (1984) Neurochemistry of invertebrates. In A. Lajtha (ed) *Handbook of Neurochemistry: Vol: 7. Structural Elements of the nervous system*, 2nd ed. New York: Plenum Press, pp. 613-700.
- McFarlane, I. D. (1973) Spontaneous contractions and nerve net activity in the sea anemone *Calliactis parasitica*. *Mar. Behav. Physiol.* 2: 97-113.
- McFarlane, I. D. (1974) Excitatory and inhibitory control of inherent contractions in the sea anemone *Calliactis parasitica*. *J. Exp. Biol.* 60: 397-422.
- Meltzer, H. Y. et M. T. Lowy (1987) The serotonin hypothesis of depression. In *Psychopharmacology: The third generation of progress*, ed. by H. Y. Meltzer, pp. 513-526, Raven Press, New York.
- Miron, M-J. (1987) Démonstration immunohistochimique de systèmes monoaminergiques dans des élytres lumineux et le système nerveux du

ver polychète *Harmothoe imbricata*. Mémoire de Maîtrise, Université de Montréal, Montréal.

Miron, M-J. et M. Anctil (1988) 5HT-like immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of the scale worm *Harmothoe imbricata* (Polychaeta). *J. Comp. Neurol.* 275: 429-440.

Möhler, H., J. G. Richards et J-Y. Wu (1981) Autoradiographic localization of benzodiazepine receptors in immunocytochemically identified  $\gamma$ -aminobutyrgic synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1935-1938.

Müller, E. E., G. Nisticò et U. Scapagnini (1977) « Brain Neurotransmitters and Anterior Pituitary Function ». Academic Press, New York.

Müller, E. E. et G. Nisticò (1989) Neurotransmitters, neuromodulators and neuromediators. V. Serotonin. In. *Brain Messengers and The Pituitary*. pp. 88- 107. Eds. E.E. Müller and G. Nisticò. Academic Press, New York.

Narumi, S., H. K. Kimelberg et R. S. Bourke (1978) Effects of norepinephrine on the morphology and some enzyme activities of primary monolayer cultures from the rat brain. *J. Neurochem.* 31: 1479-1490.

- Nassel, D. R. (1988) Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. *Prog. Neurobiol.* 30: 1-85.
- Nicol, J. A. C. (1955) Nervous regulation of luminescence in the sea pansy *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Biol.* 32: 619-635.
- Norris, D. O. (1997) An overview of chemical regulation. In: *Vertebrate endocrinology*. 3rd ed, Chap. 1. Ed. D. O. Norris. Academic Press, United States of America.
- Olson, L., L. O. Boreus et A. Seiger (1973) Histochemical demonstration and mapping of 5-hydroxytryptamine and catecholamin-containing neurons systems in human fetal brain. *Z. Anat. Entwickl-Gesch.* 139: 259-282.
- Olson, L., C. Wetmore, I. Strömberg et T. Ebendal (1991) Endogenous and exogenous nerve growth factor in the central nervous system. In: *Volume transmission in the brain. Novel mechanisms for neural transmission*. *Advances in Neuroscience Vol. 1*, pp.455-462. Eds. K. Fuxe and L. F. Agnati. Raven Press: New York.
- Osborne, N. N. (1982) Uptake, localization and release of serotonin in the chick retina. *J. Physiol. (Lond.)* 331: 469-479.

- Osborne, N. N., L. Hiripi et V. Neuhoff (1975) The in vitro uptake of biogenic amines by snail (*Helix pomatia*) nervous tissue. *Biochem.Pharmacol.* 24: 2141-2148.
- Palacios, J. M., A. Probst et R. Cortes (1983) The distribution of serotonin receptors in the human brain: high density of [<sup>3</sup>H]LSD binding sites in the raphe nuclei of the brainstem. *Brain Res.* 274: 150-155.
- Pani, A. K. et M. Anctil (1994a) Quantitative survey of biogenic monoamines, their precursors and metabolites in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *Biogenic amines.* 10 (2); 161-180.
- Pani, A. K. et M. Anctil (1994b) Evidence for biosynthesis and catabolism of monoamines in the sea pansy *Renilla koellikeri* (Cnidarian). *Neurochem. Int.* 25:465-474.
- Parent, A. (1973) Distribution of monoamine-containing neurons in the brain stem of the frog, *Rana Temporaria*. *J. Morphol.* 139: 67-78.
- Parent, A. (1979) Monoaminergic systems of the brain. In « Biology of Reptilia », Vol. 10C. Gans, R. G. Northcott and P. Olinski, Eds. London: Academic Press, pp. 247-285.
- Parent, A. (1981) The anatomy of serotonin-containing neurons across phylogeny. In « Serotonin Neurotransmission and behaviour ». Eds. Barry L. Jacobs and Alan Gelperin. MIT press.



- Parker, G. H. (1920a) Activities of colonial animals. I. Circulation of water in *Renilla*. J. Exp. Zool. 31: 343-365.
- Parker, G. H. (1920b) Activities of colonial animals. II. Neuromuscular movements and phosphorescence in *Renilla*. J. Exp. Zool. 31: 475-515.
- Passano, L. M. (1965) Pacemakers and activity patterns in medusae: homage to Romanes. Am. Zool. 5: 465-481.
- Pazos, A. et J. M. Palacios (1985) Quantitative autoradiographic mapping of receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. Brain Res. 346: 205-230.
- Pazos, A., R. Cortes et J. M. Palacios (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. Brain Res. 346: 231-249.
- Pentreath, V. W. et G. A. Cottrell (1972) Selective uptake of 5-hydroxytryptamine by axonal processes in *Helix pomatia*. Nature New Biol. 239 (88):213-214.
- Peroutka, S. J. et S. H. Snyder (1979) Multiple 5HT receptors: differential binding of [<sup>3</sup>H]5-HT, [<sup>3</sup>H]LSD and [<sup>3</sup>H]spiroperidol. Mol. Pharmacol. 16: 687-695.

- Peroutka, S. J. (1994) 5-Hydroxytryptamine receptors. In: Handbook of receptors and channels, G protein-coupled receptors. Vol. I. pp 209-232. Ed. S. J. Peroutka. CRC Press, Inc. United States of America.
- Peteya, D. J. (1975) The ciliary-cone sensory cell of anemones and cerianthids. *Tissue Cell* 7: 243-252.
- Pletcher, A. (1968) Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Br. J. Pharm. Chem.* 32: 1-16.
- Poitras, D. et A. Parent (1975) A fluorescence microscopic study of the distribution of monoamines in the hypothalamus of the cat. *J. Morphol.* 145: 387-408.
- Rapport, M. M. (1949) Serum vasoconstrictor (Serotonin): presence of creatinine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J. Biol. Chem.* 180: 961-969.
- Rapport, M. M., A. A. Green et I. H. Page (1948) Serum vasoconstrictor (Serotonin): isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 176: 1243-1251.
- Reinitz, C. A. et A. O. W. Stretton (1996) Behavioral and cellular effects of serotonin on locomotion and male mating posture in *Ascaris suum* (Nematoda). *J. Comp. Physiol. A* 178: 655-667.

- Ribeiro, P. et R. A. Webb (1986) Demonstration of specific high-affinity binding sites for [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine in the cestode *Hymenolepis diminuta*. *Comp. Biochem. and Physiol. C: Comp. Pharmacol. and Toxicol.* 84 (2): 353-358.
- Ribeiro, P. et R.A. Webb (1987) Characterization of a serotonin transporter and an adenylate cyclase-linked serotonin receptor in the cestode *Hymenolepis diminuta*. *Life Sciences.* 40 (8): 755-768.
- Roberts, A. et G.O. Mackie (1980) The giant axon escape system of a hydrozoan medusa, *Aglantha digitale*. *J. Exp. Biol.* 84: 303-318.
- Rogawski, M. A. et G. K. Aghajanian (1981) Serotonin autoreceptors on dorsal raphe neurons: structure-activity relationships of tryptamine analogs. *J. Neurosci.* 1: 1148-1154.
- Ross, S. B. (1980) Neuronal transport of 5-hydroxytryptamine. *Pharmacology* 21: 123-131.
- Ross, S. B. et A. L. Ask (1980) Structural requirements for uptake into serotonergic neurones. *Acta Pharmac. Tox.* 46: 270-277.
- Roth, B. L. et D. M. Chuang (1987) Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction. *Life Sciences* 41: 1051-1064.

- Saripalli, L. D. et J. A. Westfall (1996) Classification of nerve cells dissociated from tentacles of the sea anemone *Calliactis parasitica*. Biol. Bull. (Woods Hole) 190: 111-124.
- Satterlie, R. A. et J. F. Case (1978) Neurobiology of the gorgonian coelenterates, *Muricea californica* and *Lopogorgia chilensis*. II. Morphology. Cell Tiss. Res. 187: 379-396.
- Satterlie, R. A. et J. F. Case (1980) Neurobiology of the stoloniferan octocoral *Clavularia sp.* J. Exp. Zool. 212: 87-99.
- Satterlie, R. A. et A. Spencer (1987) Organization of conducting systems in « simple » invertebrates: *Porifera*, *Cnidaria* and *Ctenophora*. Dans Nervous Systems in invertebrates, ed. M.A. Ali. pp. 213-264. New York: Plenum Press.
- Satterlie, R. A., P. A. V. Anderson et J. F. Case (1976) Morphology and electrophysiology of the through-conducting systems in pennatulid coelenterates. In coelenterate Ecology and behaviour, ed. G. O. Mackie. pp. 619-627. New York: Plenum Press.
- Satterlie, R. A., P. A. V. Anderson et J. F. Case (1980) Colonial coordination in anthozoans: Pennatulacea. Mar. Behav. Physiol. 7: 25-46.

- Saudou, F., U. Boschert, N. Amlaiky, J-L. Plassat et R. Hen (1992) A family of *Drosophila* serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns. *The Embo Journal* 11 (1): 7-17.
- Schich, PK. et M. Weinstein (1981) A marker for megakaryocytes: serotonin accumulation in guinea pig megakaryocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 98:607-615.
- Schmid, A., A. Scheidler, P. Kaulen et G. Bruning (1993) Serotonin immunoreactivity and serotonin binding sites in the brain of the blowfly *Calliphora erythrocephala*: a combined immunohistochemical and autoradiographic study. *Comp. Biochem. Physiol.* 104C: 193-197.
- Scrivener, J. C. E. (1971) Agonistic behaviour of the american lobster *Homars americanus* (Milne-Edwards). Fisheries Research Board of Canada, Technical report number 235, Nanaimo, British Columbia.
- Shao, Y. P., J. T. Porter et K. D. McCarthy (1994) Neuroligand receptor heterogeneity among astroglia. *Persp. Develop. Neurobiol.* 2: 205-215.
- Shaskan, E. G. et S. H. Snyder (1970) Kinetics of serotonin accumulation into slices from rat brain: relationship to catecholamine uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 175: 404-418.

- Shepherd, G. M. (1988) Neurobiology. Second Edition. pp.145-176. New York: Oxford University Press.
- Singla, C. L. (1978) Fine structure of the neuromuscular system of *Polyorchis penicillactus* (Hydromedusae; Cnidaria) . Cell Tiss. Res. 193:163-194.
- Spencer, A. N. (1979) Neurobiology of polyorchis. II. Structure of effector systems. J. Neurobiol. 10:95-117.
- Spencer, A. N. et R. A. Satterlie (1981)The action potential and contraction in the subumbrellar swimming muscle of *Polyorchis pennicillatus* (Hydromedusa). J. Comp. Physiol. 144: 401-407.
- Spencer, A. N. et W. E. Schwab (1982) The hydromedusae. In Electrical conduction and behaviour in simple invertebrates ed. G. A. B. Shelton. Oxford University Press. Oxford.
- Spörhase-Eichmann, U., H. Gras et F.-W. Schurmann (1987) Patterns of serotonin-immunoreactive neurons in the central nervous system of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. I. Ganglia of the ventral nerve cord. Cell Tiss. Res. 249: 601-614.

- Steinbusch, H. W. M. (1984) In « Handbook of Chemical Neuroanatomy ». (A. Björklund, T. Hökfelt, and M. J. Kuhar, eds) vol 3, pp. 68-125. Elsevier, Amsterdam.
- Stevens, L. T. et F. S. Lee (1884) Action of intermittent pressure and defibrinated blood upon blood vessels of frog and terrapin. Johns Hopkins, Biol. Studies 3: 99.
- Stokes, D. R. (1974) Morphological substrates of conduction in the colonial hydroid *Hydractinia echinata*. I. An ectodermal nerve net. J. Exp. Zool. 190: 19-46.
- Stolz, I.F. (1985) Uptake and storage of serotonin by platelets. In: Vanhoutte P.M., (eds). Serotonin and the Cardiovascular System. New York: Raven Press, pp: 37-42.
- Stone, E. A. et M. A. Ariano (1989) Are glial cells targets of the central noradrenergic system? A review of the evidence. Brain Res. Rev. 14: 297-309.
- Stuess, S. L., W. L. Cruse et R. G. Northcutt (1990) Distribution of tyrosine hydroxylase and 5HT-immunoreactive cells in the central nervous system of the thornback guitarfish, *Platyrrhinoidis triseriata*. J. Chem. Neuroana. 3: 45-58.

- Twarog, B. M. (1967) The regulation of catch in molluscan muscle. *J. Gen. Physiol. (Suppl.)* 50: 157-169.
- Twarog, B. M. et I. H. Page (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *J. Physiol. (Lond.)* 175: 157-161.
- Umbriaco, D., M. Anctil et L. Descarries (1990) Serotonin-immunoreactive neurons in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Neurol.* 291: 167-178.
- Vandemaelen, C. P. (1985) Serotonin. In « Neurotransmitter actions in the vertebrate nervous system » (Ed. Michael A. Rogawski and Jeffery L. Barker). Plenum Press, New York.
- Vernier, P., B. Cardinaud, O. Valdenaire, H. Philippe et J. D. Vincent (1995) An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 16 (11) : 275-381.
- Walker, R. J. (1984) 5-Hydroxytryptamine in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 79: 231-235.
- Walker, R. J. (1985) The pharmacology of 5HT receptors in invertebrates. In « Neuropharmacology of 5HT » (ed. Green A. R.) ch.13, Oxford University Press, New York.



- Webb, R. A. et K. Mizukawa (1985) Serotonin-like immunoreactivity in the cestode *Hymenolepis diminuta*. *J. Comp. Neurol.* 234: 431-440.
- Weiger, W. A. (1997) Serotonergic modulation of behavior: a phylogenetic overview. *Biol. Rev.* 72: 61-95.
- Welsh, J. H. (1957) Serotonin as a possible neurohumoral agent: evidence obtained in lower animals. *Ann. NY Acad. Sci.* 66: 618-630.
- Welsh, J. H. (1960) 5-Hydroxytryptamine in coelenterates. *Nature.* 186: 811-812.
- Welsh, J. H. et L. D. Williams (1970) Monoamine-containing neurons in planaria. *J. Comp. Neur.* 138: 103-116.
- Westfall, J. A. (1969) Nervous control of nematocyst discharge: chemical synapses. *Amer. Zool.* 9: 1141.
- Westfall, J. A. (1970) Ultrastructure of synapses in a primitive coelenterate. *J. Ultrastruct. Res.* 32: 237-246.
- Westfall, J. A. (1973a) Ultrastructure evidence for a granule-containing sensory-motor-interneuron in *Hydra littoralis*. *J. Ultrastruct. Res.* 42: 268-282.

- Westfall, J. A. (1973b) Ultrastructure evidence for neuromuscular systems in coelenterates. *Am. Zool.* 13: 237-246.
- Westfall, J. A. et J.C. Kinnamon (1978) A second sensory-motor-interneuron with neurosecretory granules in *Hydra*. *J. Neurocytol.* 7: 365-379.
- Westfall, J. A., S. Yamataka et P. D. Enos (1971) Ultrastructure evidence of polarized synapses in the nerve net of *Hydra*. *J. Cell. Biol.* 51: 318-323.
- Westfall, J. A., D. D. Landers et J. D. McCallum (1997) Neuronematocyte synapses are present in sea anemones. *American Zoologist.* 37(5): 50A.
- Wilson, E. B. (1883) The development of *Renilla*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 174: 723-815.
- Wood, J. G. et T. L. Lentz (1964) Histochemical localization of amines in *Hydra* and in sea anemones. *Nature.* 201: 88-90.
- Yang, M., A. Strikiatkachorn, M. Anthony, C. N. Chesterman et B. H. Chong (1996) Serotonin uptake, storage and metabolism in megakaryoblasts. *Int. J. Hematology* 63: 137-142.
- Yeoman, M. S., M. J. Brierley et P. R. Benjamin (1996) Central pattern generator interneurons are targets for the modulatory serotonergic

cerebral giant cells in the feeding system of *Lymnaea*. J. Neurophysiol. 75 (1): 11-25.

Zaccone, G., S. Fasulo, P. Lo Cascio et A. Licata (1986) 5-Hydroxy tryptamine immunoreactivity in the epidermal sacciform gland cells of the clingfish *Lepadogaster candollei* Risso. Cell Tissue Res. 246 : 679-682.

Zaccone, G., G. Tagliafierro, L. Goniakowska-Witalinska, S. Fasulo, L. Ainis et A. Mauceri (1989) Serotonin-like immunoreactive cells in the pulmonary epithelium of ancient fish species. Histochemistry 92 : 61-63.

Zifa, E. et G. Fillion (1992) 5-Hydroxytryptamine receptors. Pharmacol. Rev. 44: 401-458.

Zoli, M. et L. F. Agnati (1996) Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses. Progr. Neurobiol. 49: 363-380.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Dr Michel Anctil pour la patience et l'aide qu'il m'a accordées durant cette période. J'adresse aussi un grand merci à mes parents et à mes frères et soeurs dont leur aide financière et leur appui moral ont rendu possible cet ouvrage. Ma reconnaissance à tous mes amis libanais et canadiens qui, par leurs encouragements, ont collaboré de loin ou de proche à la réalisation de ce travail; et également au consulat général du Liban à Montréal pour m'avoir accordé une bourse « d'exemption de frais de scolarité », à mes collègues du laboratoire Anctil et au personnel du département de sciences biologiques et à tous ceux qui m'ont apporté le désir de poursuivre la recherche tout au long de ce travail.

Finalement, le plus grand merci au Seigneur qui était le seul appui durant mes heures difficiles de cette période et à qui je rend grâce.