

Université de Montréal

**Clonage moléculaire, caractérisation et localisation de deux
récepteurs couplés à la protéine G chez le cnidaire
Renilla koellikeri (Anthozoa).**

par

Christelle Bouchard

Département de Sciences Biologiques
Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D)
en Sciences Biologiques

Février, 2004

© Christelle Bouchard, 2004



QH
302
U54
2004
v.001

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Clonage moléculaire, caractérisation et localisation de deux récepteurs couplés à la
protéine G chez le cnidaire *Renilla koellikeri* (Anthozoa).

présentée par:
Christelle Bouchard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

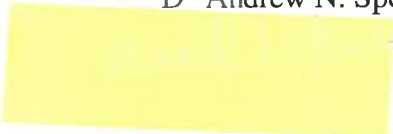
D^r Thérèse Cabana, présidente-rapporteure

D^r Michel Anctil, directeur de recherche

D^r François Dubé, co-directeur

D^r Luc Des Groseillers, membre du jury

D^r Andrew N. Spencer, examinateur externe

 représentant du doyen de la FES

À mon ami Gilles Houle

Résumé

Les animaux appartenant à l'embranchement des cnidaires sont considérés comme les premiers métazoaires à posséder des neurones. Ces neurones sont organisés en plexus nerveux, apparemment diffus dans la plupart des cas. Les mécanismes de la neurotransmission chez les cnidaires font l'objet d'études depuis une cinquantaine d'années. Toutefois, parmi les nombreuses substances soupçonnées d'être impliquées dans la neurotransmission, aucune n'a encore obtenu le statut définitif de neurotransmetteur. Chez le cnidaire *Renilla koellikeri*, de nombreux travaux ont mis en évidence l'existence d'une communication nerveuse de type aminergique. La bioluminescence, l'effecteur le mieux étudié chez la rénille, est opérée *via* un mécanisme adrénergique de type $\beta 2$. Des études suggèrent qu'un récepteur de type $\beta 2$ adrénergique est impliqué dans l'activité lumineuse de la colonie. Ce récepteur appartient à la grande famille des récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) dont la fonction est de transformer sélectivement un signal biologique extracellulaire en une cascade d'événements intracellulaires.

Le projet initial consistait à isoler un récepteur aminergique chez la rénille avec une préférence pour le récepteur de type $\beta 2$ -adrénergique. À l'aide d'oligonucléotides dégénérés déduits à partir des régions les mieux conservées de récepteurs aminergiques, nous avons amplifié par PCR, sur de l'ADNc et génomique de polypes, deux fragments d'ADN homologues à des récepteurs adrénergiques. À l'aide d'une méthode de RACE 3' couplée à des amplifications PCR sur des gabarits provenant d'une banque d'ADNc de polypes, nous avons obtenu deux séquences de récepteurs. En termes de similarité de

séquence, les récepteurs, nommés Ren1 et Ren2, se rangent parmi certains récepteurs de type aminergique, en particulier des récepteurs aux catécholamines (45% de similarité). Ce sont les premières séquences de récepteur appartenant à la famille des récepteurs aminergiques isolées chez un cnidaire.

Les méthodes classiques de caractérisation biochimique développées pour les RCPG de vertébrés ont été utilisées pour étudier Ren1 et Ren2. Les ADNc de Ren1 et Ren2 ont été exprimés dans des cellules de mammifère après avoir ajouté un épitope c-myc à l'extrémité N-terminale de chacun des récepteurs. L'immunocytologie faite sur les cellules transfectées à l'aide d'un anticorps anti-c-myc montre que les récepteurs Ren1 et Ren2 sont membranaires. Afin de trouver un ligand à ces récepteurs, trois essais pharmacologiques exploitant les voies de production de l'AMPc et de la libération du calcium ont été utilisés sur des cellules de mammifère transfectées avec Ren1 ou Ren2. Aucune des amines biogènes classiques, leurs métabolites et diverses autres substances testées n'ont déclenché une réponse chez les cellules transfectées avec ces récepteurs. Cependant, au cours de ces expériences, nous avons constaté que les cellules exprimant le récepteur Ren1 affichaient des niveaux d'AMPc intracellulaire 10 fois supérieurs au groupe de cellules témoin. Cette activité spontanée du récepteur agissant vraisemblablement sur la stimulation de l'adénylate cyclase suggère que le récepteur Ren1 est couplé à une protéine G α s.

Les transcrits du récepteur Ren2 ont été localisés dans les polypes de l'animal en utilisant la méthode par hybridation *in situ*. Les transcrits de Ren2 sont abondants dans la couche cellulaire ectodermique du disque oral, des tentacules et de la région pharyngienne.

Les cellules myoépithéliales et digestives qui constituent, pour la majeure partie, l'endoderme des cavités gastrovasculaires, sont intensément marquées. La distribution du marquage suggère que le récepteur Ren2 joue rôle une dans l'alimentation de la rénille.

Cette étude, dans sa globalité, apporte un élément de preuve supplémentaire comme quoi les récepteurs de type aminergique sont apparus avant ou au cours de l'évolution des cnidaires et qu'il puisse exister, chez les premiers métazoaires, une communication interneuronale basée sur une transmission chimique aminergique.

Mots-clés: cnidaire, récepteur couplé à la protéine G, activité constitutive, clonage, monoamines, évolution.

Abstract

Cnidarians are the most primitive animals endowed with a nervous system. The sea pansy (*Renilla koellikeri*), a colonial octocoralian, exhibits many physiological activities under the control of biogenic amines. Many of those neuroactive substances have been detected biochemically in *Renilla* tissues, and immunohistochemically in neurons. Characterisation of aminergic binding sites provided atypical pharmacological profiles making necessary the molecular identification of involved receptors. Using a PCR strategy based on degenerate oligonucleotides representing highly conserved regions of G protein-coupled aminergic receptors, followed by 3' RACE and other 5' end strategies, we determined the full-sequence of cDNAs encoding two *Renilla* G protein-coupled receptors (GPCR). These receptors, named Ren1 and Ren2, show strong sequence similarities (up to 45%) mainly with adrenergic and dopaminergic receptors among others. Expression of the N-terminaly c-myc-tagged receptors, through transfection experiments in mammalian cells followed by immunocytochemistry experiments using a anti-c-myc antibody showed that the *Renilla* receptors are targeted to the cell membrane.

The coupling of Ren1 and Ren2 receptors to second messenger pathways has been studied in mammalian culture cell lines transfected with receptor cDNAs. However we have not succeeded in finding a ligand using a variety of receptor activity assays designed to detect both cAMP- and Ca²⁺-mediated signalling. None of the classical biogenic amines, including dopamine, octopamine, tyramine, serotonin, histamine and adrenergic agents could elicit a response in Ren1- or Ren2-transfected cells. However, the results obtained for the Ren1 receptor revealed that the basal level of cAMP in cells expressing

Ren1 was consistently higher than that of mock-transfected or untransfected controls, indicating that Ren1 might be spontaneously activated. The high basal cAMP levels were shown to be specific for Ren1 and to vary proportionally with the level of Ren1 expressed in the transfected cells.

In situ hybridisation analysis suggests that Ren2 transcripts are highly expressed in the epithelium of the pharyngeal wall, the oral disk and tentacles, and in endodermal myoepithelia of the gastrovascular cavities, thus suggesting a role for Ren2 in feeding.

Keywords: Cnidaria, cloning, constitutive activity, G protein-coupled receptors, monoamines, orphan receptors, *in situ* hybridization.

Tables des matières

Résumé.....	i
Abstract	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Introduction: Chapitres 1 et 2.....	1
Chapitre 1	2
Introduction Générale.....	2
1.1 Caractéristiques générales de l'embranchement des cnidaires	3
1.2 Le système nerveux des cnidaires	6
1.3 Description générale du modèle étudié.....	10
1.4 Organisation histologique de la pensée de mer.....	13
1.5 Les amines biogènes sont présentes dans les tissus des cnidaires	16
1.6 Les neurones des cnidaires contiennent des amines biogènes	18
1.7 Les neurones des cnidaires synthétisent des amines biogènes.....	20
Chapitre 2.....	22
Introduction: Les Récepteurs	22
2.1. Les amines biogènes modifient le comportement des cnidaires <i>via</i> l'activation de récepteurs	23
2.2 Les récepteurs.....	31
2.3 La protéine G.....	36
2.4 Les voies de transduction empruntées par les récepteurs.....	37
2.5 La régulation du récepteur	38
2.6 L'activation constitutive des récepteurs	39
2.7 Les méthodes utilisées pour isoler et identifier les récepteurs de <i>Renilla</i>	43
Objectif de la thèse.....	48
Chapitre 3.....	51
Étude Expérimentale: Article I.....	51
Abstract	54

Introduction	56
Materials and methods	59
<i>Renilla</i> tissue specimens	59
Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a partial Ren1 sequence.....	59
RACE	60
Stable expression of Ren1 in HEK293 cells	61
Immunocytochemical fluorescence labeling of epitope-tagged Ren1 receptor in HEK293 cells	62
Membrane preparation and Western analysis	62
Drugs	63
Cyclic AMP response element-secreted alkaline phosphatase (CRE-SEAP) reporter assay	64
Cyclic AMP assays	64
Ca ²⁺ signaling assays	65
Results	67
Cloning of Ren1	67
Expression of Ren1 in HEK293 cells	68
Receptor signaling assays	69
Discussion	72
Figures et Légendes: Article 1	79
References	92
Chapitre 4	107
Étude Expérimentale Article II	107
Abstract	110
Introduction	111
Materials and methods	114
Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a partial Ren2 sequence.....	114
Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	114
Northern blot analysis	115
<i>In situ</i> (IS) reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).....	116
<i>In situ</i> hybridization	117

	viii
Results	119
Discussion	123
Figures et Légendes: Article II.....	128
References	139
Chapitre 5	146
Discussion Générale et Perspectives	146
Bibliographie.....	164

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des récepteurs couplés aux protéines-G

Liste des figures

Fig. 1. Arbre phylogénétique du monde animal

Fig. 2. La pensée de mer (*Renilla koellikeri*)

Fig. 3. Organisation histologique de l'autozoïde chez la pensée de mer

Fig. 4. Séquence-type d'un récepteur couplé à la protéine G et représentation schématique des deux voies de transduction principales empruntées par les récepteurs couplés à la protéine G

Fig. 5. Modèle allostérique du complexe ternaire

Fig. 6. Représentation schématique du fonctionnement de l'essai CRE-SEAP

Fig. 7. Représentation schématique du récepteur Ren1

Fig. 8. Représentation schématique du récepteur Ren2

Liste des sigles et abréviations

- ADN acide désoxyribonucléique
ADNc acide désoxyribonucléique complémentaire
AC adényl-cyclase
AMPc adénosine monophosphate cyclique
ARN acide ribonucléique
ARNm acide ribonucléique messenger
ATP adénosine triphosphate
Ca²⁺ calcium ionisé
CCF chromatographie en couches fines
CG chromatographie gazeuse
CLHP chromatographie liquide à haute pression
COS-7 cellules rénales modifiées de singe
CRE élément de réponse à l'AMPc
CREB protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc
CRE-SEAP phosphatase alcaline sécrétée par l'élément de réponse à l'AMPc
DE détection électrochimique
DAG diacylglycérol
DOPA dihydroxyphénylalanine
DOPAC acide 3, 4-dihydroxyphényl acétique
ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay
GRK kinase des récepteurs couplés à la protéine G
HEK293 cellules rénales embryonnaire humaine
5-HIAA acide 5-hydroxy-indole acétique
HMMA acide hydroxy-méthoxy mandélique
5-HTP 5-hydroxytryptophane
IP₃ inositol triphosphate
kDa kilodalton
LSD acide lysergique diéthylamide

LTK fibroblastes murins
MN métanéphrine
NA-5-HT N-acétyl-5-hydroxytryptamine
NMN norméтанéphrine
PAPP p-aminophénéthyl-m-trifluorométhyl phényl pipérazine
PCR réaction de polymérisation en chaîne

PKC protéine-kinase C
PLC phospholipase
PPSE potentiel postsynaptique excitateur
PPSI potentiel postsynaptique inhibiteur
RACE amplification rapide de l'extrémité d'un ADNc
RCPG récepteurs couplés aux protéines G
RIA dosage radioimmunologique
SM spectrographie de masse

Introduction: Chapitres 1 et 2

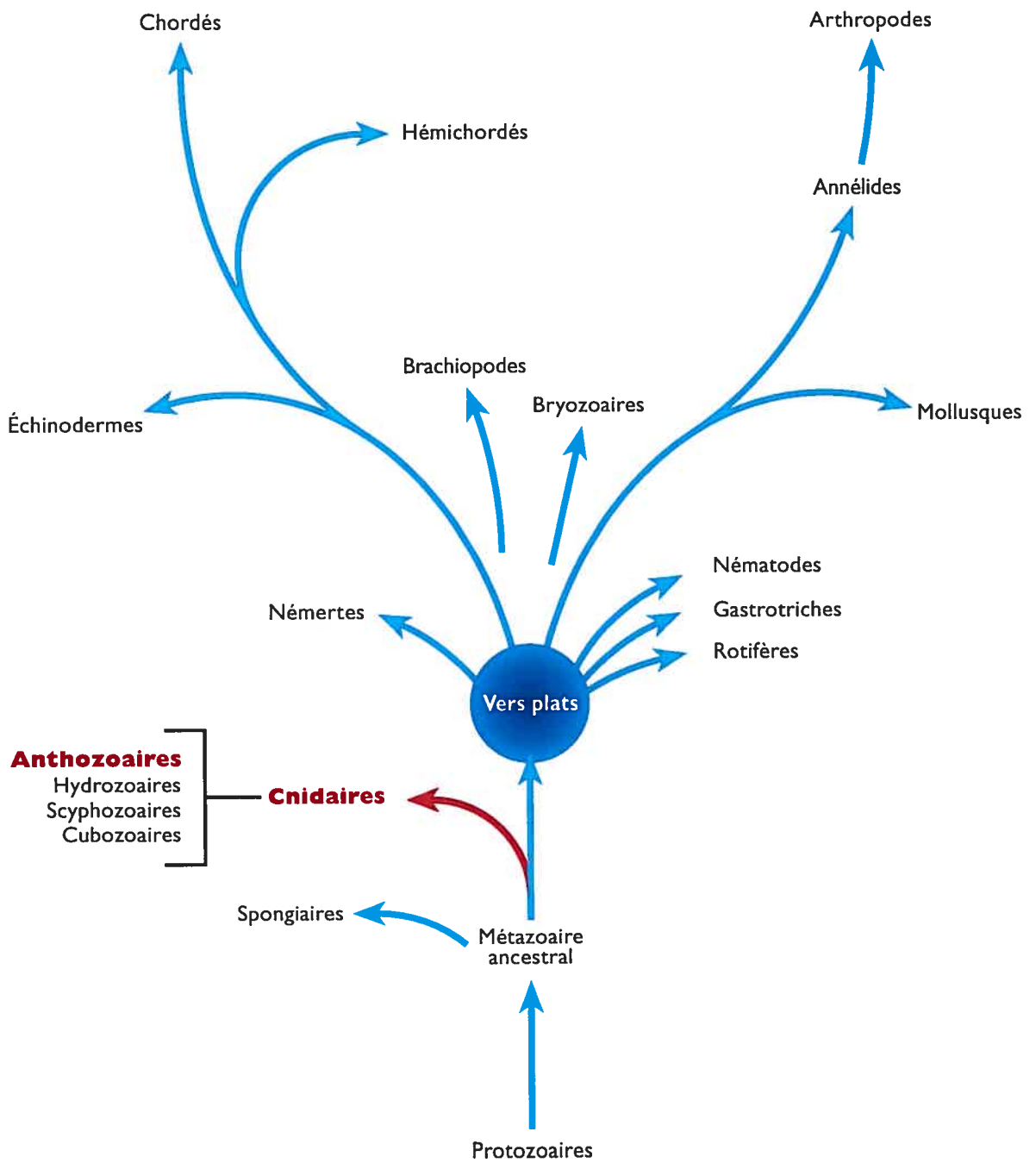
Chapitre 1

Introduction Générale

1.1 Caractéristiques générales de l'embranchement des cnidaires

Les métazoaires apparurent il y a 800 millions à 1 milliard d'années (Conway Morris, 1993). Les plus anciens des métazoaires vivant sur terre aujourd'hui sont les spongiaires (**Fig. 1**). Ces animaux mènent une existence fixée et pour ainsi dire immobile. La vie sans neurone ne pouvait être autrement (Stanley, 1992). Pourtant le système nerveux tient peut-être son origine d'une éponge calcaire. Les études phylogénétiques faites avec des séquences d'ARNr 18S appuient l'hypothèse de l'origine monophylétique du système nerveux chez un ancêtre commun immédiat des cnidaires (Cavalier-Smith *et al.*, 1996). Les membres de l'embranchement Cnidaria sont considérés comme les animaux les plus primitifs, vivant sur la planète aujourd'hui, à posséder un système nerveux. L'embranchement est peuplé d'animaux solitaires ou coloniaux que l'on retrouve généralement dans les milieux marins sous la forme libre, la méduse ou le polype fixé. Il est constitué d'animaux diploblastiques procédant de deux feuilletts embryonnaires séparés par une lame mésogléenne. L'épithélium superficiel des cnidaires est couvert de cellules venimeuses caractéristiques appelées cnidoblastes qui participent à la capture de proies et jouent un rôle de protection contre d'éventuels prédateurs. L'embranchement est subdivisé en quatre classes: les hydrozoaires (hydres), les scyphozoaires (méduses), les anthozoaires (coraux, anémones et plumes de mer) et les cubozoaires (cuboméduses). Des représentants de chacune de ces classes ont été retrouvés dans la collection de fossiles de la faune d'Ediacara. On estime que cette faune florissait il y a 580 millions d'années (Conway Morris, 1993).





Le système nerveux chez ces animaux se présente comme un réseau nerveux diffus, quoique chez la méduse ainsi que chez l'hydre des réseaux nerveux condensés en forme d'anneaux sont aussi observés (Grimmelikuijzen & Graff, 1985; Lin *et al.*, 2001). Ce système nerveux primitif est composé de neurones ayant des caractéristiques morphofonctionnelles similaires aux systèmes nerveux des animaux appartenant à des embranchements supérieurs (Satterlie & Spencer, 1987).

1.2 Le système nerveux des cnidaires

La microscopie électronique nous révèle la présence de synapses chez les cnidaires (Westfall, 1996). Repérées aux jonctions neuro-neuronales chez les scyphozoaires (Horridge *et al.*, 1962; Horridge & Mackay, 1962; Westfall, 1973b; Anderson & Schwab, 1981), les hydrozoaires (Jha & Mackie, 1967; Westfall, 1970a, 1973a, b; Westfall *et al.*, 1971; Stokes, 1974; Spencer, 1979; Kinnamon & Westfall, 1982; Weber *et al.*, 1982; Westfall & Kinnamon, 1984) et les anthozoaires (Westfall, 1973b; Satterlie & Case, 1980; Satterlie *et al.*, 1980; Westfall *et al.*, 2001) elles ont aussi été identifiées aux jonctions neuro-musculaires (Westfall, 1970a, 1973b; Satterlie & Case, 1978; Singla, 1978; Spencer 1979; Anderson & Schwab, 1981; Kinnamon & Westfall, 1982; Satterlie & Spencer, 1983; Westfall & Kinnamon, 1984; Westfall *et al.*, 1997) et neuro-nématocytaires (Westfall, 1970a, b, 1973a, b; Satterlie & Case, 1978; Westfall & Kinnamon, 1978) chez quelques autres membres de l'embranchement. Le complexe synaptique des cnidaires est semblable à celui des vertébrés. Les éléments pré- et postsynaptiques sont représentés par des régions sous-membranaires denses aux électrons séparés par la fente synaptique. Chez la plupart

des animaux, la terminaison présynaptique contient les vésicules synaptiques. Cette asymétrie de structure n'est cependant pas la règle chez les cnidaires. Les synapses symétriques où les vésicules synaptiques sont présentes dans les éléments pré- et postsynaptiques sont connues chez les cnidaires (Horridge & MacKay, 1962; Jha & Mackie, 1967; Westfall, 1970a, b, 1973a, b, 1987; Westfall & Kinnamon 1984; Anderson & Grünert, 1988) et sont de plus associées à une symétrie fonctionnelle (neurotransmission bidirectionnelle; Anderson, 1985).

Les propriétés physiologiques de la synapse du cnidaire se comparent à celles des autres animaux. Ces phénomènes évoquant une réponse synaptique ont été identifiés chez les cnidaires comme étant les suivants: le potentiel postsynaptique excitateur (PPSE), le potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI), le potentiel miniature, la facilitation, la sommation et la libération des neurotransmetteurs dépendante du calcium (Anderson & Mackie, 1977; Spencer, 1978, 1981; Anderson & Schwab, 1982; Spencer & Arkett, 1984; Roberts & Mackie, 1980). L'ensemble de ces travaux réalisés chez les cnidaires démontre que l'exocytose des vésicules synaptiques est dépendante du Ca^{2+} . Les neurotransmetteurs ainsi libérés diffusent dans la fente synaptique et se lient à leurs récepteurs sur le versant postsynaptique où se situent les récepteurs spécifiques, ce qui déclenche la dépolarisation de l'élément postsynaptique: c'est le PPSE.

L'identification d'une substance comme neurotransmetteur nécessite la démonstration expérimentale d'un ensemble de critères (Werman, 1966) que voici: (1) le neurotransmetteur putatif doit être localisé dans le neurone présynaptique, et le cas échéant, ses précurseurs ou les enzymes impliqués dans sa synthèse seront identifiés dans le tissu

nerveux; (2) le neurotransmetteur, stocké dans les vésicules, sera libéré dans la fente synaptique. La diffusion de la substance dans la fente activera des récepteurs spécifiques postsynaptiques et déclenchera une réponse postsynaptique; (3) ces récepteurs devront répondre aux drogues qui bloquent ou amplifient la réponse postsynaptique de la même manière que le ferait le neurotransmetteur d'origine; (4) finalement, un ou plusieurs mécanismes d'inactivation doivent être présents dans le tissu nerveux synaptique.

Aucun des neurotransmetteurs connus chez les cnidaires ne satisfait à l'ensemble de ces critères. Cependant, certaines de ces substances sont plus fortement sujettes à devenir des candidates à la neurotransmission. Entre autres, un nombre important de peptides à C-terminus contenant les séquences-types RF-amide, KA-amide, RI-amide, RN-amide, RP-amide, RW-amide, LW-amide, KV-amide et RG-amide (Graff & Grimmelikhuijzen, 1988; Plickert *et al.*, 2003) (voir aussi les revues de synthèse: Grimmelikhuijzen & Westfall, 1995; Grimmelikhuijzen *et al.*, 1996; 2002) auront de fortes probabilités d'accéder au statut de neurotransmetteurs ces prochaines années. Certains de ces peptides sont bioactifs (Anctil, 1987; Anctil & Grimmelikhuijzen, 1989; McFarlane *et al.*, 1991) et sont très répandus dans le système nerveux des cnidaires (Grimmelikhuijzen, 1983, 1985; Grimmelikhuijzen & Graff, 1985; Grimmelikhuijzen & Spencer, 1984). De plus, leur présence dans les vésicules synaptiques a été confirmée (Koizumi *et al.*, 1989; Westfall *et al.*, 1995).

Il y a plusieurs années, quelques travaux portant sur l'acétylcholine chez les cnidaires ont été entrepris (Lentz & Barnett, 1963; Erzen & Brzin, 1978; Kass-Simon & Passano, 1978; Castano & Rossi, 1978). Le peu de résultats obtenus de ces études ont tôt

fait de décourager la poursuite dans cette voie. De meilleures perspectives de recherche sur les transmetteurs sont à envisager avec les acides aminés comme le glutamate (Case & Morin, 1966; Carlyle, 1974; Anderson & Spencer, 1989), la glycine (Pierobon *et al.*, 2001), la taurine (Anderson & Trapido-Rosenthal, 1990; Anctil & Minh, 1997) et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Concas *et al.*, 1998).

Les amines biogènes telles que nous les connaissons chez les vertébrés font aussi l'objet d'études chez les animaux invertébrés et ce, dès le début du dernier siècle (voir Bacq, 1975). Quoique l'histamine et l'octopamine ne semblent pas occuper de place significative dans le système nerveux des cnidaires, la plupart des autres neurotransmetteurs de type aminergique qui comprennent les catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine), la sérotonine et la mélatonine sont présents. Une longue accumulation de données portant sur la présence et le rôle des amines biogènes chez les cnidaires n'a pas encore permis de dissiper les doutes quant à leurs qualités de médiateurs chimiques. Afin d'apporter des évidences supplémentaires qui permettraient à ces substances d'obtenir le statut de neurotransmetteur, nous avons choisi d'isoler un récepteur aminergique par clonage moléculaire chez le cnidaire *Renilla koellikeri*. Jusqu'à tout récemment, seulement deux récepteurs couplés à la protéine G avaient été clonés chez les cnidaires (Nothacker & Grimmelikhuijzen, 1993; New *et al.*, 2000). Ces deux récepteurs pour lesquels les ligands ne sont pas connus présentent des similarités de structure avec des récepteurs peptidiques. Cette thèse présente les résultats de mes travaux de recherche qui ont eu comme aboutissement la découverte de deux séquences de récepteurs homologues à la famille des RCPG de type aminergique chez le cnidaire *Renilla koellikeri*. La découverte de ces

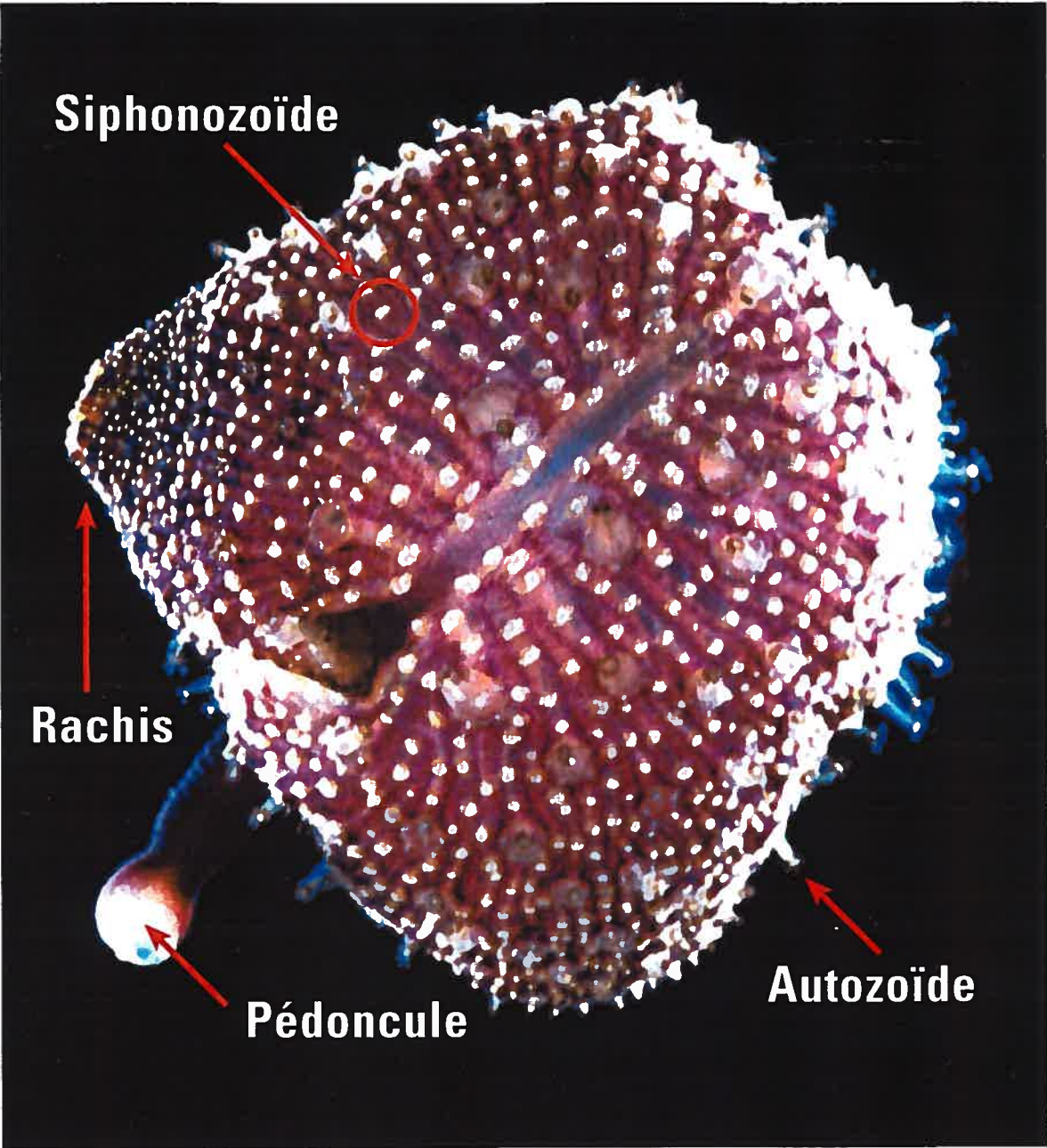
séquences contribue à étayer la preuve de l'existence de la transmission aminergique chez les cnidaires.

Cette première partie de l'introduction consiste en une revue de littérature colligeant les connaissances accumulées sur les bioamines et leurs fonctions présumées de neurotransmetteurs. La seconde partie se veut une introduction générale sur les récepteurs couplés aux protéines G. Avant de commencer cependant, familiarisons-nous avec le modèle expérimental: la pensée de mer.

1.3 Description générale du modèle étudié

La pensée de mer, *Renilla koellikeri* (Anthozoa, Pennatulacea), habite les haut-fonds sablonneux de la côte-ouest américaine (Lyke, 1965). Cet animal colonial à symétrie radiobilatérale porte sur un rachis aplati dorso-ventralement deux types de polypes; les autozoïdes et les siphonozoïdes (**Fig. 2**). Les premiers sont des polypes contractiles surmontés d'une bouche encerclée de huit tentacules pinnées. Ils ont une fonction nourricière mais participent aussi à la reproduction. Les seconds, les siphonozoïdes, n'ont pas de tentacules ni de tissus reproducteurs et ne servent qu'à l'entrée et la sortie de l'eau. Le pédoncule, prolongement musculueux inséré sur la face ventrale du rachis, permet à la colonie de s'ancrer dans le sable (Kastendiek, 1975; Grassé, 1987).



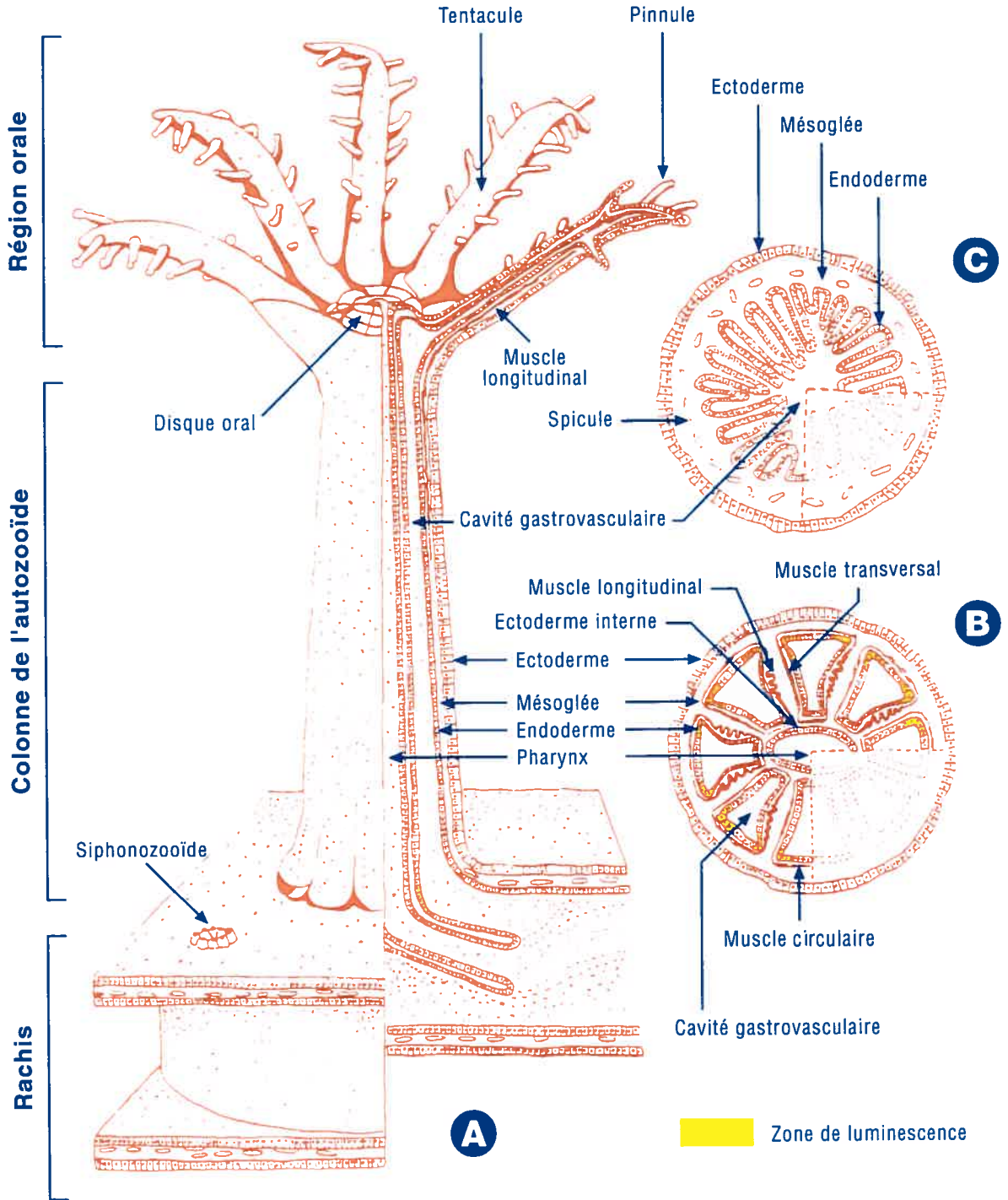


1.4 Organisation histologique de la pensée de mer

La paroi biépithéliale ecto-endodermique du polype est repliée sur elle-même de manière à ce que les tentacules et l'invagination de la bouche au pharynx soient recouvertes d'ectoderme (**Fig. 3**). L'épithélium pharyngien est séparé de l'ectoderme externe (parois des tentacules et de la colonne) par un espace scindé en huit cavités. Ces cavités qui encerclent le pharynx sont tapissées par un épithélium endodermique dont les cloisons sont appelées septes. Une lame mésogléenne s'intercale entre les feuillets du polype et s'élargit dans le rachis pour former le coenenchyme. La mésoglée, constituée d'une matière gélatineuse, est plus ou moins peuplée de cellules migratrices. C'est dans le coenenchyme que l'on retrouve des cellules d'origine ectodermique, les scléroblastes, qui sécrètent les spicules de carbonate de calcium dans le rachis.

L'endoderme donne naissance à deux musculatures au niveau des septes: le muscle septal longitudinal et le muscle septal radiaire (transversal). Cette dernière musculature de l'endoderme contient des amas de cellules lumineuses (photocytes) dans des régions bien précises des zoïdes. Les parois ectodermiques externes de la colonne et du pharynx, quant à elles, sont chacune munies d'une musculature circulaire (Lyke, 1965; Grassé, 1987).





1.5 Les amines biogènes sont présentes dans les tissus des cnidaires

Dès que nous envisageons la transmission de l'excitation nerveuse d'un neurone à un autre nous présumons la présence d'un médiateur chimique. Pour des raisons pratiques, la recherche de ces médiateurs s'effectue souvent à partir d'extraits de tissus de l'animal avant d'entreprendre tout travail de localisation ou de physiologie. Avant les années 1980, la détection d'amines biogènes s'opérait à l'aide de techniques qui furent rapidement déclassées par l'arrivée de systèmes de séparation sensibles comme la chromatographie gazeuse et la chromatographie liquide à haute pression. Malgré l'utilisation de techniques de pointe, l'unanimité n'est pas toujours au rendez-vous en ce qui a trait à la présence ou non de certaines amines.

La sérotonine a été détectée chez *Calliatis parasitica* par chromatographie sur papier (Mathias *et al.*, 1957), chez *Hydra oligactis*, *Sagartia luciae* et *Metridium senile* par fluorométrie (Welsh, 1960). Quoique la présence de catécholamines soit connue chez les cnidaires, Carlyle (1969) le premier, isole par chromatographie en couches fines (CCF) la dihydroxyphénylalanine (DOPA), la dopamine, la noradrénaline et observe des traces d'adrénaline chez *Actinia equina*. Chez l'anémone *Metridium senile*, utilisant une technique de séparation similaire, Lenicque et ses collègues (1977) observent la présence de DOPA, de dopamine, de tryptamine ainsi que de sérotonine dans les tissus de la zone orale. Ces résultats doivent cependant être abordés avec précaution puisque des analyses par chromatographie gazeuse couplée à la spectrographie de masse (CG/SM) ainsi que de fluorométrie n'ont pas détecté de dopamine et de tyramine, ni de sérotonine dans les

tentacules de l'anthozoaire *Metridium* (Elofsson *et al.*, 1977). L'absence de ces substances a aussi été constatée dans les tissus des anémones *Metridium* et *Tealia felina* en utilisant la chromatographie liquide à haute pression (CLHP) (Carlberg, 1983). Ces chercheurs détectent par contre la DOPA (Elofsson *et al.*, 1977; Carlberg, 1983) et ses dérivés, la 5-hydroxy-dopa et la 5-S-cystéinyldopa (Carlberg, 1983). En utilisant la même approche, la présence de DOPA et de 5-S-cystéinyldopa est constatée chez *Hydra attenuata* mais, cette fois-ci, on trouve aussi de la dopamine dans les tissus de l'animal (Carlberg, 1992). La présence de dopamine chez les hydres *Hydra magnipapillata* et *Chlorohydra viridissima* était déjà connue et les analyses effectuées par CLHP détectaient d'autres amines dont la sérotonine, la N-méthylsérotonine et la noradrénaline ainsi que les précurseurs tyrosine et tryptophane (Tadeka & Svendsen, 1991; Venturini *et al.*, 1984). À l'aide des techniques de CLHP-DE (DE: détection électrochimique) et de CG/MS, la dopamine a été retrouvée dans les tissus de la méduse *Polyorchis penicillatus* (Chung *et al.*, 1989) et les tentacules de l'anémone *Aiptasia pallida* (Westfall *et al.*, 2000) et divers tissus de *Renilla koellikeri* (De Waele *et al.*, 1987). En utilisant des méthodes radioenzymatique, de CCF et de CLHP-DE, les travaux de De Waele (1987) ont aussi permis de trouver dans les tissus de *Renilla* de la noradrénaline et, pour la première fois chez un coelentéré à l'aide de méthodes fiables, de l'adrénaline. Une étude exhaustive entreprise pour déterminer le contenu en amines biogènes chez la rénille ainsi que leurs précurseurs et leurs métabolites (Pani & Anctil, 1994a) a confirmé les travaux de De Waele (1987). En plus de la dopamine (qui est la catécholamine dominante chez la rénille), de l'adrénaline et de la noradrénaline, les précurseurs tyrosine et DOPA ont aussi été trouvés ainsi que les métabolites suivants: l'acide 3, 4-dihydroxyphényl acétique (DOPAC),

l'épinine, la normétanéphrine (NMN), la métanéphrine (MN) et l'acide hydroxy-méthoxy mandélique (HMMA). Les précurseurs de la sérotonine, le tryptophane et le 5-hydroxytryptophane (5-HTP), sont les plus abondants des indolamines chez la rénille. La sérotonine et le catabolite acide 5-hydroxy-indole acétique (5-HIAA) ont été détectés en quantité appréciable tandis que le N-acétyl-5-hydroxytryptamine (NA-5-HT) a été retrouvé à l'état de trace. Ce dernier composé est un précurseur de la mélatonine, laquelle a déjà été dosée par des essais radioimmunologiques chez la rénille (Pani & Anctil, 1994a).

Ces travaux suggèrent que les tissus des cnidaires contiennent des amines. Cependant le petit nombre d'études, parfois contradictoires, menées chez un petit échantillon d'espèces crée une certaine confusion. Fort heureusement, les résultats de ces travaux sont appuyés en partie par des études immunologiques qui confirment la présence d'amines biogènes chez ces animaux, en particulier dans les neurones.

1.6 Les neurones des cnidaires contiennent des amines biogènes

Diverses techniques histochimiques (Falck-Hillarp, Wood-Barnett, Tranzer-Richards et la méthode à l'acide glycoxilique) utilisées sur les tissus des hydraires *Hydra littoralis* (Wood & Lentz, 1964), *Hydra viridis* et *Hydra oligactis* (Castano & Rossi, 1978), les anémones de mer *Metridium senile* et *Tealia felina* (Dahl *et al.*, 1963) et la planule de l'hydrozoaire *Halocordyle disticha* (Kolberg & Martin, 1988) ont permis de localiser à l'aide de la microscopie optique par fluorescence un réseau de neurones contenant des catécholamines ainsi que de la sérotonine. Des doutes ont cependant été émis quant à la

véritable identité de ces substances observées dans le système nerveux (Eloffson *et al.*, 1977; Carlberg & Eloffson, 1987). En utilisant des techniques plus précises, entre autre l'immunohistochimie, plusieurs amines biogènes ont été localisées dans les cellules nerveuses des cnidaires. Chez *Hydra attenuata*, des cellules nerveuses immunoréactives à la dopamine ont été observées (Carlberg, 1992). L'auteur rapporta cependant que la majorité des animaux étudiés ne présentaient aucun marquage à la dopamine. Il est possible que la dopamine chez l'hydre soit présente transitoirement et qu'elle joue un rôle de précurseur dans la synthèse d'autres amines ou encore qu'elle participe à des fonctions autres que la neurotransmission comme, par exemple, la métamorphose. Les études ultrastructurales et immunohistochimiques réalisées par Westfall et ses collègues (2000) ont montré des neurones immunoréactifs à la sérotonine dans les tentacules d'*Aiptasia pallida*. Cette étude se distingue des autres études par le fait qu'elle a réussi à localiser la sérotonine à l'intérieur de vésicules associées à des synapses interneuronales et neuromusculaires.

Le plus grand nombre de travaux d'immunohistochimie cherchant à prouver la présence d'amines dans les tissus nerveux d'un cnidaire sont ceux réalisés chez *Renilla koellikeri*. Chez cet animal, des cellules sensorielles de l'ectoderme ainsi que les neurones de la mésoglée présentent une immunoréactivité à la sérotonine (Umbriaco *et al.*, 1990). À l'aide des même techniques, la mélatonine a été repérée dans des neurones de l'ectoderme de l'autozoïde et des filaments septaux ainsi que dans les neurones de la paroi endodermique du rachis (Mechawar & Anctil, 1997). Par ailleurs, les études réalisées par Pani et ses collègues (1995) ont montré des neurones immunoréactifs à la noradrénaline dans la mésoglée. Cette amine ainsi que l'adrénaline ont été retrouvées dans les

prolongements neuronaux de la rénille à la suite de travaux sur la recapture, un mécanisme qui s'est avéré dépendant du calcium et sensible à la désipramine (Anctil *et al.*, 1984).

Pour autant qu'on puisse en juger, il existe des amines biogènes dans les neurones des cnidaires. Elles sont localisées, du moins on le sait pour la sérotonine, dans des vésicules synaptiques, ce qui suggère une libération de neurotransmetteurs par exocytose. La libération de monoamines a été mesurée directement sur des neurones aminergiques en culture de la rénille par la technique ampérométrique. L'étude conclut qu'une fraction de la population de neurones possède des patrons d'oscillations intrinsèques qui pourraient se comparer à une activité de type pacemaker (Gillis & Anctil, 2001).

1.7 Les neurones des cnidaires synthétisent des amines biogènes

Les voies de synthèse des amines biogènes sont peu connues chez les cnidaires. Les enzymes impliquées dans la synthèse des monoamines ont fait cependant l'objet de quelques études. Chez la rénille, les voies de biosynthèse des catécholamines et des indolamines ont été étudiées par criblages radiochimiques. La CLHP-DE effectuée sur des extraits de rénille dont les tissus avaient été préalablement exposés à des précurseurs marqués, suggère qu'il existe une activité tyrosine hydroxylase (TH), tryptophane hydroxylase (TPH) et phényléthanolamine-N-méthyltransférase (la PNMT convertit la noradrénaline en adrénaline) comme chez les mammifères (Pani & Anctil, 1994b). A l'aide d'un anticorps polyclonale dirigé contre la dopamine β -hydroxylase (DBH) bovine, un

buvardage Western d'extraits de tissu de rénille a permis d'identifier une bande associée à la DBH (Anctil *et al.*, 2002). De plus, ce même anticorps marque un groupe de neurones de l'ectoderme et de la mésogée. Les travaux portant sur la DBH chez la rénille sont corroborés par ceux de Westfall et ses collègues (2000) qui montrent que la DBH est localisée à la périphérie de vésicules synaptiques chez l'anthozoaire *Aiptasia pallida*. Ces auteurs rapportent aussi des résultats similaires obtenus avec la TH.

La preuve de la conservation phylogénétique des voies de biosynthèse des transmetteurs chez les cnidaires demeure incomplète. La majeure partie de ces travaux, réalisés sur quelques espèces, couvre la voie de synthèse des catécholamines, laissant vacante la place consacrée à l'étude des voies de synthèse des autres amines.

Chapitre 2

Introduction: Les Récepteurs

2.1. Les amines biogènes modifient le comportement des cnidaires *via* l'activation de récepteurs

Nous avons vu que certaines monoamines chez les cnidaires sont synthétisées et localisées dans les neurones et que leur association avec des sites synaptiques, en particulier les vésicules, en font potentiellement des molécules qui participent à la neurotransmission. Aucune substance cependant n'est encore admise comme neurotransmetteur chez les cnidaires. Aucune ne le sera à moins de connaître les récepteurs activés par ces substances. L'étude des récepteurs chez ces animaux a été abordée principalement sous l'angle de la physiologie. Un répertoire restreint de comportements s'offre au neurobiologiste pour étudier l'effet d'une drogue sur un cnidaire. La contraction musculaire a été l'effecteur le plus exploité pour observer l'effet des monoamines sur l'animal. L'adrénaline, la tyramine, la tryptamine, la 5-méthoxytryptamine, la mélatonine, la sérotonine et la L-DOPA agissent en effet sur les comportements moteurs de plusieurs cnidaires (Ross, 1960; Tsang *et al.*, 1997; Anctil, 1989; Anctil *et al.*, 1991; Hudman & McFarlane, 1995). Peu de travaux se sont attardés à caractériser les cibles réceptorielles responsables de ces comportements. Les quelques travaux pharmacologiques existant abordent l'étude des récepteurs surtout sous l'angle de la physiologie. Chez la rénille cependant, des études de radioliation sur des extraits de tissus s'y ajoutent. Pour commencer, deux études physiologiques préalables méritent d'être décrites. L'une d'elles a été réalisée sur l'animal entier, en l'occurrence l'hydre, tandis que l'autre a été menée sur des cellules nerveuses en culture provenant d'une méduse en utilisant les techniques

d'électrophysiologie. Ces études ont permis de caractériser pharmacologiquement deux récepteurs à la dopamine présents chez les cnidaires.

La première étude menée sur *Hydra japonica* suggère l'existence de 2 récepteurs aminergiques jouant un rôle dans un réflexe alimentaire. En présence de S-méthylglutathione, les tentacules de l'hydre s'agitent et se regroupent en ballot pour apporter la proie capturée à la bouche (Lenhoff, 1974). La dopamine et la tyrosine inhibent la formation des tentacules en ballot et ce, à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Hanai & Kitajima, 1984). Les expériences effectuées avec la dopamine et la tyramine ont été menées à des concentrations physiologiques différentes pour lesquelles sont associées des taux variables de réponse. De plus, l'action physiologique disparaît lorsque les substances sont soustraites du milieu. Parce que les auteurs n'ont pas pu trouver de drogues compétitives contre l'action de la tyramine, seul le récepteur à la dopamine a été caractérisé. L'action inhibitrice de la dopamine est abolie en présence des bloqueurs adrénergiques ergométrine et DL-propranolol. Par contre, l'antagoniste α -adrénergique phentolamine est inefficace. Contre toute attente, l'action de la dopamine est mimée par l'antagoniste dopaminergique flupenthixol et la chlorpromazine, un antagoniste à la fois des récepteurs à la dopamine et des récepteurs α -adrénergiques. En plus de répondre à la dopamine, l'inhibition du réflexe alimentaire est observé, quoique moindrement, en présence des agonistes adrénergiques L-phényléphrine, DL-isoprotérénol, L-adrénaline et DL-noradrénaline. Il semble que le récepteur aminergique impliqué dans l'inhibition du réflexe alimentaire présente des caractéristiques pharmacologiques mixtes qui sont à la fois celles de récepteurs à la dopamine et de récepteurs adrénergiques. Toutefois, puisque le

récepteur interagit plus fortement avec l'isomère D-norépinéphrine que l'isomère L-norépinéphrine, les auteurs considèrent ce récepteur comme étant dopaminergique.

La dopamine a aussi un effet inhibiteur sur les neurones moteurs associés à la nage chez *Polyorchis penicillatus*. En fait, la dopamine hyperpolarise les neurones moteurs en culture en augmentant le courant potassique (Chung & Spencer, 1991a). Deux PPSIs ont été identifiés chez *Polyorchis* (Spencer, 1981; Arkett & Spencer, 1986). L'hyperpolarisation des neurones déclenchée par la dopamine ressemble à l'un de ces PPSIs qui est associé à un comportement de froissement de la cloche (Spencer, 1981). Afin d'être certain du rôle physiologique joué par le récepteur dopaminergique putatif, des expériences *in vivo* devront cependant être reprises en considérant le travail de caractérisation pharmacologique du récepteur de *Polyorchis* que voici. La noradrénaline, l'adrénaline, la tyramine, l'octopamine et la β -phényléthylamine produisent le même effet électrophysiologique que la dopamine, quoique moindrement. Quelques enregistrements montrent que l'effet inhibiteur de la dopamine est amenuisé en présence de propranolol, un antagoniste β -adrénergique. Cependant, les bloqueurs α_1 et α_2 -adrénergiques prazosine et yohimbine sont inefficaces. La réponse à la dopamine est abolie sélectivement en présence de l'antagoniste dopaminergique fluphénazine et des antagonistes D_2 halopéridol et spipérone. Ainsi, les auteurs suggèrent que l'effet inhibiteur observé en présence de dopamine s'effectue *via* un récepteur ressemblant au type D_2 (Chung & Spencer, 1991b).

Chez la pensée de mer, trois récepteurs ont été caractérisés pharmacologiquement par des méthodes de radioliation. Deux récepteurs de type adrénergique sont connus dont

l'un joue un rôle dans la production de lumière. Un récepteur à la sérotonine a aussi été caractérisé. En fait, la sérotonine est impliquée dans l'activité péristaltique de la colonie de rénille (Ancil, 1989). L'amplitude de ces contractions varie selon la turbulence du milieu. Ainsi, l'augmentation légère de la force du courant a pour effet d'accroître l'amplitude des contractions. Cet effet est imité par la sérotonine, laquelle stimule aussi la production d'AMPC dans l'animal (Ancil, 1989). La sérotonine agit sur l'animal d'une manière concentration-effet. Elle est, de plus, antagonisée par les bloqueurs sérotoninergiques naphthyl pipérazine et méthysergide. Ces études suggèrent qu'il existe un récepteur à la sérotonine chez la rénille. Des études de radioliation sur des préparations membranaires de la rénille ont cherché à caractériser le site récepteuriel à la sérotonine (Hajj-Ali & Ancil, 1997). Les caractéristiques pharmacologiques du récepteur 5-HT de la rénille divergent de celles de récepteurs connus chez les invertébrés et les vertébrés. Par exemple, il ne lie pas le LSD (acide lysergique diéthylamide). De plus, l'agoniste le plus puissant sur ce site sérotoninergique, le 2-méthyl-5-HT ($IC_{50} = 75 \text{ nM}$) est un agoniste du récepteur 5-HT₃ chez les mammifères tandis que les autres agonistes p-aminophénéthyl-m-trifluorométhyl phényl pipérazine (PAPP) ($IC_{50} = 9.38 \text{ } \mu\text{M}$) et (\pm)-8-hydroxy-dipropylaminotétralin 8-OH-DPAT ($IC_{50} = 10.3 \text{ } \mu\text{M}$) sont respectivement associés aux sous-types 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}. Parmi les antagonistes à la sérotonine, l'antagoniste 5-HT₂ mianserin ($IC_{50} = 5.14 \text{ } \mu\text{g}$), est le plus efficace pour déplacer la liaison [³H]5-HT sur les membranes de polypes. Peu d'évidences permettent d'associer le récepteur à la sérotonine de la rénille étudié par le biais de la physiologie à celui identifié par les études de radioliation. De plus, les résultats de la caractérisation pharmacologique révèlent que le récepteur de la rénille ne peut être placé dans aucune des sous classes identifiées chez les vertébrés.

La bioluminescence produite par la rénille est un événement intracellulaire. Les photocytes sont localisés dans l'endoderme à la base des tentacules de l'autozoïde, à la base de la colonne de l'autozoïde et dans les siphonozoïdes (**Fig. 3**). La luminescence se présente sous la forme d'une onde lumineuse qui se propage à travers la colonie (Parker, 1920; Nicol 1955a). La production de lumière est contrôlée par le réseau nerveux colonial (Parker, 1920; Nicol, 1955b; Buck, 1973; Anderson & Case, 1975). Ce contrôle agit du moins en partie *via* une voie aminergique impliquant un récepteur adrénergique relativement bien étudié. L'application d'adrénaline ou d'isoprotérénol à des concentrations d'ordre physiologique sur les tissus de la rénille déclenche une réponse lumineuse et cette réponse est partiellement inhibée en présence d'un antagoniste β -adrénergique, le propranolol (Ancil *et al.*, 1982). Les antagonistes [^3H]CGP12177 et [^3H]dihydroalprénolol utilisés dans des expériences de radiolisation ont mis en évidence l'existence de deux sites adrénergiques, le site₁ et le site₂ (Awad & Ancil, 1993a). Le site₁ a été caractérisé comme étant un récepteur de type β 2-adrénergique, sans toutefois lui ressembler absolument. Il se distingue, entre autre, du récepteur classique par la capacité qu'a l'aténolol de déplacer le [^3H]CGP12177. Cet antagoniste β 1-adrénergique déclenche la réponse lumineuse d'une manière concentration-effet. Le profil pharmacologique de ce récepteur concorde bien avec le patron de spécificité de l'effet physiologique des drogues β -adrénergiques sur l'activité lumineuse. De plus, le récepteur a été localisé dans la région photocytaire sur les muscles circulaires des autozoïdes et dans l'endoderme des siphonozoïdes. La distribution des signaux obtenus par hybridation *in situ* coïncide avec la distribution de sites de liaison spécifiques au radioligand [^3H]CGP12177 (Awad & Ancil, 1994). Le type cellulaire

exprimant le récepteur de type β 2-adrénérique est une cellule endodermique granuleuse située à proximité des photocytes.

Le site récepteuriel 2 est retrouvé dans le rachis et le pédoncule. La spécificité pharmacologique de ce site est celle d'un récepteur β 1-adrénérique sans l'être tout à fait cependant. Sa sélectivité potentielle a été évaluée selon l'ordre suivant; pindolol > (-)propranolol > (+)propranolol > alprénolol. L'incongruité de ce récepteur est qu'il possède une affinité élevée pour le bloqueur dopaminergique trifluopérazine. Il est difficile pour le moment de spéculer sur le rôle du site₂ dans la colonie (Awad & Anctil, 1993a; Anctil *et al.*, 1982).

Puisque les études de radioliation permettent d'apprécier la liaison ligand-récepteur et non pas l'effet engendré par cette liaison, une étude supplémentaire a été réalisée pour évaluer le couplage des sites 1 et 2 avec leur effecteur (Awad & Anctil, 1993b). En utilisant un essai enzymatique, un couplage positif entre les site₁ et site₂ d'une part, et l'adénylate cyclase d'autre part, a été constaté. Les agonistes adrénériques spécifiques au site₁ et au site₂ agissent chez la pensée de mer en augmentant les niveaux d'AMPc, vraisemblablement *via* une protéine G α s. Le profil pharmacologique de l'inhibition de l'activation de l'adényl cyclase correspond à celui obtenu lors des études de radioliation. Parmi les autres substances neuroactives putatives qui ont été testées dans l'essai enzymatique, seules la dopamine et la sérotonine ont provoqué l'activation de l'adénylate cyclase.

L'accumulation de données portant sur les récepteurs aux catécholamines chez les cnidaires montre qu'il existe chez ces animaux une ambiguïté pharmacologique. Nous avons vu comment les récepteurs adrénérgiques de la rénille répondent à des ligands spécifiques aux récepteurs à la dopamine et inversement, chez l'hydre et *Polyorchis*, comment les récepteurs à la dopamine montrent une sélectivité pour les drogues adrénérgiques. Cette ambiguïté n'est pas propre aux cnidaires puisque qu'on rapporte plusieurs cas de récepteurs à la dopamine chez les invertébrés répondant à des drogues adrénérgiques (Ginsborg *et al.*, 1976; House & Ginsborg 1976; Feng *et al.*, 1996; Hearn *et al.*, 2002). Dans la plupart des cas chez les invertébrés, la définition pharmacologique des récepteurs est présentée comme une approximation calquée sur nos connaissances des récepteurs des vertébrés. Ce n'est pas sans intérêt puisque parfois des lignes directrices émergent de ces comparaisons. Par exemple, une faible affinité aux benzodiazepines a souvent été constatée pour les récepteurs à la dopamine des invertébrés (Gotzes *et al.*, 1994; Sugamori *et al.*, 1995; Blenau *et al.*, 1998; Suo *et al.*, 2002, 2003). Il est tout aussi étonnant de constater l'action agoniste de plusieurs antagonistes de synthèse aux catécholamines sur les récepteurs des cnidaires. Il est bien entendu que ces drogues ont été développées pour l'étude de récepteurs de mammifères et qu'une adéquation pharmacologique entre ces derniers récepteurs et ceux des invertébrés, en particulier les invertébrés plus primitifs, n'est pas prévisible. Comme les catécholamines partagent la même voie de synthèse, et donc une structure similaire, la région du récepteur liant l'amine biogène chez les invertébrés pourrait être plus polyvalente qu'elle ne l'est chez les mammifères. Nous pourrions spéculer sur l'existence d'un récepteur de type catécholaminérgique originel qui au cours de son histoire évolutive s'est dupliqué et, dans un cas, est devenu sélectif aux

substances adrénérgiques et, dans l'autre cas, s'est défini comme un récepteur à la dopamine.

Jusqu'à tout récemment, la démonstration de l'existence de récepteurs activés par des amines biogènes a été abordée indirectement en travaillant avec l'animal entier ou une partie de celui-ci ou encore sur des préparations membranaires de tissus. Ces études ont certes permis d'aller au-delà du soupçon et l'existence de mécanismes aminérgiques chez les cnidaires est considérée comme des plus probable. Mais les méthodes utilisées demeurent des approches controversées. La complexité des préparations utilisées pour isoler et étudier un récepteur donné comporte le risque que d'autres protéines viennent interférer et ainsi modifier les résultats. À cela s'ajoute une autre difficulté, celle de caractériser les récepteurs d'invertébrés dont la spécificité pharmacologique s'écarte plus souvent qu'autrement de celle établie pour les récepteurs de vertébrés. Les points de repère sont donc rares lorsque l'on étudie des récepteurs d'invertébrés. Ils le sont d'autant plus quand les organismes étudiés appartiennent à un embranchement invertébré lointain et négligé.

Comme le mécanisme adrénérgique de la bioluminescence chez la rénille avait été beaucoup étudié par les voies de la physiologie et qu'en particulier un récepteur de type β_2 -adrénérgique avait été identifié par des études de radioliation, la suite logique de l'étude devait passer par l'isolation de ce récepteur. Aucun récepteur aminérgique n'avait été isolé moléculairement chez les cnidaires. Des deux séquences de récepteurs qui ont été clonées chez les cnidaires, l'une ressemble à un récepteur peptidique (Nothacker &

Grimmelikhuijzen, 1993) tandis que l'autre présente des caractéristiques mixtes de récepteurs aminergiques et peptidergiques (New *et al.*, 2000). La recherche d'un récepteur de type β 2-adrénergique de la pensée de mer a abouti à l'isolation de deux séquences de récepteur de type aminergique, nommées Ren1 et Ren2. Toutefois, avant de présenter l'étude expérimentale de cette thèse, je présente une introduction sur la nature des RCPGs et les méthodes utilisées pour découvrir et étudier les récepteurs de *Renilla*.

2.2 Les récepteurs

Les récepteurs membranaires traduisent des signaux exogènes (photons, odeurs, amines, peptides, acides aminés, nucléotides etc.) en une cascade d'événements biologiques intracellulaires. Ils ont été regroupés dans trois classes différentes selon leur mode d'action et leur structure moléculaire. Le premier groupe de récepteurs est constitué de récepteurs à canaux ioniques activés par un ligand comme par exemple les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Le deuxième groupe comprend des récepteurs à activité enzymatique comme les récepteurs à l'insuline ou du facteur de croissance des neurones (NGF). Finalement, le troisième groupe, la plus importante famille de récepteurs membranaires, est composé de récepteurs couplés aux protéines G. À l'intérieur de ce dernier groupe, il existe une classification des RCPGs en fonction de leur séquence primaire (**Tableau I**) (Pierce *et al.*, 2002). La classe I, celle qui nous intéresse, rassemble les récepteurs de type rhodopsine. Ces récepteurs répondent à des composés aminés, puriques et lipidiques, à de petits

Tableau 1. Classification des récepteurs couplés aux protéines-G *

Groupe 1 Récepteurs de type « rhodopsine »

- Les récepteurs sensoriels - visuels, olfactifs et gustatifs.
 - Les récepteurs des amines biogènes.
 - Les récepteurs de peptides endogènes.
(angiotensine, endothéline, oxytocine, somatostatine, etc.)
 - Les récepteurs des composés lipidiques.
(lysophospholipides, cannabinoïde, prostaglandines, etc.)
 - Les récepteurs de petites molécules (purinergiques).
 - Les récepteurs impliqués dans les réponses du système immunitaire.
(peptides N-formylés, chimiokines, anaphylatoxine)
 - Les récepteurs des protéines.
(glycoprotéines, de type LGR, activés par les protéases)
-

Groupe 2 Récepteurs de type « récepteur de la sécrétine »

- Les récepteurs de peptides endogènes.
(sécrétine, calcitonine, glucagon, parathormone, vasopressine, etc.)
 - Les récepteurs de la sous-famille EGF-TM7.
-

Groupe 3 Récepteurs de type « récepteurs métabotropiques du glutamate »

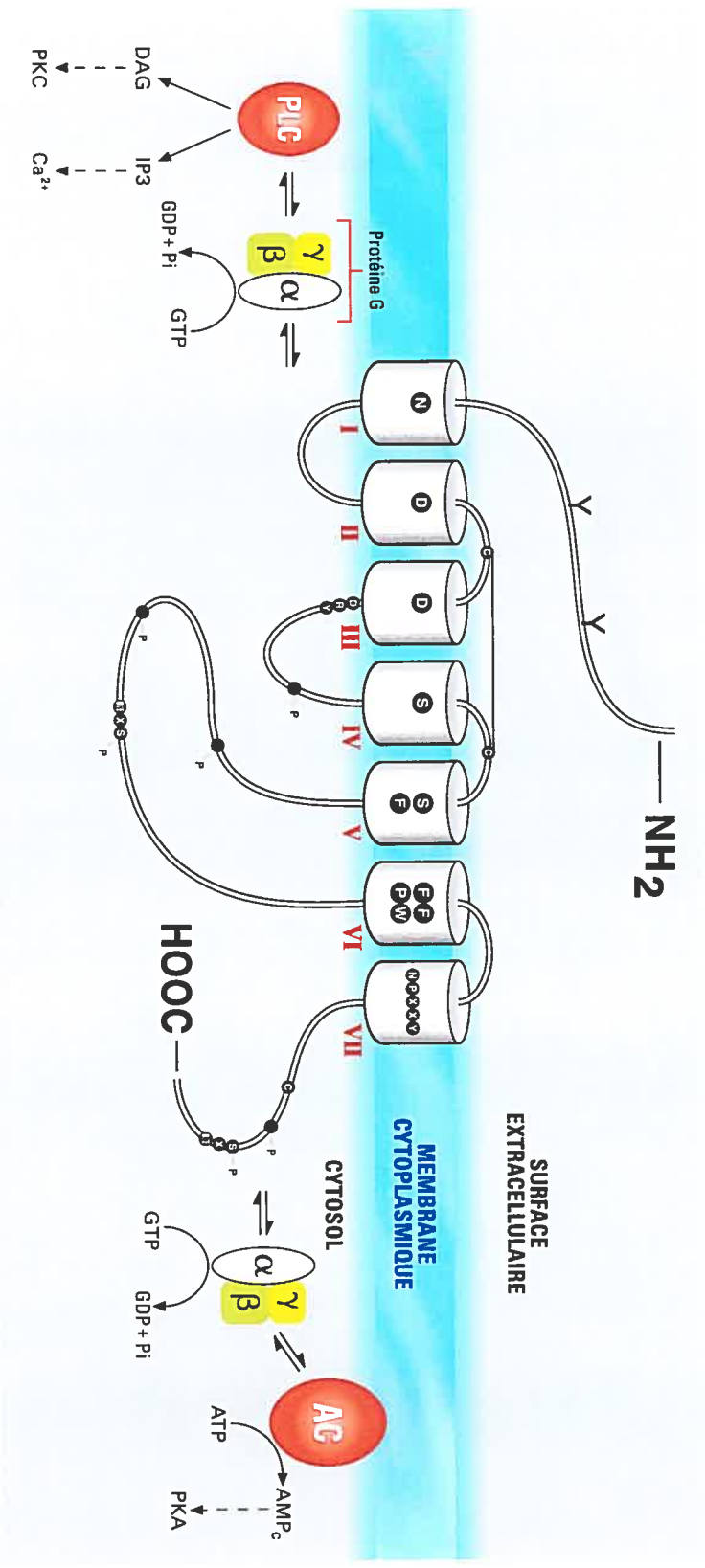
- Les récepteurs du glutamate.
- Les récepteurs de type B de l'acide γ -aminobutyrique (GABA).
- Les récepteurs de type "calcium-sensing".
- Les récepteurs des phéromones.

* D'après Botto, 2003.

peptides, des glycoprotéines, des protéases, ainsi qu'à des stimuli sensoriels tels ceux associés aux goûts, aux odeurs et à la lumière.

L'analyse du génome humain dénombre environ 600 gènes codant pour de tels récepteurs sans compter les 350 gènes de récepteurs olfactifs (Okazaki *et al.*, 2002). La première séquence complète connue de RCPG fut celle de la rhodopsine bovine (Ovchinnikov, 1982; Nathans & Hogness, 1983). Dès le début des années 80, on constate que ces récepteurs partagent des similitudes structurales avec la rhodopsine, le trait commun principal étant la présence de 7 régions hydrophobes présumément logées dans la membrane cytoplasmique. Ces segments contiennent de 21 à 26 acides aminés disposés en hélices α reliées l'une à l'autre par une série de 6 boucles dont 3 sont extracellulaires tandis que les autres se déploient dans le cytosol (**Fig. 4**). Les 7 hélices sont agencées autour d'un centre formant une pochette à l'intérieur de la membrane cellulaire où s'effectue la liaison du ligand qui entraîne l'activation du récepteur. Les domaines du récepteur, situés dans la partie amino-terminale et carboxy-terminale de la troisième boucle intracellulaire, jouent un rôle majeur auprès de la protéine G. De même, le motif DRY, situé en N-terminal de la deuxième boucle cytoplasmique à la limite du segment transmembranaire III, est reconnu pour participer à la liaison du récepteur à la protéine G ainsi qu'à son internalisation dans la cellule (**Fig. 4**) (Arora *et al.*, 1997).





2.3 La protéine G

Lorsque le ligand se lie à son récepteur, il induit chez celui-ci un changement de conformation. Le récepteur activé active à son tour une protéine associée à la face cytoplasmique de la membrane appelée protéine G. Cette protéine se place comme un intermédiaire entre le récepteur et l'effecteur et joue un rôle clé dans le choix de la voie de transduction empruntée lors de l'activation du récepteur par sa molécule-message. Il existe en effet de nombreux isoformes de la protéine G, chacun agissant sur un effecteur spécifique, le type d'action exercée pouvant être stimulatrice ou inhibitrice. Les 3 sous-unités de la protéine G sont appelées $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. La sous-unité $G\alpha$, qui possède un site nucléotidique, lie le GDP. Dans cet état, $G\alpha$ -GDP forme un complexe stable avec le dimère $G\beta$ - $G\gamma$ (**Fig. 4**). Lorsque les domaines intracellulaires du récepteur activé entrent en contact avec l'hétérotrimère, le GDP est remplacé par le GTP et les sous-unités $G\alpha$ -GTP et $G\beta$ - $G\gamma$ perdent l'affinité qu'elles avaient l'une pour l'autre. Dissociées l'une de l'autre, $G\alpha$ et $G\beta$ - $G\gamma$ sont maintenant capables d'exercer leur rôle auprès de l'effecteur (**Fig. 4**). La spécificité de la protéine G pour l'effecteur a été longtemps attribuée à la sous-unité $G\alpha$. Logothesis *et al.* (1987) furent les premiers à faire la preuve du contraire en montrant le rôle modulateur joué par la sous-unité $G\beta$ - $G\gamma$ auprès des canaux potassiques activés par l'acétylcholine. On admet aujourd'hui que le complexe $G\beta$ - $G\gamma$ est aussi apte que $G\alpha$ à réguler l'effecteur. Nous connaissons actuellement 23 $G\alpha$, 6 $G\beta$ et 12 $G\gamma$. En théorie, 1 440 combinaisons trimériques offrent autant d'options de voies de transduction (Gudermann *et al.* 1996; Clapham & Neer 1997). La diversité touche non seulement les récepteurs et les protéines G

mais aussi les effecteurs. Par exemple pour l'adényl-cyclase, il existe 7 isoformes distincts, tous pouvant être stimulés ou inhibés par des protéines G. De même, la phospholipase C possède plusieurs isoformes impliqués dans une variété de voies intracellulaires (Morris & Scarlata, 1997). Il n'est pas rare de voir une même protéine G activer deux voies de transduction différentes. Cette absence de fidélité, qui est aussi observée chez le récepteur vis-à-vis la protéine G, assure la diversité du signal.

Aucune protéine G n'a été clonée jusqu'à présent chez les coelentérés. Cependant, on sait que les cnidaires expriment des homologues fonctionnels de protéine G hétérotrimérique de mammifères (New *et al.*, 1998). Les produits résultant de l'activation de voies de transduction classiques passant par l'activation de protéines G ont été mesurés, à la hausse comme à la baisse, chez les cnidaires (Awad & Anctil, 1993b; Anctil *et al.*, 1991; Venturini *et al.*, 1984).

2.4 Les voies de transduction empruntées par les récepteurs

Les enzymes responsables de la formation des seconds messagers associés aux récepteurs RCPG sont principalement l'adényl-cyclase (AC) et la phospholipase C (PLC) (Gudermann *et al.*, 1996). L'adényl-cyclase est une protéine membranaire qui utilise l'adénosine triphosphate (ATP) comme substrat pour produire le second messager adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Le site catalytique de cette enzyme est situé vers la face cytoplasmique de la membrane. L'AMPC générée par ce site est libérée dans le cytosol et active des protéines kinases intracellulaires qui, à leur tour, phosphorylent une

variété de substrats protéiques. L'effecteur PLC est une enzyme soluble qui utilise les substrats membranaires du phospho-inositol. Le phospholipide hydrolysé produit le diacylglycérol (DAG), nécessaire à l'activation de la protéine kinase C (PKC), et l'inositol triphosphate (IP₃) qui joue un rôle important dans la libération du calcium intracellulaire (Landry & Gies, 1993). La Figure 4 illustre les deux voies de transduction principales activées par un récepteur hypothétique qui, dans un cas, agit *via* la PLC et, dans l'autre, *via* l'adényl-cyclase. Toutefois, au cours des dernières années, la vision classique des modes de transduction cellulaire associés aux RCPG s'est vue dramatiquement modifiée. En fait, la liaison de l'agoniste déclenche de multiples interactions entre le récepteur et diverses protéines du cytosol comme les arrestines, les petites protéines G, les GRK (kinases des RCPG), les récepteurs tyrosine kinases et certains domaines spécifiques de protéines (SH, PTZ). Ces interactions protéiques qui impliquent des RCPG se réalisent sans nécessairement faire entrer en jeu la protéine G (revue de Morris & Malbon, 1999 et de Hall *et al.*, 1999).

2.5 La régulation du récepteur

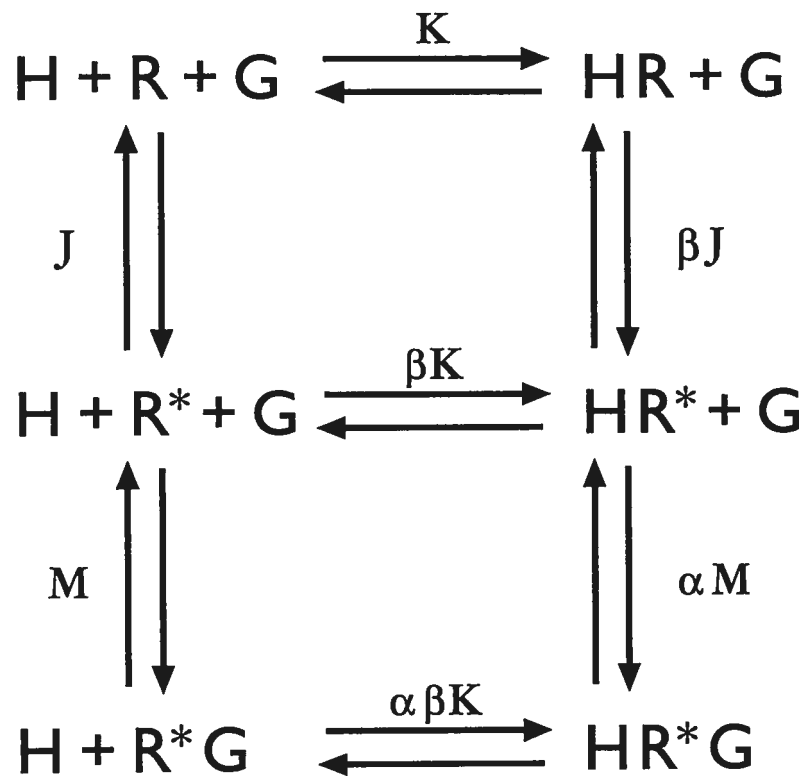
L'activation du récepteur par le ligand qui mène à la production des seconds messagers, AMPc ou IP₃, est très tôt suivie des mécanismes de rétrocontrôle négatif qui modulent l'intensité et la durée de la réaction. La première étape de cette régulation consiste en la palmitoylation d'une cystéine de la queue cytosolique (revue par Jin *et al.*, 2000). La plupart des RCPG possèdent cette cystéine qui devient palmitoylée lorsque le récepteur est soumis à une activation continue. Cette modification post-traductionnelle favorise l'accès

de la queue cytosolique aux kinases régulatrices en formant une quatrième boucle intracellulaire. La phosphorylation du récepteur l'engage dans la voie de la désensibilisation (Roth *et al.*, 1998). Cette dernière consiste à diminuer graduellement la réactivité du récepteur à un stimulus au cours du temps alors que l'on maintient le stimulus à un même niveau d'intensité (Gagnon *et al.*, 1998; Benovic *et al.*, 1987). Les sites de phosphorylation choisis par la plupart des kinases sont les groupes hydroxyl des sérines, des thréonines et des tyrosines. Les études de mutagenèse dirigée révèlent que la phosphorylation impliquée dans les processus de découplage se fait préférentiellement sur la troisième boucle intracellulaire et sur la queue carboxy-terminale du récepteur.

2.6 L'activation constitutive des récepteurs

Les concepts de la pharmacologie classique prédisent qu'un récepteur, à moins d'être stimulé par un agoniste, montre peu ou pas d'activité intrinsèque. Le récepteur au repos (R) et le récepteur activé (R*) décrivent les deux états structuraux principaux du récepteur. Le modèle du complexe ternaire propose, qu'à l'équilibre, la transition allostérique fait passer la protéine réversiblement de l'un à l'autre des états. Lorsque le ligand lie le récepteur, l'équilibre est déplacé vers la forme active du récepteur (**Fig. 5**). La forme R* est le seul état capable d'interagir efficacement avec la protéine G (Lefkowitz *et al.*, 1993). Il existe cependant des cas particuliers de récepteurs qui possèdent une activité intrinsèque importante. Cette activité spontanée, rapportée pour plusieurs récepteurs mutés, est la cause de nombreuses maladies génétiques telles que la cécité nocturne congénitale, la puberté





$$\text{J} = \frac{[\text{R}^*]}{[\text{R}]}$$

$$\text{K} = \frac{[\text{HR}]}{[\text{H}][\text{R}]}$$

$$\text{M} = \frac{[\text{R}^*\text{G}]}{[\text{R}^*][\text{G}]}$$

$$\alpha = \frac{[\text{HR}^*\text{G}][\text{R}^*]}{[\text{HR}^*][\text{R}^*\text{G}]}$$

$$\beta = \frac{[\text{HR}^*][\text{R}]}{[\text{HR}][\text{R}^*]}$$

précoce familiale chez le garçon et l'adénome thyroïdien (Parma *et al.*, 1993; Shenker *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1994). Elle est aussi associée à la formation de tumeurs oncogéniques comme, par exemple, le sarcome de Kaposi causé par le virus de l'herpès. Ce virus code pour un homologue humain de RCPG. L'activité constitutive de ce récepteur viral induit chez l'hôte la formation de tumeurs (Arvanitakis *et al.*, 1998). Des récepteurs non mutés, recombinants ou non, font l'objet d'étude justement pour cette propriété d'activité spontanée qu'ils manifestent *in vivo*. L'existence d'une telle activité chez l'animal mène à réfléchir sur sa signification biologique. Selon le modèle du complexe tertiaire révisé, le récepteur constitutivement actif a l'habileté d'atteindre une conformation active (R*) stable. En fait, on observe que ce récepteur ayant adopté la conformation R* présente une affinité accrue envers son ligand (Kikkawa *et al.*, 1997; Kozell & Neve, 1997). Il est suggéré que l'existence de sous-types de récepteurs, dont certains sont capables d'activité constitutive, n'est qu'un moyen d'offrir à l'organisme vivant des paliers de régulation différents pour un même ligand (Lefkowitz *et al.*, 1993). D'ailleurs, la nature a mis au point des mécanismes de modification post-transcriptionnelle comme l'édition d'ARN pour le récepteur 5-HT_{2C} (Niswender *et al.*, 1999) et l'épissage alternatif pour le récepteur EP₃ aux prostaglandines (Hasegawa *et al.*, 1996) qui sont dédiés à la fabrication d'isoformes à activités constitutives variables qui assurent ainsi des niveaux de régulation variés.

2.7 Les méthodes utilisées pour isoler et identifier les récepteurs de *Renilla*

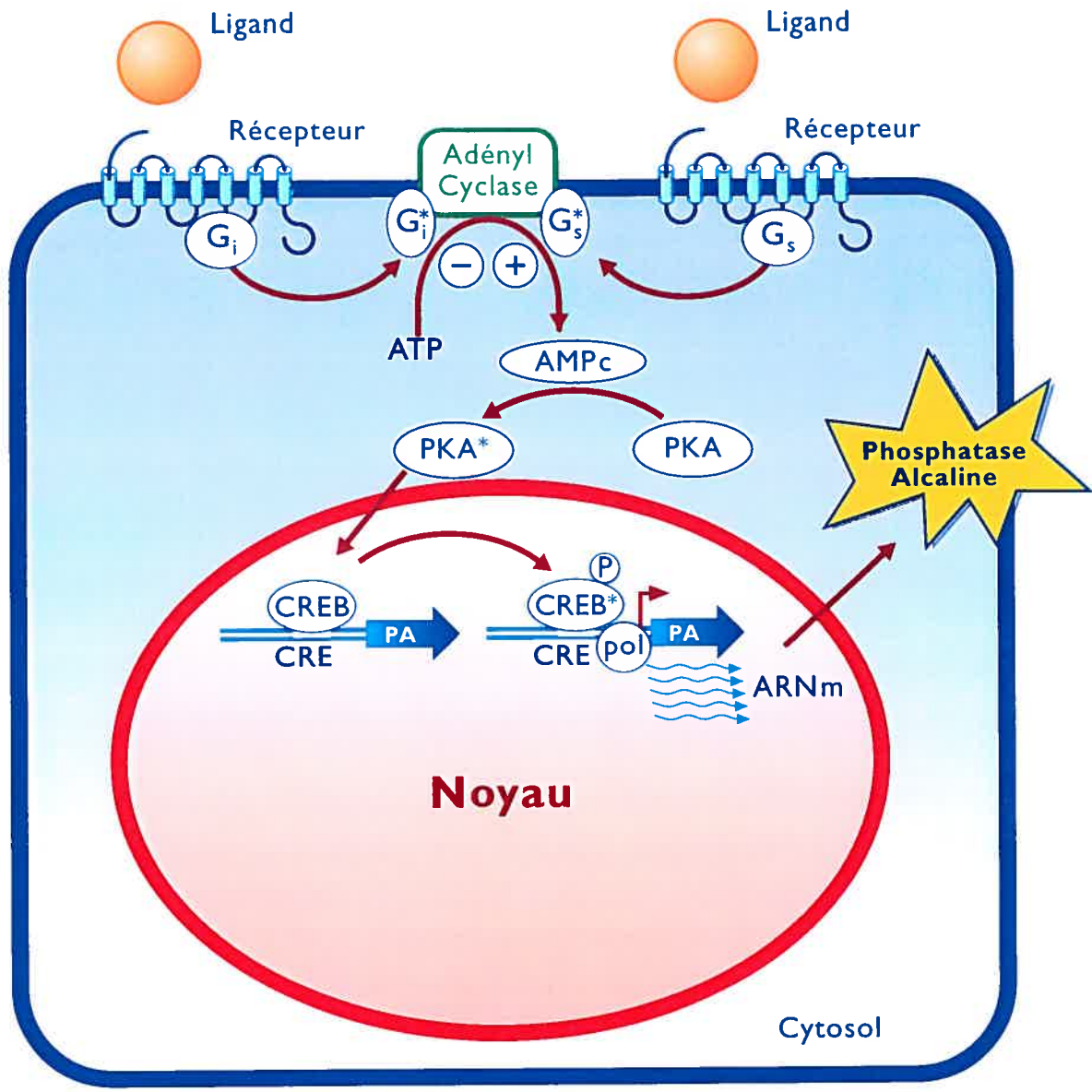
Parmi les techniques utilisées pour découvrir de nouveaux récepteurs nous retrouvons le criblage par homologie et l'amplification par PCR. La première technique consiste à utiliser un récepteur ou un fragment de récepteur comme sonde et hybrider à faible stringence une banque de gènes ou d'ADNc. La seconde méthode utilise des oligonucléotides dégénérés comme amorces qui sont homologues au gène recherché. Des amplifications par PCR à l'aide de ces amorces sur des populations d'ADNc permettent d'obtenir des produits correspondant à de nouveaux récepteurs. Aujourd'hui, avec l'avènement du séquençage du génome d'organismes entiers, les séquences de récepteurs sont facilement obtenues par voie virtuelle puis amplifiées par PCR à l'aide d'amorces spécifiques.

L'analyse de la structure primaire du nouveau récepteur est le point de départ pour évaluer la famille à laquelle il appartient. De nombreux programmes et bases de données sont disponibles sur les réseaux informatiques pour comparer une séquence inconnue à celles déjà publiées. Une similarité de séquence de 20% est considérée comme étant suffisante pour suspecter l'existence d'un lien de parenté entre la séquence inconnue et celles sélectionnées par le programme. À partir de cette information, l'ADNc du récepteur est cloné. Le récepteur est ensuite exprimé dans des cellules, le plus souvent celles de mammifères, et des essais fonctionnels de signalisation et/ou de liaison sont réalisés. Pour qu'un récepteur puisse répondre à un ligand d'une manière spécifique, des critères d'affinité,

de saturabilité et de réversibilité sont imposés. Malgré tout, plusieurs ligands peuvent lier un même récepteur avec de bonnes affinités sans pour autant être des molécules bioactives. C'est pourquoi il est parfois préférable, du moins à l'étape de caractérisation initiale, de déterminer l'identité d'un nouveau récepteur en jugeant de sa voie de transduction plutôt que d'utiliser des méthodes de radioliation (Civelli, 1998). Étant donné que la plupart des RCPG modulent la voie du calcium ou celle de l'AMPc, l'action des drogues sur un nouveau récepteur est abordée par l'une ou l'autre de ces voies. Cependant, le dosage des messagers intracellulaires implique des méthodes coûteuses et laborieuses lorsque l'on utilise un grand nombre de drogues.

Afin de faciliter le criblage pharmacologique d'un récepteur, des essais ont été développés. Ces essais reposent sur une lignée cellulaire qui a été modifiée de telle sorte qu'elle puisse produire un indicateur tangible lorsque les récepteurs qu'elle exprime sont activés. Ces cellules peuvent répondre aux variations de quantité de messagers intracellulaires par le biais de l'activation de séquences régulatrices d'ADN capables de réguler transcriptionnellement des gènes rapporteurs (Stratowa *et al.*, 1995). Une des séquences régulatrices utilisée pour ces essais est l'élément de réponse à l'AMPc (CRE: Cyclic AMP Response Element) que l'on couple à un gène rapporteur, par exemple le gène codant pour la phosphatase alcaline (**Fig. 6**) (Durocher *et al.*, 2000). Le fonctionnement de l'essai CRE-SEAP (Cyclic AMP Response Element-SEcreted Alkaline Phosphatase) est le suivant: lorsque le niveau de l'AMPc augmente dans la cellule à la suite de l'activation du récepteur par l'agoniste, la PKA (Protéine Kinase A) est phosphorylée et phosphoryle à son tour la protéine CREB (Cyclic AMP Response Element Binding protein). L'activation de





l'élément CRE par la protéine CREB déclenche la transcription du gène rapporteur, comme par exemple la forme sécrétée de la phosphatase alcaline du placenta humain. La phosphatase alcaline, libérée dans le milieu extracellulaire, peut ensuite être dosée par ELISA. En plus de suivre l'activation de récepteurs couplés à $G\alpha_s$ ou $G\alpha_i$, l'essai CRE-SEAP répond aussi à l'activation des récepteurs couplés à $G\alpha_q$. L'activation de la voie intracellulaire du Ca^{2+} qui déclenche la transcription du gène rapporteur n'est cependant pas bien comprise (Durocher *et al.*, 2000). On sait qu'une calciprotéine, la calmoduline, phosphoryle et active CREB (Sun *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 2002) mais l'équipe de Durocher (2000) a observé que l'activité CRE-SEAP est indépendante du calcium. Il est possible que la PKC soit responsable de l'activation de CREB (Solomou *et al.*, 2001).

Une fois que le récepteur est caractérisé, son rôle physiologique doit être déterminé. On cherche alors à connaître le lieu d'expression du récepteur par des expériences d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ* puis on explore son rôle physiologique par l'application *in vivo* des ligands appropriés aux endroits propices (Civelli, 1998; Shaw et Wilkinson, 1994).

Objectif de la thèse

Le premier objectif de cette thèse était d'isoler par clonage moléculaire le récepteur de type β 2-adrénérique de la rénille et/ou, le cas échéant, tout autre récepteur aminergique appartenant à la rénille. Étant donné que le récepteur est présent dans les autozoïdes, une banque d'ADNc de ces polypes fut constituée dans le phage λ ZAPII. Cette banque servit en partie de gabarit lors des amplifications PCR. Des oligonucléotides dégénérés déduits à partir des régions les mieux conservées des récepteurs aminergiques furent employées pour amplifier par PCR un premier fragment homologue à la famille des récepteurs recherchés. Des oligonucléotides spécifiques utilisés lors des RACEs (rapid amplification of cDNA end) 5' et 3' furent utilisés pour générer le reste de la séquence. L'analyse *in silico* de la séquence servit à déterminer l'identité probable du ou des nouveaux récepteurs.

Le second objectif de la thèse fut d'exprimer le ou les récepteurs dans des cellules de mammifère. Puisque c'est la première fois que des récepteurs de ce type sont clonés chez un cnidaire, il fallut s'assurer de la qualité de leur expression par immunocytologie et par buvardage Western. Afin de trouver le ligand des nouveaux récepteurs nous avons effectué un criblage pharmacologique à l'aide d'une lignée cellulaire transformée avec un gène rapporteur CRE-SEAP. Ce système est activé lorsque les niveaux d'AMPc ou de Ca^{2+} intracellulaire changent. Toute réponse produite par les cellules transfectées à la suite d'une exposition à des drogues fut examinée à nouveau par dosage radiologique ou enzymatique de l'AMPc intracellulaire ainsi que par la lecture de la fluorescence induite par la libération du

calcium. Etant donné que le récepteur Ren1 présente une activité spontanée importante en l'absence de ligand lors des essais CRE-SEAP, nous avons déterminé la voie de transduction utilisée par le récepteur et avons effectué divers tests pour vérifier l'authenticité de l'activité constitutive.

Comme dernier objectif, nous avons tenté de visualiser la répartition histologique des transcrits des récepteurs. Pour ce, nous avons utilisé la technique d'hybridation *in situ*. Une amplification RT-PCR (RT: transcription réverse) préalable à l'hybridation fut faite sur les sections de l'animal. La conversion des messagers en ADNc présente l'avantage d'amplifier la quantité de gabarit spécifique et ainsi s'assurer d'obtenir un signal d'hybridation robuste. La sonde d'ARN marquée au [P³³] correspondait à la troisième boucle intracellulaire ou à la région C-terminale des récepteurs de rénille, deux domaines peu conservés chez les RCPGs. Le marquage d'hybridation a été révélé par une émulsion photographique.

Chapitre 3

Étude Expérimentale: Article I

**Un nouveau récepteur couplé à la protéine G chez un
métazoaire primitif est homologue aux récepteurs
aminergique des vertébrés et présente une activité
constitutive lorsque exprimé dans les cellules de
mammifère.**

Ce manuscrit a été publié par Journal of Neurochemistry

en septembre 2003, volume 86, pp. 1149-1161

Toutes les expériences présentées dans le cadre de ce travail ainsi que l'écriture de cet article sont le travail de la première auteure, les autres auteurs ont agi à titre de conseillers.

**A New G Protein-Coupled Receptor from a Primitive Metazoan Shows
Homology with Vertebrate Aminergic Receptors and Displays
Constitutive Activity in Mammalian Cells**

Christelle Bouchard^{ac}, Paula Ribeiro^b, François Dubé^c, Michel Anctil^a

^a Département de sciences biologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec,
Canada H3C 3J7

^b Institute of Parasitology, McGill University, Sainte-Anne-de-Bellevue, Québec,
Canada H9X 3V9

^c Département d'obstétrique-gynécologie, Université de Montréal and Centre de
recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Hôpital Saint-
Luc, Montréal, Québec, Canada, H2X 1P1

Abstract

Biogenic amine receptors mediate wide-ranging hormonal and modulatory functions in vertebrates, but are largely unknown in primitive invertebrates. In a representative of the most basal multicellular animals possessing a nervous system, the cnidarian *Renilla koellikeri*, aminergic-like receptors were previously characterized pharmacologically and found to engender control of the animal's bioluminescent and peristaltic reactions.

Using degenerate oligonucleotides in a RT-PCR strategy, we obtained a full-length cDNA encoding a polypeptide with typical G protein-coupled receptor (GPCR) characteristics and which displayed significant degree of sequence similarity (up to 45%) to biogenic amine receptors, particularly dopamine and adrenergic receptors. The new receptor, named Ren1, did not resemble any one specific type of amine GPCR and thus could not be identified on the basis of sequence. Ren1 was expressed transiently and stably in cultured mammalian cells, as demonstrated by immunocytochemistry and Western blotting. Functional analysis of transfected HEK293, LTK- and COS-7 cells, based on both cAMP and Ca²⁺ signaling assays, revealed that Ren1 was not activated by any of the known biogenic amines tested and several related metabolites. The results indicated, however, that cells stably expressing Ren1 contained, on average, an 11-fold higher level of cAMP than the controls, in the absence of agonist stimulation. The high basal cAMP levels were shown to be specific for Ren1 and to vary proportionally with the level of Ren1 expressed in the transfected cells. Taken together, the data suggested that Ren1 was

expressed as a constitutively active receptor. Its identification provides a basis for examination of the early evolutionary emergence of GPCRs and their functional properties.

Key words: Cnidaria, cloning, G protein-coupled receptor, orphan receptor, constitutive activity, monoamines

Abbreviations used: GPCR, G protein-coupled receptor; RACE, rapid amplification of cDNA ends; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; HEK, human embryonic kidney; CRE-SEAP, Cyclic AMP response element-secreted alkaline phosphatase; L-5-HTP, 5-hydroxy-L-tryptophan; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; HMMA, DL-4-hydroxy-3-methoxymandelic acid; 5-HIAA, 5-hydroxyindole-3-acetic acid; antho-RFamide, pGlu-Gly-Arg-Phe amide; IBMX, 3-isobutyl-1-methyl xanthine.

Running title: Cloning of a cnidarian G protein-coupled receptor

Introduction

Cnidarians belong to the ancestral animal subkingdom Radiata (Cavalier-Smith 1998). These include jellyfish, sea anemones, hydras and corals such as the sea pansy *Renilla koellikeri* (Anthozoa, Pennatulacea). With the advent of cnidarians, new functions emerged, notably neuronal communication. Members of this phylum produce a variety of putative hormones and neurotransmitters (Anctil and Minh 1997; Grimmelikhuijzen and Westfall 1995; Carlberg 1992; Brinck *et al.* 1989) which are biologically active (Pierobon *et al.* 2001; Hobmayer *et al.* 2000; Chung and Spencer 1991a; Anctil 1987) and are localized within identifiable nerve cells (Westfall *et al.* 2000; Carlberg *et al.* 1989; Carlberg and Rosengren 1985; Wood and Lentz 1964). Among these neuroactive substances, biogenic amines such as catecholamines, serotonin and melatonin have a particularly wide distribution in the tissues of various species of cnidarians (Chung *et al.* 1989; Kolberg and Martin 1988; Venturini *et al.* 1984; Carlberg 1983), including *Renilla* (De Waele *et al.* 1987), and are involved in a variety of behaviours (Umbriaco *et al.* 1990; Kass-Simon and Passano 1978; Lenicque and Feral 1977; Ross 1960). Two particularly important functions, namely bioluminescence and colonial peristaltism, appear to be neurally controlled in *Renilla* via adrenergic-like (Anctil *et al.* 1982) and serotonergic-like (Anctil 1989) systems, respectively.

In vertebrates, the majority of transmembrane signal transductions pathways, in response to biogenic amines, are mediated by G protein-coupled receptors (GPCRs). Members of this superfamily are characterized by the presence of seven transmembrane domains (TM) with an extracellular N-terminus and a cytoplasmic C-

terminus, and a number of highly-conserved residues, particularly within the TM regions (Van Rhee and Jacobson 1996). Very little is known about GPCRs in cnidarians. Physiological studies have revealed a dopamine-like receptor in the jellyfish "swimming" motor neurons which was pharmacologically similar to the mammalian D₂ receptor and an adrenergic-like receptor, responding to dopamine, involved in the feeding response of hydra (Chung and Spencer 1991b; Hanai and Kitajima 1984). Radioligand binding studies have identified a serotonin binding site (Hajj-Ali and Anctil 1997) and two additional binding sites pharmacologically akin to β ₁ and β ₂ adrenoceptors in the sea pansy (Awad and Anctil 1993a). *In situ* hybridization performed with human β ₂-adrenergic probes localized putative β ₂-like adrenergic receptors of *Renilla* in tissue regions associated with bioluminescence (Awad and Anctil 1994), an activity previously associated with this type of receptor (Anctil *et al.* 1982). Functional studies have demonstrated that the adrenergic sites were positively coupled to adenylate cyclase presumably via a G_s protein (Awad and Anctil 1993b). These studies also showed activation of adenylate cyclase by serotonin and dopamine in all parts of the *Renilla* colony, suggesting the presence of multiple, possibly G_s-coupled biogenic amine receptors in this organism. To date, however, no identifiable biogenic amine GPCR has yet been cloned from cnidarians. Of the two putative GPCR sequences that have been cloned from this group of animals, one showed structural similarity with a peptidergic receptor family (Nothacker and Grimmelikhuijzen 1993) while the other sequence was described as an orphan GPCR, which shared the characteristics of peptidergic, adenosine and aminergic GPCRs, and

thus could not be classified on the basis of sequence (New *et al.* 2000). No cnidarian GPCR cDNA has been expressed *in vitro* and found to be functional.

In the present work, we describe in *Renilla* a novel cDNA that shares strong sequence homology with biogenic amine GPCRs, the first sequence of this type to be identified in cnidarians. Functional expression studies have revealed that the *Renilla* receptor is unresponsive to all major biogenic amines and several derivatives, despite the overall similarity with this receptor family. We report, however, that the expression of the new orphan receptor in mammalian cells is accompanied by spontaneous adenylate cyclase activation, suggesting that Ren1 may be constitutively active.

Materials and methods

Renilla tissue specimens

Colonies of *Renilla koellikeri* Pfeffer supplied by Marinus, Inc. (Long Beach, CA) were kept at 16°C in a 120-L tank of aerated and filtered artificial sea water (ASW, Wards) at pH 7.6-8.0. Unfed specimens were exposed to 12h-12h light-dark cycles. The animals were anesthetized by immersion in 0.37 M MgCl₂:ASW (1:1), and polyps (autozooids) were cut with scissors at the emergence level from the rachis (tissue mass supporting polyps).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a partial Ren1 sequence

Total RNA was isolated from fresh *Renilla* polyps with guanidium thiocyanate (Chomczynski and Sacchin 1987). Reverse transcription was performed with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) on 200 ng of RNA using a modified oligo dT primer (gctaagctagcgcctaagagcggccgcaagc(T)¹⁵) that contained a sequence adaptor for subsequent use in rapid amplification of cDNA ends (RACE) procedures (Frohman *et al.* 1988). The resulting cDNA was subjected to a first PCR with degenerate oligonucleotides targeting the most conserved amino acid sequences found in the TMVI and TMVII of biogenic amine receptors. PCR was performed in a reaction volume of 50 µl containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 2 units of Taq polymerase (Invitrogen) and 200 ng each of primers #1 (sigcittyitiititgytggyticcittytt) and #2 (tciggiiwraaiatigyrtaratiayiggrtt). The PCR cycling protocol consisted of an initial incubation of 3 min at 94°C, followed by 38

cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at 42°C and 2.5 min at 72°C, with a final 20-min incubation at 72°C. The amplification products were verified on 5% acrylamide gel before cloning in PCR2.1 vector (Invitrogen). Inserts in the 100-200 bp size range were sequenced by the dideoxy chain termination method. A clone containing a 181 bp insert was compared with sequence databases at the National Center for Biotechnology using basic local alignment search tool (BLAST) software for protein and nucleotide similarities (Altschul *et al.* 1990) and was found to be homologous with biogenic amine GPCRs from other species. The insert was labeled with digoxigenin (DIG) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and served as a probe to screen for the full length receptor cDNA.

RACE

Renilla total RNA was reverse-transcribed as above, and the resulting cDNA was subjected to PCR amplification with degenerate oligonucleotide #1 and the reverse primer RACE-1A (ctcttagcgctagcttagc), which hybridized to the adaptor sequence. PCR conditions remained the same except for the annealing temperature which was increased to 50°C. Southern blot analysis of the PCR products with the DIG-labeled partial Ren1 fragment described above identified a positive band of approximately 1000 bp, which corresponded to the 3' region of aminergic GPCRs. The remaining 5' end of the receptor was obtained from PCR amplification performed on a *Renilla* cDNA library. The library was previously prepared in Lambda ZapII (Stratagene, LaJolla, CA) from oligo dT reverse-transcribed *Renilla* poly(A) mRNA. An antisense primer #3 (tctccgcatctcttcaaagtctcgcattg), deduced from the 3' region of the receptor

sequence, and a primer T3 (aattaaccctcactaaaggg) that hybridized to the phage arm, allowed the amplification of a fragment of about 1400 bp. The fragment contained 301 bp of a non-coding sequence, followed by a translational start codon, and was thus presumed to represent the 5' end of Ren1, as confirmed by cloning and sequencing of two independent clones.

Stable expression of Ren1 in HEK293 cells

The complete coding region of Ren1 was PCR-amplified directly from oligo dT reverse-transcribed *Renilla* cDNA, using a proofreading polymerase (*pfu* polymerase, Promega, Madison, WI) with primer pairs, #4 (cagcgaattccaatctaataacacagcggagc) and #5 (ccgcgaattcctatcaaagtctcgcacatctga). The receptor cDNA was then cloned into the EcoR1 site of the pBact-c-myc vector, in frame with a stretch of nucleotides coding for a 11-amino acid epitope of human c-myc protein (Cravchik and Matus 1993). The resulting construct and the whole receptor sequence were verified by DNA sequencing. For expression analysis, the epitope-tagged Ren1 receptor was subcloned into the HindIII site of the pcDNAIII vector (Invitrogen) and then transfected into human embryonic kidney HEK293 cells, using FuGENE 6 (Roche Diagnostics). Clonal cell lines were isolated by selection with G418 at a concentration of 600 µg/ml (Biomedica, Drummondville, Québec, Canada) and subsequently tested for Ren1 expression by Western blotting and immunocytochemistry using an antibody against the c-myc epitope. A stably-transfected cell line was selected and then maintained in medium containing 200 µg/ml of G418.

Immunocytochemical fluorescence labeling of epitope-tagged Ren1 receptor in HEK293 cells

Immunocytochemistry was performed on stably- and transiently-transfected HEK293 cells expressing the Ren1 receptor, using the anti-c-myc monoclonal antibody 9E10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and a R-Phycoerythrin-conjugated secondary anti-mouse antibody (Immunotech/Coulter, Marseille, France). The cells were grown on coverslips for 48 h after transfection with the pBact-c-myc-Ren1 or pcDNAIII-c-myc-Ren1 constructs. They were then incubated on ice for 1 h with the monoclonal antibody diluted 1:50 (4 µg/ml) in 0.2 M HEPES prepared in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). The cells were washed 5 times with DMEM-HEPES and fixed for 15 min with a cold solution of 2% paraformaldehyde diluted in PBS-CM (PBS containing 0.1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂). They were washed and blocked for 10 min with 1% BSA in PBS-CM. The secondary antibody diluted 1:500 in the blocking solution was applied on the coverslips and incubated for 30 min at room temperature (21°C). After washing in blocking solution, the coverslips were mounted on glass slides with glycerol-based mounting medium (Sigma). The cells were viewed with a fluorescence microscope (Leitz Diaplan).

Membrane preparation and Western analysis

HEK293 cells stably expressing the receptor were washed twice with ice-cold PBS, detached mechanically, resuspended in buffer containing 5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptin, and sonicated. The lysate was centrifuged at 39000 g for 20 min. The pellet was resuspended in ice-cold

solubilization buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% Na deoxycholate, 1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptin, 1 mM EDTA) with a glass homogenizer, and the suspension was stirred at 4°C for 1 h. Aliquots of a 20000 g supernatant containing 72 ng of solubilized membrane protein were resolved on nonreducing 12% SDS-PAGE (Laemmli 1970), transferred to PVDF membrane (Roche) and blotted with anti-c-myc antibody (2 µg/ml) according to standard protocols. Immunoreactive bands were revealed with a horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse secondary antibody using the ECL system (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) by exposure to x-ray film.

Drugs

(±)Adrenaline, (-)noradrenaline, DL-octopamine, serotonin HCl, melatonin, deoxyepinephrine HCl (epinine), N-acetyl-5-hydroxytryptamine (N-acetylserotonin), 3-hydroxytyramine HCl, 5-hydroxy-L-tryptophan (L-5-HTP), DL-normetanephrine HCl, DL-metanephrine HCl, L-DOPA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), DL-4-hydroxy-3-methoxymandelic acid (HMMA), 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA), tyrosine, DL-aspartic acid, taurine, (-)-propranolol, (-)-isoproterenol HCl, atenolol, pGlu-Gly-Arg-Phe amide acetate salt (antho-RFamide), N-acetylneuraminic acid, forskolin, IBMX (3-isobutyl-1-methyl xanthine) were purchased from Sigma, and dopamine was procured from RBI (Natick, MA).

Cyclic AMP response element-secreted alkaline phosphatase (CRE-SEAP) reporter assay

Full length c-myc-tagged Ren1 cDNA was subcloned into the HindIII site of pCEP4 (Invitrogen) mammalian expression vector, and the resulting construct was confirmed by restriction enzyme analysis. For expression studies, 293CRE-SEAP cells (Durocher *et al.* 2000) were simultaneously seeded in 96-well plates at 40000 cells/well and were transfected with 60 ng/well of the plasmids pCEP4-Ren1 or pCEP4 alone, using FuGENE 6 reagent. The drugs were added 48 h post-transfection into DMEM supplemented with dialysed fetal calf serum (FCS), and the cells were incubated for an additional 6 h in DMEM without phenol red supplemented with 1% dialysed FCS in the absence or presence of 10 μ M forskolin. Aliquots of the cell growth medium were assayed directly for secreted alkaline phosphatase (SEAP) activity, as described previously (Durocher *et al.* 2000).

Cyclic AMP assays

Murine LTK- cells were seeded in 12-well plates (Corning, Inc., Corning, NY) at a density of 100000 cells/well and cultured for 6 h in DMEM supplemented with 10% dialysed FCS. Transfection with FuGENE 6 was then performed with 400 ng of the plasmids pCEP4-Ren1 or pCEP4 alone followed by incubation for an additional 44 h. The medium was removed and replaced by 0.5 ml/well of fresh DMEM containing the agonists in the presence or absence of 10 μ M forskolin and 0.25 mM IBMX. The cells were incubated for 15 min in presence of the drugs, after which they were washed with 1 ml of cold PBS. For studies in which the amount of plasmid was

varied, HEK293 cells were plated at a density of 300000 cells per well in 12-well plates and transfected the same day with 250-1000 ng pCEP4-Ren1, pCEP4 alone or a pCEP4 construct containing the entire coding sequence of the human vasopressin V₂ receptor (kindly provided by Dr. Jürgen Wess, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Thirty-two h later, the medium was changed for a 10% dialysed serum medium containing 0.25 mM IBMX in which cells were grown for an additional 16 h. All cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere under 5% CO₂ in DMEM containing 10% heat-inactivated FCS supplemented with 2 mM L-glutamine. The cells were lysed and cAMP measured by radioimmunoassay with commercial kits (Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, MA) or enzyme-linked immunoassay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) according to the manufacturers' instructions. All experiments were repeated three times with cells from independent transfections.

Ca²⁺ signaling assays

Twenty-five thousand stably-transfected HEK293-Ren1 cells were seeded onto black-walled, clear-base, 96-well plates and cultured overnight. They were subsequently incubated with medium containing the calcium indicator, Fluo-4 (4µM) in the acetylmethyl form (Molecular Probes, Eugene, OR), 0.02% pluronic F-127 (Molecular Probes) and probenecid (2.5 mM) for 60 min at 37°C. The cells were then washed two times and resuspended in Tyrode buffer (NaCl 145 mM, KCl 2.5 mM, HEPES 10 mM, Glucose 10 mM, MgCl₂ 1.2 mM, CaCl₂ 1.5 mM) containing 2.5 mM probenecid. They were placed in a plate fluorometer (FluoStar, BMG

Labtechnologies, Offenburg, Germany) set at $\lambda_{ex}=485$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm, and the gain adjusted to obtain a background reading of about 6000 fluorescence intensity units (FIUs). Test agonists or vehicle were added by means of a built-in injector after 20 sec, and fluorescence was recorded at 0.5-sec intervals for up to 60 sec.

Results

Cloning of Ren1

To isolate Ren1 receptor cDNA, we took advantage of the high degree of sequence conservation that exists in the TM segments TMVI and TMVII of biogenic amine GPCRs. A partial fragment of 181 bp was first obtained by degenerate RT-PCR. The remaining 5' and 3' ends of Ren1 were subsequently amplified by anchored PCR. Sequence analyses revealed a 1035-bp open reading frame encoding 344 amino acid residues with a calculated molecular mass of 39443 Da (Fig. 1). The sequence context surrounding the predicted initiator methionine codon conforms to the consensus translational initiation site typical of cnidarian sequences (Mankad *et al.* 1998). In the 3' end region, a polyadenylation signal followed by a poly(A) sequence is located 780 nucleotides downstream from the stop codon. Hydrophobicity analysis (Tusnady and Simon 2001) of the polypeptide revealed the presence of seven alpha-helical TM segments connected by intra- and extra-cellular loops. Like other members of the G protein-coupled receptor family, the amino-terminal is extracellular, and the carboxy-terminal is predicted to be within the cytosol.

Protein sequence analysis revealed the presence of three potential N-linked glycosylation sites (N⁴, 80, 155), located close to the extracellular amino terminus and on each of the two first extracellular loops (N-X-S/T where X may be any amino acid except P). Consensus sites for protein kinase C (T¹³¹) and cAMP-dependent protein kinase A (S²¹⁰) are present in the second and third intracellular loops, respectively. In addition, we find conserved cysteine residues of the second and third

extracellular loops (C^{90, 168}). These amino acids are predicted to form a disulfide bond which is involved in the maintenance of the receptor's compact structure (Moxham and Malbon 1985). The cysteine residue within the C-terminal tail (C³²⁹) is a putative site for palmitoylation which provides a lipophilic membrane anchor to create a possible fourth intracellular loop (Jin *et al.* 2000). BLAST analysis of the amino acid sequence of the Ren1 receptor identified, amongst the most similar polypeptides, sequences of the biogenic amine GPCR family. The 100 most closely-related sequences were all amine GPCRs, principally dopamine and adrenergic receptors. Sequence conservation was most pronounced in the putative TM regions (Fig. 2). The amino acid similarities in the TM regions of the Ren1 receptor match best with the β 1 *Xenopus* adrenergic receptor (O42574), α 1A *Rattus* adrenergic receptor (P43140) and β 2 pig adrenergic receptor (Q28997) with 45% degree of similarity. Similar scores are obtained with *Aedes* serotonin receptor (AF296125), guinea pig H2 histamine receptor (P47747) and D1A1 *Anguilla* dopamine receptor (U62918). A dendrogram analysis of more than 50 monoamine GPCRs complete amino acid sequences shows that Ren1 is related to amine receptors, but does not cluster exclusively with any one group of receptors (Fig. 3).

Expression of Ren1 in HEK293 cells

The expression of Ren1 in HEK293 cells was first examined in cells transiently transfected with the expression plasmid pBact-c-myc-Ren1. *In situ* immunocytochemical experiments, using an antibody against the N-terminal c-myc epitope, demonstrated strong immunoreactivity, mainly on the surface of non-

permeabilized cells (Fig. 4). This indicated that Ren1-c-myc was expressed at a high level on the cell membrane, and the receptor N-terminal end was located extracellularly, consistent with the known topology of a class I GPCR. Similar results were obtained with the clonal stably-transfected HEK293-Ren1 cell line and cells transiently transfected with the pCEP4-Ren1 vector. No immunoreactivity was observed in control cells transfected with plasmid only or untransfected cells (data not shown). To confirm expression, Western blot analyses were carried out with crude membranes from HEK293 cells stably expressing the c-myc epitope-tagged Ren1 receptor. Immunoblotting with the 9E10 anti-c-myc antibody revealed a predominant protein band of about 50 kDa, a value higher than that predicted from sequence analyses (39, 443 Da) (Fig. 5). The difference is likely due to glycosylation of the receptor, which is known to increase the mass of GPCRs by as much as 25-30% (Barnes 1995). No corresponding band was observed in control membranes of untransfected HEK293 cells.

Receptor signaling assays

Since sequence analysis of the *Renilla* receptor suggests an affiliation with aminergic receptors, natural amines, their precursors and metabolites were principally selected for ligand screening. Because the majority of amine GPCRs signal through changes in cellular cAMP or Ca²⁺, we tested Ren1 first by CRE-SEAP assay, which provides an indirect measure of both cAMP and Ca²⁺-mediated signaling, and is ideally suited for screening large numbers of ligands. Following this initial screen, Ren1 was tested by more direct signalling assays based on the measurement of

cellular cAMP and Ca^{2+} . Assays were performed both with the stably-transfected HEK293-Ren1 cell line and with HEK293 and LTK- cells, each transiently transfected with pCEP4-Ren1. A total of 26 biogenic amines and other related compounds were tested (Fig. 6A) at multiple concentrations (10^{-9} - 10^{-4}) and at least 3 times for neurotransmitter amines. None of the agents tested was able to activate Ren1 in the various cell types (data not shown). Surprisingly, however, the results revealed that the basal level of cAMP in cells expressing Ren1 was consistently higher than that of mock-transfected or untransfected controls, indicating that Ren1 might be spontaneously activated (Fig. 6B). This difference was most pronounced in the stable clonal cell line, where the basal cAMP level was, on average, 11-fold higher (mean \pm S.E. 9.9 ± 3.5 pmol cAMP/mg protein) than that of untransfected HEK293 cells (mean \pm S.E. 0.980 ± 0.401 pmol/mg protein). To a lesser extent, but still statistically significant, transiently-transfected cells exhibited about 7-fold higher levels of cAMP (mean \pm S.E. 207 ± 45.6 pmol cAMP/well) compared to mock-transfected controls (mean \pm S.E. 26.4 ± 6.4 pmol cAMP/well). No comparable elevation of basal cellular Ca^{2+} was observed by Ca^{2+} /Fluo-4 signaling assay, either in the presence or absence of test ligands (data not shown), suggesting that spontaneous Ren1 activity may be associated with the cAMP second messenger pathway.

To explore these observations further, HEK293 cells were transiently transfected with increasing amounts of pCEP4-Ren1 or a control pCEP4- V_2 plasmid that expresses the human vasopressin V_2 receptor. V_2 signals through elevation of cAMP (G_s coupled) (Schoneberg et al. 1997) and is not known to have intrinsic

constitutive activity. A preliminary study in our laboratory confirmed that pCEP4-V₂ expressed a functional G_S-coupled receptor, which was activated by vasopressin and had no ligand-independent activity in HEK293 cells (data not shown). Raising the expression level of V₂ by increasing the amount of pCEP4-V₂ control plasmid in transfected HEK293 cells did not change the basal level of cAMP compared to mock-transfected controls (Fig. 6C). In contrast, elevating the expression level of Ren1 in a parallel experiment resulted in a proportional increment of cAMP, consistent with Ren1 being constitutively activated. The difference between the two receptors, tested under similar conditions, strongly indicates that the increase in cAMP is due to intrinsic Ren1 activity and cannot be explained by nonspecific receptor activation in the heterologous expression system.

Discussion

In this study, we are reporting the cloning of a cDNA encoding a putative aminergic receptor from a colonial cnidarian. The deduced amino acid sequence for the new receptor, named Ren1, shows distinct homology with members of the biogenic amine GPCR family. Highly-conserved residues of the TM segments (Fig. 1) are thought to have a functional role in agonist activation that is common to all GPCRs belonging to the class I family. Among them, the well-conserved asparagine (N³⁵) in TMI and the almost invariable tryptophan (W¹⁴²) of TMIV are both present in the Ren1 receptor. A motif L⁵⁹-X-X-X-D located in the TMII region of the Ren1 receptor is found among most members of the GPCR family (Spence *et al.* 1998). For several monoamine receptors, the aspartate of this motif has been implicated in sodium-sensitivity (Schetz and Sibley, 1999; Horstman *et al.*, 1990). The highly-conserved D¹¹⁴RY motif, residing at the carboxy-terminal region of TMIII (Fraser *et al.* 1988), and the motif N³⁰⁴-P-X-X-Y in TMVII, conserved in 94% of all GPCRs belonging to class I, are also found in Ren1 (Oliveira *et al.* 1999).

The *Renilla* receptor possesses several residues typically encountered among receptors that are activated by amine ligands. One recognized to be involved in the binding of cationic amines is the highly-conserved aspartate (D⁹¹) of TMIII, which may provide a counterion to the amine moiety in the ligand (Wang *et al.* 1993; Ho *et al.* 1992; Gantz *et al.* 1992; Fraser *et al.* 1989; Strader *et al.* 1988). Also important for the proper binding of amine ligands are positions located in the TMV segment occupied by the serine (S¹⁷⁹) threonine (T¹⁸⁰) and alanine (A¹⁸³) of Ren1. These residues are frequently found in corresponding locations among amine receptors but,

in Ren1, they do not strictly match with particular receptor subfamily (Shi and Javitch, 2002). Within TMVI, the consensus sequence F²⁵⁶-X-X-X-W-X-P is conserved among many non peptide receptors. For most amine receptors, this motif is followed by a pair of phenylalanine residues. The second phenylalanine in the motif (F²⁶⁴), conserved in the Ren1 receptor, is unique to catecholamine, serotonin and histamine receptors.

Ren1 is the first putative amine GPCR with such conserved residues to be cloned from a cnidarian. Other previously-cloned cnidarian receptors showed similarity mainly to the peptidergic GPCR family (New *et al.* 2000; Nothacker and Grimmelikhuijzen 1993). As a point of comparison, the orphan sea anemone receptor (New *et al.* 2000) does not have either the well-conserved aspartate found in TMIII or the N-P-X-X-Y motif in TMVII. The presence of these cDNAs in animals considered to be among the most primitive of the metazoans is a strong indication that aminergic-like and peptidergic-like receptors diverged early in evolution, at least before the appearance of cnidarians.

Ren1 was expressed both stably and transiently in HEK293 cells. Because different cell lines may have different repertoires of G proteins, screening was also performed in COS-7 and LTK- cells transiently expressing the receptor. All three cell lines have been used successfully in previous studies of cloned GPCRs, including GPCRs from invertebrates (Hamdan *et al.* 2002; Barbas *et al.* 2002; Hamdan and Ribeiro 1999; Gotzes *et al.* 1994; Olde and McCombie 1997). Thus, these cells were selected for the present study. Initial immunocytochemistry and Western blotting analyses confirmed that Ren1 was expressed and targeted to the cell surface in the

mammalian cell environment. A broad range of potential agonists, including all known biogenic amines, were subsequently tested for their ability to induce Ca^{2+} and cAMP responses, the two predominant second messenger systems of amine GPCRs. In both transiently- and stably-transfected cells, none of the tested ligands was able to induce a significant response. A radioligand binding study using [^3H]dihydroalprenolol and [^3H]CGP12177 was also performed on membranes prepared from LTK- cells transfected with the Ren1 receptor. These β -antagonists allowed, in previous work, the identification of two β -like adrenoceptor sites in *Renilla* tissues (Awad and Anctil, 1993a), but no specific binding was observed in the present study with either ligand (data not shown). The results revealed however, that Ren1-transfected cells exhibited consistently higher cAMP levels than corresponding mock-transfected or untransfected controls. This effect was most pronounced in the stably-transfected HEK293-Ren1 cell line, where basal cAMP was elevated 11-fold on average compared to control values. Additional experiments demonstrated that the levels of cAMP were proportional to the amount of receptor expressed and were specific for Ren1, since the expression of another GPCR (V_2) under similar conditions had no effect on basal cAMP levels (Fig. 6C). Together, these results suggested that Ren1 was expressed in a constitutively-activated state, which was coupled to cAMP, possibly through a G_s protein, and could not be further activated by any of the biogenic amines tested.

Ligand-independent or constitutive receptor activity of GPCRs has been reported for a variety of amine receptors in higher organisms (Pauwels and Wurch 1998). Allosteric models for activation of GPCRs have been proposed to explain this

spontaneous activity (Samama *et al.* 1993). Initially attributed to genetically-engineered GPCRs expressed in heterologous environments, there is now increasing evidence that constitutive receptor activation is a biologically-relevant phenomenon, which has been observed in native tissues (Morisset *et al.* 2000) and may be regulated in the cell (Claeyssen *et al.* 1999; Niswender *et al.* 1999). A recent report of a constitutively-active orphan GPCRs in *Caenorhabditis elegans* (Kudo *et al.* 2000) confirms that the phenomenon is conserved across phylogeny and is present in the lower invertebrates. Although the exact function remains unclear, it has been speculated that constitutive activation plays an important role in modulating basal GPCR activity and, consequently, the magnitude of agonist response *in vivo*. In addition, constitutively-activated GPCRs may be selectively targeted by naturally-occurring inverse agonists, which lower the receptor's basal activity (De Ligt *et al.* 2000) and thereby provide an additional mechanism of fine-tuning agonist responses. We need to determine if the constitutive activity of Ren1 occurs *in vivo* and if it contributes to the biological role of the receptor.

It is unknown, at present, why Ren1 could not be stimulated by any of the amine ligands tested, despite being active in the mammalian cells and having structural characteristics of a biogenic amine GPCR. One possible explanation is the artificial environment in which the receptor was expressed. There are several differences in membrane lipid composition (Schetz *et al.*, 1993) and G proteins (New *et al.*, 1998) between mammalian cells and the native cnidarian environment. These differences could produce a receptor that was unresponsive, or responded poorly to agonist stimulation. The receptor's propensity to spontaneously isomerize into an

active (R*) form might also have contributed to the difficulty in identifying a ligand. A weak agonist response might not have been detected in the present analysis due to the high basal activity of the receptor. Alternatively, Ren1 may recognize a different ligand, possibly a different form of biogenic amine, which was not tested in this survey. Cnidarians, specifically the anthozoan class, have a number of DOPA-derivatives whose functions are unknown. (Brinck *et al.*, 1989; Carlberg and Rosengren, 1985; Carlberg, 1983; Elofsson *et al.*, 1977). Several catechol-like substances, of unknown structure, have been detected in nerve-rich tissue of *Polyorchis* (Chung *et al.*, 1989), in sea anemone tentacle extracts (Carlberg, 1983), sensory cells (Elofsson *et al.*, 1977) and *Renilla* extracts (Ancil, 1990). Since Ren1 does not belong to any specific aminergic GPCR subfamily, it may represent a new type of receptor that responds to one of these unknown amine substances. Further analysis of these compounds may lead to future identification of the endogenous ligand for the *Renilla* receptor.

The discovery of Ren1 strengthens the notion that aminergic signaling is important in cnidarians. It is established that biogenic amines are present in these organisms and are localized within vesicles at interneuronal and neuromuscular synapses (Westfall *et al.*, 2000). In addition, biogenic amines are biologically active and a number of specific amine binding sites, presumed to be amine receptors, have been identified in membrane extracts of *Renilla* and other related organisms. Together, these studies provide compelling evidence that biogenic amines may serve as neuroactive agents in cnidarians. We hope that the cloning of Ren1, the first cnidarian GPCR to share convincing sequence homology with aminergic receptors,

will stimulate new research on the role of amine neurotransmission in this primitive phylum.

In conclusion, a new G protein-coupled receptor from a primitive metazoan was cloned and expressed in mammalian cells. *In silico* analysis strongly suggests that the Ren1 receptor belongs to the aminergic receptor family, with vertebrate catecholamine receptors being the closest homologues. In the absence of a known ligand, it is difficult to speculate about the physiological role of the Ren1 receptor in *Renilla* at present. However, the constitutive activity displayed in mammalian cells strongly indicates that the Ren1 receptor is biologically-active and probably mediates cAMP signaling *in vivo* as well. It remains to be determined if the lack of agonist response is related to the state of activation of the receptor, or if Ren1 is selective for a different as yet unidentified amine ligand, which may be unique to coelenterates.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to Olivier Civelli and particularly to Rainer Reinscheid for performing a preliminary drug-testing study on the Ren1 receptor as well as for their helpful advice. Gilles Houle is also gratefully acknowledged for his excellent graphics work. The editorial assistance of Ovid Da Silva, Rédacteur/réviser, Bureau d'aide à la recherche, Centre de recherche, CHUM, is much appreciated. This study was supported by a team grant from Fond pour la Formation de chercheurs et l'aide à la recherche FCAR-Québec, by Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada CRSNG grants to M. A. and F. D. and by Canadian Institutes of Health Research CIHR grant to P. R.

Figures et Légendes: Article 1

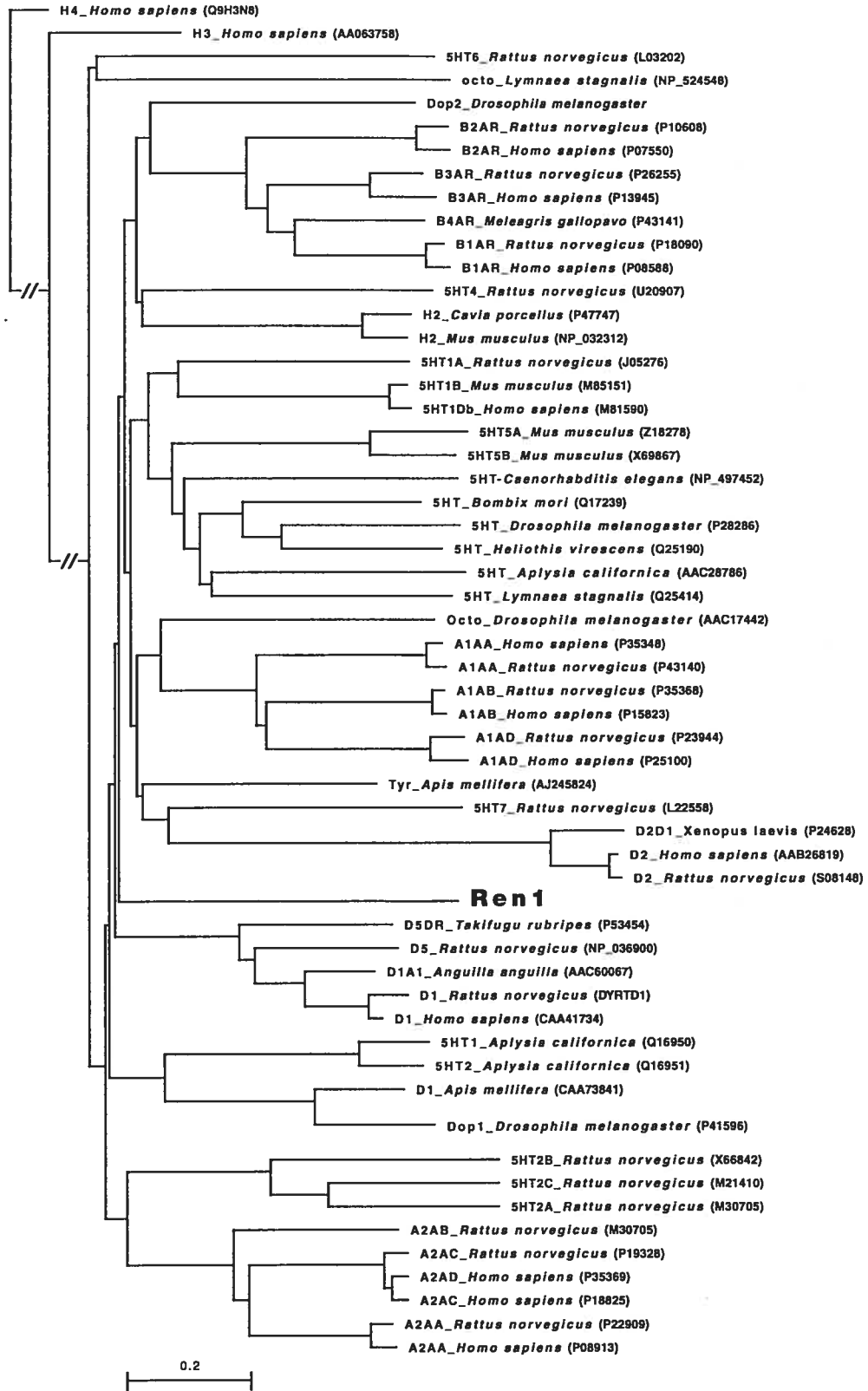


CGCCCGCTCGACATCCCGAAGAGTATAGTCGTGCCTATGAAAGGCAACACCACGCTTGATGGTTAGACT
GCAGATAAGATCATAACTGGACAAGTACTCATATAAATTTATCAAACCTTTCTCAAGACTTATATTATTTAT
TATTATTGCTGTTCTGTTGACTATTACAAGCATTACAAGCATTCTAATTCACCGTTGCCACGAAAGAGAAG
ACCAAAGAACGTACAGATCAAAGACAAGTGAATATACTGCAAGAGTGAGTGAGTGAGTCTGGGGTT
TGCTGGTACAATT

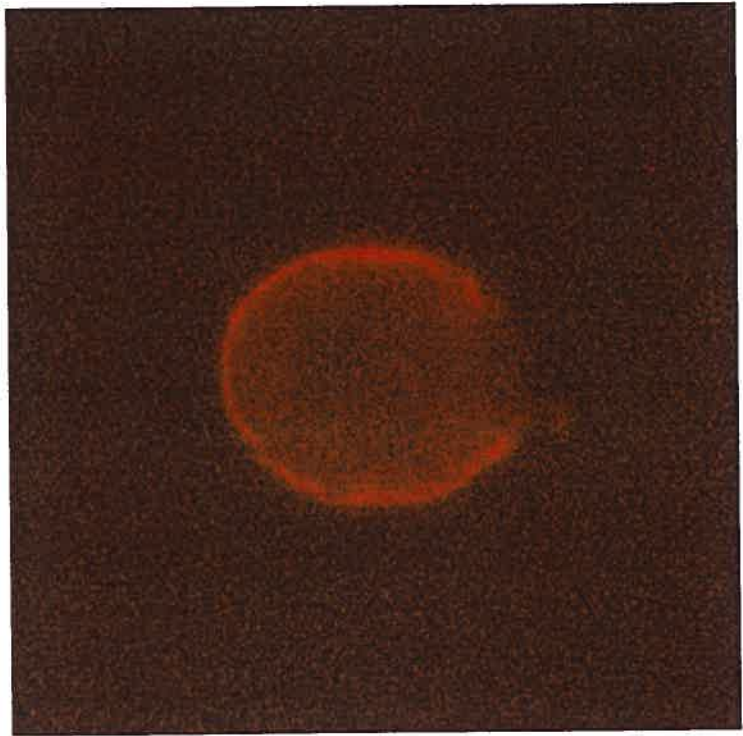
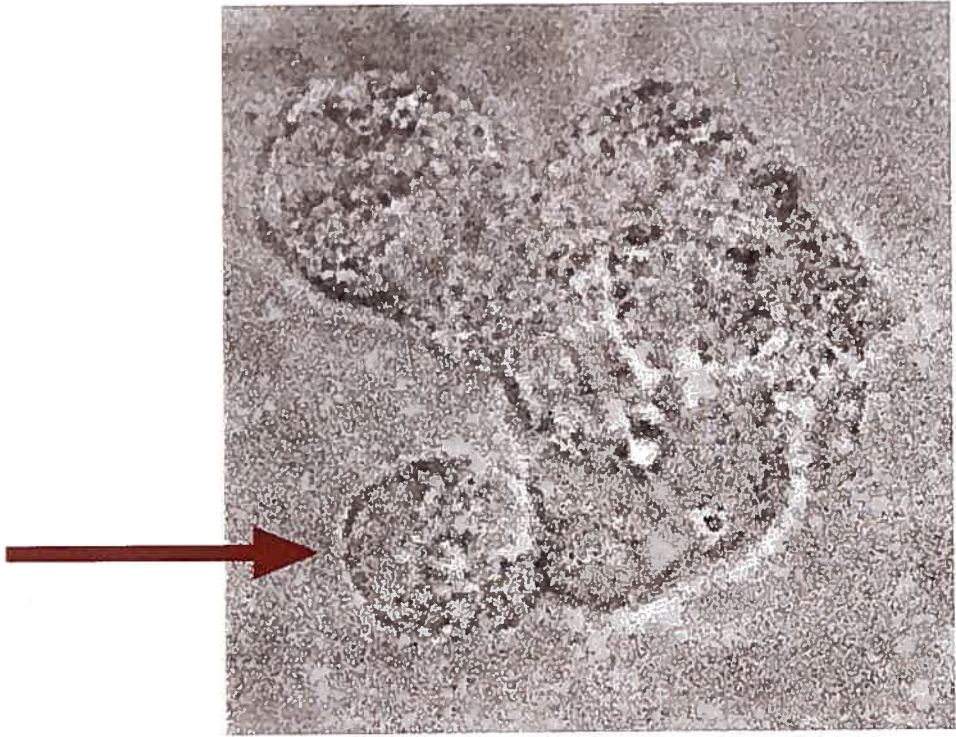
4
1 ATGCAATCTAATAACACAGCGGAGCAGGTCGCTTATAACCATGATTGGGACACGGTTCAT
1 M Q S N N T A E Q V A Y N H D W D T V H
I
61 GCATTATTTCTTCTGCTGGTTATCTTCGTAGCAGTATCTGGTAAACGCATTTCGTGTGTGCA
21 A L F L L L V I F V A V S G N A F V C A
II
121 GCAGTTGCAAGATATCGTCGCTTCAAAGACCTTCCAATTTATTTCTGGTATCATTAGCA
41 A V A R Y R R L Q R P S N Y F L V S L A
III
181 GCCTCGGACATCTTAGTAGCCCTCTTTTCATTGCCATTTTCGTGCCTACTTCGAAATCAAC
61 A S D I L V A L F S L P F R A Y F E I N
IV
241 GCCACTGGCAGCTTGGAAAGCACACATGTCAATTTTGGATTTTGTGATTACTGTGT
81 A T W Q L G K H T C Q F W I F V D L L C
V
301 TCATCTGCGTCAATTGTGAATCTTTCATTGATATCTGTTGATCGCTACATCTCATTGTCT
101 S S A S I V N L S L I S V D R Y I S L S
VI
361 CGGCCACTCAGATATTTGGTGTAAATGACCACACAGCGTTGCCGTTATTGGTATCTTTGCT
121 R P L R Y L V L M T T Q R C R I G I F A
VII
421 GTCTGGTTATTTCTTCCCGTCTCCATATTATCATTACATAATTGGTCTTCTGATGGT
141 V W L F S F T V S I L S L H N W S S D G
VIII
481 ACATTAGAATATGAAGTAATGTGTCGCAAGATCGATAAAGTCTATTACACAGCGTCAACA
161 T L E Y E V M C R K I D K V Y Y T A S T
IX
541 ATCTTGGCTATTTTGATACCACTGACAATGTTGATAGTATTGTATTACCTCGTGTTTAAA
181 I L A I L I P L T M L I V L Y Y L V F K
X
601 ATGGCATTAGAACAACAGAGGAAGATCTCACAGAGTACCACAACCTGGTAATAGTTTTAGT
201 M A L E Q Q R K I S Q S T T T G N S F S
XI
661 CAAGATGGTACAATTAATAACCAAGTCAAACACACCATCACAGACGTAATTTTCTCCGT
221 Q D G T I N N P S Q T H H R R N F L R
XII
721 GTTGAGTTAAAAGCGGCAAAAACCTTTGATCATCGTTGTTGGAACATTTCTGATTTGTTGG
241 V E L K A A K T L I I V V G T F L I C W
XIII
781 CTTCCTCTCTCTGATGATGTTGATATTACAATATTCACCAAAAACACTTCGAAGGTCTA
261 L E L F C M M L I L Q Y S P K H F E G L
XIV
841 CCATTAAGAACACAGACCATCTTGGGAACATTATTCGTCAACACGTTACCATATCTCAAC
281 P L R T Q T I L G T L F V N T L P Y L N
XV
901 AGTGCATTGAACCCGTTCAATTTATACTTATTTCAATTCGATTTTCGCAAAGTTTCAA
301 S A L N P F I Y T Y F N S D F R K V F K
XVI
961 GATACTTTTCTCACGTATTTGACGTGCGCGAAAAATAGAGCCGAAGTGAACACTGAATCA
321 D T F L T Y L T C A K N R A E V N T E S
XVII
1021 GATGCGAGACTTTGA
341 D A R L
XVIII
AGAGATGCGGAGAAAAGAAAGAGCTTTAAATAATCTTAACGTAGCTACTATAGCAGAAATCTTTCCACAACG
AATAAGATCTTGTCAAAACAATGAACACTAATGAAGCTGCCTTAACGAGGCGTAAAAGTCAGAGCAGCAACGT
TCCGCATGCGCGGGGAATATACAATAGAAGAAAAGAAATCTTGCCTAGACTTTCATCGCAACAAAATAGA
AAAGTAACATATGCACCTGGGAGTGAATGTAGATAATAGTATATATAATTCGAAAGAGTAATTCAGTAATAAT
AGTCAAAAATATACACTTGTATAAAGTTTCAGTAAAATAAACCCAGAAATCAATCTACTATGTATAAATGT
AAGTAGAAAAATGAGAAATGAGCTATATGAGCCATAATGTAATAATGATATATTAATGTAGAAAAGTTTA
CCTATAAAAATGTAATAATCTAGGGTTTATGTTGGAATAGAAAACCTTGNTCTTTGACAGTGGTCAAGAAA













HEK 293 - Ren1

HEK 293

120 000 d —
84 000 d —
52 200 d —
36 300 d —
30 200 d —

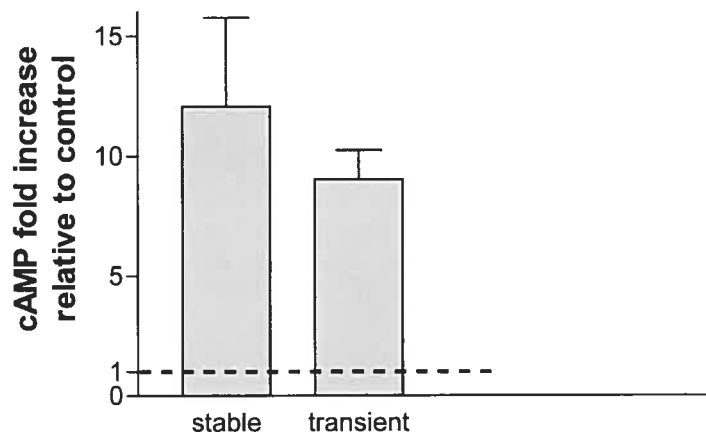




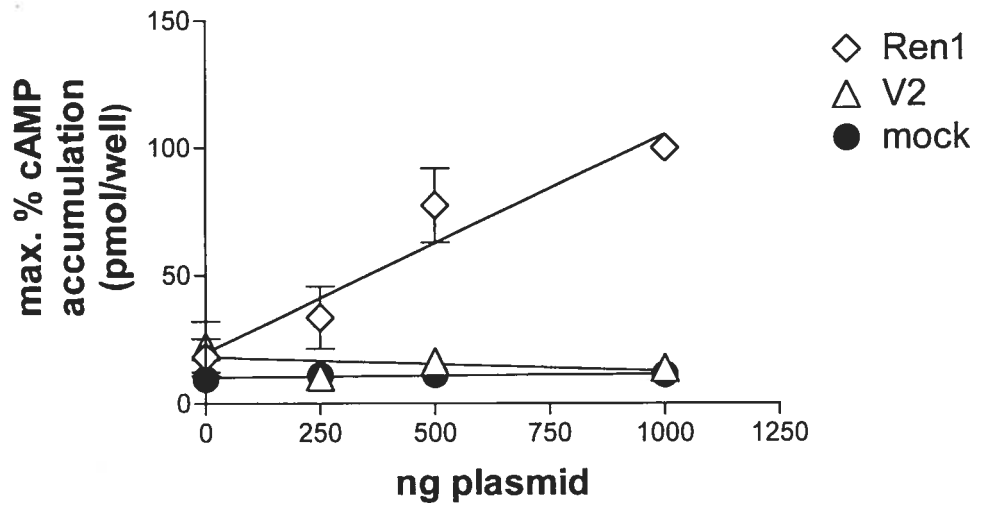
A)

Agents tested:			
Adrenaline	♦♦†	Epinine	♦ Tyrosine
Noradrenaline	♦♦†	N-Acetylserotonin	♦ Aspartic Acid
Dopamine	♦♦†	3-OH-Tyramine	♦ Taurine
Octopamine	♦♦†	5-HTP	♦ Propranolol
Histamine	♦♦†	Normetanephrine	♦ Isoproterenol
Serotonin	♦♦†	Melanephrine	♦ Atenolol
Melatonin	♦♦†	L-DOPA	♦ Antho-RFamide
Tyramine	♦♦†	DOPAC	♦ N-Acetylneuraminic Acid
		HMMA	♦
		5-HIAA	♦

B)



C)



References

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Ancil M. (1987) Bioactivity of FMRFamide and related peptides on a contractile system of the coelenterate *Renilla köllikeri*. *J. Comp. Physiol. [B]* **157**, 31-38.

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

Ancil M. (1990) The antiquity of monoaminergic neurotransmitters: evidence from Cnidaria, in *Evolution of the First Nervous Systems* (Anderson P.A.V., ed), pp. 141-155. Plenum Press, New York.

Ancil M. and Ngo Minh C. (1997) Neuronal and nonneuronal taurine-like immunoreactivity in the sea pansy, *Renilla koellikeri* (Cnidaria, Anthozoa). *Cell Tissue Res.* **288**, 127-134.

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

Awad E. W. and Anctil M. (1993a) Identification of β -like adrenoceptors associated with bioluminescence in the sea pansy *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Biol.* **177**, 181-200.

Awad E. W. and Anctil M. (1993b) Positive coupling of β -like adrenergic receptors with adenylate cyclase in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Biol.* **182**, 131-146.

Awad E. W. and Anctil M. (1994) Distribution of β -adrenergic receptors in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *Cell Tissue Res.* **278**, 207-215.

Barbas D., Zappulla J. P., Angers S., Bouvier M., Castellucci V. F. and DesGroseillers L. (2002) Functional characterization of a novel serotonin receptor (5-HT_{ap2}) expressed in the CNS of *Aplysia californica*. *J. Neurochem.* **80**, 335-345.

Barnes P. J. (1995) Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am. J. Crit. Care Med.* **152**, 838-860.

Blenau W., Erber J., et Baumann A. (1998) Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localization in the brain. *J. Neurochem.* **70**(1):15-23.

Brinck C., Carlberg M. and Elofsson R. (1989) Identification of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in the brain of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana)

and in tentacles of the sea anemone *Metridium senile* (L.) by use of gas chromatography-mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* [C] **92**, 201-203.

Carlberg M. (1983) Evidence of Dopa in the nerves of sea anemones. *J. Neural Transmission.* **57**, 75-84.

Carlberg M. (1992) Localization of dopamine in the freshwater hydrozoan *Hydra attenuata*. *Cell Tissue Res.* **270**, 601-607.

Carlberg M. and Rosengren E. (1985) Biochemical basis for adrenergic neurotransmission in coelenterates. *J. Comp. Physiol.* [B] **155**, 251-255.

Carlberg M., Mons N., Geffard M. and Nässel D. R. (1989) L-DOPA and FMRFamide immunoreactivity in the tentacular nerve plexus of the sea anemone *Metridium senile*. *Comp. Biochem. Physiol.* [C] **94**, 435-440.

Cavalier-Smith T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* **73**, 203-266.

Cavalier-Smith T. (1996) Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origine of the nervous system : 18S rRNA evidence. *Can. J. Zool.* **74**, 2031-2045.

Chomczynski P. and Sacchin A. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Analyt. Biochem.* **162**, 156-159.

Chung J. M., Spencer A. N. et Gahm K. H. (1989) Dopamine in tissues of the hydrozoan jellyfish *Polyorchis penicillatus* as revealed by HPLC and GC/MS. *J. Comp. Physiol.[B]*. **159**, 173-181.

Chung J.-M. and Spencer A. N. (1991a) Dopamine as a neuroactive substance in the jellyfish *Polyorchis Penicillatus*. *J. Exp. Biol.* **156**, 433-451.

Chung J.-M. and Spencer A. N. (1991b) Dopamine acts through a D₂-like receptor on a jellyfish motor neuron. *J. Comp. Physiol. [A]* **169**, 599-606.

Chung J.-M., Spencer A. N. and Gahm K. H. (1989) Dopamine in the tissues of the hydrozoan jellyfish *Polyorchis pennicilatus* as revealed by HPLC and GC/MS. *J. Comp. Physiol. [B]* **159**, 173-181.

Claeyssen S., Sebben M., Becamel C., Bockaert F. and Dumuis A. (1999) Novel brain-specific 5-HT₄ receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain. *Mol. Pharmacol.* **55**, 910-920.

Cravchik A. and Matus A. (1993) A novel strategy for immunological tagging of cDNA constructs. *Gene* **137**, 139-145.

De Ligt R. A. F., Kourounakis A. P. and Ijzerman A. P. (2000) Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1-12.

De Waele J.-P., Anctil M. and Carlberg M. (1987) Biogenic catecholamines in the cnidarian *Renilla köllikeri*: radioenzymatic and chromatographic detection. *Can. J. Zool.* **65**, 2458-2465.

Durocher Y., Perret S., Thibaudeau E., Gaumond M.-H., Kamen A, Stocco R. and Abramovitz M. A. (2000) A reporter gene assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors stably or transiently expressed in HEK293 EBNA cells grown in suspension culture. *Analyt. Biochem.* **284**, 316-326.

Elofsson R., Falck B., Lindvall O. and Myhrberg H. (1977) Evidence for new catecholamines or related amino acids in some invertebrate sensory neurons. *Cell Tissue Res.* **182**, 525-536.

Feng G., Hannan F., Reale V., Hon Y. Y., Kousky C. T., Evans P. D., et Hall L. M. (1996) Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **16**(12), 3925-33.

Fraiser C. M., Chung F.-Z., Wang C.-D and Venter J.C. (1988) Site-directed mutagenesis of human beta-adrenergic receptors: substitution of aspartic acid-130 by

asparagine produces a receptor with high-affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5478-5482.

Fraser C. M., Wang C. D., Robinson D.A., Gocayne J. D. and Venter J. C. (1989) Site-directed mutagenesis of m1 muscarinic acetylcholine receptors: conserved aspartic acids play important roles in receptor function. *Mol. Pharmacol.* **36**, 840-847.

Frohman M.A., Dush M.K. and Martin G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002.

Gantz I., Del Valle J., Wang L. D., Tashiro T., Munzert G., Guo Y. J., Konda Y. and Yamada T. (1992) Molecular basis for the interaction of histamine with the histamine H2 receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 20840-20843.

Gotzes F., Balfanz S. et Baumann A. Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Receptors Channels* **2**, 131-141, 1994.

Grimmelikhuijzen C. J. P. et Westfall J. A. (1995) The nervous systems of cnidarians, in *The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative*

Approach, (Breidbach O. and Kutsch W., eds), pp. 7-24. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

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

Hamdan F. F. and Ribeiro P. (1999) Characterization of a stable form of tryptophan hydroxylase from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **274**, 21746-21754.

Hamdan F. F., Abramovitz M., Mousa A., Xie J., Durocher Y. and Ribeiro P. (2002) A novel *Schistosoma mansoni* G protein-coupled receptor is responsive to histamine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**, 75-86.

Hanai K. and Kitajima M. (1984) Two types of surface amine receptors modulating the feeding response in *Hydra japonica*: the depressing action of dopamine and related amines. *Chemical Senses* **9**, 355-367.

Ho B. Y., Karschin A., Branchek T., Davidson N. and Lester H. A. (1992) The role of conserved aspartate and serine residues in ligand binding and function of the 5-HT_{1A} receptors: a site-directed mutation study. *FEBS Lett.* **312**, 259-262.

Hobmayer B., Rentzsch F., Kuhn K., Happel C. M., Cramer von Laue C., Snyder P., Rothbacher U. and Holstein T.W. (2000) WNT signaling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* **407**, 186-189.

Horstman D. A., Brandon S., Wilson A. L., Guyer C. A., Cragoe E. J., Limbird L.E. (1990) An aspartate conserved among G-protein receptors confers allosteric regulation of alpha 2-adrenergic receptors by sodium. *J. Biol. Chem.* **265** (35): 21590-21595.

Jin H., George S. R., Bouvier M. and O'Dowd B. F. (2000) Palmitoylation of G protein-coupled receptors, in *Regulation of G Protein-Coupled Receptor Function and Expression*, (Benovic J. L., ed), pp. 93-117. Wiley-Liss, Inc., New York.

Kass-Simon G. and Passano L. M. (1978) A neuropharmacological analysis of the pacemakers and conducting tissues of *Hydra attenuata*. *J. Comp. Physiol.* **128**, 71-78.

Kolberg K. J. S. and Martin V. J. (1988) Morphological, cytochemical and neuropharmacological evidence for the presence of catecholamines in hydrozoan planulae. *Development* **103**, 249-258.

Kudo M., Chen T., Nakabayashi K., Yu Hsu S. and Hsueh A. J. W. (2000) The nematode leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor (LGR) protein

homologous to vertebrate gonadotropin and thyrotropin receptors is constitutively activated in mammalian cells. *Mol. Endocrinol.* **14**, 272-284.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lenicque P. M. and Feral J.-P. (1977) Effects of biogenic amines on the regeneration of small pieces of the pedal disc of the sea anemone *Metridium senile* (Linnaeus). *Comp. Biochem. Physiol. C* **57**, 91-93.

Mankad R. V., Gimelbrant A. A and McClintock T. S. (1998) Consensus translational initiation sites of marine invertebrate phyla. *Biol. Bull.* **195**, 251-254.

Morisset S., Rouleau A., Ligneau X., Gbahou F., Tardivel-Lacombe J., Stark H., Schunack W., Ganellin C. R., Scharz J.-C. and Arrang J.-M. (2000) High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* **408**, 860-864.

Moxham C. P. and Malbon C. C. (1985) Fat cell B₁-adrenergic receptor: structural evidence for existence of disulfide bridges essential for ligand binding. *Biochemistry* **24**, 6072-6077.

New D. C., Mc Gaughey N. J., Wong Y. H. and Wong J. T. Y. (1998) Evidence for heterotrimeric G proteins in sea anemones. *Mol. Marine Biol. Biotech.* **7**(1), 31-38.

New D. C., Wong Y. H. and Wong J. T. Y. (2000) Cloning of a novel G-protein-coupled receptor from the sea anemone nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 761-769.

Niswender C. M., Copeland S. C., Herrick-Davis K., Emeson R. B. and Sanders-Bush E. (1999) RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 9472-9478.

Nothacker H.-P. and Grimmelikhuijzen C. J .P. (1993) Molecular cloning of a novel, putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1062-1069.

Olde B. and McCombie R. (1997) Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **8**, 53-62.

Oliveira L., Paiva A. C. M. and Vriend G. (1999) A low resolution model for the interaction of G protein with G protein-coupled receptors. *Protein Engineering* **12**, 1087-1095.

Pauwels P. and Wurch T. (1998) Review: amino acid domains involved in constitutive activation of G-protein-coupled receptors. *Mol. Neurobiol.* **17**, 109-135.

Pierobon P., Minei R., Porcu P., Sogliano C., Tino A., Marino G, Biggio G and Concas A. (2001) Putative glycine receptors in *Hydra*: a biochemical and behavioural study. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1659-1666.

Ross D. M. (1960) The effects of ions and drugs on neuromuscular preparations of sea anemones. *J. Exp. Biol.* **37**, 732-752.

Samama, P., Cotecchia S., Costa T. and Lefkowitz R. (1993) A mutation-induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 4625-4636.

Schetz J. A. and Anderson A. V. (1993) Investigations of lipid components neurone-enriched membranes of the jellyfish *Cyanea capillata*. *J. Exp. Biol.* **177**, 23-39.

Schetz J. A. and Sibley D.R. (1999) Metal-ions as atomic scale probes of G protein-coupled receptor structure in *Structure-function analysis of G protein-coupled receptors*, (Wess J., ed), pp. 121-140. Wiley-Liss, Inc., New York.

Schoneberg T., Yun J., Wenkert D. and Wess J. (1997) Functional rescue of mutant V_2 vasopressin receptors causing nephrogenic diabetes insipidus by a co-expressed receptor polypeptide. *EMBO J.* **15**, 1283-1291.

Shi L. and Javitch J. A. (2002) The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: The transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 437-467.

Spence P., Bard J., Jones P. and Betty M. (1998) The identification of G-protein coupled receptors in sequence databases. *Exp. Opin. Ther. Patents* **8**, 235-247.

Strader C. D., Sigal I. S. and Candelore M. R. (1988) Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in the receptor function. *J. Biol. Chem.* **263**, 10267-10271.

Sugamori K. S., Demchyshyn L. L., McConkey F., Forte M. A. and Niznik H. B. (1995) A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase-linked receptor from *Drosophila melanogaster* displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS Lett.* **362**(2),131-8.

Suo S., Sasagawa N. and Ishiura S. (2002) Identification of a dopamine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Lett.* **319**(1), 13-6.

Suo S., Sasagawa N. and Ishiura S. (2003) Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor. *J. Neurochem.* **86**(4), 869-78.

Tusnady G.E. and Simon I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**, 849-850.

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

Van Rhee A.M. and Jacobson K. A. (1996) Molecular architecture of G protein-coupled receptors. *Drug Development Res.* **37**, 1-38.

Venturini G., Silei O., Palladini G., Carolei A. and Margotta V. (1984) Aminergic neurotransmitters and adenylate cyclase in *Hydra*. *Comp. Biochem. Physiol. C* **78**, 345-348.

Wang C. D., Gallaher T. K. and Shih J. C. (1993) Site-directed mutagenesis of 5-hydroxytryptamine₂ receptor: identification of amino acids necessary for ligand binding and receptor activation. *Mol. Pharmacol.* **43**, 931-940.

Westfall J. A. (1970) The nematocyte complex in a Hydromedusan, *Gonionemus vertens*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **110**, 457-70.

Westfall J. A. (1970) Ultrastructure of synapses in a primitive coelenterate. *J. Ultrastruct. Res.* **32**, 237-46.

Westfall J. A. (1973a) Ultrastructural evidence for a granule-containing sensory-motor-interneuron in *Hydra littoralis*. *J. Ultrastruct. Res.* **42**, 268-82.

Westfall J. A. (1973b) Ultrastructure evidence for neuromuscular systems in coelenterates. *Amer. Zool.* **13**, 237-246.

Westfall J. A. and Kinnamon J. C. (1984) Perioral synaptic connections and their possible role in the feeding behavior of *Hydra*. *Tissue Cell.* **16**, 355-65.

Westfall J. A. and Grimmelikhuijzen C. J. P. (1993) Antho-RFamide immunoreactivity in neuronal synaptic and nonsynaptic vesicles of sea anemones. *Biol. Bull.* **185**, 109-114.

Westfall J. A., Sayyar K. L., Elliott C. F. and Grimmelikhuijzen C. J. P. (1995) Ultrastructural localization of antho-RWamides I and II at neuromuscular synapses in the gastrodermis and oral sphincter muscle of the sea anemone *Calliactis parasitica*. *Biol. Bull.* **189**, 280-287.

Westfall J. A., Elliot S. R., Mohan Kumar P. S. and Carlin R.W. (2000) Immunocytochemical evidence for biogenic amines and immunogold labeling of serotonergic synapses in the tentacles of *Aipasia pallida* (Cnidaria, Antozoa). *Invertebrate Biol.* **119**, 370-378.

Westfall J. A., McCallum J. D. and Carlin R.W. (2001) Neuroglandular synapses in the pharynx of the sea anemone *Aiptasia pallida* (Cnidaria, Anthozoa). *J. Morphol.* **247**, 134-41.

Westfall J. A., Elliott C. F. and Carlin R. W. (2002) Ultrastructural evidence for two-cell and three-cell neural pathways in the tentacle epidermis of the sea anemone *Aiptasia pallida*. *J. Morphol.* **251**, 83-92.

Westfall J. A., Yamataka S. and Enos P. D. (1971) Ultrastructural evidence of polarized synapses in the nerve net of *Hydra*. *J. Cell Biol.* **51**, 318-23.

Wood J. G. and Lentz T. L. (1964) Histochemical localization of amines in *Hydra* and sea anemone. *Nature* **201**, 88-90.

Chapitre 4

Étude Expérimentale Article II

**Identification d'un nouveau récepteur couplé à la protéine
G de type aminergique chez le cnidaire *Renilla koellikeri*.**

Manuscrit soumis à la revue *Gene*.

Toutes les expériences présentées dans le cadre de ce travail ainsi que l'écriture de cet article sont le travail de la première auteure, les autres auteurs ont agi à titre de conseillers.

**Identification of a novel aminergic-like G protein-coupled receptor
in the cnidarian *Renilla koellikeri***

Christelle Bouchard^{ac}, Paula Ribeiro^b, François Dubé^c, Christian Demers^c, Michel Anctil^a

^aDépartement de sciences biologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

^bInstitute of Parasitology, McGill University, Sainte-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada

^cDépartement d'obstétrique-gynécologie, Université de Montréal and Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada

Abstract

Biogenic amines exert various physiological effects in cnidarians, but the receptors involved in these responses are not known. We have cloned a novel G protein-coupled receptor cDNA from the sea pansy *Renilla koellikeri* that shows homology to mammalian catecholamine receptors, and to a lesser extent, to peptidergic receptors. This putative receptor, named Ren2, has a DRC pattern that replaces the well-conserved DRY motif on the cytoplasmic side of the transmembrane III, and lacks the cysteine residues usually found in the second extracellular loop and C-terminus tail. Both the second extracellular loop and the N-terminal tail were seen to be short (6 and 3 amino acids, respectively). Northern blot analysis suggests that the receptor gene codes for 2 transcripts. Localization of these transcripts by *in situ* hybridization demonstrated abundant expression in the epithelium of the pharyngeal wall, the oral disk and tentacles as well as in the endodermal epithelium lining the gastrovascular cavities, indicating a role for Ren2 in feeding.

Abbreviations used: 5-HT, serotonin; DIG, digoxigenin; EL, extracellular loops; aa, amino acid; GPCR, G protein-coupled receptor; IS, *in situ*; PCR, polymerase chain reaction; PF, paraformaldehyde; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; TM, transmembrane

Key-words: Cnidaria, cloning, GPCR, biogenic amines, *in situ* hybridization, evolution

1. Introduction

G protein-coupled receptors (GPCRs) bind ligands present in the extracellular milieu and couple this binding to the activation of intracellular G proteins. These membrane polypeptides are organized into several classes or families according to their sequence homology, identity of crucial residues and motifs that participate in ligand binding, mode of action and pharmacology. The rhodopsin-like family, also named class I or family A receptors, contains aminergic and small peptide receptors, and is among the largest families of GPCRs. All members of this GPCR family have a common topology that consists of 7 transmembrane (TM) domains separated by 3 extracellular and 3 intracellular loops. A number of highly conserved residues, generally found in the TMs, are thought to be required for structural integrity and activation of the receptor within cell membranes (Van Rhee and Jacobson, 1996).

Neuroactive class I GPCRs, particularly aminergic receptors, are widely distributed across phylogeny. In the ancient metazoan phylum Cnidaria, biogenic amines are considered to be involved in several behaviours, such as feeding (Hanai and Kitajima, 1984), muscular contraction (Ross, 1960; Anctil, 1989; Anctil *et al.*, 1991; Tsang *et al.*, 1997), metamorphosis (Edwards *et al.*, 1987; Kolberg and Martin, 1988) and regeneration (Lenicque and Féral, 1977). One of the best studied effector systems is the control of bioluminescence in the sea pansy *Renilla koellikeri* (Pennatulacea) (Anctil *et al.*, 1982; Awad and Anctil, 1993a). Light emission in this animal is neurally controlled via an adrenergic system. Radiobinding studies have revealed the existence of 2 high-affinity, adrenergic-sensitive binding sites in membrane homogenates of *Renilla* (Awad and Anctil, 1993a). Some investigations

have also demonstrated catecholamine-sensitive adenylyl cyclase in *Renilla* tissues (Awad and Anctil, 1993b). Whether the receptors are related to the vertebrate β 1 and β 2 adrenergic subfamily could not be established unequivocally. Identification of cnidarian receptor subtypes based solely on specific affinity for mammalian receptors is problematic due to the considerable evolutionary divergence between cnidarians and mammals.

In addition to adrenergic-like receptors, putative serotonergic (Hajj-Ali and Anctil, 1997) and dopaminergic receptors were characterized in cnidarians (Hanai and Kitajima, 1984; Chung and Spencer, 1991). Though serotonin (5-HT) enhances the amplitude of rhythmic contraction in the rachis of *Renilla* (Anctil, 1989), the action of the serotonergic network on muscular contraction has not been fully elucidated (Umbriaco *et al.*, 1990). Other studies, which have characterized dopamine-like receptors in cnidarians, have not explained how the activation of these receptors elicits a response in these animals (Hanai and Kitajima, 1984; Chung and Spencer, 1991; Carlberg, 1992).

Despite evidence for the presence of aminergic-like receptors in cnidarians, very little is known about their structure at the molecular level. Recently, we reported the cloning and characterization of Ren1, an amine-like receptor that showed constitutive activity when expressed in mammalian cells (Bouchard *et al.*, 2003). This was the first receptor of its kind to be cloned from a cnidarian, and confirmed that aminergic GPCRs appeared early in evolution. Here, we describe a second *Renilla* GPCR, named Ren2, which is also homologous to amine receptors and appears to be

enriched in feeding tentacles, pharyngeal epidermis, and endodermal epithelium lining the gastrovascular cavities.

2. Materials and methods

2.1. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a partial *Ren2* sequence

Colonies of *Renilla koellikeri* Pfeffer supplied by Marinus, Inc. (Long Beach, CA) were maintained in artificial sea water, and polyps were collected as described (Bouchard *et al.*, 2003). Genomic DNA was isolated using cetyltrimethylammonium bromide and subjected to a first PCR with degenerate oligonucleotides targeting sequences found in transmembranes TMVI and TMVII of biogenic amine receptors. PCR was performed in a reaction volume of 50 μ L containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 2 units of Taq polymerase (Invitrogen, Mississauga, Ontario, Canada) and 200 ng each of primer #1 (sigcittyitiititgytggyticcitytt) and #2 (tciggiiwraaiatigyrtaratiayiggrtt). The cycling protocol was as follows: initial incubation of 2 min at 94°C, followed by 40 cycles of 1 min at 94°C, 1.5 min at 40°C, 2.5 min at 72°C, with a final 20-min incubation at 72°C. The amplification product, a band of 175 bp, was cloned in pCR2 vector (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The insert was sequenced and found to be homologous with biogenic amine GPCRs from other species. It was labelled with digoxigenin (DIG) (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) and served as a probe to screen for full-length receptor cDNA.

2.2. Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Total RNA from *Renilla* polyps was reverse-transcribed with a modified oligo dT primer (gctaagctagcgcctaagagcggccgcaagc(T)¹⁵) that contained a sequence adapter for use in RACE procedures (Frohman *et al.*, 1988). The resulting cDNA was subjected to PCR amplification with specific oligonucleotide #3 (tcaagatgttccaccactcaaattcag) and primer RACE-1A

(ctcttagcgctagcttagc), which hybridized to the adapter sequence (refer to Fig. 1 for the positions of all relevant primer sequences). PCR conditions remained the same except for annealing temperature, which was increased to 50°C. Southern blot analysis of the PCR products with the DIG-labelled partial Ren2 fragment described above identified 2 positive bands of approximately 750 and 950 bp. Cloning and sequencing showed that the fragments were identical except for 4 nucleotides in the non-coding region and an additional 200 bp of predicted untranslated sequence at the 3' extremity of the longer species. The coding region of the cDNA sequence was homologous with aminergic GPCRs, as determined by a basic local alignment search tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with sequence databases at the National Center for Biotechnology. The remaining 5' end of the receptor was obtained by PCR amplification performed on a *Renilla* cDNA library. The library was previously prepared in Lambda ZapII (Stratagene, LaJolla, CA) from oligo dT reverse-transcribed *Renilla* polyps mRNA. An antisense primer #4(tccattgcttcttgac), deduced from the 3' region of the receptor sequence, and primer T3 (aattaaccctcactaaaggg) that hybridized to the phage arm, allowed the amplification of a 683-bp fragment. Antisense primer #5 (aggacacagcactgaaaacatctatctac) employed with primer T3, generated, by PCR, 480 bp of a non-coding sequence and the remaining part of the 5' coding region, as determined by the translational start codon. The 5' end of the coding section was confirmed by cloning and sequencing a second internal fragment obtained by PCR with primers #6 (gaatatttcgacagcgac) and T3 (see Fig. 1).

2.3. Northern blot analysis

Total RNA was prepared from the polyps as described above, and poly(A)⁺ RNA was isolated on oligo (dT)-cellulose (Sigma, Mississauga, Ontario, Canada) according to

standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989). Aliquots containing 8 µg/lane poly(A)⁺ RNA were separated on 1% agarose formaldehyde denaturing gel, transferred to a Zeta probe nylon membrane (BioRad, Mississauga, Ontario, Canada) and hybridized with a [³²P]-labelled fragment encompassing nucleotides 619 to 729 of Ren2. The membrane was hybridized at 60°C overnight in 0.25 M Na₂HPO₄, pH 7.2, 1 mM EDTA and 7% SDS. It was then washed twice at room temperature in 0.1 M Na₂HPO₄, pH 7.2, 1 mM EDTA and 5% SDS, and twice at 60°C for 20 min in 0.04 M Na₂HPO₄, pH 7.2, 1 mM EDTA and 5% SDS. The blot was exposed to X-ray film for 1 week at -80°C with an intensifying screen.

2.4. In situ (IS) reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Renilla polyps were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde (PF) in 0.1 M PBS. Eight-µm Paraffin-embedded sections were mounted onto silane-coated slides (Labsscientific, Inc., Livingston, NJ), dewaxed in xylene and rehydrated through a series of ethanol dilutions. The tissue sections were deproteinated with 50 µg/ml proteinase K (Sigma) for 15 min at 37°C, fixed in 4% PF-PBS for 20 min at 4°C, then rinsed once in PBS and twice in DEPC-water (diethyl pyrocarbonate) (Sigma). IS RT-PCR was performed using the OneStep RT-PCR kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada) with 0.6 µM of the following primer pairs: forward primer ggggactagtgaattcgcgactgcttca or reverse primer ggggccatggacaccctgcttctgtgtca. Seventy µl of reagent mix were added to each slide, and the preparation was covered with a glass cover slip sealed with Aquaperm (Lipshaw Immunon, Fisher, Nepean, Ontario, Canada) before starting the thermal reaction in an Hybrid thermal cycler

(Hybaid Ltd, Teddington, Middlesex, UK). Reverse transcription was performed at 50°C for 15 min, with an enzyme inactivation step at 95°C for 15 min. PCR immediately followed by 10 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 55°C, 2 min at 72°C, with a final 10-min incubation at 72°C. Sections were thoroughly washed in PBS, fixed with 4% PF-PBS for 20 min, and acetylated with 0.25% acetic acid in 0.1 M triethanolamine for 10 min. The antisense RNA probe was synthesized from linearized pGEMt-easy plasmids (Promega, Madison, WI) containing nucleotides 778 to 963 from Ren2 cDNA. The construct served as a template to generate [α -P³³]-UTP labelled antisense riboprobes by in vitro run-off transcription with the RNA-labelling kit (Roche) utilizing T7 RNA-polymerase.

2.5. In situ hybridization

The sections were prehybridized in hybridization solution (50 % formamide, 2X SSC, 1X Denhardt solution, 0.25 M Tris-HCl (pH 7.5), 10% dextran sulfate, 0.5% sodium pyrophosphate, 0.5% SDS, 25 μ g/ml denatured salmon sperm DNA, and 250 μ g/ml yeast transfer RNA) at 42°C for 2 h in a humidified chamber. Hybridization was performed at 42°C for 16 h with 150 μ l of hybridization solution per slide containing 1×10^6 cpm of probe. After hybridization, 2 washes in 2X SSC preceded the final wash in 1X SSC at 42°C for 15 min. Autoradiography was undertaken with NBT-2 emulsion (Kodak, New Haven, CT), and the slides were exposed for 4 days at 4°C. They were then developed in D-19 and counterstained with heamatoxylin-eosin. Photographs were obtained with an Olympus microscope (Olympus Corp., Tokyo,

Japan) coupled to a Spot Insight digital camera (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI).

3. Results

The approach taken to sequence the novel *Renilla* receptor, Ren2, was based on degenerate PCR amplification that targeted highly conserved regions of amine GPCRs, followed by RACE to obtain the 5' and 3' ends of the transcript. The open reading frame of Ren2 encodes a protein of 323 amino acids (aa) with a calculated molecular weight of 36,364 Da. cDNA extends through the putative ATG initiator, which is flanked by a predicted translation initiation site (Mankad *et al.*, 1998). At the 3' end, we detected a translation stop codon (TAA) and poly(A)⁺ tail, suggesting that the transcript was full length (Fig. 1).

Consensus N-glycosylation sites occur on the third extracellular loop (N²²⁶) and at position N⁹³, in the TMIII domain, although this latter position is unlikely to be glycosylated. Unlike most GPCRs (Wheatley and Hawtin, 1999), the short N-terminal extracellular end of Ren2 (3 aa) does not carry a consensus glycosylation site. Protein kinase C (T¹⁷⁰, S³⁰⁹) and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation sites (S³¹³) are found in the third intracellular loop and C-terminal tail. Phosphorylation of GPCRs by these kinases has been implicated in receptor desensitization after prolonged exposure to agonists (Ferguson, 2001).

Hydrophobic domains of the deduced aa sequence of Ren2 were identified by version 2 of the HMMTOP program (Tusnady and Simon, 2001). The positions of the TM boundaries were further adjusted by comparison with the crystal structure of bovine rhodopsin (Palczewski *et al.*, 2000) and an existing model for the mammalian β -adrenergic receptor (Dohlman *et al.*, 1987). This analysis indicated 7 hydrophobic

domains alternating with more polar regions, characteristic of the 7-membrane spanning topology of GPCRs. The divergent third cytoplasmic loop, which participates in G-protein activation, is only 20 aa long. In contrast, Ren2 possesses a long C-terminus of 65 residues (Karnik *et al.*, 2003).

Ren2 exhibited about the same level of sequence homology (approximately 45% similarity) with different types of biogenic amine GPCRs, particularly adrenergic, dopaminergic and some histaminergic receptors. Conserved regions from a selection of receptors are compared in Figure 2. Some somatostatin receptors, which also belong to class I GPCRs, show sequence identity with Ren2 but the highest homology scores were obtained from comparisons with aminergic receptors. A comparison of Ren2 to the other *Renilla* receptor Ren1 reveals that identity among the aa sequences is the same as what is seen with the selected aminergic receptors described above. Aside from the other *Renilla* receptor, Ren1, no homologue to Ren 2 has been identified in lower invertebrates. A dendrogram of Ren2 and a selection of vertebrate and invertebrate amine receptors indicates that the new *Renilla* receptor does not cluster with any group of receptor subtypes (Fig. 3).

Northern hybridization analysis of poly(A)⁺ RNA from *Renilla* polyps disclosed 2 mRNA species of 3.1 and 1.65 kb each (Fig. 4). The 1.65-kb band is in the range of the predicted size of the Ren2 transcript (1.9 kb) whereas the 3.1-kb band is likely to represent a larger isoform of the transcript. Alternative RNA splicing events, which are common among neurotransmitter receptors in other organisms (Grabowski and Black, 2001), may have produced the 2 Ren2 species in *Renilla*.

The tissue distribution of Ren2 was examined by IS RT-PCR, followed by hybridization with an antisense [³³P]-labelled Ren2 RNA probe which corresponds to the non-conserved C-terminal intracellular tail of the receptor. IS hybridization performed on sections that were neither reverse transcribed nor PCR amplified showed slightly less labelling than the ones which were submitted to a RT-PCR (results not shown). In both cases, the results clearly show that Ren2 transcripts are highly expressed in the sea pansy. The high density of receptor transcripts that we observed in the tissue of *Renilla* is not unusual for a GPCR. In the rat, IS hybridization studies have reported that some discrete regions of the brain abundantly express specific receptor transcripts (O'Dowd *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999).

The sea pansy is a colonial animal composed of 2 types of polyps. The autozooids are feeding and reproductive polyps, and the siphonozooids are reduced polyps responsible for water circulation inside the colonial mass (Lyke, 1965). Polyps have a diploblastic histological organization, that is, they are constituted of 2 epithelial layers, ectoderm and endoderm, separated by a loosely cellular, gelatinous layer called mesoglea (Lyke, 1965). The hybridization label was particularly strong in the epithelium of the pharyngeal wall and of the oral disk, as well as in both ectodermal and endodermal layers of the tentacles of autozooids (Fig. 5A). Labelling was localized in the basal part of the mucous and ciliated cells constituting the ectodermally-derived pharynx lining and oral disk (Fig. 5B). The apical parts of these cells, where the mucus compartment and cilia are located, were weakly or not labelled (Fig. 5B).

There was also labelling in the endodermal epithelium lining the 8 gastrovascular cavities of the autozooids (Fig. 5C). This lining comprises septa separating the gastrovascular cavities, and endodermal myoepithelia abut against the polyp wall and pharynx (Fig. 5D). The septa are composed of 2 (longitudinal and radial) muscle sheets separated by a thin mesoglea, whereas the rest of the lining is made up of circular muscle (Lyke, 1965). Labelling was concentrated as a dense band in the basal part of the musculo-epithelial and digestive cells constituting these endodermal epithelia (Fig. 5B). The muscle extension of these cells and the mesoglea in which they are anchored were unlabelled. The cells are involved in the phagocytosis and digestion of food particles, and in muscle contraction (Lyke, 1965). Labelling was largely absent from the ectoderm of the autozoid body wall. Control sections treated with RNase presented consistently low levels of labelling in the 7 replicate experiments we performed in this study (Fig. 5D).

4. Discussion

No definitive statement has yet been made for the existence of aminergic-based neurotransmission in the earliest metazoan animals endowed with neurons. A better understanding of the aminergic systems of cnidarians requires characterization of their receptors. Physiological and biochemical approaches have so far been the main way of studying receptors for biogenic amines in cnidarians. Identification of the receptor sequences found in these animals and eventually their pharmacological characterizations will lead to possibilities of new research on primitive nervous systems.

We describe here a novel cDNA from *Renilla koellikeri* that encodes a putative amine receptor and the localization of its transcripts in this animal's polyps. The new receptor, named Ren2, has typical 7 TM domain topology, and displays several structural characteristics of class I GPCRs. In particular, the motifs F²⁰³xxxWxPFF in TMVI (Shi and Javitch, 2002) and N²⁴⁶SxxNPxxY (Oliveira *et al.*, 1999) of TMVII are signatures of receptors of the rhodopsin-like family. There are, however, several noteworthy differences between Ren2 and other members of the family. Instead of the highly conserved DRY motif found at the C-terminal region of TMIII, Ren2 displays a D¹⁰⁰RC pattern at this position. A cysteine substitution at the third position of this motif is known to occur in only 4% of class I GPCRs (Van Rhee and Jacobson, 1996). A second interesting feature of Ren 2 is the absence of highly conserved disulfide linkage between extracellular loops (EL) 1 and 2. Only 1 of the 2 conserved cysteines involved in this linkage is present in Ren2 (C⁷⁸). The absence of the disulfide bond may be related to the exceptionally short length of EL2 (6 aa) in

Ren2. It will be of interest to determine if/how these fundamental structural differences affect the activity and stability of the receptor *in vivo*.

Ren2 also exhibits many of the conserved residues believed to play a role in GPCR binding and activation. Notably, aspartic acid D⁵⁰ in TMII may regulate agonist binding affinity (Strader *et al.*, 1988; Van Rhee and Jacobson, 1996) and, together with asparagine N²², may be involved in the formation of the receptor's sodium-binding pocket (Neve *et al.*, 2001). Highly conserved aspartic acid (D⁸³) in TMIII and aromatic residues of TMVI (W²⁰⁷ and F²¹²) have all been implicated in the binding of biogenic amines (Strader *et al.*, 1988, 1989, 1991; Roth *et al.*, 1997)

There is major sequence similarity between Ren2 and aminergic GPCRs from other organisms, particularly with catecholamine receptors. Although the *Renilla* receptor does not cluster with any receptor subfamily, the position it occupies on the dendrogram is in agreement with its remote metazoan origin. Nevertheless, biologically meaningful phylogenetic relationships await the discovery of receptor sequences from more representatives of lower taxa.

Ren2 was cloned and expressed in mammalian cells for ligand screening. However, we have not succeeded in finding a ligand with a variety of receptor activity assays designed to detect both cAMP- and Ca²⁺-mediated signalling, the 2 major signal transduction pathways for amine GPCRs (see Bouchard *et al.*, 2003 for details of different activity assays). None of the classical biogenic amines, including dopamine, octopamine, tyramine, 5-HT, histamine and adrenergic agents, or somatostatin, could elicit a response in Ren2-transfected HEK293 or LTK- cells (data not shown). Since Ren2 shares the greatest sequence homology with β -adrenergic

receptors, we also conducted a radiobinding assay with membranes prepared from LTK- cells transiently expressing the Ren2 receptor. No specific binding was obtained with the tritiated adrenergic ligands CGP12177 and dihydroalprenolol (data not reported). The absence of response could be attributed to the artificial environment of the heterologous expression system. Alternatively, a different type of ligand, possibly a different amine which was not tested in this survey, may activate the receptor. Considering the distant relationship between Ren2 and other GPCRs (Fig. 3), it is conceivable that Ren2 may represent a new class of the rhodopsin family with different ligand preferences. It will be of interest to determine if any of the “non-standard” amine substances, previously identified in cnidarians (Elofsson et al., 1977; Carlberg and Rosengren, 1985), are capable of activating Ren2.

Feeding in the sea pansy is accomplished by capturing small prey with its tentacles and by their ingestion through the mouth. The food particles are moved in the gastrovascular cavities until they are captured by the digestive cell bodies of the endodermal myoepithelium (Lyke, 1965). The predominance of Ren2 labelling in key tissues supporting these activities (tentacles, oral disk, pharynx cells, and digestive cells of myoepithelia) indicates that the receptor may play a role in feeding, especially in food transport and intracellular digestion. Although Ren2 labelling in endodermal myoepithelia suggests its involvement in muscle activity, the absence of labelling in the muscle part of the epithelia makes this possibility doubtful. Few studies have documented the effects of biogenic amines on feeding. Physiological studies on *Hydra* and *C. elegans* have discovered modification of the feeding response upon exposure to biogenic amines (Hanai and Kitajima, 1984; Nuttley *et al.*,

2002). However, pending identification of a ligand for the Ren2 receptor, it is difficult to speculate further about its role in this animal.

From an evolutionary standpoint, cnidarians represent an ancient metazoan group. Given the basal position that the anthozoan class occupies in the phylum (Bridge *et al.*, 1992), Ren1 and Ren2 can be considered as representatives of the oldest sequences, with the distinct structural characteristics of biogenic amine receptors. The great diversity of 5-HT receptor subtypes in the animal kingdom led Peroutka (1994 and 1995) to propose that biogenic amine receptors might be the descendents of a primordial 5-HT receptor. However, the *Renilla* Ren2 receptor, and the recently cloned Ren1 receptor, appear to be more similar to catecholamine receptors than to 5-HT receptors. Discoveries of more GPCR sequences from primitive phyla and identification of their ligands might shed light on the origin of amine GPCRs in eukaryotes.

Acknowledgements

We express our gratitude to Gilles Houle for his excellent graphic work and thank Dr. Alan S. Hazell for access to his Olympus microscope. We also acknowledge the editorial work of Ovid Da Silva, Editor, Research Support Office, CHUM Research Centre, on this manuscript. This study was supported by a team grant from Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR-Québec), and by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to MA, FD and PR.

Figures et Légendes: Article II



CGAGGAACGCATGGAATGTCATATTATCAAGTGTGTAATCGTATACTTAGATATTGCGAAGAAAGAAAA
CTGTCTCATTGTAGAGTAGCTACTAACGAATAGTCAAAGGAAAAACCCTGCTAATCTTGTCTGATCGA
GCAATGCTCTGAGAAATAATGATTCAATGCAATTGGCAC'TCCGGCGAATGACAGAGGAGCACATGGTCA
TTGGGCTTAATCATGTTATCTAATACCTTCCATGGAATACCTAACCCATTTTGAACAATTTAAGGTGTG
AATGCCCTGGCTTGTGAAGCGAGTTATAACTGTGACGACAGACGGCTTGACGACGATCTAAGTTATCGTG
AAGAGGAAAAACCGTGATCGCATTCGTTCGTGATTGATGGGCTAAAGTGTGTGAGTGACAGCCAAA
AAAAACAATTACAAAGAAAAATAACATAGTCTGGATCCATAGGTGACATTGCACTACC

1 ATGTTGGGAATAGTCGCTGTCGAAATATTTCTGTGCAATCCTCGTAGTACTTACTGTACT
1 M L G I V A V E I F C A I L V V L T V T
61 GGAACGTCCTAATAATTGCAGCAACCCGACGATTCCGACATCTCCGAGAAATTTCAAAC
21 [G N] V L I I A A T R R F R H L R E I S N
121 ATCGTCATTACGTCCCTTGCCTGGCCGATTTGCTTGTGGACTTATAAACATACCGATG
41 I V I T S L A L A [D] L L V G L I N I P M
181 TACATGTATTCTATATCAAGACCACCATCAATTACCATGACCTACGTTCTCTGTCAAGAT
61 Y M Y S I S R P P S I T M T Y V L [C] Q N
241 TCTTTGGACATTTATTTTCAGTGTGTATCCATTTTGAATTTGACAGTCATCAGTGTAGAT
81 S L [D] I Y F S V S S I L N L T V I S V [D]
301 AGATGTTTTTCAGTGTGTCTCTTTGAAAAGAAGAATCTGGCGAAAAAGCAAATCTAC
101 [R C] F S V L C P L K R R I W R K S K I Y
361 ATAATTCTAGTTTCATGTGGTTAATTGCTACGATTCCTGTTGCTCTATACGTGAACAAA
121 I I L V S L [W] L I A T I P V A L Y V N K
421 GTGAAACACACAATAGCAATAGTTACAACAGTATTTTCTTGTTCGGTTGCTCATCATG
141 V K H T I A I V T T V F F L F P L L I M
481 ATCTTATCTTACACAATTCGGCTGGCACGGTGAAGATAGCGAGGAAGAGAATGCAGGCA
161 I L S Y T I L A G T V K I A R K R M Q A
541 CACAAAACAGCAACTTCATCAAAGGAGTTGAAATGGCAAAGACATATCTATTGTAATT
181 H K T A T S S K E L K L A K T L S I V I
601 TTGTTGTTTGTGGCTGCTTGGTTACCGTCTCTCGTAGTTGTCAATGCACATCATTATCCT
201 L L [E] V A A [W L P F F] V V V N A H H Y P
661 AACGTAATTAAGTAACTTGTCAAAGAAGCAAATGGAGATCTTGATTTACTTTCATCAAG
221 N V I K V [N] L S K K Q M E I L I Y F I K
721 ATGTTCCCCACTCAAATTCAGCTGTGAACCCATAATTTACGCCTTCCGCCAACGGGAA
241 M F P H S [N S A V N P I I Y] A F R Q R E
781 TTCGCGACTGCTTTCAAAAAGCTGTTGAGAATTTAAAACCACCAACAATCGCAATACCTCTC
261 F A T A F K K L L R I K T T N N R N T L
841 GGTCGGATGCAATTATGTCAATGACAGAAAGTGGTGGCGTCAGAAATACACCTATGAAG
281 G R M Q L L S M T E S G G V R N T P M K
901 AGAAGTGTATTGACAGGGATGGCTCGAAGAAGGCGAGTGGGTGAACACAGAAGCAGGG
301 R S V I D R D G [S] K K A [S] A V N T E A G
961 TGTCTAGTTAA
321 C S S

CAAAATAGATTAACTTGTACGTACGTGATTGAAATGTGACAAGGTACATTTAAGTGTACTGGAGTAT
GGATGGAGTTTCAAAGACCCGAAACTTGACCGTGTTCACCTTTGTACTTAGAGTTGAAGAATCCAGTT
ACGTCGCGTATAATGATTGGTTGATAGTAAATGTAGATACCAGCAGTTCCAAGTATTATGCAGCAGTA
ATTTTGTCTTCGAGGCACGCACAGTCCACGCCAGTTAACACTGAACATTTCTATGCTGATTTAGCTT
CAATTTGTTATAACCTTGGCTGATAGCTTGATCTTGGAAAGTTACTTCACGTTGTATTGGTTCTGTAATG
ATTTGGTTCGTTATGAACAACATTCGAGATAGCCACCCACAAAACGTACTGTTGAAGGGGACTGTCTCT
CCAAACTTGATTTGAAATAAAATTCGACCTCAATATAACTACTGCAACCTTGTAAATCACAATTTCTGTTT
TTCAAAAA



		I		II			
REN2	(1-3)	I	VAVEIFCAILVVLT	V	TGNVLIIAATRFRHLR	-	EISNIVITSL
B2AR_FELCA	(1-32)	V	VGMGIVMSLIVLAI	V	FNVLVITAIARFERLQ	-	VTNYFITSL
D5DR_FUGRU	(1-38)	R	AL TGC V L C A L I V S T L L	G	N T L V C A A V I K F R H L R	-	S K V T N A F V V S L
B1AR_XENLA	(1-34)	T	M G M T M F M A A I I L L I V M	G	N I M V I V A I G R N Q R L Q T	-	L T N V F I T S L
H2_RAT	(1-18)	K	V T I S V V L T T L I F I T V A	G	N V V V C L A V S L N R R L R S	-	L T N C F I V S L
OCTO_APLY	(1-37)	L	V L R G M A M A A I M V G A I F	G	N V L V I S S V L R F G R L R	-	A I T N F F I V S L
SOMATO_HOMO	(1-39)	A	V L V P V L Y L L V C A A G L G	G	N T L V I Y V V L R F A K M K T	-	V T N I Y I L N L

			III				
REN2		A	LADLLVGLINIPMYYSISRPPSITMTYVL	-	C	--	QNSLDDIYFSVSSILN
B2AR_FELCA		A	CADLVMLAVVPGASHILMKMWTFGNFW	-	C	E	FWTSLIDVLCVTAASIE
D5DR_FUGRU		A	VSDLFVAVLVMPWRVAVSEVAGVWLFGRF	-	C	D	TWVAFDLMCSTASILN
B1AR_XENLA		A	CADLIMGLFVFLGATLVVSGRWLYGSI	-	C	E	FWTSLVDVLCVTAASIE
H2_RAT		A	ATDLLLGLLVMPFSAIYQLSFKWSFGQV	-	C	N	IYTSLDVMLCTASIELN
OCTO_APLY		A	FADLLVAILVMPFSAISMEISGKVVFG	-	T	M	CDIFNANDVLFSTASIIH
SOMATO_HOMO		A	VADVLY-MLGLPELA TQNAASFMPFGPVL	-	C	R	LVMTLDGVNQFTSVFC

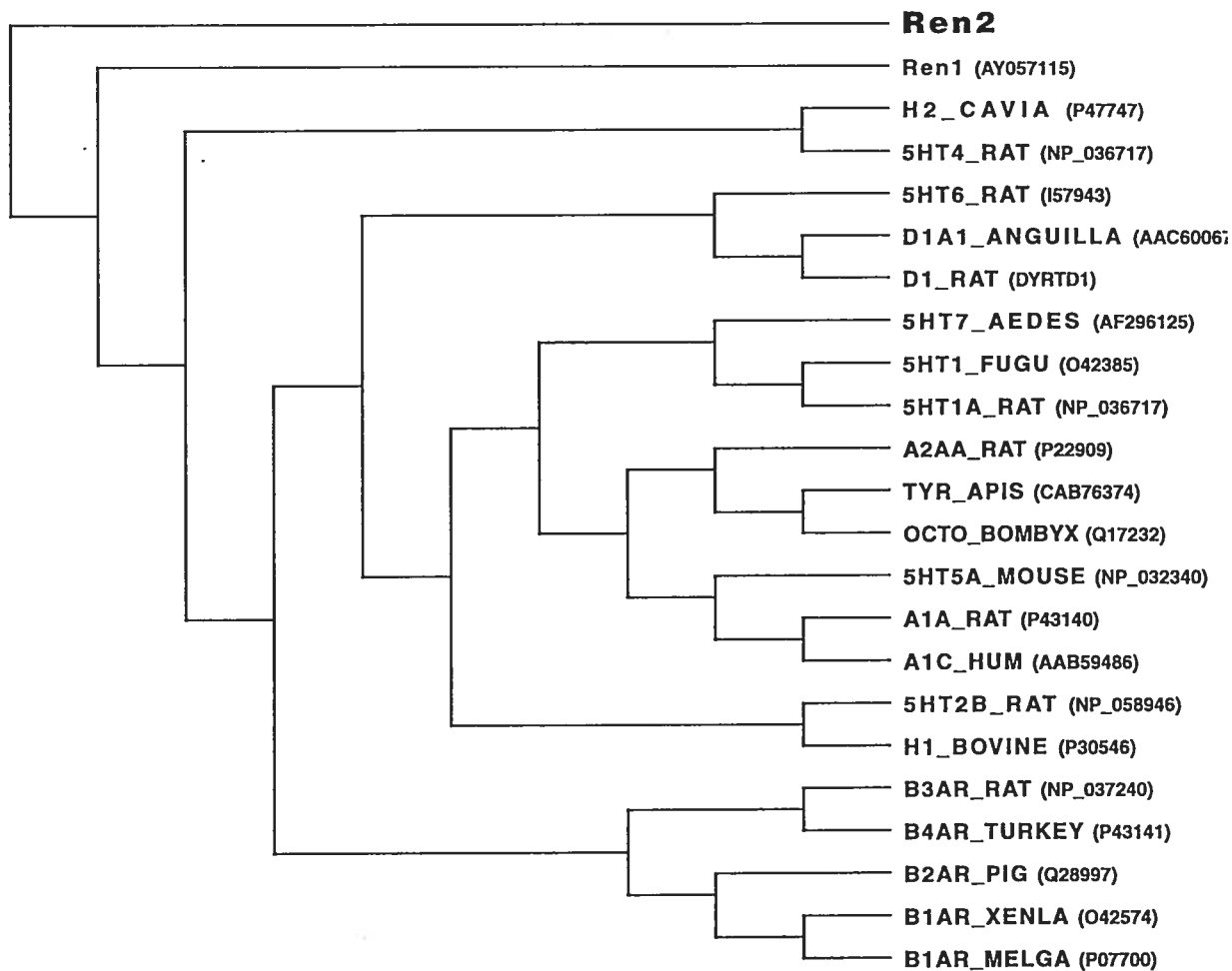
			IV																					
REN2		L	TVISVDRCFSVLCPFKRRIWR-KSKYI	I	I	L	V	S	L	W	L	I	A	T	I	P	V	A	L	Y	V	(139-144)		
B2AR_FELCA		L	CVIAVDRYFAITSPFKYQSLTKNKAR	V	V	I	L	M	V	V	I	S	G	L	T	S	F	L	P	I	(170-198)			
D5DR_FUGRU		L	CVISMDRYWAI SNPF RYERMTRRFA	F	L	M	I	A	V	A	W	T	L	S	V	L	I	S	F	I	P	V	(176-201)	
B1AR_XENLA		L	CVISIDRYIAITSPFRYQSLTKGRAK	G	I	V	C	S	V	G	I	S	A	L	V	S	F	L	P	I	(172-201)			
H2_RAT		L	FMISLDRYCAVTDPLRYPVLVTPV	V	V	A	I	S	L	V	F	I	V	I	S	I	T	L	S	F	L	S	I	(156-181)
OCTO_APLY		L	C C I S M D R Y I A I L H P L Q Y E S K M T R P R A L L M L G V T W V A S V L I S Y I P V	(175-202)																				
SOMATO_HOMO		L	T V M S V D R Y L A V V H P L S S A R W R R P R V A K L A S A A A W V L S L C M S L P L L	(176-200)																				

			V		VI								
REN2		I	AI V T T V F F L F P L L I M I L S Y T I L A G T V K I A R K R M Q	(180-188)	E	L	K	L	A	K	T	L	S
B2AR_FELCA		Y	AI ASS I V S F Y L P L V M V F V Y S R V F Q V A Q R Q L Q K I	(234-256)	K	E	H	K	A	L	K	T	L
D5DR_FUGRU		Y	AI S S L I S F Y I P V L I M V G T Y T R I F R I A Q T Q I R R I	(237-267)	R	E	T	K	V	L	K	T	L
B1AR_XENLA		Y	AI ASS I I S F Y F P L I M I F V Y I R V F K E A Q K Q M K K I	(237-265)	K	E	Q	K	A	L	K	T	L
H2_RAT		Y	G L V D G M V T F Y L P L L I M C V T Y Y R I F K I A R E Q A K R I	(217-227)	R	E	H	K	A	T	V	T	L
OCTO_APLY		Y	A G V S S S V S F W I F C T I M I F V Y I R I F L E A R K Q E K L I	(238-270)	R	E	H	K	A	A	K	T	L
SOMATO_HOMO		F	I I Y T A V L G F F A P L L V I C L C Y L L I V V K V R A A G V R V	(235-243)	--	R	K	V	T	R	M	V	

			VI		VII
REN2		I	V I L L F V A A - W L P F F V V N A H H Y P N V I K V N L S K K Q M E I L I Y F I K M F F H S - N		
B2AR_FELCA		G	I I M G T F T L C W L P F F I V M I V H V I Q D N L I P K E V - - - - - Y I L L N W V G Y V N		
D5DR_FUGRU		S	V I M G V F V F C W L P F F V L N C V P P F C D V D K V G E P P C V S D T T F N I F V W F G W A N		
B1AR_XENLA		G	I I M G T F T L C W L P F F L A N V V N V F Y R N L I P D K L - - - - - F L F L N W L G Y A N		
H2_RAT		A	A V M G A F I V C W F P Y T A F V Y R G L R G D D A V N E V E G - - - - - I V L - W L G Y A N		
OCTO_APLY		G	I I M G A F I L C F L P F F S W Y V A T T M C R D S C P Y P P - - - - - L L G S A L F W V G Y F N		
SOMATO_HOMO		L	V V V L V F A G C W L P F F T V N I V N L A V A L P Q E P A S A G - - - - - L Y F F V V I L S Y A N		

REN2	S	A	V	N	F	I	Y	A	F	R	-	Q	-	R	E	F	A	T	A	F	K	K	L	L	(270-323)	
B2AR_FELCA	S	A	F	N	F	L	I	Y	C	-	R	-	S	P	D	F	R	I	A	F	Q	E	L	L	(341-428)	
D5DR_FUGRU	S	S	L	N	F	I	Y	A	-	-	F	N	A	D	F	R	K	A	F	T	T	I	L	(349-463)		
B1AR_XENLA	S	A	F	N	F	I	Y	C	-	R	-	S	P	D	F	R	K	A	F	K	R	L	L	(339-385)		
H2_RAT	S	A	L	N	F	I	L	Y	A	T	-	-	L	N	R	D	F	R	M	A	Y	Q	L	F	(304-359)	
OCTO_APLY	S	C	L	N	F	I	Y	-	-	A	Y	F	N	R	E	F	R	T	A	F	K	K	L	L	(348-394)	
SOMATO_HOMO	S	C	A	N	F	V	L	Y	G	-	-	F	L	S	D	N	F	R	Q	S	F	Q	K	V	L	(320-364)





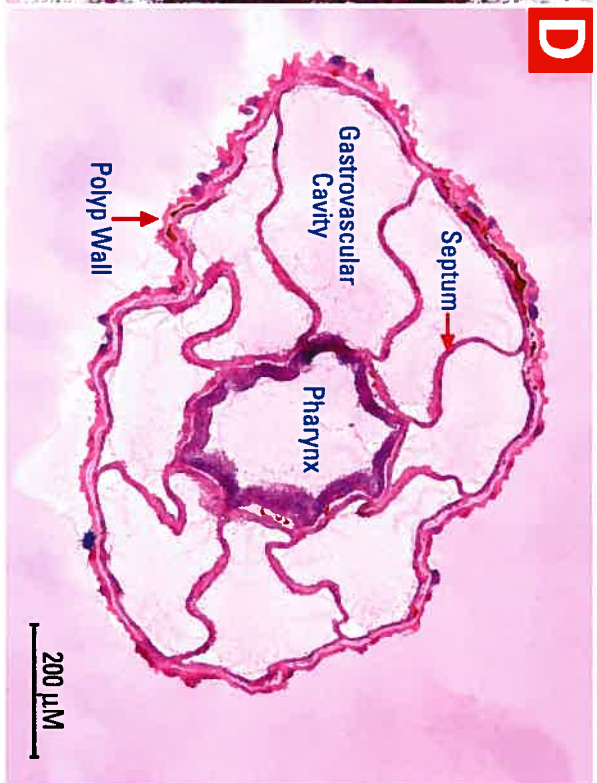
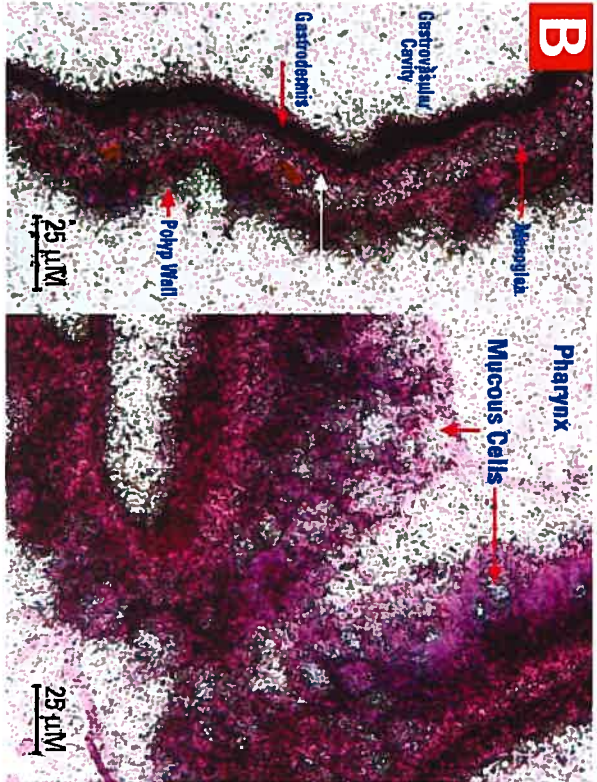
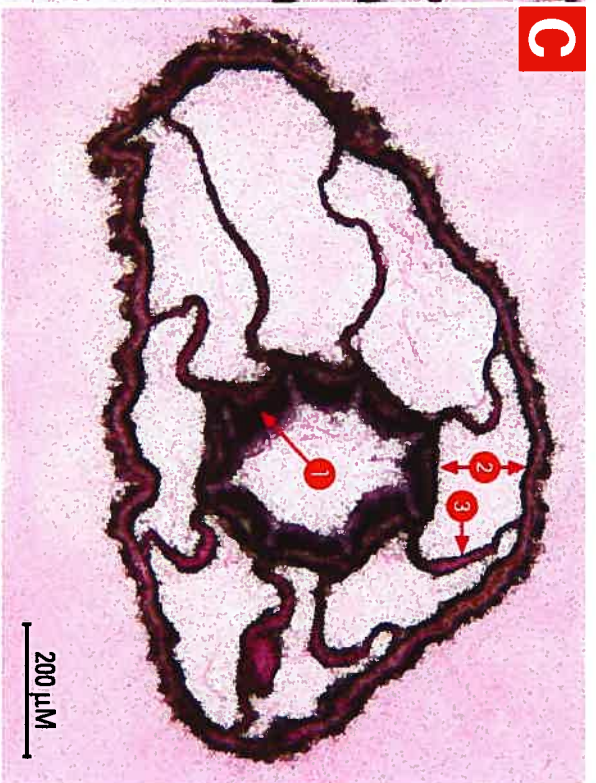
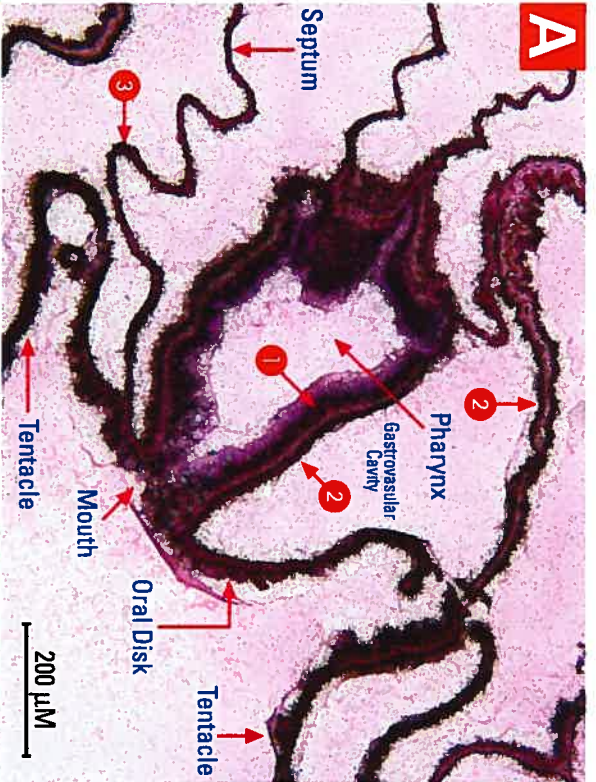




← **3.10 Kb**

← **1.65 Kb**





5. References

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

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

Anctil, M., Pani, A.K., Ali, M.A., 1991. Modulation of rhythmic contractions by melatonin via cyclic GMP in the coelenterate *Renilla koellikeri*. J. Comp. Physiol. B161, 569-575.

Awad, E.W., Anctil, M., 1993a. Identification of β -like adrenoceptors associated with bioluminescence in the sea pansy *Renilla koellikeri*. J. Exp. Biol. 177, 181-200.

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

Bouchard, C., Ribeiro, P., Dubé, F., Anctil, M., 2003. A new G protein-coupled receptor from a primitive metazoan shows homology with vertebrate aminergic receptors and displays constitutive activity in mammalian cells. J. Neurochem. 86,

1149-1161.

Bridge, D., Cunningham, C.W., Schierwater, B., DeSalle, R., Buss, L.W., 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 8750-8753.

Carlberg, M., 1992. Localization of dopamine in the freshwater hydrozoan *Hydra attenuata*. *Cell Tissue Res.* 270, 601-607.

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

Chung, J.-M., Spencer, A.N., 1991. Dopamine acts through a D₂-like receptor on a jellyfish motor neuron. *J. Comp. Physiol. A.* 169, 599-606.

Dohlman, H.K., Bouvier, M., Jeffrey, L.B., Caron, M.G, Lefkowitz, R.J., 1987. The multiple membrane spanning topography of the β ₂-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 262, 14282-14288.

Edwards, N.C., Thomas, M.B., Long, B.A., Amyotte, S.J., 1987. Catecholamines induce metamorphosis in the hydrozoan *Halocordyle disticha* but not in *Hydractinia echinata*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 196, 381-384.

Elofsson, R., Falck, O., Lindvall, O., Myhrberg, H., 1977. Evidence for new catecholamines or related amino acids in some invertebrate sensory neurons. *Cell Tiss. Res.* 182, 525-536.

Ferguson, S.S.G., 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53, 1-24.

Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 8998-9002.

Grabowski, P.J., Black, D.L., 2001. Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 65, 289-308.

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

Hanai, K., Kitajima, M., 1984. Two types of surface amine receptors modulating the feeding response in *Hydra japonica*: the depressing action of dopamine and related amines. *Chemical Senses* 9, 355-367.

Karnik, S.S., Gogonea, C., Patil, S., Saad, Y., Takezako, T., 2003. Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 431-437.

Kolberg, K.J.S., Martin, V.J., 1988. Morphological, cytochemical and neuropharmacological evidence for the presence of catecholamines in hydrozoan planulae. *Development* 103, 249-258.

Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.T., George, S.R., O'Dowd, B.F., 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 446, 103-107.

Lenicque, P.M., Feral, J.-P., 1977. Effects of biogenic amines on the regeneration of small pieces of the pedal disc of the sea anemone *Metridium senile* (Linnaeus). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 57, 91-93.

Lyke, E.B., 1965. The histology of the sea pansies, *Renilla reniformis* (Pallas) and *Renilla köllikeri* Pfeffer with a note on the fine structure of the latter species. Ph.D. thesis, The University of Wisconsin.

Mankad, R.V., Gimelbrant, A.A., McClintock, T.S., 1998. Consensus translational initiation sites of marine invertebrate phyla. *Biol. Bull.* 195, 251-254.

Neve, K.A., Cumbay, M.G., Thompson, K.R., Yang, R., Buck, D. C., Watts, V.J., Durand, C.J., Teeter, M.M., 2001. Modeling and mutational analysis of a putative sodium-binding pocket on the dopamine D2 receptor. *Mol. Pharmacol.* 60, 373-381.

Nuttley, W.M., Atkinson-Leadbater, K.P., Van Der Kooy, D., 2002. Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 12449-12454.

O'Dowd, B.F., Nguyen, T., Lynch, K.R., Kolakowski, L.F. Jr., Thompson, M., Cheng, R., Marchese, A., Ng, G., Heng, H.H., George, S.R., 1996. A novel gene codes for a putative G protein-coupled receptor with an abundant expression in brain. *FEBS Lett.* 394, 325-329.

Oliveira, L., Paiva, A.C.M., Vriend, G., 1999. A low resolution model for the interaction of G protein with G protein-coupled receptors. *Protein Eng.* 12, 1087-1095.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science.* 289, 739-745.

Peroutka, S.J., 1994. 5-Hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: why are there so many? *Neurochem. Int.* 25, 533-536.

Peroutka, S.J., 1995. 5-HT receptors: past, present and future. *Trends Neurosci.* 18, 68-69.

Ross, D.M., 1960. The effects of ions and drugs on neuromuscular preparations of sea anemones. *J. Exp. Biol.* 37, 732-752.

Roth, B.L., Shoham, M., Choudhary, M.S., Khan, N., 1997. Identification of conserved aromatic residues essential for agonist binding and second messenger production at 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors. *Mol. Pharmacol.* 52, 259-266.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Shi, L., Javitch, J.A., 2002. The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 437-467.

Strader, C.D., Sigal, I.S., Candelore, M.R., Rands, E., Hill, W.S., Dixon, R.A., 1988. Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J. Biol. Chem.* 263, 10267-10271.

Strader, C.D., Sigal, I.S., Dixon, R.A., 1989. Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J.* 3, 1825-1831.

Strader, C.D., Gaffney, T., Sugg, E.E., Candelore, M.R., Keys, R., Patchett, A.A., Dixon, R.A., 1991. Allele-specific activation of genetically engineered receptors. *J. Biol. Chem.* 266, 5-8.

Tsang, W.H., McGaughey Y.H., Wong Y.H., Wong J.T.Y., 1997. Melatonin and 5-methoxytryptamine induced muscular contraction in sea anemones. *J. Exp. Zool.* 279, 201-207.

Tusnady, G.E., Simon, I., 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849-850.

Umbriaco, D., Anctil, M., Descarries L., 1990. Serotonin-immunoreactive neurons in the Cnidarian *Renilla Koellikeri*. *J. Comp. Neurol.* 291, 167-178.

Van Rhee, A.M., Jacobson, K.A., 1996. Molecular architecture of G protein-coupled receptors. *Drug Dev. Res.* 37, 1-38.

Wheatley, M., Hawtin, S.R., 1999. Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role. *Hum. Reprod. Update* 5, 356-364.

Chapitre 5

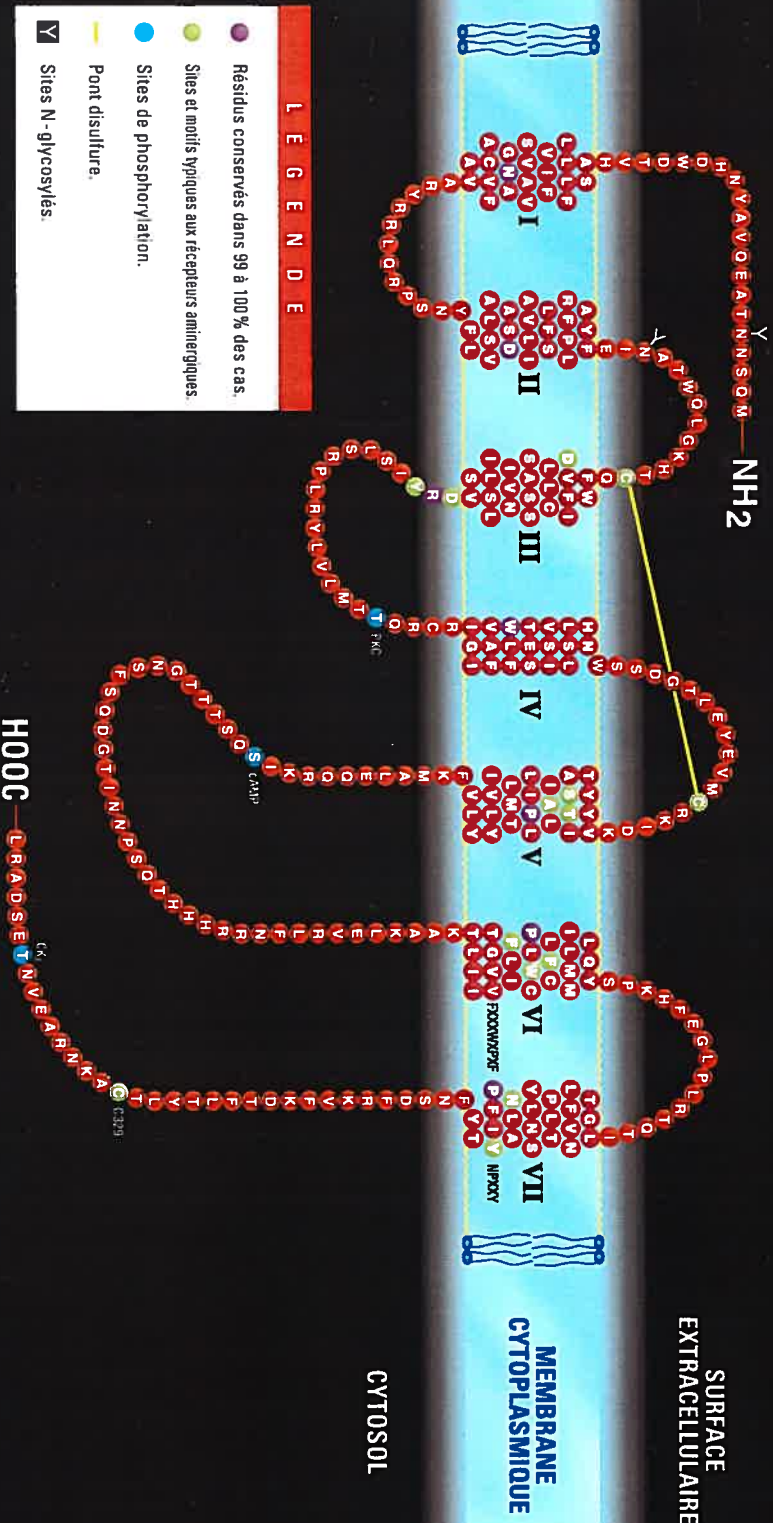
Discussion Générale et Perspectives

L'étude du système nerveux des cnidaires s'inspire majoritairement des travaux accomplis sur le système nerveux d'animaux évolués. La caractéristique principale de ces systèmes est de former des complexes de cellules capables de communiquer des informations. La connaissance des composants et des mécanismes impliqués dans la transmissions du message d'une cellule nerveuse à une autre cellule est la pierre angulaire de la recherche en neurobiologie. L'existence d'une neurotransmission chimique chez les vertébrés et plusieurs invertébrés est établie. La démonstration qu'un tel type de neurotransmission agisse chez un animal repose sur un ensemble de critères. Ces critères n'ont pas encore été tous démontrés chez les cnidaires. Quoique plusieurs substances neuroactives jouent indubitablement un rôle chez ces animaux, les connaissances acquises dans ce domaine sont fragmentaires. Un des chaînons manquants importants qui reste à résoudre pour montrer que les amines sont impliquées dans la neurotransmission chimique chez les cnidaires, est l'étude des récepteurs qui interagissent avec les neurotransmetteurs. Chez la pensée de mer, *Renilla koellikeri*, comme chez les autres cnidaires, l'étude de ces récepteurs a été principalement abordée en termes d'effet physiologique à la suite d'application d'agonistes et d'antagonistes sur l'animal, de sites de liaison étudiés à l'aide de radioligands sur des préparations membranaires de tissus et de voies de transduction utilisées par les substances capables de générer une réaction physiologique. Les analyses moléculaires de séquences de RCPGs chez les cnidaires sont rares. Chez l'anémone de mer, deux séquences de RCPGs ont été isolées (Nothacker et Grimmelikhuijzen, 1993; New *et al.*, 2000). Ces récepteurs pour lesquels aucun

ligand n'a été déterminé, présentent des homologies avec les récepteurs de type peptidergique. Mon travail de recherche a abouti à la découverte de deux nouvelles séquences de RCPGs isolées chez *Renilla*. L'analyse *in silico* des séquences des polypeptides révèle que les récepteurs, Ren1 et Ren2, partagent des caractéristiques importantes avec les récepteurs aminergiques, en particulier les récepteurs aux catécholamines, sans pouvoir être associés à aucun de ces sous-types. Ren1 et Ren2 sont pour le moment les plus anciens récepteurs de type aminergique clonés chez les animaux. Ren1, en particulier, possède un degré de conservation remarquable de ses résidus et de sa structure. Les résidus et les motifs habituellement retrouvés dans les régions transmembranaires des récepteurs aminergiques sont conservés chez Ren1 (**Fig. 7**). De plus, la conservation de plusieurs sites de domaines extra- et intracellulaires suggère que Ren1 peut être glycosylé à son extrémité N-terminale, palmitoylé sur sa queue C-terminale et ses boucles extracellulaires 1 et 2 peuvent être réunies par un lien disulfure. Le rôle central qu'occupe le site de liaison du ligand dans le fonctionnement du récepteur fait en sorte qu'il existe chez les RCPG, quelle que soit l'espèce, une conservation importante des résidus et des motifs qui le constituent. Quoique Ren1 et Ren2 divergent l'un de l'autre sur plusieurs points en ce qui concerne les régions extracellulaires et cytosoliques, on constate cependant qu'ils ont en commun plusieurs motifs et résidus jouant des rôles importants dans la liaison d'un ligand aminergique et dans l'activation du récepteur (voir **Figs. 7 et 8**). Les éléments propres aux RCPGs de la classe I qui sont absents chez Ren2 se retrouvent donc principalement dans les régions non membranaires. L'extrémité N-terminale et la boucle extracellulaire 2 sont très courtes chez ce

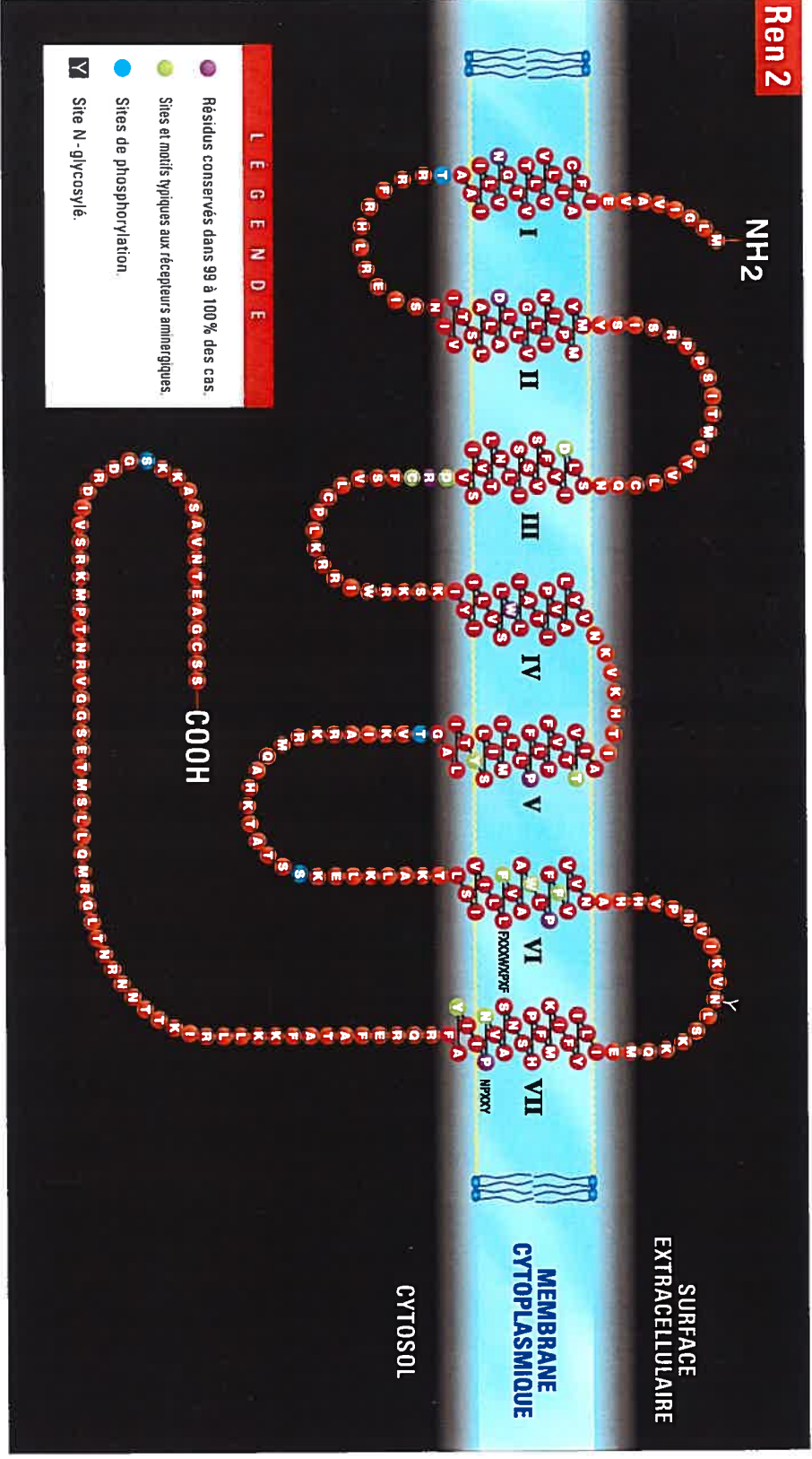


Ren 1





Ren 2



LEGENDE

- Résidus conservés dans 99 à 100% des cas
- Sites et motifs typiques aux récepteurs aminergiques
- Sites de phosphorylation
- Y Site N - glycosyle

SURFACE
EXTRACELLULAIRE

MEMBRANE
CYTOPLASMIQUE

CYTOSOL

NH₂

COOH

récepteur. Ainsi, la glycosylation de la queue N-terminale est impossible et le lien disulfure inutile. Comme ce dernier lien confère au récepteur une stabilité structurelle favorisant l'entrée et la liaison du ligand (Cook et Eidne, 1997), il est possible que la conformation compacte qu'octroie la courte boucle extracellulaire 2 ne rende pas nécessaire l'existence du lien disulfure. Ren2 se distingue aussi par la présence d'un motif DRC, situé à l'interface C-terminale transmembranaire III, au lieu du motif DRY retrouvé chez la grande majorité des RCPGs.

Le criblage pharmacologique des récepteurs Ren1 et Ren2

Les essais pharmacologiques utilisés pour caractériser Ren1 et Ren2 n'ont pas permis de mesurer de changements du contenu intracellulaire en AMPc ou en Ca^{2+} à la suite de l'application de ligands. Ren2 a été testé avec des amines biogènes et la somatostatine tandis que Ren1 a fait l'objet d'un criblage plus exhaustif qui comprenait, en plus des amines biogènes et de leurs dérivés, des acides aminés, des drogues de synthèse adrénergiques et un sucre agissant sur des chimiorécepteurs impliqués dans la décharge des cnidocytes, l'acide acétylneuraminique. Une étude pharmacologique supplémentaire a été effectuée sur le récepteur Ren1 au laboratoire d'Olivier Civelli par Rainer Reinscheid à l'Université de Californie à Irvine (résultats non présentés). À l'aide du lecteur de plaque à fluorescence FLIPER (Molecular Device), le Dr Reinscheid a testé sur des cellules HEK293, transfectées avec le récepteur Ren1, la plupart des drogues que j'ai testées mais aussi les substances suivantes: 5,6-dihydroxyl tryptamine, N-acétyldopamine, clonidine,

guanabenzacetate, 5-hydroxy indole, tolazoline, L-thyronine, L-thyroxine, agmatine, yohimbine et atropine. Aucune de ces drogues n'a été capable d'activer Ren1.

Par immunocytoologie, nous avons observé que les récepteurs Ren1 et Ren2 sont exprimés au niveau de la membrane des cellules. Dans le cas de Ren1, le buvardage Western confirme que le récepteur entier est exprimé dans la cellule. L'absence de ligand pour Ren 1 et Ren 2 doit donc trouver sa source dans autre chose qu'un problème lié à la maturation du polypeptide dans la cellule. On sait que la composition en lipides du système nerveux chez les cnidaires est différente de celle des animaux vertébrés (Schetz et al., 1993). Il n'est pas improbable que cette différence cause de légères modifications de la position des domaines transmembranaires et ainsi nuise à l'accès du ligand dans la pochette de liaison. D'autant plus que de nouvelles études suggèrent que les stéroïdes peuvent moduler l'affinité de RCPGs pour le ligand (Eroglu *et al.*, 2003). Il n'est pas exclu toutefois, qu'une autre lignée cellulaire de mammifère puisse être plus convenable pour la recherche des ligands de Ren1 et Ren2. Saudou et ses collègues (1990) ont constaté que des réponses pharmacologiques négligeables étaient détectées dans les cellules COS-7 transfectées avec le récepteur à la tyramine de la drosophile ou le récepteur à la dopamine de la souris. L'expression de ces mêmes récepteurs dans les cellules NIH 3T3 a amélioré nettement le signal cellulaire généré par le ligand ainsi que sa reproductibilité. L'établissement d'une lignée cellulaire de cnidaire nous épargnera bien des incertitudes lors des études portant sur les récepteurs de ces animaux. Je

crois qu'il faille garder à l'esprit qu'il existe peut-être une souche cellulaire chez les mammifères qui pourrait être tout à fait adéquate pour l'étude de récepteurs de cnidaire. Avec 45% de similarité de séquence, les récepteurs de la rénille ne sont après tout pas si différents des récepteurs de vertébrés auxquels ils ressemblent. De nombreux exemples nous prouvent que des récepteurs peuvent être exprimés dans des systèmes hétérologues phylogénétiquement éloignés. Par exemple, des RCPGs de vertébrés sont exprimés dans des bactéries et se déploient adéquatement à l'intérieur de la membrane bactérienne (Söhlemann *et al.*, 1997). De plus, on a montré que les récepteurs de vertébrés sont capables de couplage aux protéines G intracellulaires lorsqu'ils sont exprimés dans les levures ou dans des cellules d'insecte (Grisshammer et Tate, 1995).

L'activité constitutive de Ren1

En dépit du fait qu'aucune activité n'ait été induite par un ligand sur Ren1, une activité constitutive soutenue des cellules transfectées a toujours été observée. Cette activité spontanée se traduisait par un accroissement du contenu intracellulaire en AMPc, ce qui suggère un couplage du récepteur à la protéine $G_{\alpha s}$. Il est difficile pour le moment de savoir si l'activité spontanée de Ren1 est une conséquence de son expression dans un système cellulaire-hôte ou bien si Ren1 est capable d'une activité intrinsèque *in vivo*.

On croit aujourd'hui que l'activité constitutive des RCPGs est un mécanisme de régulation présent *in vivo*. La transition allostérique qui favorise le couplage du récepteur à sa protéine G modifie l'affinité du récepteur pour son ligand et ainsi génère de nouveaux palliers de régulation pour un même ligand. Nous pourrions imaginer que Ren1 soit présent chez *Renilla* sous divers états d'activation, multipliant ainsi les niveaux de régulation du récepteur par son ligand. Faute de connaître le ligand agissant sur Ren1, nous ne pouvons pas, pour le moment, savoir quelle est la fonction de ce récepteur ni vérifier si l'activité constitutive du récepteur est présente *in vivo*. L'inhibition de l'activité constitutive chez l'animal, à l'aide d'un agoniste inverse, nous révélera si cette activité est présente ainsi que son rôle biologique chez *Renilla*.

Outre la protéine G, plusieurs protéines cytosoliques peuvent interagir avec les RCPGs. L'expression hétérologue de récepteurs primitifs dans des cellules de vertébré soulève des questionnements quant au fonctionnement normal du récepteur dans un milieu artificiel. Que Ren1 soit orphelin et qu'il soit actif constitutivement pourraient être la conséquence de son expression dans un système cellulaire phylogénétiquement trop éloigné de son environnement habituel. L'état constitutif pourrait dépendre de l'absence de certaines interactions du récepteur avec des protéines intracellulaires. Par exemple, le récepteur du glutamate mGlu₆ est coexprimé dans les neurones granulaires du cervelet avec une protéine cytosolique appelées Homer 3. Le récepteur et Homer 3 interagissent spontanément. Lorsque l'on supprime cette interaction, le récepteur au glutamate devient alors actif

constitutivement (Ango et al., 2001). Peut-être qu'un tel facteur cytosolique et Ren1 co-habitent dans le contexte cellulaire d'origine. Le cas échéant, Ren1 ne présenterait alors pas d'activité constitutive *in vivo*.

Localisation des transcrits par hybridation in situ

La localisation de Ren1 et Ren2 dans les tissus de *Renilla* a été faite par hybridation *in situ*. Des quatre protocoles d'hybridation *in situ* utilisés, seul le protocole fait en autoradiographie a fonctionné. Les autres protocoles étaient basés sur une méthode dite « froide » qui comprend les éléments suivants; l'haptène DIG (digoxigénine) incorporé à la sonde, un anticorps anti-DIG couplé à une phosphatase et le substrat. Une réaction enzymatique colorimétrique permet de visualiser le marquage. Au cours de mes expériences avec la méthode DIG, j'ai obtenu un marquage intense de la région distale du polype, peu importe la sonde utilisée. Une sonde correspondant à une région du gène de résistance à l'ampiciline, un gène absent chez les eucaryotes, produisait le même patron de marquage que ceux obtenus avec les sondes spécifiques aux récepteurs de rénille. De plus, les témoins traités à la RNase ont toujours généré du marquage, le même d'ailleurs que les échantillons non-traités. Ce marquage n'était pas dû à des facteurs endogènes propres aux tissus de la rénille. L'inactivation des phosphatases endogènes du tissu ne modifiait pas le résultat. De plus, tout tissu n'ayant pas été exposé à une sonde marquée et subissant les étapes de révélation colorimétrique demeurait propre. Malgré tout, je suis convaincue que cette méthode peut fonctionner. Chez l'hydre, par exemple, de

magnifiques résultats sont obtenus à l'aide de la méthode DIG (Hoffman & Kroiher, 2001; Williamson & Grimmelikhuijzen, 2000, 2002). Les mises au point avec cette méthode sont non seulement laborieuses mais la plupart des protocoles que l'on retrouve dans la littérature ne sont que partiellement décrits.

L'hybridation *in situ* obtenue par autoradiographie a été faite en utilisant 2 sondes pour chacun des récepteurs. Une des sondes correspondait à la séquence entière des récepteurs tandis que l'autre était déduite à partir d'une région non conservée des récepteurs. La sonde utilisée pour Ren1 correspondait à sa 3^e boucle intracellulaire tandis que la région C-terminale de Ren2 a été choisi pour déduire une sonde. Le marquage diffus et variable obtenu avec les sondes du récepteur Ren1 ne permet pas de tirer de conclusion quant à sa distribution et les résultats n'ont pas été présentés. Les deux sondes utilisées pour la localisation de Ren2 ont généré des résultats comparables. Le marquage obtenue avec ces sondes montre que les grains se concentrent au-dessus de la couche ectodermique de la région distale du polype, c'est-à-dire le disque oral et les tentacules. L'ectoderme pharyngien présente, lui aussi, un marquage intense. Cette couche ectodermique pharyngienne est constituée de nombreuses cellules à mucus dont les parties sécrétrices, exposées à la lumière pharyngienne, ne sont pas marquées. L'endoderme recouvrant les cavités gastrovasculaires est composé principalement de cellules myoépithéliales et digestives. Nous avons observé un marquage particulièrement intense au-dessus de cet endoderme qui tapisse les huit cavités gastrovasculaires.

La distribution du marquage obtenu en hybridation *in situ* chez la rénille, suggère que le récepteur Ren2 est peut-être impliqué dans une activité alimentaire. Le mécanisme sensoriel qui gère le comportement alimentaire chez l'hydre, un cnidaire phylogénétiquement éloigné de la rénille, est décrit par la série de réactions suivantes: la capture de la proie, l'ouverture de la bouche, l'ingestion, la digestion et la régurgitation. L'hydre repue manifeste un comportement post-alimentaire qui implique la contraction des tentacules et de la colonne ainsi que l'inhibition de la décharge des cnidocytes (Smith *et al.*, 1974). Ce comportement agit vraisemblablement *via* l'activation de récepteurs, exposés à l'environnement extérieur (tentacules et hypostome) mais aussi au milieu interne (pharynx), lorsque la proie capturée laisse échapper ses humeurs (Grosvenor *et al.*, 1996). Les substances candidates impliquées dans ce réflexe inhibiteur sont pour la plupart inconnues (Grosvenor *et al.*, 1996) mais l'étude d'Hanai et Katijima (1984) a montré que certaines amines biogènes inhibent le réflexe alimentaire chez l'hydre. La rapidité de la réaction et les faibles concentrations d'amines nécessaires pour inhiber le réflexe alimentaire de l'hydre suggèrent que les récepteurs impliqués sont à la surface des tentacules (Hanai et Katijima, 1984). Il est difficile pour le moment de spéculer sur le rôle de Ren2 chez *Renilla* d'autant plus que l'on ne connaît pas son ligand. Peu d'études ont été faites sur le lien qui pourrait exister entre l'alimentation et les amines biogènes chez les cnidaires. Ren2 pourrait tout autant être impliqué dans un comportement alimentaire autre qu'inhibiteur. Il est intéressant de noter cependant que les récepteurs α 1-adrénérique et dopaminergique de type D1 sont impliqués dans l'anorexie chez les vertébrés (Cheng & Kuo, 2003). Le mécanisme alimentaire

de la satiété, contrôlé par un système catécholaminergique, a peut-être très tôt fait son apparition et il aurait été conservé depuis le Cambrien chez tous les animaux.

Perspectives

Au cours de mes essais pharmacologiques effectués sur le récepteur Ren1, une réponse importante a été observée avec l'aténolol, un antagoniste β 1-adrénergique (résultats non présentés). Ces réponses se traduisaient par une augmentation d'AMPC pouvant être 20 fois supérieure à la valeur du témoin. Cependant, aucune courbe concentration-effet n'a pu être générée avec cette drogue. Seul un effet non linéaire, fortement variable d'une expérience à l'autre, a été observé. L'effet agoniste de l'aténolol est documenté chez *Renilla*. L'aténolol induit la luminescence d'une manière concentration-effet et cette activité lumineuse peut être abolie par le (-)propranolol, le (-)pindolol, l'alprénolol ou le CGP12177 (Awad et Anctil, 1993a). De plus, des études de radioliation sur des préparations membranaires de tissus de la rénille ont montré que l'aténolol déplace le radioligand $[H^3]$ -CGP12177 du site₁, lequel possède des caractéristiques pharmacologiques du récepteur β 2-adrénergique (Awad et Anctil, 1993a).

Que des antagonistes puissent agir comme agonistes est un fait connu. Le récepteur β -adrénergique de la dinde, par exemple, rendu spontanément actif en enlevant une partie de son extrémité C-terminale, répond aux antagonistes alprénolol et propranolol en augmentant les niveaux d'AMPC intracellulaire davantage encore (Parker et Ross, 1991). De même, les niveaux d'AMPC augmentent lorsque le

récepteur β 1-adrénergique humain est en présence de CGP12177, d'acébutol, de carvédilol, de labétolol, de propranolol, d'alprénolol ou de pindolol (Baker et al., 2003). De plus, la stimulation occasionnée par ces drogues est inhibée en présence de l'antagoniste β 1-adrénergique CGP20712A.

A ma connaissance, aucun effet agoniste n'est documenté pour l'aténolol. Les accroissements d'AMPc intracellulaire importants et variables causés par l'aténolol sont peut être la conséquence d'une instabilité structurale du récepteur (Gether et al., 1997). Ren1 exprimé dans les cellules de mammifère produisait une activité indépendante d'un agoniste qui se traduisait par une augmentation du niveau d'AMPc dans le cytosol. En fait, il est possible que l'état constitutif de Ren1 lui permette une flexibilité de conformation capable de lier l'aténolol et d'activer une voie intracellulaire mais le tout d'une manière désordonnée. Quoiqu'il en soit, je crois que cette observation offre une piste intéressante dans la poursuite future de l'identification d'un ligand pour Ren1.

Les sites responsables d'activités intrinsèques sont plus ou moins localisés et fort variables d'un récepteur à un autre. Il n'en demeure pas moins que certains domaines du polypeptide sont plus fortement associés à l'activité spontanée du récepteur. Par exemple, la région C-terminale de la 3e boucle intracellulaire du récepteur β 2-adrénergique contient le motif EX₁KAX₂K où X₁ est un résidu quelconque et X₂ est une leucine. Si le résidu leucine est substitué par une alanine, le récepteur β 2-adrénergique mutant devient alors actif constitutivement. A l'instar du

récepteur β 2-adrénergique, le récepteur à la sérotonine de la souris m5-HT_{4(e)}, un récepteur actif constitutivement, possède aussi le motif EX₁KAX₂K, mais la position X₂ est cette fois-ci représentée par une alanine. Si l'alanine est remplacée par une leucine, contrairement à ce que nous aurions pu prévoir, le récepteur à la sérotonine devient alors plus fortement actif (Claeyssen *et al.*, 1999). Le motif EX₁KAX₂K est aussi retrouvé chez Ren1. Comme pour m5-HT_{4(e)}, un récepteur actif constitutivement, la position X₂ de Ren1 est une alanine. Il serait intéressant de muter l'alanine de Ren1 en une leucine pour savoir s'il en résulte un changement d'état d'activité à la hausse, comme dans le cas du récepteur à la sérotonine, ou à la baisse, comme pour le récepteur à l'adrénaline. Cet exemple illustre bien comme il est difficile de prédire l'état d'activation d'un récepteur à partir de la seule séquence primaire. Il faut croire que les causes de l'activité spontanée d'un récepteur tiennent probablement davantage de la structure tertiaire (Shi et Javitch, 2002). Si cependant une étude portant sur l'activité constitutive de Ren1 venait à être faite, la région C-terminale de la 3^e boucle intracellulaire serait une cible toute désignée.

Idéalement, Ren1 et Ren2 auraient été exprimés dans des cellules de cnidaire mais une telle lignée cellulaire n'est pas encore établie. Il existe cependant une anémone de mer (*Nematostella*) qui prolifère bien en laboratoire et dont les oeufs pourraient être utilisés comme système cellulaire-hôte pour exprimer les récepteurs de *Renilla*. L'utilisation d'oeufs d'anthozoaire serait sûrement un avantage au cas où un facteur cytosolique typique aux anthozoaires jouerait un rôle auprès du récepteur. De plus le système serait approprié pour effectuer des études électrophysiologiques. Il

existe une possibilité cependant, qu'aucune des drogues qui ont été testées sur Ren1 et Ren2 soit la bonne et que les ligands des récepteurs de *Renilla* demeurent à découvrir. Quelques études chromatographiques relatées dans la littérature des cnidaires ont montré qu'il existe des substances aminergiques qui n'ont pas encore été identifiées. Dans la mesure où les études portant sur les récepteurs des cnidaires prendront de l'ampleur, l'identification de nouvelles substances présentes chez ces animaux deviendra essentielle.

Bibliographie

Ancil M. (1987) Bioactivity of FMRFamide and related peptides on a contractile system of the coelenterate *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Physiol.* **B157**, 31-38.

Ancil M. (1989) Modulation of a rhythmic activity by serotonin via cAMP in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Physiol.* **B159**, 491-500.

Ancil M., Boulay D. et LaRivière L. (1982) Monoaminergic mechanisms associated with control of luminescence and contractile activities in the coelenterate, *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Zool.* **223**, 11-24.

Ancil M., Germain G. et LaRivière L. (1984) Catecholamines in the cnidarian *Renilla koellikeri*: uptake and radioautographic localization. *Cell Tissue Res.* **238**, 69-80.

Ancil M. et Grimmelikhuijzen C. J. P. (1989) Excitatory action of the native neuropeptide antho-RFamide on muscles in the pennatulid *Renilla koellikeri*. *Gen. Pharmac.* **20**, 381-384.

Ancil M., Pani A. K. et Ali M. A. (1991) Modulation of rhythmic contractions by melatonin via cyclic GMP in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Physiol.* **B161**, 569-575.

Ancil M. et Minh C. N. (1997) Neuronal and nonneuronal taurine-like immunoreactivity in the sea pansy, *Renilla koellikeri* (Cnidaria, Anthozoa). *Cell Tissue Res.* **288**, 127-34.

Ancil M., Hurtubise P. et Gillis M.-A. (2002) Tyrosine hydroxylase and dopamine- β -hydroxylase immunoreactivities in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *Cell Tissue Res.* **310**, 109-117.

Anderson P. A. V. (1985) Physiology of a bidirectional, excitatory chemical synapse. *J. Neurophysiol.* **53**, 821-835.

Anderson P. A. V. et Case J. F. (1975) Electrical activity associated with luminescence and other colonial behavior in the Pennatulid *Renilla Köllikeri*. *Biol. Bull.* **149**, 80-95.

Anderson P. A. V. et Mackie. (1977) Electrically coupled, photosensitive neurons control swimming in a jellyfish. *Science.* **197**, 186-188.

Anderson P. A. V. et Schwab W. E. (1981) The organization of structure of nerve and muscle in the jellyfish *Cyanea capillata* (coelenterata; scyphozoa). *J. Morphol.* **170**, 383-399.

Anderson P. A. V. et Schwab W. E. (1982) Recent advances and model systems in coelenterate neurobiology. *Prog. Neurobiol.* **19**, 213-236.

Anderson P. A. V. et Grünert U. (1988) Three-dimensional structure of bidirectional, excitatory chemical synapses in jellyfish *Cyanea capillata*. *Synapse.* **2**, 606-613.

Anderson P. A. V. et Spencer A. N. (1989) The importance of cnidarian synapses for neurobiology. *J. Neurobiol.* **20**, 435-457.

Anderson P. A. V. et Trapido-Rosenthal H. G. (1990) The importance of cnidarian synapses for neurobiology. *J. Neurobiol.* **20**, 435-457.

Ango F., Prezeau L., Muller T., Tu J. C., Xiao B., Worley P. F., Pin J. P., Bockaert J. et Fagni L. (2001) Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature.* **411**, 962-965.

Arkett S. A. et Spencer A. N. (1986) Neuronal mechanisms of a hydromedusan shadow reflex. II. Gades response of reflex components, possible mechanisms of photic integration, and functional significance. *J. Comp. Physiol. A.* **159**, 215-225.

Arora K. K., Cheng Z. et Catt K. J. (1997) Mutations of the conserved DRS motif in the second intracellular loop of the gonadotropine-releasing hormone receptor affect expression, activation, and internalization. *Mol. Endo.* **11**, 1203-1212.

Arvanitakis L., Geras-Raaka E. et Gerhengorn M. C. (1998) Constitutively signaling G-protein-coupled receptors and human disease. *TEM.* **9**, 27-31.

Awad E. W. et Anctil M. (1993a) Identification of β -like adrenoreceptors associated with bioluminescence in the sea pansy *Renilla koellikeri* (Cnidaria, Anthozoa). *J. Exp. Biol.* **177**, 181-200.

Awad E. W. et Anctil M. (1993b) Positive coupling of b-like adrenergic receptors with adenylate cyclase in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Biol.* **182**, 131-146.

Awad E. W. et Anctil M. (1994) Distribution of β 2-like adrenergic receptors in the cnidarian *Renilla koellikeri* as revealed by autoradiography and *in situ* hybridization. *Cell Tissue Res.* **278**, 207-215.

Bacq Z. M. (1975) Chemical transmission of nerve impulses: a historical sketch. pp. 76-82. Pergamon Press Ltd.

Baker J. G., Hall I. P. et Hill S. J. (2003) Agonist actions of "beta-blockers" provide evidence for two agonist activation sites or conformations of the human beta1-adrenoceptor. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1312-1321.

Benovic J. L., Kuhn H., Weyland I., Codina J., Caron M. G. et Lefkowitz R. J. (1987) Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic

receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8879-8882.

Blenau W., Erber J. et Baumann A. (1998) Characterization of a dopamine D1 receptor from *Apis mellifera*: cloning, functional expression, pharmacology, and mRNA localisation in the brain. *J. Neurochem.* **70**, 15-23.

Botto J.-M. <http://www.123bio.net/revues/rcpg/amines.html>

Brinck C., Carlberg M. et Eloffson R. (1989) Identification of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in the brain of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) and the tentacles of the sea anemone *Metridium senile* (L.) by use of gas chromatography-mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol. C* **92**, 201-203.

Buck J. (1973) Boluminescent behavior in *Renilla*. I Colonial responses. *Biol. Bull.* **144**, 19-42.

Carlberg M. (1983) Evidence of Dopa in the nerves of sea anemones. *J. Neural transmission* **57**, 75-84.

Carlberg M. (1992) Localization of dopamine in the freshwater hydrozoan *Hydra attenuata*. *Cell Tissue Res.* **270**, 601-607.

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

Carlberg M. et Eloffson R. (1987) Localisation of 3,4-dihydroxyphenylalanine and 3,4,5-tri-hydroxyphenylalanine in a coelenterate nervous system: possibly a tyrosinase-mediated accumulation. *Neurochem. Int.* **11**, 161-167.

Carlyle R. F. (1969) The occurrence of catecholamines in the sea anemone *Actinia equina*. *Br. J. Pharmacol.* **36**, 182.

Carlyle R. F. (1974) The occurrence in and actions of amino acids on isolated supra oral sphincter preparations of the sea anemone *Actinia equina*. *J. Physiol.* **236**, 635-652.

Case J. et Morin J. (1966) Glutamate suppression of neuroeffector processes in coelenterate. *Am. Zool.* **6**, 525, 1966.

Castano P. et Rossi S. (1978) Cytochemical ultrastructural and fluorescence study of the nervous net of *hydra* sp. *J. Submicr. Cytol.* **10**, 381-395.

Cavalier-Smith T., Allsopp M. T. E. P., Chao E. E., Boury-Esnault N. et Vacelet J. (1996) Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can. J. Zool.* **74**, 2031-2045.

Cheng J. T., Kuo D. Y. (2003) Both alpha1-adrenergic and D(1)-dopaminergic neurotransmissions are involved in phenylpropanolamine-mediated feeding suppression in mice. *Neurosci Lett.* **347**, 136-8.

Chung J. M., Spencer A. N. et Gahm K. H. (1989) Dopamine in tissues of the hydrozoan jellyfish *Polyorchis penicillatus* as revealed by HPLC and GC/MS. *J. Comp. Physiol.[B]*. **159**, 173-181.

Chung J. M. et Spencer A. N. (1991a) Dopamine as a neuroactive substance in the jellyfish *Polyorchis penicillatus*. *J. Exp. Biol.* **156**, 433-451.

Chung J. M. et Spencer A. N. (1991b) Dopamine acts through a D2-like receptor on a jellyfish motor neuron. *J. Comp. Physiol.[A]* **169**, 599-606.

Civelli O. (1998) Functional genomics: the search for novel neurotransmitters and neuropeptides. *FEBS Letters* **430**, 55-58.

Clayeyen S., Sebben M., Becamel C., Bockaert F. et Dumuis A. (1999) Novel brain-specific 5-HT₄ receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain. *Mol. Pharmacol.* **55**, 910-920.

Clapham D. E. et Neer E. J. (1997) G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 167-203.

Concas A., Pierobon P., Mostallino M. C., Porcu P., Marino G., Minei R. et Biggio G. (1998) Modulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors and the feeding response by neurosteroids in *Hydra vulgaris*. *Neuroscience.* **85**, 979-88.

Conway Morris S. (1993) The fossile record and the early evolution of the Metazoa. *Nature.* **361**, 219-225.

Cook J. et Eidne K. A. (1997) An intramolecular disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the gonadotropin releasing hormone receptor is essential for binding and activation. *Endocrinology.* **138**, 2800-2806.

Dahl E., Falck B., Von Mecklenburg C. et Myhrberg H. (1963) An adrenergic nervous system in the sea anemones. *Quart. J. Micr. Sci.* **104**, 531-534.

De Waele J.-P., Anctil M. et Calberg M. (1987) Biogenic catecholamines in the cnidarian *Renilla koellikeri*: radioenzymatic and chromatographic detection. *Can. J. Zool.* **65**, 2458-2465.

Durocher Y., Perret S., Thibaudeau E., Gaumond M.-H., Kamen A., Stocco R. et Abramovitz M. (2000) A reporter gene assay for high-throughput screening of G-

protein-coupled receptors stably or transiently expressed in HEK293 EBNA cells grown in suspension culture. *Analytical Biochem.* **284**, 316-326.

Elofsson R., Falck B., Lindvall O. et Myhrberg H. (1977) Evidence for new catecholamines or related amino acids in some invertebrate sensory neurons. *Cell Tiss. Res.* **182**, 525-536.

Ergolu C., Brügger B., Wieland F. et Sinning I. (2003) Glutamate-binding affinity of *Drosophila* metabotropic glutamate receptor is modulated by association with lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 10219-10224.

Erzen I. et Brzin M. (1978) Cholinergic mechanisms in *Hydra*. *Comp. Biochem. Physiol.* **59**, 39-43.

Feng G., Hannan F., Reale V., Yi Hon Y., Kousky Evans P. D. et Hall L. (1996) Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **16**, 3925-3933.

Gagnon A. W., Kallal L. et Benovic J. L. (1998) Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the β 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 6976-6980.

Gether U., Ballesteros J. A., Seifert R., Sanders-Bush E., Weinstein H. et Kobilka B. K. Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. (1997) Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *J. Biol. Chem.* **272**, 2587-2590.

Gillis M.-A. et Anciaux M. (2001) Monoamine release by neurons of a primitive nervous system: an amperometric study. *J. Neurochem.* **76**, 1774-1784.

Ginsborg B. L., House C. R. et Silinsky E. M. (1976) On the receptors which mediate the hyperpolarization of salivary gland cells of *Nauphoeta cinerea* Olivier. *J. Physiol.* **262**(2), 489-500.

Gotzes F., Balfanz S. et Baumann. (1994) Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Receptors and Channels.* **2**:131-141.

Grassé P. *Traité de zoologie.* (1987) Masson et Cie Éditeurs. Tome III.

Grimmelikhuijzen C. J. P. (1983) FMRFamide immunoreactivity is generally occurring in the nervous systems of coelenterates. *Histochemistry.* **78**(3), 361-381.

Grimmelikhuijzen C. J. P. et Spencer. (1984) FMRFamide immunoreactivity in the nervous system of the medusa *Polyorchis penicillatus*. *J. Comp. Neurol.* **230**(3), 361-71.

Grimmelikhuijzen C. J. P. et Graff. (1985) Arg-Phe-amide-like peptides in the primitive nervous systems of coelenterates. *Peptides.* 6 Suppl **3**, 477-483.

Grimmelikhuijzen C. J. P. et Westfall J. A. (1995) The nervous systems of cnidarians, dans *The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach*, (Breidbach O. et Kutsch W., eds), pp. 7-24. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Grimmelikhuijzen C. J. P. Williamson M et Hansen G. N. (2002) Neuropeptides in cnidarians. *Can. J. Zool.* **80**, 1690-1702.

Grisshammer R. et Tate C. G. (1995) Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys.* **28**, 315-422.

Grosvenor W., Rhoads D. E. et Kass-Simon. (1996) Chemoreceptive control of feeding processes in *Hydra*. *Chem. Senses*. **21**, 313-321.

Gudermann T., Kalkbrenner F. et Schultz G. (1996) Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 429-459.

Hajj-Ali I. et Anctil M. (1997) Characterisation of a serotonin receptor in the cnidarian *Renilla koellikeri*: a radiobinding analysis. *Neurochem. Int.* **1**, 83-93.

Hall R. A., Premont R.T. et Lefkowitz R. J. (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* **145**(5), 927-932.

Hanai K. et Kitajima M. (1984) Two types of surface amine receptors modulating the feeding response in *Hydra japonica*: the depressing action of dopamine and related amines. *Chem. Senses*. **9**(4), 355-367.

Hasegawa H., Negishi M. et Ichikawa A. (1996) Two isoforms of the prostaglandin E receptor EP3 subtype different in agonist-independent constitutive activity. *J. Biol. Chem.* **271**:1857-1860.

Hearn M. G., Ren Y., McBride E. W., Reveillaud I., Beinborn M. et Kopin A.S. (2002) A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**,14554-14559.

Hoffmann U. et Kroiher M. (2001) A possible role for the cnidarian homologue of serum response factor in decision making by undifferentiated cells. *Dev Biol.* **236**, 304-15.

HorrIDGE G. A. et Mackay B. (1962) Naked axons and symmetrical synapses in coelenterates. *Q. J. Microsc. Sci.* **105**, 531-541.

Horridge G. A. Chapman D. M. et Mackay B. (1962) Naked axons and symmetrical synapses in an elementary nervous system. *Nature*. **193**, 899-900.

House C. R. et Ginsborg B. L. (1976) Actions of a dopamine analogue and a neuroleptic at a neuroglandular synapse. *Nature*. **261**, 332-333.

Huang X., Duran E., Diaz F., Xiao H., Messer W.S. et Komuniecki R. (1999) Alternative-splicing of serotonin receptor isoforms in the pharynx and muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Molec. Biochem. Parasito.* **101**, 95-106.

Hudman D. et McFarlane I. D. (1995) The role of L-DOPA in the nervous system of sea anemones: A putative inhibitory transmitter in tentacles. *J. Exp. Biol.* **198**, 1045-1050.

Jin H., George S. R., Bouvier M. et O'Dowd B. F. (2000) Regulation of G protein-coupled receptor function and expression. pp. 93-117, Edité par J. L. Benovic. Wiley-Liss, Inc.

Jha R. K. & Mackie G. O. (1967) The recognition, distribution and ultrastructure of hydrozoan nerve elements. *J. Morphol.* **123**, 43-62.

Kastendiek J. (1975) The role of behaviour and interspecific interactions in determining the distribution and abundance of *Renilla koellikeri* Pfeffer, a member of a subtidal sand bottom community. Thèse de doctorat, Université de Californie à Los Angeles.

Kass-Simon G., et Passano L. M. (1978) A neuropharmacological analysis of the pacemakers and conducting tissues of *Hydra attenuata*. *J. Comp. Physiol.* **128**, 27-79, 1978.

Kikkawa H., Kurose H., Isogaya M., Sato Y. et Nagao T. (1997) Differential contribution of two serine residues of wild type and constitutively active β 2-adrenoreceptors to the interaction with β 2-selective agonists. *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 11059-1064.

Kimura Y., Corcoran E. E., Eto K., Gengyo-Ando K., Muramatsu M., Kobayashi R., Freedman J. H., Mitani S., Hagiwara M., Means A. R. et Tokumitsu H. (2002) A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Reports* **3**, 962-966.

Kinnamon J. C. et Westfall J. A. (1982) Type of neurone and synaptic connections at hypostome-tentacle junctions in *Hydra*. *J. Morphol.* **173**, 119-128.

Koizumi O., Wilson J. D., Grimmelikhuijzen C. J. et Westfall J. A. (1989) Ultrastructural localization of RFamide-like peptides in neuronal dense-cored vesicles in the peduncle of *Hydra*. *J. Exp. Zool.* **249**, 17-22.

Kolberg K. J. S. et Martin V. J. (1988) Morphological, cytochemical and neuropharmacological evidence for the presence of catecholamines in hydrozoan planulae. *Development* **103**, 249-258.

Kozell L. B. et Neve K. A. (1997) Constitutive activity of a chimeric D2/D1 dopamine receptor. *Molec. Pharmacol.* **52**, 1137-1149.

Landry Y. et Gies J.- P. (1993) *Pharmacologie Moléculaire*. Deuxième Édition. Arnette, Paris.

Lefkowitz R.J., Cotecchia S., Samana P. et Costa T. (1993) Constitutive activity of receptors couples to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends pharmacol. Sci.* **14**, 303-307.

Lenhoff H. M. (1974) On the mechanism of action and evolution of receptors associated with feeding and digestion, dans *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*, (Muscatine L. et Lenhoff H. M., eds), pp. 221-243. Academic Press, Inc. New York.

Lenicque P. M., Toneby M. I. et Doumenc (1977) D. Demonstration of biogenic amines and localization of monoamine oxidases in the sea anemone *Metridium senile* (Linné). *Comp. Biochem. Physiol* **56**, 31-34.

Lentz T. L. et Barnett R. J. (1963) The role of the nervous system in regenerating *hydra*: the effect of neuropharmacological agents. *J. Exp. Zool.* **154**, 305-327.

Lin Y. C., Gallin W. J., Spencer A. N. (2001) The anatomy of the nervous system of the hydrozoan jellyfish, *Polyorchis penicillatus*, as revealed by a monoclonal antibody. *Invert Neurosci.* **4**, 65-75.

Logothetis D. E., Kurachi Y., Galper J., Neer E. J. Clapham D. E. (1987) The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature* **325**, 321-326.

Lyke E.B. (1965) The histology of the sea pansies *Renilla pesiformis* (pallas) and *Renilla koellikeri* (pfeffer) with a note on the fine structure of the latter species. Thèse de doctorat, Université du Wisconsin.

Mathias A. P., Ross D. M. et Schachter. (1957) Identification and distribution of 5-hydroxytryptamine in a sea anemone. *Nature.* **180**, 658-659.

McFarlane I. D., Anderson P. A. et Grimmelikhuijzen C. J. P. (1991) Effects of three anthozoan neuropeptides, Antho-RWamide I, Antho-RWamide II and Antho-RFamide, on slow muscles from sea anemones. *J. Exp. Biol.* **156**, 419-31.

Mechawar N. et Anctil M. (1997) Melatonin in a primitive metazoan : seasonal changes of levels and immunohistochemical visualization in neurons. *J. Comp. Neurol.* **387**, 243-254.

Morris A. J. et Malbon C. C. (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Reviews.* **70**, 1373-1430.

Morris A. J. et Scarlata S. (1997) Regulation of effectors by G-protein α - and $\beta\gamma$ -subunits. Recent insights from studies of the phospholipase isoenzymes. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 429-435.

Nathans J. and Hogness D. S. (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell.* **34**, 807-14.

New D. C., McGaughey N. J., Wong Y. H. et Wong J. T. Y. (1998) Evidence for heterotrimeric G proteins in the sea anemones. *Mol. Mar. Biol. Technol.* **7**, 31-38.

New D. C., Wong Y. H. et Wong J. T. Y. (2000) Cloning of a novel G-protein-coupled receptor from the sea anemone nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 761-769.

Nicol J. A. C. (1955a) Observation of bioluminescence in *Renilla* (Pennatulacea). *J. Exp. Biol.* **32**, 299-320.

Nicol J. A. C. (1955b) Nervous regulation of luminescence in the sea pansy *Renilla köllikeri*. *J. Exp. Biol.* **32**, 619-635.

Niswender C. M., Copeland S. C., Herrick-Davis K., Emeson R. B. et Sanders-Bush E. (1999) RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J. Biol. Chem.* **14**, 9472-9478.

Nothacker H.-P. et Grimmelikhuijzen C. J .P. (1993) Molecular cloning of a novel, putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 1062-1069.

Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H, Yamanaka I, Kiyosawa H, Yagi K, Tomaru Y, Hasegawa Y, Nogami A, Schonbach C, Gojobori T, Baldarelli R, Hill DP, Bult C, Hume DA, Quackenbush J, Schriml LM, Kanapin A, Matsuda H, Batalov S, Beisel KW, Blake JA, Bradt D, Brusic V, Chothia C, Corbani LE, Cousins S, Dalla E, Dragani TA, Fletcher CF, Forrest A, Frazer KS, Gaasterland T, Gariboldi M, Gissi C, Godzik A, Gough J, Grimmond S, Gustincich S, Hirokawa N, Jackson IJ, Jarvis ED, Kanai A, Kawaji H, Kawasaki Y, Kedzierski RM, King BL, Konagaya A, Kurochkin IV, Lee Y, Lenhard B, Lyons PA, Maglott DR, Maltais L, Marchionni L, McKenzie L, Miki H, Nagashima T, Numata K, Okido T, Pavan WJ, Perteu G, Pesole G, Petrovsky N, Pillai R, Pontius JU, Qi D, Ramachandran S, Ravasi T, Reed JC, Reed DJ, Reid J, Ring BZ, Ringwald M, Sandelin A, Schneider C, Semple CA, Setou M, Shimada K, Sultana R, Takenaka Y, Taylor MS, Teasdale RD, Tomita M, Verardo R, Wagner L, Wahlestedt C, Wang Y, Watanabe Y, Wells C, Wilming LG, Wynshaw-Boris A, Yanagisawa M, Yang I, Yang L, Yuan Z, Zavolan M, Zhu Y, Zimmer A, Carninci P, Hayatsu N, Hirozane-Kishikawa T, Konno H, Nakamura M, Sakazume N, Sato K, Shiraki T, Waki K, Kawai J, Aizawa K, Arakawa T, Fukuda S, Hara A, Hashizume W, Imotani K, Ishii Y, Itoh M, Kagawa I, Miyazaki A, Sakai K, Sasaki D, Shibata K, Shinagawa A, Yasunishi A, Yoshino M, Waterston R, Lander ES, Rogers J, Birney E, Hayashizaki Y; FANTOM Consortium.; RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team. 2002. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature.* 420(6915), 563-73.

Ovchinnikov Y. (1982) Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. *FEBS Letters* **148**, 179-191.

Pani A.K. et Anctil M. (1994a) Quantitative survey of biogenic amines, their precursors and metabolites in the coelenterate *Renilla koelikeri*. *Biogenic Amines* **10**, 161-180.

Pani A.K. et Anctil M. (1994b) Evidence for biosynthesis and catabolism of monoamines in the sea pansy *Renilla koelikeri* (Cnidaria). *Neurochem. Int.* **25**, 465-474.

Pani A.K., Anctil M. et Umbriaco D. (1995) Neuronal localization and evoked release of norepinephrine in the cnidarian *Renilla koelikeri*. *J. Exp. Zool.* **272**, 1-12.

Parker G. H. (1920) Activities of colonial animals. II. Neuromuscular movements and phosphorescence in *Renilla*. *J. Exp. Zool.* **31**, 475-515.

Parker E. M. et Ross E. M. (1991) Truncation of the extended carboxyl-terminal domain increases the expression and regulatory activity of the avian beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 9987-96.

Parma J., Dupez L., Van Sande, Cochaux P., Gervy C., Mockel J., Dumont J. et Vassart G. (1993) Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature*. **365**, 649-651.

Pierce K. L., Premont R. T. et Lefkowitz R. J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews*. **3**, 639-650.

Pierobon P., Minei R., Porcu P., Sogliano C., Tino A., Marino G., Biggio G. et Concas A. (2001) Putative glycine receptors in *Hydra*: a biochemical and behavioural study. *Eur J Neurosci.* **14**, 1659-66.

Rao V. R., Cohen G. B. et Oprian D. D. (1994) Rhodopsin mutation G80D and a molecular mechanism for congenital night blindness. *Nature*. **367**, 639-642.

Roberts A. et Mackie G. O. (1980) The giant axon escape system of a hydrozoan medusa, *Aglantha digitale*. *J. Exp. Biol.* **84**, 303-318.

Ross D. M. (1960) The effects of ions and drugs on neuromuscular preparations of the sea anemones. *J. Exp. Biol.* **37**, 732-752.

Roth B. L., Willins D. L., Kristiansen K. et Kroeze W. K. (1998) 5-hydroxytryptamine₂-family receptors (5-hydroxytryptamine_{2A}, 5-hydroxytryptamine_{2B}, 5-hydroxytryptamine_{2C}): where structure meets function. *Pharmacol. Ther.* **79**, 231-257.

Satterlie R.A. et Case J. F. (1978) Neurobiology of the gorgonian coelenterates, *Muricea californica* and *Lophogorgia chilensis*. II. Morphology. *Cell Tiss. Res.* **187**, 379-396.

Satterlie R.A. et Case J. F. (1980) Neurobiology of the stoloniferan octocoral *Clavularia* sp. *J. Exp. Zool.* **212**, 87-99.

Satterlie R.A. Anderson P. A. V. et Case J. F. (1980) Colonial coordination in anthozoan: *Pennatulacea*. *Mar. Behav. Physiol.* **7**, 25-46.

Satterlie R.A. et Spencer A. (1983) Neuronal control of locomotion in hydrozoan medusea. A comparative study. *J. Comp. Physiol.* **150A**, 195-206.

Satterlie R.A. et Spencer A. (1987) Organisation of conducting systems in simple invertebrates: Porifera, Cnidaria and Ctenophora. *Nervous Systems in Invertebrates*. Ed. M.A. Ali., pp.213-264. New York: Plenum Press.

Saudou F., Amlaiky N., Plassat J.-L., Borrelli E. et Hen R. (1990) Cloning and characterisation of a *Drosophila* tyramine receptor. *EMBO J.* **9**, 3611-3617.

- Schetz J. A. et Anderson P. A. V. (1993) Investigations of lipid component of neurone-enriched membranes of the jellyfish *Cyanea capillata*. *J. Exp. Biol.* **177**, 23-39.
- Shaw C. A. et Wilkinson M. (1994) Receptor characterisation and regulation in intact tissue preparations. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1109-1119.
- Shenker A., Laue L., Kosugi S. Merendino J. J., Minegishi T. et Cutler G. B. A. (1993) constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature.* **365**, 652-654.
- Shi L. et Javitch J. A. (2002) The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 437-467.
- Singla C. L. (1978) Fine structure of the neuromuscular system of *Polyorchis penicillatus* (Hydromedusae; Cnidaria). *Cell Tiss. Res.* **193**, 163-194.
- Smith S., Oshida J. et Bode H. (1974) Inhibition of nematocytes discharge in *hydra* fed to repletion. *Biol. Bull.* 147: 169-177.
- Söhlemann P., Soppa J., Oesterhelt D. et Lohse M. (1997) Expression of β 2-adrenoceptors in halobacteria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **355**, 150-160.
- Solomou E. E., Juang Y.-T. et Tsokos G. C. (2001) Protein kinase C- θ participates in the activation of cyclic AMP-Responsive Element-Binding protein and its subsequent binding to the -180 site of the IL-2 promoter in normal human T lymphocytes. *J. Immunol.* **166**, 5665-5674.
- Spencer A. N. (1978) Neurobiology of Polyorchis. II. Structure of effector systems. *J. Neurobiol.* **10**, 94-117.

Spencer A. N. (1979) Neurobiology of *Polyorchis*. II. Structure of effector systems. *J. Neurobiol.* **10**, 95-117.

Spencer A. N. (1981) The parameters and properties of a group of electrically coupled neurons in the central nervous system of an hydrozoan jellyfish. *J. Exp. Biol.* **93**, 33-50.

Spencer A. N. et Arkett S. A. (1984) Radial symmetry and the organization of a central neurons in a coelenterat. *J. Exp. Biol.* **110**, 69-90.

Stanley S. M. Can neurons explain the Cambrian explosion Geol. Soc. Amer. Abstr. Progrms. *27*(7), A45.

Stokes D. R. (1974) Morphological substrates of conduction in the colonial hydroid *Hydractinia echinata*. I. An ectodermal nerve net. *J. Exp. Zool.* **190**, 19-46.

Stratowa C., Himmler A. et Czernilofski A. P. (1995) Use of a luciferase reporter system for characterizing G-protein-linked receptors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 574-581.

Sugamori K. S., Demchyshyn L. L., McConkey F., Forte M. A. et Niznik H. B. (1995) A primordial dopamine D1-like adenylyl cyclase-linked receptor from *Drosophila melanogaster* displaying poor affinity for benzazepines. *FEBS Lett.* **362**, 131-8.

Sun P., Lou L. et Maurer R. A. (1996) Regulation of activating transcription factor-1 and the cAMP response element-binding protein by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV. *J Biol Chem.* **271**, 3066-73.

Suo S., Sasagawa N. et Ishiura. (2002) Identification of a dopamine receptor from *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci. Lett.* **319**, 13-16.

- Suo S., Sasagawa N. et Ishiura. (2003) Cloning and characterization of a *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor. *J. Neurochem.* **86**, 869-878.
- Takeda N. et Svendsen. (1991) Monoamine concentration in *Hydra magnipapillata*. *Hydrobiologia* **216/217**, 549-554.
- Tsang W. H., McGaughey Y. H., Wong Y. H. et Wong J. T. Y. (1997) Melatonin and 5-methoxytryptamine induced muscular contraction in sea anemones. *J. Exp. Zool.* **279**, 201-207.
- Umbriaco D., Anctil M. et Descarries L. (1990) Serotonin-immunoreactive neurons in the Cnidarian *Renilla Koellikeri*. *J. Comp. Neurol.* **291**, 167-178.
- Venturini G., Silei O., Palladini G., Carolei A. et Margota V. (1984) Aminergic neurotransmitters and adenylate cyclase in Hydra. *Comp. Biochem. Physiol.* **78C**, 345-348.
- Weber L., Singla C. L. et Kerfoot P. A. H. (1982) Microanatomy of the subumbrellar motor innervation in *Aglantha digitale* (Hydromedusae, Trachylina). *Cell Tiss. Res.* **223**, 305-312.
- Welsh J. H. (1960) 5-hydroxytryptamine in coelenterates. *Nature.* **186**, 811-812.
- Werman R. (1966) Criteria for identification of a central nervous system transmitter. *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 745-766.
- Westfall J. A. (1970a) Ultrastructure of synapses in a primitive coelenterate. *J. Ultrastruct. Res.* **32**, 237-246.
- Westfall J. A. (1970b) The nematocyte complex in a Hydromedusan, *Gonionemus vertens*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **110**, 457-470.

Westfall J. A. (1973a) Ultrastructural evidence for a granule-containing sensory-motor-interneuron in *Hydra littoralis*. *J. Ultrastruct. Res.* **42**, 268-82.

Westfall J. A. (1973b) Ultrastructure evidence for neuromuscular systems in coelenterates. *Amer. Zool.* **13**, 237-246.

Westfall J. A. (1987) Ultrastructure of invertebrate synapses. *Dans Nervous Systems in Invertebrates*. Ed. M.A. Ali. pp.3-28. New York: Plenum Publishing Corporation.

Westfall J. A. (1996) Ultrastructure of synapses in the first-evolved nervous systems. *J. Neurocytol.* **25**, 735-746.

Westfall J. A., Yamataka S. et Enos P. D. (1971) Ultrastructural evidence of polarized synapses in the nerve net of *Hydra*. *J. Cell Biol.* **51**, 318-323.

Westfall J. A. et Kinnamon J. C. (1978) A second sensory-motor-interneuron with neurosecretory granules in *Hydra*. *J. Neurocytol.* **7**, 365-379.

Westfall J. A. et Kinnamon J. C. (1984) Perioral synaptic connections and their possible role in the feeding behavior of *Hydra*. *Tissue Cell.* **16**, 355-65.

Westfall J. A. et Grimmelikhuijzen C. J. P. (1993) Antho-RFamide immunoreactivity in neuronal synaptic and nonsynaptic vesicles of sea anemones. *Biol. Bull.* **185**, 109-114.

Westfall J. A., Sayyar K. L., Elliott C. F. et Grimmelikhuijzen C. J. P. (1995) Ultrastructural localization of antho-RWamides I and II at neuromuscular synapses in the gastrodermis and oral sphincter muscle of the sea anemone *Calliactis parasitica*. *Biol. Bull.* **189**, 280-287.





