

2M11.2701.6

Université de Montréal

Localisation par immunocytochimie ultrastructurale de cellules
sérotoninergiques chez la pensée de mer

Par
Natacha Benrimoh
Département de 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

(Décembre 1998)

© Natacha Benrimoh, 1998



QH
302
U54
1999
v.004

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire de maîtrise intitulé :
Localisation par immunocytochimie ultrastructurale de cellules
sérotoninergiques chez la pensée de mer

Présenté par :
Natacha Benrimoh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Stéphane Molotchnikoff
(Président-rapporteur)

Dr Michel Anctil
(Directeur de recherche)

Dr Thérèse Cabana
(Membre du jury)

Mémoire accepté le : 12 mai 1999

SOMMAIRE

La localisation de cellules sérotoninergiques et la description de leurs environnements chez un cnidaire, *Renilla koellikeri*, font l'objet de cette présente étude. Pour sa réalisation, nous avons utilisé la technique d'immunocytochimie en pré-enrobage en microscopie électronique à transmission (MET). L'intérêt d'une étude ultrastructurale de la sérotonine (5-HT) provient d'une recherche antérieure faite par immunohistochimie en microscopie optique chez cette espèce (Umbriaco et al. 1990) où cette monoamine avait été localisée au sein de cellules nerveuses et nématocytaires. Notre étude nous a confirmé la présence de 5-HT dans des cellules nerveuses et nous a permis d'observer leur distribution dans les trois couches, l'ectoderme, la mésoglée et l'endoderme. Les varicosités sérotoninergiques contiennent une ou deux mitochondries ainsi que deux types de vésicules; des vésicules claires et des vésicules claires ayant une densité au centre. La dimension et le type de ces vésicules s'accordent avec une revue de littérature de Westfall (1996), où elle a regroupé les résultats des études ultrastructurales faites à ce jour chez les cnidaires. Ces varicosités ont un environnement diversifié, contactant à la fois des cellules nerveuses, sérotoninergiques ou non, et des cellules myoépithéliales. Toutefois, cette apposition n'a révélé qu'un faible nombre de jonctions spécialisées entre cellules, indiquant que la 5-HT emprunte un mode de transmission paracrine plutôt que synaptique, mode de communication qui, lui, a déjà été concédé chez de nombreux vertébrés. La 5-HT a de plus été localisée dans trois types de cellules non-nerveuses, soit les nématocytes, les cellules à mucus et les cellules glandulaires de type digestif. Cette distribution de cellules immunoréactives à travers l'animal dans différents types cellulaires, autant nerveux que non nerveux, suggère fortement un rôle modulateur pour la 5-HT dans des comportements très divers. Son implication dans de nombreuses fonctions est caractéristique de cette monoamine autant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Weiger, 1997) et explique par ailleurs sa préférence pour la communication diffuse.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	v
Liste des figures	viii
Abréviations.....	ix
1. INTRODUCTION	1
1.1 UN NEUROTRANSMETTEUR UBIQUISTE: LA SÉROTONINE.....	2
1.1.1 Une perspective historique	2
1.1.2 L'influence de la sérotonine sur le comportement	3
1.2 SYSTÈME NERVEUX.....	4
1.2.1 Communication nerveuse	4
1.2.1.1 Transmission synaptique	5
1.2.1.1 Transmission volumique.....	7
1.2.2 Ultrastructure de la synapse	9
1.2.2.3 Ultrastructure de synapses électriques	9
1.2.2.4 Ultrastructure de synapses chimiques	9
1.2.3 Ultrastructure de synapses sérotoninergiques	12
1.3 CNIDAIRES	15
1.3.1 Systèmes nerveux chez les cnidaires	15
1.3.2 Système nerveux chez des anthozoaires.....	17
1.3.3 Sérotonine chez les cnidaires.....	19
1.3.4 Sérotonine chez un anthozoaire : la pensée de mer	19
1.3.4.1 Modulation du péristaltisme chez la pensée de mer.....	21
1.4 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	23
2. ARTICLE	25
2.1 ABSTRACT.....	27
2.2 INTRODUCTION.....	28
2.3 MATERIALS AND METHODS	30
2.4 RESULTS.....	32
2.5 DISCUSSION	37
2.6 REFERENCES	43
2.7 FIGURES	49
3 DISCUSSION	59
3.1 CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES	62
3.2 TYPES DE CELLULES À 5-HT	62
3.2.1 Les nématocytes.....	62

3.2.2 Les cellules à mucus.....	63
. 3.2.3 Les cellules glandulaires.....	64
. 3.2.4 Les cellules nerveuses.....	64
3.3 LE MICROENVIRONNEMENT DE NEURITES SÉROTONINÉRIQUES.....	65
3.4 MODE DE COMMUNICATION EMPRUNTÉ PAR LA 5-HT.....	67
Références.....	70
Remerciements.....	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Illustration de deux types de communications chimiques.....	8
Figure 2	Représentations schématiques de <i>Renilla koellikeri</i> et de ses individus .	22
Figure 3	Electron micrographs of an immunoreactive ciliated cell sampled from serial sections in the ectoderm.....	50
Figure 4	Electron micrographs of an immunoreactive nematocytes in the ectoderm	53
Figure 5	Electron micrographs of neurites in the ectoderm.....	55
Figure 6	Samples from serial sections of three 5-HT immunostained neurites in a small neuropile of the mesogleal nerve net	56
Figures 7	Overview of 5-HT immunoreactivity adjacent to mesenteric muscle cells in the endoderm and of immunoreactive neurites showing synaptic specializations	58

ABRÉVIATIONS

5-HT	(5 hydroxytryptamine), Sérotonine
5-HTP	5-hydroxytryptophane
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ASW	(Artificial Sea Water), Eau de mer artificielle
DAB	3,3 ¹ -Diaminobenzidine tetrahydrochloride
GTP	Guanosine triphosphate
HPLC	High pressure liquid chromatography
MET	Microscope électronique à transmission
PBS	(Phosphate Buffer Saline), Tampon phosphate salin
TEM	Transmission Electronic Microscope
TRP	Tryptophane

1. INTRODUCTION

L'intérêt que portent certains neurobiologistes envers les cnidaires vient du fait qu'on y trouve les organismes les plus primitifs à posséder un système nerveux, bien qu'encore très diffus, où les cellules nerveuses ne sont pas organisées en ganglion. Les spécialisations cellulaires et fonctionnelles y sont cependant déjà présentes (Westfall 1996). Les cellules nerveuses prédominantes sont les cellules sensorielles dont le cil apical s'étend vers l'extérieur ainsi que les cellules basoépithéliales dont les prolongements forment le coeur du réseau nerveux diffus. De plus, alors que l'on croyait que le transfert d'information entre les premières cellules nerveuses s'effectuait seulement par une communication cytoplasmique (syncytium), Horridge et Mackay démontrent en 1962 la présence de synapses chimiques chez un cnidaire, la méduse *Cyanea*.

La pensée de mer *Renilla koellikeri* est un cnidaire colonial marin appartenant à la classe des anthozoaires et plus précisément à l'ordre des pennatulacés. Cette espèce habite des eaux peu profondes, sablonneuses et turbulentes. Afin de s'adapter à cet environnement, la pensée de mer montre une activité rythmique péristaltique, comportement indispensable pour se dégager des sédiments qui l'ensevelissent sans cesse. L'addition de 5-HT dans le milieu extérieur augmente l'amplitude de cette activité rythmique, imitant ainsi l'effet naturel causé par de légers mouvements d'eau au-dessus de la colonie (Anctil 1989a). Lors d'études immunohistochimiques, la 5-HT a été associée aux cellules nerveuses et aux nématocytes (Umbriaco et al. 1990). Des récepteurs à 5-HT ont de plus été identifiés (Hajj-Ali et Anctil 1997) et localisés au niveau de l'ectoderme, de la mésoglée et de l'endoderme (Dergham et Anctil 1998). Toutes ces études portent à croire que la 5-HT est impliquée dans la modulation de cette activité motrice mais son mécanisme d'action est toujours inconnu. Agit-elle directement sur les cellules musculaires ou indirectement par l'entremise de cellules nerveuses ? Communique-t-elle par transmission focale (synaptique) ou par transmission diffuse (volumique) ?

Afin de répondre à ces questions, une meilleure résolution de la localisation de la 5-HT est nécessaire. Cette étude traitera de la localisation ultrastructurale de la sérotonine par immunocytochimie en pré-enrobage pour la microscopie électronique à transmission chez *Renilla koellikeri*. Un des objectifs sera de sonder l'environnement entourant les cellules sérotoninergiques afin de déterminer s'il est composé de cellules nerveuses ou musculaires. Un second objectif sera de décrire l'ultrastructure des varicosités sérotoninergiques; les vésicules sont-elles localisées dans toute la varicosité ou sont-elles agglutinées près d'un site de sécrétion ? Ces deux objectifs pourront nous éclairer sur le mode d'action de la 5-HT dans la modulation du péristaltisme. Dans une perspective évolutive, nous essaierons de voir chez ce représentant des invertébrés les plus primitifs si l'ultrastructure des varicosités sérotoninergiques et le mode d'action de la 5-HT sont similaires à ceux des vertébrés supérieurs.

Dans un premier temps, ce mémoire introduira un neurotransmetteur ubiquiste, la sérotonine. Dans un deuxième temps, les différents principes de communication nerveuse ainsi que l'ultrastructure de ces types de communication seront discutés. L'environnement cellulaire et l'ultrastructure des varicosités sérotoninergiques seront aussi abordés. Puis dans un troisième temps sera décrit le premier système nerveux dont les représentants sont les cnidaires et plus particulièrement celui de l'anthozoaire marin des eaux californiennes qu'est *Renilla koellikeri*. Pour terminer ce chapitre, la présence et les effets de la sérotonine chez cet organisme primitif seront décrits.

1.1 UN NEUROTRANSMETTEUR UBIQUISTE: LA SÉROTONINE

1.1.1 Une perspective historique

Autrefois, un sérum sanguin appelé sérotonine était connu pour son effet constricteur sur les vaisseaux sanguins (Rapport et al. 1948). À la même époque une autre substance nommée entéramine qui augmente la motilité intestinale était découverte (Erspamer et al. 1946). Ce n'est toutefois qu'en 1949, à l'aide de techniques biochimiques, que ces deux substances furent identifiées comme n'étant qu'une seule, la sérotonine, une monoamine

(Rapport et al. 1948, 1949; Hamlin et Fisher 1951). Ultérieurement, elle fut trouvée en quantité abondante dans le système nerveux central chez les mammifères (Twarog et Page 1953). Ceci amena à proposer la sérotonine comme un neurotransmetteur du système nerveux. Les études suivantes s'attardèrent sur sa localisation anatomique par la méthode de fluorescence de Falk-Hillarp (Dahlstrom et Fuxe 1964, 1965; Fuxe 1965; voir Takeuchi 1988). Chez les mammifères, les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont majoritairement localisés dans la formation réticulée et plus spécifiquement dans les noyaux du raphé (Takeuchi 1988; Smiley et Goldman-Rakic 1996). Ils donnent naissance à un réseau de fibres ramifiées plus ou moins dense innervant toutes les régions du cerveau (Takeuchi 1988). Les axones sérotoninergiques, majoritairement non myélinisés chez le rat mais myélinisés davantage chez l'humain (Azmitia et Cannon 1983; Takeuchi 1988), se divisent en deux groupes: l'un avec peu de varicosités, l'autre avec de nombreuses varicosités (Takeuchi 1988; Smiley et Goldman-Rakic 1996). Leur origine serait d'ailleurs différente (Smiley et Goldman-Rakic 1996). Les fibres de ce premier groupe, provenant du raphé dorsal, sont longues et orientées dans une direction rostro-caudale alors que celles du deuxième groupe, d'origine du raphé moyen, s'entremêlent et forment des réseaux qui ne suivent pas de direction particulière (Soghomonian et al. 1988; Takeuchi 1988; Smiley et Goldman-Rakic 1996). De ces observations, le concept de deux types de systèmes sérotoninergiques émergea. Toutefois aucune évidence convaincante jusqu'à ce jour ne semble associer différentes fonctions aux différents types d'innervation sérotoninergique.

1.1.2 L'influence de la sérotonine sur le comportement

La sérotonine, présente chez les végétaux comme chez les animaux, des unicellulaires à l'Homme, est un des neurotransmetteurs les plus répandus (voir Walker et al. 1996; Weiger 1997). Son rôle ne se confine toutefois pas seulement à celui d'un vasoconstricteur sanguin ou d'un stimulateur de cellules intestinales. Au contraire, dans la majorité de ces embranchements la 5-HT module des comportements aussi divers que locomoteurs, reproducteurs et psychiques (Weiger 1997).

La sérotonine augmente ou inhibe l'activité reproductrice selon les espèces (Zemlan et al. 1973; Horvitz et al. 1982; Luine et al. 1983; McIntosh et Barfield 1984; Weiger 1997); elle module la locomotion chez de nombreuses espèces (Katz et Frost 1995; Kemnitz et al. 1995; Jovanovic et al. 1996; Reinitz et Stretton 1996; Zhang et al. 1996; Weiger 1997), diminue l'appétit (Saller et Stricker 1976; Weiger 1997) et affecte l'agressivité (File et al. 1979; Maler et Ellis 1987; Molina et al. 1987; Vergnes et al. 1988; Sijbesma et al. 1991; Verhoeven et al. 1992; Kohen 1993; Tilhonen et al. 1993; Weiger 1997). Or, l'effet de la 5-HT sur le comportement agressif tient compte de certains phénomènes sociaux. Elle augmente l'agressivité chez un animal isolé alors que chez un animal habitant en société, elle n'a aucun effet s'il est soumis et amplifie son comportement agressif s'il est dominant (Yodyingyud et al. 1985; Raleigh et al. 1991; Yeh et al. 1996). De plus, de nombreuses études révèlent son implication dans plusieurs maladies psychiques telles la dépression, la schizophrénie, l'alzheimer chez l'homme et d'autres mammifères (Hunter 1989; McEntee et Crook 1991; Schatzberg et Cole 1991; Weiger 1997).

Chez toutes ces espèces, le mode d'action de la sérotonine ne se restreint pas seulement à celui d'un neurotransmetteur classique agissant directement sur la cellule post-synaptique. Cette monoamine peut agir comme un neuromodulateur altérant la libération présynaptique ou la réponse post-synaptique du neurotransmetteur principal d'une synapse. Elle peut aussi être libérée dans la circulation, affectant ainsi tout l'organisme, telle une neurohormone (Beaudet et Descarries 1978; Weiger 1997). Mais y a-t-il un mode de communication que la 5-HT préfère ou qui lui serait plus approprié.

1.2 SYSTÈME NERVEUX

1.2.1 Communication nerveuse

Le système nerveux détecte et analyse des stimuli externes ou internes à l'animal et est responsable de l'initiation d'une réponse musculaire ou glandulaire adéquate. Les neurones perçoivent un stimulus lorsque celui-ci est détecté par un récepteur qui est

formé d'une protéine intrinsèque à la membrane d'une cellule. Les récepteurs traduisent ce signal physique ou chimique en un signal électrique par l'ouverture de canaux ioniques, changeant ainsi la perméabilité membranaire et le potentiel électrique de la cellule. L'information prend la forme d'un signal électrique, communément appelé potentiel d'action, et se propage le long des prolongements jusqu'aux terminaisons nerveuses grâce aux propriétés électriques de la membrane. La terminaison nerveuse atteinte, l'information est véhiculée d'une cellule à l'autre en empruntant l'un des deux principaux mode de communications dans le système nerveux, soit la transmission synaptique, soit la transmission volumique. Ces deux types de communication sur lesquels le système nerveux repose correspondent à différentes fonctions mais diffèrent aussi morphologiquement et anatomiquement tant au niveau pré-synaptique que post-synaptique.

1.2.1.1 Transmission synaptique

Deux écoles de pensée émergent en 1930 sur le mécanisme de la transmission synaptique (voir Kandel et al. 1991). La première école, celle des physiologistes menée par Eccles, soutenait l'hypothèse de synapses électriques et la seconde école, celle des pharmacologistes menée par Dale, défendait l'idée d'un médiateur chimique libéré par les cellules présynaptiques (voir Kandel et al. 1991). Or vers les années 1950-1960, grâce à l'amélioration des techniques de fixation et d'enrobage du tissu pour l'observation au microscope électronique à transmission, la présence de ces deux types de synapses a été clairement identifiée chez les vertébrés (Palade et Palay 1954; Palay 1956) et les invertébrés (Robertson 1953).

La transmission synaptique est sélectionnée lorsque l'information doit se propager très rapidement et qu'une réponse précise et immédiate est requise. Elle fait appel à des jonctions spécialisées entre deux cellules, appelées synapses. Ces jonctions sont de deux types, électriques ou chimiques, mais dans les deux cas le transfert d'un flux d'ions ou de molécules organiques d'une cellule à l'autre se fait sur une très courte distance. Dans une

synapse électrique, les cytoplasmes des deux cellules communiquent directement par la présence de canaux alors que dans une synapse chimique, 30 nm seulement séparent les deux cellules. La faible distance séparant les deux cellules ainsi que le petit nombre de cellules exposées à l'information expliquent en partie la rapidité de la transmission synaptique. De plus, des prolongements d'astrocytes (cellules de support) sont disposés autour des terminaisons nerveuses, isolant des surfaces synaptiques ou des groupes neuronaux (Peters et Palay 1965; Pappas et Waxman 1972). Les astrocytes sont exclusivement perméable au K^+ . Des changements locaux dans la concentration extracellulaire de cet ion sont produits lors d'une activité neuronale et peuvent affecter l'activité d'autres cellules en altérant leur potentiel de repos. Les astrocytes ont donc pour rôle de garder la concentration potassique extracellulaire stable en absorbant cet ion lors d'une augmentation locale de K^+ dans le milieu extracellulaire (Kuffler et Nicholls 1966; Trachtenberg et Pollen 1970). Agissant comme un tampon, ces cellules préviennent ainsi la communication entre différents groupes neuronaux.

Au niveau post-synaptique, le transfert d'information d'un neurone à l'autre se fait lorsque le neurotransmetteur se lie à son récepteur spécifique. Il existe deux types de récepteurs présents à la surface de la cellule post-synaptique : les récepteurs-canaux (associés à la transmission synaptique) et les récepteurs liés aux protéines G (associés à la transmission volumique). Les récepteurs-canaux sont des protéines transmembranaires qui possèdent un pore ionique et un ou plusieurs sites de liaison pour le neurotransmetteur sur leur surface extracellulaire. La fixation de neurotransmetteurs sur ces sites de liaison amène le récepteur à changer de conformation, créant ainsi l'ouverture du canal ionique. Ceci permet aux ions spécifiques à ce canal, soit le Na^+ , le K^+ ou le Cl^- , d'entrer ou de sortir de la cellule et d'atteindre leur potentiel d'équilibre respectif. Ainsi, ce mouvement d'ions de part et d'autres de la membrane modifie la perméabilité membranaire, générant ainsi un potentiel d'action dans la cellule post-synaptique. Une fois le neurotransmetteur lié à son site récepteur, la réponse est immédiate, de l'ordre des millisecondes, puisque le récepteur et le canal ionique ne font qu'un. Ce type de récepteur est donc associé à la transmission synaptique.

1.2.1.2 Transmission volumique

La transmission synaptique n'est pas le seul mode de dialogue utilisé par les neurones. De plus en plus d'études démontrent que certains neurotransmetteurs sont libérés dans le milieu extracellulaire par les neurones et agissent ainsi sur une grande distance. Ce dernier type de communication, appelé transmission volumique (Fuxe et Agnati 1991; Agnati et al. 1993), a surtout été observé pour les monoamines. L'observation de micrographies en microscopie électronique à transmission a révélé que les vésicules dans les terminaisons synaptiques sont fusionnées avec la membrane, mais éloignées de la spécialisation membranaire. Ceci suggère que la libération des neurotransmetteurs se fait à l'extérieur de la jonction synaptique où ils diffusent dans le milieu extracellulaire jusqu'aux cellules possédant un récepteur adéquat.

La transmission volumique est bien moins rapide que la transmission synaptique. Elle est cependant tout aussi spécifique mais davantage impliquée dans des changements à long terme et offre une gamme de réponses souvent plus diversifiées. Les neurotransmetteurs sont libérés dans le milieu extracellulaire et agissent ainsi sur davantage de cellules pouvant être à une plus grande distance de la terminaison. En revanche leur diffusion dans le milieu jusqu'à leur liaison à un récepteur cause un délai de réponse plus long. Ainsi plusieurs cellules mais aussi différents types cellulaires peuvent répondre en même temps aux neurotransmetteurs circulant dans le milieu extracellulaire. Les récepteurs associés à ce type de transmission sont les récepteurs liés aux protéines G. Ici, le récepteur n'est pas associé à un canal ionique mais à une protéine G, protéine membranaire située du côté cytoplasmique. Lorsque le neurotransmetteur se lie à son

récepteur, la protéine G vient se lier à son tour au récepteur du côté cytoplasmique. Alors activée, elle stimule l'activité d'une enzyme membranaire qui produit un messager secondaire qui diffuse dans le milieu intracellulaire. Un neurotransmetteur lié à son récepteur active plus d'une protéine G, entraînant donc la formation de plus d'un

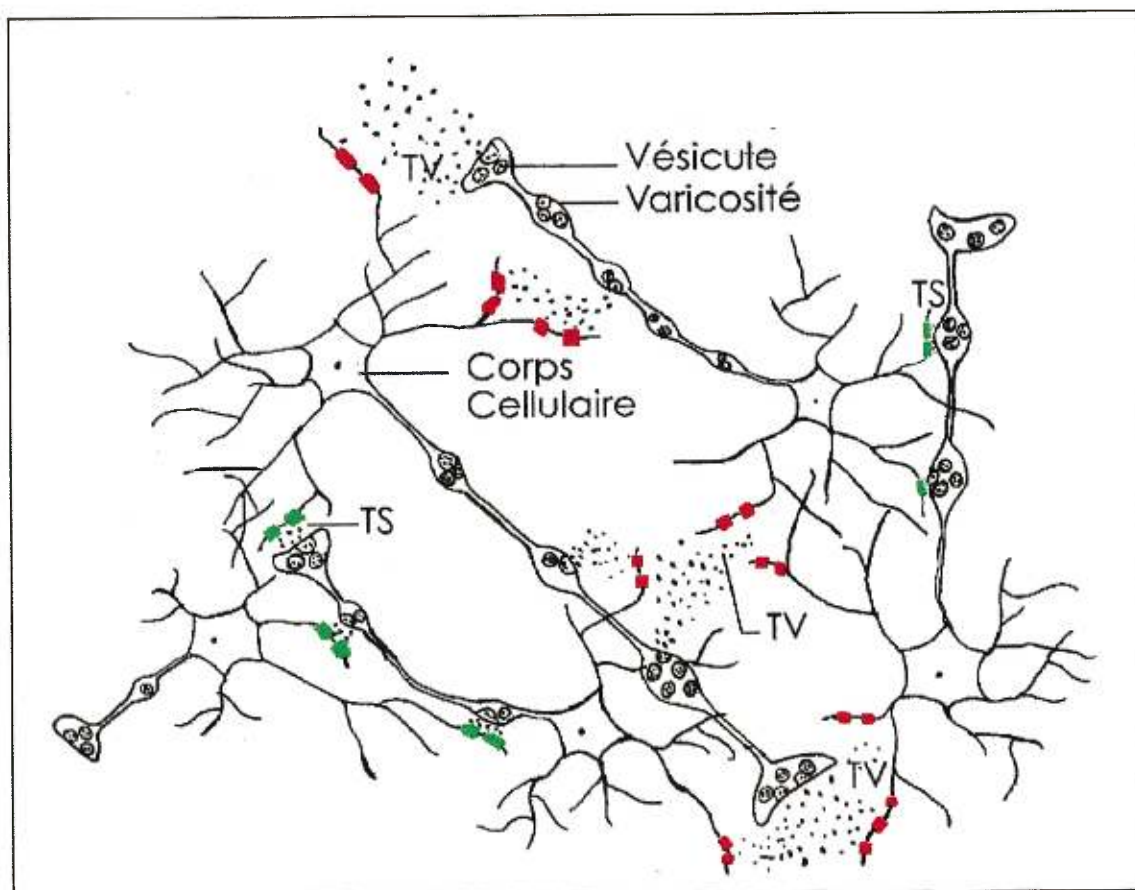


Figure 1 : Illustration de deux types de communication chimique. La transmission synaptique (TS) versus la transmission volumique (TV). Les points rouges représentent des récepteurs retrouvés dans la TV alors que les verts sont retrouvés dans la TS. Adapté de Fuxe et al. 1991.

messager secondaire ayant pour effet d'amplifier la réponse. Ce dernier va déclencher une cascade d'événements biochimiques intracellulaires par l'activation de protéines kinases

spécifiques qui vont phosphoryler des canaux ioniques, des récepteurs, des enzymes, modifiant ainsi leurs fonctions. Ces protéines kinases peuvent même agir sur l'expression génétique en induisant la synthèse d'une protéine ou affectant sa transcription. Cet éventail d'événements permet une réponse plus diversifiée à un même neurotransmetteur. La présence de ces différents intermédiaires rend la réponse beaucoup plus lente, de l'ordre des secondes et pouvant même aller jusqu'aux minutes. Les récepteurs liés aux protéines G sont souvent associés à la transmission diffuse.

1.2.2 Ultrastructure de la synapse

1.2.2.1 Synapse électrique

Les synapses électriques, rares chez les mammifères, sont plus communes chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés. Elles sont retrouvées dans le système nerveux mais davantage au sein des muscles lisses, des cellules cardiaques et épithéliales. Les synapses électriques sont caractérisées par un rapprochement des membranes plasmiques des deux cellules. Cet espace de 2 à 3 nm est traversé par des canaux appelés connexons qui réunissent les deux cytoplasmes et qui permettent ainsi un passage direct du signal électrique, sans nécessiter la présence d'un médiateur chimique. Ce flux continu de courant rend la transmission synaptique très rapide, avec un délai très faible de 0.1 ms (Peters et Palay 1996).

1.2.2.2 Synapse chimique

Les synapses chimiques sont bien plus nombreuses que les synapses électriques dans le système nerveux. La jonction synaptique, autant chez les vertébrés que chez les invertébrés, est composée de deux éléments neuronaux possédant des densités cytoplasmiques et séparés par un espace de 20 à 30 nm appelé fente synaptique (Westfall 1987, 1996; Anderson et Grünert 1988; Kandel et al. 1991; Peters et Palay 1996). De part et d'autre de cette fente, se trouvent l'élément pré-synaptique et l'élément post-synaptique présentant une paire de membranes parallèles denses. La libération de

neurotransmetteurs de la membrane pré-synaptique dans la fente synaptique jusqu'à leur liaison avec les récepteurs sur la membrane post-synaptiques nécessite un délai synaptique de 0.5 à 1.0 ms, délai caractéristique des synapses chimiques (Westfall 1987; Kandel et al. 1991).

L'élément pré-synaptique ou bouton pré-synaptique est caractérisé par la présence de mitochondries et de nombreuses vésicules, sites de stockage des neurotransmetteurs chimiques. La terminaison pré-synaptique possède des particules denses reliées entre elles par de fins filaments (Pappas et Waxman 1972; Peters et al. 1976). Ces particules d'un diamètre de 60 nm sont espacées de 80 à 100 nm et se limitent aux régions riches en vésicules synaptiques. L'ensemble des particules et des filaments est appelé la grille pré-synaptique et aurait pour rôle de guider les vésicules vers la membrane pour libérer leurs neurotransmetteurs (Peters et al. 1976). Le cytoplasme, sous-jacent à la membrane pré-synaptique, est rempli de filaments fins et de substance granuleuse formant la densité pré-synaptique. Ces filaments sont probablement composés entre autres d'actine et de synapsine, deux protéines permettant de lier les vésicules entre elles et de réguler le nombre de vésicules disponibles pour se fusionner à la membrane plasmique (Peters et al. 1976). Les vésicules synaptiques les plus communes chez les vertébrés ont un diamètre de 40 à 50 nm, sont claires, homogènes d'apparence et généralement sphériques ou quelquefois allongées (Pappas et Waxman 1972; Peters et al. 1976). Plusieurs études ont associé les vésicules rondes et plus grosses aux synapses excitatrices et les vésicules allongées et plus petites aux synapses inhibitrices (Lenn et Reese 1966; McDonald et Rasmussen 1971). Des vésicules plus grosses avec une densité centrale sont aussi observées. Certaines mesurent de 40 à 60 nm avec une densité centrale de 15 à 25 nm et sont surtout retrouvées dans les terminaisons autonomes et plus précisément dans les terminaisons catécholaminergiques et noradrénergiques. Des vésicules de 80 à 90 nm avec une densité centrale de 50 nm sont aussi retrouvées dans le système nerveux central et sont associées aux terminaisons sérotoninergiques (Peters et al. 1976).

La surface post-synaptique est couverte d'éléments tubulaires de 3 à 5 nm de diamètre. Sous la membrane post-synaptique, une accumulation de fibres de 3 à 10 nm forme un réseau qui se lie à des particules de la membrane post-synaptique, directement ou par l'entremise de granules. De plus, des corps denses sous cette densité ont été observés mais leur fonction reste inconnue (Pappas et Waxman 1972; Peters et al. 1976).

La fente synaptique, large de 20 à 30 nm n'est pas dépourvue de matériel; au contraire, trois types de fibrilles parcourent cet espace (Ichimura et Hashimoto 1988). Des fibres de 4 à 6 nm peuvent être observées formant un pont entre les deux membranes. Ces filaments ont un rôle mécanique dans la formation des synapses (Ellisman 1984) et permettent de retenir les deux membranes côte à côte. De très courtes fibrilles partant de l'intérieur de la membrane post-synaptique et se dirigeant vers la fente synaptique forment une couverture dense sur cette membrane. Ces fibrilles font partie du complexe récepteur-enzyme (Matus 1981). Finalement, de fins filaments longent parallèlement les deux surfaces membranaires, formant la ligne dense observée dans la fente synaptique.

Les synapses chimiques des invertébrés démontrent toutefois une plus grande diversité morphologiques que celles des vertébrés (Westfall 1987). Elles peuvent être formées d'un complexe de longues membranes, continues ou avec plusieurs interruptions, ou encore être très courtes (Westfall 1987; Peters et Palay 1996). Toutefois, la grande différence entre les premiers animaux à posséder un système nerveux et les animaux supérieurs réside dans le nombre, la taille et le type de vésicules synaptiques. Chez les cnidaires plus précisément, le nombre de vésicules est très aléatoire. Les varicosités peuvent contenir plusieurs vésicules ou alors seulement une ou deux. À partir de la reconstruction d'une synapse en trois dimensions, Anderson et Grünert (1988) montre qu'une terminaison typique peut contenir de 30 à 40 vésicules sphériques et translucides. Cependant, dans chaque tranche, il n'y a qu'une ou deux vésicules (Westfall 1987; Anderson et Grünert 1988). De plus, une grande diversité au niveau de la taille et de la forme de ces vésicules est trouvée dans une même terminaison nerveuse (Westfall 1987; Anderson et Grünert 1988). Elles sont d'ailleurs plus grosses (40 nm à 200 nm) que celles des vertébrés (40 à

90 nm). Trois types de vésicules sont présentes et non deux; soit des vésicules claires (50 à 150 nm), des vésicules avec une densité centrale (70 à 200 nm) et des vésicules opaques (40 à 90 nm), absentes chez les vertébrés.

La synapse caractéristique décrite ci-dessus, dite unidirectionnelle, transfère l'information dans une seule direction, de l'élément pré-synaptique à l'élément post-synaptique. Des études ultrastructurales faites chez 36 cnidaires ont toutes démontré des synapses unidirectionnelles (Westfall 1996). Cependant, d'autres sortes de synapses ont été décrites, bien que moins communes. Chez quelques espèces, des synapses bidirectionnelles ont été observées (Horridge et Mackay 1962; Jha et Mackie 1967; Westfall et al. 1971, Westfall 1973; Anderson et Schwab 1981) Elles ont pour caractéristique que les deux terminaisons soient identiques, contenant toutes deux des vésicules synaptiques près de la membrane dense et épaisse et qui se font face. Leur présence a été signalée chez les crustacés (Hama 1961), les mollusques (McCarraghen et al. 1983, 1985), les annélides (Hama 1959) et chez quelques vertébrés (Kohno 1970). Une étude de Anderson (1985) chez un cnidaire a démontré que ces synapses conduisent l'information dans les deux directions et que cette transmission est chimique et généralement excitatrice et non inhibitrice. Ce type de synapse n'est pas à confondre avec les synapses réciproques où les deux terminaisons possèdent également des vésicules, mais où celles-ci sont apposées à la membrane en décalage. D'ailleurs, les vésicules des deux terminaisons sont souvent morphologiquement différentes l'une de l'autre, et généralement inhibitrices dans une terminaison et excitatrices dans l'autre (Gray 1966).

1.2.3 Ultrastructure des varicosités sérotoninergiques

Peu d'études sur l'ultrastructure des varicosités sérotoninergiques par la méthode de post-enrobage ont été faites. Cette méthode utilise des particules d'or, particules mesurant quelques nanomètres, comme révélateur. Leur petite taille permet une grande précision quant à la localisation du transmetteur sans masquer la varicosité. Des études en

post-enrobage chez le rat et le poisson ont démontré la présence de vésicules d'apparence homogènes, petites, rondes ainsi que de grosses vésicules denses et granuleuses (Kiliaan et al. 1996; Liem et Copray 1996). Alors que la sérotonine semble n'être localisée que dans les vésicules granuleuses chez le poisson (Kiliaan et al. 1996), elle est présente chez le rat dans les deux types de vésicules (Richards et al. 1973; Descarries et al. 1975; Liem et Copray 1996). Chez les insectes, le homard et l'écrevisse, des varicosités sérotoninergiques semblent aussi contenir ces deux types de vésicules (Sandeman et al. 1995). Cependant, puisque ces dernières études ont été faites en pré-enrobage, il est difficile de déterminer si la sérotonine est préférentiellement localisée dans l'un ou l'autre type de vésicules. En pré-enrobage, le marquage forme un dépôt opaque et flocculant, masquant ainsi la fine structure de la varicosité. Les vésicules grosses et denses sont en fait situées à une certaine distance des jonctions synaptiques (Liem et Copray 1996) et sont peu nombreuses dans une terminaison (Descarries et al. 1975). Leur présence a déjà été associée à une innervation monoaminergique dans différentes régions du cerveau (Bloom et Aghajanian 1968). Éloignées de la jonction synaptique, elles pourraient être des vésicules de réserve qui ne seraient libérées que dans certaines circonstances (Liem et Copray 1996). Les petites vésicules, au contraire, sont plus nombreuses et l'on peut en retrouver dans quelques varicosités, en forte concentration, à proximité du site de libération (Liem et Copray 1996).

Bien que les résultats des études diffèrent, celles-ci ont démontré que la majorité des varicosités sérotoninergiques n'avaient pas de spécialisation membranaire. Quelques études (Molliver et al. 1982; Parnavelas et al. 1985; Papadopoulos et al. 1987) ont montré une forte fréquence de jonctions synaptiques alors que d'autres (Descarries et al. 1975; Beaudet et Descarries 1978; Séguéla et al. 1989; Smiley et Goldman-Rakic 1996) ont démontré une faible présence de synapses. Cette divergence de résultats peut être attribuable à quelques facteurs techniques, telle l'utilisation de différents fixateurs. Certains chercheurs extrapolent la fréquence synaptique à partir de coupes aléatoires alors que d'autres la calculent à partir de coupes sériées, augmentant ainsi la précision. De plus certaines de ces études tendent à comparer différentes régions corticales, or, il

semble que naturellement certaines présentent davantage de synapses que d'autres (Soghomonian et al. 1988).

Dans le cortex cérébral du rat adulte, 28 % à 45 % des varicosités sérotoninergiques établissent des synapses (Séguéla et al. 1989; Descarries et al. 1991) alors que seulement 25 % en forment chez le singe (Smiley et Goldman-Rakic 1996). Chez la lamproie, elle semble aussi agir d'une façon paracrine en n'établissant aucune jonction synaptique (Christenson et al. 1990; Schotland et al. 1996). Chez deux espèces de poissons, *Carassius auratus* et *Oreochromis mossambicus*, la sérotonine agirait aussi par diffusion au niveau des cellules de l'intestin; la distance entre le site de libération et sa cellule cible est de plus de 2 μm , distance trop grande pour qu'il y ait une transmission synaptique (Kiliaan et al. 1996). Chez les crustacés et les insectes, une faible fréquence de synapses sérotoninergiques a été observée dans le système nerveux central (Schürmann et al. 1991; Sun et al. 1993) et aucune dans le système périphérique (Livingstone et al. 1981; Nässel et Elekes 1984). Ce faible taux est partagé par d'autres neurotransmetteurs tels la norépinéphrine (Descarries et al. 1977; Séguéla et al. 1990), la dopamine (Séguéla et al. 1988; Garris et al. 1994; Gonon 1997), l'acétylcholine (Descarries et al. 1997) ainsi que par certains peptides (Fuxe et al. 1989). De plus, d'autres études ont montré que la localisation des récepteurs monoaminergiques n'est pas associée à la présence de leurs monoamines respectifs (Herkenham 1987; Descarries et al. 1991). Ces différents résultats soulignent tous que le système monoaminergique tend à préférer la communication volumique comme moyen de communication.

Le microenvironnement des neurones sérotoninergiques est principalement composé de cellules nerveuses. La jonction synaptique, généralement unidirectionnelle (Séguéla et al. 1989; Smiley et Goldman-Rakic 1996), s'effectue principalement entre des interneurons (Christenson et al. 1990; Smiley et Goldman-Rakic 1996) ou encore sur des dendrites de neurones (Séguéla et al. 1989; Christenson et al. 1990; Descarries et al. 1991). Cette apposition fréquente avec les cellules nerveuses démontre que cette monoamine semble altérer la libération des neurotransmetteurs en contactant l'élément pré-synaptique ou

encore en modulant sa réponse en contactant l'élément post-synaptique (Séguéla et al. 1989; Smiley et Goldman-Rakic 1996). Cette indolamine module donc divers comportements, mais ne semble jamais être responsable du déclenchement d'un mouvement, étant rarement retrouvée près de cellules musculaires ou glandulaires (Jacobs et Azmitia 1992).

1.3 CNIDAIRES

Les cnidaires sont apparus à l'ère du Précambrien (Wang et al. 1999). Ils tiennent leur nom de certaines de leurs cellules appelées cnidocytes ou nématocytes. Ces cellules, uniques à cet embranchement, éjectent un microharpon enduit d'une substance urticante utile pour la défense et la capture de proies. Majoritairement marins, ces animaux à symétrie radiale sont les plus primitifs à posséder un système nerveux. Les cnidaires sont diploblastiques : ils ne possèdent que deux feuilletts tissulaires, l'ectoderme et l'endoderme, séparés par une substance gélatineuse, la mésogée. Les membres de ce groupe existent sous la forme de méduse ou de polype ou encore alternent entre ces deux formes. La première est caractéristique de la faune vagile alors que la seconde est propre à la faune sessile (Wilson 1883; Parker 1919).

1.3.1 *Systèmes nerveux chez les cnidaires*

L'absence de vraies cellules nerveuses et de synapses chez les Porifères (l'embranchement immédiatement inférieur aux cnidaires) fait des Cnidaires les pionniers dans l'établissement du système nerveux (Satterlie et Spencer 1987). Ce dernier est constitué de deux ou plusieurs réseaux nerveux diffus et bidimensionnels (Mackie 1990; Spencer 1991). Les prolongements (ou neurites) des cellules nerveuses, qui ne peuvent être différenciés en axones ou en dendrites, conduisent l'information dans les deux directions et s'entremêlent pour former un réseau diffus (Satterlie et al. 1976, 1980; Spencer 1991). Cette organisation n'est point retrouvée dans les embranchements supérieurs où les neurones sont regroupés en ganglions. Chez les plathelminthes, l'embranchement immédiatement supérieur aux cnidaires, un système nerveux diffus cohabite avec la

présence d'une paire de ganglions nerveux. Alors que les chercheurs ont d'abord cru que ces cellules nerveuses primitives étaient multifonctionnelles, deux types de cellules nerveuses ont été identifiées chez les cnidaires. Les premières sont des cellules sensorielles possédant un cil apical en contact avec le milieu extérieur (Westfall 1996). En 1919, Parker (voir Mackie 1990; Westfall 1996) postule qu'au cours de l'évolution, certaines cellules épithéliales possédant des flagelles se sont transformées en cellules sensorielles. Les deuxièmes sont des cellules motrices situées à la base de l'épithélium et dont les longs prolongements forment le corps du plexus nerveux diffus (Westfall 1996). Dans les années 1920, les chercheurs présumaient que la communication entre cellules nerveuses était de nature syncytiale. Or la mise en évidence de synapses chimiques en 1962 par Horridge et Mackay suggère la présence d'un mode de communication synaptique. Des différences physiologiques et de transmission dans le réseau nerveux existent cependant entre les trois classes de cnidaires. La communication entre cellules nerveuses d'un réseau nerveux se fait par l'entremise de synapses chimiques chez les anthozoaires et les scyphozoaires, alors que chez les hydrozoaires celle-ci se fait par des synapses électriques. Chez ces derniers, les jonctions gap sont ubiquistes et accouplent non seulement les cellules nerveuses mais aussi les cellules épithéliales. Les hydrozoaires possèdent également des synapses chimiques, mais elles sont plutôt impliquées dans la communication entre deux réseaux nerveux ou pour exciter des effecteurs.

Des synapses chimiques neuro-neurales ont été trouvées chez des représentants des trois classes de cnidaires : chez les hydrozoaires (Westfall 1969, 1970; Spencer 1979; Kinnamon et Westfall 1982; Weber et al. 1982), chez les scyphozoaires (Horridge et Mackay 1962; Singla 1976; Anderson et Schawb 1981) et chez les anthozoaires (Satterlie et al. 1980). Des synapses neuromusculaires ont aussi été identifiées chez les hydrozoaires (Westfall et al. 1971; Westfall 1973; Singla 1978, Spencer 1979), chez les scyphozoaires (Westfall 1973; Anderson et Schawb 1981), et les anthozoaires (Westfall 1973; Satterlie et Case 1978). L'ultrastructure de ces synapses ressemble fort aux synapses neuro-neurales conventionnelles, possédant des vésicules denses dans les terminaisons pré-synaptiques et une paire de membranes parallèles. Les spécialisations

post-synaptiques y sont pourtant absentes alors que chez les vertébrés, les cellules post-synaptiques ont des replis membranaires (Westfall 1973, 1996). En outre, des synapses neuro-nématocytes ont été observées chez quelques cnidaires (Westfall 1969, 1970; Westfall et al. 1971; Westfall et Kinnamon. 1978, 1984).

Des études électrophysiologiques faites chez les hydrozoaires et les scyphozoaires ont démontré que les mécanismes neurophysiologiques de base au niveau d'une synapse étaient similaires à ceux des autres invertébrés (Spencer 1990). Ces neurones manifestent un potentiel d'action conventionnel où un courant Na^+ entrant dépolarise le neurone et un courant K^+ sortant le repolarise. De plus, la libération du neurotransmetteur requiert la présence de Ca^{2+} alors qu'un excès de Mg^{2+} inhibe la transmission (Anderson 1985; Spencer 1990). Des potentiels post-synaptiques excitateurs ou inhibiteurs, des potentiels miniatures, la facilitation, la sommation temporelle et spatiale sont des propriétés synaptiques qui ont aussi été observées chez les cnidaires (Anderson 1985; Spencer 1990).

1.3.2 Système nerveux chez des anthozoaires

L'architecture du système nerveux des anthozoaires repose sur un réseau nerveux ectodermique-mésogléen innervant la musculature et un endoderme pauvre en cellules nerveuses (Fautin et Mariscal 1991). Dans la mésoglée, les prolongements bipolaires ou multipolaires s'étendent en direction des muscles longitudinaux et circulaires, et envoient des neurites dans l'endoderme où ils semblent se lier avec des cellules nerveuses. Le second réseau nerveux s'entremêle avec celui de la mésoglée et est formé par les neurites des neurones ectodermiques qui longent la bordure ectodermique-mésogléenne et dont certains se dirigent dans la mésoglée. Chez les pennatulacés, ces réseaux se retrouvent à travers le rachis (tissu colonial) et les polypes (Satterlie et al. 1976, 1980; Anctil, 1989b).

Les anthozoaires sont exclusivement des individus polyploïdes qui peuvent vivre en solitaire (anémone de mer) ou en colonie. Les anthozoaires coloniaux ont deux ou

plusieurs types de système nerveux; chaque polype a son propre réseau nerveux alors que le rachis possède un réseau indépendant à propagation continue, synaptique et non polarisée qui coordonne la colonie (Satterlie et al. 1976; Fautin et Mariscal 1991).

Chez les hydrozoaires, la transmission coloniale a été étudiée chez quelques espèces et toutes les études révèlent qu'elle est non-nerveuse (épithéliale). Au contraire, chez les anthozoaires dont les pennatulacés, de multiples types de transmission coloniale existent (Anderson et Case 1975). Les anthozoaires possèdent des réseaux nerveux à propagation continue, synaptique et non polarisé, responsable des contractions musculaires lentes et rapides (McFarlane 1969; Fautin et Mariscal 1991). Il existe deux réseaux responsables de la contraction musculaire lente: le réseau SS1 et le réseau SS2. Le premier est ectodermique et responsable entre autres de l'extension du polype et de l'initiation de la nage alors que le second est endodermique et probablement impliqué dans la régulation de la bouche et du pharynx. Il est cependant peu développé et n'a été que peu étudié (McFarlane 1969).

Ces organismes primitifs expriment des réactions motrices simples tels la contraction du polype et le contrôle de la bouche ainsi que des comportements coloniaux, tous régis par le système nerveux (Spencer 1991). Chez les pennatulacés, quatre activités coloniales sont davantage étudiées : la bioluminescence, la rétraction des polypes, la contraction du rachis et le péristaltisme (Anderson et Case 1975; Satterlie et al. 1980). Les trois premiers comportements sont contrôlés par un réseau nerveux synaptique à propagation continue situé dans l'ectoderme-mésoglée (Satterlie et al. 1980). Le péristaltisme, par contre, serait gouverné par un autre réseau nerveux encore inconnu, impliquant un pacemaker (Anderson et Case 1975; Anctil 1989a).

Parmi les pennatulacés en particulier, certaines espèces, *Acanthoptilum*, *Ptilosarcus*, *Renilla*, *Pennatula phosphorea* (Anderson et Case 1975; Shelton 1975; Satterlie et al. 1976) semblent posséder deux systèmes de conduction coloniale alors que d'autres, *Stylatula* et *Virgularia* n'en ont qu'un seul (Satterlie et al. 1976). Cette distinction entre

le nombre de système de conduction s'associe avec l'étendue et la vitesse des contractions du rachis. Les pennatulacés rapides subissent une rétraction du rachis rapide et complète et possèdent un seul système de conduction. Les pennatulacés lents, par contre, manifestent un dégonflement lent du rachis et possèdent deux types de conduction. Chez ces derniers, des études électrophysiologiques ont montré des caractéristiques distinctes pour ces deux réseaux. Le premier (appelé le réseau nerveux) est rapide et est responsable du contrôle de la luminescence, de la rétraction des polypes et des contractions du rachis. Lors d'une répétition de stimulation, on observe le phénomène de facilitation (Shelton 1975; Satterlie et al. 1980; Spencer 1991). Le second, appelé système de transmission lent, ne démontre pas de facilitation et est rapidement fatigué. Le réseau nerveux et le système de conduction lent sont distincts et séparés. La découverte d'un système à conduction lente (Shelton 1975) amène d'autres possibilités de contrôle des comportements coloniaux. Chez l'anémone de mer, cette dernière conduction se fait dans la mésoglée et est responsable de procédés de sécrétion, en plus d'interagir avec le réseau nerveux pour contrôler les muscles circulaires et longitudinaux.

1.3.3 Sérotonine chez les cnidaires

La sérotonine (5-HT) a été identifiée dans les trois classes de cnidaires : les Anthozoaires (Mathias et al. 1960; Mazzanti et Piccinelli 1979), les Hydrozoaires (Welsh 1960; Wood et Lentz 1964; Kline et Weissbach 1965) et les Scyphozoaires (Carlberg et Rosengren 1985). Welsh (1960), ayant rapporté la présence de 5-HT chez l'hydre et l'anémone de mer, suggère une association de cette monoamine avec les cellules nerveuses et les nématocystes, cellules urticantes, une association d'ailleurs confirmée chez la pensée de mer par Umbriaco et al. (1990).

1.3.4 Sérotonine chez un anthozoaire : la pensée de mer

La sérotonine a fait l'objet de quelques études chez la pensée de mer, *Renilla koellikeri* (Fig. 2), où elle y a été détectée par HPLC-ED (Pani et Anctil 1994a, b). Cette analyse a permis de détecter la présence de molécules associées aux indolamines, dont le

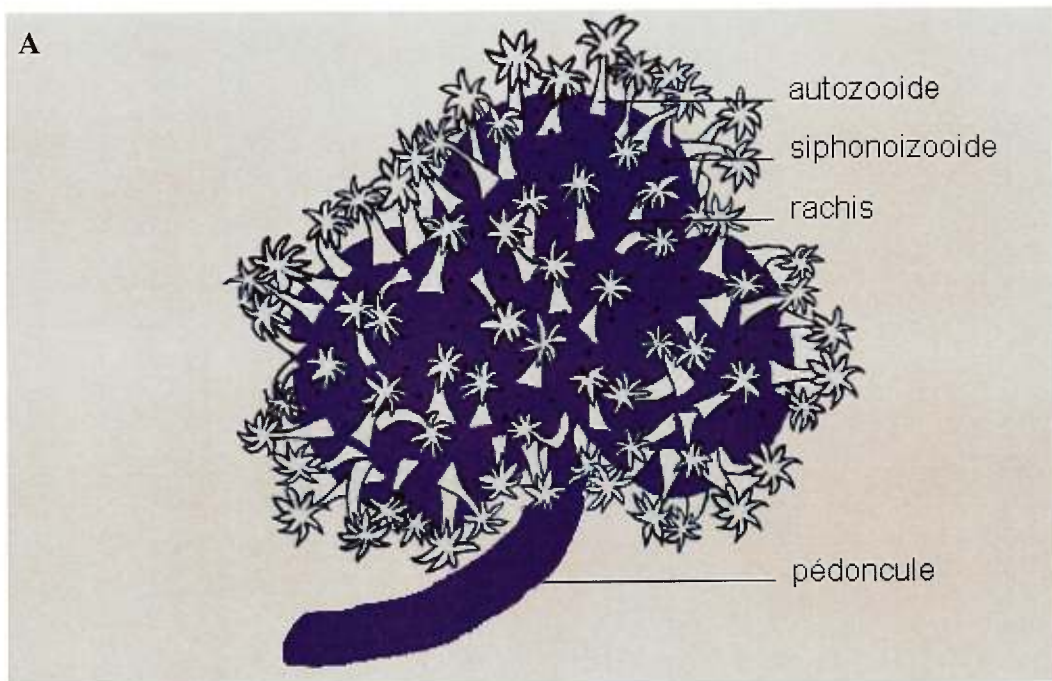
tryptophane (Trp) et le 5-hydroxytryptophane (5-HTP), précurseurs de la sérotonine, en quantités abondantes. Ces résultats suggèrent que la pensée de mer ai le potentiel de synthétiser la sérotonine (Carlberg et Anctil 1993; Pani et Anctil 1994a, b). Cette monoamine a été localisée dans des cellules nerveuses de l'ectoderme et la mésoglée (Umbriaco et al. 1990). Les neurones ectodermiques présentent une morphologie caractéristique de cellules mécanosensorielles dont le cône ciliaire est projeté vers l'extérieur de la surface ectodermique. À l'opposé de cet appendice apparaît un prolongement unique qui, par la suite, bifurque en plusieurs neurites longeant la bordure ectodermique-mésogléenne, y formant ainsi un plexus nerveux. Les neurones bipolaires de la mésoglée ont de courts prolongements qui participent au réseau nerveux sous-ectodermique et mésogléen, alors que d'autres s'étendent vers les muscles endodermiques (Umbriaco et al. 1990) responsables de la contraction péristaltique (McFarlane 1973, 1974).

Des études sur les récepteurs sérotoninergiques par Hajj-Ali et Anctil (1997) ont démontré la présence d'un récepteur spécifique pour la sérotonine. Cependant, contrairement aux récepteurs sérotoninergiques chez les autres invertébrés, celui-ci présente une absence d'affinité envers le LSD, un agoniste de la 5-HT. De plus, le profil pharmacologique des sites de liaison ne ressemble à aucun récepteur à 5-HT mammalien connu. Ces résultats permettent de croire que le récepteur à 5-HT de la pensée de mer précède évolutivement la différenciation des récepteurs à 5-HT en plusieurs classes. Les sites de liaisons à 5-HT ont été trouvés en prédominance dans les tissus ectodermiques et endodermiques lors d'études autoradiographiques (Dergham et Anctil 1998) et ont été associés à des cellules ressemblant aux neurones. Dans le tissu ectodermique, les récepteurs à 5-HT sont concentrés dans la région basoectodermique (Dergham et Anctil 1998), région où est localisé le réseau nerveux sous-ectodermique dont les prolongements des neurites à 5-HT font partie (Umbriaco et al. 1990). Cette correspondance entre récepteurs et innervation de la 5-HT suggère que cette monoamine module ce réseau nerveux sous-ectodermique. Au niveau de l'endoderme, au contraire, la présence de récepteurs à 5-HT n'est pas accompagnée d'une innervation

sérotoninergique (Umbriaco et al. 1990). Les récepteurs à 5-HT n'ont d'ailleurs pas été localisés sur les cellules myoépithéliales, mais sur des cellules avoisinant les cellules musculaires. Cette absence de corrélation suggère un mode de communication paracrine où la 5-HT est libérée par des terminaisons mésogléennes et se diffuse jusqu'aux sites récepteurs de l'endoderme.

1.3.4.1 Modulation du péristaltisme chez la pensée de mer

On a montré que chez cet anthozoaire la 5-HT module un comportement rythmique endogène : le péristaltisme. L'injection de sérotonine provoque une augmentation de l'amplitude du péristaltisme proportionnelle à celle créée par de faibles mouvements d'eau, mais n'affecte ni la vitesse ni le tonus de ces contractions (Anctil 1989a). Habitant des eaux peu profondes et sablonneuses sujettes à de forts courants, la pensée de mer manifeste ce comportement afin de se dégager des sédiments qui l'ensevelissent. Ces contractions amènent le rachis à se fléchir et à former un sillon par lequel le sable s'écoule, libérant ainsi les polypes (Kastendiek 1976; Anctil 1994). Affecté par la vitesse des courants d'eau, ce comportement semble donc être sous l'influence sérotoninergique. L'administration de substances épuisant les stocks de sérotonine, telle la réserpine, ou des neurotoxines tels le 5,7-dihydroxytryptamine, a d'ailleurs montré une diminution de l'activité péristaltique (Anctil 1989a). L'addition de 6-hydroxydopamine, un destructeur spécifique des terminaisons nerveuses adrénergiques, n'a eu aucun effet sur l'activité péristaltique, indiquant bien la spécificité de la modulation par le système sérotoninergique (Anctil et al. 1982). L'AMPc dibutyrique et l'AMPc 8-bromocyclique, deux homologues perméables de l'AMPc, induisent une augmentation de l'amplitude similaire à celle causée par l'addition de la sérotonine dans le milieu. De plus, dans des tissus incubés avec la sérotonine, on observe une augmentation de la concentration



C

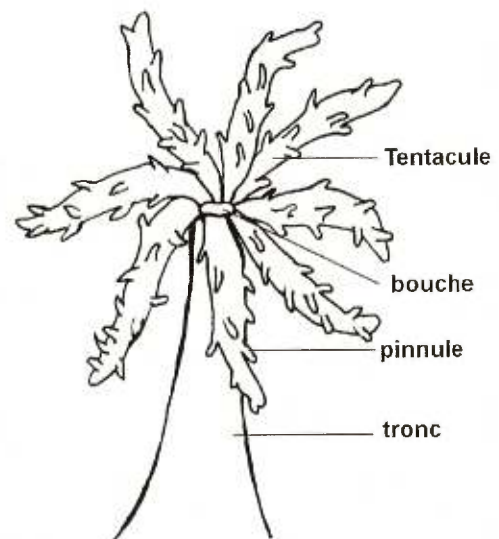


Fig.2 Représentations schématiques de *Renilla koellikeri* et de ses individus. **A.** Schéma de l'organisation de la pénée de mer. **B.** Micrographie d'un polype en microscopie électronique à balayage. Échelle 500 μm . **C.** Schéma d'un individu polyplôïde.

d'AMPC (Anctil 1989a) et de l'activité enzymatique de l'adénylate cyclase (Awad et Anctil 1993). La modulation de la sérotonine par l'intermédiaire de l'AMPC a été aussi observée chez les protozoaires (McMahon 1974), l'escargot d'eau douce, *Planorbarius corneus* (Ferretti et al. 1996), ainsi que chez de nombreux vertébrés. De plus l'étude de Hajj-Ali et Anctil (1997) sur les récepteurs sérotoninergiques de la pensée de mer a montré qu'en présence d'un analogue non-hydrolysable à la GTP, le péristaltisme était inhibé. Toutes ces études appuient fortement l'hypothèse que cette activité péristaltique est modulée par la sérotonine et que cette monoamine agit sur un récepteur couplé à une protéine G.

1.4 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

Les études passées ont démontré la modulation du péristaltisme par la 5-HT (Anctil 1989a). Cependant, le mécanisme d'action emprunté par cette monoamine reste encore confus. La présence de cellules sérotoninergiques mécanosensorielles au niveau de l'ectoderme (Umbriaco et al. 1990) suggère que la pensée de mer puisse détecter les fluctuations de courants d'eau et ainsi adapter son comportement. Ces neurones interagissent avec les cellules 5-HT ou non 5-HT du réseau nerveux ectodermique-mésogléen. Cependant, aucun neurone à 5-HT n'a été localisé dans l'endoderme, région musculaire (Umbriaco et al. 1990), bien que des récepteurs à 5-HT ont été identifiés dans ce tissu (Dergham et Anctil 1998). Ainsi, deux hypothèses s'offrent à nous. La première est que la 5-HT agisse comme une neurohormone libérée par des neurones ectodermiques et mésogléens et diffusant jusqu'aux cellules musculaires endodermiques. La seconde est qu'elle peut agir sur un pacemaker nerveux responsable de la génération de ce comportement.

Afin d'apporter plus d'éléments à la compréhension du mode d'action de ce comportement, une étude d'immunocytochimie en pré-enrobage en microscopie électronique à transmission a donc été entreprise. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir quelles sont les cellules avoisinant les terminaisons des cellules

sérotoninergiques, à savoir si ce sont des cellules musculaires ou nerveuses. Dans un deuxième temps, nous avons voulu connaître la structure fine des cellules sérotoninergiques. Finalement, l'analyse de ces résultats nous permettra de postuler un mécanisme possible sur le mode d'action de la sérotonine.

L'immunocytochimie est un ensemble de techniques de marquage permettant de localiser des éléments, la sérotonine dans notre cas, au niveau ultrastructural. Dans notre étude l'immunocytochimie fut faite en pré-enrobage. Cette méthode consiste à provoquer la réaction entre l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire couplé au révélateur (peroxydase) avant d'enrober et de polymériser le tissu dans une résine de plastique. La révélation s'effectue par la réaction du 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochlorure (DAB) avec la peroxydase formant ainsi un dépôt opaque flocculant en microscopie électronique à transmission.

2. ARTICLE

Ultrastructural Localization of Serotonin Immunoreactivity at
Neuro-Neuronal and Neuromuscular Junctions in the Cnidarian
Renilla koellikeri

NATACHA BENRIMOH AND MICHEL ANCTIL

Département de sciences biologiques et Centre de recherche en sciences neurologiques

Université de Montréal

Soumis à la revue Biological Bulletin en avril 1999

Running head: SEROTONIN IN SEA PANSY NEURONS

Ultrastructural Localization of Serotonin Immunoreactivity at
Neuro-Neuronal and Neuromuscular Junctions in the Cnidarian
Renilla koellikeri

NATACHA BENRIMOH AND MICHEL ANCTIL

Département de sciences biologiques and Centre de recherche en sciences neurologiques,

Université de Montréal

Case postale 6128, Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Address for correspondence: Dr. Michel Anctil, Département de sciences biologiques,
Université de Montréal, Case postale 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec,
Canada H3C 3J7

Abstract. Serotonin (5-HT) was reported to modulate peristaltic contractions in the cnidarian Renilla koellikeri, but the pathway of modulation, either through neuro-neuronal or direct neuromuscular contacts, was not determined. We localized 5-HT immunoreactivity by pre-embedding immunoelectron microscopy in order to trace contacts made by serotonergic neurons. Immunoreactivity was present primarily in nerve cells and nematocytes previously identified by light-microscopic immunohistochemistry. In nematocytes, it was localized primarily in the cytosol around the nematocyst. Immunoreactive neurites were distributed widely throughout the ectoderm, mesoglea and endoderm and were apposed to other neurites, some of which also immunoreactive, as well as to musculo-epithelial cells. Immunoreactive neurites contained dense-cored and/or electron-lucent vesicles exhibiting a wide range of diameters (50-214 nm) and a scattered distribution within terminals. Ectodermal and mesogleal neuro-neuronal junctions involving immunoreactive neurites rarely displayed synaptic specializations such as paired electron-dense membranes and cleft densities, whereas corresponding neuro-neuronal and neuromuscular junctions in the endoderm appeared to possess synaptic features more prominently. These results suggest that 5-HT acts as an intracrine regulator in nematocytes and as a broad-range modulator of peristaltic activity in the sea pansy through complex synaptic and non-synaptic contacts on both nerve and muscle cells.

Introduction

Serotonin (5-HT) is an ubiquitous monoamine known to act as a neuromodulator across phylogeny (Weiger, 1997). Involved in the modulation of diverse behaviors, the role of 5-HT as a transmitter appears to go back to the most primitive animals endowed with a nervous system. Early works reported effects of 5-HT on motor behaviors in a few cnidarians (Ross, 1960 a, b; Kass-Simon and Passano, 1978). In the sea pansy Renilla koellikeri, a colonial anthozoan, 5-HT was reported to specifically modulate a peristalsis behavior (Anctil, 1989).

The sea pansy abides in shallow and tumultuous sandy bottoms along the Californian coast (Kastendiek, 1976). As an adaptive feature to this agitated environment, the sea pansy undergoes rhythmic peristalsis to sweep the sediments accumulated on its colonial mass. Serotonin was shown to enhance the amplitude of peristaltic contractions in a dose-dependant manner, thereby mimicking the effect of changes in water flow over the colony (Anctil, 1989).

The substrate for the modulation of peristalsis by 5-HT appears to be neural. An immunohistochemical study by Umbriaco et al. (1990) revealed the presence of 5-HT-immunoreactive neurons (5-HT-IR) in the ectoderm and in the mesoglea of the sea pansy. The 5-HT-IR ectodermal neurons are mechanosensory neurons typically found in anthozoans, with an apical cone extending at the surface (Peteya, 1975). In addition, 5-HT-IR mesogleal neurons extend neurites along the ectoderm-mesoglea boundary on the one hand, and toward the mesoglea-endoderm boundary on the other (Umbriaco et al.,

1990). As the musculo-epithelial cells are located in the endoderm, this suggests the presence of a serotonergic pathway from sensory input in the ectoderm to motor output in the endoderm.

The distribution of 5-HT-IR neurons suggests two hypotheses regarding the implication of 5-HT in the modulation of peristalsis. Ectodermal 5-HT neurons may interact with a group of nerve cells acting as pacemakers responsible for generating the rhythmic motor output. Alternatively, 5-HT can modulate myoepithelial cells directly. Recent studies reported the presence of specific binding sites for this monoamine (Hajj-Ali and Anctil, 1997) which appeared in autoradiograms to be localized on neurons in the ectoderm, mesoglea and endoderm (Dergham and Anctil, 1998). These observations are consistent with the hypothesis that 5-HT acts through other nerve cells which regulate musculo-epithelial cell activity. However, no conclusive evidence was obtained because of the limited resolution of light microscopic autoradiography.

Therefore an electron microscopic study was undertaken to resolve the structure of serotonergic cells and to identify cells in contact with them. Ultrastructural studies in cnidarians have demonstrated that junctional specializations exist between their primitive nerve cells. Chemical synapses were identified between neurons and between neurons and their effector cells in all cnidarian classes (Horridge and Mackay, 1962; ; Westfall, 1970; Anderson and Schwab, 1981; Anderson and Grünert, 1988; Westfall, 1996 for review). Whether the 5-HT-IR neurons of the sea pansy establish specialized junctions and with what cells needs to be investigated. This in turn may shed some light on pathways underlying peristalsis modulation by 5-HT.

Toward this goal, an immunocytochemical approach using the pre-embedding method was chosen. Here we describe the ultrastructure of 5-HT-IR cells and especially the nature of contacts made by 5-HT-IR neurons with elements of their cellular environment.

Materials and Methods

Colonies of sea pansies Renilla koellikeri Pfeffer were shipped from California (Marinus Inc., Long Beach, CA.) to Montreal where they were kept in a tank of circulating, aerated and filtered artificial sea water (ASW). The sea pansies, unfed, were exposed to a 12h:12h light-dark cycle and a water temperature similar with their own environment. For this study, autozoid polyps were utilized a few days after arrival, and a total of 100 polyps from 20 colonies were processed.

Pre-embedding immunocytochemistry for transmission electron microscopy was performed on autozooids using two different antibodies against 5-HT. One of the antibodies required paraformaldehyde fixation while the other required glutaraldehyde as a fixative. The first antibody (Incstar Corp.), raised in rabbit, has already been used successfully for fluorescence and peroxidase immunohistochemical studies against 5-HT in the sea pansy (Umbriavo et al. 1990). The second, a monoclonal antibody provided by M. Geffard, University of Talence, France (Geffard et al., 1988), allowed fixation in glutaraldehyde for improved tissue preservation at the ultrastructural level.

Sea pansies were anesthetized in 0.37 M MgCl₂ and ASW (1:1). Polyps were cleaved from the rachis and immersed in one of two freshly prepared fixatives: 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB, 0.1 M, pH 7.4) or 3.5% glutaraldehyde in PB for 4 h. The tissues were then coated with agarose for 24 h and sliced with a vibratome to a thickness of 100 μm.

Tissues fixed in paraformaldehyde were rinsed 3x15 min in PB with saline (PBS 0.1 M, pH 7.4) and 0.08 M glycine. The sections were then exposed to a 0.3% H₂O₂ solution for 20 min followed by a 1% NaBH₄ solution for 30 min to inactivate free aldehyde groups. They were then rinsed for 1 h at 4°C with PBS, preincubated for 1 h in PBS with 10% of normal goat serum (NGS), and incubated with the primary antibody diluted 1:500 at 4°C for 48h. Three 15-min rinses followed before an overnight incubation at 4°C in horseradish peroxidase (HRP) diluted 1:100 (Jackson ImmunoResearch). After a 30 min wash the tissues were incubated in 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) intensified with 1% CoCl₂ and 1% nickel ammonium sulfate and revealed with 0.01% H₂O₂. The tissues were then washed 3x15 min with PBS.

Tissues fixed with glutaraldehyde were rinsed 2x5 min in Tris metabisulfite saline (TMBS 0.05 M, pH 7.4), and exposed to NaBH₄ for 15 min. After a few washes in TMBS, they were preincubated for 1 h in TMBS with 10% NGS, 0.5% bovine serum albumine (BSA) and 0.1% sodium azide, and then incubated with the primary antibody diluted 1:5000 for 48 h at 4°C. After rinsing in Tris buffer (0.05 M, pH 7.4) sections were incubated in HRP for 2 h and rinsed in the same buffer. The tissues were then exposed to

the ABC kit (Vector Laboratories) for 2 h prior to a 30-min wash, and to DAB reacted with H₂O₂ for 10 min.

All tissues were then postfixed in 1% OsO₄ for 1 h and dehydrated in ascending grades of ethanol followed by propylene oxide. The tissues were embedded in a mixture of Epon and Araldite and the tissue blocks polymerized for 24 h at 60°C. Semi-thin sections were observed first by light microscopy and tissue blocks of interest were used to obtain ultrathin sections on a Sorvall MT2-B ultramicrotome. Sections were collected on 200-mesh copper grids and counterstained with uranyl acetate and lead citrate. They were examined with a JEOL JEM-100S transmission electron microscope.

Results

Both paraformaldehyde and glutaraldehyde conjugated antibodies gave positive results. However, tissues fixed with glutaraldehyde showed a superior preservation of cell structure and organization. Control sections in which the primary antibodies were omitted exhibited no specific reactivity. The pre-embedding technique was primarily used to locate 5-HT-immunoreactive (5-HT-IR) cells and contacts made by 5-HT-IR neurites with other cells. Despite the flocculent aspect of the DAB precipitate, it was still possible to describe the ultrastructure of the stained cells and to resolve their organelles. Attempts to improve resolution of subcellular labeling by using the post-embedding immunocytochemical technique of Kiliaan et al. (1996) for 5-HT gave unsatisfactory results.

Organization of autozooid polyps

Sea pansies, like all anthozoans, are exclusively polypoid. The autozooid polyps bear eight tentacles at the oral end of the column while the basal end emerges from a colonial mass shaped as a kidney called the rachis. The autozooids are retractile and implicated in reproduction and feeding behavior.

The body walls of autozooids consist of two tissue layers, the ectoderm and the endoderm, separated by a gelatinous medium, the mesoglea in which tracts of intermingled amoebocytes and nerve cells form a plexus. The ectodermal tissue is composed of nematocytes, nervous, mucus and gland cells. Within the endoderm of the coelenteron, three different muscle types, e.g., radial, circular and longitudinal muscles, are present with their cell bodies bordering the gastrovascular cavity. The layout of the nervous system consists principally of ectodermal and mesogleal nerve nets. Ectodermal neurons are mostly ciliated sensory cells whose neurites form a basiepithelial plexus from which some processes extend to the mesogleal nerve net. The latter is formed by somata whose neurites cross each other and occasionally extend between endodermal cells. Sensory cells are present as well in the endodermal layer bordering the gastrovascular cavity. For a more detailed description of the organization and ultrastructure of Renilla koellikeri and other pennatulaceans, see Lyke (1965) and Buisson (1970).

Description of immunostained cells

Immunocytochemistry revealed the presence of 5-HT-IR in all tissues and its association with four cell types, e.g., nerve cells, nematocytes, gland cells and mucous cells.

The most prominently stained cellular elements were ectodermal neurons. In the ectodermal layer, 5-HT-IR cells contained a cilium surrounded by microvilli in a pit (Fig. 1). These appear to correspond to the 5-HT-IR sensory cells depicted by Umbriaco et al. (1990). Deeper in the ectoderm these cells were characterized by an ovoid shape and a cytoplasm filled with clear vesicles of 120 nm in diameter containing a few small granules. These nerve cells were surrounded by regular epithelial cells (Fig. 1) and, less frequently, by mucous cells and nematocytes. They measured 2.5-3.5 μm in the long axis and 1.5-2 μm in the short axis.

Ectodermal 5-HT-IR was also present in nematocytes (Fig. 2). The staining was localised in the cytoplasm of the nematocyte and was particularly prominent around the nematocyst (Fig 2A,B). The nematocyst itself was devoid of any reactivity. The labeled nematocytes contain a ciliary apparatus (Fig 2A), numerous mitochondria, and endoplasmic reticulum profiles (Fig. 2C).

In the endoderm, gland cells contained 5-HT-IR digestive vacuoles typical of those seen in anthozoan gastrodermis (Fautin and Mariscal, 1991; Westfall et al., 1997). A few mucous cells, characterized by a coalescent mass of proteinaceous globules, also exhibited immunoreactivity in their cytoplasmic compartment.

Ultrastructure of immunostained neurites

Defining synapses and their vesicular content unequivocally in jellylike animals such as cnidarians is difficult. We adhered largely to Westfall's (1996) classification and terminology to describe neurites and their junctional complexes. Based on a variety of ultrastructural studies performed on several cnidarian species, she defined a synapse as constituted by paired electron dense membranes separated by a 13-25-nm gap, with dense material in the gap and vesicles on either side in neuro-neuronal contacts. Three vesicle types were identified: electron-lucent vesicles, dense-cored vesicles in which a conspicuous halo is interposed between the granule and the limiting membrane, and opaque (granular) vesicles in which no such halo is apparent.

Immunoreactive neurites were localized in the three layers of the sea pansy (Figs. 3-5). Stained neurites exhibited different populations of vesicles, some of which containing dense-cored vesicles whereas others had either electron-lucent vesicles of variable size. Opaque vesicles were never found in 5-HT-IR neurites. The majority of neurites contained one or two mitochondria (Fig. 3A), usually in their center. The neurites measured 0.8-1.3 μm in their short axis and 1.0-3.6 μm in their long axis (Figs. 3-5). These provide a range, not precise measurements, as they are not based on sampling serial sections. Dense-cored vesicles ranged from 70 to 214 nm in diameter, electron-lucent vesicles 50-150 nm, and opaque vesicles 33-80 nm, sizes that fall within the ranges reported by Westfall (1996).

Immunostained neurites were found at various levels through the ectoderm and contained dense-cored vesicles (Fig. 3B). Reactivity appeared to be distributed

throughout the neurite (Fig. 3A) or concentrated at discrete locations within the neurite (Fig. 3B), but very few specialized junctions, e.g. parallel and dense membranes in physical contact with a few vesicles, were observed. Immunoreactive neurites were surrounded by cell processes containing opaque or granular vesicles (Fig. 3A) similar to those seen in DOPA-immunoreactive ectodermal cells of the sea anemone Metridium senile (Carlberg et al., 1989), or by unidentified cell types (Fig. 3A,B).

In the mesoglea, immunostained neurites contained dense-cored vesicles (Fig. 4A-C) or electron-lucent vesicles (Fig. 4D). These neurites are embedded in small neuropiles that assemble into a nerve plexus (Satterlie et al., 1980). Tracking these neurites through serial sections as shown in Figure 4 illustrates that reactive deposits are locally restricted within profiles that appear relatively empty (Ne1) or filled with vesicles (Ne2 and Ne3). No synaptic specialization was apparent.

Immunoreactive neurites containing electron-lucent vesicles were also present in the vicinity of musculo-epithelial cells in the endoderm (Fig. 5A,B) or of other endodermal neurites (Fig. 5C,D). Direct appositions between immunostained profiles and septal musculo-epithelial cells were apparent (Fig. 5B) in which a gap of 28 nm separated the membranes of each cell. In this case, membranes exhibited parallel alignments in some of these appositions (thick arrow in Fig. 5B), but no gap densities were observed. In contrast, endodermal interneuronal junctions exhibit synaptic-like specializations according to Westfall's (1996) criteria, as shown in Figure 5C,D. These junctions include zones of more or less parallel membranes separated by a 20-25 nm gap containing dense

material. In addition, vesicles heavily coated with reactive precipitate were present on both sides of the junction, in the vicinity of the apposed membranes (Fig. 5C,D).

Discussion

In this ultrastructural investigation we sought to identify 5-HT-IR cells first revealed by light-microscopic immunohistochemistry in the sea pansy (Umbriaco et al. 1990). Our results confirm the presence of 5-HT-IR neurons and nematocytes, but in addition we report the occasional occurrence of immunoreactivity in other, non-neuronal cells. The ultrastructural approach allowed us to reveal synaptic and non-synaptic contacts made by 5-HT-IR neurites with other nerve cells as well as with musculo-epithelial and sensory cells. This suggests that serotonergic neurons are capable of establishing multiple and complex interactions in the sea pansy that are consistent with a role for 5-HT as a wide-range neuromodulator.

Immunoreactivity in non-neural cells

Umbriaco et al. (1990), in agreement with earlier non-immunohistochemical studies in other cnidarians (Welsh, 1960; Kline and Weissbach, 1965; Burnett and Calton, 1977), reported the presence of 5-HT inside nematocysts, but close scrutiny of their photomicrographs suggests that staining was confined mostly to the envelope of the nematocyst. The localization in the present study of immunostaining principally in the nematocyte cytoplasm closest to the nematocyst is consistent with the impression gained

in light-microscopic observations. However, our observation of the lack of reactivity inside the nematocyst calls for a reassessment of the potential significance of 5-HT in nematocytes.

The earlier observations had led to the proposal that 5-HT, considered a skin pain-inducer in mammals (Le Bars, 1988), is part of the chemical arsenal of the discharged nematocyst capsule (Halstead, 1988). At least in the sea pansy, this proposal is now refuted by the localization of 5-HT-IR in the cytoplasm instead of in the capsule of the nematocyte. This new finding leaves open the possibility that 5-HT may participate as an intracellular messenger in the discharge control mechanism of the nematocyst. Alternatively, as suggested by Umbriaco et al. (1990), the presence of 5-HT immunoreactivity in nematocytes may merely reflect the fact that cnidarian nerve cells and nematocytes arise from the same multipotent stem cells (David, 1983), and as a consequence nematocytes may have retained the capacity of storing 5-HT.

The presence of 5-HT-IR in a few vacuoles of endodermal gland cells is in accord with histochemical observations by Wood and Lentz (1964) in Hydra and the sea anemone Metridium senile. The restricted distribution of 5-HT-IR to food vacuoles suggests an occasional entrapment of circulating 5-HT by digestive cells through phagocytosis. We also found 5-HT-IR in mucous cells of the sea pansy, especially in the cytoplasm bordering their large globules filled with mucoid material as also observed by Elofsson and Carlberg (1989) in mucous cells of the scyphozoan Cyanea lamarcki. The significance of this finding is unclear.

Immunoreactivity in nerve cells

Our study confirmed the localization of 5-HT immunoreactivity in ectodermal nerve cells of the sea pansy, as first reported by Umbriaco et al. (1990). The ultrastructure of these cells is in accordance with the description of sensory cells in a closely related species, the sea pen Ptilosarcus gurneyi (Chia and Crawford, 1977). Umbriaco et al. (1990) had identified these as sensory cells on the basis of the presence at their apex of tuft that resembled the apical cone described in sea anemones (Peteya, 1975; Westfall and Sayyar, 1997) and in another pennatulacean (Buisson, 1970) as consisting of a cilium surrounded by a crown of stereocilia. We found such a structure in the 5-HT-IR ectodermal cells of the sea pansy (Fig. 1).

While 5-HT-IR nerve cell bodies were found only in the ectoderm, immunostained neurites were widely distributed in ectoderm, mesoglea and endoderm. Umbriaco et al. (1990) reported the presence of 5-HT-IR neurons with small somata in the mesoglea adjacent either to the ectoderm or to the endoderm, but they appeared to be less prominent than their ectodermal counterparts. Thus it is probable that our survey at the ultrastructural level was inadequate to detect them, given the sparse distribution of these cells in loosely arranged cnidarian nerve nets (Westfall, 1996).

The vesicle content of 5-HT-IR varicosities in the sea pansy resembles that found in serotonergic neurons of vertebrates (Beaudet and Descarries, 1987, for review; Kiliaan et al., 1996; Liem and Copray, 1996) and of the majority of invertebrates investigated (Penreath and Cottrell, 1974; Schwartz et al., 1982; Kuffler et al., 1987; but see Livingstone et al., 1981) inasmuch as it is characterized by the presence of clear

(electron-lucent) and dense-cored vesicles. It differs from that of vertebrates and higher invertebrates in that there is no major difference of size between the two types of vesicles in the sea pansy, whereas clear vesicles are substantially smaller than dense-cored vesicles in vertebrates. In addition, the granule of dense-cored vesicles is smaller relative to the vesicle size in sea pansy 5-HT-IR neurites compared with corresponding terminals from other phyla. Our observations with pre-embedded material give little clue about which vesicle type stores 5-HT, except that immunoprecipitates clustered around electro-lucent, not dense-cored vesicles. In preparations in which post-embedding immunocytochemistry was applied, either dense-cored vesicles only (Pelletier et al., 1981; Kuffler et al., 1987; Kiliaan et al., 1996) or both vesicle types (Liem and Copray, 1996) exhibited 5-HT labeling.

None of the 5-HT-IR neurites observed in the sea pansy contained the third vesicle type in Westfall's (1996) classification: opaque vesicles. The latter were consistently found in cnidarian neurons to be immunoreactive against antibodies to neuropeptides (Koizumi et al., 1989; Singla and Mackie, 1991; Westfall and Grimmelikhuijzen, 1993; Westfall et al., 1995), including Antho-RFamide which is present in the sea pansy (Grimmelikhuijzen and Groeger, 1987). Thus it is unlikely that Antho-RFamide and 5-HT are present in the same neurons.

Sea pansy neurites exhibiting 5-HT-IR were apposed to other nerve cells in the ectoderm and mesoglea as well as to endodermal musculo-epithelial cells. Few synaptic specializations matching the descriptions by Westfall (1996) for cnidarians were found among those appositions between nerve cells. Because our survey did not include an

extensive sampling from serial sections, it was not possible to provide a precise assessment of the frequency of occurrence of synapses. When present they exhibited paired and electron-dense membranes with dense material in the narrow (20-30 nm) synaptic cleft. This rarity of synapses appears to be a common feature of serotonergic systems in vertebrates (Séguéla et al., 1989; Christenson et al., 1990; Killian et al., 1996) as well as invertebrates (Livingstone et al., 1981). It was suggested that non-synaptic junctions are well suited for volumic transmission as opposed to wired (synaptic) transmission (Zoli et al., 1998) and it is consistent with the wide-ranging neuromodulatory actions of 5-HT in many animals investigated (Weiger, 1997). The diffuse distribution of 5-HT-IR neurites in all tissue layers of the sea pansy and the predominance of unspecialized junctions at their varicosities suggest that these features of serotonergic systems were conserved throughout phylogeny from the earliest nervous systems.

Although not abundant as well, synaptic specializations appeared to be more frequently encountered at neuro-neuronal and neuromuscular junctions involving 5-HT-IR neurites in the endoderm. At neuromuscular junctions these specializations comprised single labelled electron-lucent vesicles close to paired, dense membranes, but no postsynaptic densities. The presence of specialized junctions between 5-HT-IR neurites and musculo-epithelial cells suggests strongly a direct participation of 5-HT in neuromuscular transmission. The light-microscopic study by Dergham and Anctil (1998) suggested the absence of 5-HT receptor sites on musculo-epithelial cells in the sea pansy,

although the possibility of such sites was not discarded. The present results lend credence to the latter possibility.

Functional implication

The distribution of 5-HT immunoreactivity in several cell types as well as in neurites throughout all three cellular layers supports a modulatory role for 5-HT in a wide range of functions in the sea pansy for which there is at present no physiological data. We wanted to know if the model proposed by Dergham and Anctil (1998) to account for the modulatory action of 5-HT on peristalsis (Anctil, 1989) is supported by the observations in this study. In that model based on the distribution of 5-HT receptor sites in the sea pansy, it was proposed that 5-HT acts indirectly through nerve nets to affect the strength of peristaltic contractions. As we now provide evidence of 5-HT-IR varicosities contacting musculo-epithelial cells directly, the model is not supported and it appears likely that 5-HT may affect peristalsis in a complex manner through pathways involving both neuro-neuronal and neuromuscular contacts.

Acknowledgment

We thank Louise Pelletier for her valuable help in technical assistance. This work was supported by grant OGP-6447 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M.A.

Literature Cited

- Anctil, M. 1989.** Modulation of a rhythmic activity by serotonin via cyclic AMP in the coelenterate Renilla köllikeri. J. Comp. Physiol. **B159**: 491-500.
- Anderson, P.A.V., and W.E. Schwab. 1981.** The organization and structure of nerve and muscle in the jellyfish Cyanea capillata (Coelenterata; Scyphozoa). J. Morphol. **170**: 383-399.
- Anderson, P.A.V., and U. Grünert. 1988.** Three-dimensional structure of bidirectional, excitatory chemical synapses in the jellyfish Cyanea capillata. Synapse 2:606-613.
- Beudet, A., and L. Descarries. 1987.** Ultrastructural identification of serotonin neurons. Pp. 265-313 in Monoaminergic Neurons: Light Microscopy and Ultrastructure, H.W.M. Steinbusch, ed. John Wiley & Sons, Chichester, U.K.
- Buisson, B. 1970.** Les supports morphologiques de l'intégration dans la colonie de Veretillum cynomorium Pall. (Cnidaria, Pennatularia). Z. Morph. Tiere 68:1-36.
- Burnett, J.W., and G.J. Calton. 1977.** The chemistry and toxicology of some venomous pelagic coelenterates. Toxicon **15**:177-196.
- Carlberg, M., N. Mons, M. Geffard, and D. Nässel. 1989.** L-DOPA and FMRFamide immunoreactivity in the tentacular nerve plexus of the sea anemone Metridium senile. Comp. Biochem. Physiol. **94C**:435-440.
- Chia, F.S., and B. Crawford. 1977.** Comparative fine structural studies of planulae and primary polys of identical age of the sea pen, Ptilosarcus gurneyi. J. Morph. **151**:131-158.

- Christenson, J., S. Culheim, S. Grillner, and T. Hökfelt. 1990.** 5-Hydroxytryptamine immunoreactive varicosities in the lamprey spinal cord have no synaptic specialisations - An ultrastructural study. Brain Res. **512**: 201-2096.
- David, C.N. 1983.** Stem cell proliferation and differentiation in hydra. Pp. 12-27 in Stem cells, their identification and characterization, C.S. Potten, ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Dergham, P., and M. Anctil. 1998.** Distribution of serotonin uptake and binding sites in the cnidarian Renilla koellikeri: an autoradiographic study. Tissue & Cell **30**: 205-215.
- Elofsson, R., and M. Carlberg. 1989.** Gland cells in the tentacles of the jellyfish Cyanea lamarcki reactive with an antibody against 5-hydroxytryptamine. Cell Tissue Res. **255**: 419-422.
- Fautin, D.G., and R.N. Mariscal. 1991.** Cnidaria: Anthozoa. Pp. 267-358 in Microscopic anatomy of invertebrates, Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria and Ctenophora, F.W. Harrison, ed. Wiley-Liss, New York.
- Geffard, M., S. Tuffet, L. Peuble, and S. Patel. 1988.** Production of antisera to serotonin and their metabolites and their use in immunocytochemistry. Pp. 1-23 in Neuronal serotonin, N.N. Osborne and M. Hamon, eds. John Wiley and Sons, New York. .
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., and A. Groeger. 1987.** Isolation of the neuropeptide pGlu-Gly-Arg-Phe-amide from the pennatulid Renilla köllikeri. FEBS Lett. **211**:105-108.

- Hajj-Ali, I., and M. Anctil. 1997.** Characterization of a serotonin receptor in the cnidarian Renilla koellikeri: A radiobinding analysis. Neurochem. Int. **31**: 83-93.
- Halstead, B.W. 1988.** Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. Darwin Press, Princeton, N.J.
- Horridge, G.A., and B. Mackay. 1962.** Naked axons and symmetrical synapses in coelenterates. Quart. J. Microsc. Sci. **105**: 531-541
- Kass-Simon, G., and L.M. Passano. 1978.** A neuropharmacological analysis of the pacemakers and conducting tissues of Hydra attenuata. J. Comp. Physiol. **A128**: 71-79.
- Kastendiek, J. 1976.** Behavior of the sea pansy Renilla köllikeri Pfeffer (Coelenterata: Pennatulacea) and its influence on the distribution and biological interactions of the species. Biol. Bull. **151**: 518-537.
- Kiliaan, A.J., G. Scholten, and J.A. Groot. 1996.** Ultrastructural study of the presence of vasoactive intestinal polypeptide and serotonin in mucosal nerve fibres and endocrine cells of the intestine of goldfish (Carassius auratus) and tilapia (Oreochromis mossambicus). Cell Tissue Res. **283**: 143-150.
- Kline, E., and H. Weissbach. 1965.** Hydroxyindoleamines in the nematocysts of Hydra littoralis. Life Sci. **4**: 63-67.
- Koizumi, O., J.D. Wilson, C.J.P. Grimmelikhuijzen, and J.A. Westfall. 1989.** Ultrastructural localization of RFamide-like peptides in neuronal dense-cored vesicles in the peduncle of Hydra. J. Exp. Zool. **249**: 17-22.

- Kuffler, D.P., J. Nicholls, and P. Drapeau. 1987.** Transmitter localization and vesicle turnover at a serotonergic synapse between identified leech neurons in culture. J. Comp. Neurol. **256**:516-526.
- Le Bars, D. 1988.** Serotonin and pain. Pp. 171-229 in Neuronal Serotonin, N.N. Osborne and M. Hamon, eds. John Wiley and Sons, New York.
- Liem, R.S.B., and J.C.V.M. Copray. 1996.** Immunogold localization of serotonin within synaptic terminals in the rat mesencephalic trigeminal nucleus. Acta Anat. **155**: 50-56.
- Livingstone, M.S., S.F. Schaeffer, and E.A. Kravitz. 1981.** Biochemistry and ultrastructure of serotonergic nerve endings in the lobster: serotonin and octopamine are contained in different nerve endings. J. Neurobiol. **12**:27-54.
- Lyke, E.B. 1965.** The histology of the sea pansies Renilla reniformis (Pallas) and Renilla köllikeri (Pfeffer) with a note on the fine structure of the latter species. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin. Madison.
- Pelletier, G., H.W.M. Steinbusch, and A.A.J. Verhofstad. 1981.** Immunoreactive substance P and serotonin present in the same dense-cored vesicles. Nature **293**:71-72.
- Penreath, V.W., and G.A. Cottrell. 1974.** Anatomy of an identified serotonin neurone studied by means of injection of tritiated « transmitter ». Nature **250**:655-658.
- Peteya, D.J. 1975.** The ciliary-cone sensory cell of anemones and cerianthids. Tissue and Cell **7**:243-252.

- Ross, D.M. 1960a.** The effects of ions and drugs on neuromuscular preparations of sea anemones. I. On preparations of the column of Calliactis and Metridium. J. Exp. Biol. **37**:732-752.
- Ross, D.M. 1960b.** The effects of ions and drugs on neuromuscular preparations of sea anemones. II. On sphincter preparations of Calliactis and Metridium. J. Exp. Biol. **37**:753-774.
- Satterlie, R.A., P.A.V. Anderson, and J.F. Case. 1980.** Colonial coordination in anthozoans: Pennatulacea. Mar. Behav. Physiol. **7**:25-46.
- Schwartz, J.H., C.H. Bailey, R.D. Hawkins, and M.C. Chen. 1982.** Functional architecture of two identified serotonergic neurons in *Aplysia*: morphological studies of synaptic modulation. Pp. 495-515 in Cytochemical Methods in Neuroanatomy, V. Chan-Palay, ed. Alan R. Liss, New York.
- Seguela, P., K.C. Watkins, and L. Descarries. 1989.** Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. J. Comp. Neurol. **289**: 129-142.
- Singla, C.L., and G.O. Mackie. 1991.** Immunogold labelling of FMRFamide-like neuropeptide in neurons of Aglantha (Hydromedusae: Trachylina). Can. J. Zool. **69**:800-802.
- Umbriaco, D., M. Anctil, and L. Descarries. 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.

- Welsh, J.H. 1960.** 5-Hydroxytryptamine in coelenterates. Nature **186**: 811-812.
- Westfall, J.A. 1970.** Ultrastructure of synapses in a primitive coelenterate. J. Ultrastr. Res. **32**:237-246.
- Westfall, J.A. 1996.** Ultrastructure of synapses in the first evolved nervous systems. J. Neurocytol. **25**: 735-746
- Westfall, J.A., and C.J.P. Grimmelikhuijzen. 1993.** Antho-RFamide immunoreactivity in neuronal synaptic and nonsynaptic vesicles of sea anemones. Biol. Bull. **185**:109-113.
- Westfall, J.A., and K.L. Sayyar. 1997.** Ultrastructure of neurons and synapses in the tentacle epidermis of the sea anemone Calliactis parasitica. J. Morph. **232**:207-216
- Westfall, J.A., K.L. Sayyar, and J.K. Bone. 1997.** Ultrastructure of neurons and synapses in the tentacle gastrodermis of the sea anemone Calliactis parasitica. J. Morph. **231**:217-223.
- Westfall, J.A., K.L. Sayyar, C.F. Elliott, and C.J.P. Grimmelikhuijzen. 1995.** Ultrastructural localization of Antho-RWamides I and II at neuromuscular synapses in the gastrodermis and oral sphincter muscle of the sea anemone Calliactis parasitica. Biol. Bull. **189**:280-287.
- Wood, J.G., and T.L. Lentz. 1964.** Histochemical localization of amines in Hydra and in the sea anemone. Nature **201**: 88-90.
- Zoli, M., C. Torri, R. Ferrari, A. Jansson, I. Zini, K. Fuxe, and L.F. Agnati. 1998.** The emergence of the volume transmission concept. Brain Res. Rev. **26**:136-147.

Figure 3. Electron micrographs of a 5-HT-IR ciliated cell sampled from serial tangential sections through the ectoderm. From A to C sections become more superficial. Note the cilium in A and B (arrows). Note in C the pit (between arrows) in which both the cilium and associated stereocilia are recessed. Reactivity is apparent throughout the cell. Tissue fixed in glutaraldehyde. N, nematocyst. Scale bar = 1 μ m.

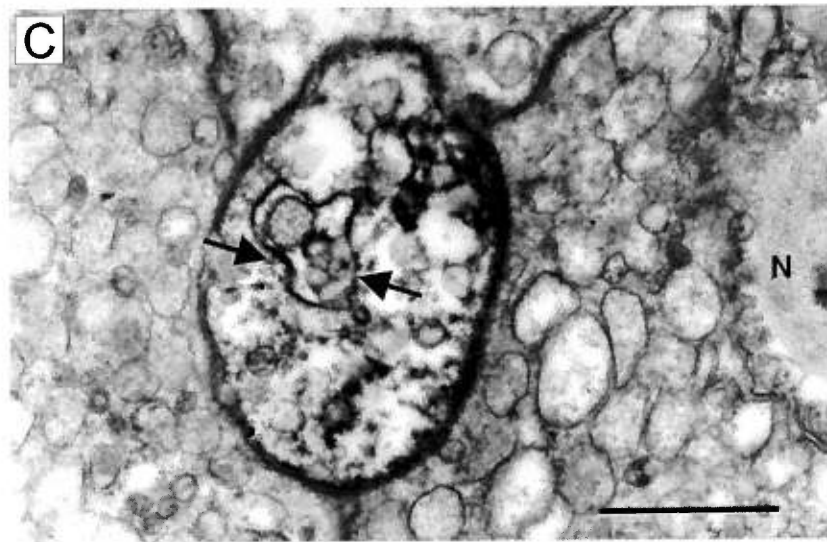
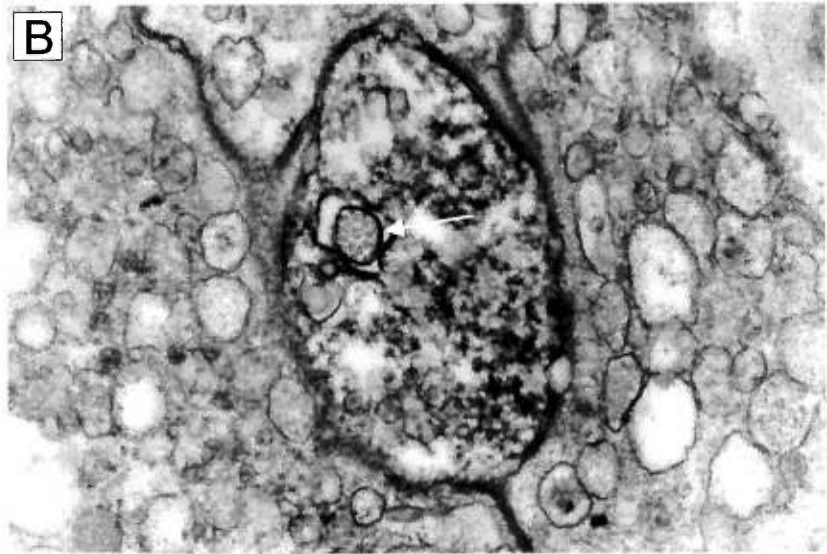
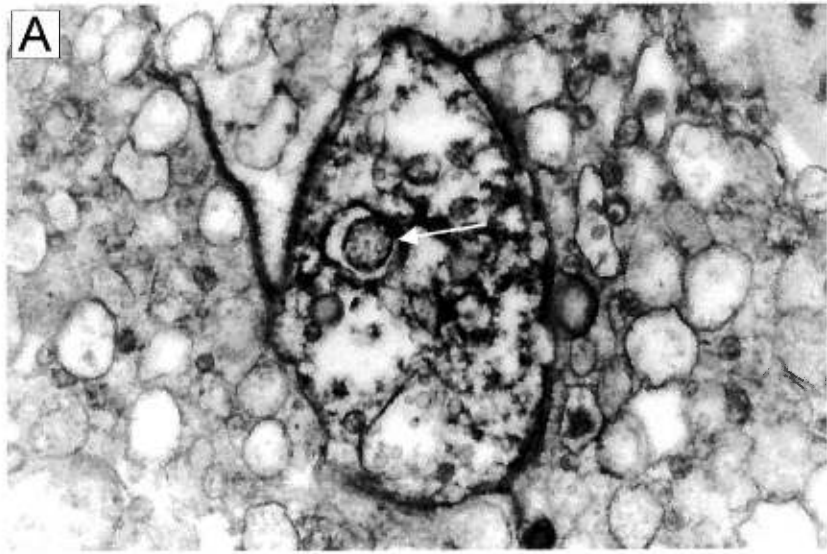


Figure 4. Electron micrographs of 5-HT-IR nematocytes in the ectoderm. **A,B:** two samples from serial sections through a nematocyte. Reactivity is apparent throughout the cytoplasm and especially around (arrow), but not in, the nematocyst. Tissue fixed in glutaraldehyde. **C:** nematocytes at the base of a tentacle. Immunoreactive vesicles (arrows) are located in the cytoplasm around the nematocysts (N) and their nucleus (Nun). Tissue fixed in paraformaldehyde. C, cilium; M, mitochondria; Nu, ectodermal cell nuclei; S, septate desmosome. Scale bar = 1 μ m.

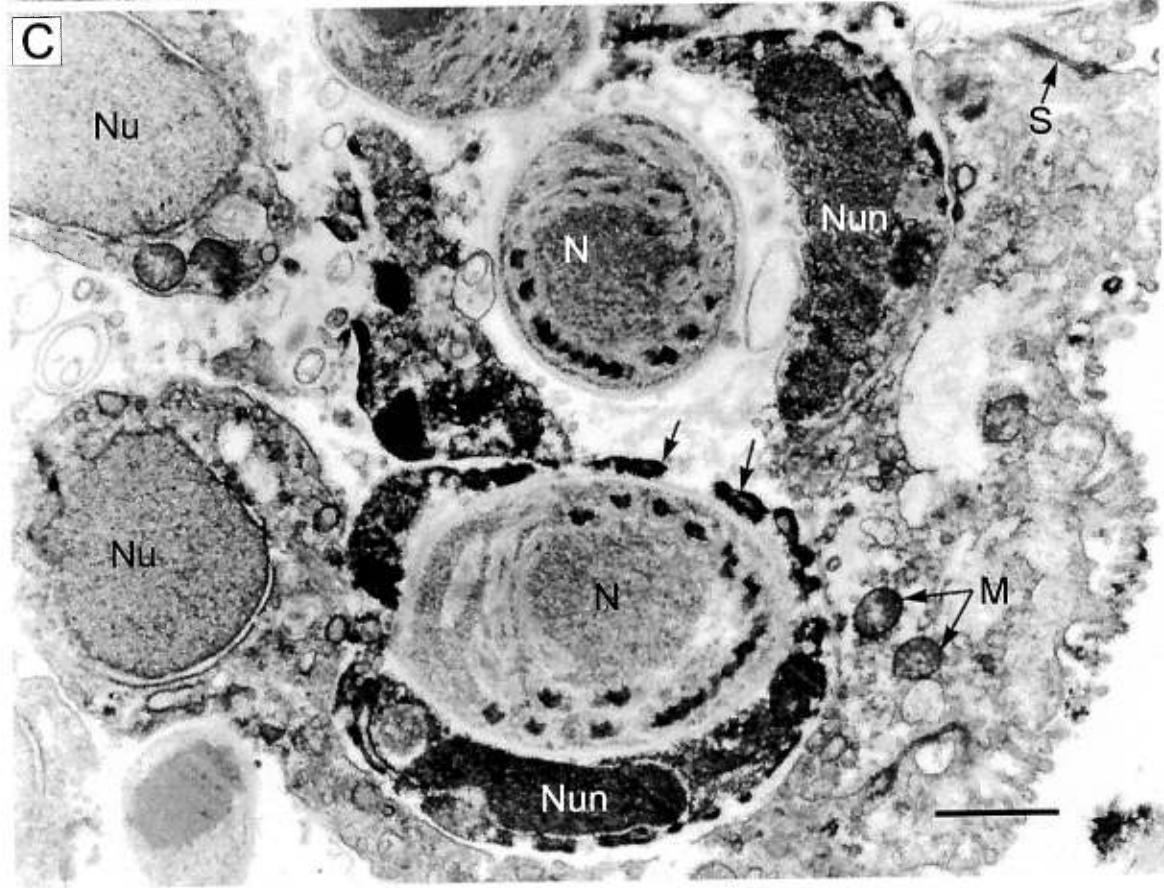
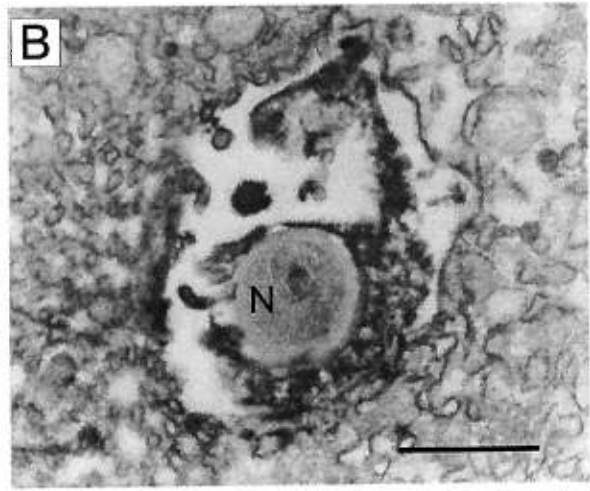
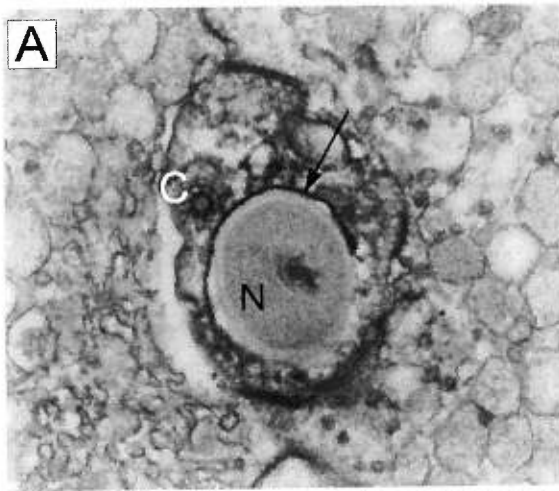


Figure 5. Electron micrographs of neurites in the ectoderm. **A**, 5-HT-IR neurite in the basal ectoderm. The neurite (arrow), in which two mitochondria are present, is closely apposed to a neurosecretory cell (NS) in which numerous opaque vesicles are present. Note that one cell stands between the neurite and the mesoglea (Me). **B**, neurite in which reactivity is confined mostly to a small area (arrow) and which contains dense-cored vesicles (De). Both tissues fixed in paraformaldehyde. Scale bars = 0.5 μm .

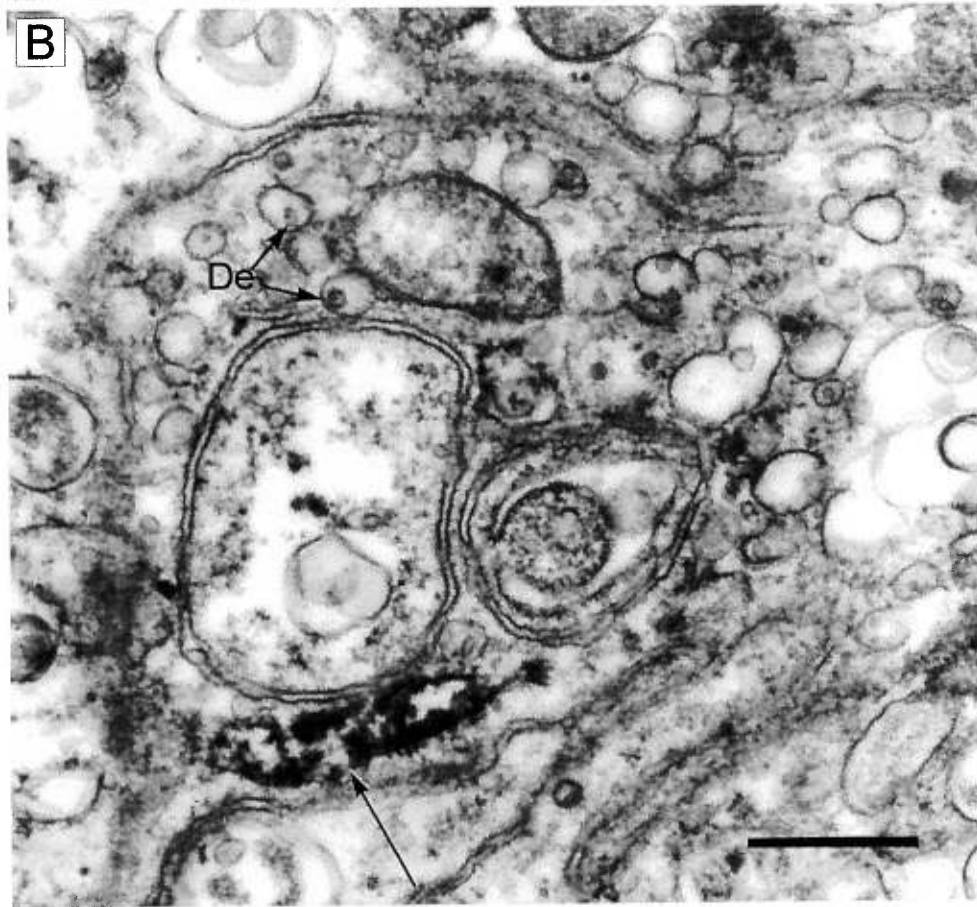
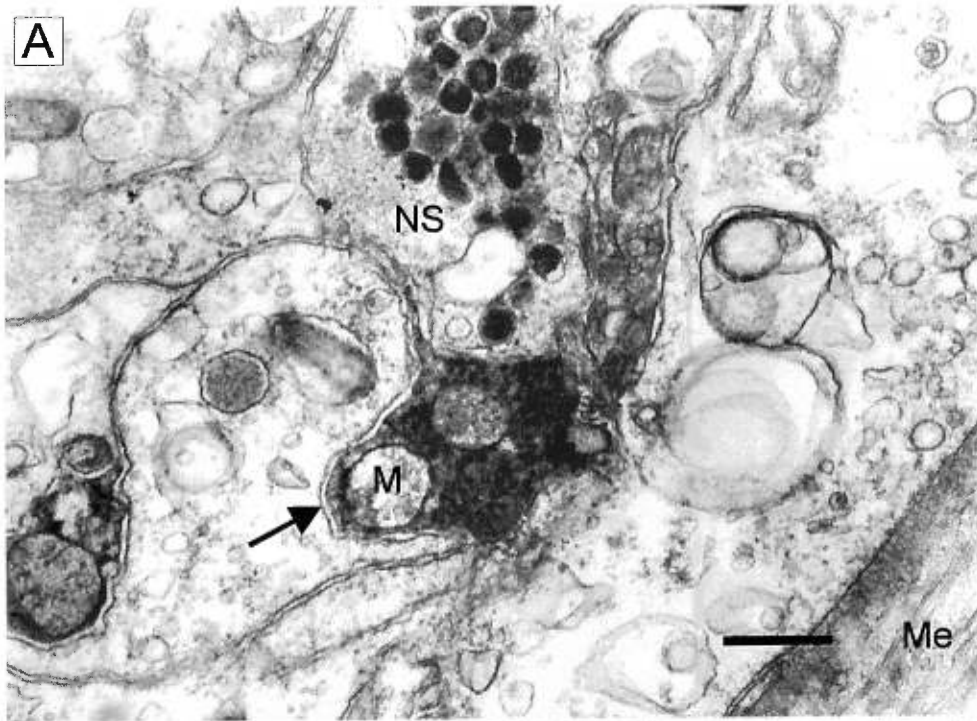


Figure 6. Electron micrographs sampled from serial sections of three 5-HT-IR neurites in a small neuropile of the mesogleal nerve net. In **A**, only neurite Ne1 adjacent to the mesoglea (Me) is apparent. In **B** and **C**, neurite Ne2 exhibits local staining. Neurite Ne3, sandwiched between Ne1 and Ne2, becomes apparent in **D** as a reactive neurite containing opaque vesicles (arrow). Tissue fixed in glutaraldehyde. De, dense-cored vesicles. Scale bars = 0.5 μm .

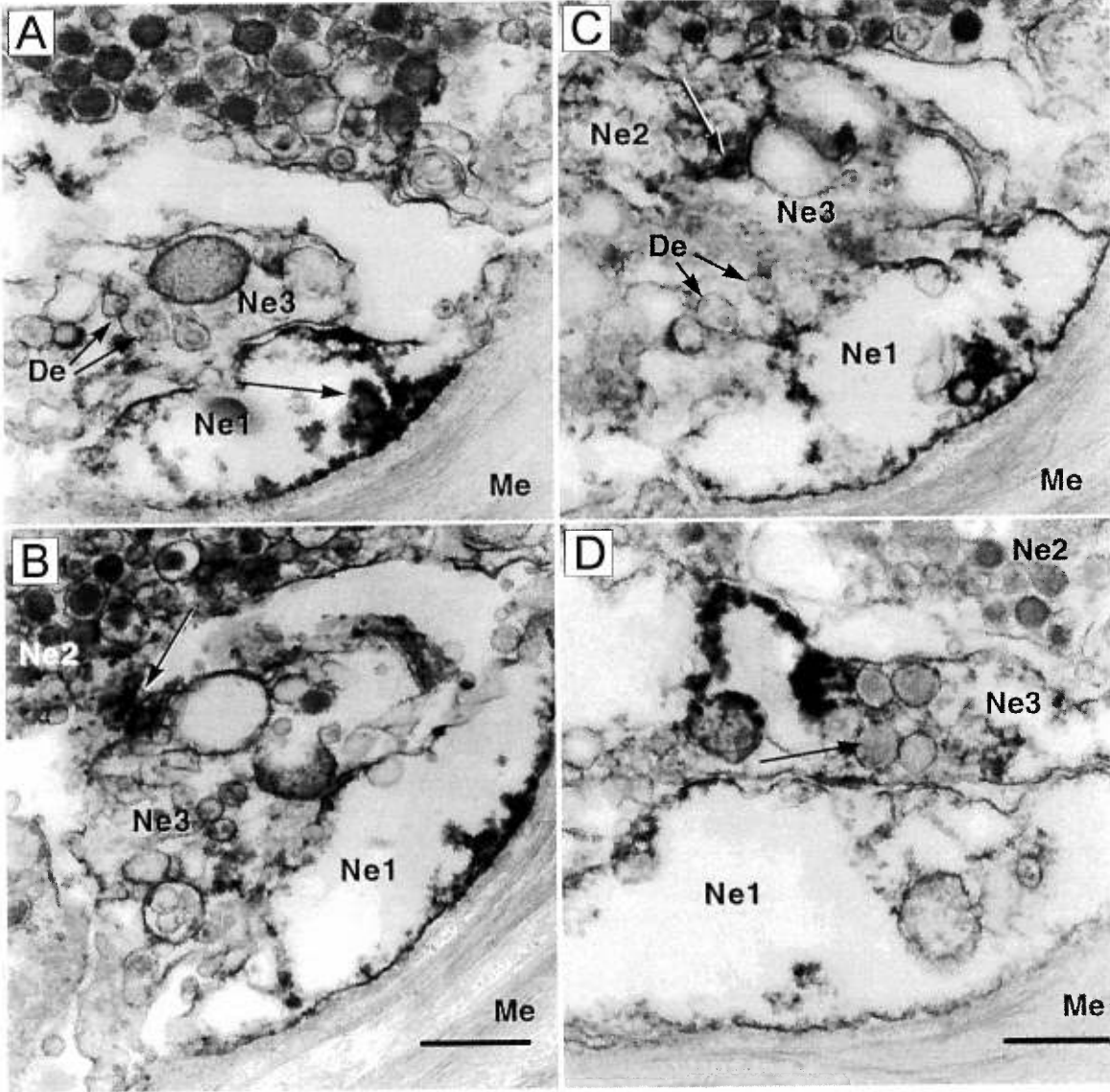
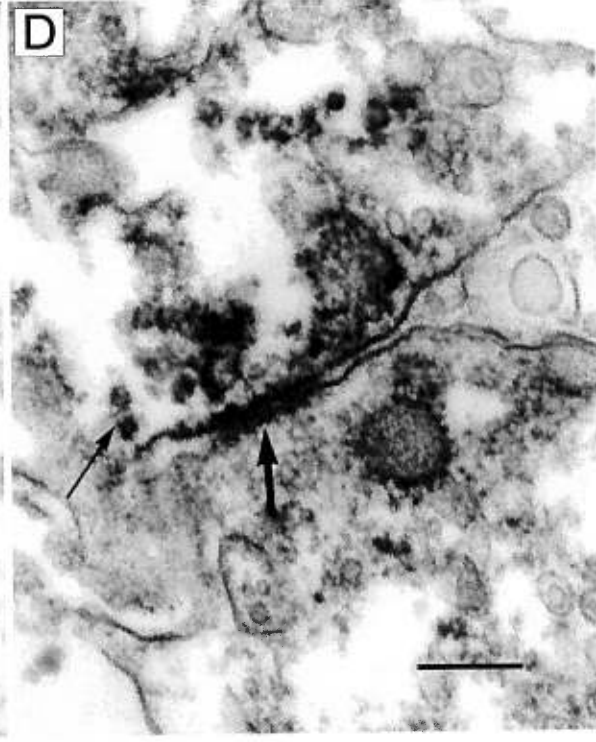
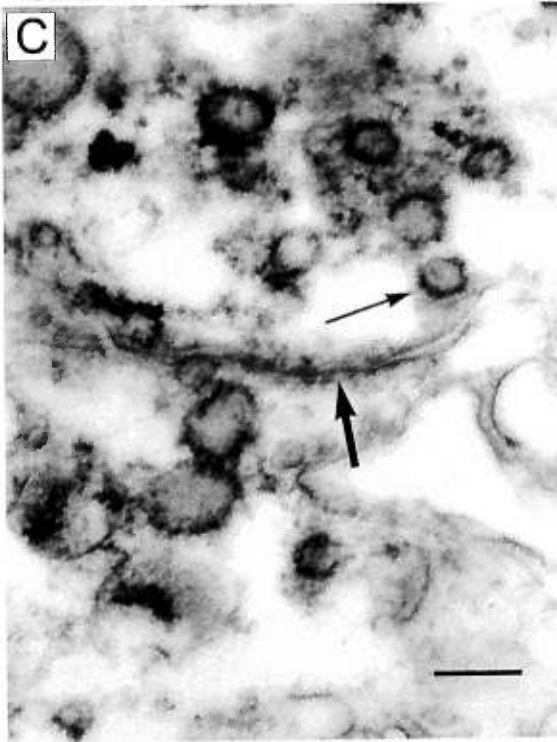
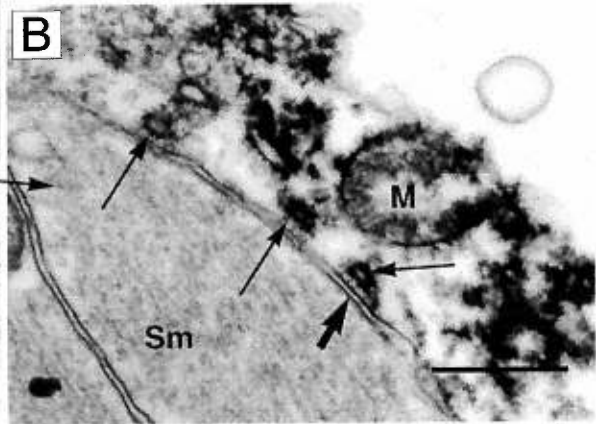
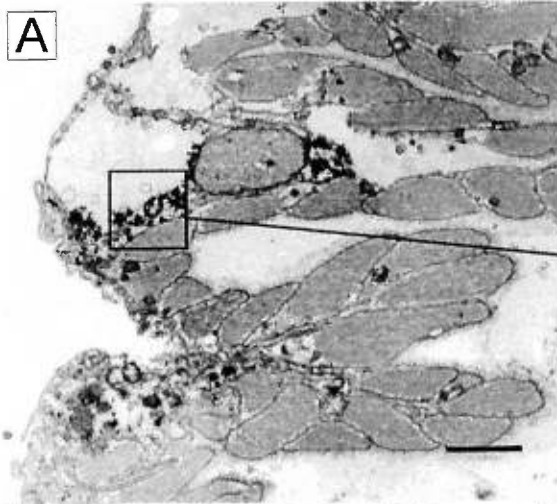


Figure 7. Electron micrographs of 5-HT-IR neurites in the endoderm. **A**, low magnification of immunostained neurites proximal to myoepithelium in a septum of autozoid polyp. Scale bar = 2 μm . **B**, enlargement of box in **A**, showing junction between an immunoreactive neurite and a smooth muscle cell (Sm). Reactivity is distributed around a mitochondrion (M) and vesicles close to the neurolemma (thin arrows). Note the dense parallel membranes at a presumed active zone (thick arrow). Scale bar = 0.5 μm . **C**, two immunoreactive neurites facing each other. Note electron-lucent vesicles with coating of reaction precipitate (thin arrow) and paired dense membranes (thick arrow). Scale bar = 0.25 μm . **D**, another example of contact between two 5-HT-IR neurites in which electron-lucent vesicles (thin arrow) and dense paired membranes (thick arrow) are apparent. All tissues fixed in paraformaldehyde. Scale bar = 0.25 μm .



3. DISCUSSION

L'intérêt premier de cette étude en microscopie électronique à transmission (MET) était de décrire la fine structure des neurites sérotoninergiques au sein de la pensée de mer, *Renilla koellikeri*, et d'examiner leur microenvironnement. On anticipait que ces observations nous permettraient de comprendre davantage le mode d'action de la 5-HT sur le mouvement péristaltique. Bien que la 5-HT aie été localisée dans les cellules nerveuses et les nématocytes lors d'études immunohistochimiques en microscopie photonique (Umbriaco et al. 1990), ce n'est que par l'observation en MET que la relation entre les cellules à 5-HT et leur environnement pouvait être révélée.

3.1 CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES

Inventé dans les années 1930-1940, le microscope électronique à transmission (MET) projette un faisceau d'électrons à travers un tissu permettant de visualiser son image en deux dimensions sur un écran phosphorescent. L'image générée par ce faisceau consiste en une gamme d'intensités. Les zones claires sont associées à des aires de faible densité permettant aux électrons de traverser le tissu alors que les zones sombres correspondent à des aires de forte densité, bloquant leurs passages. Toutefois, un tissu présente une densité similaire entre ces différents constituants, produisant ainsi un contraste faible. Afin d'augmenter ce contraste, les tissus sont colorés avec des métaux lourds s'associant à différents organites pour former ainsi une zone plus sombre sur l'écran. Les métaux lourds classiques sont le tétroxide d'osmium (OsO_4), le citrate de plomb et l'acétate d'uranium: les deux premiers se lient avec les phospholipides, augmentant ainsi la densité des membranes, alors que le troisième réagit fortement avec les groupes aminés et phosphates, colorant les acides nucléiques et les protéines. Aussi, lors d'études immunocytochimiques, il est nécessaire que le marquage soit fait avec un métal lourd tel l'or colloïdal ou avec une substance dense et opaque telle le DAB, permettant de visualiser les cellules réactives.

Deux techniques d'immunocytochimie en MET s'offraient à nous, l'immunocytochimie en pré-enrobage ou en post-enrobage. Le succès de l'immunocytochimie repose sur trois facteurs: la préservation des sites antigéniques, la préservation de l'ultrastructure, et la facilité de pénétration de l'anticorps dans le tissu. Comme l'indique son nom, le pré-enrobage consiste à effectuer la réaction immunocytochimique avant la déshydratation et l'enrobage du tissu dans une résine polymérisée. Cette méthode a pour avantage de préserver les sites antigéniques, créant ainsi un marquage spécifique. Cependant, la pénétration de l'anticorps est difficile, due à l'épaisseur du tissu, donnant souvent lieu à une réaction superficielle. Pour amoindrir cet inconvénient, il est possible de couper le tissu au moyen d'un microtome ou d'un cryostat en des tranches d'une épaisseur de 50 μm avant la réaction immunocytochimique, augmentant ainsi la pénétration de l'anticorps. Cependant ces manipulations peuvent abîmer la structure du tissu. De plus, le révélateur de cette méthode, en général le DAB, forme un dépôt opaque et flocculent masquant une partie des organites de la cellule réactive et empêchant ainsi une localisation spécifique intracellulaire des molécules étudiées. La seconde méthode, le post-enrobage, consiste à appliquer l'anticorps une fois que le tissu est enrobé dans une résine polymérisée. Ainsi, l'immunocytochimie se fait sur des coupes de tissus très fines (0.1 μm) offrant une très bonne pénétration de l'anticorps aux sites antigéniques. Des particules d'or colloïdal, particules mesurant quelques nanomètres, constituent le révélateur type de cette méthode. Leur petite taille confère une plus grande précision quant à la localisation de l'antigène dans les organites de la cellule. Cette technique permet aussi une quantification puisque l'on peut distinguer chaque particule d'or distinctement. Le revers du post-enrobage est que les sites antigéniques sont souvent abîmés ou détruits lors de la déshydratation et de la polymérisation à la chaleur ou au froid.

L'immunocytochimie en MET fut la méthode de choix pour cette étude. En effet, elle permettait de visualiser au niveau ultrastructural le type de cellules à 5-HT, leur composition intracellulaire ainsi que leur environnement. La méthode en pré-enrobage fut sélectionnée en premier lieu étant plus facile à maîtriser. Cette méthode nous a donc

permis d'obtenir des informations pertinentes sur l'environnement des cellules immunoréactives, mais une description précise de leur fine structure était malaisée. En modifiant les temps de révélation du DAB, il est possible d'obtenir des zones réactives moins denses et donc par le fait même une meilleure description ultrastructurale du neurite sans toutefois ajouter de la précision à la localisation de la sérotonine. Pour pallier à ce problème, nous avons entrepris l'immunocytochimie en post-enrobage. Cependant, nous avons encouru plusieurs problèmes avec cette seconde technique, obtenant beaucoup de bruit de fond et une détérioration du tissu. Alors que cette méthode est couramment utilisée pour cerner différents neurotransmetteurs à des vésicules synaptiques, elle n'a été employée que deux fois avec des anticorps contre la 5-HT: l'une chez deux espèces de poissons (Kiliaan et al. 1996), l'autre chez le rat (Liem et Copray 1996). La maîtrise de cette technique, sans apporter d'informations supplémentaires sur l'environnement des cellules réactives, pourrait tout au moins nous renseigner sur la nature des vésicules contenant de la 5-HT et leur emplacement au sein de la cellule.

Les caractéristiques du tissu étudié, soit le polype, présente certaines difficultés afin de réaliser une bonne préservation tissulaire. Une couche de mucus, sécrétée par les cellules épithéliales, recouvrent le polype. Ayant des avantages pour les différentes activités de l'animal dans la nature, cette couche de mucus rend la pénétration des fixateurs ainsi que des anticorps plus difficile et plus lente. De plus, constitué de plusieurs canaux, donc d'espaces vides, la coupe de ce tissu ainsi que son observation au MET est plus délicate.

Lors de notre étude en pré-enrobage nous avons employé deux anticorps distincts, l'un requérant une fixation au paraformaldéhyde, l'autre au glutaraldéhyde. Le premier anticorps avait déjà été utilisé avec succès dans la première étude immunohistochimique chez la pensée de mer (Umbriaco et al. 1990). Nous avons aussi employé le second anticorps puisqu'il permettait de fixer le tissu avec du glutaraldéhyde, un fixateur à pénétration plus lente mais plus stable et qui préserve davantage la structure. Les deux anticorps ont cependant donné des résultats similaires quant à la spécificité du marquage. Toutefois, la qualité de la préservation alliée avec une répartition plus fine du précipité

réactif dans certaines coupes fines nous ont permis de mieux définir les cellules à 5-HT et même de visualiser la réaction à des organites comme les vésicules synaptiques.

3.2 TYPES DE CELLULES À 5-HT

Alors que les études ultrastructurales avec des anticorps contre la 5HT sont nombreuses chez les vertébrés (Descarries et al. 1975; Séguéla et al. 1989; Schotland et al. 1996; Smiley et Goldman-Rakic 1996) et chez quelques invertébrés (Sun et al. 1993; Sandeman et al. 1995), seulement une étude jusqu'à présent a été faite chez les cnidaires (Elofsson et Carlberg 1989). Celle-ci concernait le tissu tentaculaire des scyphozoaires *Cyanea lamarcki* et *Cyanea capillata* et a permis la localisation de la 5-HT exclusivement dans les cellules à mucus. Aussi, notre travail est la première étude ultrastructurale démontrant la présence de sérotonine à la fois dans des cellules nerveuses et non nerveuses, chez un cnidaire.

La 5-HT a été localisée dans trois types de cellules non-nerveuses, les nématocytes, les cellules à mucus et les cellules glandulaires ainsi que des cellules nerveuses.

3.2.1 *Les nématocytes*

Les cnidocytes, cellules urticantes, peuvent se classer en trois types : les nématocytes, les spirocytes et les ptychocytes (Fautin et Mariscal 1991). Seuls les nématocytes sont présents chez les octocoralliaires, l'ordre dont fait partie la pensée de mer. Les nématocytes sont constitués d'une capsule urticante, appelé nématocyste, contenant le microharpon fermement replié en spirale. Nous avons localisé la 5-HT dans le cytoplasme où une forte réactivité est concentrée dans le voisinage immédiat du nématocyste. Or, d'après les résultats de l'étude immunohistochimique de Umbriaco et al. (1990) chez la pensée de mer, on s'attendait à trouver la 5-HT dans les nématocystes eux-mêmes. Ce désaccord peut cependant être attribué à la résolution inférieure des observations en microscopie optique de cette étude antérieure. En effet, en scrutant de près les

photomicrographies de cette étude on s'aperçoit que la réactivité ne fait que circonscire le nématocyste.

Toutefois, des études antérieures chez d'autres espèces et utilisant des méthodes biochimiques ou histochimiques (Welsh 1960; Kline et Weissbach 1965) ont associé la 5-HT à la capsule urticante, suggérant que la 5-HT est une des composantes de l'arsenal chimique libéré. Ces premières observations semblaient biologiquement significatives puisque la 5-HT est reconnue pour être impliquée dans la modulation de la douleur chez les mammifères (Le Bars 1988). Cependant aucune étude ultrastructurale n'avait jusqu'alors confirmé la localisation précise de la 5-HT dans ces cellules. Or, sa présence dans le cytoplasme chez la pensée de mer incite à lui conférer un tout autre rôle. En effet, des études ayant montré que la décharge des nématocytes était contrôlée par l'animal (Mariscal 1974), la 5-HT pourrait agir comme un transducteur intracellulaire menant à une réponse mécanique. Toutefois, le mécanisme de décharge des nématocytes n'étant pas encore très connu il est difficile d'établir un rôle pour cette monoamine dans le cytoplasme. Mais il est aussi possible que sa présence soit simplement due à son origine cellulaire. En effet, les nématocystes et les cellules nerveuses ont pour origine des mêmes cellules souches (David 1983).

3.2.2 Les cellules à mucus

La présence d'immunoréactivité à 5-HT dans les cellules à mucus de la pensée de mer concorde avec une étude d'Elofsson et Carlberg (1989) où sa localisation dans les cellules à mucus d'une méduse est restreinte au cytoplasme entourant des vésicules grosses et claires. Une étude d'Ertmann et Davenport (1981) a révélé que les cellules à mucus étaient impliquées dans le mécanisme de reconnaissance entre différents clones d'anémones de mer. Situées dans l'ectoderme près de cellules nématocytaires, elles pourraient affecter la décharge de ces cellules, causant un rapprochement ou une rétraction de tentacules selon leur appartenance à une lignée similaire ou différente. Toutefois, puisque nous avons aussi trouvé cette réactivité dans l'endoderme, d'autres

fonctions peuvent lui être attribuées. Ces cellules à mucus sont impliquées dans la capture de la proie et la digestion. Or, il est connu que cette monoamine affecte des comportements alimentaires chez de nombreuses espèces (revue dans Weiger 1997). Ceci nous incite à croire que chez ces animaux primitifs la 5-HT peut moduler la sécrétion de mucus et ainsi moduler le comportement alimentaire.

3.2.3 Les cellules glandulaires

L'immunoréactivité à 5-HT a de plus été associée à des cellules glandulaires de type digestif dans l'endoderme. Ce sont des cellules contenant des gouttelettes lipidiques similaires à celles observées chez une anémone de mer par Westfall et al. (1997). L'immunoréactivité est toutefois restreinte à des vacuoles ressemblant aux vacuoles alimentaires décrites chez les anthozoaires (Fautin et Mariscal 1991). La présence de cette immunoréactivité n'a probablement pas de signification physiologique, étant tout simplement la conséquence de la capacité de la cellule à récupérer par phagocytose le résidu de 5-HT circulant dans le milieu. Elle découlerait donc secondairement du mode de digestion de la pensée de mer.

3.2.4 Les cellules nerveuses

Nous avons surtout localisé la 5-HT dans les cellules nerveuses présentes dans l'ectoderme, la mésoglée et l'endoderme. Les cellules immunoréactives de l'ectoderme possèdent un cil apical entouré d'une couronne de microvillosités. Ces cellules correspondent aux cellules sensorielles décrites par Umbriaco et al. (1990). L'ultrastructure de l'appareil cilié est en accord avec la description faite chez un autre pennatulacé, *Ptilosarcus gurneyi* (Chia and Crawford 1977). La présence de ces cellules sensorielles dans l'ectoderme laisse donc croire qu'elles peuvent détecter les courants d'eau et moduler le comportement moteur en conséquence. Alors que les corps cellulaires sont situés dans l'ectoderme, les neurites et leurs varicosités ont été retrouvés dans les trois couches cellulaires.

L'identification de vésicules chez les cnidaires peut parfois être ardue à cause de la grande diversité des types de vésicules et de leurs différentes tailles dans une même varicosité. Aussi, avons-nous adhéré à la terminologie et la classification de Westfall (1996) établies à partir d'études ultrastructurales chez de nombreux cnidaires. Nos résultats démontrent la présence de petites vésicules opaques et granuleuses (33 à 80 nm), de vésicules denses de taille variée (70-214 nm) dont la densité centrale est entourée d'un halo, et de vésicules claires (50-150 nm) dont certaines semblaient avoir une faible densité au centre. Toutefois, les terminaisons sérotoninergiques ne présentent que deux types distincts de vésicules: soit des grosses vésicules à densité centrale, et des petites vésicules claires. Pourrait-il y avoir une homologie entre ces types de vésicules chez la pensée de mer et les vertébrés? Des études en post-enrobage effectuées chez les vertébrés (Killian et al. 1996; Liem and Copray 1996) ont rapporté la présence de ces deux types de vésicules dans les terminaisons sérotoninergiques. Cependant, alors que chez les poissons (Killian et al. 1996) la 5-HT est associée aux vésicules denses, chez le rat (Liem and Copray 1996) elle est associée aux deux types de vésicules. Par ailleurs, les grosses vésicules à densité centrale que l'on retrouve chez les cnidaires ont une taille similaire aux varicosités sérotoninergiques des vertébrés. Notre étude ne nous permettant pas une visualisation complète de la fine structure des neurites réactifs, nous ne pouvons associer ce neurotransmetteur à l'un ou l'autre type de vésicules. Les vésicules opaques présentes chez les cnidaires n'ont pas été retrouvées dans les terminaisons sérotoninergiques. Des études antérieures chez les anthozoaires ont d'ailleurs démontré que les vésicules opaques contenaient plutôt des peptides (Westfall et Grimmelikhwijzen 1993). Il est intéressant de noter que les vésicules opaques chez les cnidaires ont une taille similaire aux vésicules petites et claires que l'on retrouve chez les vertébrés (Westfall 1996).

3.3 LE MICROENVIRONNEMENT DES NEURITES SÉROTONINERGIQUES

Des études effectuées chez les vertébrés et les invertébrés s'accordent pour dire que la 5-HT ne déclenche pas directement un comportement moteur mais plutôt le module d'une façon excitatrice ou inhibitrice, telle un neuromodulateur (revue dans Weiger 1997).

Toutes ces analyses soulignent l'existence d'une infrastructure nerveuse autour des varicosités sérotoninergiques. Nos résultats démontrent un milieu plus diversifié autour des neurites sérotoninergiques, composé de cellules nerveuses et de cellules myoépithéliales.

L'environnement nerveux observé suggère fortement que la modulation du comportement se fait par l'entremise de cellules nerveuses tout comme chez les vertébrés. Dergham et Anctil (1998) ont en effet rapporté que les sites de liaison à 5-HT semblent situés sur les cellules nerveuses. Dans l'ectoderme, les récepteurs ont été localisés dans la zone où se trouvent les neurites sérotoninergiques identifiés par Umbriaco et al. (1990). En revanche, cette colocalisation des neurites et récepteurs ne se manifeste ni dans la mésoglée, ni dans l'endoderme. Ceci est attribuable au fait que Dergham et Anctil (1998) ont identifié des sites de liaison dans l'ectoderme et l'endoderme alors qu'Umbriaco et al. (1990) n'ont localisé des neurites immunoréactifs que dans l'ectoderme et la mésoglée. Toutefois, cette absence de coïncidence entre sites de liaisons et présence de varicosités à 5-HT ne réfute pas l'hypothèse que la 5-HT module l'activité de cellules nerveuses. Elle permet plutôt de postuler un type de communication autre que la transmission synaptique. La 5-HT serait libérée par les varicosités ectodermiques et mésogléennes et diffuserait dans l'endoderme pour se lier à ses récepteurs sur des neurones locaux.

En contrepartie, l'apposition directe entre les varicosités sérotoninergiques et les cellules myoépithéliales observée dans notre étude démontre que la 5-HT peut moduler directement l'activité musculaire. Le fait que Dergham et Anctil (1998) n'ont pas trouvé de site de liaisons sur les cellules myoépithéliales peut être expliqué par les limites de résolution de la technique d'autoradiographie en microscopie optique.

En effet, chez le rat (Séguéla et al. 1989) comme chez le singe (Smiley et Goldman-Rackic 1996) les varicosités sérotoninergiques sont surtout entourées de dendrites et de quelques axones. Même chez la lamproie, un vertébré primitif où la 5-HT est connue pour moduler la locomotion, aucune cellule musculaire ne côtoie les terminaisons

sérotoninergiques (Christenson et al. 1990; Schotland et al. 1996). Chez les invertébrés, quelques études démontrent aussi un environnement neural (Livingstone et al. 1981; Shürmann et al. 1991) bien que d'autres, chez les insectes surtout, montrent une relation intime avec des cellules musculaires (Nässel et Elekes 1984). Une explication évolutive pourrait-elle rendre compte de cette préférence d'environnement des neurites sérotoninergiques ?

3.4 MODE DE COMMUNICATION EMPRUNTÉ PAR LA 5-HT

C'est en 1888, que Ramon y Cajal démontra par la méthode cytologique d'imprégnation d'argent que les neurones étaient en fait des cellules individuelles communiquant entre elles par l'entremise de leurs prolongements: c'est la doctrine neuronale (voir Kandel et al. 1991). Bien que cette notion de contact provienne de Ramon y Cajal, c'est Sherrington en 1897 qui introduit le terme de synapse pour définir cette relation anatomique entre deux neurones ou un neurone et une cellule effectrice contiguë (Peters et Palay 1996). Il était donc établi que la communication nerveuse ne pourrait avoir lieu qu'à des jonctions spécifiques, les jonctions synaptiques. A cette époque, Golgi soutenait une autre hypothèse. Il affirmait que le contact entre deux fibres nerveuses n'était pas une condition nécessaire à l'existence d'une relation fonctionnelle entre deux cellules. Peu écoutée, sa théorie ne fut point exploitée. Ce n'est que plus tard, par des études sur des monoamines en utilisant la technique d'immunohistochimie par fluorescence que les chercheurs commencèrent à croire à l'existence d'un autre moyen de communication entre cellules nerveuses. L'application de drogues monoaminergiques causait une fluorescence non pas dans la cellule nerveuse mais dans le milieu l'entourant Ceci reflétait fort probablement une diffusion des neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire. D'autres études suivirent, confirmant la présence d'un second mode de communication, appelé transmission volumique, tout aussi important que la transmission synaptique.

Une synapse chez les cnidaires est identifiée si elle présente une paire de membranes denses séparées d'une distance de 13 à 25 nm contenant du matériel dense ainsi que par

la présence de vésicules de chaque côté de la fente synaptique (Westfall 1996). Dans notre étude, nous avons observé une faible proportion de neurones immunoréactifs établissant des contacts synaptiques, s'accordant avec les études plus nombreuses faites chez les vertébrés. Cependant, nous n'avons pas entrepris une étude systématique ni tenté de quantifier la fréquence de contacts synaptiques que les terminaisons sérotoninergiques formaient. Ceci pourrait d'ailleurs faire l'objet d'études ultérieures intéressantes. En suivant des coupes sériées, on pourrait détecter une différence de fréquence synaptique selon les couches cellulaires et voir si la fréquence de synapses se révèle être aussi faible que chez les vertébrés. Nous avons toutefois pu observer une apposition de membranes séparées par une distance permettant une communication synaptique, mais avec absence de densité. Or, Zoli et Agnati (1996) définissent une variété de types de synapses chimiques dans le tissu nerveux avec des différences morphologiques et des organisations fonctionnelles empêchant ou favorisant la diffusion des neurotransmetteurs. Aux deux extrémités de cette gamme se retrouvent les synapses fermées et les synapses ouvertes. Les premières sont en fait les synapses chimiques classiques avec deux membranes parallèles denses et une fente synaptique où les neurotransmetteurs ne peuvent que rejoindre la cellule post-synaptique. Les deuxièmes présentent des membranes parallèles sans densités et une fente synaptique plus large. De plus, les vésicules synaptiques ne sont pas distribuées face à la membrane post-synaptique. Aussi avons-nous trouvé des rapprochements de membranes s'associant à ce type de synapses ouvertes, montrant un espace de 50 à 100 nm, des vésicules rapprochées ou éloignées de la membrane, mais une absence de densité. Ces synapses ne sont pas aussi restrictives que les synapses conventionnelles et concorderaient très bien avec un mode de communication volumique où la 5-HT est libérée et diffuse dans le milieu extracellulaire.

Nos résultats permettent de croire que les neurones sensoriels sérotoninergiques de la pensée de mer, peuvent détecter les changements de courants et altérer le péristaltisme. La sérotonine libérée des cellules sensorielles agit sur d'autres cellules nerveuses ou directement sur les cellules myoépithéliales. La présence de cellules sérotoninergiques près de cellules musculaires laisse croire que cette monoamine peut moduler ce

comportement directement. Toutefois, il serait tout à fait possible que cette interaction directe entre varicosités sérotoninergiques et cellules musculaires puisse être impliqué dans un autre comportement moteur. En effet, jusqu'à ce jour on a montré une implication fonctionnelle de la 5-HT dans un comportement péristaltique, mais il ne serait pas surprenant que celle-ci module d'autres comportements moteurs. D'ailleurs sa présence dans d'autres types cellulaires suggère une implication plus grande dans la modulation de comportements divers. Nos résultats, bien qu'ils aient permis d'éclairer les voies de la modulation du péristaltisme par le 5-HT, ouvrent la porte à de nombreuses études physiologiques.

RÉFÉRENCES

Agnati LF., Bjelke B., Fuxe K. Volume transmission in the brain. *Am. Scientist.*, 1993; **80**: 362-373.

Ancil M. Modulation of a rhythmic activity by serotonin via cyclic AMP in the coelenterate *Renilla köllikeri*. *J. Comp. Physiol. B*, 1989a, **159**: 491-500.

Ancil M. The Antiquity of monoaminergic neurotransmitters: Evidence from cnidaria, dans PAV Anderson (ed): *Evolution of the First Nervous Systems*, 1989b. New York: Plenum Press, pp. 141-155.

Ancil M. Monoamines and elementary behaviour in a coelenterate, dans K.G. Davey, R.E. Peter, et S.S. Tobe (eds): *Perspective in comparative endocrinology*, 1994. Ottawa: National Research Council of Canada, pp. 449-454.

Ancil M., Boulay D., Larivière L. Monoaminergic mechanisms associated with control of luminescence and contractile activities in the coelenterate, *Renilla köllikeri*. *J. Exp. Zool.*, 1982; **223**: 11-24.

Anderson PAV. Physiology of a bidirectional, excitatory, chemical synapse. *J. Neurophysiol.*, 1985; **53**: 821-835.

Anderson PAV., Case JF. Electrical activity associated with luminescence and other colonial behavior in the pennatulid *Renilla köllikeri*. *Biol. Bull.*, 1975; **149**: 80-95.

Anderson PA., Grünert U. Three-dimensional structure of bidirectional, excitatory chemical synapses in the jellyfish *Cyanea capillata*. *Synapse*, 1988; **2**: 606-613.

Anderson PAV., Schawb WE. The organization and structure of nerve and muscle in the jellyfish *Cyanea capillata* (Coelenterata; Scyphozoa). *J. Morphol.*, 1981; **170**: 383-399.

Azmitia EE., Cannon PJ. The ultrastructure localization of 5-HT immunoreactive in myelin and unmyelin axons within the medial forebrain bundle of rat and monkey. *J. Neurosci.*, 1983; **3**: 2083-2090.

Awad EW., Anctil M. Positive coupling of β -like adrenergic receptors with adenylate cyclase in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Biol.*, 1993; **182**: 131-146.

Beaudet A., Descarries L. The monoamine innervation of rat cerebral cortex: Synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience*, 1978; **3**: 851-860.

Bloom FE., Aghajanian GK., An electron microscopic analysis of large granular synaptic vesicles of the brain in relation to monoamine content. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1968; **159**: 261-273.

Carlberg M., Anctil M. Biogenic amines in coelenterates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993; **106C**: 1-9.

Carlberg M., Rosengren E. Biochemical basis for adrenergic neurotransmission in coelenterates. *J. Comp. Physiol. B*, 1985; **155**: 251-255.

Chia FS, and Crawford B. Comparative fine structural studies of planulae and primary polyps of identical age of the sea pen, *Ptilosarcus gurneyi*. *J. Morph.*, 1977; **151**:131-158.

Christenson J., Culheim S., Grillner S., Hökfelt T. 5-hydroxytryptamine immunoreactive varicosities in the lamprey spinal cord have no synaptic specialisations- an ultrastructural study. *Brain Res.*, 1990; **512**: 201-209.

Dahlstrom A., Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the CNS. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand.*, 1964; **64 (S232)**: 1-55.

Dahlstrom A., Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the CNS. II. Experience induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbo spinal neuron systems. *Acta Physiol. Scand.*, 1965; **64 (S247)**: 1-36.

David CN. Stem cell proliferation and differentiation in hydra, dans CS. Potten (ed): *Stem cells, their identification and characterization*, 1983. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp.12-27.

Dergham P., Anctil M. Distribution of serotonin uptake and binding sites in the cnidarian *Renilla koellikeri*: an autoradiographic study. *Tissue & Cell*, 1998; **30**: 205-215.

Descarries L., Beaudet A., Watkins KC. Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res.*, 1975; **100**: 563-588.

Descarries L., Gisiger V., Steriade M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog. Neurobiol.*, 1997; **53**: 603-625.

Descarries L., Séguéla P., Watkins KC. Nonjunctional relationships of monoamine axon terminals in the cerebral cortex of adult rat, dans K. Fuxe and L.F. Agnati (eds) *Volume Transmission in the brain: Novel mechanisms for neural transmissions*, 1991; New York: Raven Press, pp. 53-62.

Descarries L., Watkins KC., Lapierre Y. Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. III. Topometric ultrastructural analysis. *Brain Res.*, 1977; **133**: 197-222.

Ellisman MH. 3-dimensionnal imaging of a transcellular filament network that interconnect cell in tissues. *J. Cell Biol.*, 1984; 99-195.

Elofsson R., Carlberg M. Gland cells in the tentacles of the jellyfish *Cyanea lamarcki* reactive with an antibody against 5-hydroxytryptamine. *Cell Tissue Res.*, 1989; **255**: 419-422.

Erspamer V. *Arch. Sci. Biol.*, 1946; **31**: 86-95.

Ertman S., Davenport D. Tentacular-nematocyte discharge and "self-recognition" in *Anthopleura elegantissima*. *Biol. Bull.*, 1981; **161**:366-370.

Fautin DG., Mariscal RN. Cnidaria: anthozoa, dans FW Harrison (Ed): *Microscopic anatomy of invertebrates*, 1991 vol. 2; New York: Wiley-Liss Press, pp. 267-358.

Ferretti ME., Sonetti D., Pareschi MC., Buzzi M., Colamussi ML., Biondi C. Effect of serotonin and neuropeptides on adenylate cyclase of the central nervous system and peripheral organs of the freshwater snail. *Planorbarius corneus*. *Neurochem. Int.*, 1996; **28**: 417-424.

File SE., Hyde JRG., MacLeod NK. 5,7-dihydroxytryptamine lesions of dorsal and median raphé nuclei and performance in the social interaction test of anxiety and in a home-cage aggression test. *J. Affective Disord.*, 1979; **1**: 115-122.

Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. The distribution of monoamine terminals in the CNS. *Acta Physiol. Scand.*, 1965; **64** (S247): 41-85.

Fuxe K., Agnati LF. Two principle modes of electrochemical communication in the Brain: Volume versus Wiring Transmission, dans K. Fuxe and L. F. Agnati (ed): *Volume Transmission in the brain: Novel Mechanism for Neural Transmission*, 1991; New York: Raven Press, pp. 1-9.

Fuxe K., Härfstrand A., Agnati LF., von Euler G., Svensson T., Fredholm B. On the role of NPY in central cardiovascular regulation, dans V. Muller, K. Fuxe, T. Hökfelt, J. Lundberg (eds): *Neuropeptide Y*, 1989. New-York: Raven Press, pp. 201-214.

Garris PA., Ciolkowski EL., Pastore P. Wightman RM. Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *J. Neurosci.*, 1994; **14**: 6084-6093

Gonon F. Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *J. Neurosci.*, 1997; **17**: 5972-5978.

Gray EG. Problems of interpreting the fine structure of vertebrate and invertebrates synapses. *Inter. Rev. Gen. and Exp. Zool.*, 1966; **2**: 139-170.

Hajj-Ali I., Anctil M. Characterization of a serotonin receptor in the cnidarian *Renilla koellikeri*: a radiobinding analysis. *Neurochem. Int.*, 1997; **31**: 83-93.

Hama K. Some observations on the fine structure of the giant nerve fibers of the earthworm, *Eisenia foetida*. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 1959; **6**: 61-67.

Hama K. Some observations on the fine structure of the giant fibers of the crayfish (*Cambarus virilus* and *Cambarus clarkii*) with reference to the submicroscopic structure of the synapse. *Anat. Rec.*, 1961; **141**: 275-293.

Hamlin KE., Fisher FE. Synthesis of 5-Hydroxytryptamine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1951; **73**: 5007-5008.

Herkenham M. Mismatches between neurotransmitter and receptor localization in brain: observations and implications. *Neuroscience*, 1987; **23**: 1-38.

HorrIDGE GA., Mackay B. Naked axons and symmetrical synapses in coelenterates. *Q. J. Microsc. Sci.*, 1962; **105**: 531-541.

Horvitz HT., Chalfie M., Trent C., Sulston JE., Evans PD. Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 1982; **216**: 1012-1014.

Hunter AJ. Serotonergic involvement in learning and memory. *Biochem. Soc. Trans.*, 1989; **17**: 79-81.

Ichimura T., Hashimoto PH. Structural components in the synaptic cleft captured by freeze-substitution and deep-etching of directly frozen cerebellar cortex. *J. Neurocytol.*, 1988; **1**: 3-12.

Jacobs BL., Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.*, 1992; **72**: 165-177.

Jha RK., Mackie GO. The recognition, distribution and ultrastructure of hydrozoan nerve elements. *J. Morphol.*, 1967; **123**: 43-62.

Jovanovic K., Petrov T., Greer JJ., Stein RB. Serotonergic modulation of the mudpuppy (*Necturus maculatus*) locomotor pattern in vitro. *Exp. Brain Res.*, 1996; **111**: 57-67.

Kandel ER., Schwartz JH., Jessel TM. Synaptic transmission dans *Principles of Neural Science*. Third Edition; 1991; pp. 123-134.

Kastendiek J. Behavior of the sea pansy *Renilla köllikeri* pfeffer (coelenterata: pennatulacea) and its influence on the distribution and biological interactions of the species. *Biol. Bull.*, 1976; **151**: 518-537.

Katz PS., Frost WS. Intrinsic neuromodulation in the *Tritonia* swim CPG: serotonin mediates both neuromodulation and neurotransmission by the dorsal swim interneurons. *J. Neurophysiol.*, 1995; **74**: 2281-2294.

Kemnitz CP., Strauss TR., Hosford DM., Buchanan JT. Modulation of swimming in the lamprey, *Petromyzon marinus*, by serotonergic and dopaminergic drugs. *Neurosci. Lett.*, 1995; **201**: 115-118.

Kiliaan AJ., Scholten G., Groot JA. Ultrastructural study of the presence of vasoactive intestinal polypeptide and serotonin in mucosal nerve fibers and endocrine cells of the intestine of goldfish (*Carassius auratus*) and tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Cell Tissue Res.*, 1996; **283**: 143-150.

Kinnamon JC, Westfall JA. Type of neurons and synaptic connections at hypostome-tentacle junctions in *Hydra*. *J. Morphol.*, 1982; **173**: 119-128.

Kline E., Weissbach H. Hydroxyindoleamines in the nematocysts of *Hydra littoralis*. *Life Sciences*. Vol. 4, 1965; Great-Britain: Pergamon Press, pp 63-67.

Kohen D. Eltoprazine for aggression in mental handicap (letter). *Lancet*, 1993; **341**: 628-629.

Kohno K. Symmetrical axo-axonic synapses in the axon cap of the goldfish Mauthner cell. *Brain Res.*, 1970; **23**: 255-258.

Kuffler SW., Nicholls G. The physiology of neuroglial cells. *Ergebn. Physiol.*, 1966; **57**: 1-90.

Le Bars D. Serotonin and pain dans NN. Osborne and M. Hamon (eds). *Neuronal Serotonin*, 1988; pp. 171-229.

Lenn NJ., Reese TS. The fine structure of nerve endings in the nucleus of the trapezoid body and the ventral cochlear nucleus. *Am. J. Anat.*, 1966; **118**: 375-389.

Liem RSB., Copray JCVM. Immunogold localization of serotonin within synaptic terminals in the rat mesencephalic trigeminal nucleus. *Acta Anat.*, 1996; **155**: 50-56.

Livingstone MS., Schaeffer SF., Kravits EA. Biochemistry and ultrastructure of serotonergic nerve endings in the lobster : Serotonin and octopamine are contained in different nerve endings. *J. Neurobiol.*, 1981; **12**: 22-54.

Luine VN., Frankfurt M., Rainbow TC., Biegon A., Azmitia E. Intrahypothalamic 5,7-dihydroxytryptamine facilitates feminine sexual behavior and decreases imipramine binding and 5-HT uptake. *Brain Res.*, 1983; **264**: 344-348.

Mackie GO. The elementary nervous system revisited. *Amer. Zool.*, 1990; **30**: 907-920.

Maler L., Ellis WG. Inter-male aggressive signals in weakly aggressive fish are modulated by monoamines. *Behav. Brain Res.*, 1987; **25**: 75-81.

Mariscal RN. Nematocyst, dans L. Muscatine and HM Lenhoff (eds). *Coelenterate biology: Reviews and new perspectives*, 1974; New York: Academic Press, pp.120-178.

Mathias AP, Ross DM, Schaeffer M. The distribution of 5-hydroxytryptamine, tetramethylammonium, homarine and other substances in sea anemones. *J. Physiol.*, 1960; **151**: 296-311.

Matus AI. The post-synaptic density. *Trends in Neurosci.*, 1981; **4**: 51-53.

Mazzanti G., Piccinelli D. The occurrence of indole and imidazole compounds in marine worms and sea anemones from South Africa. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979; **63C**: 215-219.

McCarraghen G., Chase R. Morphological evidence for bidirectional chemical synapses. *Neurosci. Abstr.*, 1983; **9**: 1025.

McCarraghen G., Chase R. Quantification of ultrastructural symmetry at molluscan chemical synapses. *J. Neurobiol.*, 1985; **16**: 69-74.

McEntee WJ., Crook TH. Serotonin, memory, and the aging brain. *Psycho-pharmacol.*, 1991; **103**: 143-149.

McDonald DM., Rasmussen GL. Ultrastructural characteristics of synaptic endings in the cochlear nucleus having acetylcholinesterase activity. *Brain Res.*, 1971; **28**: 1-18.

McFarlane ID. Two slow conduction systems in the sea anemone *Calliactis parasitica*. *J. Exp. Biol.*, 1969; **51**: 211-220.

McFarlane ID. Spontaneous contractions and nerve net activity in the sea anemone *Calliactis parasitica*. *Mar. Behav. Physiol.*, 1973; **2**: 97-113.

- McFarlane ID. Excitatory and inhibitory control of inherent contractions in the sea anemone *Calliactis parasitica*. *J. Exp. Biol.*, 1974; **60**: 397-422.
- McIntosh TK., Barfield RJ. Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. I. Serotonin and the post-ejaculatory refractory period. *Behav. Brain Res.*, 1984; **12**: 255-265.
- McMahon D. Chemical messengers in development: a hypothesis. *Science*, 1974; **185**:1012-1021.
- Molina V., Ciesielski L., Gobaille S., Isel F., Mandel P. Inhibition of mouse killing behavior by serotonin-mimetic drugs: effects of partial alterations of serotonin neurotransmission. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1987; **27**: 123-131.
- Molliver ME., Grzanna R., Lidov HGW., Morrison JH., Olschowka JA. Monoamines systems in the cerebral cortex dans : V. Chan-Palay and S.L. Palay (eds): *Cytochemical methods in neuroanatomy*, 1982; New-York: Alan R. Liss, Inc., pp 255-277.
- Nassel DR., Elekes K. Ultrastructural demonstration of serotonin-immunoreactivity in the nervous system of an insect (*Calliphora erythrocephala*). *Neurosc. Lett.* 1984; **48**: 203-210.
- Palade GE., Palay SL. Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat. Rec.*, 1954; **118**: 335-336.
- Palay SL. Synapses in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956; **2** (suppl.): 193-202.
- Pani AK., Anctil M. Evidence for biosynthesis and catabolism of monoamines in the sea pansy *Renilla koellikeri* (cnidaria). *Neurochem. Int.*, 1994a; **25**: 465-474.

Pani. AK., Anctil M. Quantitative survey of biogenic monoamines, their precursors and metabolites in coelenterate *Renilla koellikeri*. *Biog. Amines*, 1994b; **10**: 161-180.

Papadopoulos GC., Parnavelas LG., Buijs R. Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the serotonin innervation of the rat visual cortex. *J. Neurocytol.*, 1987; **16**: 883-892.

Pappas GD., Waxman SG. Synaptic fine structure - morphological correlates of chemical and electrotonic transmission, dans GD. Pappas and DP. Purpura (eds) *Structure and function of synapses*, 1972; New York: Raven Press, pp. 1-43.

Parker GH. The organization of renilla. *J. Exp. Zool.*, 1919; **27**: 499-507.

Parnavelas LG., Moises HC., Speciale SG. The monoaminergic innervation of the rat visual cortex. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, 1985; **223**: 319-329.

Peters A., Palay SL. An electron microscope study of the distribution and patterns of astroglial process in the central nervous system. *J. Anat. (London)*, 1965; **99**: 419-424.

Peters A., Palay SL., Webster HdF. Synapses, dans Peters A., Palay SL., Webster HdF (eds): *The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells*, 1976. New-York: Oxford University Press, pp. 118-180.

Peters A., Palay SL. The morphology of synapses. *J. Neurocytol.*, 1996; **25**: 687-700.

Raleigh MJ., McGuire MT., Brammer Gl., Pollack DB., Yuwiler A. Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. *Brain Res.*, 1991; **559**: 181-190.

Rapport MM. Serum vasoconstrictor (serotonin) V. Presence of creatine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J. Biol. Chem.*, 1949; **180**: 961-969.

Rapport MM., Green AA., Page IH. Serum vasoconstrictor (serotonin) IV. Isolation and characterisation. *J. Biol. Chem.*, 1948; **176**: 1243-1251.

Reinitz CA., Stretton AOW. Behavioral and cellular effects of serotonin on locomotion and male mating posture in *Ascaris suum* (nematoda). *J. Comp. Physiol. A*, 1996; **178**: 655-667.

Richards JC., Lorez HP., Tranzer JP. Indolealkylamine nerve terminals in cerebral ventricles: identification by electron microscopy and fluorescence histochemistry. *Brain Res.*, 1973; **57**: 277-288.

Robertson JD. Ultrastructure of two invertebrate synapses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1953; **82**: 219-223.

Saller CF., Stricker EM. Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7 dihydroxytryptamine. *Science*, 1976; **192**: 385-387.

Sandeman RE., Watson AHD., Sandeman DC. Ultrastructure of the synaptic terminals of the dorsal giant serotonin-IR neuron and deutocerebral commissure interneurons in the accessory and olfactory lobes of the crayfish. *J. Comp. Neurol.*, 1995; **361**: 617-632.

Satterlie RA., Anderson PAV., Case JF. Morphology and electrophysiology of the through-conducting systems in pennatulid coelenterates dans G.O. Mackie (ed) *Coelenterate ecology and behavior*, 1976; Plenum Publishing Corporation, pp. 619-627.

Satterlie RA., Anderson PAV., Case JF. Colonial coordination in anthozoans: Pennatulacea. *Mar. Behav. Physiol.*, 1980; **7**: 25-46.

Satterlie RA., Case JF. Neurobiology of the gorgonian coelenterates, *Muricea californica* and *Lophogorgia chilensis*. II. Morphology. *Cell Tissue Res.*, 1978; **187**: 379-396.

Satterlie RA., Spencer AN. Organization of conducting systems in simple invertebrates : Porifera, Cnidaria and Ctenophora dans M.A. Ali (ed): *Nervous Systems in invertebrates*, 1987; NATO ASI SERIES vol. 11. New York: Plenum Press, pp 213-264.

Schatzberg AF., Cole JO. *Manual of Clinical Psychopharmacology*. 1991, American Psychiatric Press. Washington DC.

Schotland JL., Shupliakov O., Grillner S., Brodin L. Synaptic and nonsynaptic monoaminergic neuron systems in the lamprey spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 1996; **372**: 229-244.

Schürmann F-W., Sandeman R., Sandeman D. Dense-core vesicles and non-synaptic exocytosis in the central body of the crayfish brain. *Cell Tissue Res.*, 1991; **265**: 493-501.

Séguéla P., Watkins KC., Descarries L. Ultrastructural features of dopamine axon terminals in the anteromedial and the suprarhinal cortex of adult rat. *Brain Res.*, 1988; **442**: 11-22.

Séguéla P., Watkins KC., Descarries L. Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J. Comp. Neurol.*, 1989; **289**: 129-142.

Séguéla P., Watkins KC., Geffard M., Descarries L. Noradrenaline axon terminals in adult rat neocortex: an immunocytochemical analysis in serial thin sections. *Neuroscience*, 1990; **35**: 249-264.

- Shelton GAB. Colonial conduction systems in the anthozoa: octocorallia. *J. Exp. Biol.*, 1975; **62**: 571-578.
- Sijbesma H., Schipper J., de Kloet ER., Mos J., van Aken H., Olivier B. Postsynaptic 5-HT₁ receptors and offensive aggression in rats: a combined behavioural and autoradiographic study with eltoprazine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1991; **38**: 447-458.
- Singla CL. Ultrastructure and attachment of the basal disk of *Halicysteus*, dans G.O. Mackie (ed): *Coelenterate ecology and behavior*, 1976; New York: Plenum Press, pp 533-540.
- Singla CL. Locomotion and neuromuscular system of *Aglantha digitale*. *Cell Tissue Res.*; 1978; **188**: 317-327.
- Smiley JF., Goldman-Rakic PS. Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J. Comp. Neurol.*, 1996; **367**: 431-443.
- Soghomonian J-J., Beaudet A., Descarries L. Ultrastructural relationships of central serotonin neurons, dans NN. Osborne and M. Hamon (eds). *Neuronal Serotonin*, 1988; pp. 57-92.
- Spencer AN. Neurobiology of *Polyorchis*. II. Structure of effector systems. *J. Neurobiol.*, 1979; **10**: 95-117.
- Spencer AN. Chemical and electrical synaptic transmission in the cnidaria, dans : PAV Anderson (ed): *Evolution of the First Nervous Systems*, 1990; New York: Plenum Press, pp. 33-53.

Spencer AN. Central nervous system, dans CL. Proser (ed): *Neural and integrative animal physiology*. Comparative animal physiology. Fourth Edition. 1991; pp 554-566.

Sun XJ., Tolbert LP., Hildebrand JG. Ramification pattern and ultrastructural characteristics of the serotonin-immunoreactive neuron in the antennal lobe of the moth *Manduca sexta*: a laser scanning confocal and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 1993; **338**: 5-16.

Takeuchi Y. Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain, dans NN. Osborne and M. Hamon (eds). *Neuronal Serotonin*, 1988; pp. 25-56.

Tilhonen J., Hakola P., Paanila J., Turtiainen M. Eltoprazine for aggression in schizophrenia and mental retardation. (letter). *Lancet*, 1993; **341**: 307.

Trachtenberg MC., Pollen DA. Neuroglia: biophysical properties and physiologic function. *Science*, 1970; **167**: 1248-1251.

Twarog BM., Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues of urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.*, 1953; **175**: 157-161.

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

Vergnes M., Depaulis A., Boehrer A., Kempf E. Selective increase of offensive behavior in the rat following intrahypothalamic 5,8-DHT-induced serotonin depletion. *Beh. Brain Res.*, 1988; **29**: 85-91.

Verhoeven WMA., Tuinier S., Sijben NAS., van den Berg YWHM., de Witter-van der Schoot EPPM., Pepplinkhuizen L., van Nieuwenhuizen O. Eltoprazine in mentally retarded self-injuring patients. (letter). *Lancet*, 1992; **340**: 1037-1038.

Walker RJ., Brooks HL., Holden-Dye L. Evolution and overview of classical transmitter molecules and their receptors. *Parasitology*, 1996; **113**: S3-S33.

Wang DYC., Kumar S., Hedges SB. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc.R. Soc. Lond.*, 1999; **B266**: 163-171.

Weber C., Singla CL., Kerfoot PAH. Microanatomy of the subumbrellar motor innervation in *Aglantha digitale* (Hydromedusae : Trachylina). *Cell. Tiss. Res.*, 1982; **223**: 305-312.

Weiger WA. Serotonergic modulation of behavior: a phylogenetic overview. *Biol. Rev.*, 1997; **72**: 61-95.

Welsh JH. 5-hydroxytryptamine in coelenterates. *Nature*, 1960; **186**: 811-812.

Westfall JA. Nervous control of nematocyst discharge: chemical synapses. *Amer. Zool.*, 1969; **9**: 1141-1149.

Westfall JA. The nematocyte complex in a hydromedusan, *Gonionemus vertens*. *Z. Zellforsch Mikrosk Anat.*, 1970; **110**: 457-470.

Westfall JA. Ultrastructural evidence for neuromuscular systems in coelenterates. *Amer. Zool.*, 1973; **13**: 237-246.

Westfall JA. Ultrastructure of invertebrate synapses dans M. A. Ali. (ed) *Nervous systems in invertebrates*. New York, Plenum Press 1987; pp 3-28.

Westfall JA. Ultrastructure of synapses in the first evolved nervous systems. *J. Neurocytol.*, 1996; **25**: 735-746.

Westfall JA., Grimmelikhuijzen CJP. Antho-RFamide immunoreactivity in neuronal synaptic and nonsynaptic vesicles of sea anemones. *Biol. Bull.*, 1993; **185**: 109-114.

Westfall JA., Kinnamon JC. A second sensory-motor-interneuron with neurosecretory granules in *Hydra*. *J. Neurocytol.*, 1978; **7**: 365-379.

Westfall JA., Kinnamon JC. Perioral synaptic connections and their possible role in the feeding behavior of *Hydra*. *Tissue Cell*, 1984; **16**: 355-365.

Westfall JA., Sayyar KL., Bone JK. Ultrastructure of neurons and synapses in the tentacle gastrodermis of the sea anemone *Calliactis parasitica*. *J. Morphol.*, 1997; **231**: 217-223.

Westfall JA., Yamataka S., Enos PD. Ultrastructural evidence of polarized synapses in the nerve net of *Hydra*. *J. Cell Biol.*, 1971; **51**: 318-323.

Wilson EB. The development of *Renilla*. *Soc. Lond. B*, 1883; **174**: 723-815.

Wood JG., Lentz TL. Histochemical localization of amines in *hydra* and in the sea anemone. *Nature*, 1964; **201**: 88-90.

Yeh S-R., Fricke RA., Edwards DH. The effect of social experience on serotonergic modulation of the escape circuit of crayfish. *Science*, 1996; **271**: 366-369.

Yodyingyuad U., de la Riva C., Abbott DH., Herbert J., Keverne EB. Relationship between dominance hierarchy, cerebrospinal fluid levels of amine transmitter metabolites (5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid) and plasma cortisol in monkeys. *Neuroscience*, 1985; **16**: 851-858.

Zemlan FP., Ward IL., Crowley WR., Margules DL. Activation of lordotic responding in female rats by suppression of serotonergic activity. *Science*, 1973; **179**: 1010-1011.

Zhang W., Pombal MA., El Manira A., Grillner S. Rostrocaudal distribution of 5-HT innervation in the lamprey spinal cord and differential effects of 5-HT on fictive locomotion. *J. Comp. Neurol.*, 1996; **374**: 278-290.

Zoli M., Agnati, LF. Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses. *Prog. Neurobiol.*, 1996; **49**: 363-380.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, M. Michel Anctil. Ses connaissances et ses conseils judicieux ont été d'une aide précieuse. Sa grande disponibilité a été très appréciée.

Je remercie également Louise Pelletier pour ses conseils techniques en microscopie électronique et sa constante bonne humeur.

Je tiens à dire un merci tout particulier à ma mère pour la mise en forme de ce mémoire, à mon frère pour la révision du texte, ainsi qu'à mon père pour ses encouragements.

Un gros merci à Stéphane pour son aide, sa patience et sa compréhension.

Enfin, un merci spécial à Marie-Claude, Zeina, Marie-Christine, Audrey, Marc-Antoine, Louise, Claudette, Pierre, Christelle, et les autres pour leur présence et sens de l'humour.