

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effets d'agents morphogénétiques sur la prolifération et la  
différenciation neuronales et épithéliales chez la pensée  
de mer *Renilla koellikeri***

Présenté par :

**Djoyce Estephane**

A été évalué par un jury composé de :

**Dre. Thérèse Cabana (présidente)**

**Dr. Michel Anctil (directeur de recherche)**

**Dre. Nicole Leclerc (membre)**

**Mémoire accepté : Février 2010**

Université de Montréal

**Effets d'agents morphogénétiques sur la prolifération et la  
différenciation neuronales et épithéliales chez la pensée de mer**

***Renilla koellikeri***

**Par**

**Djoyce Estephane**

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention  
du grade de maîtrise ès sciences (M.sc) en sciences neurologiques

Février 2010

© Djoyce Estephane 2010

## Sommaire

La présence d'un récepteur de type RXR a récemment été rapporté chez la pensée de mer, *Renilla koellikeri*, de même que chez d'autres anthozoaires, et le NO semble jouer des différents rôles physiologiques, chez plusieurs cnidaires. L'acide rétinoïque (AR) et le monoxyde d'azote (NO) sont connus pour leur implication dans l'induction de la croissance des neurites chez les vertébrés ainsi que chez les invertébrés. Mais jusqu'à présent, aucun rôle de ces agents n'a encore été identifié chez ce phylum ancien des invertébrés.

Dans le but de montrer que ces agents morphogénétiques ont un rôle dans le développement neuronal chez ces ancêtres des métazoaires bilatéraux, nous avons utilisé des cultures primaires de cellules du cnidaire anthozoaire *Renilla koellikeri* (pensée de mer), doté d'un système nerveux des plus primitif. Nous avons trouvé que les deux types d'acide rétinoïque, 9-cis et 11-trans, induisent une prolifération cellulaire dose-dépendante en fonction du temps dans les boîtes de pétri enduites de polylysine. Les cultures cellulaires exposées à l'acide rétinoïque dans les boîtes sans polylysine montrent une différenciation en des cellules épithéliales. D'autre part, le NO induit exclusivement une différenciation neuronale dans les boîtes enduites de polylysine. Aucun autre type de cellules subit une différenciation en présence de NO et la densité des cellules dédifférenciées a diminué. Les prolongements des neurones différenciés semblent s'enchevêtrer et former un réseau neuronal assez dense.

L'ensemble de ces observations suggère que l'acide rétinoïque, contrairement à NO, est associé à l'activité mitotique, et que l'acide rétinoïque et le NO sont impliqués

différemment dans la spécification cellulaire, respectivement épithéliale et neuronale, chez la pensée de mer. Le type d'action déclenchée, qu'il soit la mitogénèse ou la différenciation (épithéliale ou neuronale), varie alors selon l'état d'adhésion des cellules au substrat. Comme les données moléculaires et paléontologiques rapprochent les cnidaires, telle la pensée de mer, des ancêtres des eumétazoaires, nos résultats suggèrent que le rôle morphogénétique de l'acide rétinoïque et du NO est enraciné dans l'ancêtre commun de tous les métazoaires.

**Mots clés :** anthozoa, cnidaires, culture cellulaire, polylysine, acide rétinoïque, monoxyde d'azote, prolifération, différenciation.

## Summary

Retinoic acid receptors were recently reported in the sea pansy, *Renilla koellikeri*, and in other anthozoans, and NO seems to play various roles in several cnidarians. Retinoic acid (RA) and nitric oxide (NO) are known for their implication in inducing neurite outgrowth in both vertebrates and invertebrates. But so far, no role of these agents has been identified in this basal metazoan phylum.

In order to show that these agents have a morphogenetic role in neuronal development in the ancestors of bilateral metazoan. We used primary cultures of cells from the cnidarian anthozoan *Renilla koellikeri* (sea pansy), with the most primary nervous system. We found that both 9-cis and 11-trans retinoic acid induced cell proliferation in dose- and time-dependant manners in petri dishes coated with polylysine. Cell cultures exposed to retinoic acid in dishes devoid of polylysine were observed to differentiate into epithelial cells. On the other hand, NO induced extensive neurite outgrowth in polylysine-coated culture dishes. No other cell type underwent differentiation in the presence of NO, and the density of dedifferentiated cells was reduced. The neurites of the differentiating neurons appeared to intertwine and form a loose nerve net.

These observations suggest that retinoic acid, but not NO, has mitogenic activity, and that retinoic acid and NO are differentially involved in nerve cell specification in the sea pansy. The type of action, mitogenesis or cell differentiation (epithelial or neural), depends on the degree of cell adhesion to substrate. As both molecular and paleontological evidence place cnidarians such as the sea pansy closest to the

eumetazoan ancestor, our results suggest that the morphogenetic role of retinoic acid and NO was rooted in the common ancestor of all metazoans.

**Key words :** anthozoan, cnidaria, cells culture, polylysine, retinoic acid, nitric oxide, proliferation, differentiation.

## Table des matières

<b>Sommaire.....</b>	<b>i</b>
<b>Summary.....</b>	<b>iii</b>
<b>Table de matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abbréviations.....</b>	<b>ix</b>
<b>Décidace.....</b>	<b>xi</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xii</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Vitamine A et rétinoïdes.....</b>	<b>2</b>
<b>I.2 Synthèse et dégradation de l'acide rétinoïque (AR).....</b>	<b>5</b>
<b>I.3 L'acide rétinoïque : tératogène et signal inducteur.....</b>	<b>10</b>
I.3.1 Carence et excès en acide rétinoïque.....	11
I.3.2 Rôle de l'acide rétinoïque dans la prévention du cancer.....	12
I.3.3 Récepteurs de l'acide rétinoïque.....	14
I.3.3.a Deux types de récepteurs RAR et RXR.....	14
I.3.3.b Structure générale des récepteurs nucléaires.....	16
I.3.4 Implication de l'acide rétinoïque chez les cnidaires.....	18
<b>I.4 Monoxyde d'azote.....</b>	<b>19</b>
I.4.1 Généralités.....	19
I.4.2 La biosynthèse de NO.....	22
I.4.3 Métabolisme du NO.....	25
I.4.4 Rôle du NO chez les cnidaires.....	29

<b>I.5</b>	<b>Modèle expérimentale : <i>Renilla koellikeri</i>.....</b>	<b>30</b>
I.5.1	L'embranchement des cnidaires dans le règne animal.....	30
I.5.2	Anatomie de la pensée de mer.....	31
I.5.3	Organisation tissulaire.....	35
I.5.3.a	L'ectoderme.....	35
I.5.3.b	La mésoglée.....	35
I.5.3.c	L'endoderme.....	36
I.5.4	Particularités des cellules nerveuses chez les cnidaires.....	37
<b>I.6</b>	<b>Hypothèse et objectif du travail.....</b>	<b>39</b>
<b>II.</b>	<b>Article Retinoic acid and nitric oxide promote cell proliferation and differentially induce neuronal differentiation in vitro in the cnidaria <i>Renilla koellikeri</i>....</b>	<b>41</b>
	Abstract.....	44
	Introduction.....	45
	Materials and methods.....	48
	Results.....	51
	Discussion.....	54
	References.....	61
	Legends to figures.....	67
<b>III.</b>	<b>Discussion générale et conclusion.....</b>	<b>75</b>
	<b>Références.....</b>	<b>86</b>

## Liste des figures

### I- INTRODUCTION

I. 2	Structure des rétinoïdes.....	9
I.4.3	Représentation schématique de la voie de signalisation cellulaire du NO/cGMP.....	28
I.5.2	Dessin détaillé d'une colonie de <i>Renilla koellikeri</i> .....	34

### II- ARTICLE

Fig. 1	Effet de l'acide rétinoïque et des donneurs de NO sur la prolifération cellulaire chez la pensée de mer dans les cultures maintenues dans les pétris revêtus par la polylysine.....	69
Fig.2	Courbe dose-réponse montrant l'effet proliférant de l'acide rétinoïque sur les cultures cellulaires.....	70
Fig. 3	Micrographes des cultures cellulaires de la pensée de mer traitées avec l'acide rétinoïque et maintenues dans des pétris non revêtus par la polylysine.....	71
Fig. 4	Histogramme de quantification de l'effet de l'acide rétinoïque 9-Cis (100µmol/L) sur la différenciation cellulaire chez la pensée de mer dans les cultures maintenues dans des pétris non revêtus par la polylysine.....	72
Fig. 5	Histogramme montrant l'effet du donneur de NO, SIN-1, (90µml/L) sur la différenciation neuronale chez la pensée de mer	

dans les cultures maintenues dans des pétris non revêtus par la polylysine.....73

Fig. 6 Micrographes des neurones différenciés, six jour après leur traitement avec 90 $\mu$ mol/L de SIN-1 dans les cultures maintenues dans des pétris non revêtues par la polylysine.....74

## Liste des abbréviations

ADH	Alcools déshydrogénases
ALDH	Aldéhydes déshydrogénases
AR :	Acide Rétinoïque
BH4	Tétrahydrobioptérine
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
DBD	DNA Binding Domain
ECM	Extracellular Matrix
EDRF	Endothelial Derivated Relaxing Factor
ER	Récepteurs aux oestrogènes
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
GFP	Green Fluorescent Protein (Protéine fluorescente verte)
GR	Récepteurs aux glucocorticoïdes
GTP	Guanosine triphosphate
LAP :	Leucémie Promyélocytique Aigüe
LBD	Ligand Binding Domain
NO :	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
NOS-I	NO synthase neuronale
NOS-II	NO synthase inductible
NOS-III	NO synthase endothéliale
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
RA :	Retinoic Acid
RALDH2	Rétinaldéhyde déshydrogénase-2
RAR	Récepteurs de l'acide rétinoïque (Retinoic Acid Receptor)
RARE	Retinoic Acid Response Elements
RXR	Récepteurs X des rétinoïdes (Retinoid X Receptor)
SDR	Déshydrogénases/réductases

TR	Récepteurs aux hormones thyroïdiennes
VDR	Récepteurs de la vitamine D3
µm :	micromètre

A Maman, Papa, Joelle et mes cousins.

## Remerciements

J'adresse ma profonde gratitude à mon directeur de recherche Dr Michel Anctil qui m'a accueillie dans son laboratoire. Je le remercie aussi pour son aide, ses conseils et sa rapidité lors des corrections de ce mémoire. Sa présence permanente, ses encouragements incessants m'ont aidée à surmonter toutes les difficultés. Dr Anctil, je m'incline devant votre soutien, et votre amour indéterminé.

Je tiens de même à remercier mon comité de parrainage Mme Thérèse Cabana et Mme Nicole Leclerc pour m'avoir guidée et conseillée à surmonter toutes les difficultés lors de mes expériences et pour leurs corrections.

Un gros remerciement à Dr John Kalaska pour sa présence permanente à côté de moi et son support durant les périodes difficiles.

Je remercie plus particulièrement ma collègue Meriem Bouzaiene qui m'a aidée à démarrer les expériences de ce projet ainsi que pour l'entretien de l'aquarium.

J'adresse également mes remerciements à tout le personnel du département de sciences biologiques et du département de physiologie pour leur aide, leur disponibilité et leurs conseils, tout particulièrement : Hélène Lavigne, Louise Pelletier, Joanne Noiseux, Renée Forget, Diane Guertin, Diane Lacasse, Daniel Gingras et Joanne Payette.

Je remercie ma tante Jeanette, mon oncle Hani et mes cousins pour leur présence à côté de moi et pour m'avoir apporté tout l'amour et le soutien moral nécessaire.

Mes profonds remerciements seront adressés à mes parents, qui, malgré leur présence loin de moi, m'ont poussé plus d'une fois à achever mon travail que sans eux je n'aurais jamais accompli et m'ont aidée à me rendre là où je suis maintenant.

Je finis par remercier ma soeur Joelle pour son amour, sa tendresse et surtout ses visites répétées au Canada.

**Merci à vous tous!**

# Chapitre I

## I. Introduction

L'acide rétinoïque et le monoxyde d'azote (NO) sont impliqués dans l'induction de la croissance des neurites chez les vertébrés ainsi que chez les invertébrés. Parmi les cnidaires, un récepteur analogue aux récepteurs rétinoïques fut identifié chez la méduse *Tripedalia cystophora* (Kostrouch et al., 2005), et un récepteur de type RXR a été détecté chez la pensée de mer *Renilla koellikeri* qui semble être associé aux cellules intersticielles et nerveuses (Bouzaiene et al., 2007). En outre, chez la pensée de mer, on a mis en évidence le rôle du monoxyde d'azote dans la modulation des contractions péristaltiques de son système gastrovasculaire primitif, et on a visualisé des neurones contenant une NO synthase dans la couche basi-ectodermique où se trouvent les cellules intersticielles (Anctil et al., 2005). Dans le but de montrer que ces agents morphogénétiques ont un rôle dans le développement neuronal des ancêtres des métazoaires bilatéraux, nous avons utilisé des cultures primaires de cellules du cnidaire *Renilla koellikeri* (pensée de mer).

Ce projet est basé principalement sur l'étude de l'effet de l'acide rétinoïque et du NO sur la prolifération et la différenciation cellulaires chez la pensée de mer *Renilla*

*koellikeri*. Avant de décrire les contributions de mon travail, je vais présenter les différents contextes nécessaires à la compréhension du contenu. Cette partie est constituée de trois grandes sections. La première section aborde de manière générale le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque. Plus précisément, elle aborde le rôle et le mode d'action de la vitamine A et elle décrit les acteurs impliqués dans la voie de signalisation des rétinoïdes, à savoir, le rétinol, ses métabolites ainsi que les récepteurs nucléaires intervenant dans cette voie. La seconde section présente comment se déroulent les différentes voies de signalisation par le NO. Elle montre notamment l'action de cet agent sur les cultures cellulaires. Enfin, la troisième section se consacre à la description de l'organisation générale du modèle expérimental, la pensée de mer. Cette section est suivie par l'hypothèse et le but du travail.

## **I.1 Vitamine A et rétinoïdes**

Les rétinoïdes, dérivés actifs de la vitamine A (rétinol), jouent un rôle important dans le contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaires. Le rétinol est un nutriment indispensable au bon déroulement de nombreux processus biologiques tels que la croissance, la reproduction, la vision et le fonctionnement du système immunitaire. L'humain est incapable de synthétiser le rétinol. Il doit ainsi se le procurer dans son alimentation. C'est pour cette raison que cette substance a été classifiée parmi les vitamines et qu'elle est appelée communément vitamine A. La vitamine A est présente sous deux principales formes dans les aliments : le rétinol (de source animale) et les caroténoïdes (de source végétale). Le rétinol est présent sous sa forme estérifiée (ester de rétinol) dans des produits d'origine animale, en particulier le

foie, les huiles de foie de poisson, et en plus faible quantité dans le beurre, les oeufs et les produits laitiers non écrémés. Les caroténoïdes, précurseurs naturels de la vitamine A, sont présents dans certains aliments végétaux et sont transformés par l'organisme en rétinol. Le bêta-carotène est le principal caroténoïde trouvé dans l'alimentation. Les sources de bêta-carotène sont essentiellement les fruits et légumes jaune orangés comme la carotte, le poivron, la pêche ou le melon mais aussi les légumes feuillus verts comme le persil, l'oseille ou l'épinard (McLaren & Frigg, 2001).

Les apports journaliers recommandés en vitamine A varient selon l'âge. La carence en vitamine A, associée à des modes de consommation alimentaire monotones et restreints, constitue un grave problème de santé publique à l'échelle de la planète. Elle est la principale cause de cécité infantile dans le monde, mais aussi une cause importante de mortalité des jeunes enfants (Bendeck et al., 1997). En effet, le déficit d'apport en vitamine A, lié à de nombreux facteurs sociaux, culturels, économiques, environnementaux et éducatifs, est largement répandu parmi les enfants dans les pays en développement où la consommation de produits animaux est faible et où les céréales ou féculents sont largement prédominants. De plus, l'acide rétinoïque joue un rôle déterminant dans la différenciation des cellules épithéliales en culture. En absence d'acide rétinoïque, les cellules s'orientent vers une différenciation squameuse (Jetten et al., 1992).

Au contraire, un apport excessif en vitamine A cause l'hypervitaminose A qui se traduit par des phénomènes de toxicité divers (Dillon et al., 1995), comme des atteintes hépatiques, des troubles du métabolisme osseux, des modifications de la peau et des malformations foetales, plus particulièrement au niveau du système nerveux et des yeux, chez la femme enceinte, surtout en début de grossesse.

La vitamine A, ou rétinol est une des premières vitamines à avoir été identifiée. Elle fut découverte en 1913, comme une substance liposoluble nécessaire pour la nutrition normale (Loescher & Sauer, 1984). Son rôle primordial dans le mécanisme de la vision est maintenant clairement établi. Elle intervient également dans la régulation (activation, répression) de l'expression des gènes, et est ainsi impliquée dans de nombreuses fonctions de l'organisme: développement de l'embryon, renouvellement des tissus épithéliaux (peau, muqueuse intestinale), système immunitaire, différenciation cellulaire (des cellules hématopoïétiques). Ainsi, l'acide rétinoïque est connu pour avoir des rôles divers dans la neurogénèse chez les mammifères : spécification neuronale à partir de cellules souches (Kondo et al., 2005).

En plus des propriétés de la vitamine A, le  $\beta$ -carotène peut agir comme antioxydant (destruction des radicaux libres). L'acide rétinoïque, quant à lui, possède une activité plus spécifique au niveau de la différenciation cellulaire d'une large variété de types cellulaires embryonnaires et adultes (Wendling et al., 2001). En effet, utilisé depuis le début des années 80 pour le traitement de nombreuses maladies dermatologiques, dont le psoriasis et l'acné sévère (Goodman, 1984), ce métabolite de la vitamine A est plus récemment associé au traitement de certains cancers, dont les LAP (leucémie promyélocytaire aiguë) (Degos et al., 1990; 1991). En fait, il intervient tout au long de la vie de l'organisme, de la gastrulation à la mort. Il régule le développement et agit aussi bien dans la cellule qu'à distance.

Donc, d'une façon générale, les rétinoïdes sont impliqués dans le développement embryonnaire et la vie post natale au niveau de la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Ces trois processus constituent la base moléculaire

pour l'utilisation des rétinoïdes dans le traitement de certaines maladies de la peau et de certain cancers.

Par ailleurs, en 1922, neuf ans avant que la structure chimique de la vitamine A ne soit connue, des chercheurs s'aperçurent qu'un régime pauvre en vitamine A chez des petits mammifères s'accompagne d'un développement de métaplasies épithéliales du système respiratoire et des glandes salivaires (Mori, 1922). Puis les travaux de Wolbach et Howe rapportent en 1925 les mêmes observations pour le tractus digestif et le système génito-urinaire avec une prolifération excessive et un défaut de différenciation cellulaire (Wolbach & Howe, 1925). Ces chercheurs mettent en évidence lors de carence en vitamine A l'apparition d'une métaplasie épithéliale de type squameux semblable aux changements morphologiques induits par certains oncogènes. Plus tard, l'inverse est également rapporté sur l'épiderme de poulet dans un milieu de culture soumis à un excès en vitamine A où l'épithélium kératinisé se métaplasie en devenant muqueux (Fell & Mellanby, 1953).

## **I.2 Synthèse et dégradation de l'acide rétinoïque (AR)**

La vitamine A, liposoluble, se présente dans l'organisme sous la forme de rétinol, de rétinol (dans la rétine), d'acide rétinoïque (dans les os et les muqueuses) ou de palmitate de rétinyle (réserves stockées dans le foie). C'est dans la rétine qu'on a isolé la vitamine A pour la première fois, d'où le nom de « rétinol ».

La vitamine A est connue de longue date comme « vitamine de croissance ». Elle joue un rôle important dans la vision, notamment au chapitre de l'adaptation de l'oeil à l'obscurité, mais aussi dans la croissance des os, la reproduction et la régulation du

système immunitaire. Elle contribue à la santé de la peau et des muqueuses (yeux, voies respiratoires et urinaires, intestins), qui constituent notre première ligne de défense contre les bactéries et les virus.

Elle est essentielle à la différenciation et à la croissance cellulaire, car elle participe à la transcription de certains gènes et à la synthèse de certaines protéines. Elle favorise également l'absorption du fer et semble jouer un rôle dans la régulation des réponses inflammatoires.

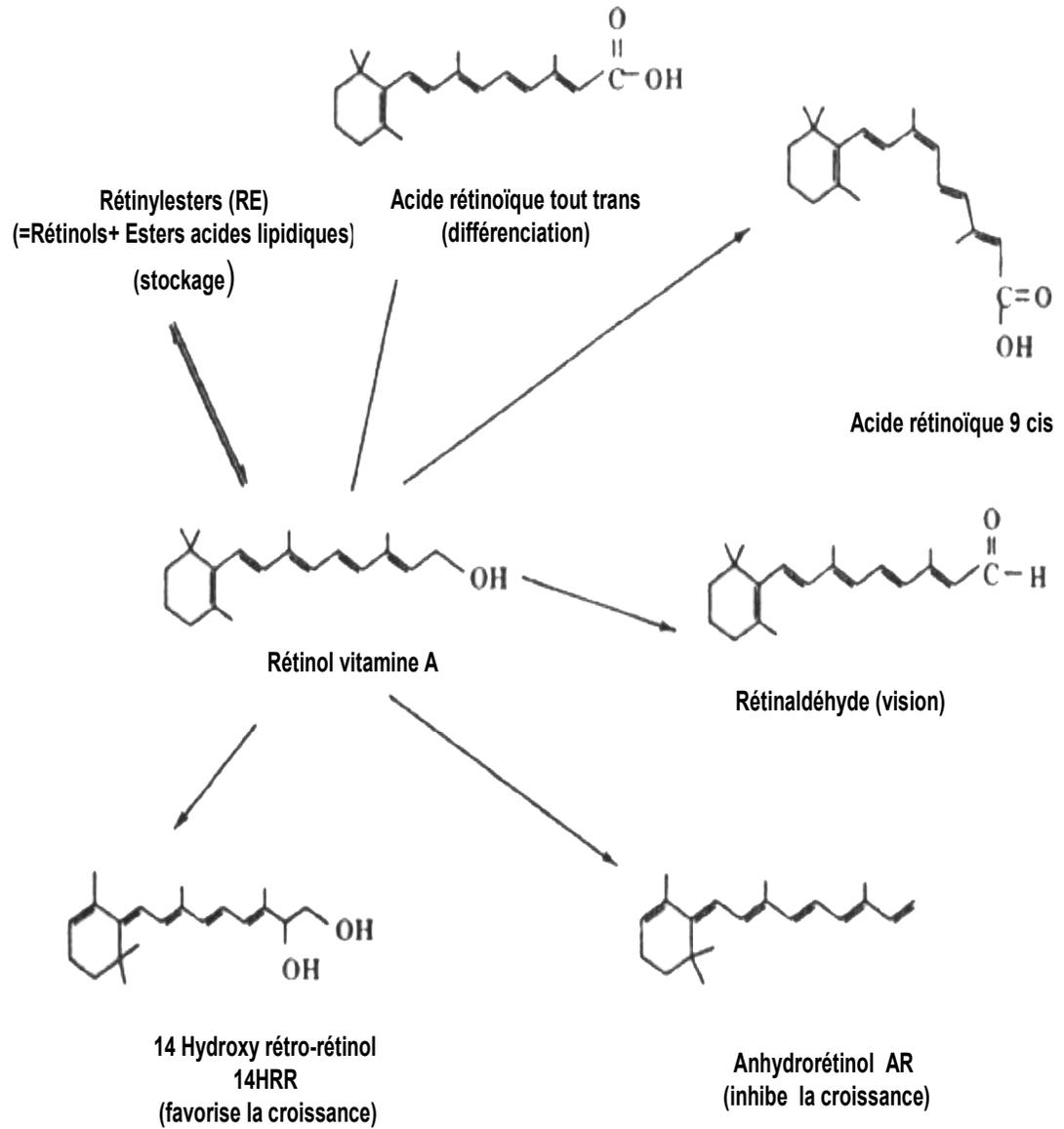
Le rétinol est le rétinoïde majoritaire dans le sang, provenant de la conversion du  $\beta$ -carotène et des rétinyl esters alimentaires dans l'intestin et/ou des rétinyl esters stockés dans le foie. L'acide rétinoïque est présent en faibles concentrations dans le plasma et est synthétisé dans les tissus possédant le système enzymatique approprié. Les rétinoïdes existent sous plusieurs formes (Fig. 1). Leur action est le résultat de la communication et de la coordination entre plusieurs composés : des hormones, des protéines de liaison, des récepteurs et des enzymes. Cette coordination se produit chez tous les organismes selon un patron spécifique (Napoli, 1996).

Dans sa forme libre, un rétinoïde se liant à une protéine de liaison (rétinol cellulaire liant la protéine) sert de modulateur de la concentration d'enzymes, qui catalysent le métabolisme du rétinol. Cette liaison peut aussi servir de substrat pour le métabolisme de quelques rétinoïdes (Napoli, 1996). L'oxydation du rétinol en acide rétinoïque est un processus enzymatique en deux étapes dont le rétinal est le métabolite intermédiaire, la première oxydation étant réversible et la deuxième irréversible. La synthèse de l'acide rétinoïque implique plusieurs déshydrogénases appartenant à quatre familles distinctes, soient les alcools déshydrogénases (ADH), les déshydrogénases/réductases à chaînes courtes (SDR), les aldéhydes déshydrogénases

(ALDH), ainsi que les enzymes de la famille des cytochromes P450 (Napoli, 1999; Duester et al., 2003). L'importance des ADH et des ALDH dans la synthèse de l'acide rétinoïque lors de l'embryogenèse et chez l'adulte est illustrée par leurs domaines d'expression et par les phénotypes résultant de l'inactivation génique chez la souris. Par exemple, ADH3 est exprimée de manière ubiquitaire lors de l'embryogenèse, assurant une conversion du rétinol en rétinol dans la plupart des tissus. RALDH2 est principalement responsable de la conversion histo-spécifique du rétinol en acide rétinoïque dans le mésoderme embryonnaire, la suppression ciblée de RALDH2 chez la souris provoquant la mort embryonnaire précoce (Duester et al., 2003). Chez l'adulte, les ADH de classe I et IV ainsi que RALDH1/4 sont exprimées dans les épithéliums qui dépendent de l'AR pour leur différenciation normale (Duester et al., 2003).

En effet, dans le cas de la souris, le blocage de la production de RALDH2 (rétinaldéhyde déhydrogénase-2), l'enzyme responsable de la synthèse de l'acide rétinoïque, chez des embryons mutants provoque la mort embryonnaire précoce (Duester et al., 2003). Ces mutants sont incapables d'opérer la rotation axiale du corps, souffrent d'un raccourcissement drastique de l'axe antéropostérieur, d'anomalies du système nerveux central, et leurs membres ne se forment pas (Niederreither et al., 1999). Ils meurent à mi-gestation des suites de ces malformations et des perturbations du développement. En revanche, l'administration d'acide rétinoïque maternel avant ce stade permet de compenser la quasi-totalité de ces malformations, résultantes d'un manque dans la synthèse embryonnaire d'acide rétinoïque. Ceci démontre ainsi sans équivoque l'importance cruciale de l'acide rétinoïque synthétisé par l'embryon comme signal hormonal au cours du développement précoce chez les mammifères.

Un excès d'acide rétinoïque peut entraîner la formation de membres supplémentaires chez la souris mutante âgée de six jours (Chambon et al., 1996). Le rôle de l'acide rétinoïque dans la première semaine du développement de l'embryon de la souris est démontré par la méthode d'invalidation des gènes (*knock-out*).



**Fig. 1** : Structure des rétinoïdes (d'après Means & Gudas, 1995).

### **I.3 L'acide rétinoïque : tératogène et signal inducteur**

L'acide rétinoïque est connu comme régulateur important de l'expression génique durant la croissance, le développement, et dans les tumeurs; il est essentiel pour la croissance normale et pour le développement de l'embryon. Cependant un excès a des effets tératogènes. Au début des années 1930, des chercheurs remarquèrent chez l'animal, qu'un manque de vitamine A au cours de la gestation entraînait des malformations foetales. Les anomalies les plus graves portaient sur le cerveau, qui présentait souvent des malformations importantes. À peu près à la même époque, divers travaux expérimentaux aboutirent à la découverte surprenante que l'excès de vitamine A pouvait provoquer des anomalies similaires (Purves et al., 2005). Ces observations suggéraient que toute une famille de composés chimiques, les rétinoïdes, précurseurs ou dérivés métaboliques de la vitamine A, pouvaient être tératogènes. Les effets tératogènes de doses pharmacologiques d'acide rétinoïque, dépendant ou non des récepteurs nucléaires, ont, par ailleurs, suggéré qu'il agirait en tant que morphogène conférant aux cellules une information de position nécessaire à la mise en place de l'axe antéro-postérieur du corps et des membres. Ceci indiquent que l'acide rétinoïque est effectivement le métabolite actif de la vitamine A au cours du développement; participant également à l'organogenèse de nombreux systèmes, ainsi qu'à plusieurs étapes du développement d'un même organe. En outre, les effets délétères de la carence en vitamine A chez le rat après la naissance ont montré qu'elle était aussi essentielle à la croissance, à la survie, à la reproduction, à la vision, ainsi qu'au maintien de l'état différencié normal de nombreux tissus (Wilson et al., 1953) .

Cet acide ou ses dérivés agissent en induisant, comme les hormones stéroïdiennes, la synthèse d'ARN messager et de protéines spécifiques; ils stimulent la différenciation cellulaire, en particulier pour les cellules épithéliales, la sécrétion de mucus, les mécanismes immunitaires, les fonctions de reproduction et la protection contre les cancers.

### **I.3.1 Carence et excès en acide rétinoïque**

Plusieurs études ont démontré qu'un déficit en vitamine A entraîne des symptômes caractéristiques liés au dysfonctionnement de divers mécanismes cellulaires auxquels les rétinoïdes participent. Parmi ces manifestations on cite une vision nocturne défectueuse, une kératinisation du tissu épithélial de l'oeil, des poumons, du tractus gastro-intestinal et des voies uro-génitales (Sporn & Roberts, 1983). En effet, chez les poissons, la carence provoque un ralentissement de la croissance. Cependant, au niveau du bourgeon des membres, un gradient d'acide rétinoïque assure le patron de croissance des doigts. Un excès en acide rétinoïque provoque l'absence, la duplication ou l'orientation anormale des phalanges (Eichele et al., 1985; Sundin & Eichele, 1992). D'autres travaux ont indiqué aussi que le développement du patron morphologique du cerveau est aussi sous la régulation du système de signalisation de l'acide rétinoïque, et que des concentrations d'acide rétinoïque légèrement en excès causent des malformations crânio-faciales chez des mammifères, des oiseaux, des amphibiens et des poissons (Alexandre et al., 1996; Hill et al., 1995; Morris-Kay et al., 1991; Sive et al., 1990; Tabin, 1995; Vandersea et al., 1998; Zhang et al., 1996).

Les récepteurs de l'acide rétinoïque, et par conséquent l'acide rétinoïque, sont notamment indispensables à l'ontogenèse des dérivés mésenchymateux de la crête neurale. Ils sont impliqués dans l'établissement des patrons le long de l'axe antéro-postérieur du corps en contrôlant directement l'expression de certains gènes *Hox* (Dupé et al, 1997), ainsi que dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur des membres (Dupé et al., 1999b; Hoffmann & Eichele, 1994; Lohnes et al., 1994; Lu et al., 1999; Mascrez et al., 1998; Ross et al., 2000; Stratford et al., 1999; Tabin, 1995). Ils interviennent par ailleurs dans l'histogenèse de la rétine, la différenciation des cardiomyocytes (Kastner et al., 1994, 1997), ainsi que dans le contrôle de l'apoptose dans la rétine (Grondona et al., 1996). En outre d'un point de vue physiologique, ces molécules sont directement impliquées dans le contrôle de grandes fonctions comme la reproduction, la différenciation cellulaire ou l'homéostasie.

Donc, le parallèle entre les symptômes de carence ou d'excès en vitamine A et les effets constatés dans les populations étudiées mettent en jeu des conséquences pouvant être associées aux déséquilibres en rétinoïdes, comme l'observation de malformations, la fréquence des cancers et des lésions dermiques.

### **I.3.2 Rôle de l'acide rétinoïque dans la prévention du cancer**

Depuis que l'on connaît leur rôle dans la morphogénèse et leur importance sur le contrôle de la différenciation cellulaire des épithéliums, les rétinoïdes suscitent un intérêt grandissant dans la lutte contre le cancer en raison de leurs propriétés antiprolifératives et préventives de tumeurs épithéliales (chimioprévention et le traitement de certains cancers); puisque la plupart des néoplasies (nouvelle croissance,

qui se développe par prolifération cellulaire, désignant tumeur ou cancer) se forment à partir d'une structure épithéliale et s'associent à une perte de la différenciation cellulaire (Lasnitzki, 1976; Moon & Mehta, 1991).

L'association de la vitamine A avec le cancer a été initialement signalée en 1926, lorsque des rats nourris par une alimentation déficiente en vitamine A ont développé des carcinomes gastriques (Fujimake, 1926). De plus, des expériences effectuées par Lasnitski ont montré que l'administration des rétinoïdes diminue l'effet de certains cancérogènes en inhibant *in vitro* chez la souris des lésions pré-cancéreuses prostatiques par divers rétinoïdes (Lasnitski, 1976).

Ainsi, chez l'homme, de nombreux cancers surviennent dans les tissus épithéliaux qui dépendent des rétinoïdes pour une différenciation cellulaire normale. A cet égard, certaines études épidémiologiques ont montré une corrélation négative entre le contenu en vitamine A du régime alimentaire et le risque de survenue de cancer (Blot et al., 1993; Wald et al., 1980).

Dès lors on a commencé à saisir l'importance d'approfondir le rôle des rétinoïdes sur la carcinogenèse, via l'acide rétinoïque, par l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et la croissance de la cellule. Mais parallèlement à cela, il existe d'autres mécanismes anti-tumoraux grâce auxquels les rétinoïdes agissent; ainsi leurs capacités immuno-modulatrices représentent un moyen important de défense contre le développement de tumeurs. D'une manière plus spécifique, les mécanismes d'action des rétinoïdes dans la prévention et la thérapie cancéreuse agissent à 5 niveaux différents de la carcinogenèse: sur le carcinogène lui-même, dans la phase de promotion de la tumeur, sur la perte de différenciation cellulaire, sur la réponse immune et dans la phase de progression tumorale (Gollnick & Orfanos, 1991).

### **I.3.3 Récepteurs de l'acide rétinoïque**

#### **I.3.3.a Deux types de récepteurs RAR et RXR**

L'activité biologique associée à la vitamine A se produit suite aux liaisons entre ligands et récepteurs nucléaires. En 1985, les travaux de Lottan sur l'acide rétinoïque, un dérivé actif de la vitamine A, suggérait que cette molécule pourrait fonctionner comme des stéroïdes. En 1986, on a effectivement trouvé un récepteur similaire pour l'acide rétinoïque. Ainsi les mécanismes moléculaires d'action de la vitamine A et des rétinoïdes ont abouti à l'identification et la caractérisation des récepteurs de la vitamine A qui appartiennent à une super-famille de récepteurs nucléaires dont font également partie les récepteurs aux hormones stéroïdiennes, tels que les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) et aux oestrogènes (ER), les récepteurs pour les hormones non stéroïdiennes comme le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR), le récepteur de la vitamine D3 (VDR), et également les récepteurs pour divers métabolites lipidiques comme les acides gras et les prostaglandines (Green & Chambon, 1986). Il existe deux séries de récepteurs rétinoïques: les RAR ou « récepteurs de l'acide rétinoïque » dont nous connaissons 3 sous-types ( $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$ , et  $RAR\gamma$ ) avec de nombreuses isoformes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\gamma 1$  et  $\gamma 2$ .) et dont les ligands sont l'acide tout-trans rétinoïque et l'acide 9-cis rétinoïque (Kastner et al., 1994), puis les récepteurs RXR ou « récepteurs X des rétinoïdes », comprenant aussi 3 sous-types ( $RXR\alpha$ ,  $RXR\beta$ ,  $RXR\gamma$ ) et de nombreuses isoformes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  et  $\gamma 2$ ) liés, spécifiquement et uniquement, par l'acide 9-cis rétinoïque (Allegretto et al., 1993 ; Allenby et al., 1993).

Ces récepteurs, régulateurs transcriptionnels ligand-dépendants, appartiennent à une famille de facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes en fonction de la fixation d'un ligand et activent par la suite la transcription du gène (Chambon, 1996, 2005).

Une fois liés par leurs ligands, les récepteurs RAR et RXR forment les dimères RAR:RXR qui peuvent se lier à l'ADN et, plus spécifiquement, aux éléments de réponse de l'acide rétinoïque (retinoic acid response elements ou RARE) des gènes cibles. Les RAR forment un hétérodimère RAR-RXR et les RXR un homodimère RXR-RXR. A cela s'ajoute la possibilité pour les récepteurs RXR de créer un hétérodimère avec les récepteurs de la vitamine D, des hormones thyroïdiennes, ceux des PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) et avec d'autres récepteurs encore. Ceci montre toute la complexité de ce système dans lequel les multiples isoformes de ces récepteurs RAR et RXR sont des partenaires hétérodimériques susceptibles de s'associer avec différents ligands.

L'influence sur la transcription génétique peut être une activation ou une répression: l'induction de la transcription se traduit par la fixation du complexe ternaire (RAR-RA-RXR) sur les RARE en position 5' tandis que la répression a lieu par la fixation du complexe sur les RARE en position 3'. L'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires peut être contrôlée par la liaison de corépresseurs en l'absence de ligand et le recrutement de coactivateurs après liaison du ligand (Xu et al., 1999).

Compte tenu des nombreuses isoformes de récepteurs connus pour l'acide rétinoïque, de leurs nombreuses possibilités de dimérisation, des différents éléments de réponses à l'acide rétinoïque et donc des multiples protéines exprimées, l'action des rétinoïdes semble bien complexe. Ainsi pouvait s'expliquer l'action pléiotrope de la vitamine A

et de son dérivé actif, l'acide rétinoïque, non seulement au niveau de la croissance et de multiples fonctions comme la vision ou le maintien des tissus, mais également au cours de l'embryogenèse et du développement (Katzenellenbogen J.A. & Katzenellenbogen B.S., 1996).

En outre, la distribution des isoformes des récepteurs peut varier en fonction du tissu et du stade de développement de l'organisme, mais les RXR semblent bien conservés entre l'amphibien, le poisson, l'oiseau et le mammifère (Beckett & Petkovich, 1999). Même les fonctions sont très semblables chez le poisson et le mammifère, ce qui suggère l'importance de la signalisation des rétinoïdes au cours de l'évolution des vertébrés.

### **I.3.3.b Structure générale des récepteurs nucléaires**

Depuis l'identification des premiers récepteurs de l'acide rétinoïque (Giguère et al., 1987; Petkovich et al., 1987), ils ont été classés, selon leur homologie, comme membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens-thyroïdiens (Evans, 1988). En fait, les récepteurs nucléaires présentent la même structure générale, comprenant différents domaines fonctionnels notés de A à F. La structure des RARs est divisée en six régions fonctionnelles de A à F alors que les RXRs ne possèdent pas de région F. La région N-terminale (domaine A / B) est la plus variable en termes de taille et de séquence protéique. Il existe une forte homologie de séquence dans les domaines de liaison à l'ADN ("DNA Binding Domain" ou DBD) et de liaison au ligand ("Ligand Binding Domain" ou LBD).

Dans le domaine d'activation des récepteurs nucléaires, on trouve deux séquences portant des fonctions activatrices : AF-1 en N-terminal (domaine A/B), indépendant du ligand et AF-2 en C-terminal (domaine E/F), dépendant du ligand. Ces deux domaines (mais principalement AF-2) peuvent servir au recrutement des co-activateurs et des co-répresseurs, menant à l'activation de la transcription du gène (transactivation) (Kastner et al., 1994). Ces séquences d'acides aminés permettant la dimérisation des récepteurs, indispensable à l'activité transcriptionnelle, sont localisées dans les domaines C et E / F. La séquence NLS permet au récepteur de rester localisé dans le compartiment nucléaire. Elle peut être aussi modulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation des récepteurs nucléaires. Ces différents types de RXRs présentent une forte identité de séquence dans leurs régions C et E, mais diffèrent fortement au niveau de leurs régions A/B et D. Cette différence est ainsi spécifique d'un type donné de RXR (Chambon, 1996).

En effet, certains récepteurs nucléaires, tel que le RAR, peuvent réprimer des gènes cibles en absence ou en présence du ligand. Ces effets sont liés à l'interaction des récepteurs nucléaires avec des classes de protéines intermédiaires dont la fonction est soit d'activer (les co-activateurs), soit de réprimer (les co-répresseurs) la transcription des séquences d'acides aminés permettant la dimérisation des récepteurs, indispensable à l'activité transcriptionnelle (Xu et al., 1999).

Ainsi la liaison de l'acide rétinoïque, une fois pénétré dans le noyau, à son récepteur induit l'activation de ce complexe qui peut alors se lier à l'ADN au niveau d'une région promotrice d'un gène appelée RARE (retinoic acid response element) et réguler la transcription des gènes.

### **Domaine de liaison à l'ADN**

Le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires est la région où l'homologie de séquence est la plus importante entre les différents récepteurs nucléaires. Il est composé de 66 à 68 acides aminés dont 9 résidus cystéine parfaitement conservés. Ce domaine contient 2 séquences riches en acides aminés cystéine, lysine et arginine, formant une structure en forme de doigt contenant un ion zinc. Ce motif en doigt de zinc, retrouvé dans d'autres facteurs de transcription, permet au récepteur de se fixer sur la double hélice d'ADN (Pettersson & Gustafsson, 2001).

### **I.3.4 Implication de l'acide rétinoïque chez les cnidaires**

L'acide rétinoïque est connu comme un morphogène très répandu chez les animaux supérieurs. Ceci n'empêche pas le fait que des récepteurs très proches de RXR aient été retrouvés chez des groupes primitifs d'invertébrés tels que les spongiaires et les cnidaires.

En fait, plusieurs études ont porté sur l'existence de récepteurs RXR chez les cnidaires et les spongiaires. Ainsi, lorsqu'on expose différentes espèces de spongiaires à l'acide rétinoïque, on remarque qu'il y a modification de l'adhésion cellulaire, ce qui suggère l'existence de récepteurs pour l'acide rétinoïque chez cet embranchement primitif (Imsiecke et al., 1996). Le clonage du récepteur RXR chez le spongiaire *Suberites domuncula* démontre son existence chez cet espèce, où on a aussi démontré que l'acide rétinoïque exerce une régulation positive sur le récepteur RXR (Wiens et al., 2003).

D'autre part, la mise en évidence d'un récepteur de type rétinoïque chez les cnidaires tel la pensée de mer et *Acropora* (Bouzaiene et al., 2007) suggère que ce récepteur est ancien du point de vue évolutif. Grâce à un anticorps dirigé contre RXR on a montré que ce récepteur est exprimé dans tous les stades de développement chez un autre cnidaire, *T. cystophora*, sauf le stade ephydra (Kostrouch et al., 1998). De ce point de vue, nous émettons l'hypothèse que le rôle du récepteur RXR soit aussi conservé. Il serait donc impliqué essentiellement dans le développement et le maintien de l'état différencié des cellules nerveuses du plexus nerveux chez les espèces de ce phylum.

Étant donné l'importance de l'acide rétinoïque et de ces récepteurs impliqués essentiellement dans la régulation cellulaire de la croissance, de la différenciation, et du développement, leur étude chez la pensée de mer est intéressante. Ceci nous permet de vérifier si le rôle de l'acide rétinoïque a été conservé depuis l'émergence évolutive des premiers systèmes nerveux.

## **I.4 Monoxyde d'azote (NO)**

### **I.4.1 Généralités**

Le monoxyde d'azote (NO) est un composé naturel, radical libre et stable, produit de la réduction bactériologique des nitrates et nitrites dans la terre et les eaux, et de l'oxydation enzymatique de la L-arginine en L-citrulline, en présence de NADPH, chez les animaux. Le NO est un gaz qui, à l'état dissous, peut franchir les membranes biologiques et, contenant un électron célibataire, est chimiquement très réactif. Il est considéré comme un important neurotransmetteur chez les mammifères et l'un des rares neurotransmetteurs gazeux connus.

La découverte que les cellules endothéliales vasculaires libéraient du NO et que celui-ci était produit à partir d'un acide aminé, la L-arginine, mit en évidence un nouveau système biologique ubiquitaire (Ignarro et al., 1987). Furchgott et Zawadski (1980) ont démontré que la relaxation artérielle induite par l'acétylcholine dépendait d'un endothélium intact qui produisait une substance pouvant diffuser et agir sur les cellules musculaires lisses. Cette substance fut nommée *endothelial derived relaxing factor* (EDRF) jusqu'à ce que Palmer *et al* (1987) découvrent qu'il s'agissait du NO. Le NO ayant suscité beaucoup d'intérêt au cours des années qui suivirent, sa découverte fut récompensée du Prix Nobel de médecine en 1998, décerné à R.F. Furchgott, L.J. Ignarro et F. Murad.

Cette molécule endogène, libérée par les cellules endothéliales (couche recouvrant la paroi interne des vaisseaux), les macrophages, les cellules du foie et les neurones, est synthétisée naturellement par le corps à partir de la L-arginine, un acide aminé (Moncada et al., 1991), et de l'oxygène par des enzymes finement régulés appelés NO-synthases (NOS), qui sont des hémoprotéines proches du cytochrome P450 (White & Marletta., 1992).

Le NO joue un rôle important dans les défenses immunitaires ; il participe au pouvoir bactéricide des macrophages. L'activation de ces derniers par les cytokines augmente, en effet, la production de NO. Le NO joue aussi un rôle de neuromédiateur (Sorkin, 1993).

La biosynthèse de NO varie selon l'état physiopathologique de l'individu. Elle augmente chez les sportifs et les malades soumis à une infection. C'est un indice dans certaines pathologies, telles que l'asthme, les myopathies ou les états inflammatoires aigus et chroniques (Thébaud et al., 1999). NO diffuse aisément dans les tissus. Par

son affinité pour l'ion  $\text{Fe}^{++}$ , NO réagit rapidement avec les hémoprotéines et les centres fer-soufre, telles que la guanylate cyclase soluble, pour donner les composés nitrosylés. Il s'oxyde plus lentement pour donner des oxydes de NO qui nitrosent les thiols en thionitrite (Garthwaite et al., 1995). Transporté sous ces différentes formes, libéré spontanément ou par des mécanismes plus ou moins bien élucidés, il accède à la plupart des cellules et régule la consommation de l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale en interagissant avec la cytochrome oxydase. Cette molécule gazeuse hydro et liposoluble peut agir à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules et possède un large spectre d'actions physiologiques, tant au niveau rénal que cardiovasculaire, pulmonaire et gastro-intestinal.

Dans le système cardiovasculaire, il diminue la pression sanguine en activant une hémoprotéine, la guanylate cyclase présente dans les cellules musculaires, contribuant ainsi au maintien du tonus vasodilatateur nécessaire pour la régulation de la circulation sanguine et le contrôle de la pression artérielle (Palmer et al., 1987). Le NO produit par l'endothélium ou les plaquettes inhibe aussi l'agrégation et l'adhésion des plaquettes. Il empêche l'adhésion des leucocytes et module la prolifération des cellules musculaires lisses. NO joue un rôle homéostatique dans les fonctions vasculaires et une diminution de sa synthèse ou de ses effets contribue au développement de certaines pathologies vasculaires.

Dans le système nerveux central, il agit comme un neuromédiateur, participant à l'acquisition de la mémoire, coordonnant de nombreuses activités neuronales, régulant le flux sanguin et modulant la douleur. Dans le système nerveux périphérique, NO est libéré par des terminaisons nitrinergiques qui médient la vasodilatation neurogénique et qui régulent certaines fonctions des systèmes gastro-intestinal, respiratoire (Ziegler

et al., 1996) et urogénital (Vanderwinden et al., 1992). Toutes ces actions physiologiques du NO sont médiés par l'activation de la guanylate cyclase soluble, entraînant une augmentation de la concentration du GMP cyclique dans les cellules cibles.

D'autre part, NO est produit en grande quantité lors des réactions de défense de l'organisme. Une telle libération du NO fut premièrement observée dans des macrophages activés où il participe aux défenses de l'organisme vis-à-vis des cellules tumorales, des bactéries, des virus et d'autres microorganismes pathogènes. Libéré de cette manière, NO participe au développement de plusieurs pathologies comme le choc septique et certaines formes d'inflammation aiguë ou chronique (McIntyre et al., 1999).

#### **I.4.2 La biosynthèse de NO**

Le NO est un biomédiateur synthétisé par les NO synthases (NOS), qui consomment du B-nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et de l'O<sub>2</sub> pour oxyder la L-arginine en citrulline et NO. Les NOS utilisent pour fonctionner un ensemble de cofacteurs: la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>, molécule impliquée dans les hydroxylations aromatiques réalisées par exemple par la tyrosine hydroxylase), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et un hème (protoporphyrine IX de fer). Il existe trois isoformes de NOS, actuellement bien identifiées, les NOS I, II et III, qui sont très fortement régulées au niveau de leur activité, de la quantité de protéines et d'ARN messagers correspondants et dont la classification découle de leur ordre historique de purification. La NOS-I neuronale, est largement distribuée dans

d'autres tissus que le système nerveux avec, par exemple, une concentration importante dans les muscles squelettiques (Michel & Feron, 1997). La NOS-II inductible, purifiée et clonée à partir des macrophages de souris activés par des extraits bactériens, est exprimée dans les cellules impliquées dans les processus d'inflammation et de défense contre les infections (Nathan, 1997). Généralement, la NOS-II n'est pas présente dans les tissus sains. Elle est synthétisée dans des cellules qui ont été en contact avec des microorganismes ou des extraits membranaires de bactéries, ou induite par certaines cytokines (Sennequier & Stuehr 1996). C'est ainsi qu'elle peut apparaître dans les leucocytes, myocytes, cellules gliales, hépatocytes ou kératinocytes. Elle est aussi synthétisée au cours de certaines phases de développement de l'organisme et de la différenciation cellulaire. La NOS-III endothéliale, originellement isolée de l'endothélium vasculaire, existe aussi dans les myocytes cardiaques, les plaquettes et les neurones de l'hippocampe.

Les NOS-I et III sont présentes dans les cellules ou les tissus où elles existent d'une façon constitutive généralement sous forme de monomères inactifs (Forstermann et al., 1998). C'est la dimérisation et l'association avec la calmoduline, la L-arginine et la tétrahydroptérine qui permet d'activer l'oxygène et d'oxyder la L-arginine et enfin de libérer le NO et la citrulline. L'activité de ces deux enzymes est tributaire de la concentration en ions calcium nécessaire à l'association avec la calmoduline. Elle suit les fluctuations du gradient des ions calcium dans leur environnement qui modulent ainsi le flux du NO libéré. De plus, la NOS-III est normalement fixée à la membrane des cellules endothéliales où elle se trouve associée aux cavéolines (Feron et al., 1998). Cette structure membranaire complexe est sensible à la pression des fluides qui

s'exerce sur la membrane. La pression sanguine constitue le principal mécanisme de régulation de l'activité de la NOS-III endothéliale chez les mammifères.

En cas de production excessive, le NO peut provoquer des défaillances circulatoires. Pour diminuer la production de NO cellulaire, on utilise des inhibiteurs des NOS (Fukuto & Chaudhuri, 1995). Les premiers inhibiteurs de NOS utilisés ont été les dérivés de la L-arginine (L-méthylarginine, L-diméthylarginine, L-nitroarginine, L-aminoarginine). Ces dérivés sont des inhibiteurs efficaces mais peu spécifiques d'une classe particulière de NOS. C'est pourquoi ils peuvent être utilisés comme outils dans les études de biochimie mais sont toxiques lorsqu'ils sont administrés à un animal. Même dans le cas du choc septique où la tension vasculaire est dangereusement basse, leur administration s'est révélée néfaste. D'autres molécules sont inhibiteurs comme l'aminoguanidine plus sélective de la NOS-II, le 7- nitroindazole (Wolff & Gribin, 1994) qui agit d'abord sur la NOS-I. La recherche d'autres structures moléculaires qui seraient inhibiteurs de NOS est en pleine expansion (Boucher et al., 1999) et certains agents spécifiques pour la NOS-I ou II sont actuellement à l'essai clinique (Chabrier et al., 1999). De tels inhibiteurs représenteraient une avancée thérapeutique pour les maladies causées par une surproduction du NO, maladies qui pourraient inclure l'ischémie cérébrale, le choc septique et les migraines. L'éventail de rôles dans lesquels chacune des NOS est impliquée reste un défi pour la mise au point de médicaments et souligne la nécessité de disposer d'inhibiteurs sélectifs de chacune des NOS pour régler leur activité.

### **I.4.3 Métabolisme du NO**

L'impact de la biosynthèse du NO dépend d'une part, de la quantité produite et, d'autre part, des cibles situées à proximité du lieu de cette synthèse. Un des rôles les plus intéressants du NO provient de sa capacité de traverser les membranes et de sa large diffusion potentielle à faible concentration. Il synchroniserait des processus biologiques dans une zone de l'organisme. Ainsi le NO, produit par les isoformes constitutives (NOS-I et NOS-III), est impliqué dans la transmission d'information, en particulier comme neurotransmetteur lorsqu'il est synthétisé par la NOS-I d'un neurone, et comme vasodilatateur lorsqu'il est sécrété par le NOS-III d'une cellule endothéliale vasculaire. Un stimulus, tel que le glutamate pour un neurone postsynaptique, ou la contrainte de cisaillement pour une cellule endothéliale, provoque une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium. La calmoduline se fixe alors à l'isoforme constitutive, qui produit du NO. Celui-ci peut diffuser au travers des membranes cellulaires pour atteindre une cible dans une cellule voisine. Lorsque cette cible est la guanylate cyclase, le NO, ayant une grande affinité pour le fer, module l'activité de diverses enzymes contenant du fer. Donc il active la guanylate cyclase, enzyme hémérique (fer lié à des atomes d'azote) et hétérodimerique. L'activité cellulaire du NO passe par deux voies essentielles, celle qui consiste en la production du GMP cyclique (cGMP) à partir de la guanosine triphosphate (GTP) et la formation de peroxy-nitrites cytotoxiques (Bicker, 2005). Cette activation provoque la transformation de GTP en cGMP, dont l'augmentation est responsable de la modulation de l'activité de diverses protéines kinases qui, en favorisant la sortie de potassium hors de la cellule, provoquent une hyperpolarisation

ayant pour conséquence la relaxation, si la cellule cible est une cellule musculaire lisse (Fig. 2).

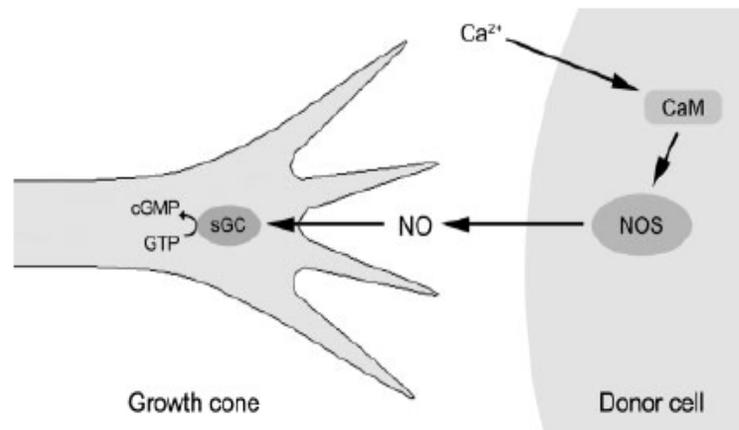
Une forte quantité de NO, en revanche, entraîne l'inhibition d'enzymes essentielles au fonctionnement cellulaire, comme la ribonucléotide réductase et certaines enzymes du transport d'électron mitochondrial (*via* la destruction des *clusters* Fe-S des mitochondries). Éventuellement, après réaction du NO avec l'ion superoxyde il y a formation de l'ion peroxyde. Cela explique l'implication du NO, après sa synthèse par des macrophages activés, dans la défense immunitaire comme instrument de destruction de cellules bactériennes et tumorales.

Alors que le NO était considéré initialement comme n'ayant que des effets bénéfiques, les études ultérieures ont montré qu'une production endogène excessive de NO peut avoir des effets néfastes. Par exemple, à concentration élevée, il provoque des lésions cérébrales, peut-être par libération excessive de glutamate responsable de l'ouverture de canaux cationiques (Vincent & Hope, 1992). Il jouerait un rôle dans la genèse de la maladie de Parkinson et au cours du choc septique. L'excès de NO pourrait participer à l'altération des cellules  $\beta$  du pancréas lors de l'installation du diabète. Il pourrait aussi stimuler le développement de certaines tumeurs ainsi que l'angiogenèse.

Le NO produit par l'isoforme inductible (NOS-II) est impliqué principalement dans la défense immunitaire. L'activation de macrophages par des cytokines ou des endotoxines provoque l'expression de la NOS-II. Celle-ci, n'étant apparemment pas régulée post-transcriptionnellement, produit du NO en continu, la quantité de NO produite dépendant donc de celle de NOS-II exprimée. NO peut alors intervenir sur des

cellules tumorales et bactériennes par son action cytostatique et cytotoxique (Endo et al., 1996).

Un cas extrême de forte production de NO est le choc septique, observé chez l'homme, où l'expression incontrôlée de NOS-II par les tissus vasculaires, en réponse à l'infection, est probablement en partie responsable des symptômes observés (Smalt et al., 1997). Le NO produit surstimule les mécanismes régulateurs de la pression sanguine normalement régulés par la NOS-III (Endo et al., 1996). L'exemple du choc septique souligne l'importance d'une inhibition appropriée des NOS.



**Fig. 2 :** Représentation schématique de la voie de signalisation cellulaire du NO/cGMP (d'après Bicker, 2005).

#### I.4.4 Rôle du NO chez les cnidaires

La présence de NO a été bien démontrée chez tous les vertébrés. Les données récentes sur la présence et le rôle de NO à travers les principaux groupes d'invertébrés montrent la vaste distribution de cette molécule de signalisation dans les organismes tout au long de l'échelle phylogénétique, des champignons (Ninnemann & Maier, 1996) aux mammifères (Garthwaite & Boulton, 1995; Moncada et al., 1991; Moroz, 2001). Effectivement, le NO est bien connu pour avoir un rôle dans la différenciation des neurones chez certains invertébrés comme les insectes et les sangsues, particulièrement dans l'extension et le guidage du cône de croissance (Bicker, 2005). Le NO est aussi nouvellement identifié chez les cnidaires, suggérant son rôle neuromodulateur, plutôt multifonctionnel, dans les systèmes effecteurs des différents cnidaires, plus précisément chez *Hydra* (Kass-Simon & Pierobon, 2007), connu parmi les premiers métazoaires ayant un système nerveux.

On a visualisé chez la pensée de mer des neurones contenant la NOS dans la couche basi-ectodermique, où se trouvent les cellules intersticielles et mis en évidence le rôle du NO dans la modulation des contractions péristaltiques de son système gastrovasculaire (Anctil et al., 2005).

Des études récentes faites chez *Hydra vulgaris*, ont montré une augmentation de la production de NO durant le processus de régénération, tout en activant la voie de signalisation NO/cGMP qui joue un rôle important au cours du développement et semble être en vigueur au début de la différenciation des cellules souches embryonnaires (Colasanti et al., 2009).

Toutes les données de la littérature signalées ici suggèrent que les recherches futures sur le rôle biologique de cette petite molécule de signalisation dans les formes de vie les plus inférieures pourrait être importantes pour comprendre l'évolution du système nerveux.

## **I.5 Modèle expérimental : *Renilla koellikeri***

### **I.5.1 L'embranchement des cnidaires dans le règne animal**

La pensée de mer *Renilla koellikeri* est un cnidaire anthozoaire appartenant à la classe des Octocoralliaires. Un des intérêts principaux de la pensée de mer comme modèle est sa position basale dans l'évolution des animaux multicellulaires et sa représentativité des animaux les plus anciens possédant un système nerveux. Conséquemment elle fait l'objet de nombreuses recherches sur son système nerveux, et particulièrement sur ses neurotransmetteurs (Grimmelikhuijzen et al. 1981*a, b, c*, 1982*a, b*; Grimmelikhuijzen 1983*a, b*). Les cnidaires représentent une forme très primitive de l'organisation et de la physiologie des métazoaires. Sur le plan évolutif, les cnidaires viennent juste après les spongiaires (éponges) et, comme ces derniers, ils sont des animaux diploblastiques caractérisés par l'apparition de deux couches de tissus véritables: l'ectoderme qui couvre l'extérieur de l'animal et la lumière du pharynx et l'endoderme qui tapisse l'appareil digestif. Ces deux couches de tissus sont séparés par une couche gélatineuse nommée la mésoglée qui varie en épaisseur selon les espèces (Beauvais et al., 1987) et ne constitue pas un mésoderme. Cet embranchement est divisé en quatre classes: les Cubozoaires, les Scyphozoaires, les Hydrozoaires et les Anthozoaires, cette dernière étant celle à laquelle appartient la

pensée de mer (Fig. 3). Les cnidaires sont parmi les animaux multicellulaires les plus simples, et les premiers dans le rang de la classification pourvus de cellules nerveuses et musculaires. Ils peuvent donc être considérés comme le groupe frère des animaux triploblastiques (Wainright et al., 1993). Les stratégies génétiques et moléculaires appliquées durant ces deux dernières décennies ont identifié un grand nombre de composants moléculaires que les bilatéraux partagent pour réguler les mécanismes de développement. De ce point de vue, les espèces de Cnidaires offrent évidemment une position intéressante pour rechercher les mécanismes déjà en place dans les ancêtres communs des bilatéraux.

### **I.5.2 Anatomie de la pensée de mer**

La pensée de mer est un animal colonial qui se présente sous forme d'un rein aplati avec une symétrie bilatérale (Wilson, 1882), d'où son nom *Renilla*. Elle mesure environ 10 cm de diamètre sur 1 cm d'épaisseur. Elle vit le long de l'Atlantique, du Golfe du Mexique et des côtes du Pacifique des Etats-Unis.

*Renilla* est formée de deux lobes symétriques, composant le plancher colonial ou rachis et d'un pédoncule, perpendiculaire au rachis, qui ancre la colonie au fond de l'eau (Kastendiek, 1976; Parker, 1920a, b). La colonie est constituée de polypes qui sont de deux sortes et qui bourgeonnent sur la face dorsale du rachis : les autozoïdes et les siphonozoïdes (Fig. 3).

Les autozoïdes, mesurant 1 à 3 cm de longueur, possèdent huit septums et huit tentacules. Ces dernières interviennent dans l'alimentation, tout en sécrétant un mucus collant afin de piéger les organismes planctoniques et les déchets organiques suspendus dans l'eau. La reproduction a lieu surtout entre le début Mai et la fin Juin.

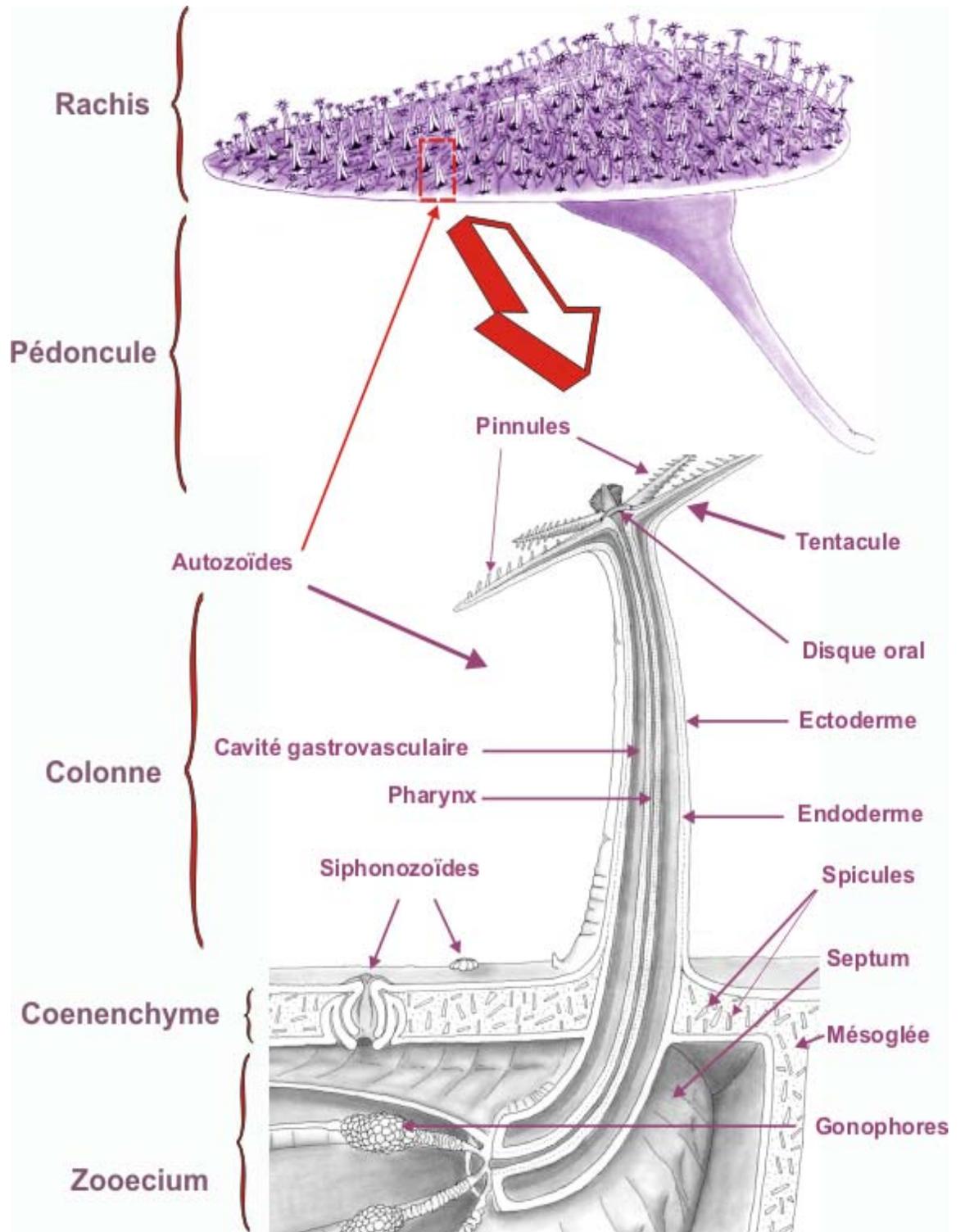
Les siphonozoïdes, variant de 2 à 3 mm de diamètre, correspondent à des zooïdes de taille réduite et leurs tentacules sont rudimentaires ou absentes. Ils sont dotés d'un septum réduit et n'ont pas de filaments septaux. Ils sont non rétractiles (Grassé, 1987). Ils ne participent pas à l'alimentation, leur fonction principale étant d'assurer un fort courant d'eau dans la colonie. Ils sont divisés en deux catégories: un siphonozoïde unique constitue une soupape de sortie qui relâche l'eau et permet de dégonfler la colonie, tous les autres sont groupés en petits points blancs répartis entre les autozoïdes, qui servent de pompes pour augmenter le volume de la colonie.

La colonie demeure généralement ancrée sur les fonds (benthique) sablonneux à l'aide de son pédoncule, localisé sur la face ventrale du rachis. Les mouvements péristaltiques au niveau du pédoncule lui permettent alors d'émerger. Ces mêmes mouvements péristaltiques lui permettent de se diriger en se laissant emporter par les courants marins (Kastendiek, 1975).

Contrairement à certaines cnidaires où deux générations alternent (phase polype et phase méduse), la pensée de mer ne possède que le stade polype. À la différence des coraux durs qui possèdent un squelette externe fortement calcifié, la pensée de mer est un corail mou, possédant des spicules pourpres de carbonate de calcium qui leur servent de squelette flexible. Les coraux mous sont constitués d'un ensemble de polypes reliés entre eux par un tissu : le coenenchyme. Les polypes sont de forme et de taille variable. Ils correspondent à un tube terminé par un disque oral qui se prolonge par des tentacules et qui s'ouvre à l'extérieur par une bouche. Un pharynx fait communiquer la bouche avec des cavités gastriques (chambre gastrovasculaire). La musculature des polypes se borne à des muscles septaux. Ils sont sous le contrôle d'un

système nerveux primitif et localisé dans les trois couches cellulaires du polype : l'ectoderme, l'endoderme et la mésogée (Fig. 3).

La pensée de mer est un animal bioluminescent, grâce à des cellules lumineuses et la présence d'une protéine fluorescente verte (GFP), qui lui permet d'émettre de la lumière quand elle est stimulée (Buck, 1973; Morin, 1974).



**Fig. 3 :** Dessin détaillé d'une colonie de *Renilla koellikeri*. Gracieuseté de Vincent Pernet.

### **I.5.3 Organisation tissulaire**

#### **I.5.3.1 L'ectoderme**

L'ectoderme correspond à la couche externe; il couvre la surface du polype et s'étend sur toute la colonie (Lyke, 1965). L'ectoderme est constitué de plusieurs types de cellules: les cellules glandulaires à cytoplasme riche en mucus, les cellules glandulaires à cytoplasme granulaire et acidophile, les cellules sensorielles uni-, bi- ou multipolaires qui sont très abondantes près de la mésoglée, les cellules interstitielles de forme irrégulières les cnidoblastes qui sont des cellules urticantes abondantes au niveau des tentacules des autozoïdes mais qui diminuent en densité en s'approchant du rachis et des polypes secondaires, et finalement les cellules épithéliomusculaires réparties au niveau des tentacules et du disque oral des autozoïdes mais qui sont absentes au niveau de l'ectoderme du rachis (Chevalier et al., 1987).

Avec cette diversité cellulaire, l'ectoderme assure principalement des rôles de protection, de défense et de capture des proies (nématocytes).

#### **1.5.3.2 La mésoglée**

La mésoglée est située entre l'ectoderme et l'endoderme. Elle sert en quelque sorte de matrice d'ancrage pour les prolongements musculaires des cellules musculo-épithéliales de l'endoderme et de l'ectoderme (Buisson & Franc, 1969). Elle est constituée par une matrice gélatineuse contenant essentiellement deux types de spicules calcaires, dont l'un beaucoup plus abondant de forme allongée et lisse, l'autre de forme plutôt variable, souvent étoilé, qui assurent une certaine rigidité à la colonie et qui contribuent également à la couleur de la colonie (Buisson & Franc, 1969; Lyke,

1965). La mésoglée est très fine et sans spicules au niveau du polype mais représente la plus grande partie du coenenchyme de la colonie au niveau du rachis et du pédoncule, avec un nombre important de spicules. Ces derniers sont disposés parallèlement dans la mésoglée et la présence ou leur absence sert de moyen de repère sur des coupes histologiques.

On y retrouve principalement des cellules particulières qualifiées d'amiboïdes, les amœbocytes, qui sont disposées de manière aléatoire dans la mésoglée, formant un complexe intramésogléal ou sous forme de cellules individuelles. On y trouve aussi des cellules nerveuses de deux types: cellules ganglionnaires de grande dimension et cellules de petite dimension à activité sécrétrice (Buisson & Franc, 1969). Des scléroblastes qui sont les cellules mères des spicules y sont aussi présentes, provenant à partir des cellules interstitielles de l'ectoderme ayant migré dans la mésoglée (Dunkelberger & Watabe, 1974).

### **I.5.3.3 L'endoderme**

L'endoderme correspond à la couche interne, appelée également le gastroderme. Il limite la surface interne des tentacules et du disque oral de chaque polype. Il revêt la surface externe du pharynx, les deux faces des cloisons et la surface interne des cavités gastrovasculaires sur toute leur longueur. Il est constitué d'un épithélium assez régulier, formé majoritairement par des cellules musculoépithéliales. À ces cellules s'ajoutent des cellules glandulaires, sensorielles, digestives et nerveuses. On y retrouve aussi des cellules lumineuses ainsi que des gamètes. Les cellules lumineuses, sont reconnues grâce à des granules blancs dans leur cytoplasme. Elles sont localisées

essentiellement dans la paroi de la colonne à la base des autozoïdes et au niveau du disque oral ainsi que dans les siphonozoïdes (Lyke, 1965). Quant aux gamètes, ils sont situés au niveau des filaments mésentériques dans la cavité gastrovasculaire.

L'endoderme des autozoïdes est caractérisé par une couronne d'algues unicellulaires symbiotiques, les zooxantelles. Ces algues intracellulaires, situées principalement à la base des tentacules et en plus faible quantité sur toute la longueur de la colonne et des tentacules, sont importantes pour le métabolisme de la pensée de mer. Les zooxanthelles produisent à partir de la lumière et des déchets azotés et phosphorés de la pensée de mer, de l'oxygène, des vitamines, des hormones et des acides aminés qui sont récupérés par l'hôte (Beauvais et al., 1987; Lyke, 1965).

#### **I.5.4 Particularités des cellules nerveuses chez les Cnidaires**

Les cnidaires sont probablement les premiers animaux à avoir développé un véritable système nerveux. Il est constitué d'un ensemble de cellules nerveuses, également appelées cellules ganglionnaires, et de neurones sensoriels qui forment un réseau nerveux qui entre en contact avec des cellules contractiles, situées au niveau de l'épiderme et du gastroderme. Ces cellules nerveuses transmettent les messages aux cellules contractiles.

L'étude de l'organisation générale du réseau nerveux montre que ce réseau est tantôt dense, formant un plexus nerveux, tel le plexus pharyngien où l'ectoderme se replie dans la cavité gastrovasculaire, tantôt lâche et clairsemé, allant même jusqu'à être constitué, dans certains endroits, par des neurones isolés, spécialement au niveau des

muscles à conduction lente, qui sont contrôlés par un nombre de neurones limités, contrairement aux muscles rétracteurs (Batham & Robson, 1960).

La recherche de neurotransmetteurs impliqués dans la transmission synaptique chez la pensée de mer a fait l'objet de plusieurs études immunohistochimiques ayant permis d'identifier divers neurones qui, interconnectés, constituent le plexus nerveux tout au long du tissu du polype. D'après les travaux de Grimmelikhuijzen, la transmission synaptique serait principalement peptidergique (Grimmelikhuijzen & Westfall, 1995), mais les petits neurotransmetteurs classiques sont aussi présents (Kass-Simon et Pierobon, 2007). On cite parmi ceux-ci la sérotonine, visualisées dans les cellules du plexus nerveux formant l'ectoderme (Umbriaco et al., 1990), la norépinéphrine, caractérisant le plexus nerveux au niveau de la mésoglée (Pani et al., 1995) et des peptides, également appelés antho-RFamide, partout dans le polype de la colonie et dans le rachis et au niveau des deux couches tissulaires (Pernet et al., 2004).

L'antho-RFamide est un peptide appartenant à la famille des RFamides, dont le préfixe « antho » fait référence à leur membre chez les anthozoaires (Grimmelikhuijzen & Graff, 1986). C'est un tétrapeptide (Glu-Gly-Arg-Phe) protégé par un groupe pyroglutamate à l'extrémité amino terminale et un groupe amide à l'extrémité carboxy terminale. Il est le seul RFamide synthétisé par la pensée de mer en quantité énorme (Grimmelikhuijzen & Groeger, 1987). Une étude par Anctil et Grimmelikhuijzen (1989) a démontré le rôle de l'antho-RFamide dans le déclenchement de l'activité neuromusculaire de la pensée de mer.

En plus des cellules ganglionnaires décrites précédemment, les cnidaires possèdent un autre type cellulaire présentant les mêmes propriétés (présence de prolongements

nerveux et établissement de jonctions synaptiques) et pouvant donc être considérés comme des cellules nerveuses. Il s'agit des cellules neurosensorielles.

Les cellules neurosensorielles réagissent aux stimuli de nature mécanique, chimique ou lumineuse. Elles se caractérisent par la présence d'un cil bien développé entouré la plupart du temps par des microvillosités ou stéréovillosités. La cytologie de ce type cellulaire n'est pas une spécificité des Cnidaires, étant retrouvée chez certaines cellules sensorielles des animaux bilatéraux, par exemple les cellules mécanoréceptrices de l'oreille interne des Vertébrés. Au pôle basal, les cellules sensorielles possèdent également des neurites (deux ou plusieurs), tortueux et ramifiés, qui s'étendent dans différents plans et dans différentes directions. De plus, elles établissent des contacts synaptiques, non seulement avec des neurones, mais également avec des cellules épithélio-musculaires. Un exemple particulier de cellule neurosensorielle est le cnidocyte (cellule urticante) (Bellis et al., 1991 ; Bullock & Horridge, 1965).

Toute cette variété de cellules nerveuses identifiées met en jeu l'existence d'un système nerveux complexe chez la pensée de mer. Ces cellules dérivent d'une population multipotente de cellules souches arrondies (Bode, 1996) se retrouvant exclusivement au niveau de l'ectoderme basal: les cellules interstitielles.

## **I.6 Hypothèse et objectif du travail**

Plusieurs études ont porté sur l'existence de récepteurs nucléaires chez les cnidaires. Les travaux de Kostrouch et al (1998) chez le cnidaire *Tripedalia cystophora* ont abouti au clonage de l'ADN provenant d'un gène possédant une forte homologie de séquence avec celui des récepteurs de l'acide rétinoïque RXR; ceci suggère sa

présence chez d'autres cnidaires tels que la pensée de mer. À cet égard, un récepteur de type RXR a été détecté chez la pensée de mer. Il semble être associé aux cellules intersticielles et nerveuses (plus ou moins différenciées), qui sont les cellules pluripotentes de ces animaux (Bouzaiene et al., 2007). Nous nous intéressons alors à vérifier si cette molécule de signalisation, dans ce cas, l'acide rétinoïque, joue un rôle dans la différenciation des neurones de la pensée de mer à partir des cellules intersticielles. Ceci nous permettra de vérifier par la suite si le rôle de l'acide rétinoïque a été conservé depuis l'émergence évolutive des premiers systèmes nerveux.

En outre, les travaux d'Anctil et al. (2005) ont mis en évidence le rôle du NO dans la modulation des contractions péristaltiques du système gastrovasculaire primitif de *Renilla koellikeri*. De plus, les auteurs ont visualisé des neurones contenant une NO synthase dans la couche basi-ectodermique où se trouvent les cellules intersticielles. Ceci nous pousse encore à vérifier si le NO est impliqué dans la différenciation et la motilité des cellules engagées dans la voie de différenciation neuronale chez la pensée de mer.

Etant donné l'action de l'acide rétinoïque ainsi que celle du NO à travers la phylogénie, nous nous attendons à ce que leurs rôles soient conservés depuis l'émergence évolutive des premiers systèmes nerveux.

## Chapitre II

### Article

Article: Estephane D, Anctil M. (2009). L'acide rétinoïque et le monoxyde d'azote favorisent la prolifération cellulaire et induisent différemment la différenciation neuronale in vitro chez le cnidaire *Renilla koellikeri* (en phase finale de préparation). Sera soumis à *Developmental Neurobiology*

Contribution de l'étudiant à l'article : L'idée originale du projet a été proposée par Michel Anctil. Les expériences concernant *Renilla koellikeri* et leur analyse ont été effectuées par Djoyce Estephane co-dirigée par Michel Anctil. L'article a été rédigé par Djoyce Estephane sous la direction de Michel Anctil.

## ACCORD DES COAUTEURS

Estephane Djoyce, ESTD08618309

M.Sc. Sciences neurologiques- 2-530-1-0. Département de physiologie

Article : Estephane D, Anctil M. (2009). Retinoic acid and nitric oxide promote cell proliferation and differentially induce neuronal differentiation in vitro in the cnidarian *Renilla koellikeri* (en phase finale de préparation). Sera soumis à *Developmental Neurobiology*.

À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Djoyce Estephane** inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Effets d'agents morphogénétiques sur la prolifération et la différenciation neuronales et épithéliales chez la pensée de mer *Renilla koellikeri*.

Signature des coauteurs

.....  
Djoyce Estephane

.....  
Michel Anctil

Date:

**Retinoic acid and nitric oxide promote cell proliferation and  
differentially induce neuronal differentiation in vitro in the cnidarian  
*Renilla koellikeri***

ESTEPHANE D., ANCTIL M.

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

Address for correspondance :

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

Tel : (514) 343-7691

Fax : (514) 343-2293

## **Abstract**

Retinoic acid (RA) and nitric oxide (NO) are known to promote neuronal development in both vertebrates and invertebrates. Retinoic acid receptors appear to be present in cnidarians and NO plays various physiological roles in several cnidarians, but there is as yet no evidence that these agents have a role in neural development in this basal metazoan phylum. We used primary cultures of cells from the sea pansy *Renilla koellikeri* to investigate the involvement of these signaling molecules in cnidarian cell differentiation. We found that both 9-cis and all-trans RA induce cell proliferation in dose- and time-dependent manners in dishes coated with polylysine from the onset of culture. Cells in cultures exposed to RA in dishes devoid of polylysine were observed to differentiate into epithelium-associated cells, including sensory cells, without net gain in cell density. NO donors also induce cell proliferation in polylysine-coated dishes, but induce neuronal differentiation and neurite outgrowth in uncoated dishes. No other cell type undergoes differentiation in the presence of NO. These observations suggest that in the sea pansy (1) cell adhesion promotes proliferation without morphogenesis and this proliferation is modulated positively by RA and NO, (2) RA and NO differentially induce neuronal differentiation in nonadherent cells while repressing proliferation, and (3) the involvement of RA and NO in neuronal differentiation appeared early during the evolutionary emergence of nervous systems.

**Key words:** anthozoan, cnidaria, cells culture, polylysine, retinoic acid, nitric oxide, proliferation, differentiation.

## Introduction

Cnidarians constitute the first animal phylum in which representatives possess an organized nervous system and neurally supported behaviors. While experimental models such as hydra and the starlet sea anemone (*Nematostella vectensis*) led to significant advances for cnidarian developmental biology (Bode, 1996; Galliot et al., 2006; Fritzenwanker et al., 2007), our understanding of mechanisms underlying neurogenesis and neuronal specification in cnidarians is limited. In hydra nerve cells are known to derive from a group of stem cells called the interstitial cell system (Bode, 1996). Cells committed to the neuronal pathway are arrested at the G2 phase and need a signal to divide and differentiate (Schaller et al., 1989). A native neuropeptide, Hym355, was reported to act as a signaling molecule positively regulating neuronal differentiation in hydra (Takahashi et al., 2000). In contrast, native peptides released by epithelial cells have inhibitory effects on neuronal differentiation (Takahashi et al., 1997; Bosch and Fujisawa, 2001). These findings beg the question: is cnidarian neuronal differentiation regulated by uniquely evolved signalling molecules, or are there other categories of signaling systems found in more complex animals that are already involved in differentiation of cnidarian nerve cells?

Two signaling molecules that were reported to be important for neuronal development in vertebrates are retinoic acid (RA) and nitric oxide (NO). RA, a physiologically active derivative of vitamin A, is known to play a variety of roles in mammalian neurogenesis, neuronal differentiation and patterning (Andrews, 1984; Liu et al., 2001; Maden et al., 1996; Maden, 2007; Sidell et al., 1983; Wilson et al., 2004

for review). Two forms of RA, all-trans and 9-cis RA, exert their actions through retinoic acid receptors (RAR) or retinoid X receptors (RXR), members of class II receptors in the nuclear receptor superfamily (Allenby et al., 1993). Other members of class II nuclear receptors, orphan COUP-TF receptors, are known to repress RA-induced neuronal differentiation in a mammalian cell line (Neuman et al., 1995). Because hydra homologs of COUP-TF receptors are expressed in a hydra neuron population during neurogenesis and are also able to repress RAR/RXR-induced transactivation in mammalian cells (Gauchat et al., 2004), a role for RA in cnidarian neuronal development can be envisaged. Recent studies have produced the first direct evidence of induction of neurite outgrowth by RA in an invertebrate, the mollusc *Lymnaea stagnalis* (Dmetrichuk et al., 2006, 2008). Therefore, widening investigations may lead to findings of a generalized role for RA in invertebrate neuronal differentiation. A hypothesized physiological role for RA in cnidarians was bolstered by (1) evidence that retinoids affect body pattern formation in a hydrozoan (Müller, 1984) and (2) the identification of a RXR-like receptor in the jellyfish *Tripedalia cystophora* showing significant similarity with the human RXR alpha receptor (Kostrouch et al., 1998). More recently, report of the presence of immunoreactive RXR in interstitial cells and neurons of two anthozoans, the sea pansy *Renilla köllikeri* and the staghorn coral *Acropora millepora*, adds support for a role of RA in cnidarian neuronal differentiation (Bouzaiene et al., 2007).

The other signalling molecule of interest, NO, is a gaseous molecule involved in many different physiological processes, including cell proliferation and differentiation, smooth muscle contraction, apoptosis, macrophage activity and neurotransmission (Krumenacker and Murad, 2006; Tota and Trimmer, 2007). It is

known to play a direct role in inhibiting mammalian neurogenesis during neuronal differentiation but with few exceptions it is not involved directly in neuronal differentiation (Estrada and Murillo-Carretero, 2005; Gibbs, 2003; Packer et al., 2003; Peunona and Enikolopov, 1995). Gaseous transmission using NO appears to be widespread in the animal kingdom (Moroz, 2001). In insects and molluscs NO is known to regulate neurite extension and neuronal migration (Seidel and Bicker, 2000; Trimm and Rehder, 2004). Although NO was shown to modulate muscle contraction and nitric oxide synthase (NOS) was found to be present in neurons of cnidarians (Anctil et al., 2005; Moroz et al., 2004), there is no evidence so far for its involvement in cnidarian neuronal development.

The evidence of the presence of retinoic acid and nitric oxide signaling systems in cnidarians prompted us to ask whether they participate in neurogenesis in this phylum. We used cell culture techniques to investigate the role of RA and NO in cell proliferation and differentiation, and especially in the process of neuronal differentiation, in the sea pansy *Renilla koellikeri*. We found that these agents affect cell proliferation and neuronal differentiation differently in adhesion-permissive and nonadhesive culture conditions.

## **Materials and methods**

### **Animals**

Colonies of *Renilla köellikeri* were purchased from, and shipped to Montreal by Marinus Scientific (Garden Grove, CA, USA). They were kept at 16°C in a 120-L tank filled with filtered artificial sea water (ASW, Instant Ocean). Sea water osmolarity was adjusted to 1100mOsm and pH to 8. Colonies were maintained under a 12h:12h light-dark cycle and they were kept unfed. They were processed within 3-4 days of their arrival.

### **Cell culture**

Sea pansy colonies were progressively anesthetized in a solution of 0.37 mol/L magnesium chloride. Autozoid polyps were excised from the colony, sliced extensively into minute fragments and large tissue pieces were discarded. The remaining small tissue pieces and cell agglomerates were dissociated at room temperature in 10ml of culture medium to which 3.1 mmol/L papain and 3.2 mmol/L dithiothreitol were added for 90 min with agitation. The culture medium contained 23 mmol/L NaCl, 0.63 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 3.69 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.38 mmol/L HEPES and 0.09 mmol/L gentamycin. It was millipore filtered, and pH was adjusted to 8. This was followed by three washes with fresh culture medium by centrifugation with a VWR microcentrifuge at 1500 rpm.

To grow dissociated cells 35-mm Nunclon culture dishes with a bottom grid were used. For some of the experiments dishes were first coated with 1mg/ml poly-L-

lysine and allowed to dry overnight. Dissociated cells were plated at a density of  $5 \times 10^3$  cells per dish (1 mL of cell suspension). Cell cultures were maintained at 11°C in an Echo Therm 30 Chilling incubator. Cells were allowed to grow to 90% confluency over a period of 8-10 days post-plating.

### **Assays of retinoic acid and nitric oxide**

The two isomers of retinoic acid (RA), 9-cis and all-trans, and the NO donors, S-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP) and amino-3-morpholinyl-1,2,3-oxadiazolium chloride (SIN-1), were purchased from Sigma-Aldrich (Canada). Stock solutions of retinoic acid were prepared using 100 % ethanol as solvent to obtain a concentration of 0.1 mmol/L. NO donors were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a stock concentration of 0.9 mmol/L.

To test the effect of retinoic acid on cultures of dissociated cells, various volumes of stock solutions of RA were added to dishes containing one day old cultures to obtain the desired final concentration. For NO donors, 100 µL of stock solutions was diluted in 5 mL of culture medium to obtain a concentration of  $2 \times 10^{-2}$  mmol/L and different volumes of this dilution were added one-day old cultures to obtain the desired final concentration. Cultures remained exposed to the test substances for their remaining life (7-10 days). For controls, untreated cultures prepared from the same animal as the treated cultures contained the same amount of vehicle, ethanol or DMSO, present in the treated cultures. In addition, degraded NO donor solutions were

used as additional controls to ensure that no byproduct was responsible for observed effects when there was no more NO producing ability.

After treatments, the cultures were maintained in the incubator at 11°C in the dark. The cultures were examined daily with a Nikon Eclipse TE300 inverted microscope equipped with phase-contrast and with Hoffman modulation contrast optics. Images were obtained with a Nikon Coolpix 4500 digital camera and processed with Corel PHOTO-Paint 12.

### **Analysis**

To assess the effects of RA or NO donors cell densities and morphologies were compared between control and treated cultures in polylysine-coated and uncoated dishes. In uncoated dishes, the cells were settled on the dish bottom. Densities were evaluated from viewing fields under a 20X objective by counting dedifferentiated and/or redifferentiated cells over areas of 2 mm<sup>2</sup> using the bottom grid squares of culture dishes as guide. The position of the selected area in each culture dish at the beginning of treatment was scored and cell density was recorded daily in that same area over the duration of treatment (6-8 days) for each dish. Average density values from five separate control and experimental cultures were then recorded and the means  $\pm$  standard error of means computed. The rates of cell proliferation and cell differentiation were analysed and displayed using Graph Pad Prism.

## **Results**

### **Cell growth in culture**

When cultured on polylysine-coated or uncoated dishes, untreated cells rapidly dedifferentiated into round or ovoid shapes and for the most part remained thus undifferentiated while their population grew over the useful life of the culture (up to 10 days). In polylysine-coated dishes, cell density of untreated cultures rose steadily to reach a 5-fold increase by days 8-10 (Fig. 1A, B), compared to a twofold increase only in uncoated dishes (Fig. 4A).

In contrast to cells grown in polylysine-coated dishes, some of the cells grown in uncoated dishes, while remaining round or slightly oval, exhibited intracellular morphologies associated with known anthozoan cell types. The most outstanding example in this study is the epitheliomuscular and bioluminescent cell of the sea pansy, characterized when dissociated by an excentric cytoplasm and a large vacuole-like pool of disorganized myofibrils (Fig. 3A; see Germain and Anctil, 1988). Symbiotic algal cells also grew in these cultures, but they were easily identified by their brown color and discarded from the cell counts.

### **Cell growth and morphogenetic effects of retinoic acid**

When cultures in polylysine-coated dishes were treated with either 9-cis or all-trans RA, cell proliferation occurred at an increasingly greater rate than in untreated cultures (Fig. 1A). By the tenth day post-treatment cell density in treated cultures had increased by three- to fourfold over that of untreated cultures. No cell differentiation

was apparent under these conditions. The RA-induced accelerated rate of cell proliferation was dose-dependent and the sigmoid curve of the relationship (Fig. 2) was consistent with a receptor-mediated event. The increase in cell density is readily apparent by visual inspection of 6 days old cultures (Fig. 2).

When cells were cultured in uncoated dishes, they began differentiating into various types of epithelium-associated cells after exposure to RA. In untreated cultures cells show few distinctive morphologies (Fig. 3A). In cultures treated with 10-100  $\mu\text{mol/L}$  9-cis or all-trans RA, cell morphologies typical of anthozoan epithelium-associated cells (Fautin and Mariscal, 1991) appear with increasing frequency, especially sensory cells, nematocytes, gland cells and ciliary motor cells (Fig. 3B). As the density of undifferentiated cells steadily declined over the life of the RA-treated cultures, the density of differentiated cells rose gradually (Fig. 4A). In contrast, no measurable increase in overall cell density was observed, thus indicating that no cell proliferation occurred in RA-treated, uncoated culture dishes. Sensory cells constituted the greater share of observed epithelial cells, with densities of other epithelial-like cell types being substantially lower to varying degrees than those of sensory cells (Fig. 4B).

### **Cell growth and morphogenetic effects of nitric oxide donors**

Both NO donors SIN-1 and SNAP enhanced cell growth in polylysine-coated dishes in a manner similar to retinoic acid. However, cell density increased at a lesser rate than in retinoic acid-treated cultures in the effective concentration range of the NO

donors (10-100  $\mu\text{mol/L}$ ), remaining around double the cell density of untreated cultures throughout the life of the cultures (Fig. 1B). In contrast, NO donors induced the differentiation of an increasingly larger number of cells into neurons in uncoated dishes. Two days after treatment with 90  $\mu\text{mol/L}$  SIN-1 or SNAP only 25% of cultured cells are identifiable as neurons, whereas 85% of the cultured cells are recognizable neurons 6 days after treatment (Fig. 5). No cell type other than neuronal was detectable in treated cultures. Cells in untreated cultures grew in number similarly to uncoated control dishes in retinoic acid experiments (compare Fig. 5 with Fig. 4A). Treatments with degraded NO donor solutions yielded the same results as in untreated cultures (not shown).

Cells in untreated cultures remained largely spherical or ovoid throughout the culture period (Fig. 6A) whereas the majority of cells displayed a smaller soma and grew fine extensions (neurites) in NO treated cultures (Fig. 6B). The nerve cells were mostly unipolar or bipolar and their long neurites showed swellings (varicosities) along their entire length (Fig. 6C). Multipolar neurons were also observed, and the neurites of some of these neurons appear to cross over each other, bifurcate and contact non-neuronal cells (Fig. 6D). These cells resemble the norepinephrine- and RFamide-immunoreactive neurons forming the nerve net in the mesoglea of the sea pansy, particularly near the endoderm (Pani et al., 1995; Pernet et al., 2004).

## **Discussion**

Our results, using the sea pansy as a cnidarian experimental model, show that the two isomers of RA and NO donors potentiate cell proliferation and induce differentiation under different culture conditions. All these agents enhance cell proliferation but fail to induce morphogenesis in polylysine-coated dishes. In contrast, while RA and NO donors both induce neuronal differentiation in uncoated dishes, they differ in their morphogenetic products, epithelial (including sensory) cells for RA and exclusively neurons for NO donors. Together with previous evidence of RA receptors (Bouzaiene et al., 2007) and NO signaling systems (Anctil et al., 2005), these results support a role for RA and NO in regulating adhesion-dependent cell proliferation and adhesion-independent neuronal differentiation in the sea pansy. It remains to be determined to which extent and in which manner the observed *in vitro* effects of these morphogens are played out *in vivo*.

## **Validation of cell culture method**

Several attempts to establish long-term cultures of cnidarian cells have met with obstacles or have altogether failed (Schmid et al., 1999 for review). Frank et al. (1994) reported successful establishment of continuous cell cultures and of cell lines in colonial anthozoans, including octocorallians other than the sea pansy, but the notorious *in vivo* plasticity of cnidarian cells and the presence of parasites and symbiont cells in cnidarian tissues cast doubt on the identity of cells proliferating over long time periods (Schmid et al., 1999). This demonstrates the need to rely on short-

term primary cultures for studies intended to examine pathways and mechanisms of cell differentiation such as in this study.

The first successful attempt at establishing a primary culture of cnidarian neurons was made in a jellyfish (a hydrozoan) in which nerve-rich tissue can be found (Przysieznik and Spencer, 1989). The authors used a homogenate of the jellyfish's own extracellular matrix (ECM) in the abundant mesogleal jelly as substrate for adhesion of the cultured neurons and in these conditions the cultures survived for up to two weeks in ASW (Przysieznik and Spencer, 1989). They and other authors (Schmid et al., 1999) tested other substrate media than ECM, including polylysine, but only ECM appeared satisfactory. However, while cell survival depends on attachment to substrate, cell proliferation was inhibited under such conditions (Schmid et al., 1999). In addition, no anthozoan possesses nerve-rich tissues or can yield sufficient ECM material for practical use as substrate for cell attachment in culture.

Polylysine-coated culture surfaces have been known for several decades to provide an adequate substrate for cell attachment and especially strong adhesion for neurons without inhibiting neurite elongation (Varon, 1979). Day and Lenhoff (1981) reported that hydra cells adhered well to polylysine and we were also able to successfully culture sea pansy cells in dishes coated with poly-L-lysine, but in agreement with Przysieznik and Spencer (1989) cells failed to undergo neuronal differentiation under such conditions. A larger concentration of polylysine (1 mg/ml) than those used for vertebrate cell cultures (0.1 mg/ml) was necessary to ensure cell adhesion, yet contrary to vertebrate cultured cells (Varon, 1979) no apparent toxicity to

sea pansy cells was noted at such a concentration. It is not clear why a high level of polylysine is needed and why sea pansy cells are resistant to its toxic effect at such a level, but the unusual lipid environment of cnidarian cell membranes (Schetz and Anderson, 1993) and the divergent molecular structure of cnidarian ECM proteins (Knack et al., 2008; Magie and Martindale, 2008) may at least partly account for these properties.

In our hands dissociated sea pansy cells plated in either uncoated or polylysine-coated dishes and in the absence of enriched media or trophic factors were able to proliferate while showing little or no evidence of differentiation within the life time of the cultures. This allowed us to design experiments during which morphogenetic agents could be tested and their effects on cell growth or morphological phenotype unambiguously observed.

### **Retinoic acid and nitric oxide promote proliferation of adherent cells**

Our results demonstrate that RA and NO potentiate cell proliferation without inducing differentiation in sea pansy cells allowed to adhere to polylysine-coated dish bottoms. This is consistent with studies on vertebrate cell lines showing that both RA (Henion and Weston, 1994; Nabeyrat et al., 1998; Wohl and Weiss, 1998) and NO (Mejia-Garcia and Paes-de-Carvalho, 2007; Ulibarri et al., 1999;) can promote proliferation and spreading of adherent cells under specific conditions. It is clear that substrate adhesion is a determining factor in the repression of differentiation of sea pansy cells exposed to RA or NO, because we have also shown that cells cultured

without substrate coating and showing little or no substrate adhesion respond to these agents by differentiating into specific cell types (see below).

The similar proliferative effects of RA and NO donors raise the possibility that RA acts through the mediation of a nitrenergic pathway. RA stimulation of NO production was previously reported in mammalian endothelial cells (Achan et al., 2002; Urano et al., 2005) and in a neuroblastoma cell line (Ghigo et al., 1998). Even if a functional link between RA and NO is discovered, the process by which cell growth is promoted and differentiation repressed in our experimental conditions remains to be examined. One possibility is that the proliferative effects of these agents are mediated through trophic factor transduction pathways that may also interfere with differentiation signals. There are several candidates identified in cnidarians, such as cnidarian homologs of vascular endothelial growth factor and receptor (Seipel et al., 2004), fibroblast growth factor (Matus et al., 2007) and insulin growth factor (Steele et al., 1996).

### **Retinoic acid and nitric oxide differentially induce neuronal differentiation in non-adherent cells**

We have shown that sea pansy cells cultured on a non-adhesive substrate differentiate into sensory and other epithelium-associated cells when exposed to RA and selectively into neuronal cells when exposed to NO donors. The RA results are consistent with numerous studies demonstrating the role of retinoids in vertebrate epithelial differentiation (Shapiro, 1986 for review), including sensory epithelia (Lefevre et al., 1993; Raz and Kelley, 1999). In contrast, the NO results do not concur

with the lack of direct involvement of nitrenergic pathways in mammalian neuronal differentiation (Estrada and Murillo-Carretero, 2005), but are consonant with invertebrate studies demonstrating a direct role in neuronal differentiation, especially neurite outgrowth and navigation (Bicker, 2005).

The induced differentiations occur in a time-dependent manner, with a gradual reversal of dominance from undifferentiated to differentiated morphologies. It is striking that while control cultures displayed a twofold increase in density, the size of cell populations remained stable during the RA- and NO-induced differentiation processes, suggesting that the morphogens inhibit growth while inducing differentiation. This is consistent with reports showing that both retinoids (Sidell, 1981; Sidell et al., 1983) and NO (Kuzin et al., 1996; Peunova and Enikolopov, 1995) suppress cell growth during differentiation of neuronal and other cell lines. Termination of cell division is required also in cnidarians to engage in processes of cell differentiation (Bode, 1996), including neurodifferentiation (Hager and David, 1997). Retinoids appear to coordinate growth arrest with neuronal differentiation in mammalian target cells through distinct RXR/RAR receptor signaling pathways (Cheung et al., 1996; Giannini et al., 1997). NO, on the other hand, appears to specifically mediate the growth suppressing effect of nerve growth factors (Peunova and Enikolopov, 1995) and is linked to the onset of differentiation only as a prerequisite. Without a better knowledge of retinoid receptor and nitrenergic signaling it will be difficult to unravel the mechanisms by which these morphogens affect cell proliferation and differentiation in this cnidarian. Although RA and NO clearly

commit sea pansy cells to different fates, it remains possible that the RA-induced arrest of cell proliferation is mediated by NO.

The occurrence of morphogen-induced differentiation only in non-adhesive conditions suggests that the absence of adhesion activates signals that make the dedifferentiated cells responsive to the morphogenetic actions of RA and NO. The nature of the hypothesized signals is suggested by studies showing that jellyfish striated muscle cells remain differentiated when the integrity of their ECM is preserved, but dedifferentiate and undergo transdifferentiation when the ECM is removed or inactivated (Schmid and Reber-Müller, 1995). Dedifferentiation in jellyfish involves disassembly of cytoskeletal components, hence the round cell shapes in culture, and is followed by DNA replication, which the cell proliferations we observed are assumed to reflect. Protein kinase C signaling may also be involved (Kurz and Schmid, 1991). In jellyfish transdifferentiation into smooth muscle cells and neurons follows dedifferentiation and cell division without any further experimental treatment. In the sea pansy cells remain largely dedifferentiated and proliferate until exposure to RA or NO when redifferentiation is initiated.

The differential effects of RA and NO suggest that epithelium-associated cell commitment and mesogleal neuron commitment are subjected to distinct signaling pathways. The majority of epithelium-associated cells in this study (sensory neurons, nematocytes, gland cells) are known in hydra to be derived from interstitial cells, a form of multipotent stem cells (Bode, 1996 for review). In hydra all neurons are associated with the epithelial monolayers (ectoderm and endoderm) and the mesogleal

jelly, which is sandwiched by the two epithelial layers, is acellular. In contrast, the mesoglea of anthozoans such as the sea pansy is thicker and contains cells including neurons resembling the ganglion cells of hydra (Fautin and Mariscal, 1991; Pani et al., 1995; Pernet et al., 2004). Thus RA appears to specifically target interstitial cells for commitment to epithelium-associated cell lineages in the sea pansy, whereas NO selectively targets precursor cells of mesogleal neurons. Mesogleal neurons are known to form nerve nets in the sea pansy (Pernet et al., 2004) and the neurite extensions of the differentiating mesogleal-like neurons in this study are seen to cross each other (Fig. 6D) as expected from cnidarian nerve-net organizations (Minobe et al., 1995).

### **Evolutionary significance**

To our knowledge this is the first report of effects of retinoids and NO on cell proliferation, neuronal differentiation and neurite outgrowth in a cnidarian. This suggests that RA and NO are important morphogens in cnidarians as they are in vertebrates. As neurons are considered to have evolved first in cnidarians, the implication is that these morphogens were functionally integrated into morphogenetic signaling early in the evolutionary emergence of nervous systems.

## References

- Achan V, Tran CTL, Arrigoni F, Whitley GS, Leiper JM, Vallance P. 2002. All-*trans*-Retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells. A role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 90:764-769.
- Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo JF, Chambon P, Levin AA. 1993. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:30-34.
- Anctil M, Poulain I, Pelletier C. 2005. Nitric oxide modulates peristaltic muscle activity associated with fluid circulation in the sea pansy *Renilla koellikeri*. *J Exp Biol* 208:2005-2018.
- Andrews PA. 1984. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line *in vitro*. *Dev Biol* 103:285-293.
- Bicker G. 2005. STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. *BioEssays* 27:495-505.
- Bode HR. 1996. The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J Cell Sci* 109:1155-1164.
- Bosch TCG, Fujisawa T. 2001. Polyp, peptides and patterning. *BioEssays* 23:420-427.
- Bouzaiene M, Angers A, Anctil M. 2007. Immunohistochemical localization of a retinoic acid-like receptor in nerve cells of two colonial anthozoans (Cnidaria). *Tissue Cell* 39:123-130.
- Cheung B, Hocker JE, Smith SA, Reichert U, Norris MD, Haber M, Stewart BW, Marshall GM. 1996. Retinoic acid receptors  $\beta$  and  $\gamma$  distinguish retinoid signals for growth inhibition and neuritogenesis in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229:349-354.
- Day RM, Lenhoff HM. 1981. Hydra mesoglea: a model for investigating epithelial cell-basement membrane interactions. *Science* 211:291-294.
- Dmetrichuk JM, Carlone RL, Jones TRB, Vesprini ND, Spencer GE. 2006. Detection of endogenous retinoids in the molluscan CNS and characterization of the trophic and tropic actions of 9-*cis* retinoic acid on isolated neurons. *J Neurosci* 28:13014-13024.

- Dmetrichuk JM, Carlone RL, Spencer GE. 2006. Retinoic acid induces neurite outgrowth and growth cone turning in invertebrate neurons. *Dev Biol* 294:39-49.
- Estrada C, Murillo-Carretero M. 2005. Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* 11:294-307.
- Fautin DG, Mariscal RN. 1991. Cnidaria: Anthozoa. In: Harrison FW, Westfall JA, editors. *Microscopic anatomy of Invertebrates, Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria and Ctenophora*. New York: Wiley-Liss, p. 267-358.
- Frank U, Rabinowitz C, Rinkevich B. 1994. In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians. *Mar Biol* 120:491-499.
- Fritzenwanker JH, Genikhovich G, Kraus Y, Technau U. 2007. Early development and axis specification in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Dev Biol* 310:264-279.
- Galliot B, Miljkovic-Licina M, de Rosa R, Chera S. 2006. Hydra, a niche for cell and developmental plasticity. *Semin Cell Dev Biol* 17:492-502.
- Gauchat D, Escriva H, Miljkovic-Licina M, Chera S, Langlois M-C, Begue A, Laudet V, Galliot B. 2004. The orphan COUP-TF nuclear receptors are markers for neurogenesis from cnidarians to vertebrates. *Dev Biol* 275:104-123.
- Germain G, Anctil M. 1988. Luminescent activity and ultrastructural characterization of photocytes dissociated from the coelenterate *Renilla köllikeri*. *Tissue Cell* 20:701-720.
- Ghigo D, Priotto C, Migliorino D, Geromin D, Franchino C, Todde R, Costamagna C, Pescarmona G, Bosia A. 1998. Retinoic acid-induced differentiation in a human neuroblastoma cell line is associated with an increase in nitric oxide synthesis. *J Cell Physiol* 174:99-106.
- Giannini G, Dawson MI, Zhang X-k, Thiele CJ. 1997. Activation of three distinct RXR/RAR heterodimers induces growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 272:26693-26701.
- Gibbs SM. 2003. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol Neurobiol* 27:107-120.
- Haase A, Bicker G. 2003. Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. *Development* 130:3977-3987.
- Hager G, David CN. 1997. Pattern of differentiated nerve cells in hydra is determined by precursor migration. *Development* 124:569-576.

- Henion PD, Weston JA. 1994. Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neural crest cell populations. *Dev Biol* 161:243-250.
- Knack BA, Iguchi A, Shinzato C, Hayward DC, Ball EE, Miller DJ. 2008. Unexpected diversity of cnidarian integrins: expression during coral integration. *BMC Evol Biol* 8:136.
- Kostrouch Z, Kostrouchova M, Love W, Jannini E, Piatigorsky J, Rall JE. 1998. Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13442-13447.
- Krumenacker JS, Murad F. 2006. NO-cGMP signaling in development and stem cells. *Mol Genet Metab* 87:311-314.
- Kurz, E, Schmid V. 1991. Effects of tumor promoters and diacylglycerol on the transdifferentiation of striated muscle cells of the medusa *Podocoryne carnea* to RFamide positive nerve cells. In: Williams RB, Cornelius PFS, Hughes RG, Robson EA (editors). *Coelenterate biology: recent research on Cnidaria and Ctenophora*. Kluwer Academic Publishers, p. 11-17.
- Kuzin B, Roberts I, Peunova N, Enikolopov G. 1996. Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87:639-649.
- Lefebvre PP, Malgrange B, Staecker H, Moonen G, Van De Water TR. 1993. Retinoic acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cell. *Science* 260:692-695.
- Liu J-P, Laufer E, Jessell TM. 2001. Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by Fgfs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* 32:997-1012.
- Maden M. 2007. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Rev Neurosci* 8:755-765.
- Maden M, Gale E, Kostetskii I, Zile M. 1996. Vitamin A-deficient quail embryos have half a midbrain and other neural defects. *Curr Biol* 6:417-426.
- Magie CR, Martindale MQ. 2008. Cell-cell adhesion in the Cnidaria: insights into the evolution of tissue morphogenesis. *Biol Bull* 214:218-232.
- Matus DQ, Thomsen GH, Martindale MQ. 2007. FGF signaling in gastrulation and neural development in *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarians. *Dev Genes Evol* 217:137-148.

- Mejia-Garcia TA, Paes-de-Carvalho R. 2007. Nitric oxide regulates cell survival in purified cultures of avian retinal neurons: involvement of multiple transduction pathways. *J Neurochem* 100:382-394.
- Minobe S, Koizumi O, Sugiyama T. 1995. Nerve cell differentiation in nerve-free tissue of epithelial hydra from precursor cells introduced by grafting. I. Tentacles and hypostome. *Dev Biol* 172:170-181.
- Moroz LL. 2001. Gaseous transmission across time and species. *Amer Zool* 41:304-320.
- Moroz LL, Meech RW, Sweedler JV, Mackie GO. 2004. Nitric oxide regulates swimming in the jellyfish *Aequorea victoria*. *J Comp Neurol* 471:26-36.
- Müller WA. 1984. Retinoids and pattern formation in a hydroid. *J Embryol Exp Morph* 81:253-271.
- Nabeyrat E, Besnard V, Corroyer S, Cazals V, Clément A. 1998. Retinoic acid-induced proliferation of lung alveolar epithelial cells: relation with the IGF system. *Am J Physiol* 275:L71-L79.
- Neuman K, Soosaar A, Nornes HO, Neuman T. 1995. Orphan receptor COUP-TF I antagonizes retinoic acid-induced neuronal differentiation. *J Neurosci Res* 41:39-48.
- Packer MA, Stasiv Y, Benraiss A, Chmielnicki E, Grinberg A, Westphal H, Goldman SA, Enikolopov G. 2003. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9566-9571.
- Pani AK, Anctil M, Umbriaco D. 1994. Neuronal localization and evoked release of norepinephrine in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J Exp Zool* 272:1-12.
- Pernet V, Anctil M, Grimmelikhuijzen CJP. 2004. Antho-RFamide-containing neurons in the primitive nervous system of the anthozoan *Renilla koellikeri*. *J Comp Neurol* 472:208-220.
- Peunova N, Enikolopov G. 1995. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375:68-73.
- Przysieszniak J, Spencer AN. 1989. Primary culture of identified neurones from a cnidarian. *J Exp Biol* 142:97-113.
- Raz Y, Kekkey MW. 1999. Retinoic acid signaling is necessary for the development of the organ of Corti. *Dev Biol* 213:180-193.
- Schaller HC, Hoffmeister SA, Dubel S. 1989. Role of the neuropeptide head activator for growth and development in hydra and mammals. *Development* 107:99-107.

- Schetz JA, Anderson PAV. 1993. Investigations of lipid components of neurone-enriched membranes of the jellyfish *Cyanea capillata*. *J Exp Biol* 177:23-39.
- Schmid V, Reber-Müller S. 1995. Transdifferentiation of isolated striated muscle of jellyfish *in vitro*: the initiation process. *Sem Cell Biol* 6:109-116.
- Schmid V, Ono S-I, Reber-Müller S. 1999. Cell-substrate interactions in Cnidaria. *Microsc Res Tech* 44:254-268.
- Seidel C, Bicker G. 2000. Nitric oxide and cGMP influence axogenesis of antennal pioneer neurons. *Development* 127:4541-4549.
- Seipel K, Eberhardt M, Müller P, Pescia E, Yanze N, Schmid V. 2004. Homologs of vascular endothelial growth factor and receptor, VEGF and VEGFR, in the jellyfish *Podocoryne camea*. *Dev Dynamics* 231:303-312.
- Shapiro SS. 1986. Retinoids and epithelial differentiation. In: Sherman MI, editor. *Retinoids and cell differentiation*. Boca Raton, CRC Press, p 29-60.
- Sidell N. 1981. Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells *in vitro*. *J Natl Cancer Inst* 68:589-596.
- Sidell N, Altman A, Haussler MR. 1983. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 148:21-30.
- Steele RE, Lieu P, Mai NH, Shenk MA, Sarras Jr MP. 1996. Response to insulin and the expression pattern of a gene encoding an insulin receptor homologue suggest a role for an insulin-like molecule in regulating growth and patterning in *Hydra*. *Dev Genes Evol* 206:247-259.
- Takahashi T, Koizumi O, Ariura, Y, Romanovitch A, Bosch TCG, Kobayakawa Y, Mohri S, Bode HR, Yum S, Hatta M, Fujisawa T. 2000. A novel neuropeptide, Hym-355, positively regulates neuron differentiation in hydra. *Development* 127:997-1005.
- Takahashi T, Muneoka Y, Lohmann J, Lopez deHaro MS, Solleder G, Bosch TCG, David CN, Bode HR, Koizumi O, Shimizu H, Hatta M, Fujizawa T, Sugiyama T. 1997. Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in hydra: Lwamide and PW families. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1241-1246.
- Tota B, Trimmer B (eds). *Nitric Oxide*. Amsterdam. Elsevier B.V. 390 p.

- Trimm KR, Rehder V. 2004. Nitric oxide acts as a slow-down and search signal in developing neurites. *Eur J neurosci* 19:809-818.
- Ulibarri JA, Mozdziak PE, Schultz E, Cook C, Best TM. 1999. Nitric oxide donors, sodium nitroprusside and *S*-Nitroso-*N*-acetylpenicillamine, stimulate myoblast proliferation *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35:215-218.
- Urano A, Sugawara A, Kanatsuka H, Kagechika H, Saito A, Sato K, Kudo M, Takeuchi K, Ito S. 2005. Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* 112:727-736.
- Varon S. 1979. The culture of chick embryo dorsal root ganglionic cells on polylysine-coated plastic. *Neurochem Res* 4:155-173.
- Wilson L, Gale E, Chambers D, Maden M. 2004. The role of retinoic acid in the dorsoventral patterning of the spinal cord. *Dev Biol* 269:433-446.
- Wohl CA, Weiss, S. 1998. Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. *J Neurobiol* 37:281-290.

## Legends to figures

**Fig. 1.** Effect of retinoic acid and nitric oxide (NO) donor on sea pansy cell proliferation in cultures maintained in poly-L-lysine-coated dishes. A: graph showing the increase of cell density over time in untreated cultures and in cultures treated with 100  $\mu\text{mol/L}$  9-cis retinoic acid added at day 2. B: graph showing the effect of 90  $\mu\text{mol/L}$  SNAP added at day 2 on the rise of cell density over time in cultures maintained in poly-L-lysine-coated dishes.

**Fig.2.** Dose-response curve of the proliferative effect of 9-cis retinoic acid on cell cultures. The panel below the graph shows the difference of cell density between representative images of untreated and retinoic acid-treated cultures at day 6.

**Fig. 3.** Micrographs of sea pansy cells in cultures maintained in uncoated dishes. A: untreated culture at day 7 in which only round epitheliomuscular cells (EMC) are identifiable. B: culture 6 days after treatment with 100  $\mu\text{mol/L}$  9-cis retinoic (culture day 7) in which ciliomotor (CMC), epitheliomuscular (EMC), gland (GC), interstitial (IC), nematocytes (NC) and sensory cells (SC) are identifiable.

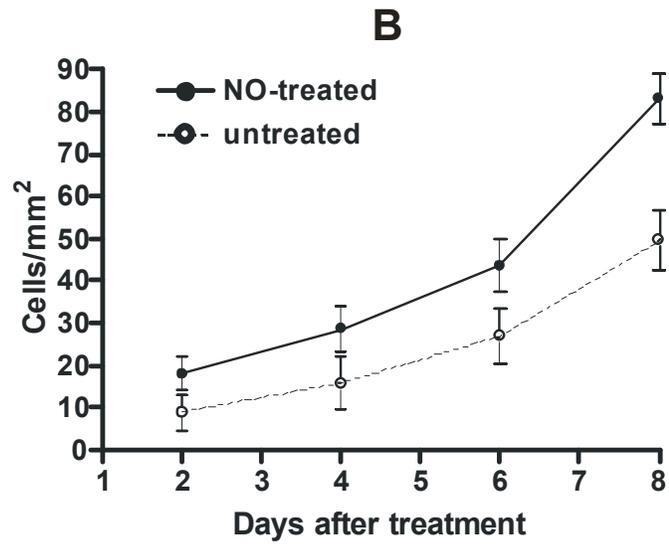
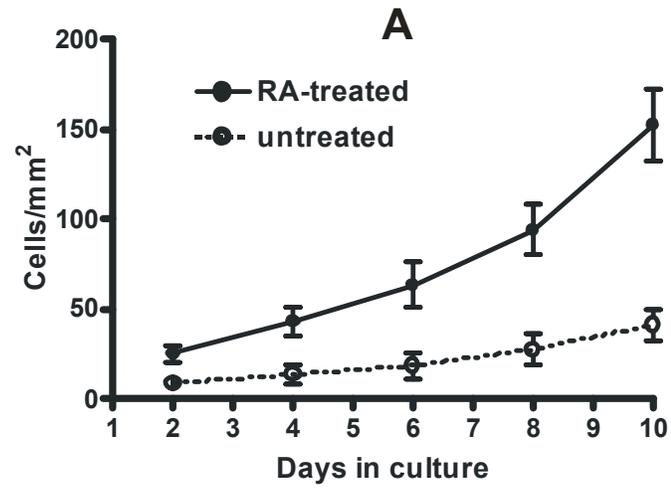
**Fig. 4.** Histograms quantifying the effect of 100  $\mu\text{mol/L}$  9-cis retinoic acid on sea pansy cell differentiation in cultures maintained in uncoated dishes. A: changes in cell density of untreated (controls) versus treated (undifferentiated and differentiated cells) cultures over time. Note the rise in cell density in untreated cultures and the reversal of relative cell densities between undifferentiated and differentiated cells in treated cultures. B: relative cell density among various types of identifiable differentiated epithelial cells after 6 days of treatment with retinoic acid.

**Fig. 5.** Histograms showing the effect of 90  $\mu\text{mol/L}$  of NO donor SIN-1 on sea pansy neuronal differentiation in cultures maintained in uncoated dishes. Note the rise in cell density in untreated cultures and the sharp reversal of relative cell densities between undifferentiated and differentiated neuronal cells in treated cultures.

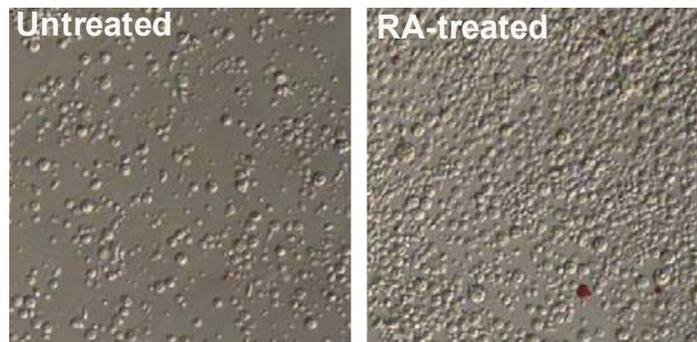
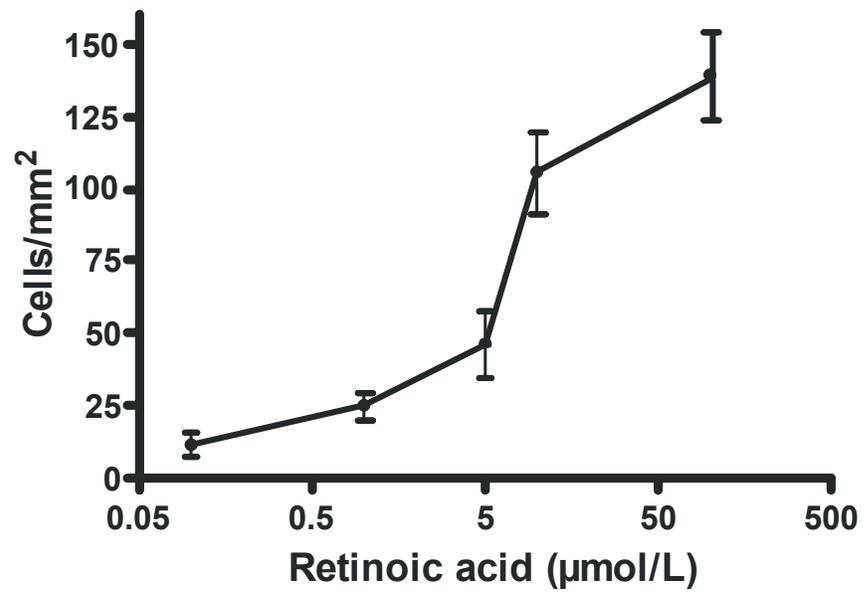
**Fig. 6.** Micrographs of neurons differentiating 6 days after treatment with 90  $\mu\text{mol/L}$  SIN-1 in cultures maintained in uncoated dishes. A: untreated culture at day 7 in which cells of various sizes possess round or ovoid shapes. B: treated culture at day 7 (6 days

post-treatment) in which numerous neuron soma with long, intersecting neurites are visible and relatively few round cells remain. C: enlarged view of a bipolar neuron with elongating, varicose neurites. D: enlarged view highlighting two neurons (NC), one of which has a neurite crossing over other neurites (arrow) and bifurcating to make contact with non-neuronal cells (arrowheads).

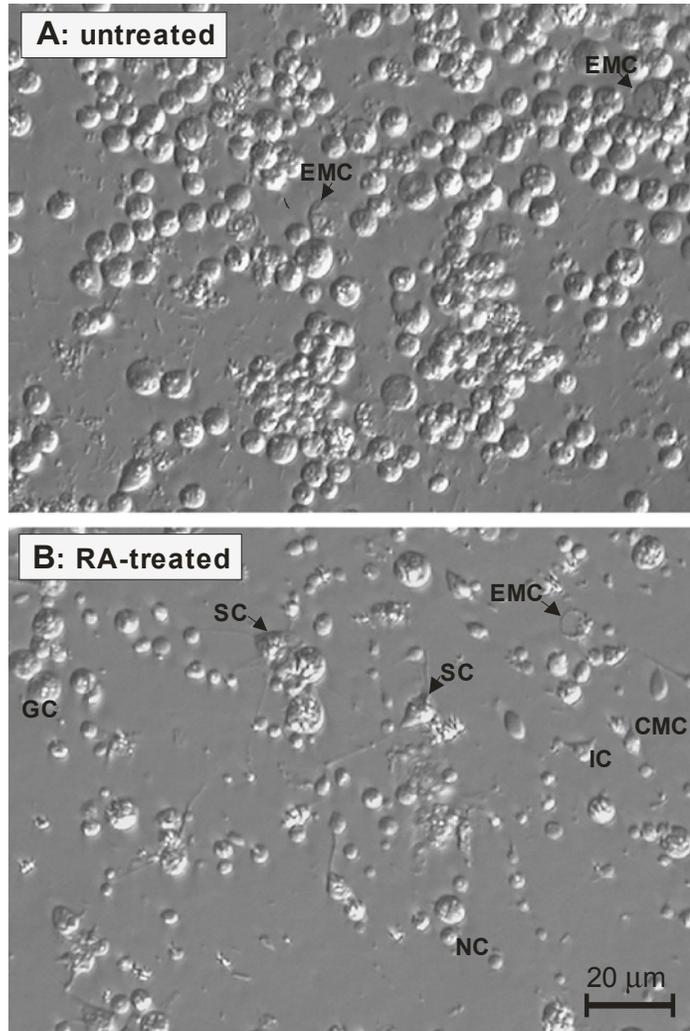
①



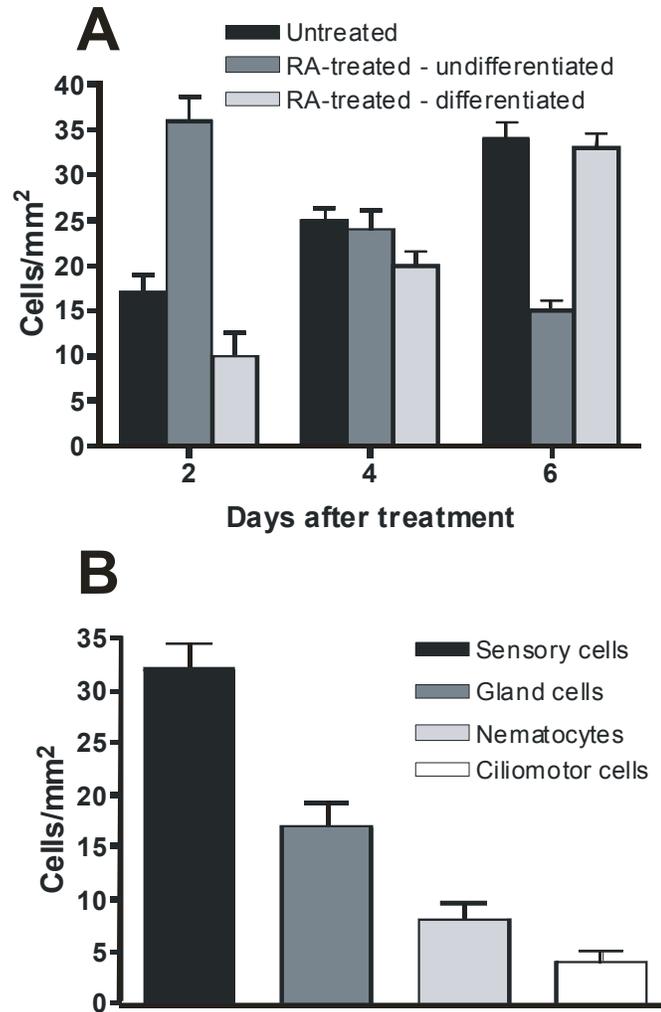
②



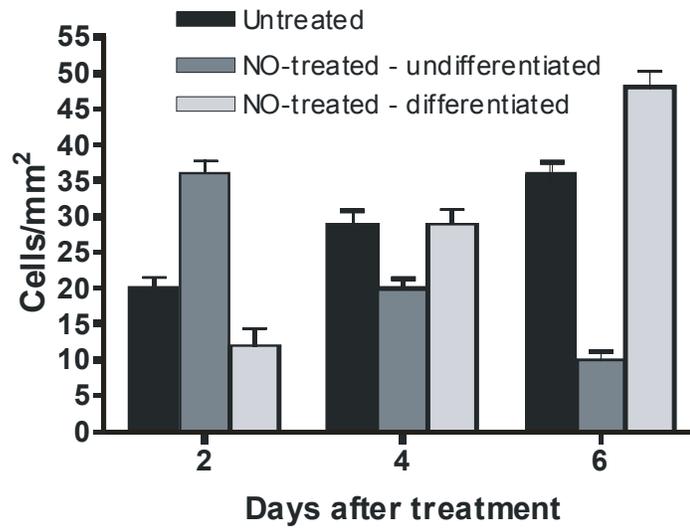
3



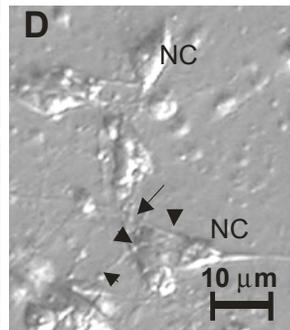
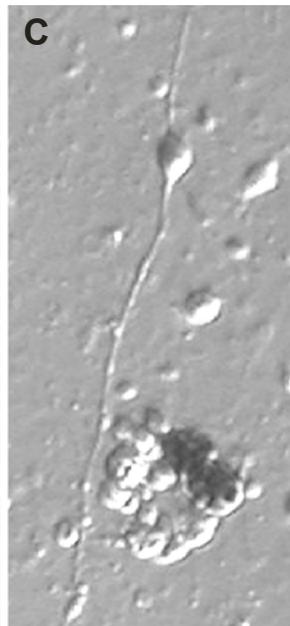
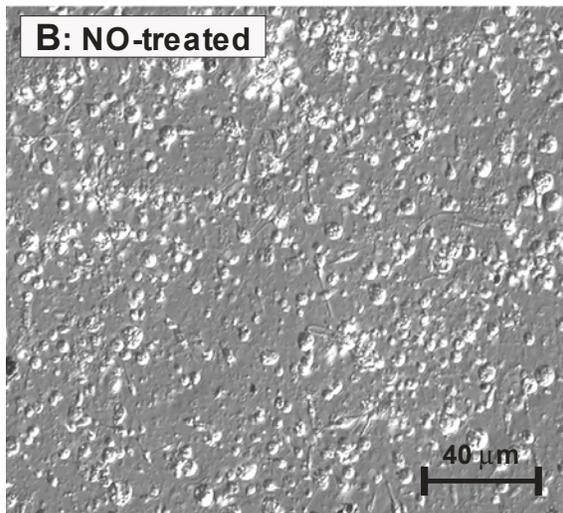
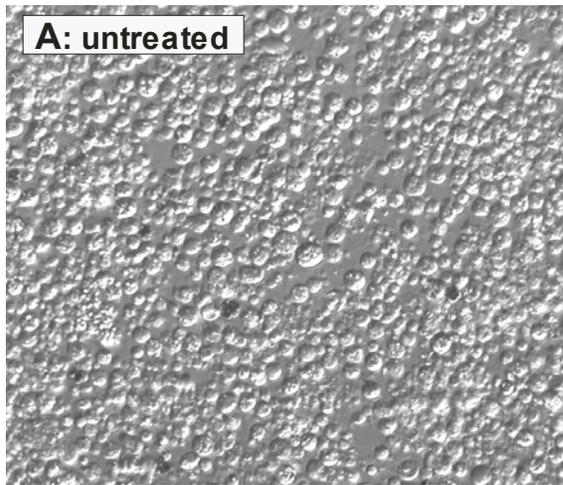
④



⑤



6



# Chapitre III

## I. Discussion générale et conclusion

Les deux agents utilisés pour ce projet sont l'acide rétinoïque et le NO, reconnus comme des morphogènes contrôlant à la fois la prolifération et la différenciation cellulaire chez les invertébrés ainsi que chez les vertébrés. Afin de démontrer que ces deux agents jouent un rôle similaire chez un cnidaire, tel la pensée de mer, *Renilla koellikeri*, nous avons procédé à des cultures cellulaires sur des boîtes de pétris enduites ou non de polylysine. Nos résultats ont montré que les deux isomères de l'acide rétinoïque (Cis et Trans) et les donneurs de NO activent la prolifération cellulaire et induisent la différenciation dans les différentes conditions de culture. Dans les pétris non revêtus par un fond de polylysine, les agents accroissent la prolifération cellulaire, mais ne parviennent pas à induire la morphogénèse. En revanche, dans les boîtes couvertes par la polylysine, quand l'acide rétinoïque et les donneurs de NO favorisent la différenciation neuronale, ils diffèrent dans leurs produits morphogénétiques; on observe, des cellules épithéliales (notamment de type sensoriels) en traitant avec l'acide rétinoïque et des cellules exclusivement neuronales en traitant avec les donneurs de NO. Compte tenu de la présence d'un récepteur de type RXR chez la pensée de mer (Bouzaiene et al., 2007), et la mise en évidence d'un

système de signalisation pour le NO (Anctil et al., 2005); on peut suggérer que le rôle de l'acide rétinoïque et du NO est conservé depuis l'émergence évolutive des premiers systèmes nerveux. Cependant il reste à déterminer dans quelle mesure et de quelle manière les effets de ces morphogènes observés *in vitro*, sont effectués *in vivo*.

Afin d'examiner les voies et les mécanismes de la différenciation cellulaire dans cette étude, nous avons procédé à des cultures primaires à court terme; car plusieurs tentatives d'établir des cultures cellulaires de cnidaires à long terme ont rencontré des obstacles ou ont totalement échoué (Schmid et al., 1999). D'ailleurs, Frank et al. (1994) ont réussi à obtenir des cultures cellulaires continues chez des anthozoaires coloniaux, y compris les octocoralliaires autres que la pensée de mer. Mais la plasticité des cellules de cnidaires ainsi que la présence de parasites et de cellules symbiotiques dans les tissus de ces derniers jettent le doute sur l'identité des cellules proliférées sur de longues périodes de temps (Schmid et al., 1999).

En 1989, Przysieznik et Spencer ont réussi à établir une culture primaire de neurones à partir d'une méduse (un hydrozoaire), riche en tissus nerveux. Les neurones ont été cultivés pendant deux semaines dans de l'eau de mer artificielle (ASW), sur un substrat d'adhésion constitué par un homogénat de la matrice extracellulaire, abondant dans la mésoglée même de cette méduse. Un peu plus tard, eux et d'autres chercheurs (Schmid et al., 1999) ont testé d'autres substrats d'adhésion que la matrice extracellulaire, y compris la polylysine, mais malheureusement seule la matrice extracellulaire a fourni des résultats satisfaisants. Cependant, alors que la survie des cellules dépend de l'attachement au substrat, la prolifération cellulaire a été inhibée sous certaines conditions (Schmid et al., 1999). En outre, aucun anthozoaire possède

assez de tissus nerveux ou peut produire suffisamment de matrice extracellulaire pour l'utiliser comme un substrat pour la fixation des cellules en culture.

Depuis plusieurs décennies, la polylysine est connue pour fournir un bon substrat pour l'adhésion des cellules et en particulier une forte adhérence pour les neurones sans inhiber l'allongement des neurites (Varon, 1979). De plus, il a été démontré, chez les hydres que les cellules adhèrent bien à la polylysine (Day & Lenhoff (1981)) et ceci a été également prouvé avec des cellules de la pensée de mer. Mais des études faites par Przysieznik et Spencer (1989) ont révélé que les cellules ne peuvent pas subir une différenciation neuronale sous certaines conditions. Il est donc nécessaire d'utiliser une plus grande concentration de polylysine (1mg/ml) que celles utilisées dans les cultures cellulaires de vertébrés (0.1mg/ml) pour assurer l'adhérence des cellules. Une telle concentration ne favorise aucune toxicité pour les cellules de pensée de mer, contrairement aux cultures cellulaires de vertébrés (Varon, 1979). Il est donc possible d'avoir une certaine régulation entre la perméabilité cellulaire et le métabolisme, grâce aux interactions adhésives établies entre les cellules et leur substrat. D'ailleurs, la variation de la composition lipidique des membranes cellulaires des cnidaires (Schetz & Anderson, 1993) ainsi que la divergence de la structure moléculaire des protéines de leur matrice extracellulaire (Knack et al., 2008; Magie & Martindale, 2008) font partie en quelque sorte de ces propriétés.

Les cellules dissociées de la pensée de mer, étalées sur un fond de polylysine ou non et en absence de facteurs trophiques ou d'autres; sont capable de proliférer tout en montrant peu ou pas de différenciation au cours de la vie des cultures. Ceci nous a permis de concevoir des expériences au cours desquelles on pourrait tester les effets de l'acide rétinoïque et du NO sur la croissance et la différenciation cellulaire.

Par conséquent; de nombreuses études faites sur des lignées cellulaires de vertébrés montrent que l'acide rétinoïque (Henion & Weston, 1994; Nabeyrat et al., 1998; Wohl & Weiss, 1998), ainsi que le NO (Mejia-Garcia & Paes-de-Carvalho, 2007; Ulibarri et al., 1999;) peuvent favoriser la croissance et la propagation des cellules adhérentes sous certaines conditions. En procédant à des cultures sur des pétris revêtus de polylysine, et traitées avec l'acide rétinoïque ou les donneurs de NO, nous nous attendons à observer une prolifération cellulaire sans induire une différenciation des cellules de la pensée de mer adhérentes sur un fond de polylysine, et tel que prévu, l'acide rétinoïque et le monoxyde d'azote promouvoient la croissance des cellules adhérentes. C'est bien évident alors que le substrat d'adhésion est un facteur déterminant de la répression de la différenciation des cellules de la pensée de mer exposées à l'acide rétinoïque ou au NO; parce que nous avons également démontré que des cultures cellulaires exposées sans un substrat d'adhésion répondent à ces agents par une différenciation en des types cellulaires spécifiques. Etant donné que l'acide rétinoïque et les donneurs de NO induisent un effet proliférant similaire sur les cultures de *Renilla koellikeri* fixées sur un substrat, mais de moindre amplitude avec les donneurs de NO, il est possible qu'un lien signalétique existe entre les voies du NO et de l'acide rétinoïque.

En effet, l'acide rétinoïque est connu chez les cellules humaines de neuroblastome (Ghigo et al., 1998) et chez les cellules endothéliales des mammifères (Achan et al., 2002; Urano et al., 2005) pour stimuler la production de NO. D'autres études ont démontré que l'acide rétinoïque réduit l'expression du gène iNOS (NO synthase inductible) ou son activité (Becherel et al., 1996; Hirokawa et al., 1994; Lianos & Datta, 1999; Mehta et al., 1994; Motomura et al., 1997; Villarroya et al., 1999; Yang et al., 2002), suggérant ainsi un mécanisme alternatif pour l'action de l'acide rétinoïque

qui pourrait induire une autre enzyme qui va influencer indirectement l'expression des NOS. Même si un lien fonctionnel entre l'acide rétinoïque et le NO peut être mis en évidence, le processus par lequel la croissance cellulaire est déclenchée et la différenciation est réprimée reste à être investigué plus en détail les voies empruntées par chacun de ces agents. D'ailleurs, plusieurs candidats ont été identifiés chez les cnidaires, tels que les homologues des facteurs de croissance vasculaires et leurs récepteurs (Seipel et al., 2004), le facteur de croissance des fibroblastes (Matus et al., 2007) et le facteur de croissance de l'insuline (Steele et al., 1996 ). Nous émettons l'hypothèse que les effets prolifératifs de ces agents sont médiés à travers des voies de transduction de facteurs trophiques, qui peuvent aussi interférer avec des signaux de différenciation.

En parallèle, nous avons montré que les cellules de la pensée de mer cultivées sur un substrat non-adhésif (sans polylysine) se différencient en des cellules épithéliales, surtout de type sensoriel, une fois exposées à l'acide rétinoïque et sélectivement en des cellules de type neuronal quand elles sont traitées avec les donneurs de NO. Donc l'acide rétinoïque et le NO induisent différemment la différenciation neuronale des cellules dissociées. Ces observations viennent supporter de nombreuses études montrant le rôle des rétinoïdes dans la différenciation épithéliales chez les vertébrés (Shapiro, 1986), y compris l'épithélium sensoriel (Lefevre et al., 1993; Raz & Kelley, 1999).

Par contre, les travaux effectués chez les mammifères ne montrent pas la participation directe de la voie nitrinergique dans la différenciation neuronale (Estrada & Murillo-Carretero, 2005). Dans ce cas le NO endogène produit à proximité des

précurseurs neuronaux vient participer physiologiquement à la régulation de la neurogénèse adulte tout en exerçant un contrôle négatif sur le taux de prolifération des précurseurs indifférenciés et facilitant ainsi le processus de différenciation neuronale. Mais des études faites chez les invertébrés ont démontré un rôle direct du NO dans la différenciation neuronale, en particulier dans le prolongement des neurites et leur navigation (Bicker, 2005). Ceci se fait par l'intermédiaire de la voie (NO/GMPc), où l'activité du NO passe par la production de guanosine monophosphate cyclique intracellulaire (GMPc) à partir de la guanosine triphosphate (GTP). L'augmentation de la concentration de GMP cyclique va permettre la libération de l'énergie pour favoriser la croissance du cône de croissance au niveau des cellules réceptrices (cellules nerveuses).

L'observation des cultures de *Renilla koellikeri*, traitées avec l'acide rétinoïque ou le NO, ont montré une inversion progressive de la domination des cellules indifférenciées versus différenciées avec le temps. Bien que l'observation des cultures témoins ait révélé une augmentation de la densité cellulaire, la taille des populations cellulaires est restée stable au cours des processus de différenciation induit par l'acide rétinoïque ou le NO. Ceci suggère que ces agents morphogènes inhibent la croissance, une fois la différenciation engagée. Nos résultats sont semblables à ceux déjà rapportés dans des travaux précédents indiquant que les rétinoïdes et le NO (Kuzin et al., 1996; Peunova & Enikolopov, 1995) suppriment la croissance cellulaire durant la différenciation des neurones ou d'autres lignées cellulaires (Sidell, 1981; Sidell et al., 1983). On a montré la nécessité de l'accomplissement de la division cellulaire pour que les cellules puissent s'engager dans le processus de différenciation (Bode, 1996), y compris la neurodifférenciation (Hager & David, 1997). D'autre part, chez l'hydre, les deux couches (ectoderme et endoderme) sont constamment renouvelées et gardées en

équilibre grâce à l'activité mitotique des cellules souches de la région centrale du polype et la perte des cellules différenciées aux extrémités. Donc, la cellule-souche perd sa capacité d'auto-renouvellement, puis progressivement sa capacité de prolifération pour s'orienter vers l'une des voies de différenciation grâce à des signaux intra- ou extra-cellulaires qui gouvernent sa destinée. Quel que soit le signal considéré, ces mécanismes conduisent de façon ultime à l'activation de facteurs de transcription qui activent les gènes responsables de la différenciation cellulaire (Felsenfeld et al., 1996).

De plus en plus de travaux démontrent le rôle important des récepteurs de rétinoïdes dans la médiation de l'action de l'acide rétinoïque en tant qu'agent de différenciation cellulaire (Giguère, 1994 & Chambon, 1996). En effet, les rétinoïdes semblent coordonner l'arrêt de la croissance avec la différenciation neuronale dans les cellules cibles des mammifères par le biais de différentes voies de signalisation des récepteurs RXR / RAR (Cheung et al., 1996; Giannini et al., 1997). D'autre part, le NO semble particulièrement médier l'effet cytotatique du facteur de croissance neuronal, comme étant un messager secondaire avec deux propriétés para-autocrines qui peuvent diffuser et agir dans un volume restreint (Peunova & Enikolopov, 1995). Dans ce cas, la réponse des cellules au facteur de croissance comporte une phase de prolifération suivie par un arrêt de croissance pour aboutir à une différenciation. Le NO est considéré comme un interrupteur d'arrêt de la croissance au cours de la différenciation des cellules neuronales.

L'arrêt de la division cellulaire est donc une condition préalable pour que les cellules entrent dans un programme de différenciation terminale. Il serait difficile de démêler les mécanismes par lesquels ces morphogènes affectent la prolifération cellulaire et la différenciation chez ce cnidaire sans une meilleure connaissance des récepteurs

rétinoïques et des voies de signalisation nitroergiques. Bien que l'acide rétinoïque et le NO soient clairement impliqués dans les différentes destinées des cellules, il reste possible que la voie de l'acide rétinoïque induisant l'arrêt de la prolifération cellulaire soit médiée par le NO.

La différenciation cellulaire observée, induits par ces morphogènes, est retrouvée uniquement dans les cultures cellulaires de la méduse de mer non-adhérentes au substrat. Ces résultats suggèrent que ce manque d'adhésion entre la cellule et son substrat fait activer des signaux qui rendent les cellules dédifférenciées sensibles aux actions morphogénétiques de l'acide rétinoïque et du NO. La nature de ces signaux est suggérée par une étude montrant clairement que les cellules musculaires striées des méduses restent différenciées quand l'intégrité de leur matrice extracellulaire est conservée, mais se dédifférencient puis subissent une transdifférenciation lorsque cette matrice est supprimée ou inactivée (Schmid & Reber-Müller, 1995). En effet, l'analyse fonctionnelle des molécules de la matrice extracellulaire dans les cultures cellulaires ont révélé que non seulement elles promouvoient ou inhibent l'adhésion cellulaire et la migration, mais qu'elles sont également importantes dans les processus de détermination et de différenciation cellulaire (Acheson et al. 1986; Beck & Gruber 1992; Juliano & Haskill 1993). Non seulement les molécules elles mêmes, mais aussi l'interaction mécano-chimique entre la cellule et le substrat affecte le comportement cellulaire, comme le montrent des expériences dans lesquelles la densité des différents ligands de la EMC ont transformé les cellules endothéliales de leur phase de prolifération à leur phase de différenciation tout en modifiant la forme des cellules (Ingber, 1990). Chez la méduse, la transdifférenciation en myocytes lisses et en neurones suit la dédifférenciation et la division cellulaire, sans autre traitement

expérimental. En revanche, chez la pensée de mer, les cellules restent grandement dédifférenciées et prolifèrent jusqu'à l'exposition à l'acide rétinoïque ou au NO quand la redifférenciation est mise en marche.

De multiples mécanismes interagissent pour contrôler la différenciation en cellules épithéliales et neuronales. Ainsi, les effets différentiels de l'acide rétinoïque et du NO sont soumis à des voies de signalisation distinctes afin de contribuer à un meilleur engagement des cellules soit à l'épithélium, soit aux neurones de la mésoglée. Dans cette étude la majorité des cellules associées à l'épithélium (neurones sensoriels, nématocytes, cellules glandulaires) sont connues chez l'hydre pour être produites de façon continue par différenciation de cellules souches interstitielles multipotentes (Bode, 1996). Le réseau nerveux chez l'hydre est une mosaïque de sous-groupes neuronaux associés à un phénotype neural particulier, soit les neurones associés aux couches épithéliales (ectoderme et endoderme), alors que la mésoglée, qui sépare les deux couches épithéliales, ne contient pas de cellules. Au contraire, la mésoglée des anthozoaires tel que la pensée de mer est plus épaisse et contient des cellules, y compris les neurones ressemblant aux cellules ganglionnaires de l'hydre (Fautin & Mariscal, 1991; Pani et al., 1995; Pernet et al., 2004). Ainsi, l'acide rétinoïque semble cibler spécifiquement les cellules interstitielles à s'engager en lignées cellulaires associées à l'épithélium chez la pensée de mer alors que le NO cible sélectivement les précurseurs des neurones de la mésoglée. Les neurones de la mésoglée sont connus pour former les réseaux nerveux chez la pensée de mer (Pernet et al., 2004) et les extensions des neurites provenant de la différenciation des neurones de la mésoglée, dans cette étude, finissent par se croiser l'un avec l'autre, tel que prévu par l'organisation du réseau nerveux des cnidaires (Minobe et al., 1995).

Notre étude est la première faisant état des effets des rétinoïdes et du NO sur la prolifération cellulaire, la différenciation neuronale et la croissance des neurites chez un cnidaire. Cela suggère que l'acide rétinoïque et le NO sont des morphogènes chez les cnidaires comme il le sont chez les vertébrés. Il semble donc que le rôle de l'acide rétinoïque et du NO a été conservé depuis l'émergence évolutive des premiers animaux. Et comme les systèmes nerveux semblent être apparus d'abord chez les cnidaires, ces morphogènes sont donc fonctionnellement intégrés très tôt dans la signalisation associée au développement du système nerveux.

La suite de ce projet constitue alors une base stimulante pour explorer les mécanismes sous-jacents à l'action du NO sur la prolifération et la différenciation neuronale chez la pensée de mer. Étant donné que beaucoup d'effets physiologiques du NO se manifestent par l'intermédiaire d'un changement du niveau de cGMP dans la cellule, est-ce que c'est le cas en ce qui concerne les effets prolifératifs et morphogéniques du NO chez *Renilla koellikeri*. Présentement, il n'est pas encore connu si l'action morphogénique du NO chez les cnidaires se manifeste par un changement de concentration intracellulaire de cGMP. D'autre part, le NO mime l'action stimulante de l'acide rétinoïque sur la prolifération cellulaire, on peut se demander si le NO constitue une étape intermédiaire dans l'action de l'acide rétinoïque. Dans ce cas, l'acide rétinoïque doit probablement activer plusieurs voies de signalisation dont l'une utiliserait la voie du NO. Ou bien est-ce que l'acide rétinoïque constitue une étape intermédiaire de l'action proliférante du NO? Ce sont là des pistes

de recherche pour éventuellement comprendre les mécanismes d'action de ces morphogènes.

## Références

- Achan V., Tran C.T.L., Arrigoni F., Whitley G.S., Leiper J.M., Vallance P. (2002). All-*trans*-Retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells. A role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ. Res.* 90:764-769.
- Acheson A.D., Timpel E.R., Thoenen H. (1986). Laminin increases both levels and activity of tyrosin hydroxylase in calf adrenal chromaffin cells. *J. Cell. Biol.* 102:151-159.
- Alexandre D., Clarke J.D.W., Oxtoby E., Yan Y.L., Jowett T., Holder N. (1996). Ectopic expression of Hoxa-1 in the zebrafish alters the fate of the mandibular arch neural crest and phenocopies a retinoic acid-induced phenotype. *Development* 122:735-746.
- Allegreto E. A., McClurg M. R., Lazarchick S. B., Clemm D. L., Kerner S. A., Elgort M. G., Boehm M. F., White S. K., Pike J. W., Heyman R. A. (1993). Transactivation properties of retinoic acid and retinoic X receptors in mammalian cells and yeast. Correlation with hormone binding and effects of metabolism. *J. Biol. Chem.* 268: 26625-26633.
- Allenby G., Bocquel M. T., Saunders M., Kazmer S., Speck J., Rosenberger M., Lovey A., Kastner P., Grippo J. F., Chambon P. (1993). Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:30-34.
- Ancil M., Grimmelikhuijzen C.J.P. (1989). Excitatory action of the native neuropeptide Antho-RFamide on muscles in the pennatulid *Renilla koellikeri*. *Gen. Pharmacol.* 20:381-384.
- Ancil M, Poulain I, Pelletier C. (2005). Nitric oxide modulates peristaltic muscle activity associated with fluid circulation in the sea pansy *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Biol.* 208:2005-2018.
- Batham E.J., Robson E.A. (1960). The nerve net of the sea anemone *Metridium senile*: The mesenteries and the column. *Quart. J. Micr. Sci.* 101:487-510.
- Beauvais L., Chevalier J.P. (1987). Cnidaires anthozoaires. In *traité de zoologie*. 3 :859. Masson, Paris.
- Becherel P. A., Le Goff L., Ktorza S., Chosidow O., Frances C., Issaly F., Mencia-Huerta J.M., Debre P., Mossalayi M.D., Arock M.(1996). CD23-mediated

- nitric oxide synthase pathway induction in human keratinocytes is inhibited by retinoic acid derivatives. *J. Invest. Dermatol.* 106:1182-1186.
- Beck K., Gruber T. (1992). Structure and assembly of basement membrane and related extracellular matrix protein. In: Steiner M., Richardson P.D. (eds) Cell adhesion. CRC Press, Boca Raton Florida. 1-52.
- Beckett B.R., Petkovich M. (1999). Evolutionary conservation in retinoid signalling and metabolism. *American Zoology* 39:783-795.
- Bellis S.L., Grosvenor W., Kass-Simon G., Rhoads D.E. (1991). Chemoreception in *Hydra vulgaris (attenuata)*: initial characterization of two distinct binding sites for l-glutamic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1061:89-94.
- Bendech M.A., Malvy D.J., Chauliac M. (1997). Vitamin A deficiency: epidemiological aspects and methods of control. *Sante* 5:309-16.
- Bicker G. (2005). STOP and GO with NO: nitric oxide as a regulator of cell motility in simple brains. *BioEssays* 27:495-505.
- Blot W.J., Li J.Y., Taylor P.R., Guo W., Dawsey S., Wang G.Q., Yang C.S., Zheng S.F., Gail M., Li G.Y., et al.(1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/ mineral combinations, cancer incidence, and disease specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.* 85(18):1483-1491.
- Bode H.R. (1996). The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J. Cell. Sci.* 109:1155-1164.
- Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P. (1999). Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:1015-1028.
- Bouzaïene M, Angers A, Anctil M. (2007). Immunohistochemical localization of a retinoic acid-like receptor in nerve cells of two colonial anthozoans (Cnidaria). *Tissue Cell* 39:123-130.
- Buck J. (1973). Bioluminescence behavior in *Renilla* I. colonial responses. *Biol. Bull.* 144:19-42.
- Buisson B., Franc S. (1969). La structure et l'ultrastructure des cellules mésenchymateuses et nerveuses intramésogléennes de *Veretillum cynomorium* Pall. (Cnidaire, Pennatulidae). *Vie et milieu* 20 (2-A) :279-291.
- Bullock T.H., Horridge G.A. (1965). *Structure and function in the nervous Systems of Invertebrates*, vol. 1. W.A. Freeman and co, San Francisco.

- Chabrier P.E.C., Demerle-Pallardy C., Auguet M. (1999). Nitric oxide synthase : targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:1029-1035.
- Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10: 940- 954.
- Chambon P. (2005). The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol. Endocrinol.*: special issue commemorating the 20<sup>th</sup> anniversary of the cloning of the nuclear receptors. 19:1418-28.
- Chambon P., Neiderreither K., Ward S.J., Dollé P. (1996). Morphological and molecular characterization of retinoic acid-induced limb duplications in mice. *Develop. Biology.* 176:185-198.
- Cheung B., Hocker J.E., Smith S.A., Reichert U., Norris M.D., Haber M., Stewart B.W., Marshall G.M. (1996). Retinoic acid receptors  $\beta$  and  $\gamma$  distinguish retinoid signals for growth inhibition and neuritogenesis in human neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229:349-354.
- Chevalier J., Doumenc C., Herberts C., Lafuste L., Senenoff-Tiam-Chansky P., Tiffon Y., Tixier-Durivault A., Van Praet M. (1987). Cnidaires anthozoaires. In *traité de zoologie*. Masson , Paris. 3 :859.
- Day R.M., Lenhoff H.M. (1981). Hydra mesoglea: a model for investigating epithelial cell-basement membrane interactions. *Science* 211:291-294.
- Degos L., Castaigne S., Fenaux P., Daniel MT., Dombret H., Chomienne C. (1991). All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Nou.v Rev. Fr. Hematol.* 33: 183-185.
- Degos L., Chomienne C., Daniel MT., Berger R., Dombret H., Fenaux P., Castaigne S. (1990). Treatment of first relapse in acute promyelocytic leukaemia with all-trans retinoic acid. *Lancet* 336: 1440-1441.
- Dillon J.C., Phuc A.P., Dubacq J.P. (1995). Risks associated with pesticide residue contamination of foods in developing countries. *World-Rev-Nutr-Diet* 7732-46.
- Duester G., Mic F.A., Molotkov A. (2003). Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem. Biol. Interact.* 143-144 : 201-10.
- Dunkelberger D.G., Watabe N. (1974). An ultrastructure study on spicule formation in the pennatulid colony *Renilla reniformis*. *Tissue cell* 6:573-586.

- Dupe V., Davenne M., Brocard J., Dolle P., Mark M., Dierich A., Chambon P., Rijli F.M. (1997). In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124:2399-410.
- Dupe V., Ghyselinck N.B., Thomazy V., Nagy L., Davies P.J., Chambon P., Mark M. (1999a). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev. Biol.* 208:30-43.
- Dupe V., Ghyselinck N.B., Wendling O., Chambon P., Mark M. (1999b). Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 126:5051-5059.
- Eichele G., Rickle C., Alberts B.M. (1985). Studies on the mechanism of retinoic-induced pattern duplications in the early chick limb bud: temporal and spatial aspects. *The Journal of cell Biology* 101:1913-1920.
- Endo S., Inada K., Nakae H., et al. (1996). Nitrite/nitrate oxide(NOx) and cytokine levels in patients with septic shock. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 91:347-356.
- Estrada C, Murillo-Carretero M. (2005). Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist* 11:294-307.
- Evans R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Fautin D.G., Mariscal R.N. (1991). Cnidaria: Anthozoa. In: Harrison FW, Westfall JA, editors. *Microscopic anatomy of Invertebrates, Vol. 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria and Ctenophora*. New York: Wiley-Liss. 267-358.
- Fell H.B., Mellanby E. (1953). Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A. *J. Physiol.* 119:470-488.
- Felsenfeld G., Boyes J., Chung J., Clark D., Studitsky V. (1996). Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9384-9388.
- Feron O., Saldana F., Michel J.B., Michel T. (1998). The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J. Biol. Chem.* 273:3125-3128.
- Forstemann U., Boissel J.P., Kleinert H. (1998). Expression of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 12:773-790.
- Frank U., Rabinowitz C., Rinkevich B. (1994). In vitro establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians. *Mar. Biol.* 120:491-499.

- Fujimake Y. (1926). Formation of carcinoma in albino rats fed on deficient diets. *Journal of Cancer Research*. 10:469-477.
- Fukuto J.M., Chaudhuri G. (1995). Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:165-194.
- Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Garthwaite J., Boulton C.L. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.* 57:683-706.
- Garthwaite J., Southam E., Boulton C.L., Nielsen E.B., Schmidt K., Mayer B. (1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one. *Molecular Pharmacology* 48:184-188.
- Ghigo D., Priotto C., Migliorino D., Geromin D., Franchino C., Todde R., Costamagna C., Pescarmona G., Bosia A. (1998). Retinoic acid-induced differentiation in a human neuroblastoma cell line is associated with an increase in nitric oxide synthesis. *J. Cell.Physiol.* 174:99-106.
- Giannini G., Dawson M.I., Zhang X-k., Thiele C.J. (1997). Activation of three distinct RXR/RAR heterodimers induces growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 272:26693-26701.
- Giguère V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr. Rev.* 15:61-79.
- Giguère V., Ong E.S., Segui P., Evans R.M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629.
- Gollnick HPM., Orfanos CE. (1991). Theoretical aspects of the use of retinoids as anticancer agents. In: Marks R (ed). *Retinoids in cutaneous malignancy. Blackwell Scientific Publication, Oxford*, pp 41-65.
- Goodman DS. (1984). Vitamin A and retinoids in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 310: 1023-1031.
- Grassé P. *Traité de zoologie.* (1987) Masson et Cie Editeurs. Tome III.
- Green S., Chambon P. (1986). Carcinogenesis: a superfamily of potentially oncogenic hormone receptors. *Nature* 324:615-617.
- Grimmelikhuijzen C.J.P. (1983a). Coexistence of neuropeptides in hydra. *Neuroscience* 9:837-845.

- Grimmelikhuijzen C.J.P. (1983b). FMRFamide immunoreactivity is generally occurring in the nervous systems of coelenterates. *Histochemistry* 78:361-381.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Balfe A., Emson P.C., Powell D., Sundler F. (1981a). Substance P-like immunoreactivity in the nervous system of *hydra*. *Histochemistry* 71:325-333.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Carraway R., Rokaeus A., Sundler F. (1981b). Neurotensin-like immunoreactivity in the nervous system of *hydra*. *Histochemistry* 72:199-209.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Dockray G.J., Yanaihara N. (1981c). Bombesin-like immunoreactivity in the nervous system of *hydra*. *Histochemistry* 73:171-180.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Dierickx K., Boer G.J. (1982a). Oxytocin/vasopressin-like immunoreactivity in the nervous system of *hydra*. *Neuroscience* 7:3191-3199.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Dockray G.J., Schot J.P.C. (1982b). FMRFamide-like immunoreactivity in the nervous system of *hydra*. *Histochemistry* 73:499-508.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Graff D. (1986). Isolation of pyroGlu-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (Anthr-RFamide), a neuropeptide from sea anemones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 9817-9821.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Groeger A. (1987). Isolation of the neuropeptide pGlu-Gly-Arg-Phe-amide from the pennatulid *Renilla koellikeri*. *FEBS Lett* 211;105-108.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Westfall J. (1995). The nervous systems of cnidarians, dans *The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach*, (Breidbach O., Kutsch W., eds), 7-24. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Grondona J.M., Kastner P., Gansmuller A., Décimo D., Chambon P., Mark M. (1996) Retinal dysplasia and degeneration in RARb2/RARg2 compound mutant mice. *Development* 122:2173-2188.
- Hager G., David C.N. (1997). Pattern of differentiated nerve cells in *hydra* is determined by precursor migration. *Development* 124:569-576.
- Henion P.D., Weston J.A. (1994). Retinoic acid selectively promotes the survival and proliferation of neurogenic precursors in cultured neural crest cell populations. *Dev. Biol.* 161:243-250.
- Hill J., Clarke J.D.W., Vargesson N., Jowett T., Holder N. (1995). Exogenous retinoic acid causes alterations in the development of the hindbrain and midbrain of the

zebrafish embryo including positional respecification of the Mauthner neuron. *Mechanisms of development* 50:3-16.

- Hirokawa K., O'Shaughnessy K.M., Ramrakha P., Wilkins M.R. (1994). Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids. *Br. J. Pharmacol.* 113:1448-1454.
- Hoffmann C., Eichel G. (1994). Retinoids in development. *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, New York, Raven Press, 387-441.
- Imsiecke G., Borojevic R., Custodio M., Müller W.E.G. (1996). retinoic acid acts as morphogen in freshwater sponges. *Inv. Reprod. Dev.* 26:89-98.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:9265-9269.
- Ingber D.E. (1990). Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:3579-3583.
- Jetten A.M., Nervi C., Vollberg T.M. (1992). Control of squamous differentiation in tracheobronchial and epidermal epithelial cells: role of retinoids. *J.Natl. Cancer Inst. Monogr.* 13:93-100.
- Juliano R.L., Haskill S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* 120:577-585.
- Kass-Simon G., Pierobon P. (2007). Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146:9-25.
- Kastendiek J.E. (1975). The role of behavior and interspecific interactions in determining the distribution and abundance of *Renilla koellikeri* Pfeffer. Ph.D. thesis, University of California.
- Kastendiek J. (1976). Behavior of the sea pansy *Renilla koellikeri* Pfeffer (Coelenterata: Pennatulacea) and its influence on the distribution and biological interactions of the species. *Biol. Bull.* 151:518-537.
- Kastner P., Grondona J.M., Mark M., Gansmuller A., LeMeur M., Decimo D., Vonesch J.L., Dollé P., Chambon P. (1994). Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78:987-1003.
- Kastner P., Messaddeq N., Mark M., Wendling O., Grondona J.M., Ward S., Ghyselinck N., Chambon P. (1997). Vitamin A deficiency and mutations of

RXRa, RXRb and RARa lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Development* 124, 4749–4758.

- Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S. (1996). Nuclear hormone receptors: ligand- activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem. Biol.* 3: 529-536.
- Knack B.A., Iquchi A., Shinzato C., Hayward D.C., Ball E.E., Miller D.J. (2008). Unexpected diversity of cnidarian integrins: expression during coral gastrulation. *B.M.C. Evol. Biol.* 9:8-136.
- Kondo et al., (2005). The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science* 309:1559-1563.
- Kostrouch Z., Kostrouchova M., Love W., Jannini E., Piatigorsky J., Rall J.E., (1998). Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:13442-47.
- Kuzin B., Roberts I., Peunova N., Enikolopov G. (1996). Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell.* 87:639-649.
- Lasnitzki I. (1976). Reversal of methylcholanthrene-induced changes in mouse prostates in vitro by retinoic acid and its analogs. *British J. Cancer.* 34:329-248.
- Lefebvre P.P., Malgrange B., Staecker H., Moonen G., Van De Water T.R. (1993). Retinoic acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cell. *Science* 260:692-695.
- Lianos E.A., Datta P.K. (1999). Retinoic acids inhibit inducible nitric oxide synthase expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 56:486-493.
- Loescher L.J., Sauer K.A. (1984). Vitamin therapy for advanced cancer. *Oncol. Nur.s Forum* 6:38-45.
- Lohnes D., Mark M., Mendelsohn C., Dolle P., Dierich A., Gorry P., Gansmuller A., Chambon, P. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120:2723-48.
- Lu M.F., Cheng H.T., Kern M.J., Potter S.S., Tran B., Diekwisch T.G., Martin J.F. (1999). prx-1 functions cooperatively with another paired-related homeobox gene, prx-2, to maintain cell fates within the craniofacial mesenchyme. *Development* 126:495-504.

- Lyke E.B. (1965). The histology of the sea pansies *Renilla reniformis* (Pallas) and *Renilla Koellikeri* Pfeffer a note on the fine structure of the latter species. Ph.D. thesis, University of Wisconsin.
- Magie C.R., Martindale M.Q. (2008). Cell-cell adhesion in the cnidaria. insights into the evolution of tissue morphogenesis. *Biol. Bull.* 214:218-232.
- Colasanti M., Mazzone V., Mancinelli L., Leone S., Venturini G. (2009). Involvement of nitric oxide in the head regeneration of *Hydra vulgaris*. *Nitric oxide* 21:164-170.
- Mascrez B., Mark M., Dierich A., Ghyselinck N.B., Kastner P., Chambon P. (1998). The RXRalpha ligand-dependent activation function 2 (AF-2) is important for mouse development. *Development* 125:4691-707.
- Matus D.Q., Thomsen G.H., Martindale M.Q. (2007). FGF signaling in gastrulation and neural development in *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarians. *Dev. Genes Evol.* 217:137-148.
- McIntyre M., Bohr D.F., et al. (1999). Endothelial function in hypertension : the role of superoxide anion. *Hypertension* 34:539-545.
- McLaren DS, Frigg M. (2001). Sight and life manual on vitamin A deficiency disorders. In: McLaren DS, Frigg M (eds). *Task Force Sight and Life* 2<sup>nd</sup> edn. Switzerland: Basel.pp 176.
- Means A.L., Gudas L.J. (1995). The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 210-233.
- Mehta K., McQueen, T., Tucker S., Pandita, R., Aggarwal B.B. (1994). Inhibition by all-*trans*-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 55:336-342.
- Mejia-Garcia T.A., Paes-de-Carvalho R. (2007). Nitric oxide regulates cell survival in purified cultures of avian retinal neurons : involvement of multiple transduction pathways. *J. Neurochem.* 100:382-394.
- Michel T., Feron O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J. Clin. Invest.* 100:2146-2152.
- Minobe S., Koizumi O., Sugiyama T. (1995). Nerve cell differentiation in nerve-free tissue of epithelial hydra from precursor cells introduced by grafting. I. Tentacles and hypostome. *Dev. Biol.* 172:170-181.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.

- Moon R.C., Mehta R.G. (1991). Vitamin A and the prevention of cancer. In Marks R (ed). *Retinoids in cutaneous malignancy*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 1-15.
- Mori S. (1992). Primary changes on eyes of rats which result from deficiency of fat-soluble A in diet. *Journ. Amer. Med. Assoc. t.* 79:197-200.
- Morin G.J. (1974). Coelenterate bioluminescence. In: Muscatine, L., Lenhoff, H. (eds). *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*, Academic Press, New York, 501:397-438.
- Morin G.J., Reynolds G.T. (1974). The cellular origin of Bioluminescence in the colonial hydroid *Obelia*. *Biol. Bull.* 147:397-410.
- Moroz L.L. (2001). Gaseous transmission across time and species. *Amer. Zool.* 41:304-320.
- Morris-Kay G.M., Murphy R., Hill R., Davidson D. (1991). Effects of retinoic acid excess on expression of *Hox-2.9* and *Krox-20* and on morphological segmentation of the hindbrain of mouse embryos. *European Molecular Biology Organisation Journal* 10:2985-2995.
- Motomura K., Sakai H., Isobe H., Nawata H. (1997). Effects of retinoids on the production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells in vitro :evidence for participation of retinoid X receptor signalling pathway. *Cell. Biochem. Funct.* 15:95-101.
- Nabeyrat E., Besnard V., Corroyer S., Cazals V., Clement A. (1998). Retinoic acid-induced proliferation of lung alveolar epithelial cells: relation with the IGF system. *Am. J. Physiol.* 275:L71-79.
- Napoli J.L. (1996). Biochemical pathways of retinoids transport, metabolism, and signal transduction. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80: 52-62.
- Napoli J.L. (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1440 : 139-62.
- Nathan C. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* 100:2417-2423.
- Niederreither K., Simon J.W., Dollé P., Chambon P. (1996). Morphological and molecular characterization of retinoic acid-induced limb duplications in mice. *Dev. Biol.* 176:185-98.

- Niederreither K., Subbarayan V., Dolle P., Chambon P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat. Genet.* 21:444-8.
- Ninnemann H., Maier J. (1996). Indications for the Occurrence of Nitric Oxide Synthases in Fungi and Plants and the Involvement in Photoconidiation of *Neurospora Crassa*. *Photochemistry and photobiology* 64(2): 393-398.
- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987). Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Pani A.K., Anctil M., Umbriaco D. (1995). Neuronal localization and evoked release of norepinephrine in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Zool.* 272:1-12.
- Parker G.H. (1920a). Activities of colonial animals I. Circulation of water in *Renilla*. *J. Exp. Zool.* 31:343-368.
- Parker G.H. (1920b). Activities of colonial animals II. Neuromuscular movements and phosphorescence in *Renilla*. *J. Exp. Zool.* 31:475-513.
- Pernet V., Anctil M., Grimmelikhuijzen C.J.P. (2004). Antho-RFamide-containing neurons in the primitive nervous system of the anthozoan *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Neurol.* 472: 208-220.
- Petkovich M., Brand N.J., Krust A., Chambon P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444-450.
- Pettersson K., Gustafsson J.A. (2001). Role of estrogen receptor  $\beta$  in estrogen action. *Annu. Rev. Physiol.* 63:165-192.
- Peunova N., Enikolopov G. (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375:68-73.
- Przysieszniak J., Spencer A.N. (1989). Primary culture of identified neurones from a cnidarian. *J. Exp. Biol.* 142:97-113.
- Purves E. (2005). Neonatal Hematologic Disorders. *Journal of pediatric Oncology Nursing* 22:168-175.
- Raz Y., Kelley M.W. (1999). Retinoic acid signaling is necessary for the development of the organ of Corti. *Dev. Biol.* 213:180-193.
- Ross S.A., McCaffery P.J., Drager U.C., De Luca L.M. (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80:1021-1054.
- Schetz J.A., Anderson P.A.V. (1993). Investigations of lipid components of neurone-enriched membranes of the jellyfish *Cyanea capillata*. *J. Exp. Biol.* 177:23-39.

- Schmid V., Ono S-I., Reber-Müller S. (1999). Cell-Substrate interactions in Cnidaria. *Microse Res Tech.* 44:254-268.
- Schmid V., Reber-Müller S. (1995). Transdifferentiation of isolated striated muscle of jellyfish in vitro: the initiation process. *Sem. Cell. Biol.* 6:109-116.
- Seidel C., Bicker G. (2000). Nitric oxide and cGMP influence axogenesis of antennal pioneer neurons. *Development* 127:4541-4549.
- Seipel K., Eberhardt M., Müller P., Pescia E., Yanze N., Schmid V. (2004). Homologs of vascular endothelial growth factor and receptor, VEGF and VEGFR, in the jellyfish *Podocoryne camea*. *Dev. Dynamics* 231:303-312.
- Sennequier N., Stuehr D.j. (1996). Analysis of substrate-induced electronic, catalytic and structural changes in inducible NO synthase. *Biochemistry* 35:5883-5892.
- Shapiro S.S. (1986). Retinoids and epithelial differentiation. In: Sherman M.I, editor. Retinoids and cell differentiation. Boca Raton, *CRC Press*, p 29-60
- Sidell N. (1981). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 68:589-596.
- Sidell N., Altman A., Huassler M.R. (1983). Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp. Cell. Res.* 148:21-30.
- Sive H.L., Draper B.W., Harland R.M. and Weintraub H. (1990). Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in *Xenopus Laevis*. *Genes & Dev.* 4:932-942.
- Smalt R., Mitchell F.T., Howard R.L., Chambers T.J. (1997). Induction of NO and prostaglandin E-2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. *Am. J. Physiol.* 36:E751-758.
- Sorkin L.S. (1993). NMDA evokes an L-NAME sensitive spinal release of glutamate and citrulline. *Neuroreport.* 4:479-482.
- Sporn M.B., Roberts A.B. (1983). Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res.* 43:3034-40.
- Steele R.E., Lieu P., Mai N.H., Shenk M.A., Sarras Jr. M.P. (1996). Response to insulin and the expression pattern of a gene encoding an insulin receptor homologue suggest a role for an insulin-like molecule in regulating growth and patterning in *Hydra*. *Dev. Genes Evol.* 206:247-259

- Stratford T., Logan C., Zile M., Maden M. (1999). Abnormal anteroposterior and dorsoventral patterning of the limb bud in the absence of retinoids. *Mechanism of development* 81:115-125.
- Sundin O., Eichele G. (1992). An early marker of axial pattern in the chick embryo and its respecification by retinoic acid. *Development* 114:841-852.
- Tabin C. (1995). The initiation of the limb bud: Growth factors, Hox genes and retinoids. *Cell* 80:671-674.
- Thébaud B., Arnal J.F., Mercier J.C., Dinh-Xuan A.T. (1999). Inhaled and exhaled nitric oxide. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:1103-1112.
- Ulibarri J.A., Mozdziak P.E., Schultz E., Cook C., Best T.M. (1999). Nitric oxide donors, sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpencillamine, stimulate myoblast proliferation in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35:215-218.
- Umbriaco D., Anctil M., Descarries L. (1990). Serotonin-immunoreactive neurons in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Neurol.* 291:167-178.
- Urano A., Sugawara A., Kanatsuka H., Kagechika H., Saito A., Sato K., Kudo M., Takeuchi K., Ito S. (2005). Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-*trans* retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* 112:727-736.
- Vandersea M.W., Fleming P., McCarthy R.A., Smith D.G. (1998). Fin duplications and deletions induced by retinoic acid signaling. *Development Genes and Evolution* 208:61-68.
- Vanderwinden J.M., Mailleux P., Schiffman S.N., Vanderhaeghen J., De Laet M. (1992). Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N. Engl. J. Med.* 327:511-515.
- Varon S. (1979). The culture of chick embryo dorsal root ganglionic cells on polylysine-coated plastic. *Neurochemical Research* 4:155-174.
- Villarroya F., Giralt M., Iglesias R. (1999). Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23:1-6.
- Vincent S.R., Hope B.T. (1992). Neurons that say NO. *Trends Neurosci.* 15:108-113.
- Wainright P.O., Hinkle G., Sogin M.L., Stickel S.K. (1993). Monophyletic origins of the metazoa: an evolutionary link with fungi. *Science* 260:340-342.

- Wald N., Idle M., Boreham J., Bailey A. (1980). Low serum-vitamin-A and subsequent risk of cancer: Preliminary results of a prospective study. *Lancet* 2:813-815.
- Wendling O., Ghyselinck N.B., Chambon P., Mark M. (2001). Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development* 128:2031-2038.
- White K.A., Marletta M.A. (1992): Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 29:6627-6631.
- Wiens M., Batel R., Korzhev M., Müller W.E.G. (2003). Retinoid X receptor and retinoic acid response in the marine sponge *Suberites domuncula*. *J. Exp. Bio.* 206:3261-3271.
- Wilson E.B. (1882). The development of renilla. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 174:723-815.
- Wilson J.G., Roth C.B, Warkany J. (1953). An analysis of syndrome of malformations induced by maternal vitamin a deficiency. Effects of restoration of vitamin a at various times during gestation. *American journal of Anatomy* 92:189-217.
- Wohl C.A., Weiss S. (1998). Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. *J. Neurobiol.* 37:281-290.
- Wolbach S.B., Howe P.R. (1925). Tissues following deprivation of fat soluble A vitamin. *J. Exp. Med.* 42:753-77.
- Wolff D.J., Gribin B.J. (1994). The inhibition of the constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms by indazole agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 311:300-306.
- Yang Q., Sakurai T., Kakudo K. (2002). Retinoid, retinoic acid receptor  $\beta$  and breast cancer. *Breast. Cancer Res. Treat.* 76:167-173.
- Xu L., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr.Opin. Genet. Dev.* 9:140-147.
- Zhang Z., Balmer J.E., Lovlie A., Fromm S.H., Blomhoff R. (1996). Specific teratogenic effects of different retinoic acid isomers and analogs in the developing anterior central nervous system of zebrafish. *Developmental Dynamics.* 206:73-86.
- Ziegler J.W., Ivy D.D., Kinsella J.P., Abman S.H. (1996). The role of nitric oxide, endothelin, and prostaglandins in the transition of pulmonary circulation. *Clin. Perinatal* 22:387-403.

