



HAL
open science

Origine(s) du système nerveux des Métazoaires et évolution des mécanismes liés au contrôle de la prolifération cellulaire : apports de l'étude chez un Cténaire et un Cnidaire

Alicia Coste

► **To cite this version:**

Alicia Coste. Origine(s) du système nerveux des Métazoaires et évolution des mécanismes liés au contrôle de la prolifération cellulaire : apports de l'étude chez un Cténaire et un Cnidaire. Neurobiologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066629 . tel-01633223v2

HAL Id: tel-01633223

<https://theses.hal.science/tel-01633223v2>

Submitted on 4 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE – PARIS VI

Ecole Doctorale 515 « Complexité du Vivant »

Présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie par

Alicia Coste

Origine(s) du système nerveux des Métazoaires et évolution des mécanismes liés au contrôle de la prolifération cellulaire : apports de l'étude chez un Cténaire et un Cnidaire

Soutenance prévue le 10 Novembre 2015

Devant le jury composé de :

Sylvie RETAUX, Directrice de Recherche CNRS
Denis ALLEMAND, Professeur, Université Nice-Sophia Antipolis
Jorge CUBO, Professeur Université Paris VI
Carine BARREAU, Maître de Conférence, Université Paris VI
Franck BOURRAT, Chargé de Recherche INSERM
Michaël MANUEL, Professeur, Université Paris VI

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Résumé

Les Cnidaires et les Cténares sont deux embranchements extérieurs aux Bilatériens qui, de par leur position phylogénétique, constituent des modèles d'étude cruciaux pour comprendre l'origine et l'évolution de mécanismes moléculaires ou encore de types cellulaires à grande échelle chez les Métazoaires. Ils sont les deux seuls embranchements non-Bilatériens à posséder des cellules nerveuses ainsi que des cellules musculaires. La première partie de mon travail de thèse s'inscrit dans le contexte de la compréhension de l'origine du système nerveux des Métazoaires. Des études récentes suggèrent une origine double du système nerveux ; ainsi celui des Cténares aurait été acquis de manière convergente par rapport à celui des Cnidaires et des Bilatériens. Cela repose sur des données récentes de phylogénomique proposant les Cténares en tant que groupe-frère de tous les autres Métazoaires et sur l'absence supposée chez les Cténares de quasiment tous les systèmes de neurotransmission connus y compris le système cholinergique. A l'encontre de ces hypothèses, j'ai pu mettre en évidence l'existence d'un système cholinergique chez le Cténaire *Pleurobrachia pileus* ainsi que son étroite association avec le système nerveux. Cette conclusion repose sur une multiplicité d'approches à l'échelle moléculaire (analyses d'orthologie, immunolocalisation, hybridations *in situ*), cellulaire (imagerie calcique) et de l'organisme (approche pharmacologique). Dans la seconde partie de ma thèse, j'aborde la question de la conservation des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire à l'échelle des Métazoaires. J'ai pu mettre en évidence la conservation des acteurs de la voie Hippo, voie de signalisation connue comme étant impliquée dans l'arrêt de la prolifération chez les Bilatériens, chez *Clytia hemisphaerica* et *Pleurobrachia pileus*, et suggérer la conservation de leur rôle dans le contrôle de la prolifération. Pour finir, une approche par transcriptomique différentielle mettant à profit l'existence d'un tapis roulant cellulaire chez *Clytia hemisphaerica*, suggère une tendance à la conservation, à l'échelle des Eumétazoaires, de la fonction des gènes connus pour être impliqués dans l'arrêt de la prolifération.

Abstract

Due to their phylogenetic position outside from Bilateria, cnidarians and ctenophores are key phyla to understanding the origin and early evolution of molecular mechanisms, cell types, or body plan features at the level of Metazoa. Unlike other non-bilaterian phyla (sponges and placozoans), they possess neurons and muscle cells. The first part of my work relates to the problem of the origin of the metazoan nervous system. Recent studies have suggested a dual origin for nerve cells, with ctenophore neurons having emerged independently from those of cnidarians and bilaterians. This hypothesis relies on phylogenomic analyses supporting ctenophores as sister-group to all other metazoans, and on the purported absence in ctenophores of almost all well-known neuro-transmission systems, including the cholinergic system. Refuting this claim, I present substantial evidence in favour of acetylcholine (ACh) being used in the ctenophore *Pleurobrachia pileus* as an extra-cellular messenger, including within the nervous system. This conclusion arises from the conjunction of multiple approaches at the molecular scale (orthology analyses, ACh immuno-localisation, gene *in situ* hybridisation), at the cellular scale (calcium imaging on muscle cells exposed to ACh) and at the organism scale (pharmacological treatments with an ACh analogue and ACh antagonists). In the second part of my thesis, I address the conservation of molecular mechanisms involved in the control of cellular proliferation. Notably, the Hippo pathway is known for its role in bilaterians in the negative control of cellular proliferation. I show that components of this pathway are conserved in *Pleurobrachia pileus* and in *Clytia hemisphaerica* and that the nuclear vs. cytoplasmic localisation of the transcriptional co-factor Yorkie is correlated to the extent of proliferation within *C. hemisphaerica* tissues. Finally, RNAseq differential gene expression analyses along a cellular conveyor belt of the *C. hemisphaerica* medusa

suggests a tendency for conservation of function among a set of genes whose mammalian orthologues have documented roles in the arrest of cellular proliferation.

Remerciements

Je commence ces remerciements par un merci général et gigantesque à toute mon équipe. Si je peux dire aujourd'hui que j'ai adoré mes années de thèse, c'est grâce à vous. Vous êtes devenus pour moi comme une seconde famille, où chacun a sa place, son importance et dans laquelle il fait bon vivre. Merci à tous d'avoir été là, et d'avoir fait que cela soit si agréable de venir chaque jour. Je dois avouer aujourd'hui que vous quitter est assez difficile. Dans ma nouvelle vie, chaque matin, je pense à vous et à l'envie de prendre le chemin du labo pour vous retrouver.

Mes premiers remerciements sont évidemment pour Michaël. Merci pour ton encadrement, ta présence, tes enseignements mais aussi pour toutes les réflexions vers lesquelles tu m'as menée. Tu as su me guider tout au long de ma thèse et m'amener à faire les bons choix aux bons moments. Les derniers instants de thèse ont été aussi intenses qu'agréables, et c'est en grande partie grâce à toi. Il a fallu un peu de temps pour que l'on se trouve, se découvre et je suis aujourd'hui heureuse et émue du résultat. Un directeur de thèse, c'est essentiel au cours d'une thèse. Le mien aura été parfait.

Bien sûr, vient ensuite Muriel. J'ai du mal à imaginer une thèse sans Muriel. Ca ne devrait d'ailleurs pas exister. Merci pour tout ce que tu m'as appris mais aussi pour tout ce que tu m'as apporté. Tu as toujours été là, dans les bons moments et les moins bons. Dès que j'avais un problème, qu'il soit scientifique ou personnel, je savais que je pouvais venir te retrouver. Grâce à toi je n'étais jamais perdue. Je dois d'ailleurs avouer que les rares journées où tu n'étais pas là, je ressentais comme un vide. Tu as été l'une des pièces majeures de mon bonheur pendant ces trois années de thèse.

Je tiens ensuite à remercier particulièrement Hervé. De manière formelle, en tant qu'ancien directeur du laboratoire et de l'école doctorale. Et de manière plus personnelle, pour tous les conseils, le soutien, l'écoute, les petits coups de pression ou encore les cafés aux aurores. C'était « trop cool ». Ça a été un réel plaisir et un honneur d'avoir le bureau juste à côté de Monsieur Wikipédia.

Je remercie ensuite Éric qui se situe au point de départ de cette belle histoire : un cours sur le système nerveux des Métazoaires à la prépa agrég, le master 2 qu'il dirigeait puis son labo. Bien sûr ça ne s'arrête pas là. J'ai adoré que tu sois toujours là pour discuter, débattre, me conseiller, j'ai adoré te poser mille questions (et un peu moins que tu restes toujours si mystérieux), j'ai adoré boire des bières avec toi, j'ai adoré te raconter mes secrets, j'ai adoré que tu sois toujours là, de l'autre côté du mur. Merci pour tout ça.

Vient maintenant le tour de Karen. Tout a commencé un mois de septembre, en Allemagne, un congrès-croisière et très vite nous avons pris nos marques. A la jonction entre les « jeunes » et les « moins jeunes », tu as toujours été une personne vers qui je pouvais me tourner. Je savais que quoiqu'il arrive, tu prendrais le temps. Je crois que grâce à toi, toute ma vie, 15h me donnera le sourire. Synonyme de moments privilégiés, de débriefing sur tous les petits « secrets » que l'on avait pu collecter, d'échange de nos petites histoires ; pour rien au monde je n'aurais raté ce moment. Toutes mes manip étaient d'ailleurs organisées en fonction. J'adorais ce moment où tu apparaissais derrière nous, faisant signe que c'était le moment.

Merci ensuite à Jean-Philippe. Merci pour ton aide scientifique et ta disponibilité en toutes circonstances, pour les heures au confocal, pour les castings et les tournages, pour les échanges autour d'un café, pour les discussions sur la vie et les casse-croûtes. J'ai adoré que tu rejoignes notre équipe et la joie de vivre que tu as apporté. Grâce à toi, je ne vois plus le chinois de la même manière.

Merci à tous mes copains thésards de l'équipe. Vous avoir près de moi a été un bonheur incontestable.

Paul, bien sûr. Merci de ton aide et de ta présence quotidienne. Merci d'être devenu l'ami que tu es aujourd'hui. Merci pour tous ces moments, toute la chaleur, tout le bonheur que tu m'as apporté, tous les rires et les V. paillettes d'or, que l'on a partagé. (Merci aussi pour ce long trajet chambre de Joao – Butte aux Cailles). J'aurais voulu que tu ne partes jamais mais l'important aujourd'hui, c'est que tu sois là.

Puis Joao, mon voisin de bureau, mon copain de soirée. Je me souviendrai toujours de cette première soirée à Lisbonne, quelques secondes et tout était dit. J'ai su dès ce moment-là que ça allait être bien que tu sois là. Merci pour toutes ces soirées tous les deux, merci pour les longues marches dans Paris, pour les grandes discussions devant chez l'Indien, merci pour ce mardi, merci de toujours comprendre si vite ce qu'il se passe dans ma vie.

Enfin, le petit Thomas. Merci d'être toujours disponible, merci de toujours m'avoir aidé avec le sourire, même quand je n'avais rien demandé, merci d'avoir fait le meilleur gâteau que j'ai mangé de ma vie. On a eu peu de temps, mais ces derniers mois, je crois pouvoir dire que la transition entre co-thésards et amis s'est faite et je suis heureuse de te connaître et de savoir que ça ne va pas s'arrêter là.

Il reste bien sûr Marie, ma copine de l'autre côté du couloir. Un énorme et immense merci. « Café ?! ». J'adorais recevoir ton message du matin, notre synchronisation, nos discussions du matin, j'adorais savoir que tu étais là, qu'on était dans le même bateau, qu'on le faisait ensemble. Merci d'être aujourd'hui une amie sur laquelle je sais pouvoir compter quoiqu'il arrive.

Je voudrais aussi remercier les anciens thésards de l'équipe, Alex, Cyrielle et Lucas pour leurs conseils et leurs encouragements. Vos visites ont toujours été un plaisir.

Je tiens ensuite à remercier les membres du laboratoire et de l'école doctorale qui m'ont entourée pendant ces années de thèse. Merci à Dominique Higuët d'avoir été un directeur de laboratoire si proche de ses étudiants. Merci à Gaëlle Boutin dont le sourire, la bonne humeur et le professionnalisme m'ont rendu la vie si facile. Merci à Danielle et Philippe pour leur soutien administratif. Merci à Paula et Latifa pour leur aide inestimable mais aussi pour la bonne humeur et la joie que procure chaque jour leur présence au laboratoire.

Un grand merci à mes collaborateurs de Neurosciences du 5^{ème}. Merci de m'avoir accueilli ainsi, merci de votre aide inestimable et de tout l'intérêt que vous avez porté à Pleuro. Un énorme merci à Tentille Alex. Sans toi, tout ça n'aurait bien sûr jamais pu être possible. Merci de m'avoir suivi toute cette année, de m'avoir conseillé et aidé à chaque étape. Merci d'avoir rendu ça si agréable. Merci à Philippe Faure pour le temps qu'il m'a accordé et pour tous ses conseils. Un autre énorme merci à Tentille Bruno, pour m'avoir permis de manipuler dans son laboratoire et pour m'avoir enseigné son savoir concernant le calcium imaging. Et enfin, un immense merci à Juliette, qui a rendu mes longues expériences de calcium imaging mille fois plus agréables que ce qu'elles auraient pu être. Merci de m'avoir consacré autant de temps, pour discuter et pour m'aider à débloquer cette machine.

Merci au Professeur Klein d'avoir accepté de réaliser les expériences d'HPLC sur cet animal mystérieux.

Merci à Eric Krejci de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir conseillé sur l'acétylcholinestérase.

Je tiens maintenant à remercier très sincèrement les membres de mon comité de thèse ainsi que les membres de mon jury de thèse. Merci à tous d'avoir accepté d'évaluer et de partager mon travail.

Je clôture ces remerciements en adressant un immense merci aux gens qui me font l'honneur de partager ma vie, qui ont contribué de près ou de loin à ce que je suis aujourd'hui et qui ont su plus que jamais m'accompagner tout au long de ces trois années.

Je remercie pour commencer les professeurs clés qui ont croisé mon chemin et qui font que je suis là aujourd'hui. Mme De Marcillac, Sophie, Thomas, Eric, et avec une mention spéciale pour Michèle Blaise, sans qui rien de tout ça n'existerait. Un merci sans mesure.

Je remercie bien sûr ma famille, qui a su être à mes côtés, veiller sur moi et comprendre ma relative absence ces derniers mois. Je tiens à remercier tout particulièrement mon père et ma mère qui ont toujours cru en moi et su me donner la confiance et la force nécessaire. Mes pensées vont aujourd'hui à mes grands-parents. Mamie de Grenoble, mamie de Marly et mon grand-père. Vous avez toujours été fiers de ce que j'étais et j'aurais été fière à mon tour que vous soyez là aujourd'hui. Je remercie aussi ma petite sœur Anaïs, être avec toi, c'est rire et sourire sans jamais s'arrêter. Je remercie enfin Marine, demi-sœur et beaucoup plus. La vie sans toi n'aurait pas la même saveur. Merci kk.

Il me reste à remercier tous mes copains de Cachan, de l'agreg, de Saint-Louis, de la thèse, de la vie. Avec une ola d'amour plus particulière pour Anna, Bouboune, Marine, Antoine et Alix. Merci d'avoir été si près.

Mon dernier merci se dirige directement vers Laure, qui a su, au quotidien, m'écouter, me supporter et m'apporter l'amour et le soutien qui m'ont incontestablement mené jusqu'ici.

Table des matières

Table des matières	1
---------------------------------	---

Chapitre 1

Introduction générale	5
------------------------------------	---

1.1 Aperçu de la diversité des Cténares et des Cnidaires	5
---	---

1.2 Position phylogénétique des Cténares et des Cnidaires et intérêts pour la compréhension de l’histoire évolutive des Métazoaires	9
--	---

1.2.1 Le débat autour de la position des Cténares	9
---	---

1.2.2 Importance de la résolution de la topologie pour la compréhension des scénarios évolutifs concernant l’histoire des Métazoaires	11
---	----

1.3 Morpho-anatomie et biologie du Cnidaire <i>Clytia hemisphaerica</i>	18
--	----

1.3.1 Morphologie générale de <i>Clytia hemisphaerica</i> , caractéristiques et position au sein des Cnidaires.....	18
---	----

1.3.2 Elevage en laboratoire de <i>Clytia hemisphaerica</i> et ressources transcriptomiques et génomiques.....	21
--	----

1.3.3 Particularités anatomiques et cellulaires du stade méduse de <i>Clytia hemisphaerica</i>	22
---	----

1.3.4 Croissance du stade méduse de <i>Clytia hemisphaerica</i>	36
---	----

1.4 Morpho-anatomie et biologie du Cténaire <i>Pleurobrachia pileus</i>	48
--	----

1.4.1 Morphologie générale de <i>Pleurobrachia pileus</i> , caractéristiques et position à l’intérieur des Cténares.....	48
--	----

1.4.2 Récoltes de <i>Pleurobrachia pileus</i> et ressources transcriptomiques.....	51
--	----

1.4.3 Organisation de l’appareil tentaculaire.....	52
--	----

1.4.4 Le système nerveux et sensoriel	56
---	----

1.4.5 Le système musculaire	72
-----------------------------------	----

1.4.6 Les peignes ou palettes natatoires	76
--	----

1.4.7 Mésoglée et épiderme, une diversité de types cellulaires.....	84
---	----

1.4.8 Le système reproducteur.....	87
------------------------------------	----

1.4.9 Le système gastrovasculaire	88
---	----

1.5	Objectifs de la thèse.....	89
-----	----------------------------	----

Chapitre 2

Origine(s) et évolution du système nerveux des Métazoaires : recherche de l'existence d'un système nerveux cholinergique chez *P. pileus* 91

2.1	Introduction	91
2.1.1	Les « neurotransmetteurs classiques » comme arguments en faveur de l'un des scénarios évolutifs concernant l'origine du système nerveux des Métazoaires ?.....	91
2.1.2	Transmission(s) et jonction(s) neuromusculaire(s) à l'échelle des Eumétazoaires	100
2.1.3	Précisions concernant les cellules musculaires des Cténaires : excitabilité et couplage excitation-contraction	118
2.1.4	Le système cholinergique à l'échelle des Eumétazoaires.....	122
2.2	Article 1 : Existence d'un système cholinergique chez le Cténaire <i>Pleurobrachia pileus</i> : implications concernant l'origine du système nerveux.....	129

Chapitre 3

Aspects de l'évolution du contrôle de la prolifération cellulaire abordés dans le contexte des « tapis roulants cellulaires » 201

3.1	Les tapis roulants cellulaires.....	201
3.1.1	Concept de « tapis roulant cellulaire », exemples à travers les Métazoaires et intérêts expérimentaux	201
3.1.2	Exploration morpho-anatomique et caractérisation cellulaire et moléculaire des tapis roulants de <i>P. pileus</i> et <i>C. hemisphaerica</i> : une multiplicité d'approches.....	204
3.2	Objectifs de mon travail.....	221
3.3	Evolution de la voie Hippo : étude le long des tapis roulants cellulaires d'un Cnidaire et d'un Cténaire.....	222
3.3.1	Présentation de la voie Hippo telle qu'elle est connue chez la Drosophile et les Mammifères.....	222

3.3.2	Article 2 : Comparative study of Hippo pathway genes in cellular conveyor belts of a ctenophore and a cnidarian.....	234
3.3.3	Complément 1 de l'article : Etude par transcriptomique différentielle de l'expression des acteurs de la voie Hippo le long du tapis roulant du bulbe tentaculaire de <i>Clytia hemisphaerica</i>	272
3.3.4	Complément 2 de l'article : Localisation des zones d'apoptose au niveau du système tentaculaire de <i>Clytia hemisphaerica</i>	275
3.4	Transcriptomique différentielle le long du tapis roulant de <i>Clytia hemisphaerica</i> et mise en évidence de gènes potentiellement impliqués dans l'arrêt de la prolifération cellulaire	285
	Conclusions générales et perspectives	294
	Bibliographie	300
	Annexe	325

Chapitre 1

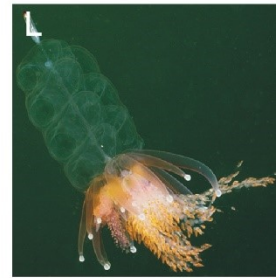
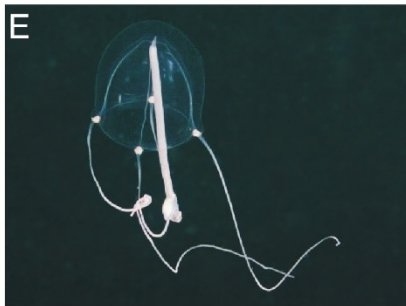
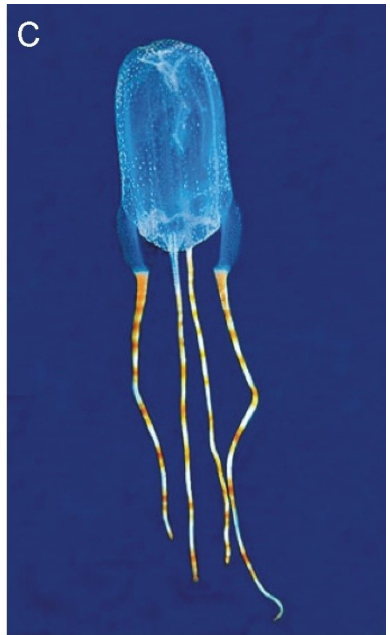
Introduction générale

1.1 Aperçu de la diversité des Cténaires et des Cnidaires

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur deux organismes marins non-Bilatériens, la méduse *Clytia hemisphaerica* et la groseille de mer *Pleurobrachia pileus*. Ces deux espèces appartiennent respectivement à l'embranchement des Cnidaires et à celui des Cténaires.

Les méduses sont des organismes bien connus du grand public. La méduse *Clytia hemisphaerica*, atteignant la taille d'environ 2 cm de diamètre à l'âge adulte, que l'on élève au laboratoire dans de petits aquariums d'une quinzaine de décimètre cubes, contraste cependant avec les méduses, de l'ordre de la dizaine de centimètre au mètre, que l'on a l'habitude de voir sur le bord des plages ou dans les grands aquariums publics. Il existe en effet une grande diversité de méduses, en terme de morphologie, de taille, de couleur, de présence ou non de tentacules, de forme de ces tentacules, *etc.* (Figure 1.1 A-H). Les Cnidaires présentent aussi une grande diversité de cycles de vie. On observe pour certaines espèces (comme *Clytia hemisphaerica*) l'alternance de deux générations (le stade méduse (Fig. 1.1 A-H) et le stade polype (Fig. 1.1 I-O)) et pour d'autres uniquement une génération polype (solitaire, (Fig 1.1 I,M,O) ou coloniale (Fig. 1.1 J-L,K,N) ou uniquement la génération méduse. Coraux, anémones, gorgones, pennatules font ainsi partie des Cnidaires et ne possèdent pas de génération méduse. La présence de cellules urticantes (les cnidocytes) et d'une larve planula sont des synapomorphies des Cnidaires.

Figure 1.1 Diversité morpho-anatomique des Cnidaires. A-H) Diversité des stades méduses. A) *Clytia hemisphaerica* (Leptothecata, Hydrozoa). B) *Ptychogena crocea* (Leptothecata, Hydrozoa). C) *Tamoya ohboya* (Cubozoa). D) *Leuckartiara octona* (Anthoathecata, Hydrozoa) E) *Clapper hydromedusa* (Anthoathecata, Hydrozoa). F) *Aurelia aurita* (Scyphozoa). G) *Periphylla periphylla* (Scyphozoa). H) *Cyanea capillata* (Scyphozoa). I-O) Diversité des stades polypes. I) *Hydra magnipapillata*. Polype solitaire. Pas de stade méduse dans le cycle de vie (Leptothecata, Hydrozoa). J) *Kirchenpaueria pinnata* (Leptothecata, Hydrozoa). Stade polype, organisé sous la forme d'une colonie. K) *Hydractinia echinata* (Anthoathecata, Hydrozoa) Stade polype, organisé sous la forme d'une colonie. L) *Physophora hydrostatica* (Siphonophorae, Hydrozoa). Colonie pélagique de polypes et de méduses modifiées. M) *Caryophyllia smithii* (Hexacorallia, Anthozoa). Coraux, pas de stade méduse dans le cycle de vie. N) *Pennatula phosphorea* (Octocorallia, Anthozoa). Pennatules, pas de stade méduse dans le cycle de vie. O) *Urtica eques* (Hexacorallia, Anthozoa). Anémones, pas de stade méduse dans le cycle de vie. Les différentes images ne sont pas toutes à la même échelle. A-B, D-O) : Images Kare Talnes ; C) Image N. Deloach.



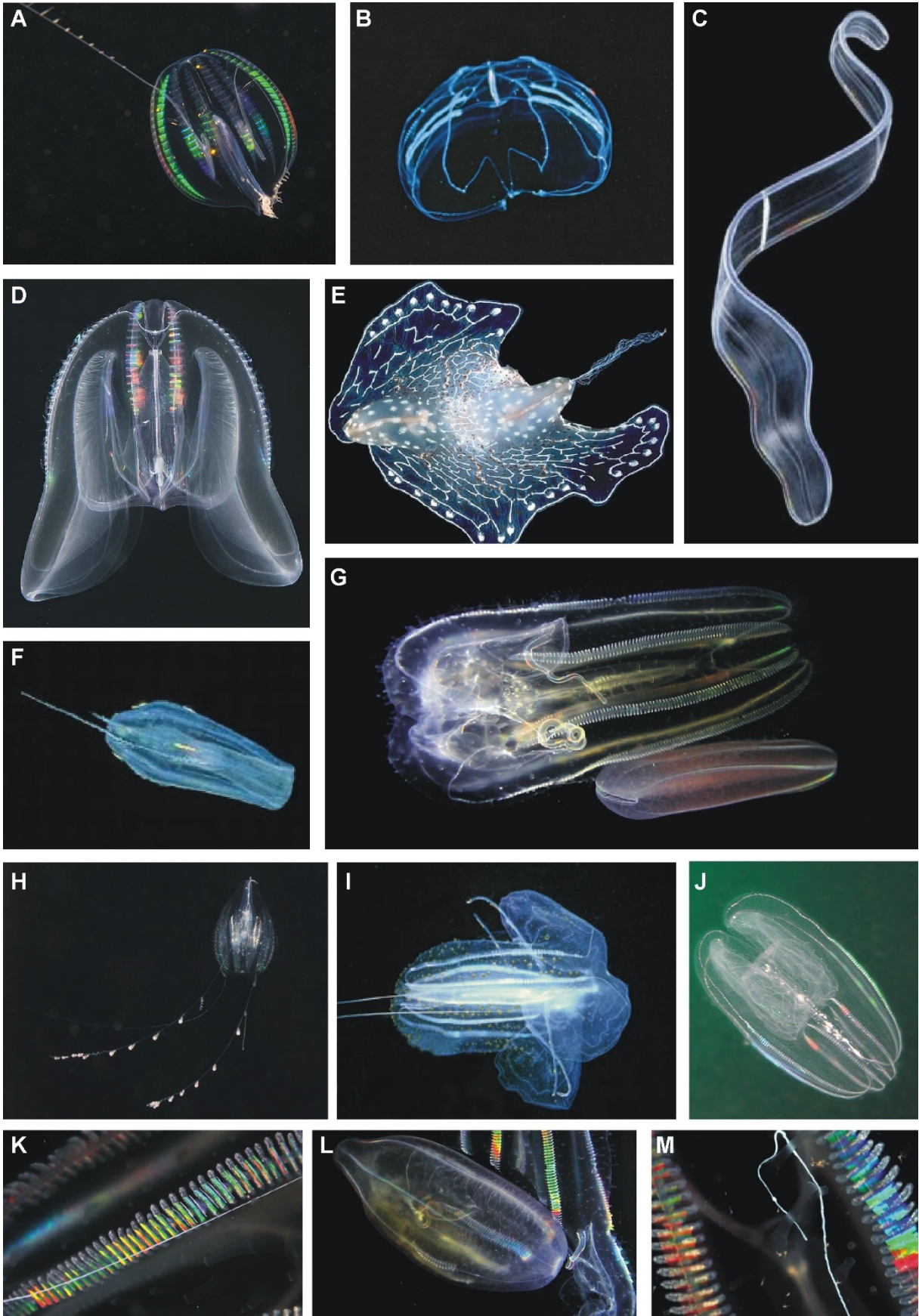


Figure 1.2 Diversité morpho-anatomique des Cténaïres. A) *Pleurobrachia pileus* (Cydippida). B) *Thalassocalyce inconstans* (Thalassocalycida). C) *Cestum veneris* (Cestida). D) *Mnemiopsis leidyi* (Lobata). E) *Coeloplana* sp. (Platyctenida). F) *Lampea pancerina* (Cydippida). G) *Beroe ovata* (Beroida) en bas (10 cm) et *Leucothea multicornis* (Lobata) en haut (20cm). H) *Euplokamis dunlapae* (Cydippida). I) *Leucothea pulchra* (Lobata). J) *Bolinopsis infundibulum* (Lobata). K) Gros plan sur une rangée de peignes (palettes natatoires) diffractant la lumière. L) Un *Beroe* ayant « mordu » et partiellement dévoré un *Leucothea*, beaucoup plus gros que lui. A l'intérieur du *Beroe* on distingue les palettes ciliaires du *Leucothea*. M) Tentacule de *Leucothea*. *Leucothea* pêche des organismes variés du zooplancton – copépodes, mollusques, larves – à l'aide de lobes oraux et de tentacules munis de colloblastes. Les différentes images ne sont pas toutes à la même échelle. A-B,E-F) David Wrobel, C-E) site de C.E Mills : <http://faculty.washington.edu/cemills/Ctenolist.html> ; G, K-M) C. et N. Sardet.

Les Cnidaïres, benthiques ou pélagiques, vivent dans tous les océans et mers du monde et certaines espèces sont adaptées à la vie en eau douce (comme l'Hydre). *Clytia hemisphaerica* est particulièrement abondante au niveau de l'Atlantique Nord, de la mer du Nord, de la Manche et de la Méditerranée.

Les Cténaïres sont eux complètement inconnus du grand public et sont très souvent confondus par ce dernier avec les Cnidaïres, en grande partie du fait de leur aspect gélatineux et de la présence de tentacules chez certaines espèces. Il s'agit d'animaux fascinants, du fait de leur élégance, de leur diversité et de leur complexité. Il existe en effet une diversité morpho-anatomique considérable au sein des Cténaïres (Figure 1.2 A-J). Différentes synapomorphies permettent de les rassembler au sein de cet embranchement, telles que la présence de cellules « collantes », appelées colloblastes, permettant la capture des proies (les Cténaïres sont des prédateurs) ou la présence de 8 rangées de palettes natatoires (appelées peignes) distribuées longitudinalement le long du corps de l'animal. La présence de ces rangées de peignes leur a donné leur nom (Cténophores du grec *kteis*, « peigne » et *phero*, « porter »). Ces peignes sont composés de cils diffractant la lumière et dont chaque vague de battement crée une vague iridescente aux couleurs de l'arc-en-ciel et responsable de la beauté envoûtante de ces animaux (Figure 1.2 K-M). Il existe actuellement environ 200 espèces de Cténaïres connues (Mills, C.E. Internet 1998-present <http://faculty.washington.edu/cemills/Ctenolist.html> ; Tamm 2014), allant de la taille du millimètre à plus d'un mètre, planctoniques ou benthiques, existant dans toutes les mers et océans du monde et à toutes les profondeurs. Leurs proies peuvent être de types et de tailles très variées et comprennent par exemple des Crustacés, des Cnidaïres, d'autres Cténaïres et parfois des poissons de petite taille (Figure 1.2 L-M). La présence de *Pleurobrachia pileus* a été largement décrite au niveau des côtes de l'océan Atlantique (Müller 1776, Mayer 1912, Bigelow 1926, Johnson & Allen 2012), de la Manche (Moser 1903, Mayer 1912, Bigelow 1912, Simion et al. in prep), de la mer du Nord (Muller 1776), de la mer Méditerranée (Mills et al. 1996) ainsi que des mers Arctiques (Chun 1880, Moser 1903, Mayer 1912).

1.2 Position phylogénétique des Cténaïres et des Cnidaires et intérêts pour la compréhension de l'histoire évolutive des Métazoaires

L'analyse des relations phylogénétiques au sein des Métazoaires place Cténaïres et Cnidaires en dehors des Bilatériens. Cette position phylogénétique en fait des modèles de choix pour l'élaboration de scénarios évolutifs concernant l'histoire des Métazoaires. La grande quantité de données disponibles chez les Bilatériens permet de réaliser des analyses comparées et de tirer des informations en ce qui concerne l'origine et l'évolution des mécanismes développementaux, tant à l'échelle moléculaire (par exemple, le rôle des voies de signalisation) qu'à l'échelle de l'organisme (plans d'organisations, axes, symétries, polarités, etc.), ainsi que des types cellulaires (cellule nerveuse, cellule musculaire, etc.).

Ces scénarios ne peuvent être compris qu'à la lumière d'une topologie résolue des Métazoaires. Cependant, les relations phylogénétiques entre Cténaïres, Cnidaires et Bilatériens restent fortement débattues et la question actuellement la plus controversée porte sur la position des Cténaïres.

1.2.1 Le débat autour de la position des Cténaïres

Différentes approches ont permis d'apporter des informations quant à la position phylogénétique des Cténaïres. Les analyses cladistiques utilisant des données morpho-anatomiques suggèrent une proche parenté entre les Cténaïres et les Bilatériens (Figure 1.3 A -Schram 1991, Nielsen et al. 1996, Zrzavy et al. 1998, Peterson & Eernisse 2001, Brusca & Brusca 2005). Cependant, le fait que la plupart des caractéristiques de leur anatomie soit des autapomorphies rend ces analyses difficiles. Le développement du séquençage a permis de pallier les limites des caractères anatomiques par une immense quantité de caractères moléculaires. Les premières études moléculaires ont été basées sur l'utilisation des ARN ribosomiques et ont placé, pour la plupart, les Cténaïres comme groupe-frère d'un clade « Cnidaires-Bilatériens » et aussi parfois d'un clade « Cnidaires-Bilatériens-Placozoaires » (Figure 1.3 B – Podar et al. 2001, Borchiellini et al. 2001, Manuel et al. 2003, Sperling et al. 2009) ou encore comme groupe-frère des éponges calcaires. De plus, les éponges étaient la plupart du temps paraphylétiques dans ces études. Ces topologies apparaissent alors contradictoires entre elles et avec celles obtenues à partir des données morpho-anatomiques.

Il est maintenant admis que l'utilisation d'un seul (ou de quelques) marqueur(s) moléculaire(s) n'est pas suffisante pour reconstituer les relations de parentés au sein des Métazoaires. L'essor récent de la phylogénomique, dont les jeux de données sont constitués de la concaténation de dizaines à des centaines de gènes alignés, constitue donc aujourd'hui un espoir pour la résolution de la topologie des Métazoaires et en particulier de la position des Cténaïres. Les topologies obtenues sont elles aussi en contradiction et la communauté scientifique se retrouve divisée en deux camps : d'un côté ceux qui trouvent les Cténaïres comme groupe-frère de tous les autres Métazoaires (Figure 1.3 C, Dunn et al. 2008, Hejnol et al. 2009, Ryan et al. 2013, Moroz et al. 2014), et de l'autre, ceux qui obtiennent les Cténaïres « ailleurs ». La topologie la plus souvent obtenue au sein de ce deuxième groupe correspond à l'hypothèse des « Cœlentérés », regroupant les Cténaïres et les Cnidaires, comme groupe-frère des Bilatériens (Figure 1.3 D – Philippe et al. 2009, Philippe et al. 2011, Nosenko et al. 2013). On peut noter ici le caractère hétérodoxe, notamment en ce qui concerne la morphologie, de l'hypothèse de la position des Cténaïres comme groupe-frère des autres Métazoaires.

La difficulté de résolution de la topologie des Métazoaires et les différentes contradictions auxquels les analyses ont abouti jusqu'à maintenant viennent d'une part de problèmes propres aux méthodes de reconstruction en phylogénomique et d'autre part, de problèmes inhérents aux Cténaïres. Ceux-ci sont en effet très fortement divergents des autres animaux, d'un point de vue morphologique mais aussi moléculaire. En effet, les Cténaïres ne ressemblent à aucun autre animal, et cette observation est aussi valable à l'échelle moléculaire, puisque les séquences de leurs protéines sont également difficilement comparables à celles des autres animaux du fait d'un taux de substitution particulièrement élevé. De plus, la diversité génétique intra-Cténaïres étant faible, les topologies obtenues à partir de séquences protéiques aboutissent à une longue branche regroupant les Cténaïres. Ils sont de ce fait extrêmement sensibles au phénomène d'attraction de longues branches. A cela s'ajoute le très grand nombre de duplications et de pertes de gènes Cténaïres-spécifiques au sein des familles multigéniques.

En ce qui concerne la méthode phylogénomique, le choix de l'échantillonnage taxonomique, la construction de la matrice de caractères et sa qualité (problèmes d'alignement, présence de paralogues, contaminations) ainsi que le choix du modèle d'évolution sont autant de paramètres qui ont une influence sur la topologie obtenue. L'hypothèse proposant les Cténaïres comme groupe-frère de tous les autres Métazoaires (Dunn et al. 2008, Hejnol et al. 2009, Ryan et al. 2013, Moroz et al. 2014, Moroz et al. 2015) a été obtenue à partir d'analyses basées sur l'utilisation de très grands jeux de données construits à l'aide de méthodes automatisées, qui conduisent à des matrices contenant beaucoup d'erreurs (voir Philippe et al. 2011). De plus, le faible échantillonnage en dehors des Bilatériens mais aussi intra-Cténaïres ainsi que le choix de groupes externes trop distants sont aussi des éléments permettant de supposer que cette position ne soit qu'un artefact (attraction de longues branches). L'hypothèse des Cœlentérés (Philippe et al. 2009, Philippe et al. 2011, Nosenko et al. 2013)

par contre, a été proposée à partir de jeux de données de dimension plus modeste en terme de nombre de gènes mais dont la qualité a été contrôlée manuellement et à différentes étapes (résolution des problèmes d'alignement, des données manquantes, élimination des paralogues ou de séquences contaminantes, augmentation de l'échantillonnage des phylums non-Bilatériens). Le travail de thèse de Paul Simion au sein de l'équipe (thèse soutenue en Novembre 2014) a consisté à combiner ces deux approches, c'est-à-dire à constituer un grand jeu de données tout en mettant au point une procédure bio-informatique permettant un contrôle rigoureux de sa qualité. Ce travail est encore actuellement en cours et ne permet pas encore de conclure sur la position des Cténaies. Cependant, des analyses préliminaires du jeu de données suggèrent que la position des Cténaies en tant que groupe-frère de tous les autres Métazoaires soit effectivement due à un artéfact d'attraction de longues branches.

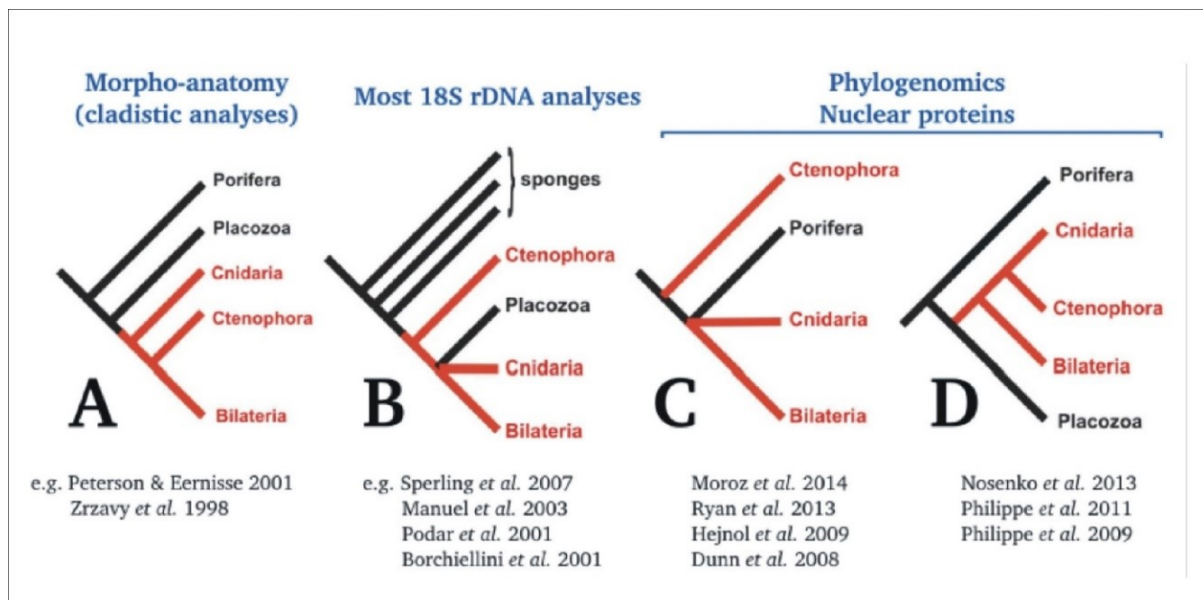


Figure 1.3 Les différentes hypothèses phylogénétiques concernant la position des Cténaies. En rouge sont indiqués les groupes possédant un système nerveux et des cellules musculaires.

1.2.2 Importance de la résolution de la topologie pour la compréhension des scénarios évolutifs concernant l'histoire des Métazoaires

Les différentes topologies que nous venons de présenter mènent à des histoires évolutives complètement différentes. On comprend alors l'enjeu de ce débat scientifique pour la compréhension des scénarios évolutifs que ce soit à l'échelle moléculaire (par exemple, évolution des acteurs d'une voie de signalisation, de leurs interactions et de leurs fonctions), cellulaire (évolution des types

cellulaires) ou de l'organisme (évolution des caractères morpho-anatomiques). Réciproquement, les analyses comparées des différents embranchements selon des approches moléculaires, cellulaires, morpho-anatomiques ou encore fonctionnelles sont susceptibles de donner des arguments en faveur de l'une ou l'autre des topologies. Afin d'illustrer ces notions, je vais prendre pour exemple le problème de l'acquisition du système nerveux et de l'homologie de la cellule nerveuse.

Exemple concret : Le problème de l'origine du système nerveux des Métazoaires

De la topologie à la reconstruction de l'histoire évolutive du système nerveux

La présence de cellules nerveuses a été mise en évidence chez les Cténares, les Cnidaires et les Bilatériens (Bullock & Horridge, 1965). En revanche, elles sont absentes chez les Placozoaires et les Spongiaires. Dès lors, l'optimisation de ce caractère sur chaque topologie proposée mène à des scénarios évolutifs très différents (Figure 1.3). Si l'on s'intéresse plus précisément aux deux topologies actuellement au centre du débat, différentes hypothèses sont alors formulées :

- Selon l'hypothèse des Cœlentérés (ou plus généralement, de monophylie des Eumétazoaires), on peut proposer une origine unique des cellules nerveuses qui serait alors une synapomorphie des Eumétazoaires (Scénario 1 - Figure 1.4).
- Selon l'hypothèse « Cténares comme groupe-frère de tous les autres Métazoaires », deux scénarios évolutifs peuvent être proposés :
 - ➔ Scénario 2a : Apparition de la cellule nerveuse chez l'ancêtre commun des Métazoaires avec perte chez les Spongiaires et les Placozoaires (Scénario 2a - Figure 1.4).
 - ➔ Scénario 2b : Origine et évolution indépendante du système nerveux dans la branche des Cténares et dans la branche « Cnidaires + Bilatériens » (scénario de convergence) (Scénario 2b - Figure 1.4).

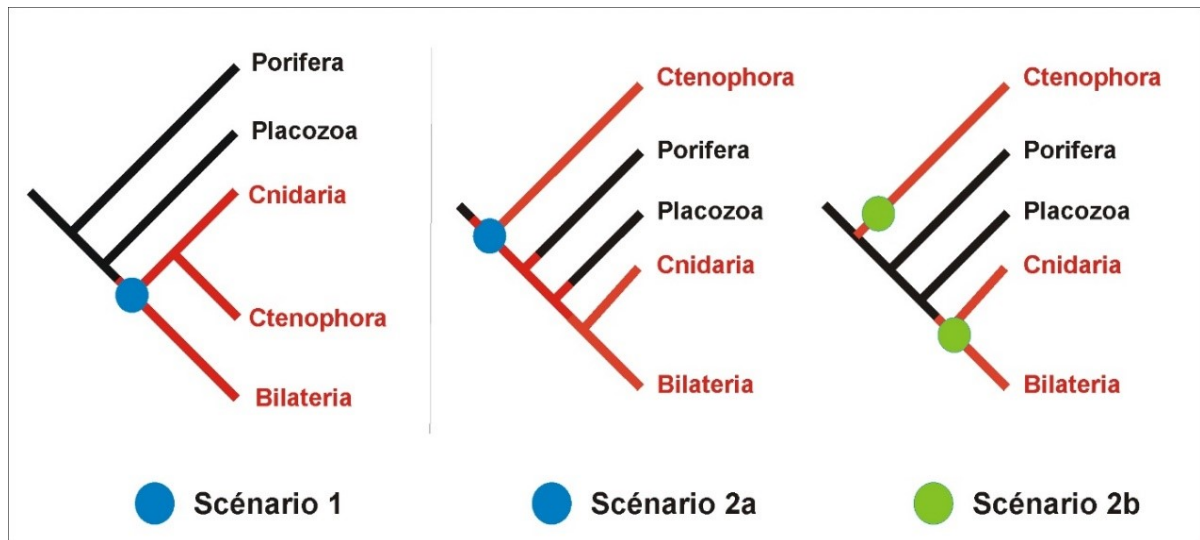


Figure 1.4 Différents scénarios proposés concernant l'origine du système nerveux des Métazoaires. L'hypothèse d'une origine unique du système nerveux est figurée par un rond bleu dans les scénarios 1 et 2a, l'hypothèse de la convergence est figurée par des ronds verts dans le scénario 2b.

De l'analyse comparée des systèmes nerveux des Métazoaires à la topologie

Origine unique du système nerveux des Métazoaires : les arguments au-delà de la phylogénie (scénarios 1 et 2a)

Les premiers arguments en faveur de l'homologie des cellules nerveuses se placent du point de vue de leur morphologie et de leur ultrastructure. On observe en effet, au sein des trois embranchements, des cellules présentant un corps cellulaire à partir duquel partent des expansions permettant de réaliser des contacts synaptiques avec des cellules cibles post-synaptiques. Les critères cytologiques majeurs permettant de caractériser un neurone sont la présence de neurotubules (Palay, 1956), marqués à l'aide de l'anticorps anti- α -tubuline tyrosylée (YL1/2) ainsi que la présence de vésicules synaptiques (de 30 à 50 nm de diamètre) au niveau de l'extrémité présynaptique. L'étude de la morphologie présynaptique des Cténaïres, Cnidaires et Bilatériens met de plus en évidence la présence des mêmes composants subcellulaires impliqués dans la fonction synaptique : mitochondries, expansions du réticulum endoplasmique et vésicules d'exocytose qui font face à la membrane présynaptique (Hernandez-Nicaise 1973a, Anderson & Grunert 1988, Droz et al. 1975, Sudhof et al. 2012).

Des arguments moléculaires concernant la neurotransmission peuvent aussi être pris en compte. Il a ainsi été mis en évidence une immunoréactivité positive à certains neuropeptides (FMRFamide), à la vasopressine ainsi qu'à des monoamines (Jager et al. 2011a, Jager et al. 2013) associée à des structures nerveuses du Cténaire *Pleurobrachia pileus* ; ces molécules étant connues

pour être impliquées dans la neurotransmission des Cnidaires et des Bilatériens (Grimmelikhuijzen & Hauser 2012, Pierobon 2012, Takahashi & Takeda 2015).

Les publications récentes des génomes de deux Cténaïres, *Mnemiopsis leidyi* (Ryan et al. 2013) et *Pleurobrachia bachei* (Moroz et al. 2014) permettent désormais de rechercher la présence de marqueurs génomiques de cellules nerveuses, à l'échelle des Métazoaires. Ces études permettent alors de conclure à la présence chez les cténaïres :

- De certains gènes régulateurs impliqués, chez les Bilatériens et les Cnidaires, dans le destin et le patterning neuronal : les facteurs de transcription *Lhx*, *Hes*, *b-hlh*, *Sox*, *Lim* et *Tlx* (Jager et al. 2006, Derelle & Manuel 2007, Jager et al. 2008, Layden et al. 2010, Ryan et al. 2010, Simmons et al. 2012, Schnitzler et al. 2014). L'expression des gènes *LIM* et *Sox* a de plus été mise en évidence au niveau de structures neurales des Cténaïres (Jager et al. 2008, Simmons et al. 2012).
- de certains homologues de composants critiques des complexes pré- et post-synaptiques connus chez les Bilatériens : Cadhérines, Ephrin, Pmca, mGluR, Syncap, etc... (Ryan et al. 2013).

Origine double et évolution indépendante des systèmes nerveux des Métazoaires : les arguments au-delà de la phylogénie (scénario 2b)

Les analyses phylogénomiques les plus récentes, publiées respectivement dans *Science* et *Nature*, par Ryan et al. (2013) et Moroz et al. (2014) obtiennent les Cténaïres comme groupe-frère de tous les autres Métazoaires. Ces publications présentent de plus une discussion concernant l'histoire évolutive et l'origine de la cellule nerveuse. Ryan et ses collaborateurs restent prudents dans leurs interprétations (Ryan et al. 2013, Ryan 2014) alors que Moroz et ses collaborateurs se prononcent clairement en faveur d'une origine indépendante (scénario 2b – Moroz et al. 2014, Moroz 2015). Selon leurs interprétations, les données obtenues à partir de l'exploration à différentes échelles du système nerveux des Cténaïres permettent, par comparaison avec les Cnidaires et les Bilatériens, d'appuyer la position des Cténaïres proposée mais aussi de trancher en faveur d'une origine et d'une évolution indépendantes de leur système nerveux (Figure 1.4 – scénario 2b).

Ainsi, les analyses phylogénétiques, s'intéressant à différents composants et acteurs des synapses chimiques, à partir de l'étude des génomes complets des Cténaïres *Mnemiopsis leidyi* (Ryan et al. 2013) et *Pleurobrachia bachei* (Moroz et al. 2014, Moroz 2015) montrent l'absence chez les Cténaïres :

- de nombreux gènes régulateurs connus pour être impliqués dans la spécification et le développement neuronal chez les Cnidaires et les Bilatériens (par exemple : *neurogénines*, *NeuroD*, *HOX*, *achaete-scute*, *Otx*),
- de nombreux gènes impliqués dans la fonction synaptique au niveau pré ou post-synaptique (par exemple, absence de neuroligin, une protéine connue pour avoir une fonction critique dans la communication synaptique chez les Cnidaires et les Bilatériens (Moroz et al. 2014, Moroz 2015),
- des récepteurs et des enzymes de synthèse de la plupart des neurotransmetteurs classiques (acétylcholine, sérotonine, dopamine, noradrénaline, adrénaline, histamine, glycine, octopamine) de la communication nerveuse (Moroz et al. 2014, Moroz 2015),
- de précurseurs de neuropeptides homologues des neuropeptides connus chez les Cnidaires et les Bilatériens. Mais la présence de précurseurs de neuropeptides putatifs ainsi que d'un grand nombre de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) amène Moroz et ses collaborateurs à formuler l'hypothèse de la présence d'un large répertoire de signalisation peptidergique qui aurait évolué indépendamment chez les Cténares (Moroz et al. 2014).

L'étude moléculaire des synapses électriques cette fois-ci, montre une extrême diversification des protéines impliquées dans les jonctions communicantes au sein des Cténares (innexines) et amène Moroz et ses collaborateurs à conclure à une énorme diversité des synapses électriques, spécifique des Cténares.

Associée à ces analyses génomiques, l'organisation subcellulaire « unique » observée au niveau des synapses des Cténares (Hernandez-Nicaise 1973a) est aussi avancée comme un argument morphologique en faveur du scénario de convergence (Moroz 2015). En effet, les Cténares présentent une organisation en « triade synaptique » avec une apposition précise de différentes couches (Figure 1.29, page 54) : la membrane plasmique présynaptique, la couche de vésicules synaptiques et du réticulum endoplasmique contre lequel sont positionnées une ou plusieurs mitochondries (Hernandez-Nicaise 1973a). Ce type d'organisation n'a jamais été observé chez les Cnidaires ou chez les Bilatériens et est utilisé comme argument en faveur d'une acquisition indépendante des cellules nerveuses chez les Cténares (Moroz 2015).

L'étude de l'expression, chez *Pleurobrachia bachei*, du gène *Elav* classiquement connu comme marqueur pan-neural chez les Bilatériens et les Cnidaires (protéine de liaison aux ARN, à domaines RRM) montrerait une expression non associée aux cellules nerveuses (Moroz et al. 2014).

Pour finir, de façon très intrigante, la combinaison de techniques de détection ultrasensibles de molécules (électrophorèse capillaire, spectroscopie de masse), d'immunohistochimie, d'électrophysiologie et de pharmacologie chez *Pleurobrachia bachei* semble mettre en évidence, toujours d'après Moroz et al. (2014), l'absence d'implication des neurotransmetteurs classiques

(acétylcholine, sérotonine, dopamine, noradrénaline, adrénaline, histamine, glycine, octopamine) dans tout processus de communication intercellulaire.

L'absence des messagers eux-mêmes, de la plupart des enzymes de synthèse et des récepteurs, et d'effets sur d'éventuelles cellules cibles (cellules ciliées des peignes et cellules musculaires mésogléennes testées lors d'essais pharmacologiques et électrophysiologiques) va donc dans le sens d'une singularité (*unique molecular make-up*) des neurones de Cténaïres (Moroz et al. 2014, Moroz 2015). Seul le L-glutamate (l'un des 20 acides aminés naturels constituant les protéines, mais aussi neurotransmetteur majeur du système nerveux central et périphérique chez les Bilatériens) a pu être détecté par spectrométrie de masse et son application a pu conduire à des effets sur les battements ciliaires et l'excitation des cellules musculaires. Il est alors proposé comme étant le neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire des Cténaïres. Cette hypothèse est appuyée par la présence d'un très grand nombre de paralogues des récepteurs ionotropiques du glutamate ainsi que des protéines de synthèse et de transport du glutamate.

Discussion autour des arguments avancés : importance du choix de marqueurs spécifiques des cellules nerveuses

Afin d'utiliser la présence ou l'absence d'un marqueur génomique, morphologique ou moléculaire en tant qu'argument en faveur de l'un des scénarios évolutifs du système nerveux, l'étape préalable indispensable est la connaissance précise de ce marqueur à l'échelle des Métazoaires. Il s'agit essentiellement de vérifier qu'il s'agisse bien d'un marqueur spécifique du système nerveux. En pratique, cette étape n'est pas si évidente et le nombre de marqueurs spécifiques du système nerveux est relativement limité.

En ce qui concerne les arguments génomiques, il a récemment été démontré que la plupart des gènes participant aux modules pré- et post-synaptiques ne sont en réalité pas spécifiques des neurones puisque présents chez les Placozoaires et les Eponges (Srivastava et al. 2008, Srivastava et al. 2010, Südhof 2012, Ryan et al. 2013, Marlow & Arendt 2014) et même chez de nombreux non-Métazoaires (Alié & Manuel 2010). Leur présence/absence n'est donc pas informative en ce qui concerne l'homologie des cellules nerveuses. De plus, si l'on regarde de plus près les arguments génomiques présentés par Moroz et ses collaborateurs (Moroz et al. 2014), on se rend compte, pour commencer, que la Neurogénine et NeuroD sont en réalité Bilatériens-spécifiques et que l'on ne s'attend donc pas à ce qu'ils soient présents chez les Cténaïres (Simionato et al. 2007). De plus, la Neuroligin, absente chez les Cténaïres, est aussi absente chez l'Hydre, qui pourtant possède bien des neurones dont l'homologie avec ceux des Bilatériens n'est pas discutée (Alié & Manuel 2010).

En ce qui concerne les données concernant les neuropeptides, leur présence a été mise en évidence chez les Placozoaires, les Cnidaires et les Bilatériens (Schuchert 1993, Jékely 2013, Nikitin 2014). Ils ne sont donc pas spécifiques du système nerveux puisque les Placozoaires n'en possèdent pas. Il a de plus été montré que leur conservation entre les phylums ne concerne en réalité qu'un faible nombre de résidus (Jékely 2013, Nikitin 2014). L'absence de similarité entre les peptides de Cténares et ceux des autres Métazoaires pourrait être simplement due à la longue période d'évolution depuis la divergence de leur génome ainsi qu'au taux d'évolution particulièrement élevé des protéines de Cténares.

Enfin, l'énorme diversification intra-Cténares des innexines, présentée comme une singularité des Cténares par Moroz et ses collaborateurs (Moroz et al. 2014) est aussi observée au sein des Hydrozoaires (Cnidaires) et ne peut donc pas servir d'argument en faveur de l'origine indépendante du système nerveux des Cténares (données non publiées de l'équipe – post-doctorat Thomas Silberfield). Les innexines sont des protéines permettant la formation de jonctions communicantes (jonctions de type gap). Plusieurs types de protéines, appartenant à la famille des protéines à 4 segments transmembranaires, sont en réalité impliqués dans ce type de jonctions, à l'échelle des Métazoaires (Panchin 2005). Les connexines sont la sous-famille la mieux caractérisée et sont spécifiques des Deutérostomiens (Alexopoulos et al. 2004). Les protéines appartenant à la sous-famille des pannexines sont aussi impliquées dans la formation de synapses électriques (au niveau du système nerveux central par exemple, Bruzzone et al. 2003) et sont spécifiques des Chordés (Panchin 2005). Les protéines impliquées dans les jonctions communicantes en dehors des Chordés font partie de la sous-famille des innexines. Il est important de noter que les innexines sont absentes chez les Placozoaires et les Eponges (Panchin 2005). De plus, il a été récemment proposé que les innexines et les pannexines soient homologues (Kumar & Gigula 1996 ; Panchin et al. 2000 ; Baranova et al. 2004 ; Phelan, 2005 ; Panchin 2005 ; résumé dans Yen & Saier 2007). L'expression de ces protéines en association avec le système nerveux chez les Cténares (données non publiées de l'équipe – post-doctorat Thomas Silberfield), les Cnidaires (Takaku et al. 2014) et les Bilatériens (Dermietzel & Spray 1993) suggère la présence d'une communication synaptique électrique chez leur dernier ancêtre commun. Cependant, les jonctions de types gap ne sont pas restreintes aux cellules nerveuses (on en trouve par exemple au niveau des myocytes cardiaques des Vertébrés, des cellules musculaires striées des Hydroméduses ou encore des cellules des sillons ciliés des Cténares – Alberts et al. 2011 ; Satterlie et al. 2002 ; données non publiées de l'équipe, post-doctorat Thomas Silberfield) et constituent donc de nouveau un bel exemple de « marqueur » qui en réalité n'est pas spécifique du système nerveux. De plus, les innexines ont été perdues indépendamment chez les Anthozoaires et les Scyphozoaires (Takaku et al. 2014 ; données non publiées de l'équipe, post-doctorat Thomas Silberfield) et la présence/absence de ce caractère ne peut donc pas non plus être utilisée comme critère d'homologie des cellules nerveuses.

Si l'on s'intéresse à l'organisation subcellulaire des synapses, les synapses des Cténaïres présentent bien un arrangement unique (triade synaptique) mais mettent en jeu les mêmes composants intracellulaires qu'au niveau des synapses des Cnidaires et des Bilatériens. Cet arrangement n'est donc pas extrêmement original et pourrait simplement représenter une autapomorphie de l'embranchement des Cténaïres.

Le résultat concernant l'absence d'association du marqueur pan-neural *Elav* au système nerveux des Cténaïres est aussi à nuancer. En effet, Moroz et ses collaborateurs ne présentent l'étude d'expression que d'un seul des trois paralogues présents chez les Cténaïres, ce qui est donc insuffisant pour en tirer des conclusions. De plus, des données récentes de notre équipe (données non publiées – M. Jager) montrent qu'en réalité, 2 des 3 paralogues sont exprimés au niveau de cellules nerveuses chez *Pleurobrachia pileus*.

Pour finir, l'absence des neurotransmetteurs classiques et des systèmes associés est un des arguments clés de la démonstration de Moroz et de ses collaborateurs (Moroz et al. 2014, Moroz 2015). La première réponse que l'on peut alors lui opposer est que « l'absence de preuve ne peut constituer la preuve d'une absence ». Au-delà de cette remarque, il est important de noter que ces résultats paraissent étonnants puisque l'acétylcholine est une molécule signal largement répandue à l'échelle des Eucaryotes (Wessler et al. 2001a, Horiuchi et al. 2003) et que des données antérieures suggéraient la présence d'un système cholinergique chez les Cténaïres (Hernandez Nicaise 1974, Anctil 1985). Je reviendrai en détail sur ce thème dans la seconde partie de mon manuscrit (Chapitre 2, page 91) puisque l'étude du système cholinergique chez les Cténaïres est l'un des deux axes principaux de ma thèse.

Ce rapide bilan met donc en évidence que la recherche de la présence/absence de telle ou telle caractéristique du neurone, ne peut servir à lui seul d'argument en faveur ou non de l'homologie des cellules nerveuses. Au lieu de considérer le neurone comme un caractère unique, il s'agirait alors de déconstruire ce « caractère » complexe et d'envisager séparément l'évolution de chacun des éléments qui le constitue.

1.3 Morpho-anatomie et biologie du Cnidaire *Clytia hemisphaerica*

1.3.1 Morphologie générale de *Clytia hemisphaerica*, caractéristiques et position au sein des Cnidaires

La méduse *Clytia hemisphaerica* est de petite taille (environ 1 à 2 cm de diamètre à l'état adulte), en forme de cloche aplatie, abondamment présente sur nos côtes atlantique et méditerranéenne. Elle appartient à l'embranchement des Cnidaires et plus précisément au groupe des Hydrozoaires, groupe-frère de l'ensemble (Stauroméduses + Cuboméduses + Scyphozoaires), constituant ainsi le clade des Médusozoaires, lui-même groupe-frère des Anthozoaires (Figure 1.5).

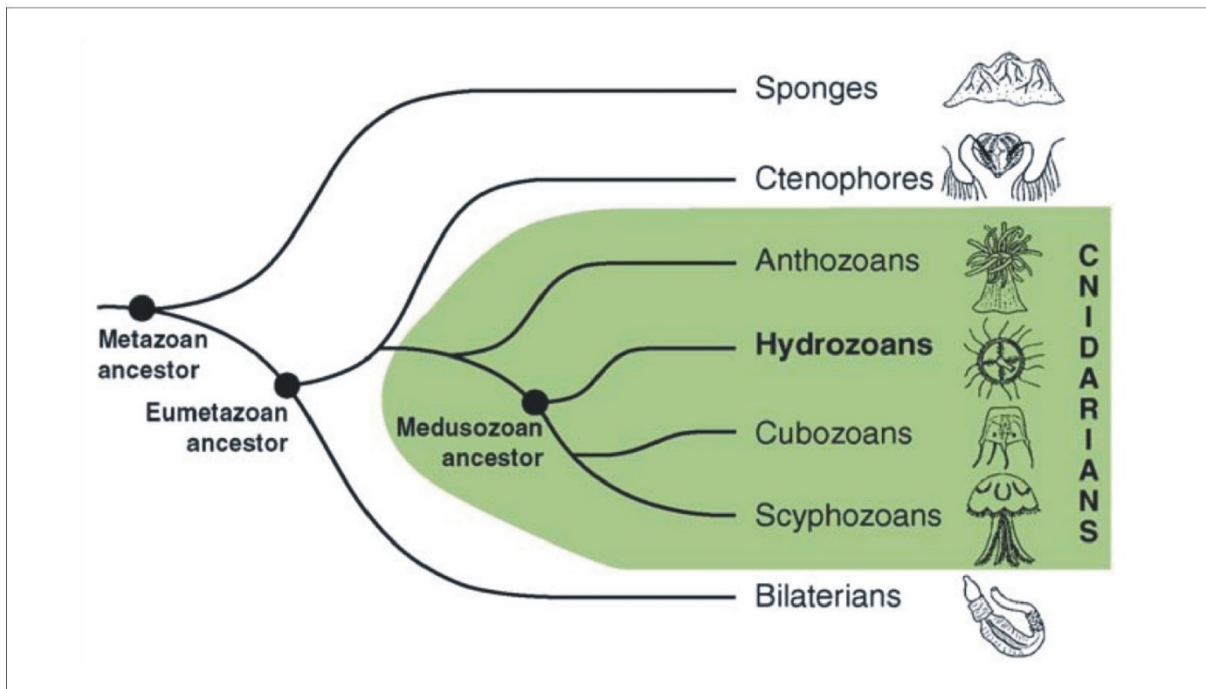


Figure 1.5 Position phylogénétique des Hydrozoaires dans l'arbre des Métazoaires (Houliston et al. 2010). *Clytia hemisphaerica* appartient à ce taxon.

Les Cnidaires sont caractérisés par une symétrie radiaire et la possession de cellules épithéliales urticantes, les cnidocytes, spécialisées dans la défense et la prédation. La forme adulte consiste en un polype benthique et/ou une méduse pélagique et le cycle de vie peut présenter une alternance entre ces deux générations : on parle alors de cycle métagénétique. *Clytia hemisphaerica* est une espèce à cycle métagénétique dont la génération polype est coloniale (Figure 1.6). Il s'agit d'un organisme polymorphe, présentant une alternance entre une génération polype fixée, benthique et une génération méduse libre, pélagique. Elle constitue donc un modèle original, au sein des Hydrozoaires, par comparaison avec l'Hydre, autre Hydrozoaire modèle en laboratoire, ne présentant pas de génération méduse.

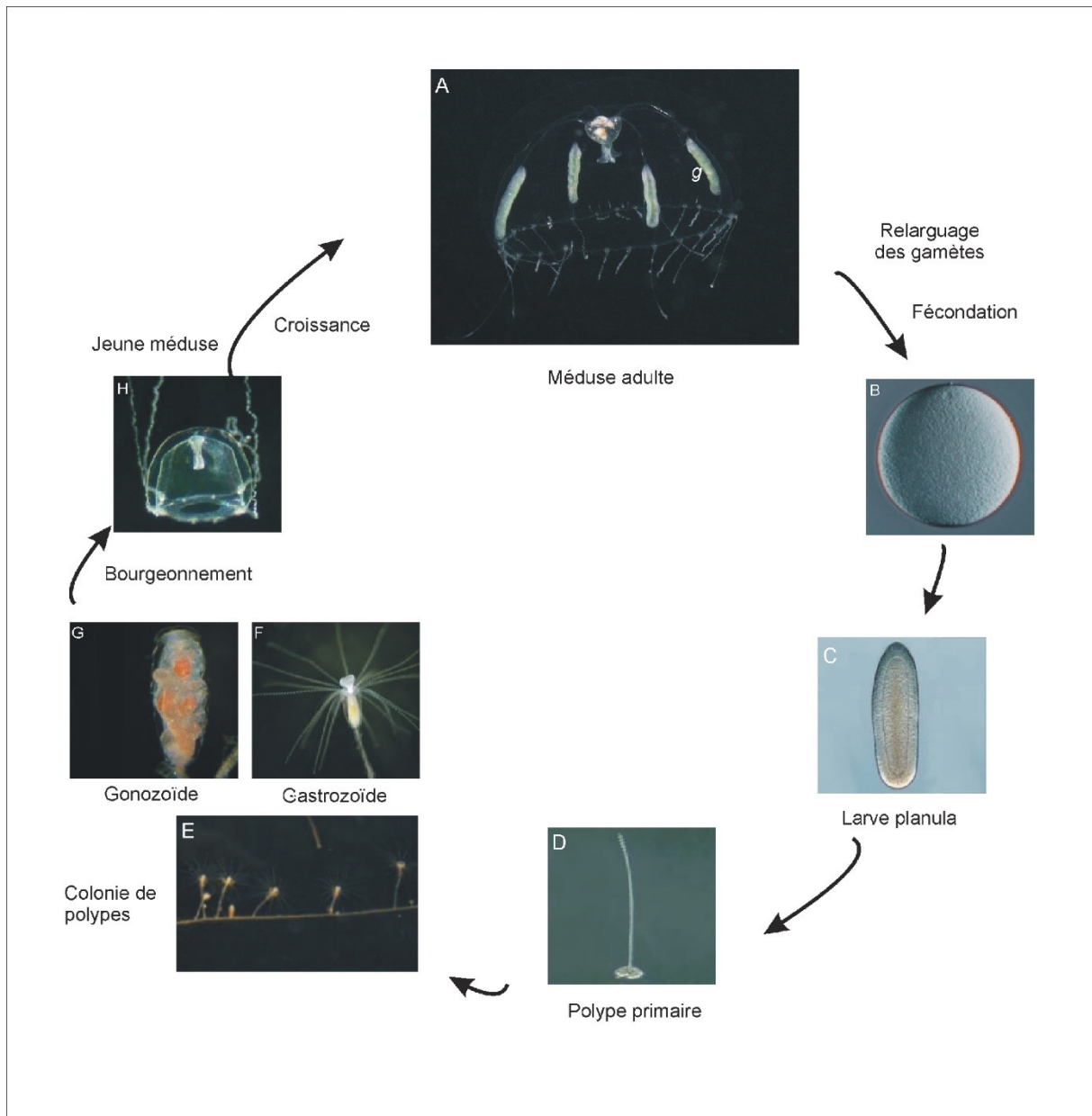


Figure 1.6 Cycle de vie de *Clytia hemisphaerica*. A) Méduse adulte. B) Zygote. C) Larve planula de 2 jours. D) Polype primaire. E) Colonie de polypes. F) Gastrozoïde avec son panache de tentacules au centre duquel se trouve la bouche. G) Gonozoïde contenant des bourgeons médusaires, les plus âgés se trouvant à l'apex. H) Jeune méduse. g : gonade. (A) Photo Kåre Telnes (B-H) Photos du site web de l'équipe d'Evelyn Houliston.

Les polypes forment des colonies fixées sur des supports immergés via un stolon horizontal (Figure 1.6 E). De ce stolon partent verticalement des tiges dressées, les hydrocaules. Les polypes possèdent un squelette chitineux, la thèque, à l'intérieur duquel ils peuvent se rétracter. Au sein de la colonie, les polypes sont spécialisés : les gastrozoïdes (polypes pourvus de tentacules recouverts de cnidocytes, qui entourent la bouche – Figure 1.6 F) ont une fonction nourricière et les gonozoïdes (polypes dépourvus de tentacules et de bouche – Figure 1.6 G) une fonction reproductrice. La production des nouveaux polypes se réalise par bourgeoisement du stolon. Celle des méduses est assurée par les gonozoïdes de manière asexuée, au niveau des gonophores ou bourgeons médusaires.

La méduse, une fois libérée, et après une phase de croissance, assure la reproduction sexuée. *Clytia hemisphaerica* est une espèce gonochorique ; les méduses mâles et femelles présentent quatre gonades localisées le long des canaux radiaires (Figure 1.6 A) qui libèrent les gamètes dans l'eau de mer à maturité sexuelle. Le sexe de la méduse est déterminé par celui de la colonie de polypes qui l'a produite. Dans les conditions naturelles, celui-ci est déterminé par la température au moment de la production des méduses. Au sein du laboratoire par contre, nous utilisons des souches dont le sexe est fixé génétiquement, pour des raisons pratiques. Ainsi, les souches Z4B produisent des méduses femelles, et les souches Z10 des méduses mâles. Après fécondation, le développement embryonnaire conduit à la formation d'une larve nageuse appelée planula (Figure 1.6 C). La planula se fixe après 3 à 5 jours par son pôle antérieur et après métamorphose, donne naissance à un nouveau polype appelé polype primaire (Figure 1.6 D), à l'origine d'une nouvelle colonie de polypes. Quel que soit le stade considéré (polype, méduse ou planula), on peut distinguer deux feuillettes, ectoderme et endoderme, séparés par une couche de matrice extracellulaire acellulaire : la mésogée.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé exclusivement sur le stade méduse de *Clytia hemisphaerica* dont je vais présenter certaines particularités morpho-anatomiques.

1.3.2 Elevage en laboratoire de *Clytia hemisphaerica* et ressources transcriptomiques et génomiques

Le cycle complet de *Clytia hemisphaerica* est maîtrisé au sein de notre laboratoire. L'élevage a été constitué il y a plusieurs années à partir de boutures de polypes fournis par le laboratoire d'Evelyn Houliston (UMR7009, Villefranche-sur-Mer). Les polypes se développent sur des plaques en verre placées dans des aquariums contenant de l'eau de mer artificielle et maintenues sous courant d'eau permanent (Figure 1.7). Le système fonctionne en circuit fermé, la température est maintenue à 18°C et la salinité à 37 g.L⁻¹. Les plaques de polypes peuvent être placées dans un cristalliseur durant une nuit afin de récupérer les méduses libérées par les gonozoïdes. Les polypes et les méduses sont nourris deux fois par jour grâce à des artémies au stade nauplius.

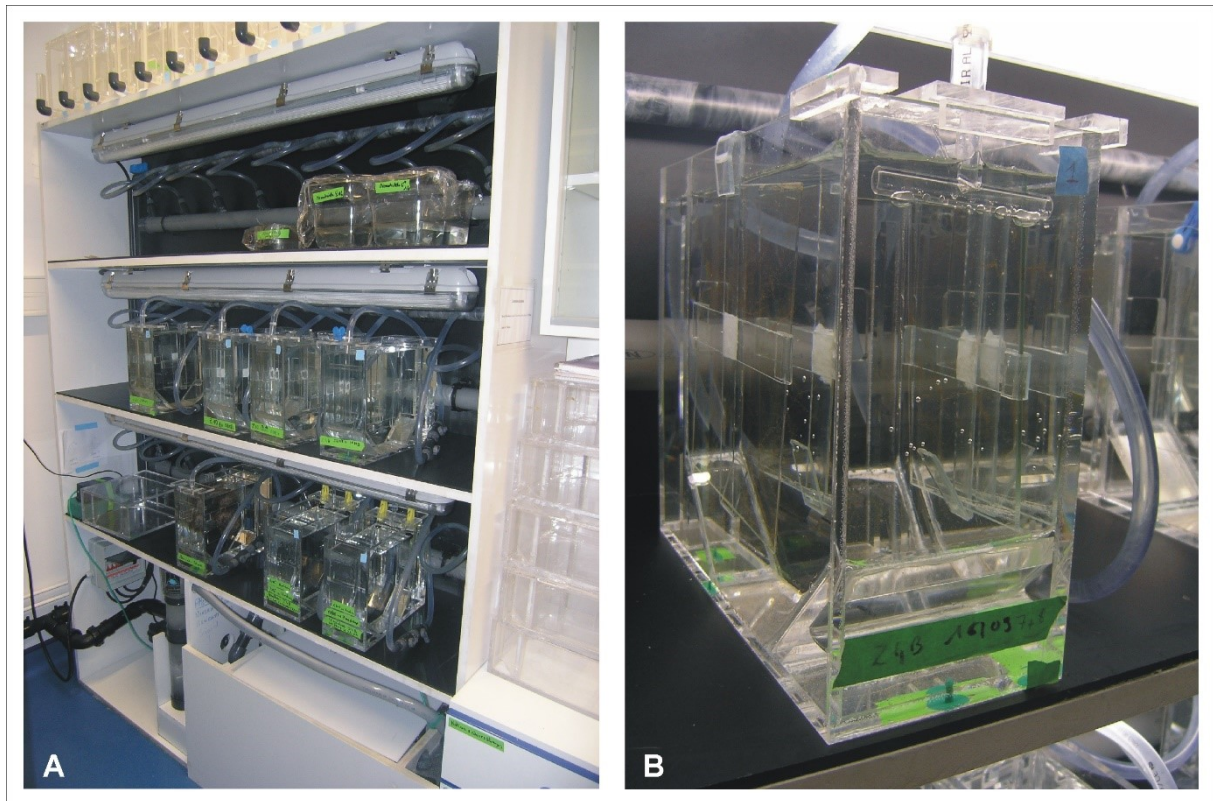


Figure 1.7 Elevages de *Clytia hemisphaerica* au sein de notre laboratoire. A) Système d'élevages, fonctionnant en circuit fermé, organisé sous la forme de petits aquariums où l'eau circule en permanence et dans lesquels les polypes et les méduses sont maintenus. En bas se trouve l'unité de filtration. B) Tank avec deux plaques de colonies de polypes.

Nous disposons du transcriptome quasi-exhaustif de *C. hemisphaerica* issu du séquençage en Sanger de 86 000 ESTs-5' et 8000 ESTs-3' et du séquençage en 454 et en Illumina des différents stades du cycle de vie. Les clones correspondants aux ESTs-5' sont disponibles au sein du laboratoire. De plus, le génome de *Clytia hemisphaerica* a été récemment séquençé au Genoscope (Centre National de Séquençage, Evry) et assemblé par Richard Copley (UMR7009, Villefranche-sur-Mer) et est en cours d'annotation.

1.3.3 Particularités anatomiques et cellulaires du stade méduse de *Clytia hemisphaerica*

Morpho-anatomie générale de la méduse de *Clytia hemisphaerica*

La méduse *C. hemisphaerica* est constituée d'une exombrelle (surface externe convexe aborale) et d'une sous-ombrelle (surface interne concave orale) séparées par une mésoglée (matrice extracellulaire acellulaire) (Figure 1.8). L'ensemble forme l'ombrelle. Exombrelle et sous-ombrelle

sont constituées d'une unique assise de cellules épithéliales de différents types. La sous-ombrelle est composée entre autres de cellules nerveuses et de cellules musculaires, et il semblerait que des cellules souches (*i-cells*, *interstitial cells*) soient aussi présentes. De nombreux nématocytes sont présents au niveau de l'exombrelle qui est dépourvue de cellules nerveuses et musculaires. Inséré à la périphérie de l'ombrelle, et en position orale, on trouve le vélum (synapomorphie des Hydrozoaires – Figure 1.8) dont les contractions sont coordonnées avec celles des muscles de la sous-ombrelle, permettant à la méduse de se propulser. Sur le pourtour de l'ombrelle se trouvent les bulbes tentaculaires d'où émergent les tentacules, ayant un rôle de capture des proies, grâce à leurs cellules ciliées urticantes : les cnidocytes (ou nématocytes), ainsi que des organes d'équilibration (statocystes) localisés entre les bulbes tentaculaires (Figure 1.8). La bouche est localisée à l'extrémité d'une expansion médiane appelée manubrium qui s'étend jusqu'à l'estomac. De l'estomac partent quatre canaux endodermiques orthogonaux, les canaux radiaires, qui rejoignent le canal circulaire à la périphérie de l'ombrelle. De ce canal circulaire, partent des canaux tentaculaires qui pénètrent dans les bulbes tentaculaires (Figure 1.8). La digestion se fait principalement au niveau des cavités endodermiques des bulbes tentaculaires et les canaux permettent aux nutriments de circuler dans l'ensemble de la méduse.

Les nématocytes, cellules neuro-sensorielles et urticantes spécifiques des Cnidaires

Les nématocytes ou cnidocytes¹ sont des cellules hautement différenciées, spécialisées dans la défense et la capture des proies et principalement localisées au niveau des tentacules de l'animal (on en trouve aussi en abondance au niveau du manubrium au stade méduse ainsi que sur toute l'exombrelle). Leur cytoplasme comprend une capsule, appelée nématocyste (ou cnidocyste), organite « explosif » contenant un filament urticant (ou tubule) (Figure 1.9 a). A la surface de la cellule, un cil (le cnidocil) est sensible aux stimuli mécaniques et chimiques (Williams 1975, Purcell 1977) et entraîne l'ouverture

¹ Cnidocytes et nématocytes sont synonymes chez les Hydrozoaires. Chez les Anthozoaires, on trouve d'autres types de cnidocytes : les spirocytes et les ptychocytes (Mariscal & Bigger 1976, Mariscal et al. 1977). La distinction entre les différents types de cnidocytes se fait en fonction du type de capsule (cnidocyste).

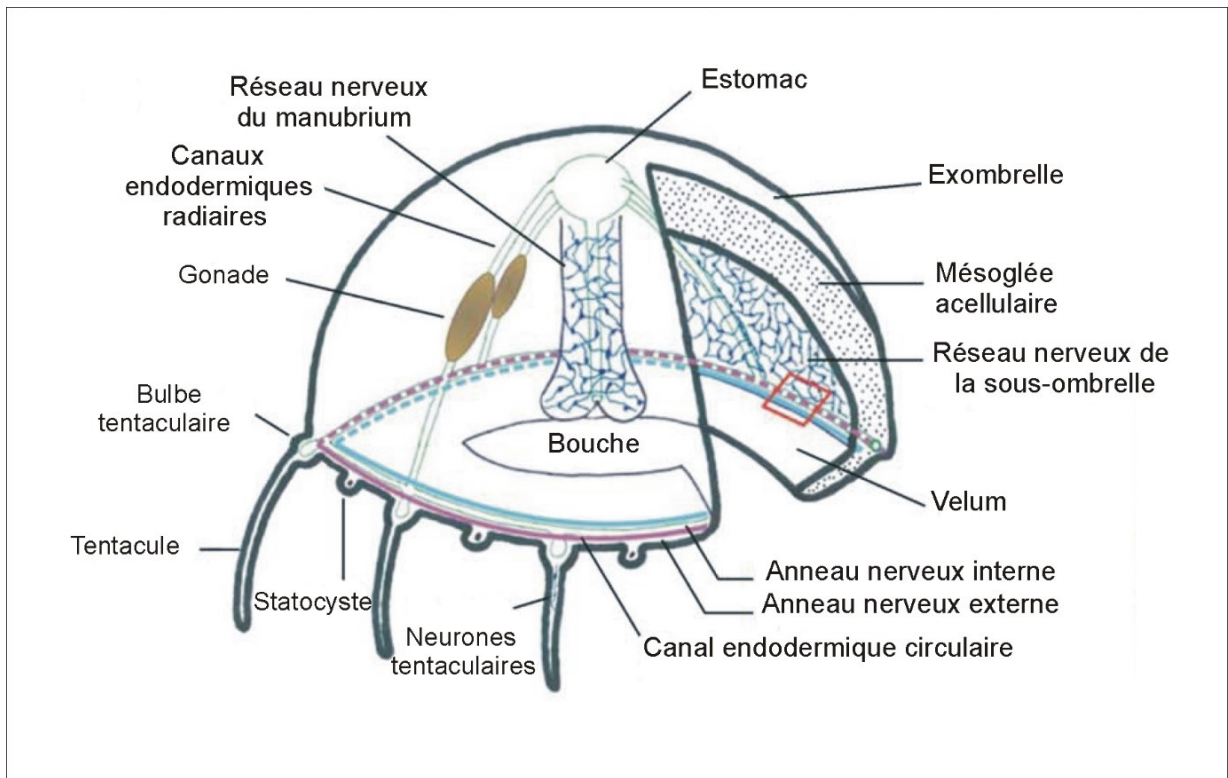


Figure 1.8 Anatomie générale de *Clytia hemisphaerica*. Houliston et al. (2010)

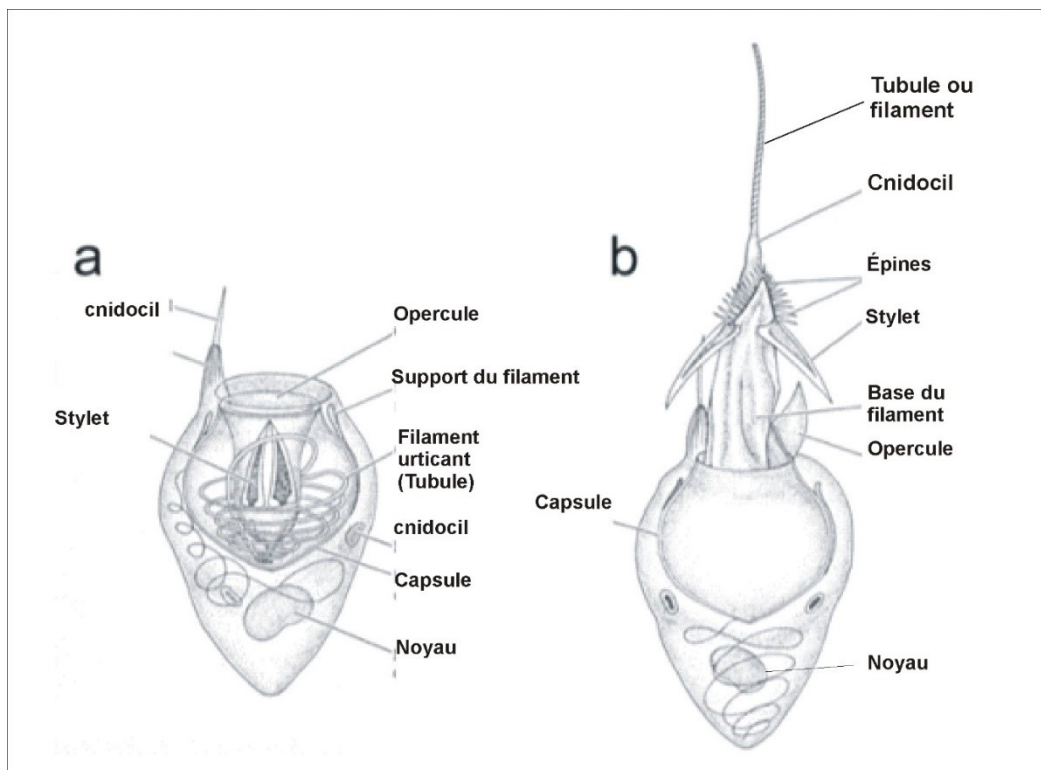


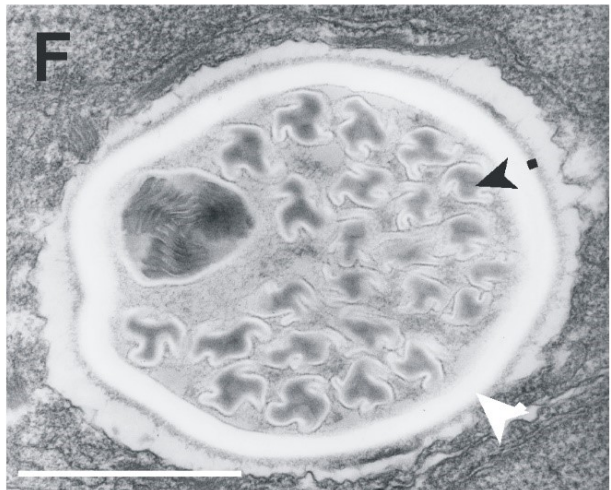
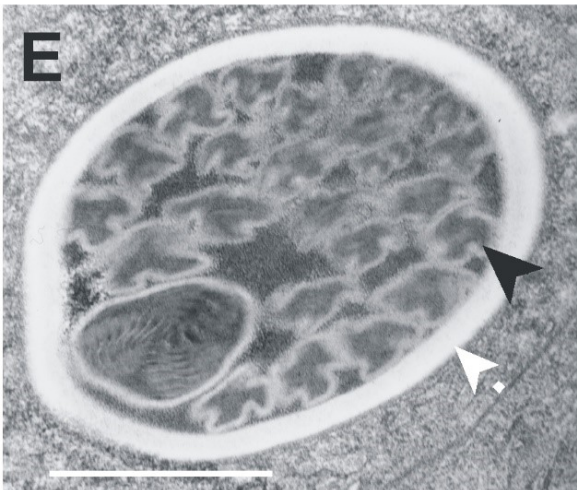
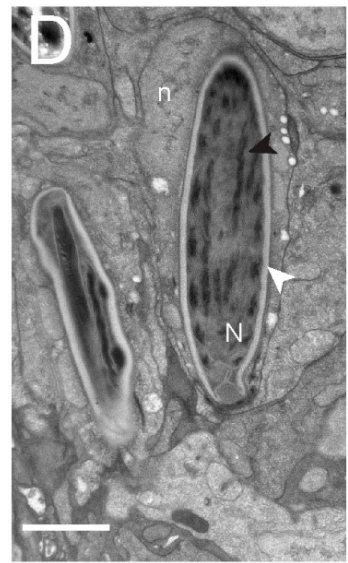
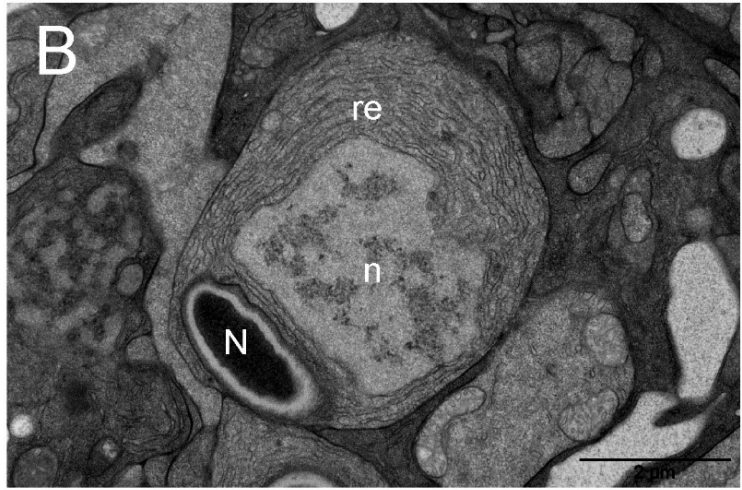
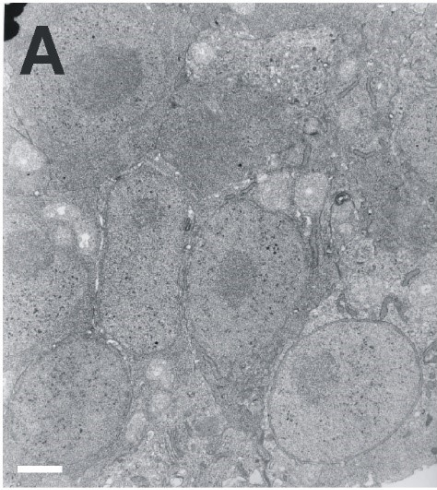
Figure 1.9 Schémas d'un nématocyte – a) Nématocyte non déchargé (tubule invaginé). b) Nématocyte déchargé (tubule dévaginé). D'après Brusca & Brusca 2005.

de l'opercule de la capsule et l'éjection du tubule lors de sa stimulation (Figure 1.9 b). La décharge du tubule est extrêmement rapide (700 nsec environ, Nüchter et al. 2006) et est permise par la mise en jeu d'une force osmotique très importante au sein de la capsule et par l'élasticité de la paroi (Weber 1989). Cette force osmotique est générée par la présence, en grande quantité, d'un polyanion, le poly- γ -glutamate, qui permet la rétention de cations (Weber, 1990).

Les nématocytes sont par ailleurs des cellules neurosensorielles, ils sont innervés et sensibles aux signaux venant du système nerveux mais aussi d'autres nématocytes (Kass-Simon 1988, Westfall et al. 2002, Kass-Simon & Scappaticci 2002). Des synapses afférentes aux nématocytes ont été mises en évidence (Hufnagel & Kass-Simon 1988, Westfall et al. 1998). Les nématocytes sont de plus capables d'émettre des potentiels d'action suite à une stimulation électrique (Oliver et al. 2008) et réaliseraient des contacts synaptiques avec d'autres nématocytes (Holtmann & Thurm 2001). Ils expriment de plus des marqueurs de différenciation neurosensorielle (Galliot et al. 2009).

La différenciation des nématocytes se réalise selon différentes étapes (Figure 1.10 – description de la différenciation des nématocytes des tentacules de *Clytia hemisphaerica*). Il est possible d'observer, dans un nématoblaste (progéniteur non mature de nématocyte), la mise en place progressive de la capsule (dérivée de l'appareil de golgi – Figure 1.10 B,C), qui finit par occuper la quasi-totalité du cytoplasme (Figure 1.10 D,E,F) ainsi que la formation du tubule dans le cytoplasme, à l'extérieur de la capsule (Figure 1.10 C) avant son invagination dans la capsule (Figure 1.10 D,E,F). La différenciation des nématocytes des tentacules se réalise au niveau de l'ectoderme des bulbes tentaculaires.

Figure 1.10 Etapes de la nématogénèse chez *Clytia hemisphaerica* en MET (au niveau du bulbe tentaculaire) – A) Cellules interstitielles. B) Jeune nématoblaste (nématocyte en différenciation) contenant un primordium de capsule noté N et du réticulum endoplasmique (re) très développé. C) Nématoblaste avec une capsule en développement (tête de flèche blanche) et un tubule (tête de flèche noire) formé dans le cytoplasme en dehors de la capsule. D) Nématocyte avec une capsule non mature. E) Nématocyte en cours de maturation avec une matrice encore dense aux électrons. F) Nématocyte mature avec une matrice faiblement dense aux électrons. N : capsule, n : noyau, re : réticulum endoplasmique. Echelles : A, E, F : 1 μ m ; B, C, D : 2 μ m. Images de Cyrielle Dayraud (B,C,D) et de Elsa Denker (A,E,F – Denker et al. 2008b)



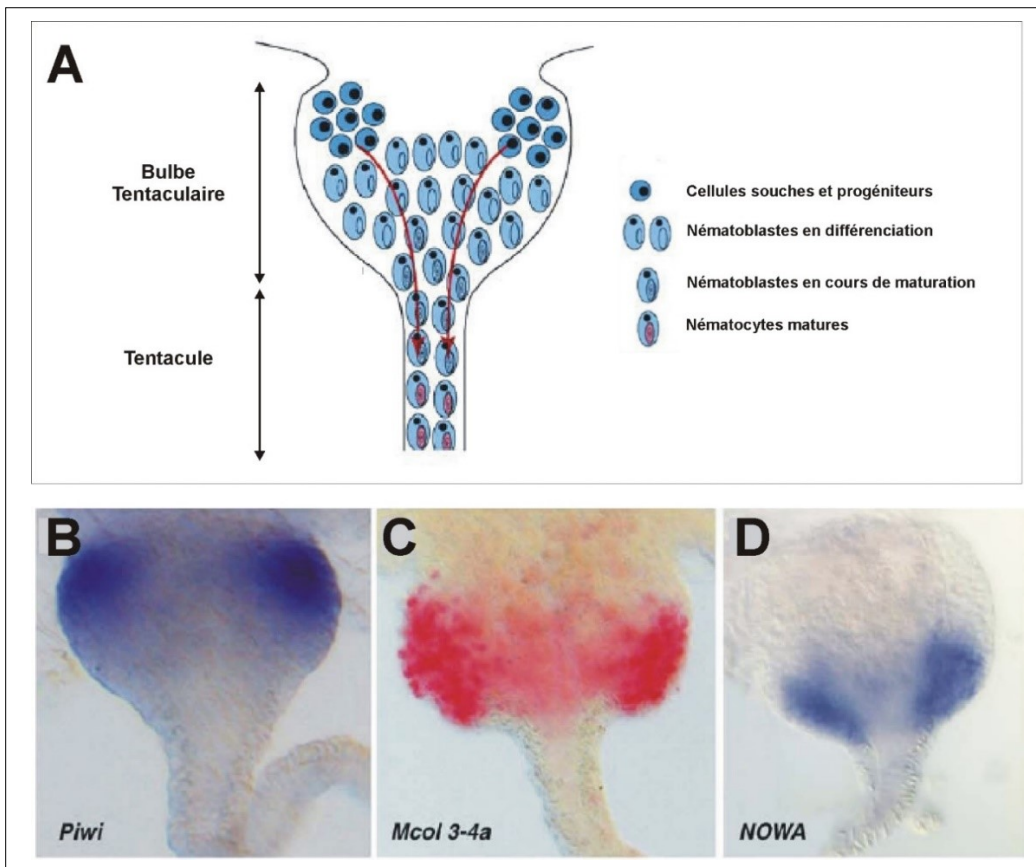
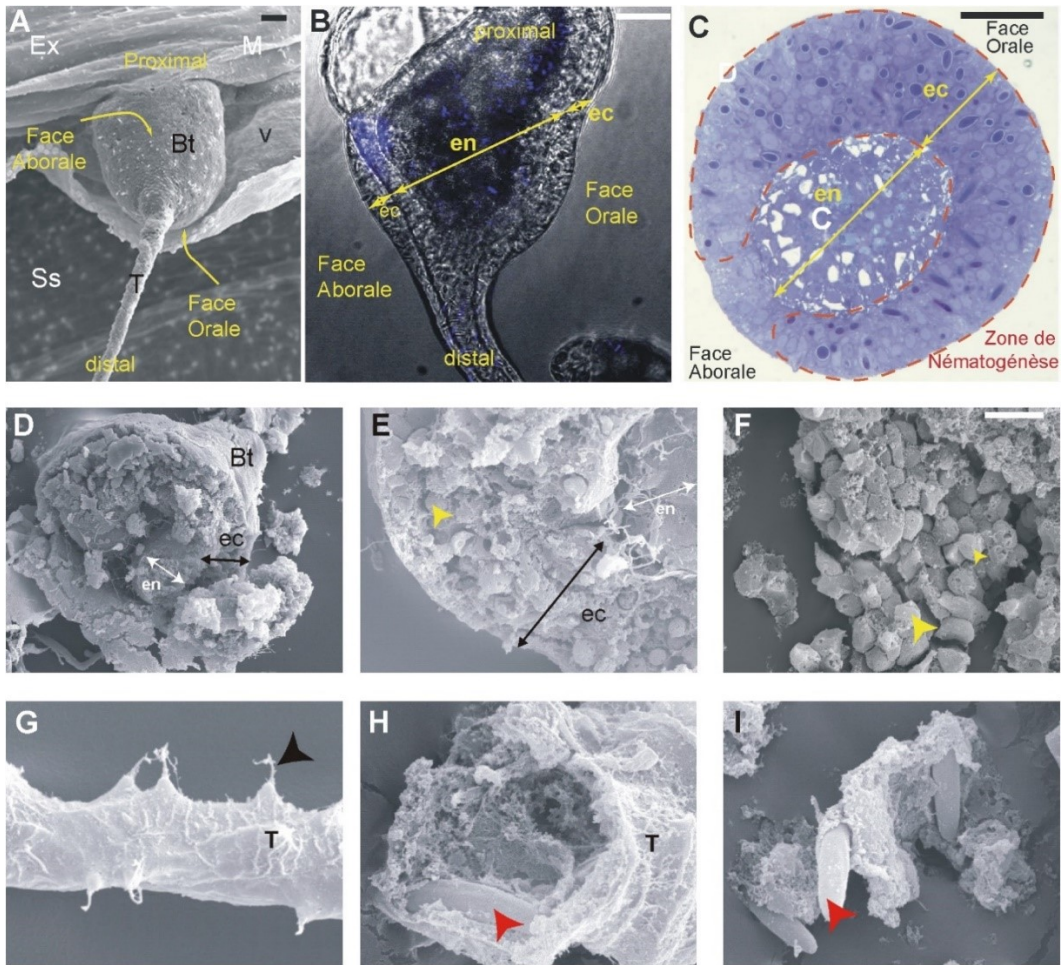
Bulbes tentaculaires et genèse en continue des tissus tentaculaires

Les tentacules prennent naissance, à leur base, au niveau de bulbes tentaculaires. L'ectoderme du système tentaculaire (bulbe + tentacule) est composé de nématocytes, de cellules myoépithéliales, et possède son propre réseau nerveux.

C'est au niveau de l'ectoderme des bulbes qu'est localisée la zone de production des nématocytes ou zone de nématogenèse (Figure 1.11). Cette zone forme une sorte de croissant à la surface du bulbe et s'interrompt au niveau de sa face externe (aborale - Figure 1.11 C – Denker et al. 2008b). Cette distribution en croissant explique les marquages en *in situ* interrompus sur la face externe du bulbe lorsque l'on étudie un gène impliqué dans la nématogenèse (Figure 1.12 B,C). L'ectoderme nématogénique de *Clytia hemisphaerica* a la particularité de fonctionner comme un tapis roulant cellulaire : il permet la production de nématocytes de manière polarisée et ordonnée, de la partie proximale (zone des cellules souches) à la partie distale (zone des nématocytes différenciés) du bulbe (Figure 1.12 A - Denker et al. 2008b). Il est possible d'observer les différents stades de différenciation des nématoblastes le long de cet axe proximo-distal (Figure 1.12 B-D). Ce « tapis roulant cellulaire » est bien caractérisé du point de vue histologique, cytologique, dynamique de la prolifération cellulaire, et expression de gènes marqueurs (Denker et al. 2008b, Alié et al. 2011, Jager et al. 2011b) et sera présenté plus en détail dans le Chapitre 3 de ma thèse (page 201). De tels systèmes organisés en « tapis roulants cellulaires » n'ont été décrit, en dehors des Bilatériens, que chez *Clytia hemisphaerica* et chez *Pleurobrachia pileus*.

Figure 1.11 Morpho-anatomie du bulbe tentaculaire de *Clytia hemisphaerica*. A) Image en microscopie électronique à balayage (MEB) du bulbe tentaculaire (vue frontale, face aborale). On peut y observer l'insertion du bulbe au niveau de l'exombrelle (Ex), en bordure de l'ombrelle (M) ainsi que sa position relative par rapport au vélum (V) et à la sous-ombrelle (Ss). B) Image confocale du bulbe (fluorescence naturelle en bleu) superposée à une image en DIC. On peut y observer l'ectoderme nématogénique (ec) ainsi que la cavité endodermique (en). C) Coupe transversale du bulbe marquée au bleu de toluidine où l'on peut observer l'interruption de la zone de nématogenèse (délimitée par les pointillés oranges). D-F) Dissection du bulbe tentaculaire (MEB) où l'on peut observer de nombreux nématoblastes (têtes de flèches jaunes) au niveau de l'ectoderme. G-I) Dissection du tentacule où l'on peut observer les nématocytes matures (têtes de flèches rouges). Sur l'image G, on peut observer le tubule d'un nématocyte déchargé (tête de flèche noire). *Bt* : *Bulbe tentaculaire*, *ec* : *ectoderme*, *en* : *endoderme*, *T* : *tentacule*. D'après Denker et al. (2008b).

Figure 1.12 Le tapis roulant cellulaire au sein du bulbe de *Clytia hemisphaerica*. A) Schéma du tapis roulant cellulaire et du gradient spatio-temporel de différenciation des nématocytes (flèches rouges). B-D) Expression au sein du bulbe tentaculaire *in toto* de marqueurs de cellules souches (B), de différenciation (C) et de maturation (D) des nématocytes.



Système nerveux de la méduse *Clytia hemisphaerica*

Le système nerveux de *Clytia hemisphaerica* est organisé sous la forme de différents réseaux nerveux associés à la sous-ombrelle, au système tentaculaire (bulbe + tentacule), au manubrium et aux gonades, ainsi que de deux anneaux nerveux localisés sur le bord de l'ombrelle (Voir Figure 1.8). Le vélum et l'exombrelle sont dépourvus de cellules nerveuses. Je vais détailler ici certaines caractéristiques du système nerveux de la méduse *Clytia hemisphaerica*. La majorité des résultats présentés dans cette partie ne sont pas encore publiés (Jager et al. manuscrit en préparation).

Le réseau nerveux épithélial associé à la sous-ombrelle est organisé sous la forme d'un réseau polygonal (de plus en plus dense au cours de la croissance de la méduse) et n'a pas d'orientation préférentielle (sauf à proximité du canal radiaire chez les méduses âgées) (Figure 1.13 A). Il est composé de neurones bipolaires ou multipolaires dont une grande majorité est FMRFamide positive (90% environ – Figure 1.13 B,D). Aucun réseau nerveux n'est observé au niveau du vélum (Figure 1.13 C).

Sur le bord de l'ombrelle, on observe deux anneaux nerveux caractéristiques des hydroméduses : l'anneau moteur interne et l'anneau sensoriel externe (Figure 1.13E). L'anneau sensoriel est fortement marqué par l'anticorps anti-FMRFamide alors que l'anneau moteur ne l'est pas (Figure 1.13F). Des stimulations électriques de l'anneau moteur entraînent la contraction de la musculature de la méduse (Takahashi & Takeda 2015). Les anneaux nerveux moteur et sensoriel ne sont pas interrompus au niveau des bulbes tentaculaires et ne montrent pas de modification morphologique particulière à ce niveau, à l'exception d'une légère déviation de leur trajectoire (Figure 1.14 A).

Les bulbes tentaculaires et les tentacules possèdent de plus leurs propres systèmes nerveux connectés l'un à l'autre et aux anneaux nerveux. Au niveau du bulbe tentaculaire, le réseau nerveux est ectodermique et présente des caractéristiques différentes entre les faces orale (du côté de la sous-ombrelle) et aborale (du côté de l'exombrelle) du bulbe. Du côté oral, le réseau présente une orientation longitudinale, quelques neurones sont immunoréactifs à l'anticorps anti-vasopressine et aucune immunoréactivité FMRFamide n'a été détectée (Figure 1.14 B,C,D). Sur la face aborale par contre, aucune cellule vasopressine positive n'est observée et les neurones du réseau sont FMRFamide-positifs (Figure 1.14 E,F). Le réseau aboral est orienté longitudinalement au sein de l'épithélium et est absent dans la zone où la nématogénèse s'interrompt. Il est en continuité avec le réseau nerveux aboral du tentacule qui est organisé longitudinalement par rapport à l'axe du tentacule, selon deux cordons nerveux FMRFamide positifs (Figure 1.14 F,G).

La mise en évidence des différentes sous-populations neuronales immunoréactives à ces différents neuropeptides (vasopressine et FMRFamide) confirme l'importance de la neurotransmission

peptidergique chez les Cnidaires (Grimmelikhuijzen et al. 1982, Grimmelikhuijzen et al. 1996, Takahashi & Takeda 2015).

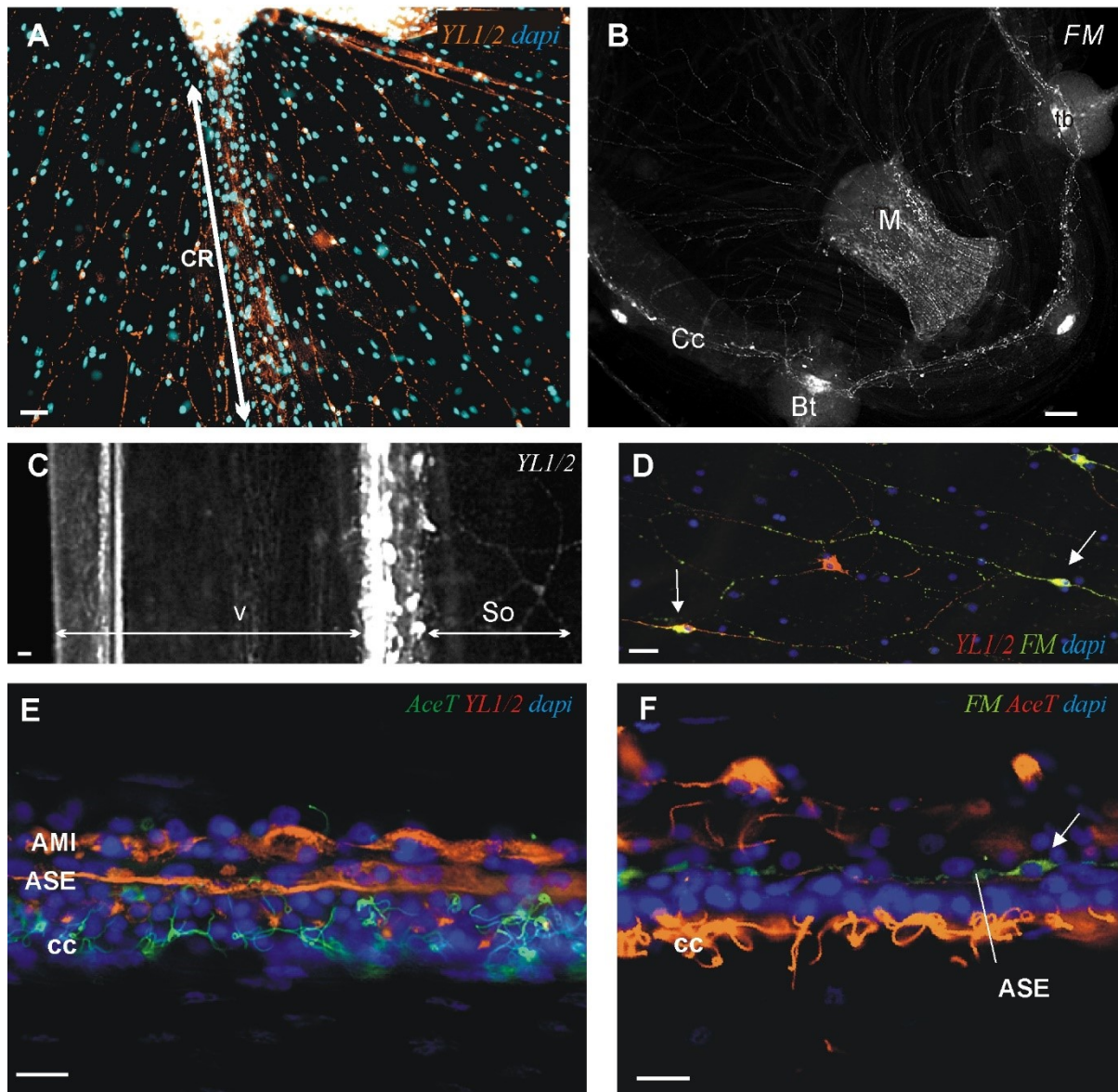


Figure 1.13 Système nerveux sous-ombrelle de *Clytia hemisphaerica*. A) Système nerveux de la sous-ombrelle et son orientation préférentielle le long d'un canal radiaire (CR). B) Réseau nerveux FMRFamide positif de la méduse. Bt : Bulbe tentaculaire, Cc : Canal circulaire, M : Manubrium. C) Mise en évidence de l'absence de marquage YL1/2 (anti- α -tubuline-tyrosylée) au niveau du vélum témoin de l'absence de réseau nerveux associé à cette structure. So : sous-ombrelle, V : vélum. D) Neurones FMRFamide-positifs (flèches blanches) au sein de la sous-ombrelle. On observe un marquage au niveau de leur corps cellulaire ainsi qu'au niveau de leurs prolongements. E-F) Visualisation des deux anneaux nerveux (AMI : anneau moteur interne ; ASE : anneau sensoriel externe) localisés sur le bord de la sous-ombrelle, à proximité du canal circulaire (cc). F) Marquage anti- α -tubuline acétylée (AceT – marqueur de cellules ciliées) et anti-FMRFamide (FM) mettant en évidence l'anneau sensoriel externe (ASE), seul des 2 anneaux à posséder des cellules FMRFamide-positives (F, flèche blanche). Echelles : A,B,C : 50 μ m ; D : 20 μ m ; E,F : 10 μ m. Images originales de Muriel Jager.

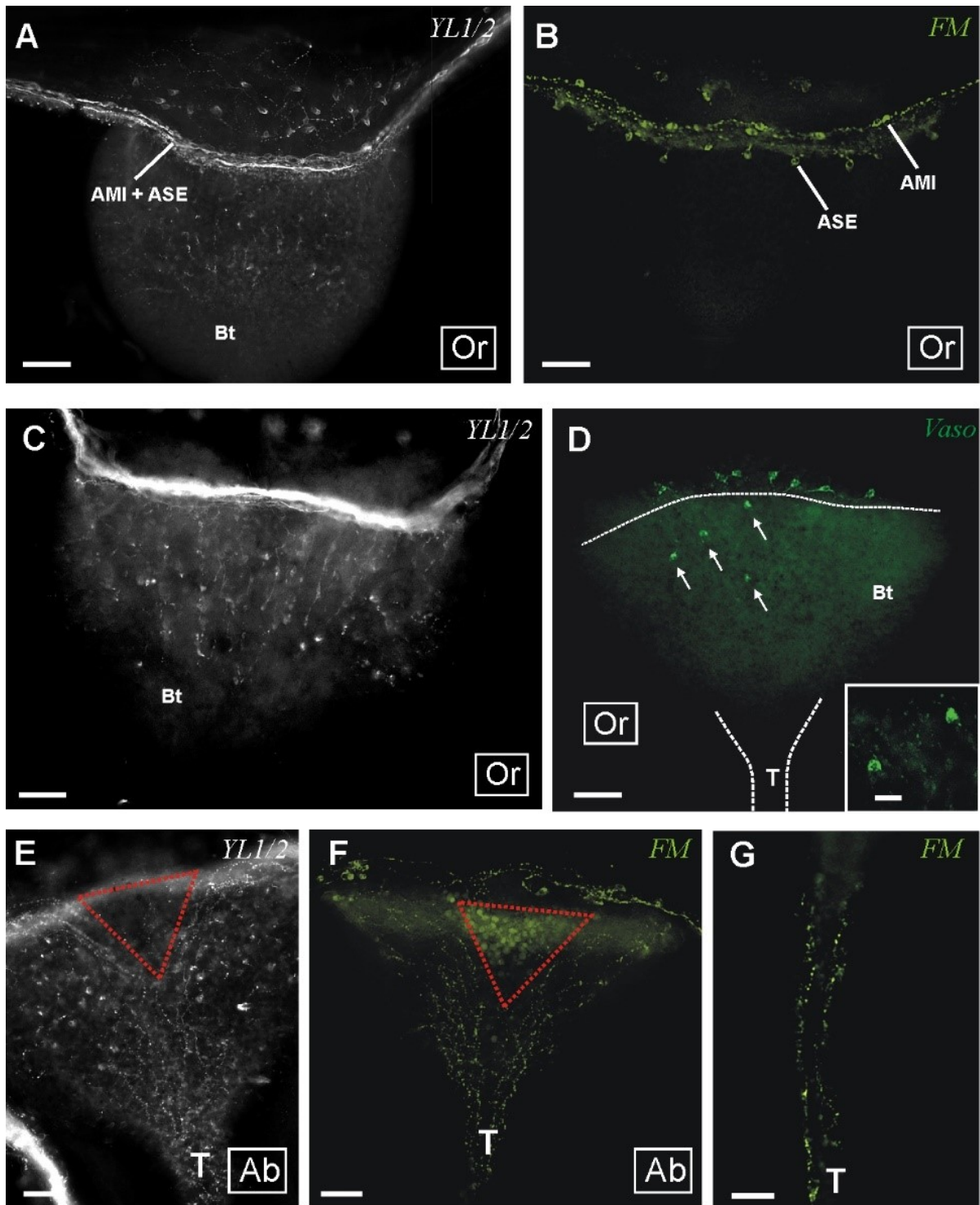


Figure 1.14 Organisation du système nerveux associé au bulbe tentaculaire de *Clytia hemisphaerica*. A) Trajet et légère déviation des anneaux moteur (AMI) et sensoriel (ASE) au niveau d'un bulbe tentaculaire. B,C,D) Système nerveux associé à la face orale du bulbe (Or), mettant en évidence l'absence de cellules FMRFamide positives (B), une organisation longitudinale par rapport à l'axe du bulbe (C) ainsi que la présence de quelques cellules immunoréactives à la vasopressine (D, flèches blanches et encadré). E,F) Système nerveux associé à la face aborale du bulbe (Ab), mettant en évidence un réseau dense orienté longitudinalement (E) et absent dans la zone où la nématogénèse s'interrompt (E, triangle rouge). Ce réseau est en grande partie FMRFamide positif (F) et est en continuité avec celui du tentacule (F). F) Réseau nerveux FMRFamide positif du tentacule constitué de deux cordons longitudinaux. *Ab* : face aborale, *AMI* : anneau moteur interne, *ASE* : anneau sensoriel externe, *Bt* : Bulbe tentaculaire, *Or* : face orale, *T* : tentacule. Echelles : A-G : 20 μ m, insert dans D : 5 μ m. Images originales de Muriel Jager.

Musculature de la méduse *Clytia hemisphaerica*

La musculature des Cnidaires est principalement de type myoépithélial et est localisée aussi bien au niveau de l'ectoderme que de l'endoderme (Figure 1.15 A - Brusca & Brusca 2005). Ces cellules sont organisées en faisceaux au sein de l'épithélium et présentent une morphologie bipolarisée, avec un corps cellulaire apical ayant l'aspect d'une cellule épithéliale pavimenteuse et une expansion basale présentant une condensation de myofilaments (on parle de myonèmes) qui s'organisent parallèlement à la lame basale (Figure 1.15 B). L'organisation des myofilaments des myonèmes peut être de type lisse ou striée. Les prolongements musculaires d'un même épithélium ont toujours la même orientation (longitudinale/radiale ou circulaire) mais sont orthogonaux entre l'endoderme et l'ectoderme. On observe de plus, chez certains Cnidaires, de « vraies cellules musculaires », de morphologie complètement différente des précédentes : dépourvues de corps cellulaire, de forme allongée et aplatie avec des myofilaments de type lisse ou striés envahissant le cytoplasme de la cellule.

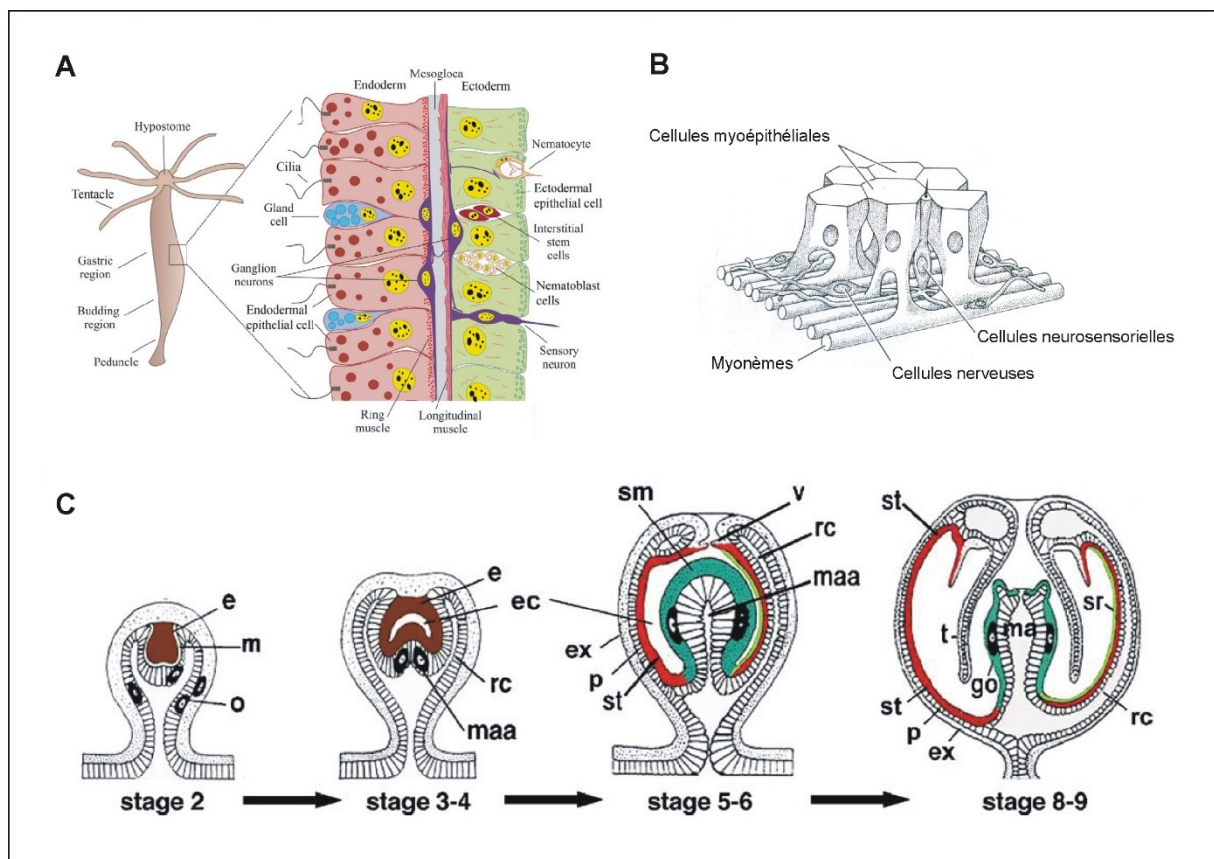


Figure 1.15 Aperçu des cellules musculaires des Cnidaires. A) Localisation des cellules musculaires myoépithéliales de l'Hydre au niveau des épithéliums endodermiques et ectodermiques. Dans l'ectoderme, les fibres sont orientées longitudinalement tandis que dans l'endoderme elles sont orientées de façon circulaire. B) Organisation ultrastructurale des cellules myoépithéliales de Cnidaires. C) Principaux stades de développement de la méduse *Podocoryne carnea* où l'on peut voir la mise en place de la musculature striée de la méduse à partir de l'entocodon. *e* : entocodon (marron); *ec* : cavité de l'entocodon ; *ex* : exombrelle ; *go* : gonade ; *m* : mésoglée ; *ma* : manubrium ; *maa* : primordium du manubrium ; *o* : ovocytes en migration ; *p* : endoderme ; *rc* : canal radiaire ; *sm* : muscle lisse du manubrium (vert foncé) ; *sr* : muscle lisse du canal radiaire (vert clair) ; *st*

: *muscle strié (rouge)* ; *t : tentacules* ; *v : vélum*. D'après A) Technau & Steele (2011), B) Brusca & Brusca (2005) et C) Seipel & Schmid (2005).

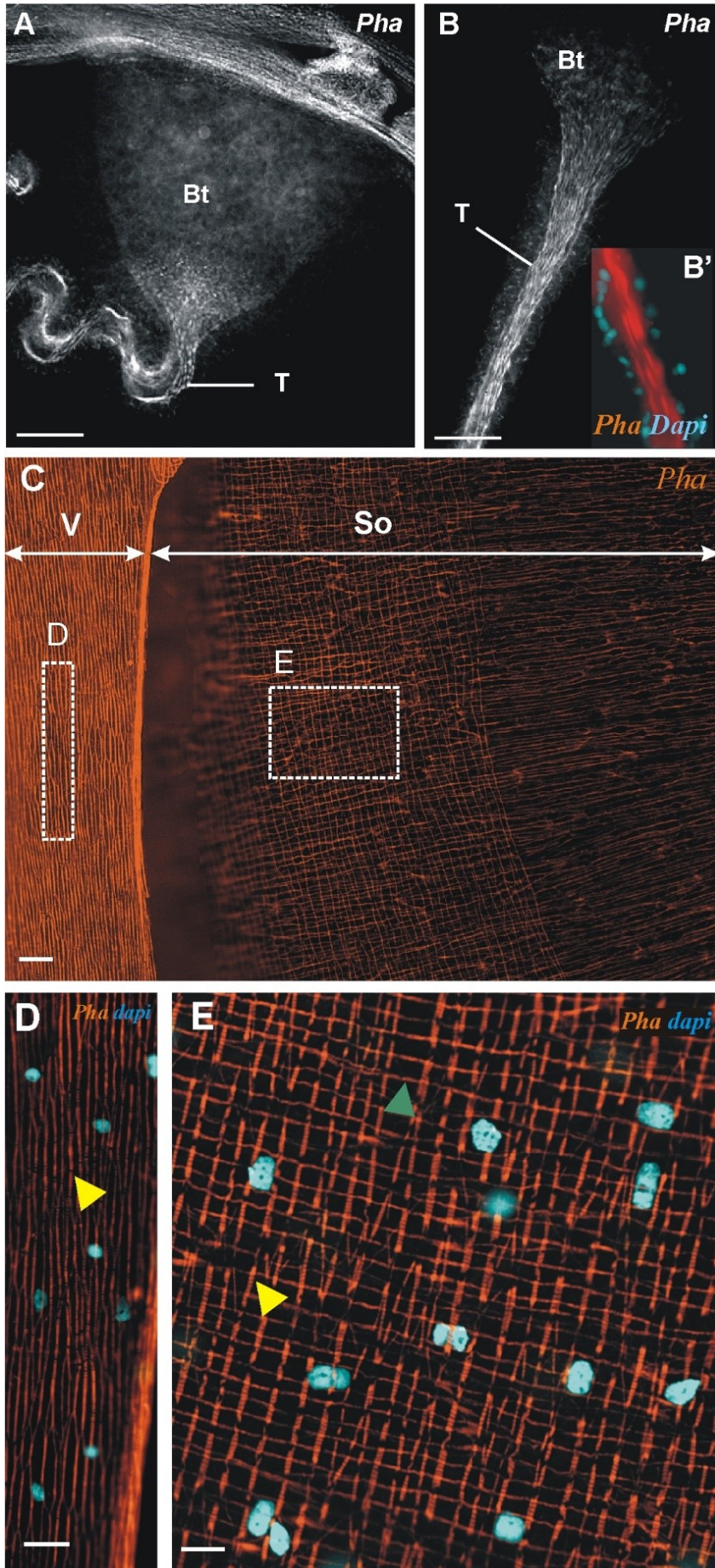
Il est intéressant de remarquer que les polypes possèdent uniquement des cellules musculaires lisses alors que les méduses possèdent des muscles striés et lisses. Toute la musculature striée de la méduse dérive de l'entocodon (Seipel & Schmid 2005), massif cellulaire mis en place lors du bourgeonnement médusaire (Figure 1.15 C). L'entocodon est intercalé entre l'endoderme et l'ectoderme et séparé de ces derniers par une fine matrice extracellulaire.

L'exploration complète de la musculature de la méduse *Clytia hemisphaerica* n'a pas encore été réalisée, mais nous possédons cependant quelques données concernant la musculature (marquages phalloïdine) de la sous-ombrelle, du vélum et du tentacule de *Clytia hemisphaerica*. La musculature du tentacule est de type myoépithélial, elle semble être orientée longitudinalement par rapport à l'axe du tentacule et s'ancrer au niveau de l'extrémité distale du bulbe tentaculaire (Figure 1.16 A-B). En ce qui concerne la musculature du vélum et de la sous-ombrelle, nous ne savons pas s'il s'agit de cellules myoépithéliales ou de cellules musculaires au sens strict. On y trouve une dense couche de cellules musculaires striées squelettiques organisées de manière circulaire (Figure 1.16 C-E, têtes de flèches jaunes en D et E), reliées entre elles par des jonctions gap et donc couplées électriquement (caractéristiques des cellules musculaires striées des Hydroméduses, Satterlie 2002). Uniquement au niveau de la sous-ombrelle, sur-apposées aux fibres striées circulaires, on observe des fibres musculaires lisses organisées de manière radiale (Figure 1.16 D,E, tête de flèche verte en E). L'innervation de ces cellules musculaires lisses se fait via le réseau nerveux épithélial de la sous-ombrelle (lui-même connecté à l'anneau nerveux moteur).

On peut noter de plus, qu'un autre système de conduction multidirectionnelle que le réseau nerveux est présent chez les Hydroméduses et est adapté à la conduction rapide de l'influx électrique au niveau des cellules musculaires. En effet, les fibres musculaires striées circulaires, que l'on trouve au niveau de la sous-ombrelle et du vélum des Hydroméduses (comme chez *Clytia hemisphaerica*), et pour lesquelles il existe un couplage électrique via des jonctions gap (Satterlie 2002) ne sont pas innervées par le réseau nerveux. La transmission de l'information depuis l'anneau nerveux moteur vers les cellules musculaires striées se ferait via une couche de cellules épithéliales en contact synaptique avec les neurones de l'anneau. Ces cellules épithéliales sont couplées électriquement entre elles et avec les cellules musculaires striées circulaires (Satterlie 2015).

Figure 1.16 Musculature de la méduse *Clytia hemisphaerica*, au niveau du bulbe tentaculaire (A-B), de la sous-ombrelle et du vélum (C-E). A-B) Marquage phalloïdine des muscles du tentacule (T). Ces derniers partent du tiers distal du bulbe tentaculaire (Bt). C) Marquage phalloïdine de la musculature du vélum (V) et de la sous-ombrelle (So). On observe des fibres orientées circulairement au sein du vélum et de la sous-ombrelle. Ces fibres correspondent à des fibres musculaires striées (D-E, têtes de flèches jaunes) reliées par des jonctions gap. Au

niveau de la sous-ombrelle, des fibres musculaires lisses sont aussi présentes et orientées longitudinalement (E, tête de flèche verte). Ces dernières sont innervées par le réseau nerveux de la sous-ombrelle. Echelles : A-B : 25 μm ; C : 50 μm ; D, E: 20 μm . Images de Muriel Jager.



De manière très intéressante, on se rend compte qu'il existe, chez les Hydroméduses, une corrélation entre la présence de fibres musculaires radiales lisses et la présence d'un réseau nerveux au niveau de la sous-ombrelle. Les fibres musculaires lisses radiales que l'on trouve uniquement dans la sous-ombrelle de certaines Hydroméduses (comme chez *Clytia hemisphaerica*) ne sont pas couplées électriquement mais innervées via le réseau nerveux épithélial diffus. Le vélum, qui ne possède que des cellules musculaires striées couplées électriquement, ne présente pas de structures nerveuses, et les Hydroméduses qui ne possèdent pas de cellules musculaires lisses au niveau de leur sous-ombrelle ne présentent pas non plus de réseau nerveux sous-ombrelle (Satterlie 2002, Satterlie 2015).

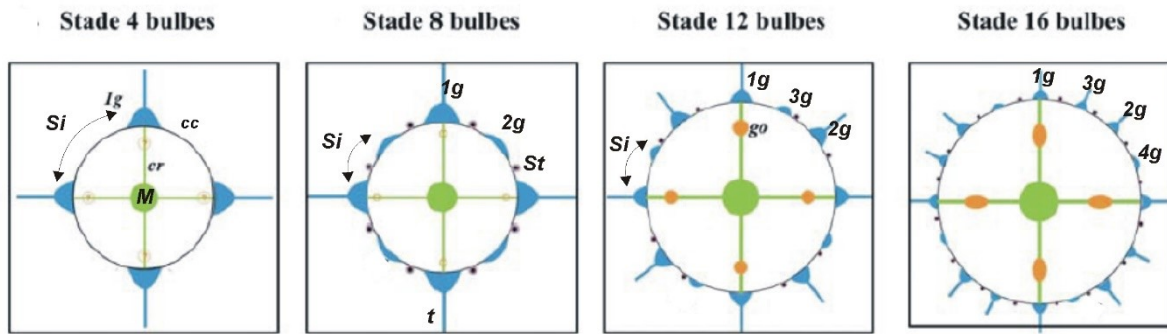
1.3.4 Croissance du stade méduse de *Clytia hemisphaerica*

Description des stades de croissance

La croissance de la méduse de *Clytia hemisphaerica* (après sa libération par le gonozoïde) présente des caractéristiques originales. En effet, lorsque l'on observe différents stades de croissance de la forme méduse, on peut observer une apparition progressive des bulbes tentaculaires et des statocystes (Figure 1.17 A) selon un *pattern* bien défini. Les données présentées ci-dessous correspondent à des observations non publiées réalisées dans l'équipe par M. Manuel et M. Jager.

La méduse libérée ne possède que 4 bulbes matures (possédant des tentacules) localisés aux points de rencontre entre les canaux radiaires et le canal circulaire ainsi que 4 ébauches de bulbes (bourgeons de bulbes sans tentacules) localisés entre chaque bulbe mature (Figures 1.17 A, stade 8 bulbes, et 1.18 A-D). Le stade ultime de croissance possède 32 bulbes matures avec des tentacules. Les nouveaux bulbes apparaissent progressivement au cours du développement et de la croissance de la méduse, jusqu'au nombre de 32. Les stades « 8 bulbes » et « 16 bulbes » ont été observés depuis longtemps, mais le suivi précis de la croissance de la méduse a permis de montrer récemment au sein de l'équipe la présence d'un stade intermédiaire possédant 12 bulbes mettant en évidence que le nombre de bulbes n'est pas multiplié par 2 à chaque stade, comme on le pensait auparavant. Des stades 4, 8, 12, 16 puis 32 bulbes sont donc successivement observés.

A



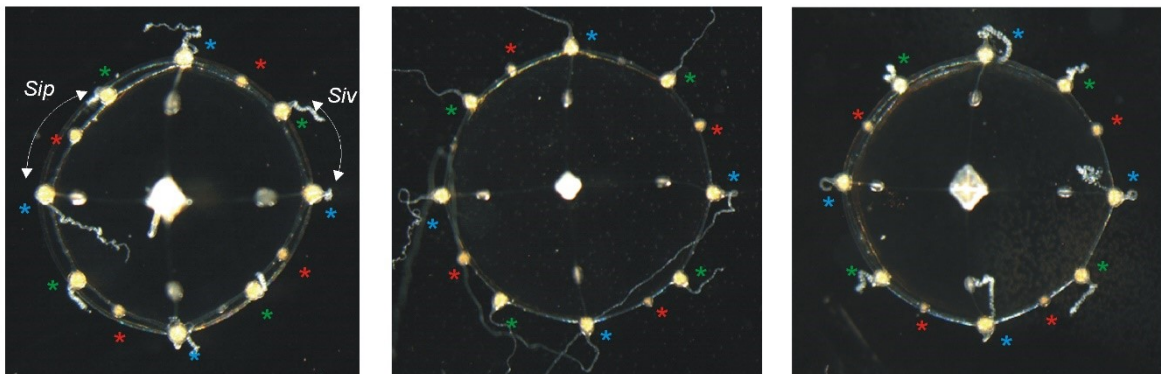
B

Stades 12 bulbes

Dextre

Séneestre

Bilatérale



* 1ère génération * 2ème génération * 3ème génération

Figure 1.17 Croissance de la méduse *Clytia hemisphaerica*. A) Schéma général des différents stades de croissance de *C. hemisphaerica*. La méduse est libérée au stade 8 bulbes et possède 4 bulbes de 1^{ère} génération (1g) et 4 bulbes de 2^{ème} génération (2g). Quatre bulbes de 3^{ème} génération se mettent ensuite en place (stade 12 bulbes) au niveau de certains des segments inter-bulbaires (Si) (leur position définit différents phénotypes présentés en B), puis quatre bulbes de 4^{ème} génération dans les segments inter-bulbaires vides (stade 16 bulbes). Le passage du stade 16 bulbe au stade 32 bulbes de la méduse en fin de croissance n'est pas représenté. Le code couleur appliqué est le suivant : bleu = bulbes avec ou sans tentacule (t), vert = manubrium (M) et canaux radiaires (cr), orange = gonades (go), violet = statocystes (st). B) Phénotypes observés au stade 12 bulbes. Les méduses sont orientées la bouche vers le bas. Les méduses dextres ont un bulbe de 3^{ème} génération présent dans le premier secteur inter-bulbaire en partant d'un bulbe de 1^{ère} génération, en tournant dans le sens des aiguilles d'une montre. Les méduses séneestres ont un bulbe de 3^{ème} génération présent dans le premier secteur inter-bulbaire en partant d'un bulbe de 1^{ère} génération, en tournant dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Ces phénotypes présentent une alternance entre les segments inter-bulbaires vides (Siv) et ceux où un bulbe de 3^{ème} génération est apparu (Sip). Les méduses bilatérales ne présentent pas cette alternance et la position des bulbes de 3^{ème} génération implique l'apparition d'une symétrie bilatérale, s'ajoutant à la symétrie radiaire. Si : segment inter-bulbaire, Sip : segment inter-bulbaire « plein », Siv : segment inter-bulbaire vide.

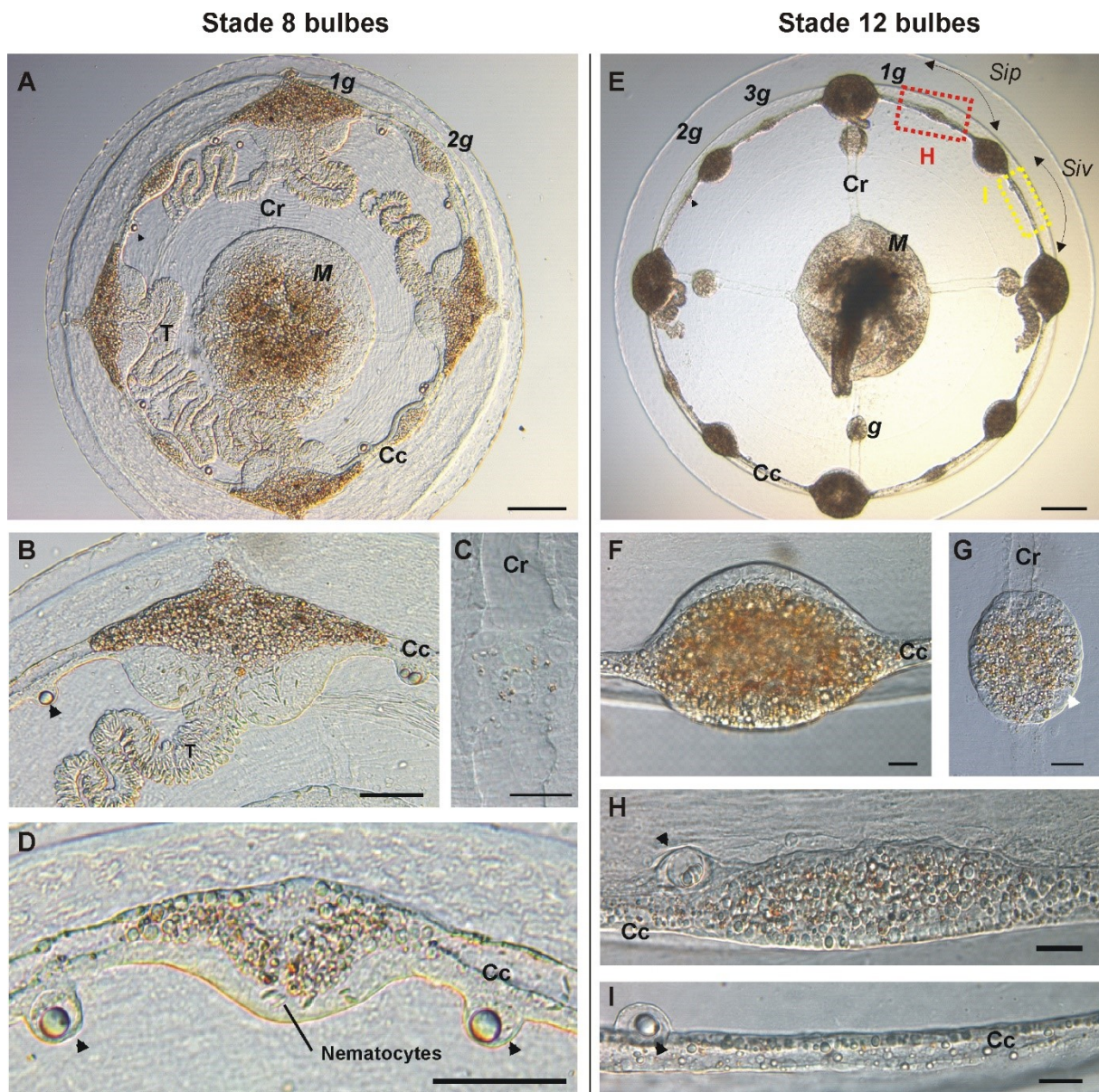


Figure 1.18 Caractéristiques anatomiques des stades 8 bulbes (A-D) et 12 bulbes (E-I). A) Vue générale de la méduse au stade 8 bulbes possédant 4 bulbes matures de 1^{ère} génération (1g) et 4 bulbes en cours de croissance de 2^{ème} génération (2g). B) Bulbe de 1^{ère} génération avec son tentacule mature. C) Ebauche de gonade le long d'un canal radiaire (cr). D) Bulbe de 2^{ème} génération en cours de croissance. E) Vue générale de la méduse au stade 12 bulbes où l'on peut voir la mise en place des bulbes de 3^{ème} génération (3g). F) Bulbe de 2^{ème} génération. G) Gonade en cours de croissance. H) Bulbe de 3^{ème} génération en cours de croissance (correspondant au cadre en pointillés rouges en E). I) Segment inter-bulbaire vide (Siv). Cc : canal circulaire, Cr : canal radiaire, g : gonade, M : manubrium, Sip : segment interbulbaire « plein », Siv : segment interbulbaire vide, T : tentacule, têtes de flèches noires : statocyste. Echelles : A : 100 μ m ; B,D,G : 50 μ m, C, F,H,I : 20 μ m, E : 200 μ m.

Chaque stade est défini par l'apparition d'une nouvelle génération de bulbes au niveau de segments inter-bulbaires (un segment inter-bulbaire correspond à la zone située entre deux bulbes de générations déjà existantes - Figure 1.17 A). Ces bulbes apparaissent donc quatre par quatre. Les bulbes de 2^{ème} génération apparaissent entre chaque bulbe de 1^{ère} génération, avant même la libération

de la méduse par les gonozoïdes (Figure 1.17 A - stade 8 bulbes). Les bulbes de 3^{ème} génération apparaissent entre un bulbe de 2^{ème} et de 1^{ère} génération (Figure 1.17 A, stade 12 bulbes et Figure 1.18 E-I), 4 à 5 jours après la libération de la méduse. L'analyse de l'apparition des bulbes de 3^{ème} génération montre qu'ils n'apparaissent pas toujours à la même position (données non publiées). Différents phénotypes du stade « 12 bulbes » ont ainsi pu être caractérisés : phénotypes dextre, sénestre et bilatéral (Figure 1.17 B). Ces phénotypes ont été définis de la manière suivante : en orientant la bouche de la méduse vers le bas, les méduses dextres ont un bulbe de 3^{ème} génération présent dans le premier secteur inter-bulbaire en partant d'un bulbe de 1^{ère} génération, en tournant dans le sens des aiguilles d'une montre. Alors que chez les méduses sénestres, il est présent dans le premier secteur en partant d'un bulbe de 1^{ère} génération et en tournant dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Pour les phénotypes dextre et sénestre, on observe une alternance entre les segments inter-bulbaires vides et ceux où un bulbe de 3^{ème} génération est apparu. En ce qui concerne le phénotype bilatéral (Figure 1.17B à droite), cette alternance n'est pas respectée et la position des bulbes implique l'apparition d'une symétrie bilatérale, s'ajoutant à la symétrie radiaire. Pour finir, il est aussi possible d'observer des méduses ne présentant que 3 bulbes de 3^{ème} génération (méduses « 11 bulbes » - non représentées sur la figure 1.17) et beaucoup plus rarement que 2 bulbes de 3^{ème} génération (Tableau 1.1). Les 4 bulbes de 4^{ème} génération se mettent ensuite en place dans les segments inter-bulbaires vides, 4 jours environ après la mise en place de la 3^{ème} génération (stade 16 bulbes). Le passage du stade 16 bulbes au stade 32 bulbes se fait ensuite par la mise en place non coordonnée (contrairement aux générations précédentes) de bulbes dans chacun des segments inter-bulbaires.

Phénotypes	Dextre	Sénestre	Bilatéral	Autres (10 ou 11 bulbes)
Proportions (%)	27	25	4,4	44,6
Souche Z4B, N = 1061				

Tableau 1.1 Proportion des différents phénotypes observés lors de l'apparition des bulbes de 3^{ème} génération.

On observe donc chez la méduse, aux différents stades de croissance, une répétition régulière des bulbes tentaculaires tout autour de l'axe principal du corps (axe oral-aboral). Cette mise en place progressive semble donc être contrôlée finement de manière spatiale et temporelle et corrélée aux processus de croissance de la méduse (les différentes générations se mettent en place en parallèle de la croissance générale de la méduse). Les bulbes ne sont pas les seules structures à présenter cette organisation radiaire ; on observe aussi une répétition des statocystes et des gonades. Un statocyste est présent au niveau de chaque segment inter-bulbaire lors de la libération de la méduse (Figure 1.17 A,

stade 8 bulbes et Figure 1.18 A). De nouveaux statocystes (néostatocystes) apparaissent de part et d'autre des bulbes de 1^{ère} génération, uniquement une fois que les bulbes de 3^{ème} génération sont apparus (Figure 1.19). Le contrôle spatio-temporel de la mise en place des bulbes semble donc être étroitement lié à celui des statocystes².

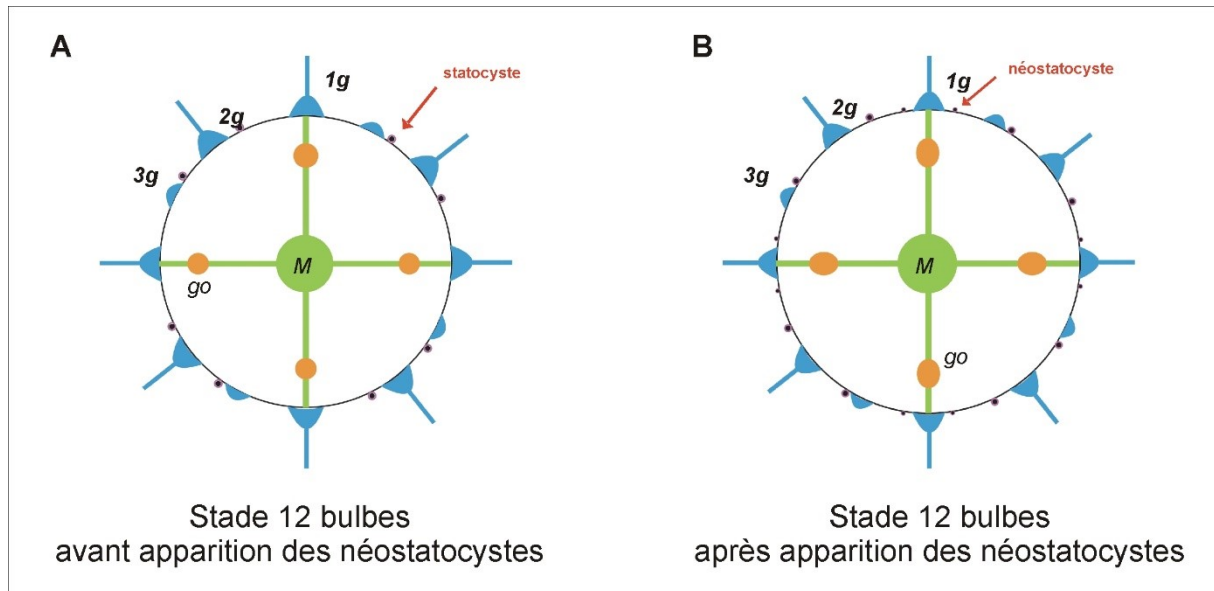


Figure 1.19 Apparition des néostatocystes au stade 12 bulbes. Les nouveaux statocystes n'apparaissent qu'une fois que les bulbes de 3^{ème} génération sont apparus. A) Stade 12 bulbes avant apparition des néostatocystes. B) Apparition des néostatocystes de part et d'autre des bulbes de 1^{ère} génération (1g). 1g : bulbe de 1^{ère} génération, 2g : bulbe de 2^{ème} génération, 3g bulbe de 3^{ème} génération, go : gonade, M : manubrium. Le code couleur appliqué est le suivant : bleu = bulbes avec ou sans tentacule, vert = manubrium (M), jaune = gonades (go), violet = statocystes.

Recherche des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la mise en place des bulbes de *C. hemisphaerica* : données préliminaires concernant le rôle de la voie Notch et de la voie mTOR

Les mécanismes contrôlant le nombre ainsi que la position des bulbes tentaculaires de *Clytia hemisphaerica* restent aujourd'hui inconnus. Différentes voies de signalisations connues, à l'échelle des Bilatériens, comme étant impliquées dans la mise en place de sériations anatomiques et dans des phénomènes de contrôle de la croissance cellulaire sont des candidats potentiels. J'ai pu tester, au cours de mon stage de M2 et de ma thèse, l'implication de la voie Notch/Delta et de la voie mTOR (mammalian target of Rapamycin) selon une approche pharmacologique. Je présente ici les résultats préliminaires que j'ai pu obtenir. Ces résultats sont issus d'un faible nombre d'expériences (une seule

² Des statocystes supplémentaires se mettent en place après le stade 16 bulbes, de manière non coordonnée et en nombre variable dans chaque segment inter-bulbaire.

en présence de DAPT et deux en présence de Rapamycine) et demandent à être répétés afin de confirmer les effets et de pouvoir les analyser statistiquement.

Mise en jeu de la voie Notch dans le contrôle de la mise en place des bulbes de C. hemisphaerica

La voie Notch, voie de signalisation dont les acteurs sont pour la plupart conservés à l'échelle des Métazoaires (Figure 1.20 A - Gazave et al. 2009), est connue pour être impliquée dans les processus de détermination, de différenciation, de prolifération cellulaire ou encore d'apoptose chez les Bilatériens (Radtke et al. 2005, Bray 2006, Grishina 2015) mais aussi chez les Cnidaires (Käsbauer et al. 2006, Marlow et al. 2012, Layden & Martindale 2014). Cette voie agit principalement via deux mécanismes d'action : mécanisme d'inhibition latérale (Figure 1.20 B) et établissement de « *developmental boundaries* » c'est-à-dire de « frontières cellulaires » (Figure 1.20 C) (Artavanis-Tsakonas et al. 1999 ; Ehebauer et al. 2006); ceci en fait un bon candidat pour le contrôle de la mise en place des bulbes de *Clytia hemisphaerica* qui semble être contrôlée spatialement de manière très précise.

J'ai pu, au cours de ma thèse, obtenir des résultats préliminaires concernant les conséquences phénotypiques de l'inhibition de la voie Notch en utilisant le DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester), un inhibiteur indirect de la voie Notch (inhibiteur du complexe de la γ -sécrétase impliqué dans le clivage de Notch, étape indispensable à la transduction intracellulaire – Figure 1.20 A). Les méduses, libérées depuis un jour, ont été incubées pendant 72 heures en présence de DAPT (5 μ M, 0,1% DMSO), de DMSO (0,1%) ou d'eau de mer. Cette approche pharmacologique permet d'émettre l'hypothèse de l'implication de la voie Notch dans le contrôle de la position mais aussi du *timing* d'apparition des bulbes tentaculaires (Figures 1.21 et 1.22). Chez les méduses traitées au DAPT, le résultat le plus spectaculaire est un passage direct du stade « 8 bulbes » au stade « 16 bulbes ». On observe en effet l'apparition, pour tous les individus traités, de la 3^{ème} génération de bulbes simultanément au niveau de quasiment tous les segments inter-bulbaires (Figure 1.21 A,B). Le stade « 12 bulbes » habituel, avec une alternance entre segments inter-bulbaires « vides » et segments avec un bulbe de 3^{ème} génération n'est jamais observé (Figure 1.21 A,B). La voie Notch semble donc être impliquée dans le contrôle spatial de la mise en place des bulbes. Ce résultat peut aussi être interprété comme une disparition de la distinction entre 3^{ème} et 4^{ème} génération de bulbes et suggère l'implication de la voie Notch dans le *timing* de la mise en place des bulbes. L'implication de la voie Notch dans une information de position est aussi suggérée par l'observation, chez les individus traités au DAPT, de fréquents bulbes surnuméraires d'une même génération (Figure 1.21 A,B pour la 3^{ème} génération et 1.21

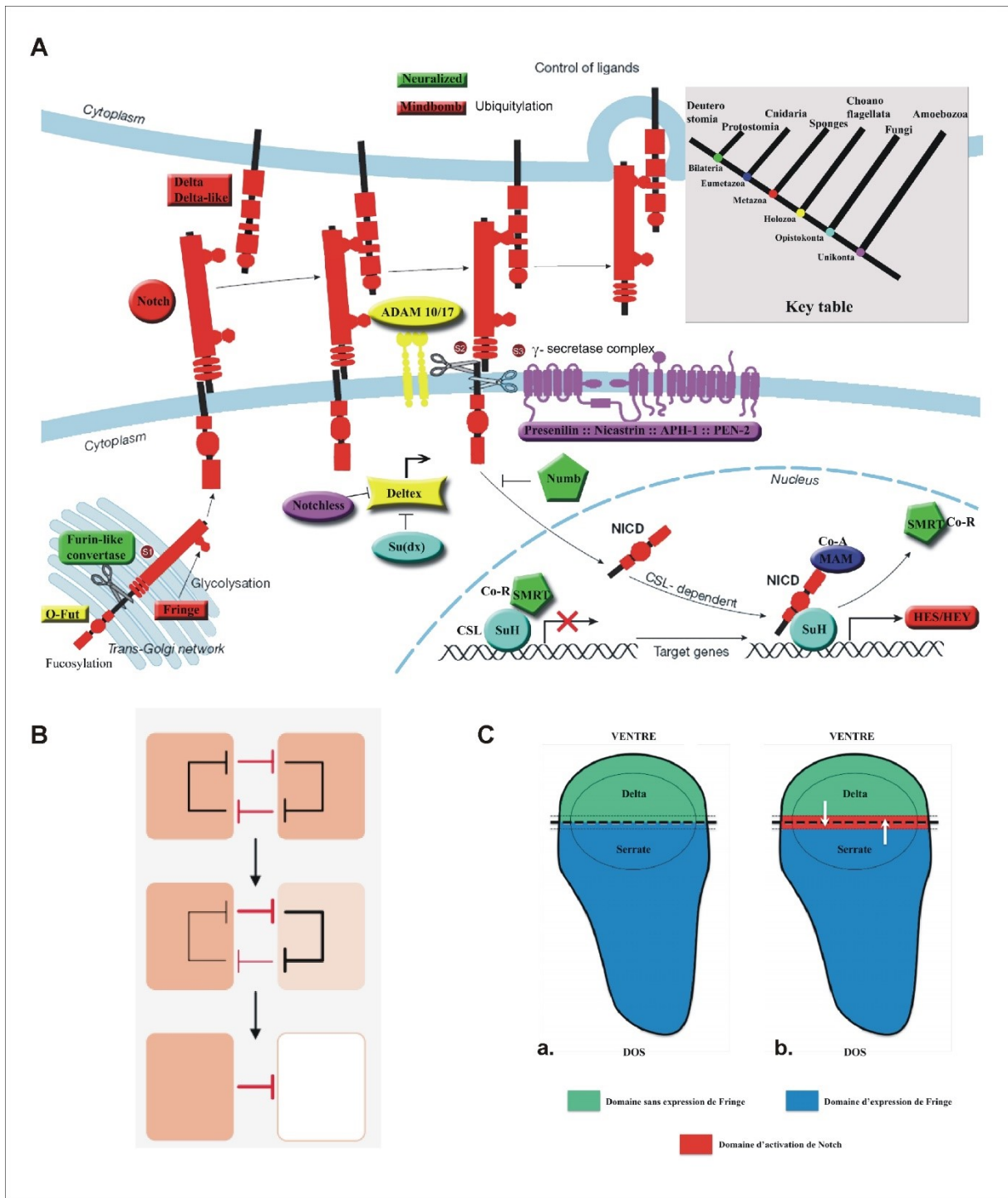


Figure 1.20 Présentation de la voie Notch : Conservation des acteurs à l'échelle des Unicontes (A) et principaux mécanismes d'action (B, C). A) Chaque protéine est représentée en une couleur qui indique son nœud d'acquisition d'après des analyses phylogénétiques (arbre en haut à droite). B) Voie Notch et mécanisme d'inhibition latérale. Deux cellules équipotentes (en orange) s'inhibent mutuellement via Delta et Notch. Si une cellule acquiert une activité de signalisation légèrement plus élevée (orange foncé), cette différence initiale minime est ensuite amplifiée par une boucle de régulation négative entre Notch et Delta. Une différence stable s'établit alors entre une cellule qui produit le signal inhibiteur (en rouge) et sa voisine qui est inhibée (en blanc). C) Voie Notch et formation de frontières cellulaires. Exemple du développement de l'aile de drosophile et de la formation d'une frontière dorso-ventrale dans le disque imaginal de l'aile. a) Régionalisation de l'expression des ligands de Notch (Delta et Serrate) ainsi que de l'enzyme Fringe. b) Notch est activé dans une couche cellulaire à la frontière dorso-ventrale où il va permettre l'expression de gènes participant à la formation de l'aile (tels que *wingless* et *vestigial*). A) Gazave et al. 2009, B) Schweisguth 2000, C) Thèse Julien Moretti 2012.

C pour la 2^{ème} génération de bulbes). Pour finir, le traitement DAPT entraîne un net retard de croissance des méduses ainsi qu'une apparition plus tardive de chaque génération de bulbes (Figure 1.22). La voie Notch semble donc être impliquée dans le mécanisme de croissance générale des méduses. En ce qui concerne le délai d'apparition de chaque génération de bulbe, il semble être étroitement lié à la taille générale de la méduse. On peut émettre l'hypothèse de la mise en jeu d'une information de position en lien avec la taille des segments inter-bulbaires.

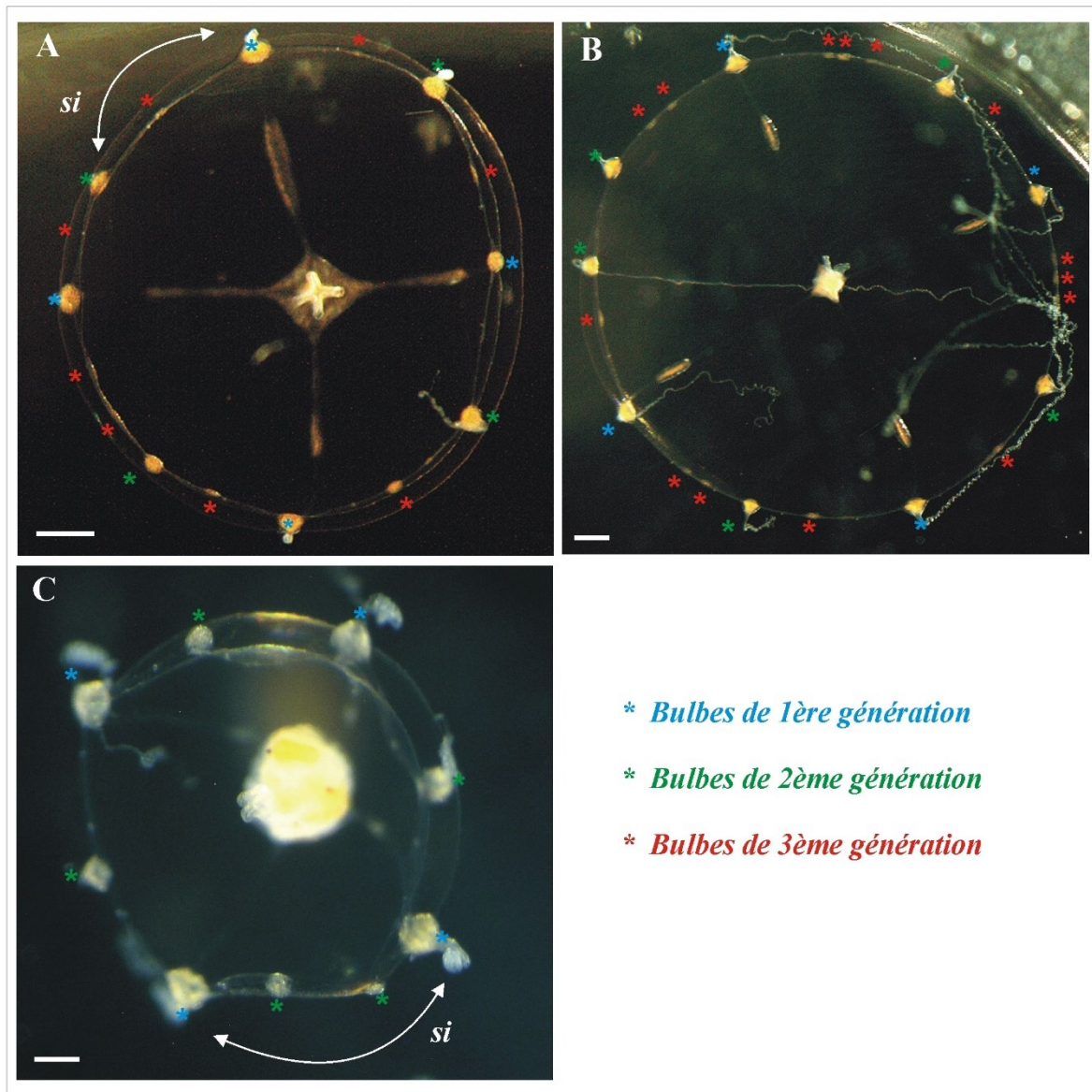


Figure 1.21 Modification de la position et du nombre de bulbes en présence de DAPT (5 μ M, 0,1% DMSO). A,B) Méduses présentant des bulbes de 3^{ème} génération dans la quasi-totalité des segments inter-bulbaires (Si). On observe de plus de 1 à 3 bulbes de 3^{ème} génération dans chaque segment inter-bulbaire. C) Méduse présentant 2 bulbes de 2^{ème} génération dans le même segment inter-bulbaire (Si). Photos prises à la loupe binoculaire. Echelles : A,B : 500 μ m ; C : 100 μ m. Images originales.

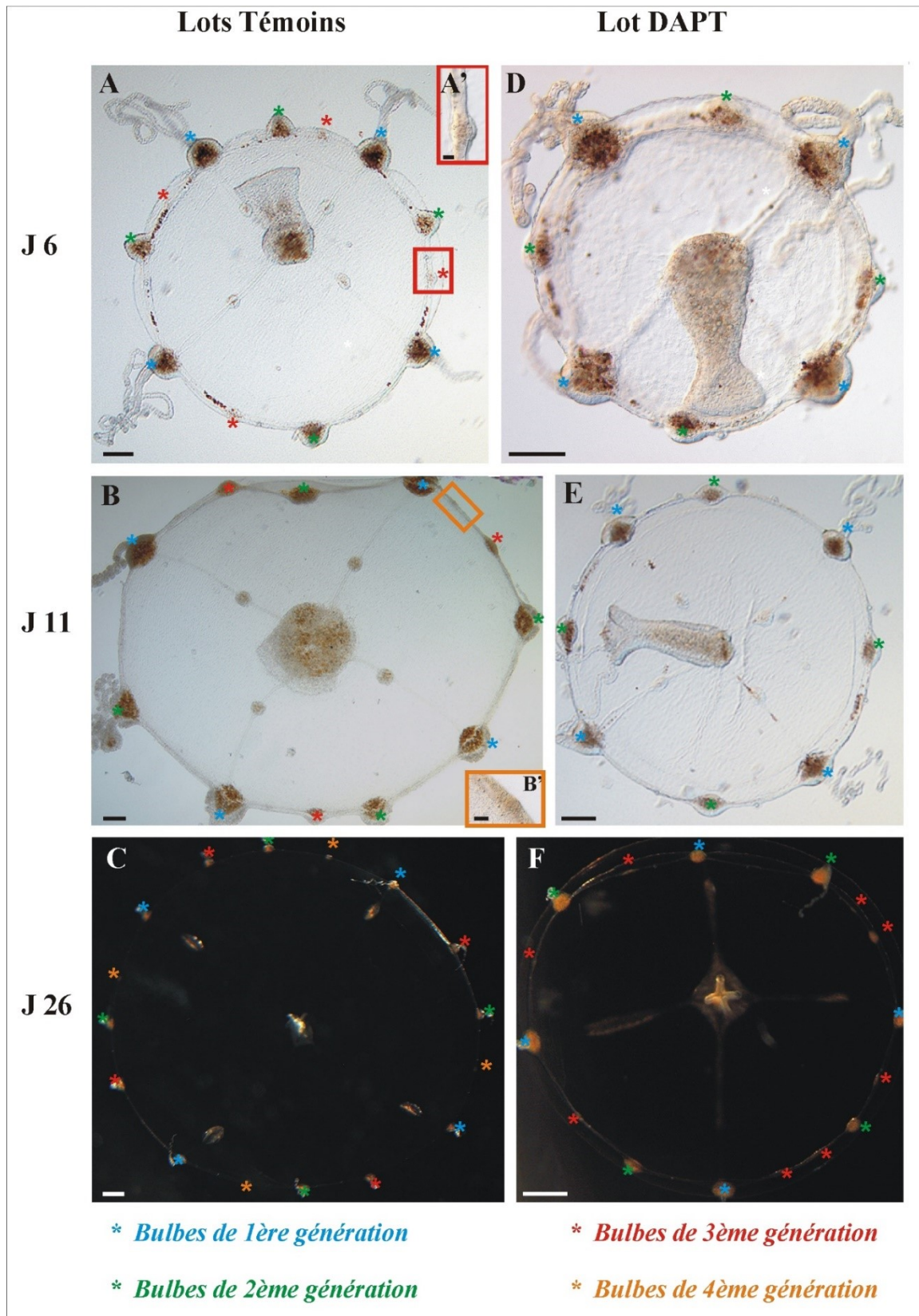


Figure 1.22 Comparaison de la croissance des méduses des lots témoins et des méduses traitées au DAPT ($5 \mu\text{M} - 0,1\%$ DMSO). A, B, C) Lots témoins respectivement aux âges J6, J11 et J26 (J : jours). A') Ebauche de bulbe de 3ème génération. B') Ebauche de bulbe de 4ème génération D, E, F) Lots traités au DAPT, montrés respectivement aux âges J6, J11 et J26. Les photos A, B, D, E ont été prises au microscope et les photos C et F à la loupe binoculaire. Echelles : A, D, B, E : $100\mu\text{m}$; A', B' : $20 \mu\text{m}$; C, F : $500 \mu\text{m}$. Images originales.

Ces résultats restent cependant à nuancer et à confirmer puisque cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. De plus, la toxicité du DAPT est bien connue et la possibilité d'effets non spécifiques de la voie Notch reste à prendre en compte (notamment en ce qui concerne le retard de croissance observé chez les méduses traitées).

Mise en jeu de la voie mTOR (mammalian target of Rapamycin) dans le contrôle de la mise en place des bulbes de *C. hemisphaerica*

La voie de signalisation mTOR est largement connue pour influencer un grand nombre de processus cellulaires tels que la croissance, la prolifération ainsi que la survie et la différenciation cellulaire (Long et al. 2002, Hay & Sonenberg 2004, Jacinto & Lorberg 2008, Russel et al. 2011). Elle est aussi impliquée dans les mécanismes de contrôle temporel de la différenciation (Bateman & McNeill 2004, Malagelada 2011). Ces rôles semblent être, au-moins en partie, conservés à l'échelle des Bilatériens (Long et al. 2004, Bateman & McNeill 2004, Makky & Mayer 2007, Han et al. 2008, Fishwick et al, 2010), mais aussi chez les Cnidaires (étude chez l'Hydre, conservation du rôle dans le contrôle de l'autophagie - Buzgariu et al. 2008) et chez la levure (Heitman et al. 1991, Barbet et al. 1996, Noda & Ohsumi 1998). Cette voie semble donc particulièrement intéressante pour l'étude de la mise en place des bulbes tentaculaires de *Clytia hemisphaerica*, processus qui semble mettre en jeu un contrôle temporel très précis, en lien avec la croissance de la méduse.

La protéine TOR est impliquée dans deux types de complexes TORC1 et TORC2 qui constituent le centre de la voie. TORC1 est le complexe le plus étudié et semble être principalement impliqué dans les rôles cités précédemment. TORC1 est en réalité activé via des facteurs de croissance (comme l'insuline), des nutriments (acides aminés) ou encore via le statut énergétique de la cellule (ratio ATP/AMP) (Dibble & Manning 2013). Il permet alors d'intégrer différentes informations provenant de l'environnement. L'une des voies de signalisation clés aboutissant à l'activation de TORC1 est la voie de l'Insuline Growth Factor (IGF-PI3K-AKT) mais il a aussi été récemment démontré que la voie mTOR interagissait avec de nombreuses autres voies de signalisation, elles aussi impliquées dans le contrôle des processus de prolifération/croissance/différenciation, comme les voies Notch, Wnt et Hippo (Shimobayashi & Hall 2014).

J'ai pu obtenir, au cours de ma thèse, des résultats préliminaires concernant les effets phénotypiques de l'inhibition du complexe TORC1 à l'aide de son inhibiteur pharmacologique : la Rapamycine. La Rapamycine est un antibiotique antifongique (Vézina et al. 1975) qui entraîne l'inhibition du complexe TORC1 (Chen et al. 1995). La conséquence majeure de l'incubation des méduses de *Clytia hemisphaerica* en présence de Rapamycine (0,1 μ M ; 1 μ M et 10 μ M – 0,1% DMSO – incubation pendant 12 heures – méduses libérées depuis 1 jour – témoins eau de mer et

DMSO 0,1%) est une complète modification du timing d'apparition des générations de bulbes ainsi que des statocystes, avec un effet qui semble être dose-dépendant.

En ce qui concerne les bulbes, on observe pour commencer une apparition beaucoup plus tardive de la 3^{ème} et de la 4^{ème} génération de bulbes chez les méduses traitées, avec un retard d'autant plus important lorsque la concentration en Rapamycine est plus forte (Tableau 1.2). On peut noter que la croissance générale des méduses n'est que légèrement affectée (pour les concentrations de 0,1 µM et 1 µM) et que la corrélation, observée chez les témoins, entre taille de la méduse et apparition des différentes générations de bulbes semble perturbée (Figure 1.23A-B). On observe de plus que les bulbes de la 3^{ème} et de la 4^{ème} génération n'apparaissent pas par quatre, de manière synchronisée comme chez les témoins mais se mettent en place progressivement (Tableau 1.2).

Condition	Eau de Mer																DMSO												Rapamycine																	
	Temps	N	2G				3G				4G				N	2G				3G				4G				N	0,1 µM				1 µM				10 µM									
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		1	2	3	4	1	2	3	4										
J8	17	3	0	1	8	5							18	4	1	1	7	5							20	11	3	4	1			19	19					12	11	1						
J13	17		0	1	5	6							16	14			3	4	3					6	20	8	6	2	3	1		19	13	5	1					11	9	2				
J14	17				1									14										12	20	8	6	2	3	1		18	13	4	1					8	7	1				
J15	17													14										14	20	8	1	7	3	1		15	11	3	1					6	6					
J16														14											18	5	4	4	3	2		14	10	3	1					5	5					
J17														14											18	3	2	4	3	4		14	9	4	1					5	5					
J20														14											16	3	2	2	4	3	2	13	9	1		3				5	5					
J21														14											15	1	2	2	3	1	6	11	2	3	3	1	2			5	3	2	1			
J22														14											12		2	3	1	2	4	10	2	1	5	2				5	1	3	1			
J23														14											12			3	2	2	5	9	1	2	3	3				5	1	1	2	1		
J24														14											12			3	2	1	6	9		1	4	3				1	5	1	1	2	1	
J28														14											11		2	4	1	5	9		1	2	4	1	1	5	1	1	1	2	2	1		
J29														14											11		1	3	2	5	8		1	1	3	1	2	5	1	1	1	2	2	1		
J30														14											11		1	3	2	5	8		1	1	3		3	4		1	1	2	1			
J31														14											11		1	2	1	7	8		1	1	2	1	3	3		3		2	1			
J34														13											11		1	1	2	7	8			1	3		4	3			2	2	1			
J35														13											9		1	1	2	5	8			1	3		4	3			1	1	1			
J37														13											8		1	1	2	5	6			1			5	3					3			

Tableau 1.2 Comparaison de l'apparition des différentes générations de bulbes au cours du temps chez des méduses témoins (eau de mer), DMSO (0,1%) et traitées avec différentes concentrations de Rapamycine (0,1 µM, 1 µM et 10 µM – 0,1% DMSO). L'âge de la méduse est indiqué à gauche (en jours (J) après sa libération). Le nombre de méduses pour chaque lot et son évolution au cours du temps est indiqué (N). Pour chaque condition sont indiqués les nombres de méduses possédant des bulbes de 2^{ème} génération uniquement (en vert), de 3^{ème} génération (en bleu) et de 4^{ème} génération (en rouge). En ce qui concerne les bulbes de 3^{ème} génération, sont indiqués les nombres de méduses en possédant 1, 2, 3 ou 4. On observe alors que l'apparition de chaque génération de bulbes est beaucoup plus tardive chez les méduses traitées et que le délai d'apparition est d'autant plus important que la concentration en Rapamycine est élevée (effet dose). On note une mortalité importante en ce qui concerne l'échantillon traité à la Rapamycine 10 µM.

Cette désynchronisation au sein d'une même génération est associée à une disparition de l'apparition progressive des différentes générations de bulbes. En effet, la 3^{ème} et la 4^{ème} génération n'apparaissent plus successivement mais se mettent en place en parallèle (Figure 1.23C). Le terme de génération ne peut donc plus faire référence à une notion temporelle de mise en place (comme chez les témoins)

mais est définie uniquement par la position des bulbes. J'ai donc considéré un bulbe comme appartenant à la

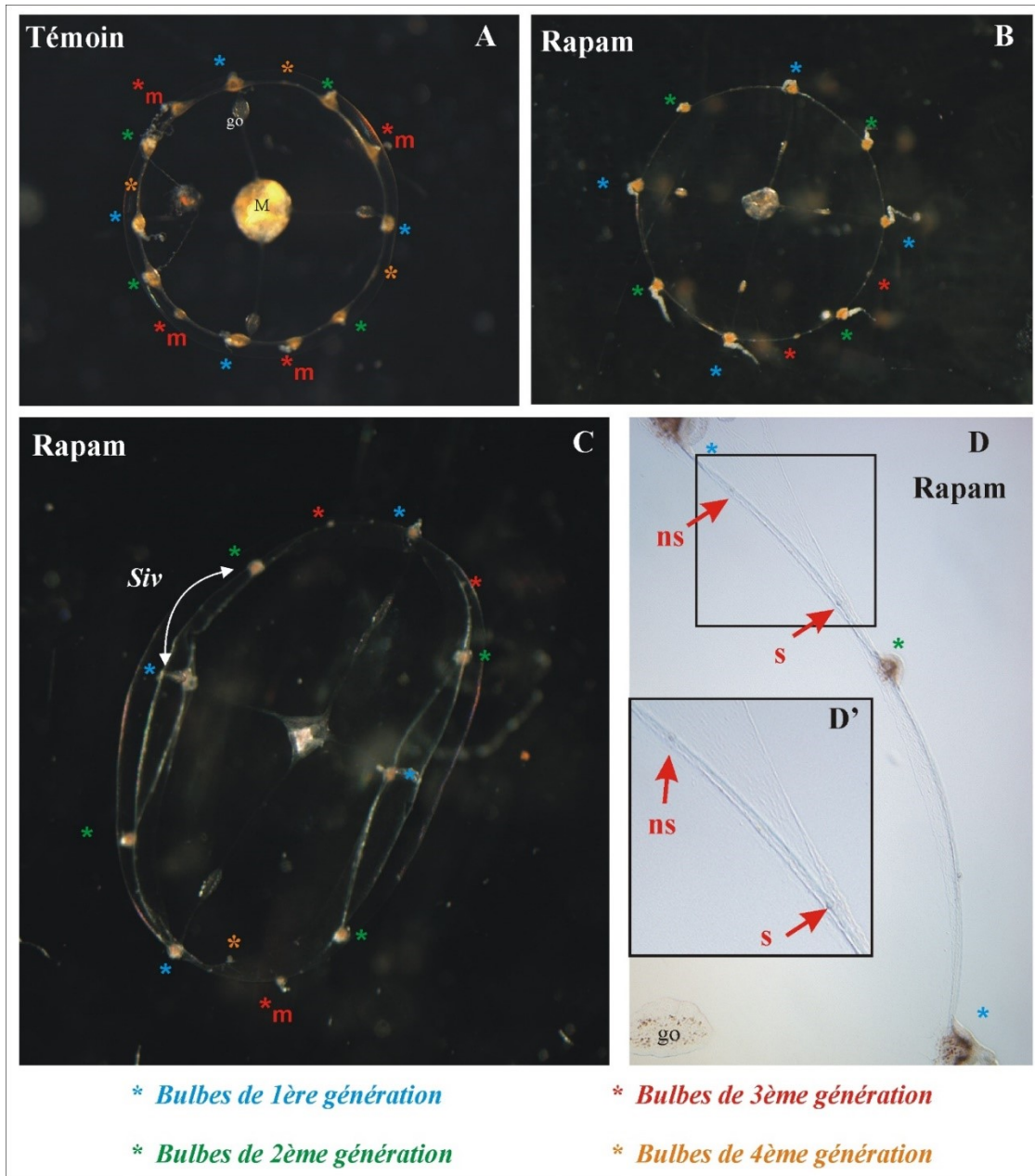


Figure 1.23 Présentation de quelques phénotypes observés en présence de Rapamycine (1 μ M, 0,1%DMSO). A-B) Comparaison des phénotypes d'une méduse témoin (A) et d'une méduse traitée à la Rapamycine (Rapam, 1 μ M) (B) à J13. Ces deux méduses sont de tailles équivalentes et ont été prises avec le même grossissement. A) Méduse témoin (eau de mer) possédant 4 bulbes de 3^{ème} génération avec tentacule donc matures (étoiles rouges, m). B) Méduse traitée à la Rapamycine, présentant seulement 2 bourgeons de bulbes de 3^{ème} génération (étoiles rouges). C) Méduse traitée à la Rapamycine montrée à J30. La méduse possède 3 bulbes de 3^{ème} génération (étoiles rouges) dont un seul possède un tentacule (m) mettant en évidence le retard et la désynchronisation dans l'apparition des bulbes de 3^{ème} génération. Cette méduse possède de plus un bourgeon de bulbe de 4^{ème} génération (étoile orange), de taille équivalente aux bourgeons de bulbes de 3^{ème} génération et apparu en même temps que ceux-ci. On note que ce bulbe de 4^{ème} génération se met en place alors que tous les bulbes de 3^{ème} génération ne sont pas apparus. Des segments inter-bulbaires entre un bulbe de 1^{ère} et de 2^{ème} génération sont en effet vides (Siv). Les images A à C ont été prises à la loupe binoculaire. D) Image en DIC d'une méduse traitée à la Rapamycine mettant en évidence l'apparition d'un néostatocyste (ns) avant l'apparition d'un bulbe de 3^{ème} génération. On note que la gonade est bien développée (go) alors qu'aucun bulbe de 3^{ème}

génération ne s'est mis en place. D') Grossissement de la zone encadrée en D. *go* : gonade, *M* : manubrium, *ns* : néostatocyste, *s* : statocyste. Les bulbes de 1^{ère} génération sont indiqués en bleu, de 2^{ème} génération en vert, de 3^{ème} en rouge et de 4^{ème} génération en orange. Les bulbes de 3^{ème} génération annotés par un m correspondent aux bulbes de 3^{ème} génération matures (avec un tentacule). Images originales.

3^{ème} génération lorsqu'il se met en place entre un bulbe de 1^{ère} et de 2^{ème} génération (Figure 1.23C) et comme appartenant à la 4^{ème} génération lorsqu'il se met en place entre un bulbe de 1^{ère} ou de 2^{ème} génération et un bulbe de 3^{ème} génération (Figure 1.23C). Cette absence de synchronisation rappelle ce qui est observé normalement pour la 5^{ème} génération.

En ce qui concerne les néostatocystes, on observe aussi une modification du contrôle temporel de leur mise en place qui ne semble plus être corrélé à celle des bulbes. Les néostatocystes n'apparaissent chez les témoins qu'après la mise en place de la 3^{ème} génération de bulbes (de part et d'autre des bulbes de 1^{ère} génération). Pour la plupart des méduses traitées à la Rapamycine, ils apparaissent avant l'apparition des bulbes de 3^{ème} génération (Figure 1.23D-D'). On peut de plus observer chez certaines méduses, une augmentation du nombre de néostatocystes (apparaissant de part et d'autre des bulbes de 1^{ère} génération) qui peuvent aller jusqu'au nombre de 3.

L'ensemble de ces résultats suggère, même s'il ne s'agit que de données préliminaires, que les voies Notch et mTOR soient impliquées dans le contrôle spatial et temporel de la mise en place des bulbes ainsi que des statocystes chez *Clytia hemisphaerica*. Ces deux voies pourraient interagir ensemble dans le contrôle de la croissance de la méduse comme cela a été mis en évidence dans de nombreux contextes cellulaires et tissulaires à l'échelle des Bilatériens (Shimobayashi & Hall 2014).

1.4 Morpho-anatomie et biologie du Cténaire

Pleurobrachia pileus

1.4.1 Morphologie générale de *Pleurobrachia pileus*, caractéristiques et position à l'intérieur des Cténaires

L'aspect général de *Pleurobrachia pileus* lui vaut son nom vernaculaire de groseille de mer (Figure 1.24). De forme plus ou moins ovale, ses huit rangées de peignes (palettes natatoires) sont disposées longitudinalement le long du corps, du pôle aboral au pôle oral. Sous les rangées de peignes, on trouve des canaux méridiens endodermiques qui permettent non seulement la circulation des nutriments depuis le pharynx mais aussi la gamétogenèse (au niveau de leur paroi). L'animal possède deux tentacules capables de se rétracter complètement dans une sorte de poche appelée gaine tentaculaire. Au pôle aboral, on trouve le complexe aboral, structure neurosensorielle composée de l'organe apical (structure sensible à la gravité, la pression et la lumière, assurant notamment

l'équilibration – Hertwig 1980, Tamm 1982) depuis lequel s'étendent deux champs polaires ainsi que huit sillons ciliés allant se connecter au peigne le plus aboral de chaque rangée. La bouche se situe au pôle oral de l'animal et débouche sur le pharynx où vont être digérés les aliments. La surface du corps de l'animal est recouverte d'un épiderme composé d'un épithélium unistratifié et d'une lame basale sous laquelle on trouve une matrice extracellulaire gélatineuse, la mésogée, riche en cellules de différents types.

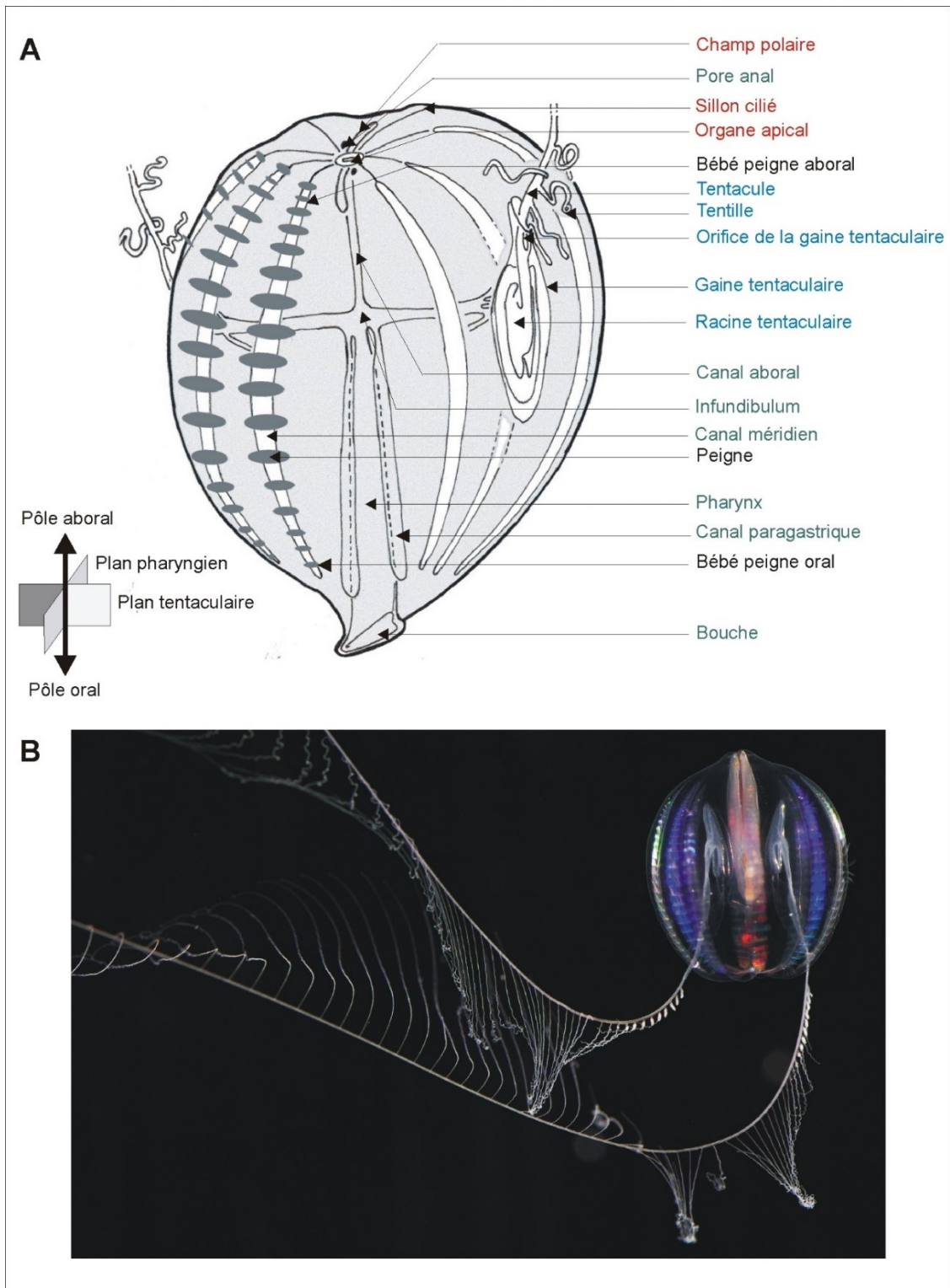


Figure 1.24 Organisation générale du Cténaire *Pleurobrachia pileus* (A) et photo de *Pleurobrachia* sp. A) Les structures appartenant au complexe aboral sont annotées en rouge, au système tentaculaire en bleu, aux rangées de peignes en noire, et au tube digestif en vert. D'après Dayraud et al. 2012.

Les rangées de peignes sont groupées deux à deux, ce qui confère à l'animal une symétrie radiaire de type 4 (symétrie tétraradiaire) (Figure 1.25). A celle-ci se superpose une symétrie biradiaire, avec deux plans de symétrie : le plan sagittal ou pharyngien, correspondant au plan

d'aplatissement du pharynx, et perpendiculairement au premier, le plan tentaculaire défini par les deux tentacules disposés de part et d'autre du corps de l'animal (Figure 1.25).

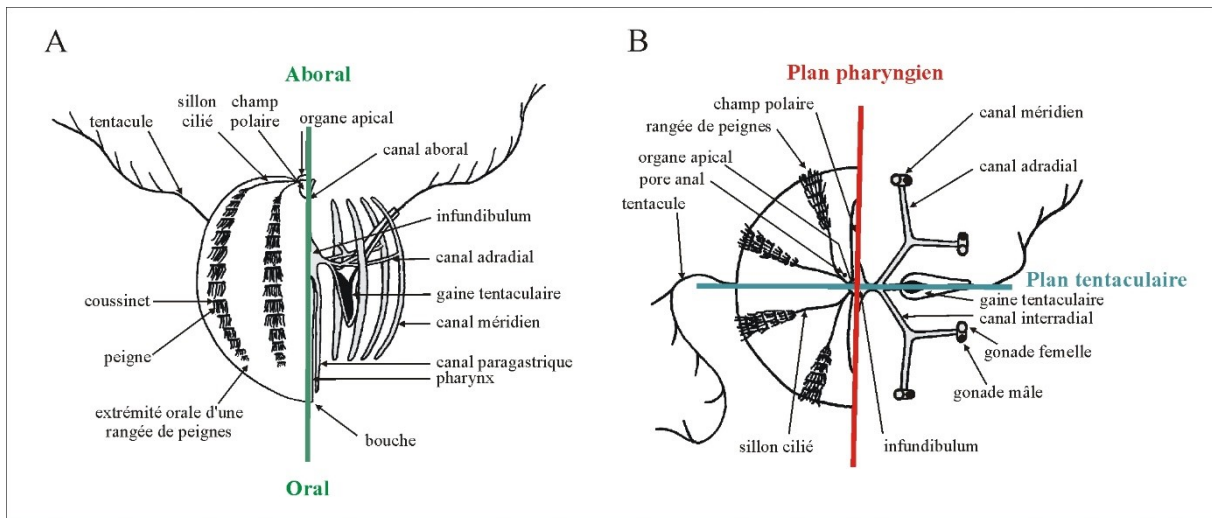


Figure 1.25 Symétrie et polarité du cténaire *Pleurobrachia pileus*. A) Vue latérale et B) vue aborale montrant l'axe de polarité oral/aboral ainsi que les deux plans de symétrie (pharyngien et tentaculaire) définissant la symétrie biradiaire. D'après Derelle & Manuel (2007).

1.4.2 Récoltes de *Pleurobrachia pileus* et ressources transcriptomiques

Le cycle de développement complet du cténaire *Pleurobrachia pileus* ne peut être réalisé en laboratoire. En effet, malgré la maîtrise de la fécondation, et l'obtention de tous les stades de développement jusqu'à la larve cyddipide, le passage de la larve à l'adulte est l'étape critique que nous n'avons pas pu franchir pour le moment. Le matériel sur lequel j'ai pu travailler au cours de ma thèse a été obtenu au cours de récoltes à différents moments de l'année. L'espèce *P. pileus* est plus ou moins répandue dans les régions côtières de la zone paléarctique. Pour des raisons pratiques (et financières...) nous récoltons nos animaux près de Dunkerque, sur le pont qui surplombe le canal d'alimentation de la centrale nucléaire de Gravelines (Figure 1.26). Nous lançons un filet à plancton, muni d'un collecteur, depuis le pont et nous réalisons le tri des animaux sur place. Leur abondance varie de manière saisonnière et est particulièrement importante au cours de phénomènes de blooms (explosions démographiques) s'étalant principalement durant la période de mars à juin. Cependant, les blooms sont plus ou moins aléatoires dans leur occurrence mais aussi dans leur durée ; le nombre d'individus récoltés au cours de chaque mission peut alors énormément varier (de 7 à 4500 par mission durant mes 3 années de thèse !). Une fois au laboratoire, une partie de la récolte est fixée immédiatement et nous parvenons à maintenir en vie le reste des individus durant environ 5 semaines. Les animaux finissent ensuite par régresser (sûrement du fait de la pauvreté en éléments nutritifs de

leur alimentation uniquement composée d'artémies). Cette contrainte rend les manipulations fonctionnelles difficiles à mettre en œuvre et largement dépendantes des périodes de récoltes.



Figure 1.26 Récoltes de *Pleurobrachia pileus* au niveau de la centrale nucléaire de Gravelines. A) Vue aérienne du pont de Gravelines (flèche rouge), étoile rouge : chenal de la centrale nucléaire. B) Zone de lancer du filet à plancton et de tri des récoltes (flèche rouge) parmi des pêcheurs du pont de Gravelines. C) Responsable de la remontée du filet en pleine action. D) Responsable du tri des récoltes. E) *Pleurobrachia pileus* récolté.

En ce qui concerne les données génétiques, nous ne disposons pas de génome complet de *Pleurobrachia pileus*. Les génomes complets des Cténaires *Pleurobrachia bachei* et *Mnemiopsis leidyi* sont cependant à disposition depuis quelques mois. Nous possédons 2 assemblages de transcriptome de *P. pileus*. L'un est issu d'un *run* de séquençage 454 (tous stades), et l'autre du séquençage en Sanger d'ESTs (36 000 ESTs-5' ont été réalisées chez *P. pileus* et les clones correspondants sont disponibles au sein de notre laboratoire).

1.4.3 Organisation de l'appareil tentaculaire

Pleurobrachia pileus possède une paire de tentacules qui lui permettent de capturer ses proies et de les amener au niveau de la bouche (Figure 1.24).

L'observation de l'appareil tentaculaire montre qu'il est composé d'un axe principal, le tentacule au sens strict, et de « ramifications » que l'on appelle tentilles. Je place le terme de ramification entre guillemets car nous verrons par la suite que tentilles et tentacules sont distincts du point de vue de leur structure morpho-anatomique, mais aussi à l'échelle cellulaire et moléculaire. L'animal peut d'ailleurs contracter ou relâcher indépendamment ses tentacules et ses tentilles. De plus, leur lieu de formation est différent et les tentilles ne sont connectés au tentacule que secondairement. L'appareil tentaculaire est ancré au reste du corps au niveau d'une racine tentaculaire. C'est au niveau de cette racine tentaculaire que tentacules et tentilles sont produits en continu tout au long de la vie de l'animal. L'appareil tentaculaire doit en effet être régénéré puisqu'il est en partie détruit lors de la capture d'une proie. Tentacules et tentilles sont tous deux composés d'un axe mésogléen composé de neurones et de cellules musculaires. Ils sont recouverts d'un épithélium composé principalement de colloblastes ainsi que de cellules glandulaires et de cellules sensorielles (Figure 1.27 A,B). Les colloblastes, type cellulaire propre aux Cténaïres, sont des cellules adhésives qui permettent de capturer les proies (Figure 1.27 C). Ils présentent une extrémité renflée riche en granules (granules P) très denses aux électrons (Figure 1.27 C) ainsi qu'une racine basale permettant leur ancrage dans la mésoglée du tentacule ou du tentille.

La racine tentaculaire est le lieu de production des tissus des tentilles et du tentacule. La production des cellules musculaires et des colloblastes des tentacules a été caractérisée et se fait au niveau de « tapis roulants cellulaires », au niveau de la racine tentaculaire (Alié et al. 2011, Dayraud et al. 2012). La racine tentaculaire est allongée selon l'axe oral-aboral de l'animal et présente une face externe, d'où émerge le tentacule, et une face interne qui présente trois bourrelets longitudinaux (Figure 1.28 A). C'est au niveau de ces bourrelets que l'on trouve les tapis roulants cellulaires. Cellules musculaires et colloblastes sont produits au niveau de tapis roulants cellulaires distincts, bien visibles en coupe transversale (Figure 1.28 B). Les colloblastes sont produits par deux tapis roulants symétriques, au niveau des bourrelets latéraux (expansions latérales) alors que les cellules musculaires du tentacule sont produites au niveau de la zone centrale correspondant au bourrelet médian. La description détaillée de ces tapis roulants sera faite dans le chapitre 3 de ce manuscrit (page 204). La formation des tentilles se fait de manière indépendante dans une zone localisée au niveau de l'extrémité orale de la racine tentaculaire.

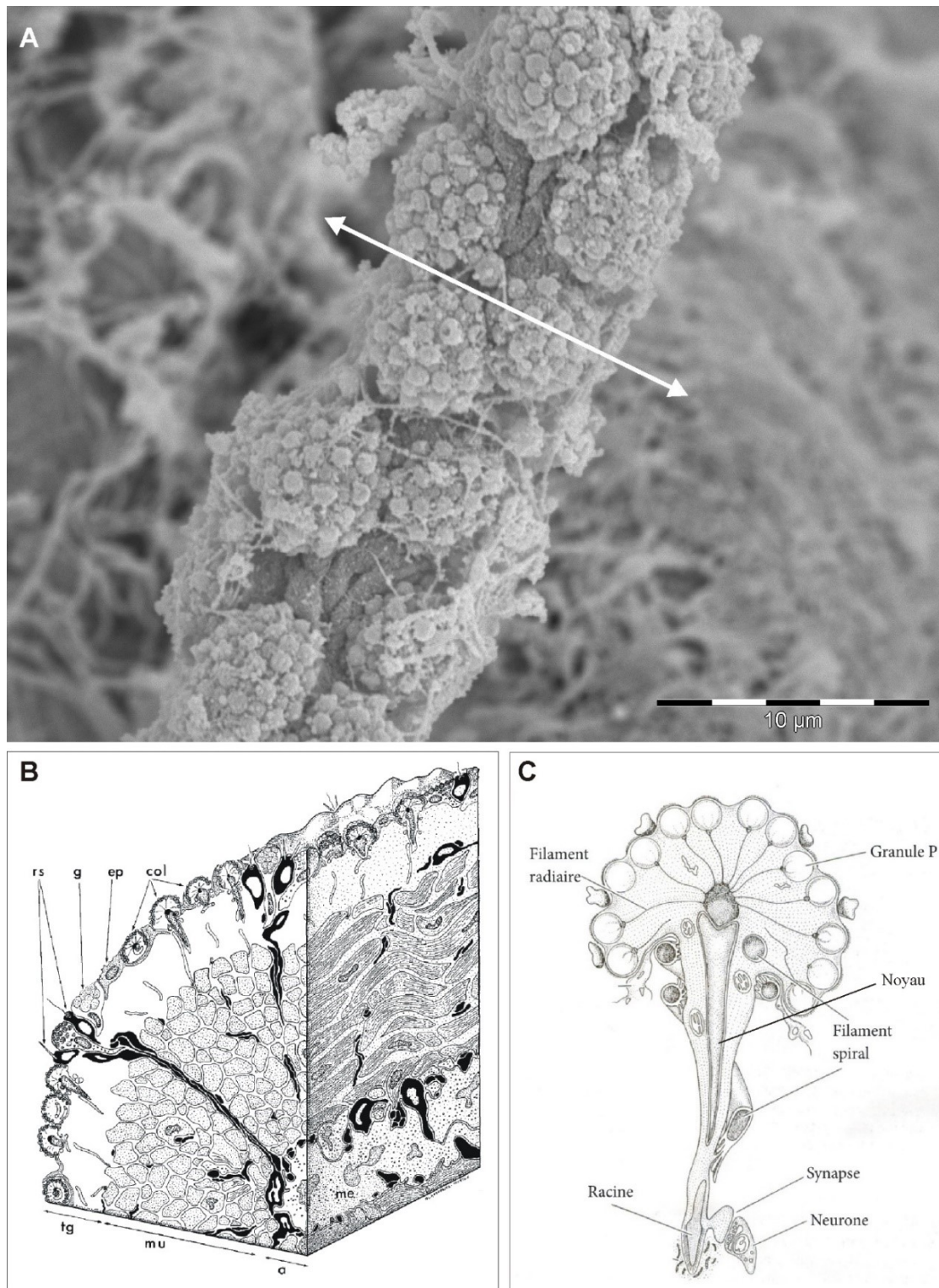


Figure 1.27 Organisation de l'axe du tentacule et des colloblastes. A) Image en microscopie électronique à balayage du tentacule de *P. pileus* sur laquelle on peut observer les colloblastes recouvrant le tentacule. B) Schéma d'une coupe transversale de tentacule (coupe figurée en A par une flèche blanche) de « *Cydippida* » mettant en évidence les différents types cellulaires du tentacule. *a* : axe mésenchymateux et nerveux, *col* : colloblaste, *ep* : épiderme, *g* : cellule glandulaire, *me* : cellule mésenchymateuse, *mu* : fibres musculaires, *rs* : récepteurs sensoriels, *tg* : revêtement tégumentaire. C) Schéma d'un colloblaste. Le colloblaste est en position ectodermique, et sa partie renflée fait face à l'extérieur. On y trouve les granules P, connectés par les filaments radiaires au filament spiral ; la nature de ces structures n'est pas connue. Le noyau est de forme allongée. Le colloblaste établit des contacts synaptiques avec le système nerveux. A) Image originale Muriel Jager, B) Thèse Hernandez-Nicaise 1974, C) Brusca & Brusca (2005).

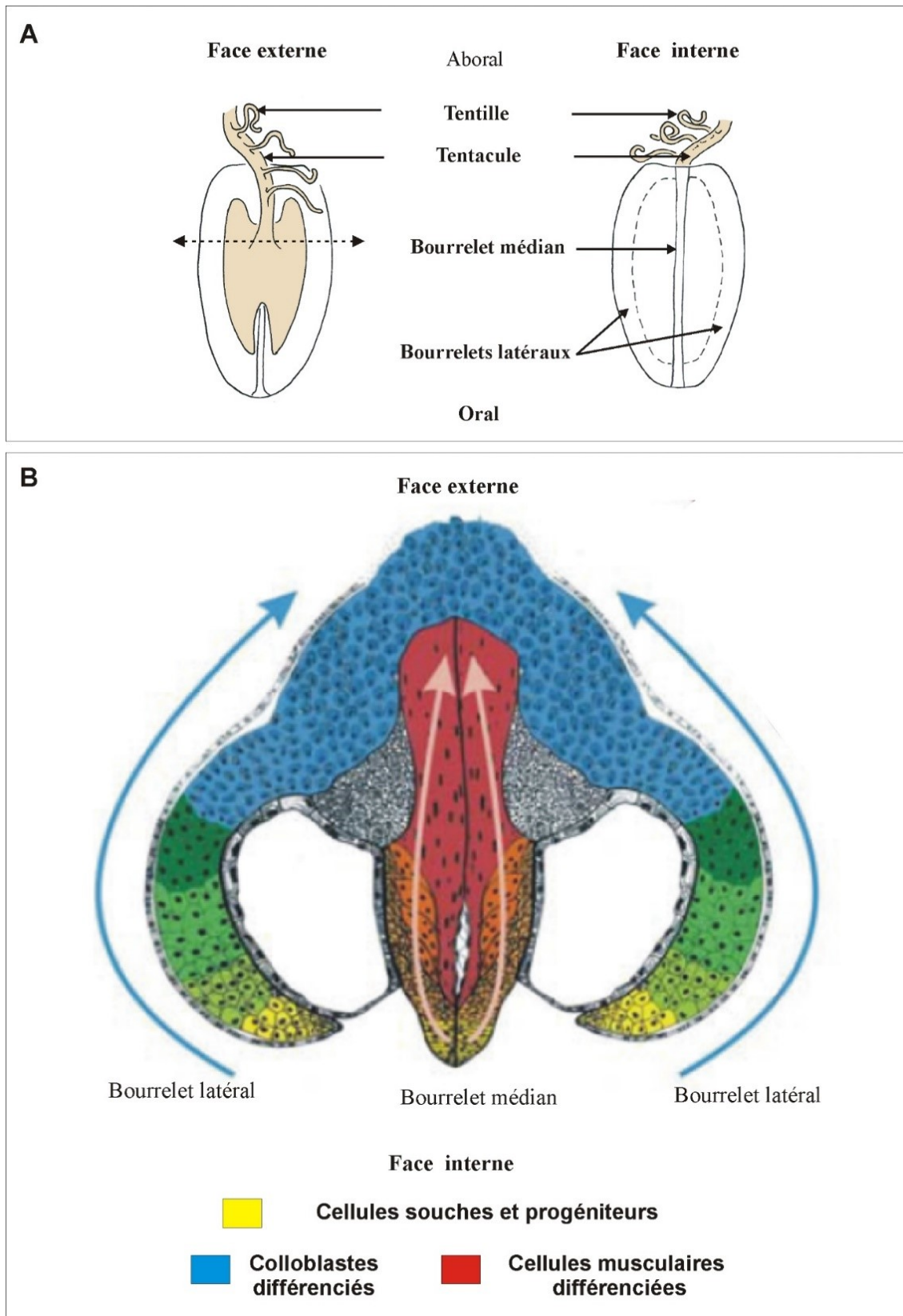


Figure 1.28 Organisation de la racine tentaculaire de *Pleurobrachia pileus* et de ses tapis roulants cellulaires. A) Schémas des vues interne et externe de la racine tentaculaire. La double flèche en pointillés sur la vue externe correspond au plan de la coupe montrée en B). B) Coupe transversale de la racine tentaculaire, avec en jaune les cellules souches et les progéniteurs en prolifération, en bleu les colloblastes différenciés (progression selon les flèches bleues) et en rouge les cellules musculaires différenciées (progression selon les flèches roses). Schémas Cyrielle Dayraud (Thèse 2011).

1.4.4 Le système nerveux et sensoriel

L'étude du système nerveux des Cténaïres faisant partie des aspects majeurs de mon travail de thèse, je vais commencer par présenter les différentes données que nous possédons sur le système nerveux à l'échelle des Cténaïres, puis je présenterai une analyse détaillée du système nerveux de *Pleurobrachia pileus*.

Exploration morpho-anatomique du système nerveux des Cténaïres : des données historiques aux approches actuelles

Les premières observations du système nerveux des Cténaïres ont été apportées par des techniques d'histologie (Chun 1880, Eimer 1880, Hertwig 1880, Heider 1927). Plus tardivement, les approches de microscopie électronique et photonique ont permis de caractériser la morphologie du système nerveux à l'échelle cellulaire (Horridge et Mackay, 1962, 1964 ; Horridge 1965 ; Hernandez-Nicaise 1973a, b, c ; Tamm et Tamm 1995, 2002 ; Cyrielle Dayraud Thèse 2011).

A l'échelle cellulaire, c'est Mari-Luz Hernandez-Nicaise (dans les années 70 à 90) qui, la première, parvient à caractériser précisément l'organisation ultrastructurale des neurones et des synapses de Cténaïres et à donner des critères de reconnaissance du système nerveux en microscopie électronique. Les neurones de Cténaïres ne possèdent ni axone ni dendrites, leurs prolongements sont appelés neurites, comme chez les Cnidaires. On distingue alors les neurones bipolaires (avec deux neurites) des neurones multipolaires (plus de deux neurites) (Hernandez-Nicaise 1973a). Des synapses chimiques ont été mises en évidence et leur organisation est spécifique des Cténaïres. La cellule pré-synaptique est caractérisée par la présence d'une triade d'éléments présynaptiques accolés à la membrane plasmique (Figure 1.29) : une couche de vésicules, un diverticule de réticulum endoplasmique lisse et une ou plusieurs mitochondries (Hernandez-Nicaise 1973a). Les synapses peuvent être unidirectionnelles (Figure 1.29 A,C, flèches blanches) ou bidirectionnelles (Figures 1.29 B,D, flèches noires). On peut distinguer différents types de synapses en fonction des cellules mises en jeu : les synapses neurone-neurone (interneurales), et les synapses entre un neurone et une cellule non neurale. En ce qui concerne les synapses interneurales, les contacts synaptiques peuvent être de différents types : soma-soma, soma-neurite, neurite-soma ou neurite-neurite. Pour les synapses impliquant une cellule non nerveuse, différentes cellules non nerveuses réalisant des contacts synaptiques avec les neurones ont été décrites : cellules sensorielles, cellules ciliées (cellules ciliées des peignes ou « polster-cells », cellules des sillons ciliés, cellules ciliées de l'organe apical), cellules épithéliales glandulaires, colloblastes, cellules mésenchymateuses et cellules musculaires (épithéliales, mésoglénnes et tentaculaires) (Hernandez-Nicaise 1973b, c ; Cyrielle Dayraud, Thèse 2011).

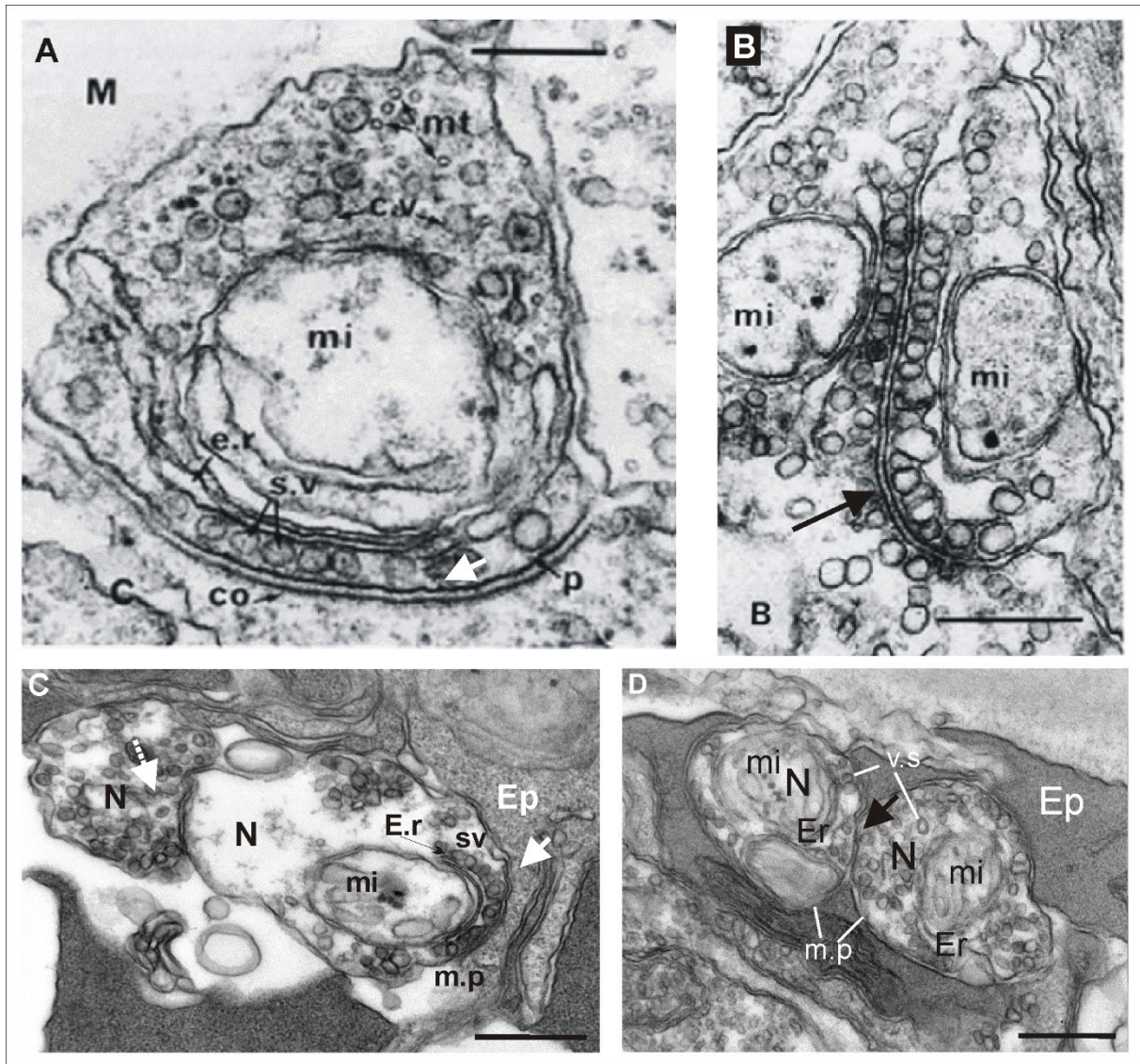


Figure 1.29 Les synapses chimiques des Cténaires. A) Organisation en triade synaptique de la synapse des Cténaires, selon une couche de vésicules (sv), un diverticule de réticulum endoplasmique lisse (er) et une ou plusieurs mitochondries (mi). Synapse de type asymétrique. B) Synapse de type symétrique, bidirectionnelle avec présence de vésicules synaptiques de part et d'autre de la synapse. C,D) Synapses observées chez *Pleurobrachia pileus* avec en C) des synapses de type asymétrique entre un neurone et une cellule épithéliale (flèche blanche) et entre deux neurones (flèche blanche en pointillé) et en D) une synapse de type symétrique entre deux neurones. Ep : cellule épithéliale, er : réticulum endoplasmique, mi : mitochondrie m.p : membrane plasmique, N : Neurone, sv : vésicules synaptiques. Flèches blanches : synapses asymétriques unidirectionnelles, flèches noires : synapses symétriques bidirectionnelles. A,B) Images de Hernandez-Nicaise (thèse 1974) ; C,D) Images de Cyrielle Dayraud (Thèse 2011).

A l'échelle de l'organisme, la combinaison des approches d'histologie et de microscopie a mené à l'observation claire d'un plexus polygonal au niveau épidermique, en tant que principale composante du système nerveux des Cténaires (Figures 1.30 et 1.31). Quelques indices (observations de fibres nerveuses) semblaient suggérer la présence de types cellulaires nerveux au niveau de la mésoglyée (Hernandez-Nicaise 1973b, Hernandez-Nicaise 1991) mais ces observations ne sont qu'anecdotiques à l'époque car aucun corps cellulaire de neurone n'avait pu y être observé.

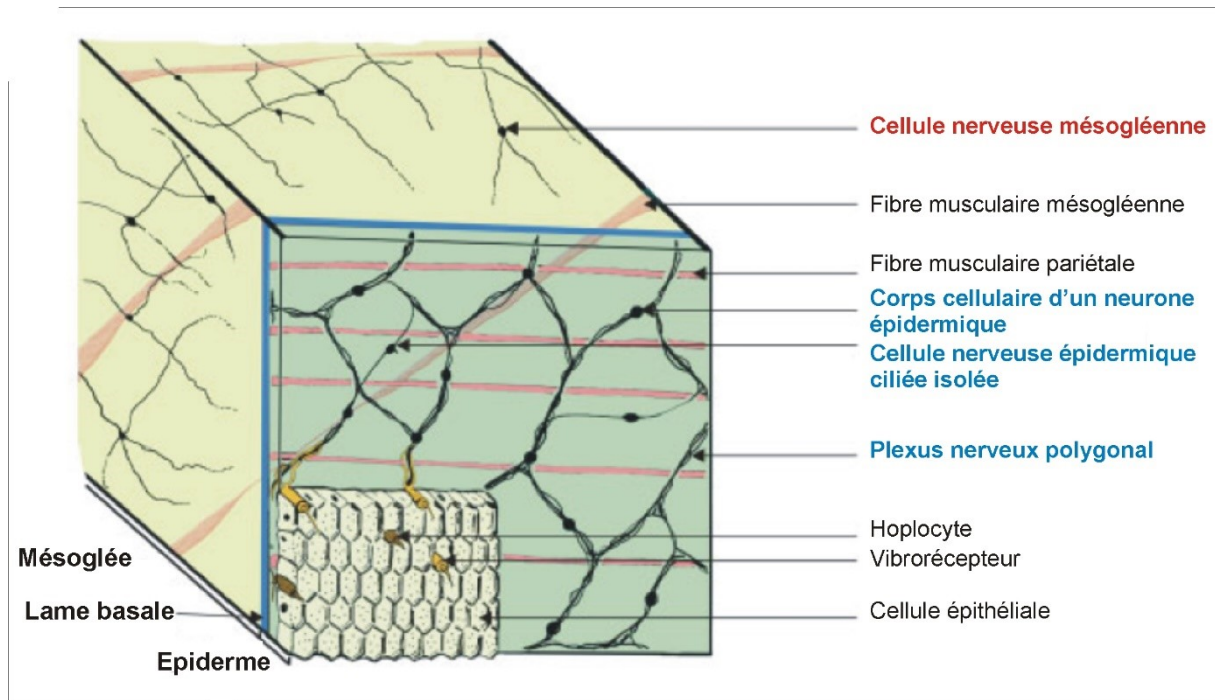


Figure 1.30 Diagramme représentant la position respective des réseaux nerveux mésogléen et épidermique. La lame basale est figurée en bleu. D'après Jager et al. (2011a).

De récentes données obtenues dans notre équipe, grâce à une approche par immunofluorescence (Jager et al. 2011a, Jager et al. 2013), ont permis d'appréhender l'organisation, la morphologie, et les spécialisations du système nerveux de *P. pileus* à l'échelle cellulaire mais aussi à l'échelle de l'organisme. Elles ont de plus permis d'apporter des pistes quant à la nature des messagers impliqués dans la neurotransmission. Cette approche par immunofluorescence a consisté en l'utilisation d'un anticorps permettant la détection de l'ensemble des cellules nerveuses, l'anticorps anti- α -tubuline tyrosylée (YL1/2) associée à l'utilisation d'anticorps dirigés contre différents neurotransmetteurs, neuromodulateurs et neuropeptides (anti-FMRFamides, anti-vasopressine, anti-serotonine, anti-catécholamines et protéines associées). On peut noter d'ores et déjà que YL1/2 n'est pas spécifique des cellules nerveuses et qu'un signal, d'intensité plus faible, est aussi observé au niveau des cellules musculaires, glandulaires et mésenchymateuses qui sont reconnaissables grâce à leur morphologie et à des contres-marquage de type phalloïdine. L'un des résultats majeurs de cette étude a été la mise en évidence d'un second plexus nerveux au niveau de la mésoglée ainsi que de condensations ganglionnaires au sein de l'épithélium des champs polaires (corps Z, qui seront décrits plus loin).

Le plexus nerveux épidermique : un plexus nerveux polygonal présentant des spécialisations

Le plexus épidermique est organisé sous la forme d'un réseau polygonal, localisé dans la partie basale de l'épiderme (Figures 1.30 et 1.31A-B). Les mailles du réseau polygonal sont de tailles et de formes irrégulières. Les corps cellulaires des neurones sont localisés au niveau des segments ou des sommets des polygones (le contre-marquage Dapi permettant leur localisation). Les segments sont composés de faisceaux de neurites parallèles et constituent donc des sortes de « cordons nerveux » (Figure 1.31 A'). En plus des cellules nerveuses organisées en réseau polygonal, on trouve, entre les mailles, des cellules nerveuses multipolaires qui, pour la plupart, sont connectées au réseau principal (Figure 1.31 B'). D'autres types cellulaires sont présents au niveau épidermique (Figures 1.31 A,B), et seront présentés par la suite : des cellules glandulaires (Figure 1.31, Gc en A et B), des cellules musculaires pariétales (Figure 1.31, Fmp en A et B), ainsi que des cellules sensorielles.

Ce réseau est présent au niveau de tout l'épiderme de *P. pileus*, sauf au niveau des champs polaires et de l'organe apical (où les caractéristiques du système nerveux épidermique sont très différentes).

Différentes spécialisations sont observables au niveau du plexus épidermique, à la fois du point de vue moléculaire et du point de vue morphologique (Jager et al. 2008, Jager et al. 2011a). J'entends par spécialisation moléculaire l'existence de sous-populations neuronales (mises en évidence par des marqueurs moléculaires), et par spécialisation morphologique l'existence de modifications de la densité et/ou de l'orientation des polygones et/ou de l'épaisseur des segments du plexus.

En ce qui concerne les spécialisations moléculaires, on observe des sous-populations neuronales distinctes FMRFamides positives et vasopressine positives (Figures 1.31 C,D - Jager et al. 2011a). Les peptides FMRFamides-like sont des neurotransmetteurs ou neuromodulateurs conservés chez l'ensemble des Métazoaires à l'exception des Echinodermes (Grimmelikhuijzen et al. 1996, Watanabe et al 2009, Walker et al. 2009). Les neuropeptides vasopressin-like (oxytocine et vasopressine) sont conservés à l'échelle des Métazoaires et leur association au système nerveux a été mise en évidence chez les Cnidaires, chez de nombreux Protostomiens et chez les Vertébrés (Grimmelikhuijzen et al. 1982, Caldwell et al. 2008, Bardou et al. 2009). On observe dans les deux cas un marquage ponctué au niveau du corps cellulaire des neurones et le long de leurs neurites (Figure 1.31 C'-D'). En ce qui concerne les cellules FMRFamides positives, elles sont en faible proportion au sein du réseau polygonal et sont localisées au niveau des mailles ou entre les mailles et connectées à celles-ci. Elles sont particulièrement abondantes à proximité des sillons ciliés (Figure 1.31 C). Les sous-populations marquées par l'anticorps anti-vasopressine, sont beaucoup plus denses et clairement distinctes des précédentes. Certaines sont localisées entre les mailles et portent un petit cil (neurones ciliés – Figure 1.31 D') ; d'autres sont des cellules nerveuses appartenant au réseau principal (Figure

1.31 D). L'analyse de la composition en neuropeptides met donc en évidence l'existence de sous-populations neuronales distinctes au sein du réseau épithélial et suggère fortement la mise en jeu d'une communication neuronale de type peptidique chez les Cténaïres.

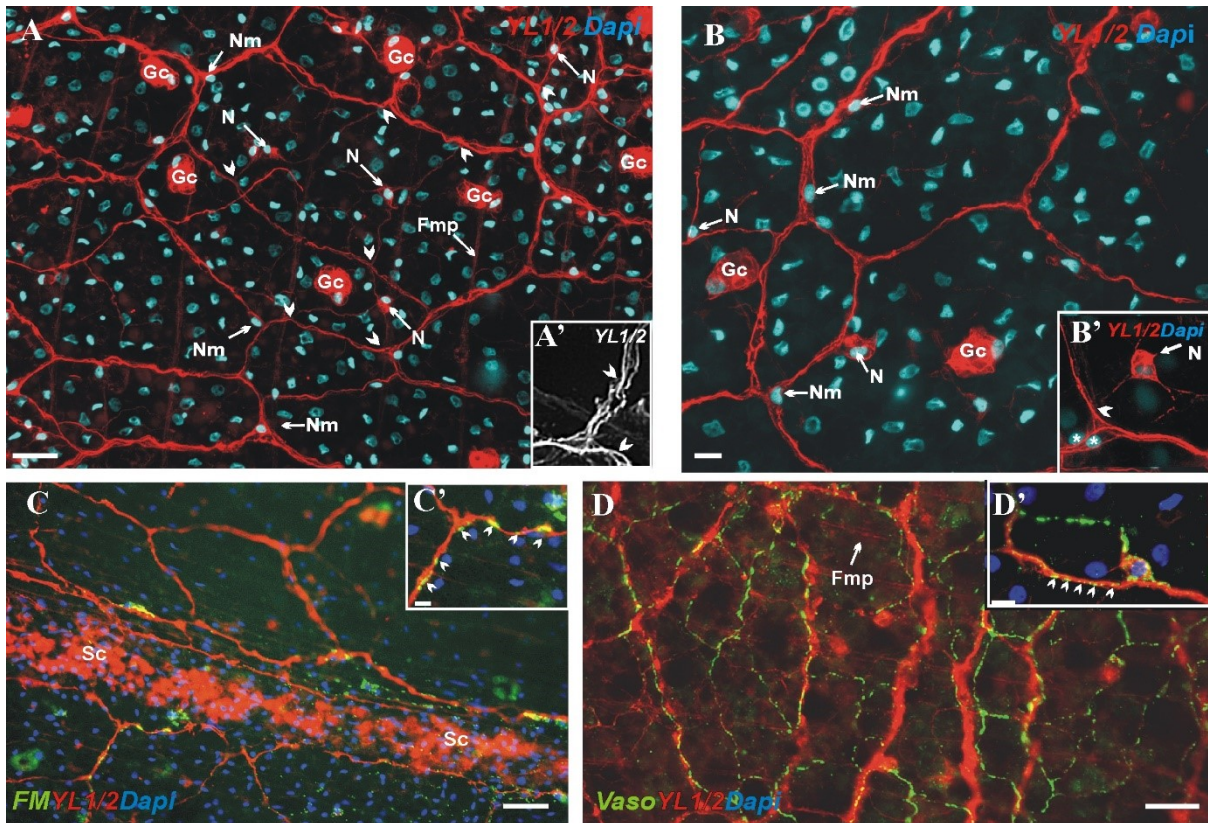


Figure 1.31 Plexus nerveux épidermique de *Pleurobrachia pileus*. Immuno-marquages YL1/2 (anti- α -tubuline tyrosylée), Dapi et anti-FMRamide (FM) et anti-vasopressine (vaso) respectivement en C et D. A) Vue générale du plexus épidermique polygonal. On observe des corps cellulaires de neurones au sein des segments (Nm) ainsi que des neurones isolés (N) dont les neurites (têtes de flèches blanches) rejoignent les mailles du réseau principal. On peut observer la présence de cellules glandulaires entre les mailles du réseau (Gc). A') Zoom au niveau d'un segment du plexus mettant en évidence la présence de plusieurs neurites parallèles (têtes de flèches blanches). B) Plexus épidermique observé à plus fort grossissement qu'en A, avec les mêmes annotations. B') Zoom au niveau d'un neurone isolé (N) dont un des neurites rejoint le réseau principal (tête de flèche blanche). C, D) Spécialisations moléculaire du plexus épidermique, avec en C) des neurones FMRamide-positifs et en D) des neurones vasopressine-positifs. C) Neurones FMRamide-positifs à proximité d'un sillon cilié (Sc). C') Zoom au niveau de ces neurones montrant leur intégration au sein des mailles du réseau (les têtes de flèches blanches mettent en évidence la colocalisation des marquages anti-FMRamide et YL1/2). D) Neurones vasopressine-positifs au sein du réseau polygonal. D') Zoom au niveau de ces neurones mettant en évidence la colocalisation des marquages anti-vasopressin et YL1/2 (têtes de flèches blanches). *Fmp* : fibre musculaire pariétale, *Gc* : cellule glandulaire, *N* : neurone isolé, *Nm* : neurone au sein du plexus, *Sc* : sillon cilié. Echelles : A, B, C,D : 20 μ m ; C',D' : 5 μ m. D'après Jager et al. 2011a.

Des spécialisations morphologiques du plexus épidermique sont présentes au niveau du plan tentaculaire, du pôle aboral, autour de la bouche et au niveau des rangées de peignes. Dans le plan tentaculaire, on observe une condensation du plexus épidermique, avec la présence d'un cordon

nerveux, appelé « cordon nerveux juxta-tentaculaire » (Figure 1.32 A-B, flèches blanches). Chaque cordon est

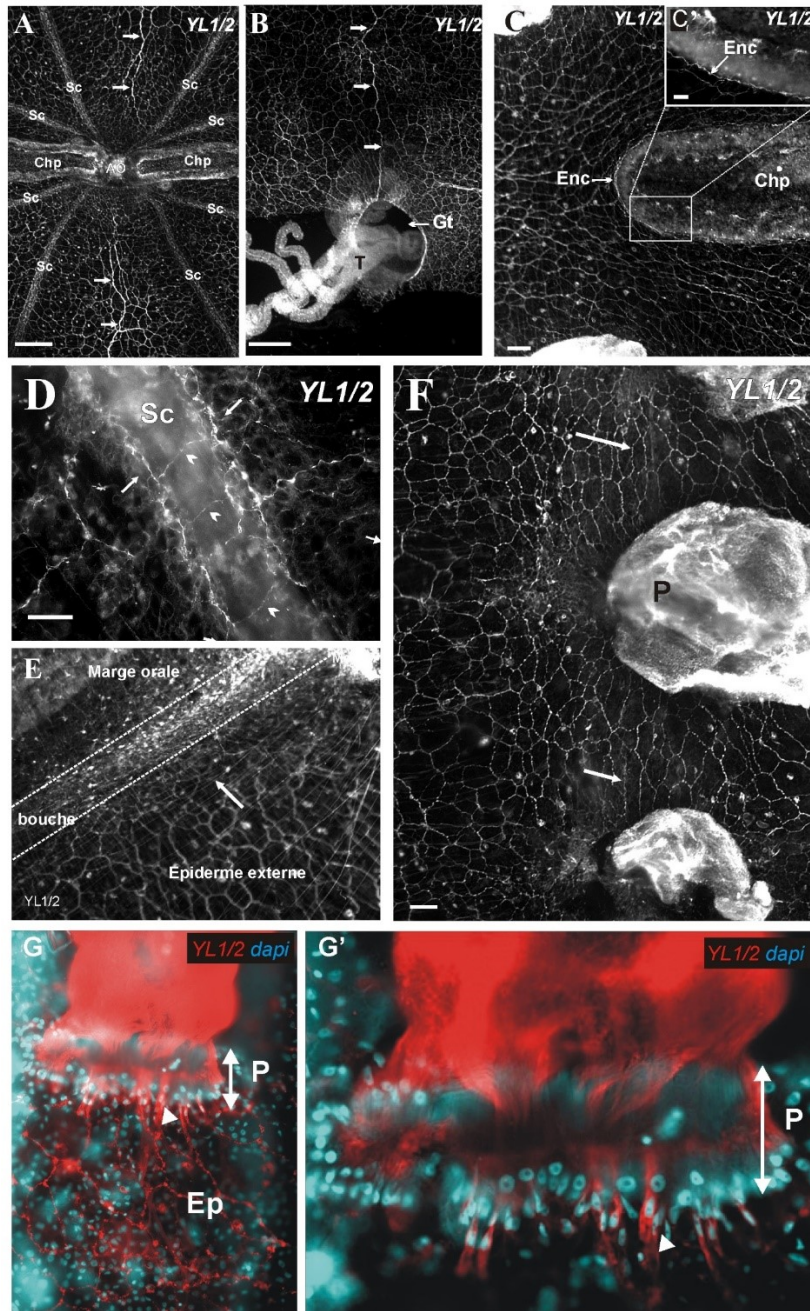


Figure 1.32 Modifications morphologiques du réseau nerveux épidermique. Caractérisation à l'aide d'immuno-marquages anti- α -tubuline tyrosylée (YL1/2). A) Vue générale du réseau polygonal au niveau du pôle aboral où l'on peut voir le nerf juxta-tentaculaire (flèches blanches) et l'augmentation de la densité du réseau polygonal à proximité de l'organe apical (AO). B) Cordon nerveux juxta-tentaculaire (flèches blanches) se connectant à la gaine tentaculaire (Gt). C) Extrémité d'un champ polaire (Chp) où l'on peut voir l'orientation préférentielle du réseau polygonal, parallèlement aux champs polaires ainsi que le cordon nerveux (Enc, cordon circum-polaire externe) encerclant les champs polaires. C') Grossissement de la zone encadrée en C, permettant de visualiser la continuité de ce cordon nerveux. D) Système nerveux épithélial aux abords d'un sillon cilié (Sc). Les polygones de part et d'autre des sillons sont orientés parallèlement aux sillons ciliés (flèches blanches) et sont connectés entre eux (têtes de flèches blanches). E) Densification et orientation parallèle à la bouche du réseau polygonal à proximité de la bouche (flèche blanche). F) Orientation parallèle à la rangée de peignes du réseau épithélial (flèches blanches). G) Cellules nerveuses (tête de flèche blanche) connectées au réseau

polygonaux (Ep) et innervent un peigne. Ces cellules sont présentes dans l'épiderme du peigne et présentent un noyau rond. G') Grossissement de G. AO : organe apical, Chp : champ polaire, enc : external circum-polar nerve cord, Gt : gaine tentaculaire, P : peigne, Sc : sillon cilié, T : tentacule. Echelles : A, B, C, E : 50 µm ; D : 20 µm. A-F) D'après Jager et al. 2011a ; G-G') Images Muriel Jager.

assez épais et est constitué de plusieurs neurites accolés, qui s'étendent d'une zone située à proximité de l'organe apical (la connexion entre les deux n'est pas directe mais semble se faire via le réseau épithélial polygonaux) jusqu'à la gaine tentaculaire, et au-delà jusqu'à proximité du pôle oral. A proximité de l'organe apical et dans le plan tentaculaire, on observe une augmentation de la densité du réseau polygonaux sans changement particulier de son orientation (Figure 1.32 A). Près des champs polaires cependant, les mailles du réseau s'orientent parallèlement aux bords des champs polaires et prennent un aspect plus allongé (Figure 1.32 C). De plus, directement aux abords des champs polaires, le réseau épithélial se différencie en un cordon nerveux (*external circum-polar nerve cord*) continu qui encercle les champs polaires (Figure 1.32 C'). De part et d'autre des sillons ciliés, on peut observer une orientation préférentielle des polygones qui semblent s'accoler aux sillons ciliés par l'un de leurs côtés (Figure 1.32D). Les réseaux épithéliaux de part et d'autres des sillons sont connectés par des neurites traversant les sillons. Au pôle oral, on observe une importante densification du réseau épidermique (réduction de la taille des mailles) qui s'oriente parallèlement à la bouche (Figure 1.32 E). Pour finir, les mailles du réseau polygonaux localisées entre chaque peigne prennent une orientation longitudinale et parallèle à celle de la rangée de peignes (Figure 1.32 F). A proximité des peignes, on observe des cellules nerveuses connectées au réseau polygonaux et innervant les cellules du peigne (Figure 1.32 G,G', tête de flèche blanche). Ces cellules nerveuses sont présentes au niveau de l'épithélium du peigne. Nous pouvons de plus noter que des cellules nerveuses sont présentes au sein même des peignes et réalisent des synapses entre elles et avec les cellules ciliées du peigne. Je préciserai cet aspect lors de la description détaillée des peignes (page 76).

Le réseau nerveux mésogléen : un réseau diffus présentant des spécialisations

Le second réseau nerveux est localisé au sein de la mésoglée et a une organisation beaucoup plus lâche (Figure 1.33 A). Les neurones mésogléens sont multipolaires et présentent un petit corps cellulaire (Figure 1.33 B). Ils sont organisés en réseau et certains neurones possèdent des prolongements qui se terminent par un contact étroit avec une cellule musculaire mésogléenne (Figure 1.33 C-D). Les images de microscopie en immunofluorescence montrent un aspect ponctué de leurs neurites (Figure 1.33 C-D) qui peut paraître surprenant. Il pourrait être dû à une organisation particulière des microtubules du neurite, avec une alternance entre microtubules labiles et stables de composition différentes, comme cela a pu être démontré pour les axones de Mammifères (Brown et al. 1993) ou encore à une modification artéfactuelle de la structure de la tubuline lors de la fixation.

Aucun marquage FMR/Famide ou vasopressine n'a été observé au niveau des neurones mésogléens. Il est important de noter aussi qu'aucune connexion n'a pu jusqu'à présent être mise en évidence entre le plexus mésogléen et le plexus épithélial.

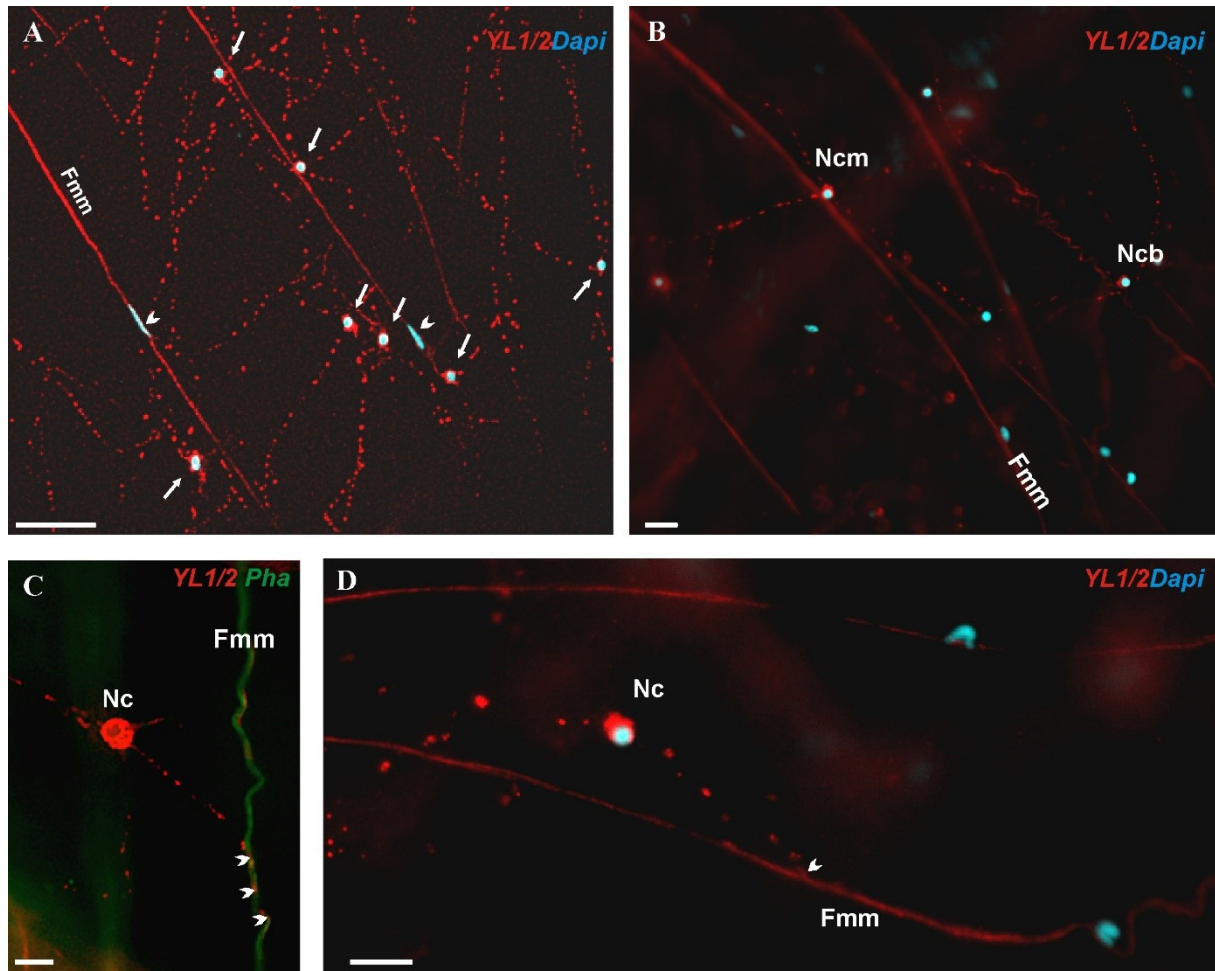


Figure 1.33 Réseau nerveux mésogléen de *P. pileus*. A) Organisation en réseau lâche du système nerveux mésogléen (Flèches blanches : corps cellulaires de neurones mésogléens, têtes de flèches : noyaux des cellules musculaires mésogléennes (Fmm)). B) Grossissement d'une zone du réseau mésogléen où l'on peut observer des neurones mésogléens multipolaires (Ncm) et bipolaires (Ncb). C-D) Connexion entre une cellule nerveuse mésogléenne (Nc) et une fibre musculaire mésogléenne (Fmm), visualisée à l'aide d'un marquage phalloïdine en C) et YL1/2 en D). Les têtes de flèches blanches indiquent la zone de contact. *Fmm* : *Fibre musculaire mésogléenne*, *Nc* : *corps cellulaire d'un neurone mésogléen*, *Ncb* : *corps cellulaire d'un neurone mésogléen bipolaire*, *Ncm* : *corps cellulaire d'un neurone mésogléen multipolaire*. Echelles : A, B, D : 10 μm ; C : 5 μm . A, C) Jager et al. 2011a, B, D) Images originales.

Des structures nerveuses distinctes, localisées dans la mésogée, sont aussi observées au niveau des tentacules et des tentilles (Figure 1.34 - Hernandez-Nicaise 1991, Jager et al. 2011a) et sont reliées entre elles (Figure 1.34 H, Cyrielle Dayraud, Thèse 2011). Au niveau du tentacule, on observe un manchon nerveux en périphérie, ainsi que deux cordons nerveux internes, parallèles à l'axe du tentacule (Figure 1.34 A,C,E). Les cordons sont connectés entre eux, au manchon nerveux et aux

colloblastes (cellules neurosensorielles épithéliales situées en périphérie du tentacule et permettant la capture des proies) (Figure 1.34 C,E : vues en coupe transversale) et sont étroitement accolés à la musculature mésogléenne du tentacule. Des synapses entre ces cellules nerveuses et les cellules musculaires du tentacule ont été mises en évidence par microscopie électronique (Cyrielle Dayraud, thèse 2011).

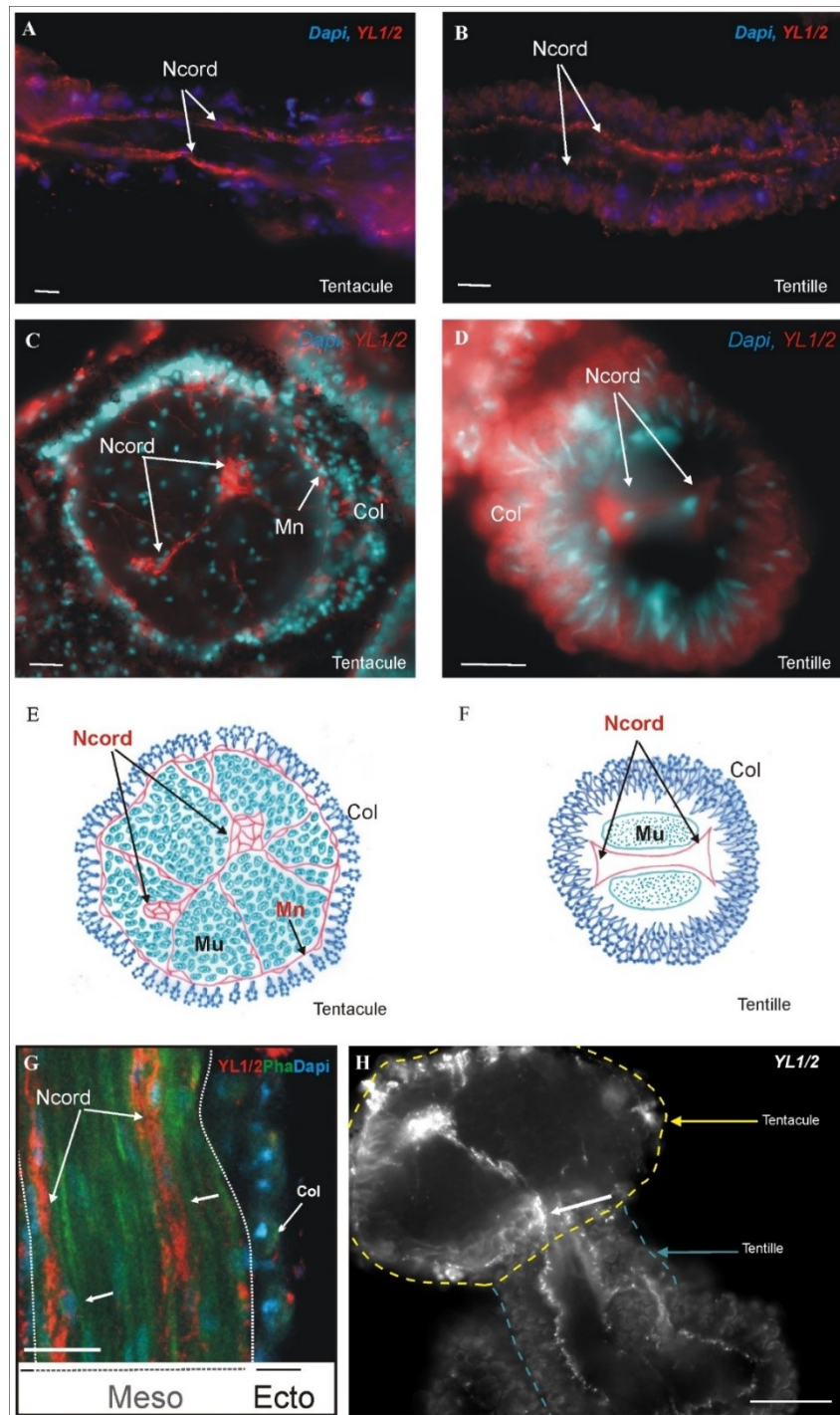


Figure 1.34 Système nerveux du système tentaculaire de *P. pileus*. Immuno-marquages anti- α -tubuline tyrosylée (YL1/2) au niveau du tentacule (A, C, G) et du tentille (B,D). A, B) Organisation du système nerveux en deux cordons nerveux (Ncord) au sein d'un tentacule (A) et d'une tentille (B). C, D) Coupes transversales d'un tentacule (C) et d'un tentille (D) et observation des deux cordons nerveux grâce à l'anticorps YL1/2 sur des

cryosections. On observe de plus, au niveau du tentacule (C), un manchon nerveux (Mn) situé sous les colloblastes. E, F) Schémas d'interprétation des images (C) et (D) avec en bleu foncé, les colloblastes (col), en bleu clair les fibres musculaires (Mu) et en rouge les éléments nerveux. G) Vue longitudinale du tentacule en microscopie confocale, marquage phalloïdine permettant de visualiser les fibres musculaires mésogléennes encerclant les cordons nerveux (Ncord). *Meso* : Mésogléée, *Ecto* : ectoderme. H) Connexion des cordons nerveux tentaculaire et tentillaire (flèche blanche). Cryosection au niveau de la jonction entre tentacule et tentille. On observe une densification du réseau nerveux au niveau de cette jonction. *Col* : colloblastes, *Mn* : manchon nerveux du tentacule, *Mu* : Fibres musculaires, *Ncord* : cordons nerveux. Echelles : A-D, G : 10 µm ; H : 25 µm. A – D, H) Images Cyrielle Dayraud, Thèse 2011 ; E – F) Schémas Cyrielle Dayraud (Thèse 2011) ; G) Jager et al. (2011a).

L'organisation du système nerveux des tentilles est différente. Deux cordons nerveux connectés entre eux sont aussi présents le long des tentilles (Figure 1.34 B,D,F). Ces cordons nerveux alternent en coupe transversale avec deux champs musculaires d'épaisseur importante (Figure 1.34 D,F, vues en coupe transversale). Aucun manchon nerveux n'a été observé sur la périphérie des tentilles.

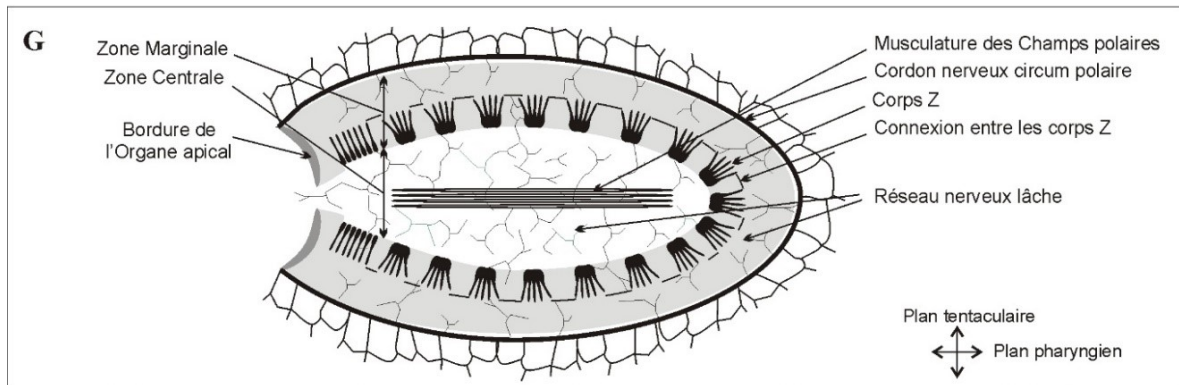
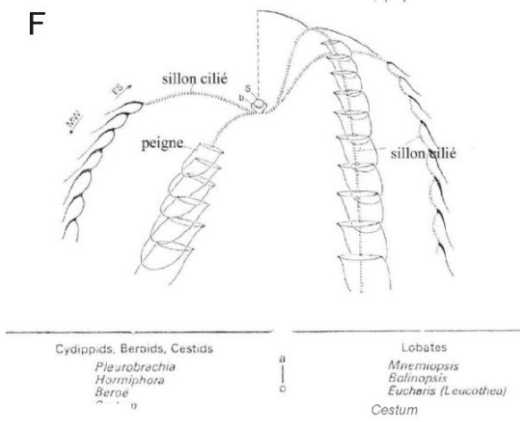
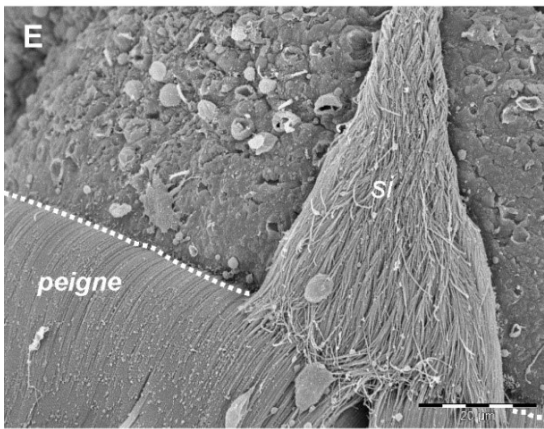
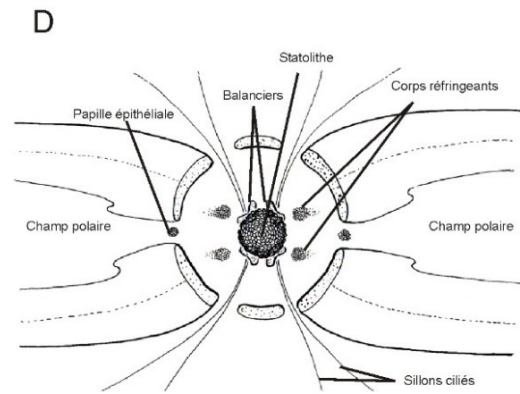
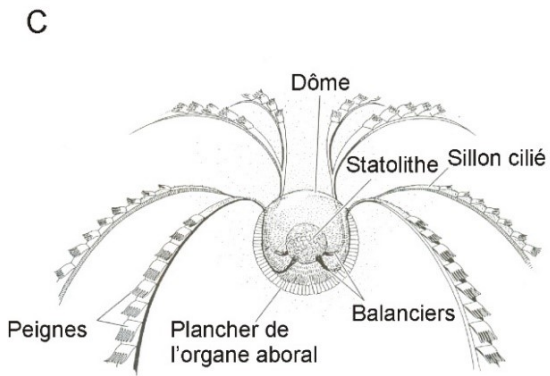
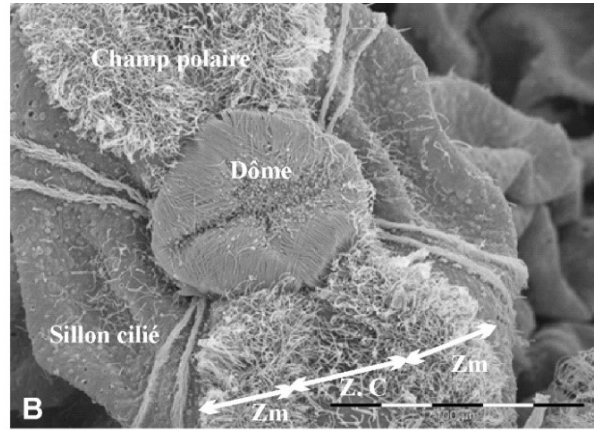
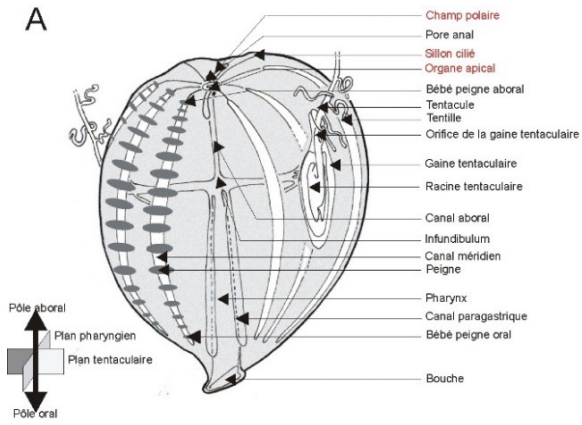
Le complexe neuro-sensoriel aboral

Le complexe aboral (Figure 1.35 A-B) est une structure neuro-sensorielle composée de l'organe apical, de deux champs polaires et de huit sillons ciliés reliant l'organe apical aux rangées de peignes.

L'organe apical (ou organe aboral) est un organe neuro-sensoriel impliqué dans différentes fonctions telles que des fonctions d'équilibration (via le statolithe - Tamm 1982), motrices (Tamm 1982) ou encore sensorielles (fonctions photoréceptrices – Horridge & Mackay 1964). En vue externe, l'organe apical apparaît sous la forme d'un dôme hémisphérique cilié qui forme la « cloche » du statocyste (Figure 1.35 B-C). Au centre de ce dôme, on observe un statolithe minéralisé soutenu par quatre groupes de cellules ciliées appelés balanciers (Figure 1.35 C). Le statolithe est formé d'un amas de cellules vivantes appelées lithocytes. Les lithocytes contiennent une concrétion minérale (l'otholithe) composée de phosphate de calcium et de magnésium (Chapman 1985). Les changements d'orientation de l'animal entraînent une modification de la pression exercée par le statolithe sur les balanciers ce qui permet la perception de la gravité (Tamm 1982, Tamm 2014). Les balanciers transmettent alors l'information aux rangées de peignes, via les sillons ciliés, permettant ainsi un contrôle de la fréquence de battement des rangées de peignes et donc de l'orientation de l'animal (Tamm 1982 ; ce point sera détaillé lors de la description du contrôle du battement des peignes, page 81).

Figure 1.35 Organisation générale du complexe aboral. A) Localisation des différents composants du complexe aboral de *P. pileus* (en rouge). B) Organe aboral de *P. pileus* vu au MEB. Dôme cilié de l'organe apical (Dôme), champs polaires à proximité de l'organe apical (ZC : zone centrale, Zm : zone marginale) et

départ des 8 sillons ciliés. C) Dessin vu de profil de l'organe apical, figurant la relation entre l'organe apical et les peignes via les sillons ciliés. Cet organe sensoriel aboral est responsable de l'équilibration de l'animal en coordonnant le battement des huit rangées de peignes via les sillons ciliés. Les 4 paires de sillons ciliés prennent naissance dans l'organe aboral d'où ils sortent par 4 ouvertures dans le dôme cilié. Le battement des cils de ces sillons est régulé par les cellules des balanciers situées sous le dôme cilié. D) Dessin en vue du dessus de l'organe apical. E) Terminaison d'un sillon cilié (Si) au niveau de sa connexion au premier peigne aboral d'une rangée de peignes, au MEB. F) Comparaison de la morphologie des sillons ciliés au sein des Cténaïres : à gauche, le sillon cilié s'arrête au peigne le plus aboral : c'est la situation que l'on rencontre chez les « *Cydippida* » (comme *P. pileus*) et les Béroïdés. A droite le sillon cilié se poursuit le long de la rangée de peignes : c'est ce que l'on observe chez les lobés et les Cestidés (apomorphie). G) Schéma d'un champ polaire montrant son organisation en 2 zones (zone marginale et zone centrale), la présence d'une musculature associée à la zone centrale ainsi que le système nerveux associé à ces deux zones. On note la présence de petits ganglions nerveux connectés entre eux (les corps-Z), disposés tout le long de la bordure interne de la zone marginale. A, D) Dessins d'Eric Quéinnec, B, E) Images de Muriel Jager et Roxane Chiori, C) Brusca & Brusca 2005, F) Tamm 1982, G) D'après Jager et al. 2011a.



Les sillons ciliés s'étendent de l'organe apical (à la base des balanciers) jusqu'aux rangées de peignes. Chez *Pleurobrachia pileus* (comme chez tous les « Cyddipidés », les Beroidés et les Cestidés), chaque sillon cilié se termine à la jonction avec le premier peigne de chaque rangée (peigne le plus aboral) (Figure 1.35 C,E, moitié gauche de F). Au sein de l'ordre des Lobés par contre, le sillon se poursuit tout le long de la rangée de peignes (Figure 1.35 F, moitié droite – Thèse Hernandez-Nicaise 1974). Les sillons ciliés sont composés de petites cellules à courts cils (Horridge 1965, Tamm 1973) connectées entre elles par des jonctions de type gap.

Les champs polaires sont situés de part et d'autre de l'organe apical et s'étendent dans le plan pharyngien (Figure 1. 35 A,B,D,G). Ils présentent une organisation concentrique avec une zone marginale (plus dense) et une zone centrale, composées de différents types de cellules ciliées associées à un réseau nerveux spécifique des champs polaires (Jager et al. 2011a – Figure 1.35 G).

Plusieurs structures nerveuses sont observées en immunofluorescence, au niveau du complexe aboral neuro-sensoriel, au niveau de l'organe apical et des champs polaires (Jager et al. 2011a, Jager et al. 2013).

Au niveau du plancher épithélial de l'organe apical (Figure 1.36), on observe un réseau nerveux épithélial profond assez lâche (Figure 1.36 B) mis en évidence par un marquage YL1/2 ainsi que des condensations nerveuses (qui correspondraient à des structures neuro-sensorielles) mises en évidence par des marquages anti-FMRFamide et anti-vasopressine (Figure 1.36 C-E). Le réseau épithélial profond est en continuité avec le réseau nerveux polygonal à l'extérieur du complexe aboral et avec le réseau nerveux des champs polaires.

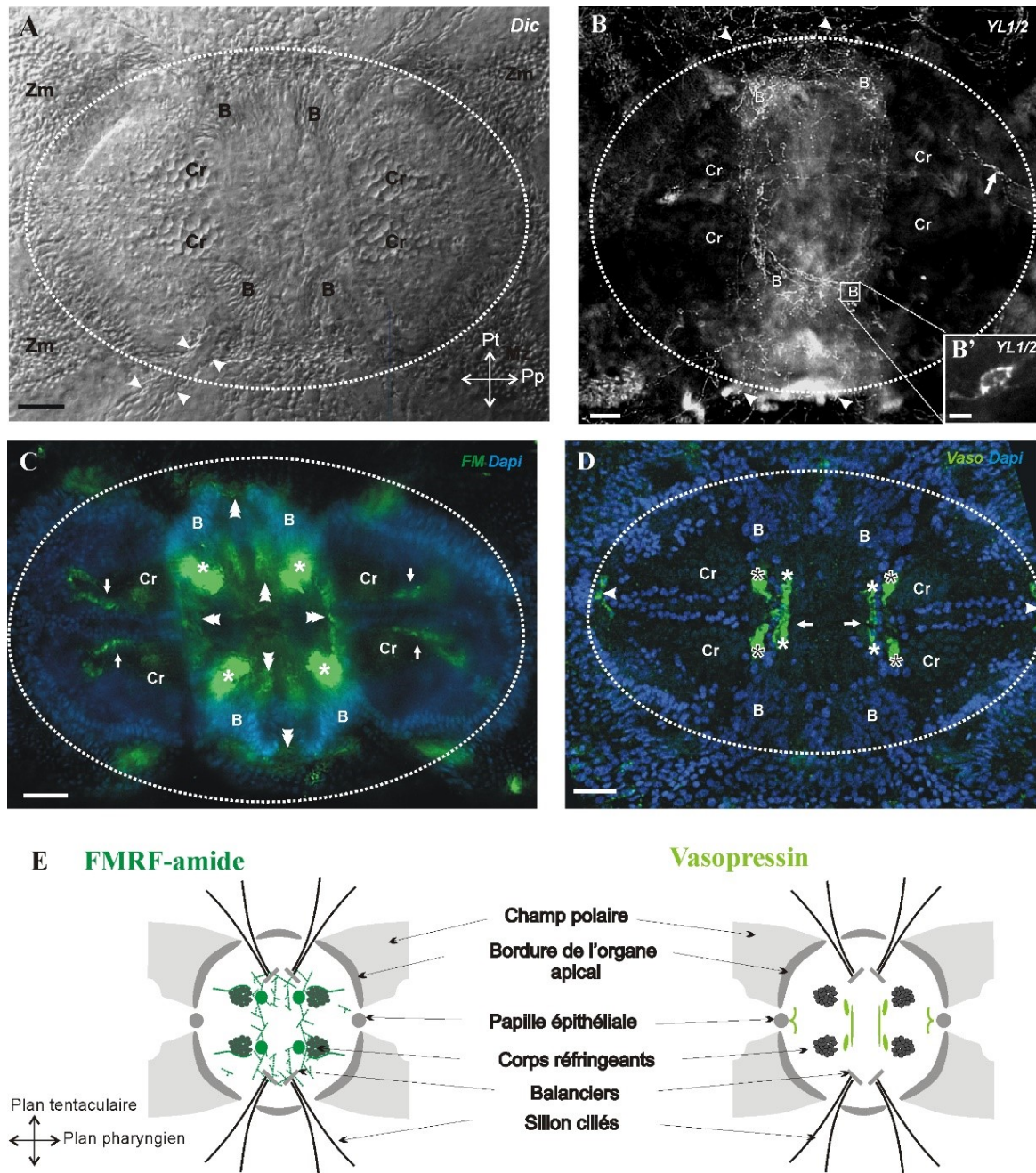
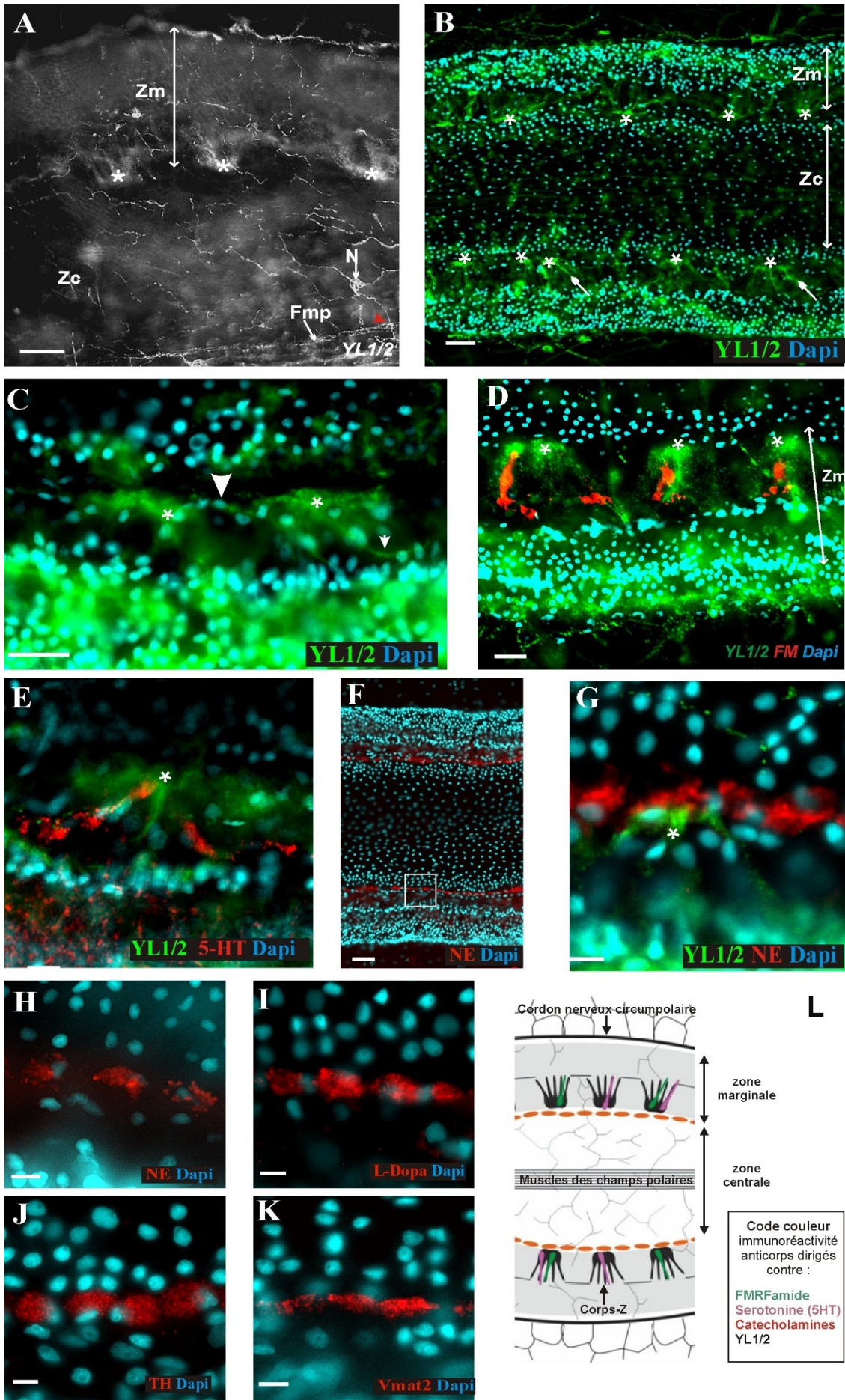


Figure 1.36 Organisation de l'organe apical et des structures nerveuses associées. Toutes les images ont été prises avec la même orientation (Pt : Plan tentaculaire, Pp : plan pharyngien). Les cercles en pointillés permettent de délimiter l'organe apical. A) Image en DIC de l'organe apical où l'on repère les 4 balanciers (B) ainsi que les 4 corps réfringents (Cr). Les têtes de flèches indiquent l'arrivée d'une paire de sillons ciliés au niveau d'un balancier. Cette image permet de se repérer lors de l'observation des immuno-marquages en YL1/2 (B) ou en présence des anticorps anti-FMRFamide (C) ou anti-vasopressine (D). B) Réseau nerveux profond du plancher épithélial, en continuité avec le système nerveux associé aux champs polaires (flèche blanche). B') Grossissement de la zone encadrée en B) montrant une cellule nerveuse. C, D) Condensations nerveuses de type FMRFamide (C) et vasopressine positives (D) résumées schématiquement en E). Ces marquages concernent des structures différentes. On observe un immuno-marquage anti-FMRFamide au niveau de structures à proximité des balanciers (étoiles blanches) ainsi qu'au niveau de 4 lignes allant des corps réfringents (Cr) à la périphérie de l'organe apical (flèches blanches). On visualise de plus un marquage au niveau du réseau nerveux du plancher de l'organe apical visualisé en B) (doubles flèches blanches). L'immuno-marquage anti-vasopressine est localisé au niveau de 4 structures à proximité des balanciers (étoiles noires et blanches) ainsi qu'au niveau de deux zones en périphérie de l'organe apical (tête de flèche blanche). *B* : balanciers, *Cr* : corps réfringents, *Zm* : zone marginale des champs polaires. Echelles : A - D : 20 μ m, B' : 5 μ m. A-E) d'après Jager et al. 2011a

Au niveau des champs polaires, on observe un réseau nerveux superficiel dans les zones centrales et marginales (Figure 1.37 A). Celui-ci est moins dense que le réseau polygonal des zones non spécialisées de l'épiderme. De plus, le long du bord interne de la zone marginale, on observe des condensations alignées de cellules nerveuses appelées corps-Z (Figure 1.37 B-E,G). Ces structures ont d'abord été mises en évidence grâce à l'étude, par hybridation *in situ*, de l'expression restreinte du gène *Sox3* (marqueur de différenciation neuronale entre autre) à leur niveau ainsi que par des contre-marquages YL1/2 (Jager et al 2008). Il s'agit de condensations de cellules nerveuses (analogues à de petits ganglions) présentant des prolongements de type neurite qu'elles envoient vers la périphérie des champs polaires (Figure 1.37 B,C). Les corps Z sont aussi reliés entre eux par des neurites (Figure 1.37 C). Au sein des corps Z, certaines cellules et leurs prolongements sont marqués par l'anticorps anti-FMRFamide ou anti-serotonine (Figure 1.37 D,E ; Jager et al 2011a, Jager et al. 2013). Un autre marquage attire aussi notre attention. L'utilisation d'anticorps dirigés contre différentes catécholamines (anti-noradrénaline, anti-L-Dopa) et contre des protéines associées à leur synthèse (anti-TH (tyrosine hydroxylase) et anti-Vmat2 (transporteur vésiculaire des catecholamines) a permis d'identifier une ligne continue de cellules le long du bord interne de la zone marginale et qui borde les corps-Z (Figure 1.37 F-K ; Jager et al. 2013). Ces cellules n'ont pas la morphologie de cellules nerveuses et n'avaient auparavant jamais été observées.

Figure 1.37 Système nerveux associé aux champs polaires. A) Réseau nerveux superficiel des champs polaires, au niveau de la zone centrale (Zc) et de la zone marginale (Zm). On peut visualiser un contact (tête de flèche rouge) entre un neurite et une fibre musculaire (Fmp). Les corps Z les plus superficiels sont visibles (étoiles blanches). B) Répartition des corps-Z le long du bord interne de la zone marginale (étoiles blanches). On observe leurs prolongements de neurites qu'ils envoient vers la périphérie du champ polaire (flèche blanche). C) Grossissement au niveau de corps Z sur lequel on peut observer la connexion de ces deux structures par des neurites (tête de flèche blanche). D, E) Certains prolongements des corps Z sont FMRFamides-positifs (D) ou sérotonine-positifs (E). G- K) Ligne interne de la zone marginale, bordant les corps Z, marquée lors de l'utilisation d'anticorps dirigés contre des catécholamines : la Noradrénaline (NE : F, G, H) et la L-Dopa (I), ou dirigés contre la Tyrosine hydroxylase (TH, enzyme impliquée dans la synthèse des catécholamines (J) ou contre Vmat2 (transporteur vésiculaire des catécholamines K). L) Schéma récapitulant les structures nerveuses ou associées des champs polaires. *Fmp* : fibre musculaire pariétale, *Zc* : zone centrale, *Zm* : zone marginale, *flèches blanches* : prolongements des corps Z, *étoiles blanches* : corps Z, *têtes de flèches blanches* : connexions entre les corps Z. Echelles : A, B, E-G : 20 μm ; C, H-K : 10 μm . A, D : Jager et al. 2011a, C : image originale, D-F : Jager et al. 2013.



1.4.5 Le système musculaire

Au sein des Métazoaires, les cellules musculaires sont présentes chez les Bilatériens, les Cnidaires et les Cténares. La question de l'origine et de l'évolution de la cellule musculaire se pose donc en des termes similaires à celle concernant la cellule nerveuse (Chapitre 1, page 11). Il s'agit de deux innovations fondamentales dont les relations fonctionnelles sont extrêmement étroites (on parle de système neuro-musculaire) et sont très bien décrites chez les Bilatériens. Leur contact étroit a aussi été mis en évidence chez les Cténares et les Cnidaires (Hernandez-Nicaise, 1991. Westfall et al. 1996). Ceci pose alors la question d'une évolution parallèle, voire contrainte, entre ces deux types cellulaires mais aussi celle de l'homologie de la jonction neuromusculaire à l'échelle des Eumétazoaires³. Nous reviendrons plus précisément sur les connaissances concernant la jonction neuromusculaire chez les Cténares et à l'échelle des Métazoaires dans la Chapitre 2 de ce manuscrit (Chapitre 2, page 100). Nous allons présenter ici l'organisation de la musculature des Cténares et plus particulièrement de *Pleurobrachia pileus*.

Les cellules musculaires des Cténares sont considérées comme étant des cellules musculaires lisses (Figure 1.38B - absence d'organisation en sarcomères, Hernandez-Nicaise, 1991), à l'exception des cellules musculaires des tentilles dans le genre *Euplokamis* (Mackie et al. 1988). Cependant, on peut noter que les cellules musculaires mésogléennes sont plurinucléées et ont donc une structure bien différente des cellules musculaires lisses des Bilatériens (mononucléées). D'autre part les cellules musculaires des tentacules (au-moins) se différencient par fusion de myoblastes, comme pour les fibres musculaires striées des Vertébrés (Dayraud et al. 2012).

Pleurobrachia pileus présente une grande variété de cellules musculaires, qui peut être appréhendée du point de vue de leur structure et de leur localisation (Figure 1.38 A).

Les cellules musculaires peuvent être réparties en deux grandes catégories selon leur localisation (Dayraud et al. 2012) :

- les fibres musculaires pariétales, localisées au niveau épithélial (Figure 1.38A,B) – on parle de cellules myoépithéliales, mais à la différence des Cnidaires, celles-ci ne présentent pas de corps cellulaire. Ces fibres musculaires pariétales sont principalement orientées de manière circulaire (fibres latitudinales- Figure 1.38 D,E). On peut noter une forte densité de ces fibres autour de la bouche (Figure 1.38 G). On observe de plus des fibres orientées longitudinalement (fibres longitudinales – Figure 1.38 A,E) au niveau du plan tentaculaire (depuis le pôle aboral jusqu'au

³ Le terme Eumétazoaires est employé dans ce manuscrit afin de désigner les Bilatériens, les Cnidaires et les Cténares mais ne sous-entend pas la monophylie de ce clade, qui est fortement débattue comme nous l'avons vu.

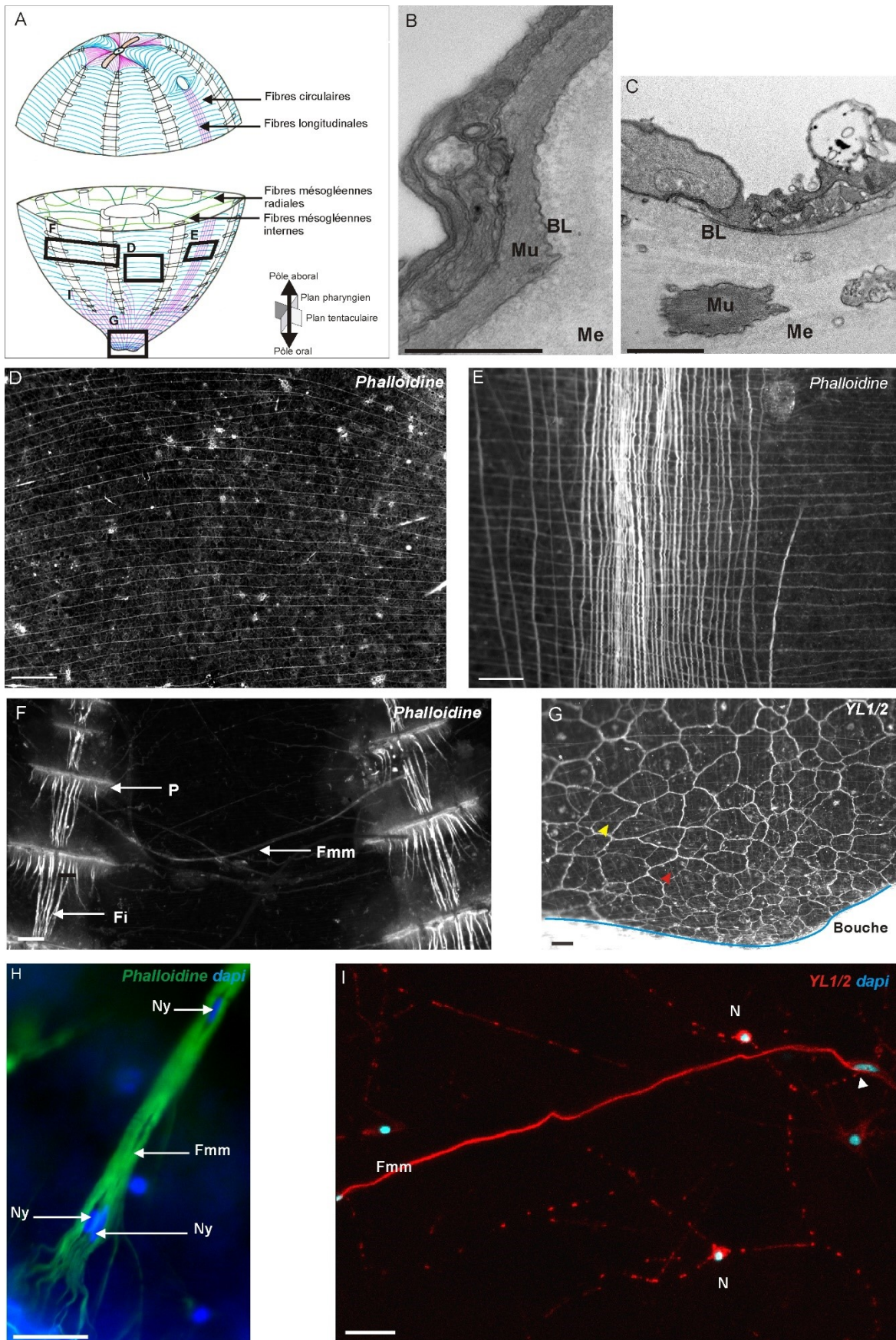


Figure 1.38 Musculature de *Pleurobrachia pileus*. A) Schéma de l'arrangement de la musculature de *P. pileus*. Les encadrés correspondent aux figures D à G (La musculature du système tentaculaire n'y est pas représentée). B-C) Images en microscopie électronique à transmission de cellules musculaires (Mu) de *P. pileus*, au niveau de l'épiderme (B) et de la mésoglée (C). B) Section au sein de l'épiderme montrant une fibre musculaire pariétale (Mu) en section longitudinale. C) Fibre musculaire mésogléenne (Mu), coupée obliquement, au sein de la mésoglée (Me). BL : lame basale. D-F) Marquages phalloïdine de la musculature épidermique (D,E) et mésogléenne (F). D) Fibres musculaires pariétales entre deux rangées de peignes (en dehors du plan tentaculaire). Toutes les fibres ont une orientation circulaire. E) Fibres musculaires pariétales localisées dans l'épiderme entre deux rangées de peignes, dans le plan tentaculaire. On peut y observer un faisceau de fibres longitudinales ainsi qu'un ensemble de fibres circulaires. F) Fibre musculaire mésogléenne (Fmm) connectant deux canaux méridiens localisés sous les rangées de peignes (P). Les fibres inter-peignes (qui ne sont pas des cellules musculaires) sont aussi visibles (Fi). G) Marquage YL1/2 de la musculature autour de la bouche, où l'on peut visualiser une musculature orientée longitudinalement (tête de flèche rouge) ainsi qu'une musculature orientée circulairement (tête de flèche jaune) tout autour de la bouche. Le trait bleu permet de délimiter la bouche. H) Grossissement au niveau d'une fibre musculaire mésogléenne (Fmm) marquée en phalloïdine. Ces cellules sont plurinucléées (Ny) et présentent des extrémités ramifiées. I) Image en microscopie confocale au niveau de la mésoglée (immunomarquage YL1/2). Les fibres musculaires mésogléennes (Fmm) sont en étroite association avec le réseau nerveux mésogléen. Certains neurones (N) ont des neurites réalisant des connexions avec les cellules musculaires (tête de flèche blanche). *Fmm* : fibre musculaire mésogléenne, *Fmp* : fibre musculaire pariétale, *Me* : mésoglée, *Mu* : fibre musculaire, *N* : neurone, *Ny* : noyau. Echelles : B : 1 μm , C : 2 μm ; D-F : 100 μm ; G : 50 μm ; H : 20 μm ; I : 10 μm . A-F, H : Dayraud et al. 2012, G : Image Muriel Jager, I : Image originale.

pôle oral de l'animal), à proximité de l'organe apical, ainsi qu'au pôle oral, entre la bouche et l'extrémité de chaque rangée de peignes.

- les cellules musculaires mésogléennes, traversant la mésoglée sous forme de fibres isolées et organisées selon un réseau lâche (Figure 1.38 A,C,H,I). Au niveau du tentacule et des tentilles par contre, les fibres musculaires s'organisent en faisceaux compacts (Figure 1.39A-D).

Il est intéressant de noter que la musculature des Cténares n'est pas impliquée dans leur locomotion, qui met uniquement en jeu la ciliature des peignes (à l'exception des Platycténides, Cténares benthiques, et des genres *Cestum* (Cestides) et *Ocyropsis* (Lobés)). La musculature est impliquée seulement dans le maintien et les modifications de la forme du corps de l'animal (musculature pariétale et mésogléenne hors tentacules/tentilles) ainsi que dans la contraction des tentacules et des tentilles.

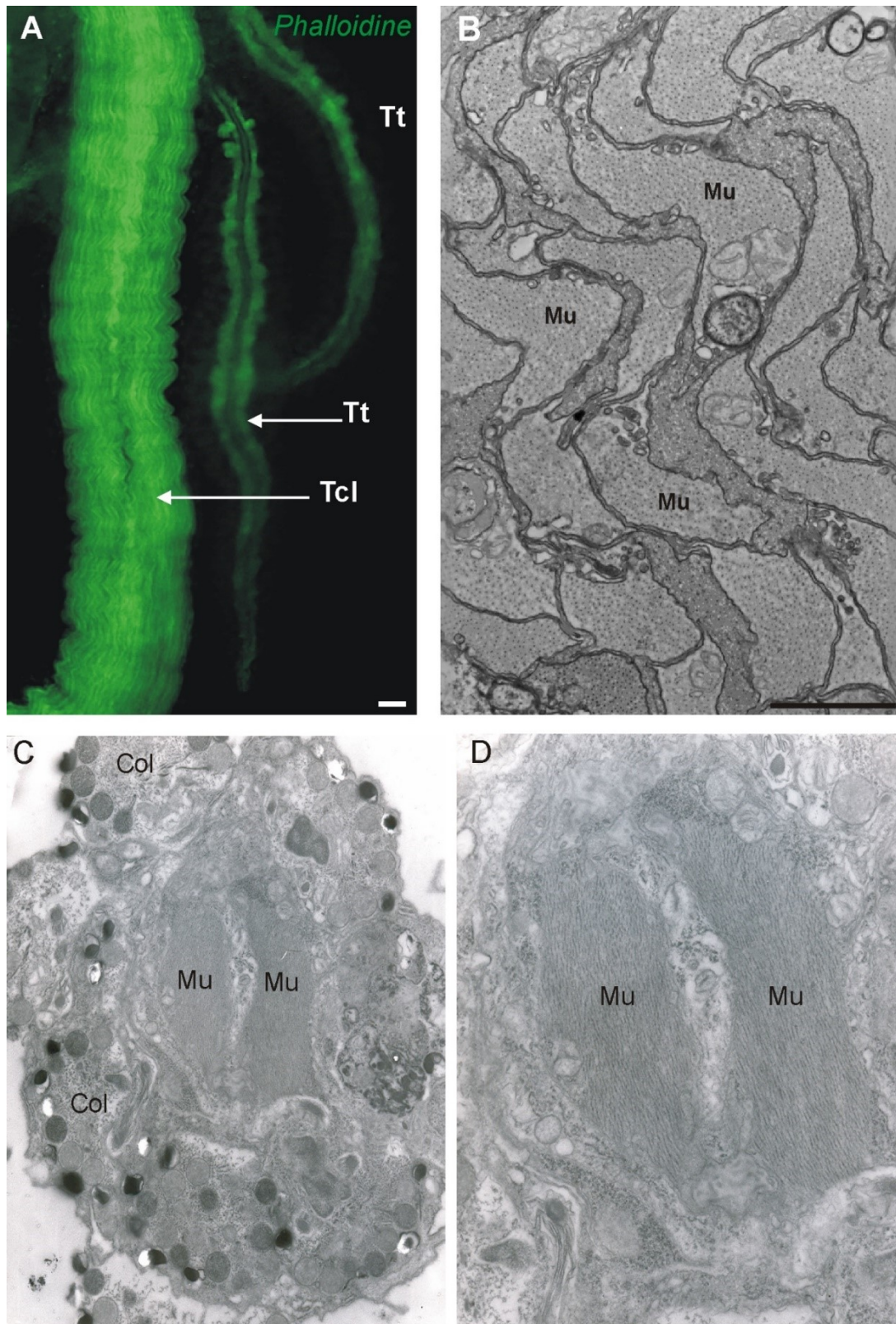


Figure 1.39 Musculature du système tentaculaire. A) Marquage phalloïdine de la musculature du tentacule (Tcl) et des tentilles (Tt). B) Coupe transversale d'un tentacule en MET, sur laquelle on observe de nombreuses fibres musculaires (Mu). C) Coupe transversale de tentille en MET où l'on peut observer les deux faisceaux de fibres musculaires (Mu). Col : *colloblastes*. D) Grossissement des fibres musculaires visibles en C. Images de Cyrielle Dayraud, (Thèse 2011).

1.4.6 Les peignes ou palettes natatoires

P. pileus présente huit rangées de peignes disposées longitudinalement le long du corps de l'animal. Je vais présenter ici l'organisation structurale et la mise en place des peignes, ainsi que le fonctionnement des rangées de peignes en tant que palettes natatoires.

Organisation structurale et croissance des peignes

Chaque peigne porte un ensemble de longs cils agglomérés (plusieurs centaines de milliers) dont les battements synchronisés permettent le déplacement de l'animal dans la colonne d'eau (Figure 1.40 A-C). Ce sont des palettes natatoires. Les cellules qui portent ces cils, appelées « *polster cells* » sont multiciliées et organisées en un coussinet basilaire. Elles constituent le corps du peigne et sont recouvertes de cellules fibreuses (ou fibres inter-peignes) et d'un épithélium de revêtement (Figure 1.40 D – vue en CT). Des cellules nerveuses sont également présentes au sein du coussinet ; elles sont intercalées entre les *polster cells* et réalisent des contacts synaptiques avec celles-ci, ainsi qu'au niveau de l'épithélium de revêtement (Figure 1.40 D-F - Hernandez-Nicaise 1991). Les fibres inter-peignes sont des cellules très allongées, multinuclées, localisées entre les *polster cells* et les cellules épithéliales (Figure 1.41). Il en existe deux types (Figure 1.41) : (1) celles qui partent du centre du peigne (en position orale) et qui s'étendent jusqu'au peigne suivant, et (2) celles qui s'étendent en position latérale, et en direction orale, sans atteindre le peigne suivant. Ces fibres sont très riches en filaments d'actine (marquages phalloïdine et β -actine) mais ne semblent pas exprimer le gène de la chaîne lourde de la myosine II et ne seraient donc pas des cellules musculaires (Dayraud et al. 2012). Leur composition et leur localisation permettent d'émettre l'hypothèse d'une implication dans le maintien de la distance inter-peignes et/ou dans la résistance aux forces de tension mises en jeu lors du battement des peignes.

Les peignes sont alignés et régulièrement espacés au sein des huit rangées de peignes longitudinales. Ils apparaissent dès le stade larvaire et subissent une augmentation en nombre et en taille tout au long de la croissance de l'animal. Un renouvellement permanent des peignes a ensuite lieu chez l'adulte. Les nouveaux peignes (ou bébés peignes) apparaissent à l'extrémité aborale (en seconde position) ainsi qu'à l'extrémité orale (en 1ère position) (voir Figure 1.24, page 47). Il existe une croissance des peignes depuis leur formation jusqu'à leur maturité, accompagnée d'un renouvellement perpétuel des *polster cells* des peignes matures.

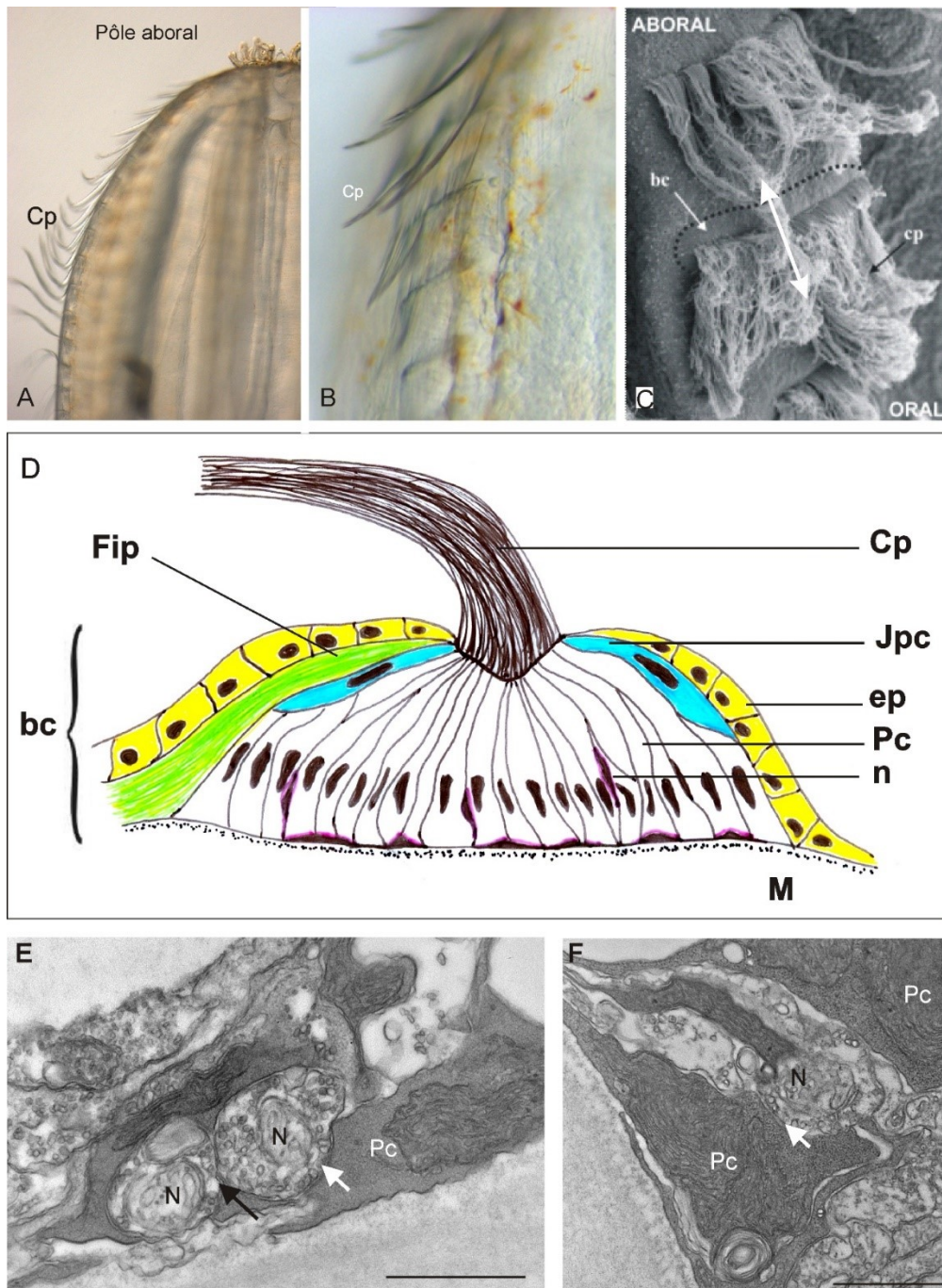


Figure 1.40 Les peignes : structure et innervation. A) Les peignes (ou palettes natatoires) d'un *Beroë*. Les battements des palettes ciliées (Cp) de chaque peigne permettent la locomotion de l'animal. B) Détail des peignes d'un *Beroë*. C) Vue en microscopie électronique à balayage (MEB) de deux peignes successifs. On distingue la palette composée de centaines de milliers de cils (dont l'aspect ébouriffé est dû à la fixation). Les cellules ciliées ont leur corps cellulaire localisé au niveau du coussinet basal (bc) constituant le corps du peigne. D) Dessin en coupe transversale du peigne (selon le trait de coupe figuré en C). Le coussinet basal (bc) est formé de *polster cells* (pc) qui sont les cellules prismatiques portant les cils de la palette (Cp). L'épithélium de revêtement du peigne (ep) est figuré en jaune, il contient, entre autre, des cellules nerveuses. Sous l'épithélium et au-dessus des *polster cells*, s'insèrent les cellules fibreuses inter-peignes (Fip, en vert). En bleu sont figurées les jeunes *polster cells* en différenciation (jpc). Des neurones ont aussi été figurés (en violet), intercalés entre les *polster cells*. E-F) Innervation des peignes. Images en MET où l'on observe des synapses interneurales (entre deux neurones) (flèche noire en E) ou bien neuro-ciliaires (entre un neurone et une *polster cell*) (flèches blanches en E et en F). bc : coussinet basilaire, cp : cils de la palette, ep : épithélium de revêtement du peigne, Fip : fibres inter-peignes, n/N : neurone, Pc : *polster cell* mature, Jpc : *polster cell* en cours de différenciation, M :

mésogléa. Echelles : E-F : 1 μm . A-B, D-F) Images et schéma de Cyrielle Dayraud (Thèse 2011), C) Image de Muriel Jager.

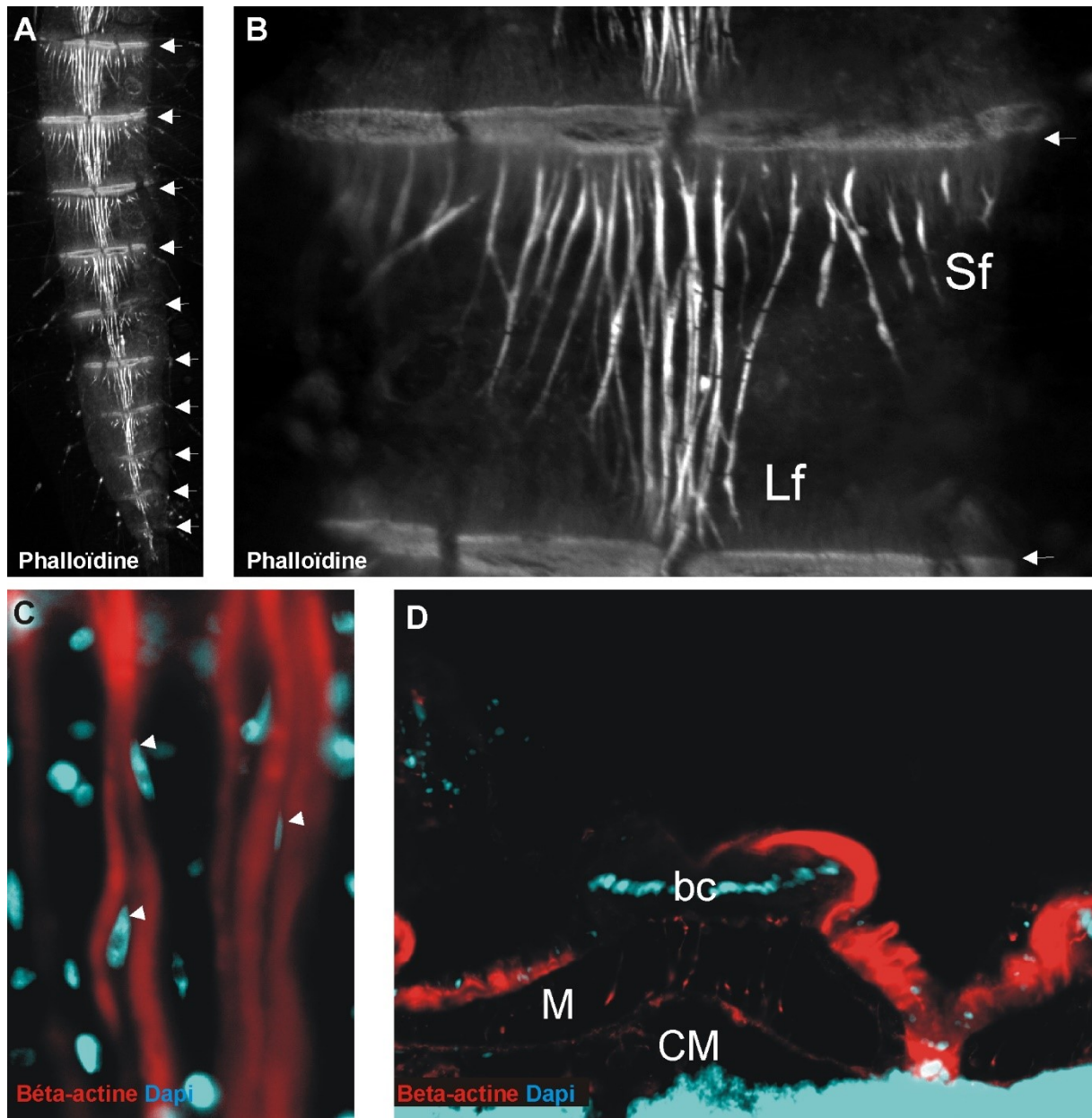


Figure 1.41 Les fibres inter-peignes. A) Fibres inter-peignes réparties tout au long d'une rangée de peignes (les flèches blanches indiquent les peignes) visualisées grâce à un marquage en phalloïdine. B) Grossissement de fibres inter-peignes entre deux peignes successifs. Les peignes sont indiqués par des flèches blanches. C) Fibres inter-peignes en marquage anti- β -actine. Leurs noyaux sont allongés (têtes de flèches blanches). G) Fibres inter-peignes observées grâce à l'anticorps anti- β -actine sur une coupe transversale de peigne. On observe les noyaux alignés des *polster cells* du coussinet basilaire (bc) du peigne. CM : canal méridien, Lf : fibres longues, M : *mésogléa*, Sf : fibres courtes. A-B) Images Muriel Jager, C-D) Images Cyrielle Dayraud (Thèse 2011).

L'utilisation de marqueurs cellulaires caractéristiques de cellules souches (*PpiPiwi*), de *polster cells* en cours de différenciation (*PpiBBS5*, marqueur de ciliogénèse précoce ; *Ppiβ-tubuline*, marqueur de ciliogénèse tardive) et de *polster cells* différenciées (*PpiSox6*) a permis de comprendre la structure du peigne et d'établir un modèle de croissance du peigne et de renouvellement des *polster cells* (Alié et al 2011, Jager et al. 2013) (Figure 1. 42).

Sur un peigne vu de dessus, on peut observer des populations de cellules souches aux deux extrémités (expression de *PpiPiwi* aux extrémités, sous la forme d'un croissant composé de cellules à gros nucléole, Figure 1.42 A). Les marqueurs de différenciation montrent un marquage en anneau tout autour du peigne, plus ou moins étendu en fonction de l'état de différenciation (*PpiBBS5* est restreint aux extrémités et *Ppiβ-tubuline* s'étend sur toute la surface du peigne, à l'exception de la zone médiane - Figure 1.42 B,C,E). Les cellules matures sont présentes sur la totalité du peigne, au niveau de la zone médiane et sous l'anneau périphérique (*PpiSox6*, marqueur de *polster cells* matures de la moitié orale du peigne, zone médiane incluse - Figure 1.42 D,F). L'observation en coupe transversale permet de comprendre l'organisation du peigne (Figure 1.42 G ; voir aussi Figure 1.40 D) : les *polster cells* sont distribuées en éventail, les cellules matures constituent le cœur de l'éventail alors que les *polster cells* en cours de différenciation sont localisées sous l'épithélium de revêtement. Toutes les *polster cells* ont leur pôle apical localisé au niveau de la ligne médiane où l'épithélium de revêtement s'interrompt et où les cils émergent (Figures 1.42 G,I).

Associées à la caractérisation de l'organisation spatiale des peignes, des expériences d'incorporation d'EdU ont permis de comprendre la dynamique mise en jeu (Figure 1.42 H,H' - Alié et al. 2011, Jager et al. 2013). Cellules souches et progéniteurs étant localisés aux extrémités, les cellules en cours de différenciation se déplacent depuis les extrémités, sur le pourtour du peigne et sous l'épithélium de revêtement. Une fois différenciées, elles intègrent le cœur de l'éventail. Le peigne croît ainsi en trois dimensions (Figure 1.42 G,I,J) : en longueur (à partir des deux extrémités), en largeur (du côté aboral et du côté oral) et en épaisseur (par ajout de cellules à la surface du coussinet basilaire).

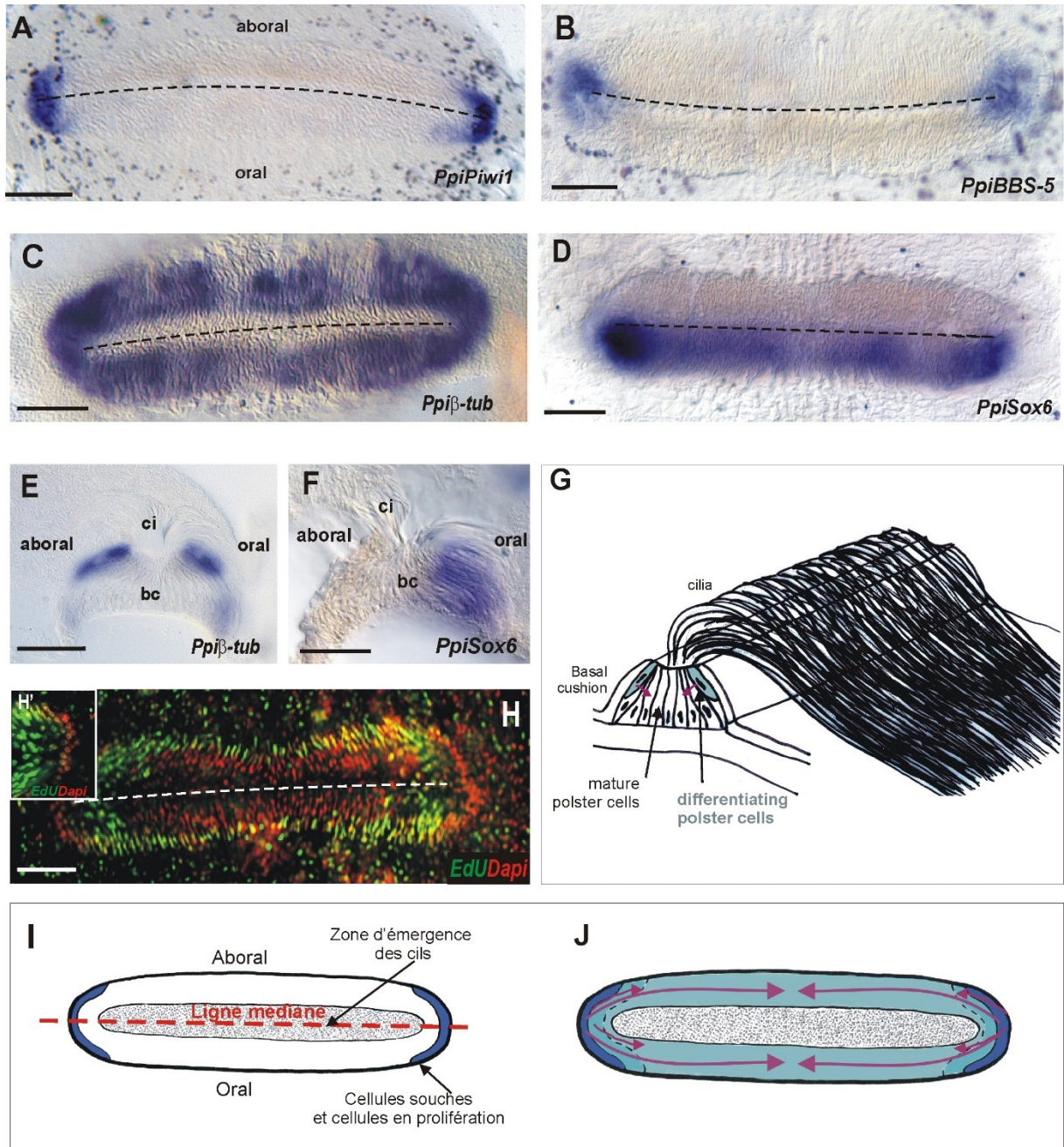


Figure 1.42 Mise en évidence du modèle de croissance du peigne. A-D) Expression au niveau d'un peigne vu de dessus de gènes marqueurs de cellules souches (*PpiPiwi1* – A), de ciliogenèse précoce (*PpiBBS5* - B), de ciliogenèse tardive (*Ppiβ-tubuline* - C) et de *polster cells* matures (*PpiSox6* - D). E-F Coupes transversales de peignes (cryosections). E) Expression de *Ppiβ-tubuline* au niveau des *polster cells* en cours de différenciation. F) Expression de *PpiSox6* uniquement au niveau des *polster cells* matures orales. Bc : coussinet basilaire, ci : cils. H) Résultats d'un marquage EdU après un pulse de 20h et une chasse de 5 jours. Le marquage met en évidence la présence de jeunes *polster cells* près des extrémités du peigne, et tout autour du coussinet basilaire du peigne, en position superficielle. En H', on peut observer la présence de noyaux ronds à gros nucléoles EdU-positifs aux extrémités du peigne qui pourraient correspondre à des cellules souches. G-J) Modèle de croissance du peigne. Les cellules souches et les progéniteurs en prolifération sont localisés aux extrémités du peigne. I). Les cellules en cours de différenciation se déplacent (flèches mauves) sous l'épiderme de revêtement (G, J) pour atteindre leur destination définitive (à proximité des extrémités), ce qui permet la croissance en longueur du peigne, ou tout autour du bord du peigne, permettant la croissance en épaisseur et en largeur. Elles intègrent le coussinet basilaire (bc) une fois matures (G). La ligne en pointillés figurée en I) matérialise la ligne médiane du coussinet basilaire. Echelles : A-H : 100 μ m. A-J : D'après Jager et al. (2013).

Battement des cils et comportement de nage : mécanismes et contrôle

Les caractéristiques des battements des palettes natatoires, en lien avec la locomotion de l'animal ont été particulièrement étudiées dans les années 1970 et 1980 (Tamm 1973, Tamm 1982, résumé dans Tamm 2014 - étude chez *Pleurobrachia* sp.). Le battement des cils des *polster cells* permet la locomotion de l'animal. Les cils d'un même peigne sont reliés entre eux par des structures appelées lamelles de compartimentation, ce qui permet la cohésion d'une même palette natatoire et permettrait une synchronisation du battement de l'ensemble des cils d'un même peigne (Tamm 1982). Au repos, les cils sont plaqués le long du corps et orientés vers le pôle oral. Le battement actif des cils qui va permettre de propulser l'animal est habituellement dirigé vers le pôle aboral. Sans stimulation extérieure, au sein d'une même rangée de peignes, on observe une onde de propagation des battements parcourant l'animal du pôle aboral au pôle oral (Tamm, 1982) et le battement des différentes rangées est plus ou moins synchrone. L'animal se déplace alors la bouche vers l'avant. Une stimulation extérieure peut entraîner une modification du battement des rangées de peignes et donc un changement de comportement de l'animal.

A chaque instant (au repos ou suite à une stimulation extérieure), plusieurs paramètres sont contrôlés :

- la mise en jeu du battement d'un peigne et la transmission de ce battement aux autres peignes de la même rangée = synchronisation des battements au sein d'une rangée de peignes et contrôle de la fréquence des battements (i)
- le battement d'une rangée de peignes par rapport à une autre = contrôle du sens et de la fréquence de battement des rangées les unes par rapport aux autres (ii)

On se pose alors la question du/des type(s) de transmission(s) impliqués. Nous disposons de peu d'informations à ce sujet et les conclusions actuelles, souvent présentées comme admises, ne sont en réalité tirées que d'un faible nombre d'expérimentations.

En ce qui concerne la mise en jeu des battements d'une rangée de peignes (i), les balanciers localisés au niveau de l'organe apical jouerait le rôle de pacemaker dans la génération de l'onde de battement (Tamm 1982). La fréquence de battement des cellules ciliées des balanciers déterminerait alors celle des peignes, via la connexion par les sillons ciliés (Tamm 1982) et ceci sans mise en jeu d'une transmission nerveuse (Tamm 1982). Les observations en microscopie électronique à transmission (Hernandez-Nicaise 1991) ainsi que des études d'expression des innexines en hybridation *in situ* (données non publiées de l'équipe – post-doctorat T. Silberfield) montrent que les cellules épithéliales des sillons ciliés communiquent entre elles par des jonctions communicantes (de type jonctions gap), ce qui suggère une transmission électrique du signal le long du sillon cilié. Aucune communication nerveuse ne semble non plus être impliquée dans la propagation de l'onde de

battement le long de la rangée de peigne (Tamm 1982). En effet, ses expériences montrent que la destruction du réseau nerveux entre deux peignes (ou le retrait d'un des peignes) n'interrompt pas la propagation du battement. Celle-ci n'est altérée que lors du retrait de plusieurs peignes successifs. Les cils d'un peigne recouvrant plus ou moins le peigne adjacent, Tamm (1982) émet alors l'hypothèse que le battement d'un peigne stimulerait le battement du peigne suivant (stimulation mécanique via des micro-courants d'eau). Des mécanorécepteurs seraient alors présents au niveau des peignes (soit les *polster cells* elles-mêmes qui auraient alors un fonctionnement autonome, récepteur et effecteur, soit d'autres types cellulaires). Des expériences plus récentes ont été réalisées par Moroz et ses collaborateurs (2014) sur *Pleurobrachia bachei* et semblent indiquer qu'aucun messenger « classique » (neurotransmetteurs, hormones, messagers paracrines ou intracellulaires...) n'a d'effet sur la fréquence de battement des peignes. Les expériences ont été réalisées sur des peignes isolés et sur des rangées de peignes sous contrôle de l'organe aboral.

La synchronisation d'une rangée par rapport à une autre (ii) est à la base de la compréhension du comportement de nage de l'animal. Au repos (sans stimulation extérieure), l'animal adopte une position verticale, l'axe oral-aboral étant parallèle à la gravité, la bouche orientée vers le haut. Les battements des rangées de peignes sont alors occasionnels et plus ou moins synchronisés. Lorsqu'il se retrouve dans une position inclinée, il revient à la position verticale grâce à une modulation de la fréquence de battement des différentes rangées de peignes. Il existe donc un contrôle de la posture sous l'influence de la pesanteur (géotaxie). L'organe apical est à l'origine de la perception de la pesanteur et est relié au peigne le plus aboral de chaque rangée par un sillon cilié (voir Figure 1.35). Une perturbation de la position d'équilibre augmente la pression appliquée par le statolithe sur certains des 4 balanciers sur lesquels il repose, ce qui entraîne alors une excitation asymétrique des balanciers (voir Figure 1.35C) et donc un battement des rangées de peignes à différentes fréquences.

Un contrôle via une transmission nerveuse a aussi été mis en évidence dans certains contextes comme lors de la modification du comportement de nage lors de la capture d'une proie (Tamm 1982). Lorsque l'animal capture une proie à l'aide de l'un de ses tentacules, une suite stéréotypée d'évènements a lieu avec une contraction partielle du tentacule, suivie d'une inversion du sens de battement des peignes dans les rangées adjacentes au tentacule, l'amenant à réaliser un mouvement de rotation sur lui-même qui lui permet d'amener la proie au niveau de sa bouche (Figure 1.43). Le mécanisme mis en jeu est bien différent de celui décrit précédemment lors de la perception de la gravité puisque des animaux sans organe apical (et donc sans statolithe) présentent un comportement de nage similaire lors de la capture d'une proie (Tamm 1982). Il est important ici de préciser que ce comportement n'est pas induit par la contraction du tentacule mais bien par le stimulus spécifique lié à la capture d'une proie (mise en jeu de récepteurs sensoriels au niveau du tentacule ?). En effet, une stimulation mécanique du tentacule ou du corps de l'animal (par exemple avec une pipette en verre)

entraîne une contraction des tentacules qui n'est pas suivie de l'inversement du sens de battement des peignes et donc du mouvement de rotation.

Cependant, la stimulation électrique (via une électrode extracellulaire) d'un tentacule ou d'une zone de la surface du corps adjacente au tentacule entraîne la même suite d'évènements (décrite précédemment) que lors de la capture d'une proie (Tamm & Moss 1985, 1986, 1993 ; Tamm 2014). L'inversion du sens de battement des peignes, qui a lieu suite à la capture d'une proie, serait alors médié par une conduction via le système nerveux. Les supports anatomiques de cette conduction nerveuse pourraient être le système nerveux des tentacules, de la racine tentaculaire, de la gaine tentaculaire et/ou du nerf juxta-tentaculaire, eux-même connectés au système nerveux épithélial de l'organisme qui innerve les cellules ciliées des peignes (Hernandez-Nicaise 1991, Jager et al. 2011a). Les connections précises entre les systèmes nerveux du système tentaculaire, de la racine tentaculaire et du reste de l'organisme n'ont pas encore été complètement décrites.

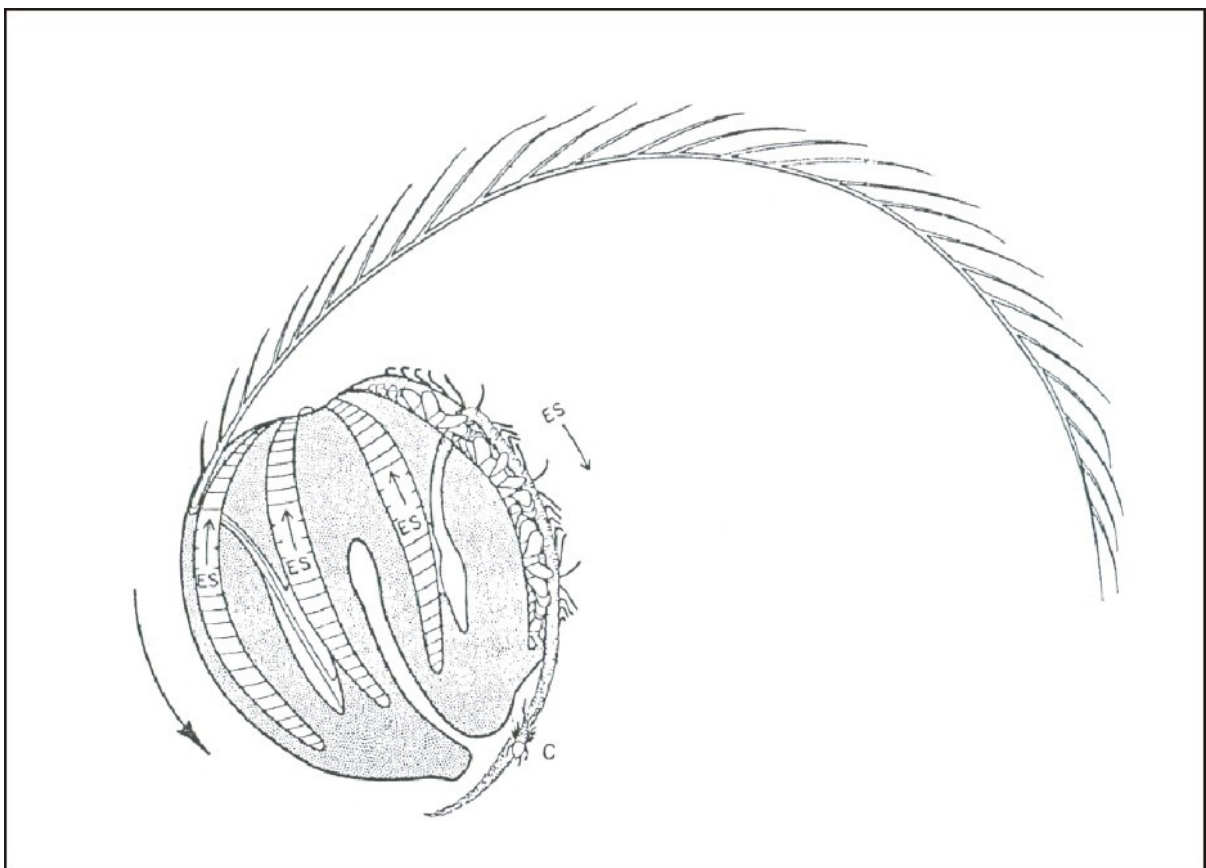


Figure 1.43 Comportement de *Pleurobrachia pileus* lors de la prise alimentaire. Les rangées de peignes situées du côté du tentacule qui a capturé une proie inversent le sens de leur battement, ce qui entraîne une rotation de l'animal sur lui-même. Figure tirée de Tamm (1982).

1.4.7 Mésoglée et épiderme, une diversité de types cellulaires

L'épiderme, localisé en position externe, est composé d'un épithélium de revêtement unistratifié et d'une lame basale (voir Figure 1.30, page 55). La mésoglée, localisée sous la lame basale (voir Figure 1.30, page 55), représente une importante matrice extracellulaire très hydratée et gélatineuse colonisée par différents types cellulaires. Ces structures présentent une grande diversité de types cellulaires. Nous avons déjà parlé de la présence de cellules nerveuses et musculaires mais un grand nombre d'autres types cellulaires y ont été mis en évidence. Leur caractérisation s'est principalement faite d'un point de vue morphologique ou à l'aide de marqueurs moléculaires selon une approche par immunofluorescence. Les fonctions précises sont rarement connues.

Les cellules de l'épiderme présentent elles aussi une grande diversité.

On y trouve, en plus des cellules musculaires et nerveuses (basi-épithéliales) :

- des cellules épithéliales de revêtement ;
- des cellules glandulaires sécrétrices de mucus (Franc, 1985). Ces cellules sont de différents types et l'on distingue les cellules glandulaires de type spumeux et les cellules glandulaires de type granulaire (Figure 1.44) ;
- des cellules sensorielles ciliées appelées vibrorécepteurs, propres aux Cténaïres (Hernandez-Nicaise 1991) ;
- des hoplocytes, type cellulaire particulier caractérisé par une sorte d'épine (« actin-peg ») (Hernandez-Nicaise, 1991).

Les cellules de la mésoglée ont été décrites par Franc et portent le nom de « cellules de Franc » (Franc 1985) ou de cellules mésenchymateuses. On distingue trois types de cellules mésenchymateuses :

- les cellules à vacuoles (« vacuolated cells ») qui possèdent de longs prolongements de type filopodes ou pseudopodes (Figure 1.45 A-B). Ces cellules sont notamment présentes en très grand nombre et donc recrutées dans les zones de lésions.
- les cellules mésenchymateuses à filaments, de forme allongée, plurinucléées avec de nombreux prolongements (Figure 1.45 C). Ces cellules seraient localisées à proximité des cellules musculaires mésogléennes et pourraient en être des précurseurs.
- les cellules mésenchymateuses claires, de forme plus ou moins sphérique et ne présentant pas de prolongement (Figure 1.45 D)

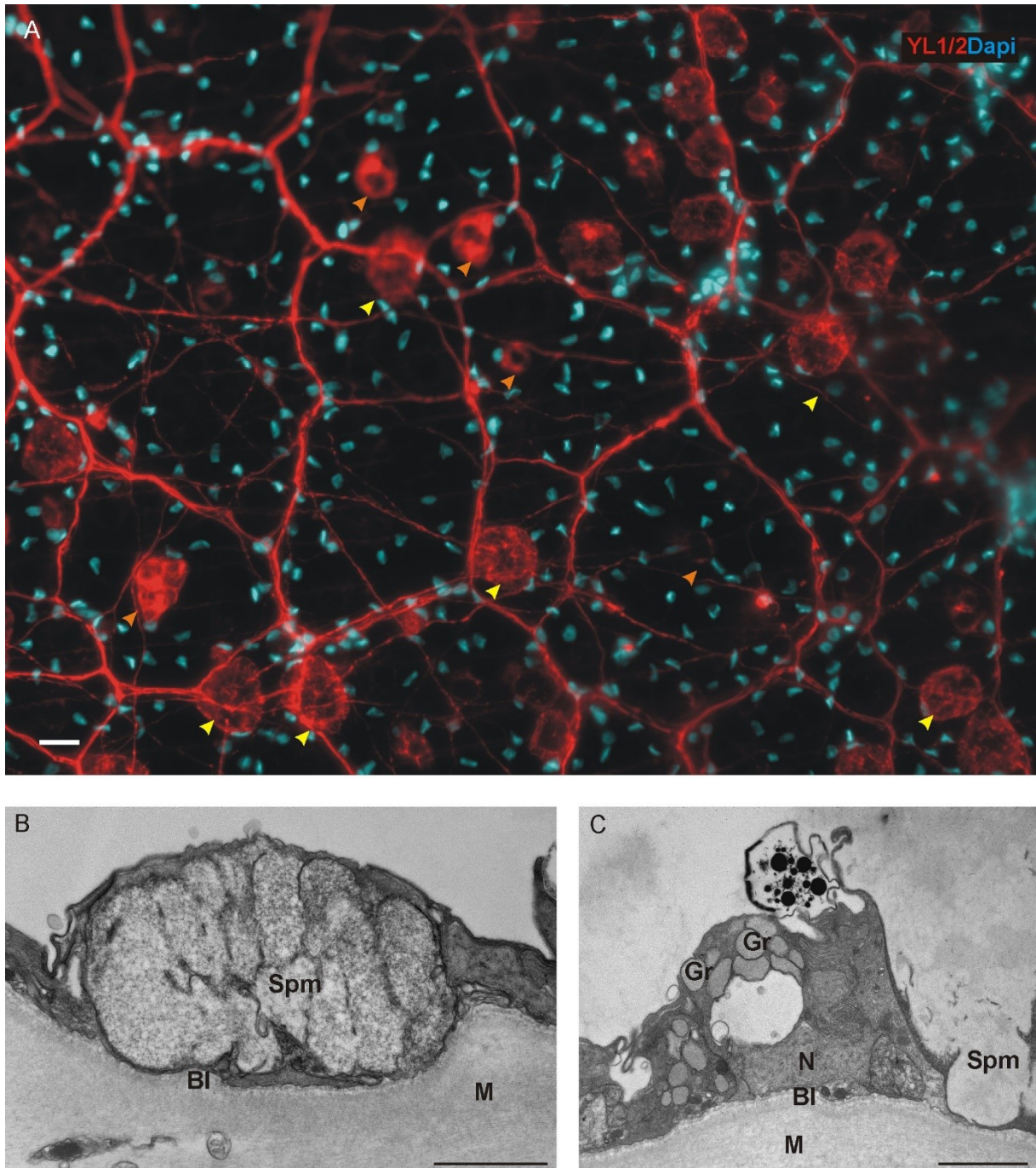


Figure 1.44 Cellules glandulaires de l'épiderme de *P. pileus*. A) Immunomarquage YL1/2 permettant de visualiser les deux types de cellules glandulaires avec vraisemblablement des cellules glandulaires de type spumeux (têtes de flèches oranges) et de type granulaire (têtes de flèches jaunes). B-C) Images en MET des différents types de cellules glandulaires de *P. pileus*. B) Cellule glandulaire de type spumeux (Spm) pour laquelle on voit que les granules de mucus sont presque fusionnés. C) Cellules glandulaires de type granulaire à gauche (Gr) et cellule glandulaire de type spumeux (Spm) à droite. *Bl* : lame basale, *M* : mésogée, *N* : noyau. Echelles : A : 20 μm ; B,C : 2 μm . A) Image originale, B-C) Images Cyrielle Dayraud, Thèse 2011.

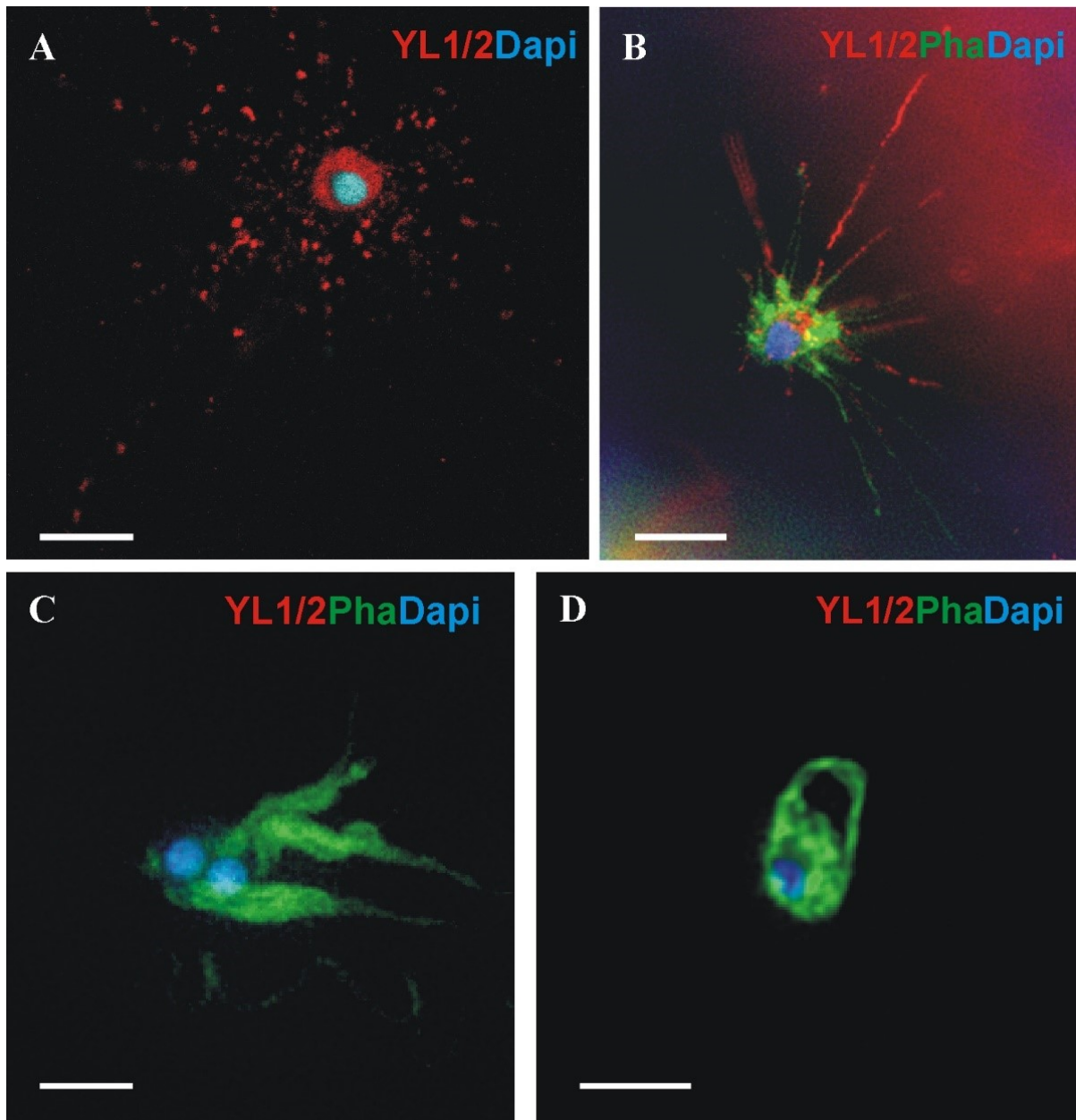


Figure 1.45 Cellules de Franc observées au niveau de la mésogée de *P. pileus*. A-B) Cellules de Franc à vacuoles (avec de nombreux prolongements) observées en microscopie confocale après un immunomarquage YL1/2 en A) et en microscopie classique après un immunomarquage YL1/2 et phalloïdine en B). C) Cellule de Franc à filaments. Ces cellules ne sont pas YL1/2 positives. D) Cellule de Franc claire. Elles ne sont pas non plus marquées par l'anticorps YL1/2. Echelles : A –D : 5 μ m. A) Image originale, B-D) Images Cyrielle Dayraud (Thèse 2011).

Les cellules à vacuoles possèdent des prolongements ainsi qu'une forte abondance en microtubules (marquage avec l'anticorps anti- α -tubuline tyrosylée, YL1/2) (Figure 45 A-B). Ceci a souvent entraîné leur confusion avec les cellules nerveuses mésogléennes. Cependant, la présence d'actine (fort marquage phalloïdine, absent dans les neurones) permet de les en distinguer (Figure 1.45 B ; Jager et al. 2011a).

1.4.8 Le système reproducteur

Les Cténaires sont hermaphrodites et présentent une reproduction de type sexuée. Les gonades mâles et femelles sont réparties dans la paroi des canaux méridiens (Figure 1.46) et les gamètes sont évacués vers l'extérieur par des gonopores permettant ainsi une fécondation externe (Dunlap 1966, Dunlap-Pianka 1974). Les gonades mâles et femelles se font face. Au niveau de la gonade mâle, on observe une ségrégation spatiale des différents stades de la spermatogénèse, les stades les plus tardifs (spermatozoïdes flagellés) étant les plus internes. Au niveau de la gonade femelle, on peut repérer les ovocytes en formation, encerclés de cellules nourricières qui leur sont associées.

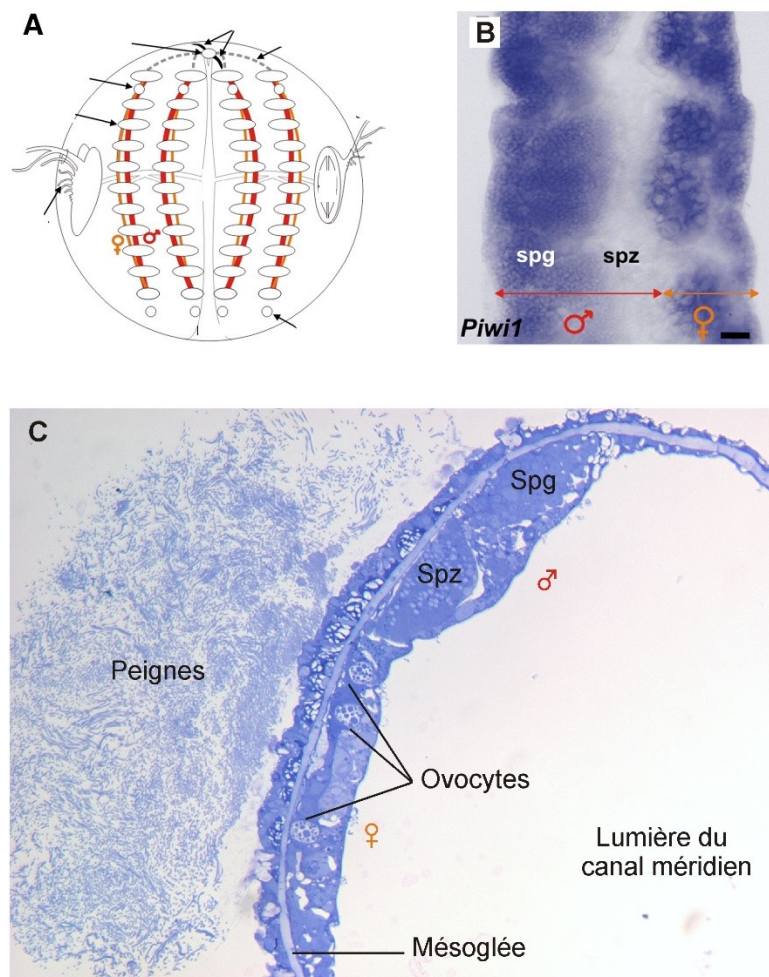


Figure 1.46 Le système reproducteur de *P. pileus*. A) Schéma de *P. pileus* montrant la localisation des gonades mâles et femelles au niveau des canaux méridiens, sous les rangées de peignes. B) Expression de *PpiPiwi1* (marqueur de cellules souches), au niveau externe de la gonade mâle (zone des spermatogonies, spg) et au niveau de la gonade femelle. Les étapes de la spermatogénèse sont ségréguées, les stades les plus tardifs (n'exprimant pas *PpiPiwi1*) sont les plus internes. C) Coupe semi-fine colorée au bleu de toluidine montrant la portion de la paroi du canal méridien contenant les gonades. Spg : spermatogonies, spz : spermatozoïdes. A, B : d'après Alié et al. 2011, C : image Alexandre Alié, Thèse 2010

1.4.9 Le système gastrovasculaire

Le système gastrovasculaire est composé du pharynx, de l'infundibulum et de l'ensemble des canaux endodermiques qui parcourent la mésogée (Figure 1.47). Il est ouvert au niveau de ses deux

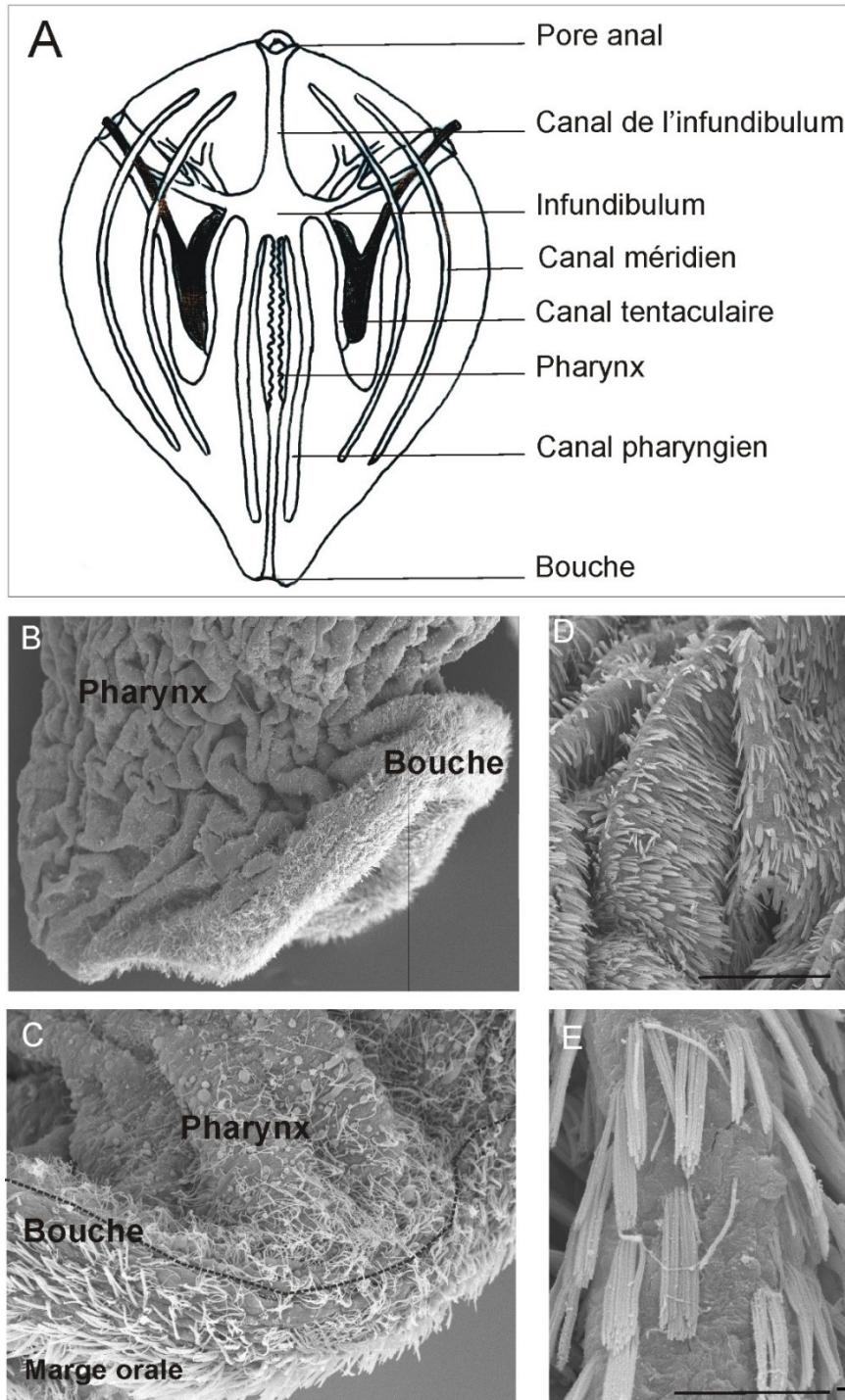


Figure 1.47 L'appareil gastrovasculaire. A) Schéma de l'appareil gastrovasculaire d'un *Cydippidé*. B-E) Images de microscopie électronique à balayage (MEB). B) L'épithélium de la bouche est densément recouvert de cellules multiciliées. C) Agrandissement au niveau de la région orale. D) Épithélium pharyngien recouvert de cellules multiciliées formant des micro-palettes. E) Grossissement de D. Echelles : D : 50 µm, E : 10 µm. B-E : Images Muriel Jager.

extrémités : les deux pores anaux au pôle aboral et la bouche au pôle oral. Les proies sont principalement digérées au niveau du pharynx et les nutriments sont ensuite acheminés, via l'infundibulum, aux différents canaux endodermiques. Des cellules ciliées tapissent la paroi interne du système gastrovasculaire et assurent le courant d'eau permettant la circulation des nutriments et l'oxygénation.

1.5 Objectifs de la thèse

Mon travail de thèse s'est développé selon deux axes. Dans le contexte de l'étude de l'origine du système nerveux des Métazoaires, je me suis intéressée à l'un des arguments clés proposés en faveur de l'origine indépendante du système nerveux des Cténaïres : l'absence de l'acétylcholine et du système cholinergique chez les Cténaïres (Moroz et al. 2014, Moroz 2015). La publication de ces résultats est apparue comme très surprenante. Deux questions en ont découlé : l'acétylcholine et le système cholinergique sont-ils réellement absents chez les Cténaïres ? Dans le cas contraire, sont-ils associés au système nerveux et impliqués dans son fonctionnement ? J'ai tenté de répondre à ces questions, grâce à une étude réalisée chez *Pleurobrachia pileus*, impliquant une multiplicité d'approches à différentes échelles. Cette partie est développée dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

Je me suis par ailleurs intéressée à l'évolution des mécanismes impliqués dans le contrôle négatif de la prolifération cellulaire, dans le contexte des tapis roulants cellulaires de *Pleurobrachia pileus* et de *Clytia hemisphaerica*. Ces systèmes sont particulièrement favorables à l'étude de l'équilibre prolifération/différenciation et de son contrôle. Ils présentent en effet une ségrégation spatio-temporelle des différents stades d'un lignage cellulaire avec la présence de cellules souches à un pôle et de cellules différenciés à l'autre. La zone de sortie du cycle cellulaire est donc délimitée spatialement. *Clytia hemisphaerica* et *Pleurobrachia pileus* étant les deux seuls organismes non-Bilatériens étudiés en laboratoire à posséder des tapis roulants cellulaires, ils représentent des modèles de choix pour l'étude de l'évolution de ces mécanismes à l'échelle des Métazoaires. Dans un premier temps, je me suis intéressée à la conservation des acteurs de la voie Hippo, voie de signalisation connue comme étant impliquée dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire et de la taille des organes chez la Drosophile et les Mammifères, ainsi qu'à leur déploiement chez ces 2 modèles. Dans un second temps, selon une approche par transcriptomique différentielle mettant à profit le tapis roulant cellulaire de *Clytia hemisphaerica*, j'ai étudié l'expression d'orthologues de gènes connus pour être impliqués dans l'arrêt de la prolifération cellulaire chez les Vertébrés afin d'émettre des hypothèses concernant la conservation de leur fonction chez les Cnidaires.

Chapitre 2

Origine(s) et évolution du système nerveux des Métazoaires : recherche de l'existence d'un système nerveux cholinergique chez *P. pileus*

2.1 Introduction

2.1.1 Les « neurotransmetteurs classiques » comme arguments en faveur de l'un des scénarios évolutifs concernant l'origine du système nerveux des Métazoaires ?

Nous avons vu en Introduction générale (Chapitre 1, page 11) que des publications récentes concluent à l'absence chez les Cténares de la quasi-totalité des « neurotransmetteurs classiques » (Moroz et al. 2014, Moroz 2015) ainsi que des systèmes associés (enzymes de synthèse et récepteurs principalement). Ces résultats sont présentés par ces auteurs en tant qu'arguments forts en faveur d'une origine indépendante du système nerveux des Cténares par rapport à celui des Cnidaires et des Bilatériens.

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à l'un de ces neurotransmetteurs classiques, l'acétylcholine ainsi qu'au système cholinergique associé. L'absence supposée d'acétylcholine ainsi que du système cholinergique chez les Cténares apparaît en réalité comme particulièrement étonnante, avant même de se poser la question de son utilisation éventuelle par le système nerveux. Afin d'illustrer cette idée, j'aimerais commencer par revenir sur la notion de « neurotransmetteurs classiques », à savoir tenter de comprendre ce qu'est un neurotransmetteur classique et en quoi sa présence ou son absence apporte des arguments en faveur de l'homologie ou non des cellules nerveuses. Les « neurotransmetteurs classiques » sont présentés dans le Tableau 2.1. Mon discours sera principalement illustré à l'aide de l'exemple de l'acétylcholine qui fait l'objet de mon étude.

Type		Neurotransmetteur	Effet postsynaptique
Amine		Acétylcholine	Excitateur
Acides aminés		GABA	Inhibiteur
		Glycine	Inhibiteur
		Glutamate	Excitateur
		Aspartate	Excitateur
Monoamines (dérivées d'acides aminés)	Catécholamines (dérivés de la tyrosine)	Dopamine	Excitateur
		Noradrénaline	Excitateur
		Adrénaline	Excitateur
	Dérivé du tryptophane	Sérotonine (5-HT)	Excitateur
	Dérivé de l'histidine	Histamine	Excitateur
Neuropeptides			

Tableau 2.1 Tableau des différents types de « neurotransmetteurs classiques ». Leur effet excitateur ou inhibiteur est précisé.

La notion de neurotransmetteur : un terme à nuancer ?

Le terme de neurotransmetteur (médiateur chimique synthétisé et libéré par un neurone, permettant à celui-ci de transmettre des messages en se fixant sur des cellules cibles – définition Larousse 2015), sous-entend non seulement un lien étroit avec le système nerveux mais aussi que la molécule et le système associé (système de synthèse, transport, libération et recyclage de la molécule) soient spécifiques des cellules nerveuses. La définition de neurotransmetteur suppose une action dans le cadre d'une synapse chimique (Figure 2.1). Cette image de neurotransmetteur doit cependant être nuancée puisque les études des 15 dernières années montrent en réalité une large distribution de ces « neurotransmetteurs classiques », non seulement du point de vue des types cellulaires (cellules nerveuses ou non), mais aussi des organismes concernés (organismes possédant un système nerveux ou non).

Si l'on prend l'exemple de l'acétylcholine on remarque, avec étonnement, que cette molécule est en réalité répartie dans l'ensemble de l'arbre du vivant (Wessler et al. 2001a, Horiuchi et al. 2003) et donc, de manière évidente, non associée exclusivement aux cellules nerveuses. L'acétylcholine est en

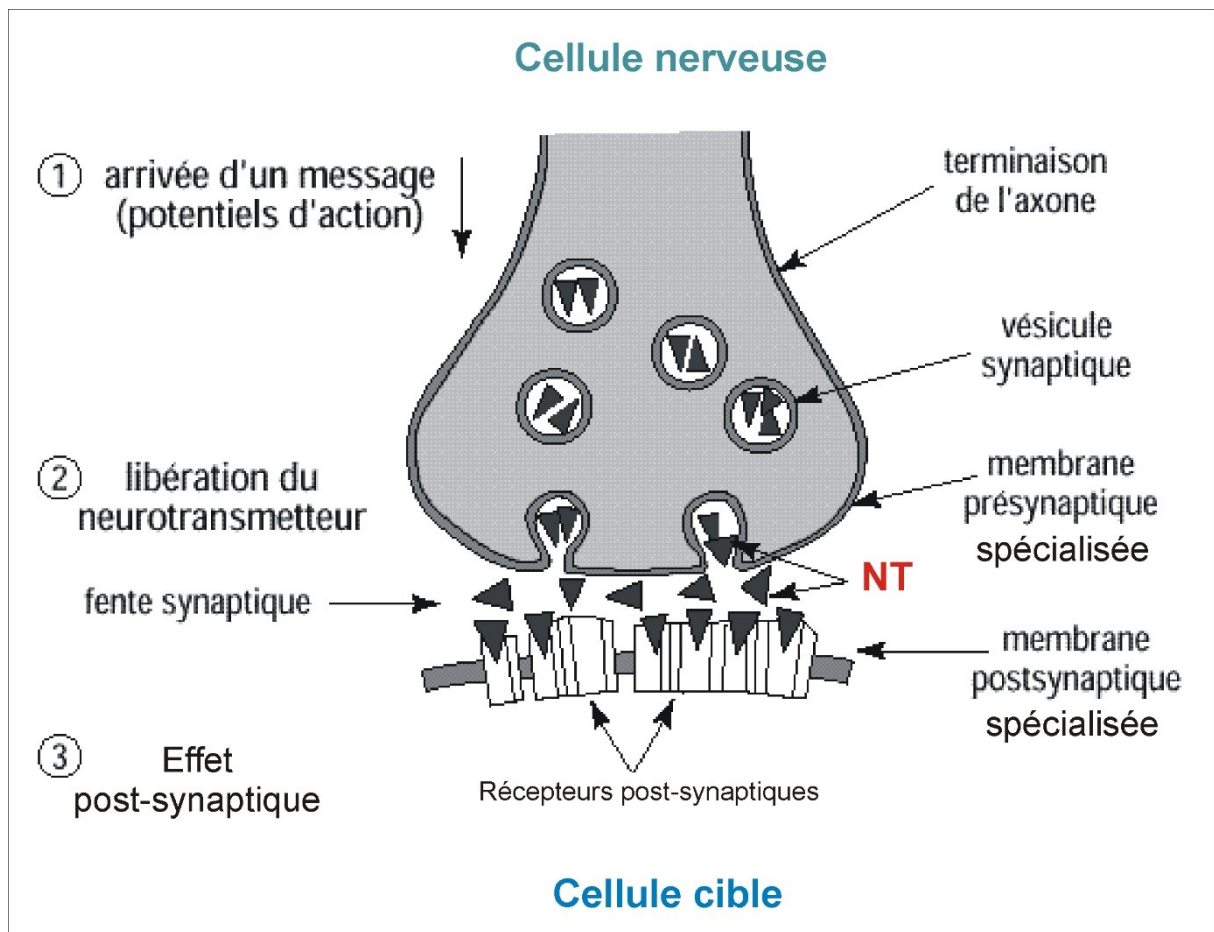


Figure 2.1 Schéma simplifié d'une synapse chimique. Une synapse chimique désigne une zone de contact spécialisée morphologiquement et fonctionnellement entre un neurone et une autre cellule (nerveuse ou non). Elle assure la conversion du message électrique (codé en fréquence de potentiel d'action) au niveau pré-synaptique en un message chimique (codé en concentration de neurotransmetteur (NT) libéré au niveau de la fente synaptique) agissant au niveau de la cellule cible.

effet présente chez les procaryotes, les plantes, les champignons, les algues, etc. L'implication fonctionnelle de l'acétylcholine a peu été étudiée en dehors des Bilatériens. Quelques données mettent cependant en évidence l'utilisation de l'acétylcholine comme molécule signal chez les plantes. Une relative diversité de rôles a pu être mise en évidence, avec par exemple une implication dans la régulation osmotique et le contrôle de la photosynthèse (Wessler et al. 2001a) ou encore dans la stimulation de l'élongation cellulaire (Sugiyama & Tezuka 2011, Di Sansebastiano et al. 2014).

Cette classification stricte en tant que neurotransmetteur est aussi à remettre en question au sein même des Vertébrés. Ces dernières années, bon nombre d'études chez les Mammifères et plus particulièrement chez l'Homme ont conduit à remettre en question cette idée reçue en mettant en évidence la présence d'acétylcholine au niveau d'une large diversité de cellules non nerveuses. Cette

molécule est libérée par exemple au niveau des cellules intestinales, placentaires, immunitaires, des adipocytes, des kératinocytes, des cellules épithéliales des voies respiratoires et même au niveau des cellules musculaires (Tucek 1982 ; Wessler & Kirkpatrick, 2008, Kummer et al. 2008). Un très grand nombre de « fonctions non neurales » de l'acétylcholine en tant que médiateur autocrine et paracrine ont été répertoriées, en lien avec la régulation de nombreux mécanismes cellulaires de base comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'immunité, la sécrétion, la migration cellulaire, les contacts cellule-cellule, l'organisation du cytosquelette, l'absorption, le contrôle du métabolisme (Duncan & Collison 2003, Wessler et al. 2001a, Fujii et al. 2008, Resende & Adhikari 2009, Tang et al. 2012, Grando et al. 2012). La classification stricte de l'acétylcholine en tant que neurotransmetteur est donc erronée mais reste difficile à modifier dans les esprits, même si cette molécule a été redéfinie comme « universal cell molecule in biological systems, including humans » dès la fin du XXème siècle (Wessler et al 1999).

Ces observations semblent généralisables aux autres molécules classées au sein des « neurotransmetteurs classiques ». Par exemple, il a été mis en évidence que le glutamate et le GABA sont utilisés comme molécule signal lors de la communication de cellules non nerveuses de Vertébrés (Hayashi et al. 2003, Gammelsaeter et al. 2004), mais aussi chez les plantes (Bouché et al. 2003, Forde & Lea 2007) ou encore chez les Eponges (Elliot & Leys 2010, Nickel 2010). Des récepteurs ionotropiques au glutamate ont de plus été identifiés chez les Eponges et chez les Placozoaires (Srivastava et al. 2008, Riesgo et al. 2014, Jorgensen 2014).

Les « neurotransmetteurs classiques » et le système associé ne sont donc pas spécifiques des cellules nerveuses et la seule mise en évidence de la présence d'une telle molécule et/ou des différents acteurs du système associé n'est pas suffisante pour apporter des arguments en faveur ou non de l'homologie des cellules nerveuses. L'obtention d'effets sur des cellules cibles n'est pas suffisante non plus. Il est indispensable d'y associer la mise en évidence claire d'une association avec des cellules nerveuses, étape essentielle qui apparaît pourtant complètement contre-intuitive de par l'utilisation du terme de neurotransmetteur. Un large faisceau d'arguments (selon une multiplicité d'approches) est donc indispensable pour permettre de répondre à la question de l'existence d'un système nerveux cholinergique chez les Cténaïres.

« Neurotransmetteurs classiques » et communication nerveuse à l'échelle des Eumétazoaires

Le terme classique sous-entend une notion de référence (« classique » par rapport à quoi ?). L'origine de ce terme prend son sens d'un point de vue historique. La mise en évidence de molécules libérées par des cellules nerveuses, et donc la définition de neurotransmetteur, viennent de travaux

chez les Mammifères. L'acétylcholine a été en effet le premier neurotransmetteur identifié dans le système nerveux des Mammifères (Dale 1914, Loewi 1921, Navratil 1926, Otto 1945, résumé dans Karczmar 1996 et dans Brown 2006). Il s'en est suivi la découverte des autres « neurotransmetteurs classiques » chez les Vertébrés ainsi que la mise en évidence de la conservation de l'utilisation de ces molécules en tant que neurotransmetteurs à l'échelle des Bilatériens (Bullock & Horridge 1965). La notion de neurotransmetteur classique se réfère donc à la transmission synaptique décrite chez les Vertébrés (et étendue par la suite aux autres Bilatériens).

En ce qui concerne les Cnidaires, la question de l'utilisation de ces « neurotransmetteurs classiques » dans la transmission synaptique reste largement débattue. La mise en jeu des systèmes liés à l'acétylcholine, au glutamate, au GABA et à la glycine est fortement suggérée par la présence des enzymes de synthèse ainsi que des récepteurs (Anctil 2009, Pierobon 2012) mais aussi par l'observation de modifications comportementales suite à l'emploi d'agonistes ou d'antagonistes de ces récepteurs (Kass-Simon et al. 2003, Kass-Simon & Pierobon 2007, Pierobon 2012). Cependant l'association au système nerveux n'a été démontrée que pour le glutamate et le NMDA (Scappaticci & Kass-Simon 2008, Delgado et al. 2010, Oren et al. 2014). En ce qui concerne les Cténaïres, nous avons vu que Moroz et ses collaborateurs (Moroz et al. 2014) concluent à l'absence d'utilisation de tous les neurotransmetteurs classiques (à part le L-glutamate) dans la communication nerveuse.

Un modèle de sélection et d'évolution des neurotransmetteurs

Il existe, à l'échelle des Bilatériens, un nombre limité de molécules mises en jeu dans la communication nerveuse. On se pose alors la question de la sélection, par les cellules nerveuses, de ces molécules en tant que molécules de communication intercellulaire. Peu d'hypothèses ont été proposées en ce qui concerne la sélection et l'évolution des neurotransmetteurs. Je vais vous présenter ici la théorie développée par Harris, Zahavi et leurs collaborateurs (Harris & Zahavi 2013, Harris et al. 2014) qui proposent d'appliquer la théorie de sélection du signal selon le principe du handicap à la sélection des neurotransmetteurs. Cette théorie me paraît être la plus en accord avec les caractéristiques connues de ces neurotransmetteurs.

La théorie de la sélection du signal selon le principe du handicap (Zahavi 1975, Zahavi & Zahavi 1997) a été développée dans le cadre de la communication animale. L'exemple des paons permet d'en comprendre le principe général. Les paonnes sont en effet stimulées par un trait phénotypique qui en réalité impose un handicap au mâle. Cette théorie suggère alors que les paonnes soient attirées par les paons qui portent la queue la plus longue et la plus lourde car ceci constitue un handicap (fardeau) témoin de la qualité des gènes du mâle. L'application de cette théorie à l'évolution des neurotransmetteurs suggère que le fardeau porté par ces molécules soit leur toxicité, à l'image de

l'encombrante queue du paon. La toxicité ainsi que les propriétés physico-chimiques de ces molécules, leur conférant la capacité de refléter la « qualité » des cellules sécrétrices, seraient à la base de leur sélection en tant que molécules signal. On entend par « qualité » des cellules sécrétrices, le type et l'intensité de leur activité métabolique, ainsi que les connexions réalisées avec les cellules voisines (leur permettant d'agir sur des cellules cibles).

Ainsi, le modèle d'évolution des neurotransmetteurs proposé est le suivant :

- 1- Libération d'une molécule par une cellule, suite à des changements dans son fonctionnement métabolique
- 2- Cette molécule, en tant que déchet métabolique toxique, cause des dommages au niveau des membranes des cellules voisines
- 3- La sélection de protéines membranaires capables de fixer la molécule au niveau des cellules voisines permet de limiter la toxicité de la molécule libérée
- 4- La fixation de la molécule par les cellules voisines leur permet d'avoir des informations concernant le type et le niveau d'activité de la cellule sécrétrice
- 5- Lorsque l'organisme tire profit de la synchronisation de l'activité des cellules voisines avec celle de la cellule sécrétrice, les cellules voisines utilisent alors la molécule libérée en tant que signal de modulation de leur activité. La molécule libérée est alors un messenger.
- 6- La cellule libératrice peut alors tirer profit de cette synchronisation, ce qui entraîne la sélection d'enzymes et de protéines permettant d'augmenter la quantité et la qualité du signal, à la base de la mise en place d'une signalisation de type paracrine
- 7- Les cellules nerveuses auraient adopté cette signalisation de type paracrine (pré-existante) plutôt que de mettre en place un nouveau système de signalisation.

Selon ce modèle d'évolution, les neurotransmetteurs auraient d'abord été sélectionnés en tant que messagers paracrines en contexte non neural puis recrutés par les cellules nerveuses. Leur utilisation au niveau de contacts synaptiques (en lien avec la compartimentation des cellules, la concentration de la sécrétion au niveau de l'extrémité de prolongements cellulaires et la réduction de la distance de diffusion) pourrait être une adaptation permettant d'identifier finement l'origine du stimulus électrique présynaptique, de prévenir d'éventuelles interférences entre différents stimuli mais aussi de donner une polarité à la transmission⁴.

Harris et Zahavi (Harris & Zahavi 2013, Harris et al. 2014) ne sont en réalité pas les premiers à proposer que les neurotransmetteurs aient été, à l'origine, des molécules de communication paracrine. Nickel (Nickel 2010) a en effet proposé un scénario (« Paracrine-to-electrochemical

⁴ La directionnalité des synapses chimiques est un cas général chez les Bilatériens mais chez les Cnidaires et les Cténaïres, de nombreuses synapses bidirectionnelles ont été mises en évidence (Hernandez Nicaise 1991, Westfall et al. 1996).

dominance transition hypothesis ») concernant l'origine de la cellule nerveuse en lien avec la co-optation des systèmes de communications paracrines (Figure 2.2).

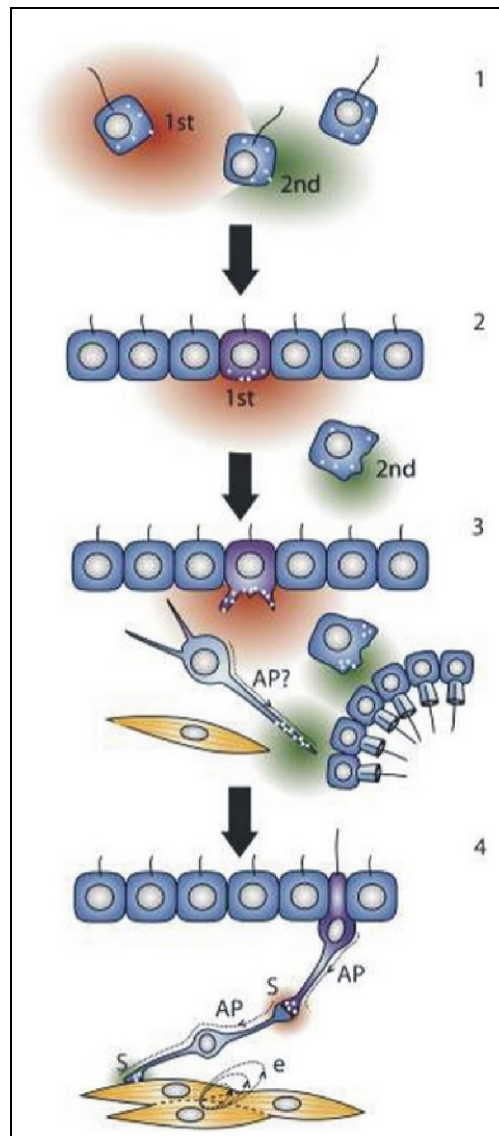


Figure 2.2 Scénario « Paracrine-to-electrochemical dominance transition hypothesis » proposé par Nickel 2010. (1) Communication paracrine chez les eucaryotes unicellulaires. (2) Communication paracrine intracorporelle hypothétique chez un métazoaire « primitif » (« early Metazoa » dans le texte de Nickel 2010) : une cellule épithéliale excitée émet un signal paracrine de premier ordre, relayé par une cellule mésenchymateuse émettant un signal de second ordre de même nature (relai) ou de nature différente (intégration) que le signal de premier ordre. (3) Apparition de nouveaux types cellulaires, dont certains présentent une polarité et/ou des prolongements, aux extrémités desquels se concentre la communication paracrine. Eventuellement ces cellules peuvent produire des potentiels d'action. (4) Les cellules polarisées avec une communication paracrine compartimentée évoluent en neurone et en neurone sensoriel avec concentration de la sécrétion des messagers au niveau des synapses. Le potentiel d'action (AP) joue maintenant un rôle prépondérant pour la communication à longue distance, alors que la communication paracrine est utilisée sur la courte distance : c'est la *Paracrine-to- electrochemical dominance transition*. AP : potentiel d'action, e : couplage électrique, S : synapse,

1st : message chimique de premier ordre, 2nd : message chimique de second ordre. Figure d'après Nickel (2010).

Différentes données permettent d'appuyer le modèle d'évolution proposé par Harris et Zahavi.

En ce qui concerne les caractéristiques physico-chimiques de ces molécules, la première observation que l'on peut faire est qu'effectivement, les « neurotransmetteurs classiques » sont de petites molécules que l'on peut qualifier de « formes dégénérées » ou de produits de dégradation de molécules biologiques impliquées dans le métabolisme basal des cellules. En effet, l'acétylcholine est par exemple produite à partir d'une modification mineure de la choline, la noradrénaline de la tyrosine, le GABA du glutamate. Leur libération au niveau extracellulaire est donc le reflet d'une activité métabolique spécifique de la cellule sécrétrice. Leurs caractéristiques physico-chimiques semblent de plus permettre de rendre compte au mieux de l'intensité de cette activité métabolique et pourraient expliquer qu'elles aient été sélectionnés en tant que molécules de communication paracrine puis nerveuse. Si l'on prend l'exemple de l'acétylcholine, sa charge positive permettrait sa libération par les cellules suite à un influx calcique dans le cytosol (Falk-Vairant et al. 1996). Contrairement aux autres cations dont la libération est déclenchée par des influx calciques, comme les ions inorganiques, l'acétylcholine est fortement hydrolysable et donc rapidement dégradée. Sa présence au niveau extracellulaire reflète finement l'entrée de calcium et est donc fortement corrélée à l'activité de la cellule émettrice. Les propriétés physico-chimiques de l'acétylcholine en font donc une molécule adaptée à la mise en jeu d'une transmission rapide et transitoire.

En ce qui concerne la toxicité des neurotransmetteurs, elle a été mise en évidence au niveau du système nerveux central ou périphérique. L'acétylcholine possède une liaison à fort pouvoir d'hydrolyse (Rosas-Garcia et al. 1997), ce qui lui confère une forte instabilité. Elle peut ainsi agir en tant que donneur de groupement acétyl et entraîner des modifications au niveau des phospholipides et glycoprotéines membranaires (Ranck & Tocanne, 1982). La choline résultant de cette réaction peut elle-même entraîner des modifications des phospholipides membranaires (Drewes & Singh 1988). Une forte toxicité a aussi été mise en évidence pour le glutamate (Sheldon & Robinson, 2007, Campos et al. 2011), le GABA (Lukasiuk & Pitkänen, 2000), la dopamine (Caudle et al. 2007, Bisaglia et al. 2013) et la sérotonine (Jones et al. 2007, Peters et al. 2013).

Si l'on s'intéresse maintenant à l'hypothèse du recrutement d'une signalisation de type paracrine à la base de la signalisation neuronale, nous avons pu voir précédemment que les « neurotransmetteurs classiques » n'étaient pas uniquement utilisés dans le cadre de communications nerveuses. Ils sont aussi largement utilisés en contexte non neural mettant en jeu une signalisation de type paracrine. Par exemple, l'acétylcholine synthétisée et libérée par les cellules épithéliales des voies respiratoires agit de manière paracrine et autocrine sur les cellules de l'épithélium ainsi que sur les macrophages alvéolaires (Proskocil et al. 2004, Sekhon et al. 2005, Biallas et al. 2007, Mikulski et al. 2007, Kummer et al. 2008). Au niveau des cellules épithéliales, elle entraîne une stimulation de la

prolifération, de la sécrétion de mucus ou encore une augmentation de la fréquence des battements ciliaires (Kummer & Lips 2006, Kummer et al. 2008) alors qu'elle module l'activité pro- ou anti-inflammatoire des macrophages alvéolaires (Sato et al. 1998, Blanchet et al. 2006, Kummer et al. 2008).

De manière remarquable, il est important de noter qu'au niveau du système nerveux central des Mammifères, il a été mis en évidence une communication neuronale de type « diffuse » caractérisée par la libération de neurotransmetteurs au niveau de renflements (varicosités) le long de l'axone sans établissement d'un contact synaptique et par la réception de ce signal au niveau de récepteurs extra-synaptiques de neurones plus ou moins distants (Descarries et al. 1997, Descarries 1998, Descarries & Mechawar 2000, Vizi et al. 2004). Cette communication non synaptique serait impliquée dans la modulation de l'activité des neurones (on parle de neuromodulateur) et a notamment été mise en évidence pour les monoamines (noradrénaline, dopamine, sérotonine - Descarries & Mechawar, 2000). Une libération par exocytose est mise en jeu et les récepteurs extra-synaptiques présentent une forte affinité pour le neurotransmetteur (par rapport aux récepteurs synaptiques ; Vizi et al. 2004). Il existe donc, chez les Mammifères, une communication entre cellules nerveuses, que l'on peut rapprocher de la signalisation paracrine.

Une communication proche du type paracrine mettant en jeu une cellule nerveuse et sa cellule cible (non nerveuse) a aussi été mise en évidence dans le cas de la jonction neuromusculaire des Mammifères. En effet, on sait depuis longtemps que les cellules musculaires synthétisent et libèrent, directement à partir du cytosol (sans stockage dans des vésicules), de l'acétylcholine (Tucek 1982). La découverte de récepteurs muscariniques extrasynaptiques au niveau du motoneurone (avec une affinité beaucoup plus importante que celle des récepteurs nicotiniques localisés au niveau de la synapse neuromusculaire) et leur caractérisation électrophysiologique ont permis de montrer que l'acétylcholine est utilisée comme signal rétrograde au voisinage de la jonction neuromusculaire (Vizi & Labos 1991, Harris et al. 2014). La libération de ce signal par la cellule cible informe alors le neurone de la réponse post-synaptique. Ce même type de communication paracrine entre un neurone et sa cellule cible a été récemment mis en évidence chez *C. elegans* (Chan et al. 2013).

Le scénario proposé pour expliquer le recrutement et l'évolution des neurotransmetteurs, que je viens de présenter, suggère donc que les cellules nerveuses aient recruté un système de communication intercellulaire préexistant et capable de répondre aux contraintes d'une transmission synaptique (rapidité, reflet précis de l'activité du neurone, réponse stéréotypée, caractère transitoire). Dans le contexte de la recherche de l'origine du système nerveux des Métazoaires, on se pose alors la question, pour chaque système de neurotransmission, de son recrutement au niveau des cellules nerveuses, soit une seule fois chez l'ancêtre commun de tous les Eumétazoaires, soit au sein d'un

embranchement uniquement ou encore plusieurs fois indépendamment. Les scénarios peuvent être différents pour chacun des systèmes de neurotransmission.

2.1.2 Transmission(s) et jonction(s) neuromusculaire(s) à l'échelle des Eumétazoaires

On attribue classiquement à l'acétylcholine le rôle de neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire. Ceci pose la question du recrutement et de l'évolution d'un neurotransmetteur en lien avec une fonction physiologique donnée. Je m'intéresse ici à l'évolution de la transmission neuromusculaire et plus largement à la question de l'homologie de la jonction neuromusculaire, pour lesquelles, de nouveau, bon nombre d'idées reçues restent ancrées dans nos esprits.

La transmission neuromusculaire à l'échelle des Métazoaires

L'acétylcholine est souvent considérée comme étant « le » neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire. Les résultats de Moroz et ses collaborateurs (2014) proposant le glutamate comme neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire chez les Cténaires peuvent alors paraître étonnants (et sembler appuyer leur scénario d'origine convergente des neurones). Cette idée est en réalité due à une vision « vertébro-centriste » et si l'on s'intéresse à la transmission neuromusculaire à l'échelle des Bilatériens, on se rend compte que l'acétylcholine n'est pas le seul neurotransmetteur excitateur pouvant être mis en jeu (Figure 2.3).

Chez les Vertébrés, l'acétylcholine est le neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire au niveau des cellules musculaires striées ; cette molécule permet l'excitation et la contraction des cellules musculaires striées. Cependant, on peut noter d'ores et déjà que la situation n'est pas si tranchée puisque en ce qui concerne les muscles lisses, la transmission neuromusculaire peut aussi mettre en jeu la noradrénaline. L'utilisation de l'acétylcholine en tant que neurotransmetteur majeur au niveau de la jonction neuromusculaire a aussi été mise en évidence chez les Céphalocordés (Candiani et al. 2008), les Urochordés (Horie et al. 2009) et les Echinodermes (Bynion 1972, Devlin 2001) et semble donc être conservée à l'échelle des Deutérostomiens. L'acétylcholine est aussi le neurotransmetteur excitateur de la jonction neuromusculaire chez les Annélides (Gardner & Walker, 1982), les Plathelminthes (Nishimura et al. 2010) et les Mollusques (Gerschenfeld, 1973, Nayak 2014). Chez les Nématodes et les Crustacés, l'acétylcholine est bien un neurotransmetteur de la transmission neuromusculaire (Gerschenfeld, 1973, Lingle & Auerbach, 1983a), mais en fonction du type de jonction neuromusculaire (et donc au sein d'une même espèce) ou des espèces, un autre neurotransmetteur peut être mis en jeu : le glutamate chez les Crustacés (Atwood 1976, Kawagoe et al.

1981, Lingle & Auerbach, 1983b) et le GABA chez les Nématodes (Schuske et al. 2004). On peut noter que le GABA en tant que neurotransmetteur excitateur n'est connu que chez les Nématodes. Enfin, chez les Insectes, l'acétylcholine n'est pas utilisée comme neurotransmetteur neuromusculaire et c'est le glutamate uniquement qui joue ce rôle (Usherwood 1967, Osborne 1996).

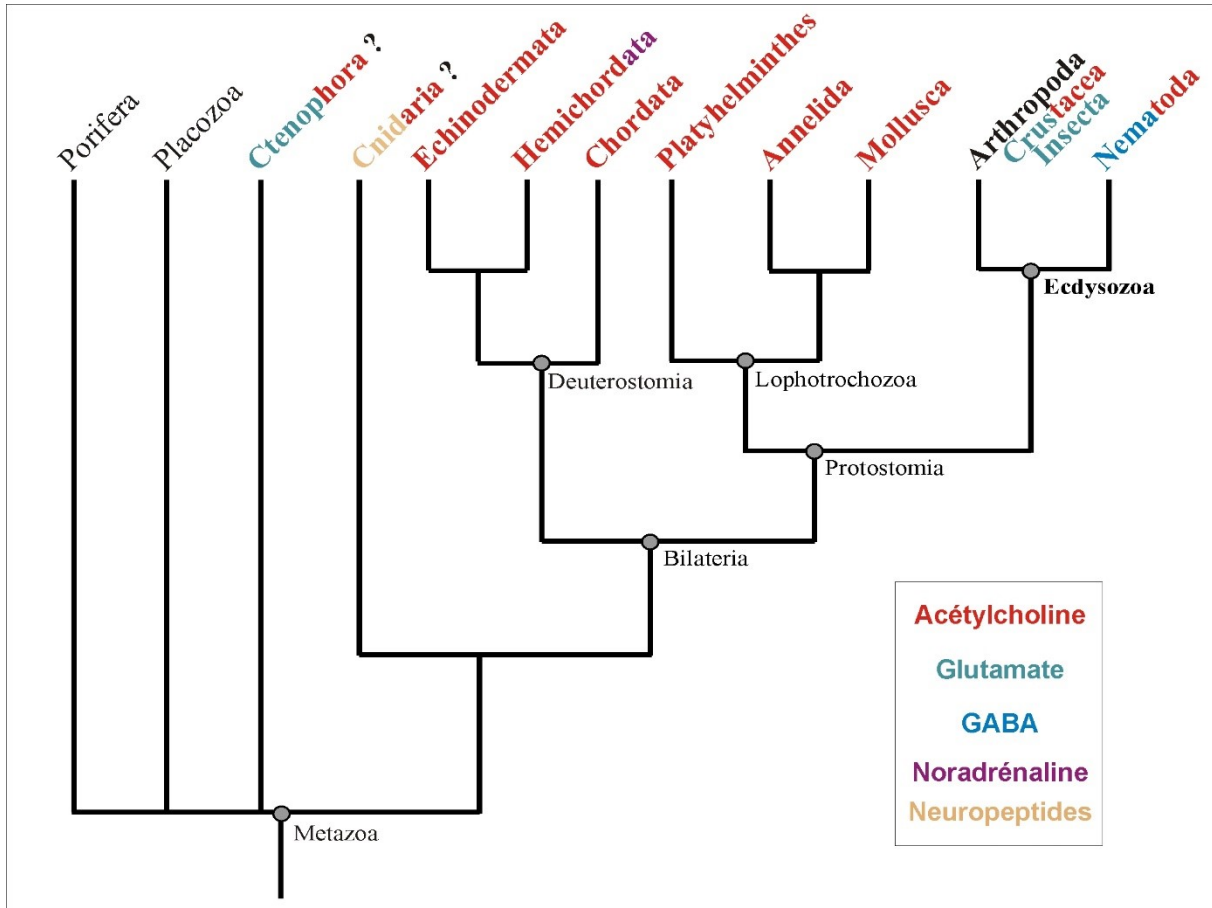


Figure 2.3 Neurotransmetteurs excitateurs de la jonction neuromusculaire à l'échelle des Métazoaires. Sur cet arbre sont présentés, en différentes couleurs, le ou les neurotransmetteurs impliqués dans la contraction musculaire au sein des différents phylums. Les embranchements, sous-embranchements ou classes pour lesquels deux types de neurotransmetteurs sont utilisés sont indiqués en deux couleurs. Un point d'interrogation est indiqué lorsque la situation n'est pas claire.

En dehors des Bilatériens, la question du (ou des) neurotransmetteurs impliqués dans la transmission neuromusculaire reste à résoudre. Chez les Cnidaires, il a été mis en évidence que certains neuropeptides agissaient directement sur la contraction musculaire (peptides FMRFamide-like et peptides de la famille GLWamide – McFarlane et al. 1987, Anctil & Grimmelikhuijzen 1989, Takahashi & Takeda 2015). Cependant, la modification de la fréquence de contraction de la musculature suite à l'emploi d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs de l'acétylcholine (connus chez les Bilatériens) suggère aussi l'implication de l'acétylcholine dans la transmission neuromusculaire (Pierobon 2012). Chez les Cténares, la mise en évidence d'une activité

acétylcholinestérase (enzyme localisée entre autres au niveau de la fente synaptique des jonctions neuromusculaires des Bilatériens, permettant l'hydrolyse de l'acétylcholine et donc son recyclage et le maintien d'une réponse transitoire) au niveau de la jonction neuromusculaire de la mésoglée du Cténaire *Beroe ovata* suggère la nature cholinergique de la transmission (Thèse Hernandez-Nicaise, 1974). Cependant les données récentes qui ont été obtenues chez *Pleurobrachia bachei* suggèrent l'implication d'une transmission glutamatergique et la non-intervention du système cholinergique (Moroz et al. 2014).

L'association d'un neurotransmetteur à la jonction neuromusculaire et à la fonction d'excitation musculaire semble pouvoir se comprendre en partie par la mise en jeu de contraintes anatomiques et physiologiques propres à chacun des phylums. Dans ce contexte, Harris et ses collaborateurs (Harris et al. 2014) proposent que la relative non exposition des jonctions neuromusculaires des Insectes à l'oxygène permette l'utilisation du glutamate comme neurotransmetteur (l'oxygène parvenant directement aux cellules lors de la respiration trachéenne, l'exposition du milieu extracellulaire aux radicaux libres de l'oxygène est limitée). Chez les Mammifères, l'oxygénation des cellules se faisant via le milieu extracellulaire, ceci entraînerait une plus forte oxydation du glutamate et donc une forte toxicité de celui-ci. On peut de plus noter que chez les Mammifères, le glutamate est utilisé en tant que neurotransmetteur au niveau du système nerveux central, protégé en grande partie des substances oxydantes par la barrière hémato-encéphalique (Greenamyre & Porter 1994, Smith 2000). La transmission neuromusculaire apparaît donc comme un système très labile fortement adaptable en fonction des contraintes anatomiques et physiologiques.

Cette forte capacité d'adaptation existe aussi au sein même de l'organisme. Il a ainsi été observé chez l'Homme que lors d'une lésion d'un nerf moteur, il est possible de restaurer chirurgicalement une innervation fonctionnelle du muscle en reconnectant l'extrémité distale du nerf moteur sectionné avec des fibres nerveuses glutamatergiques descendant du système nerveux central (Brunelli et al. 2005, Pizzi 2006, Geuna 2007). En effet, un axone du système nerveux central qui a été sectionné a des capacités de régénération au sein d'un nerf périphérique. On observe alors une croissance des axones et une restauration de l'innervation et de la fonction musculaire. De manière très étonnante, la synapse neuromusculaire devient alors de type glutamatergique, avec mise en place de récepteurs glutamatergiques au niveau de la membrane musculaire, dans la zone de contact synaptique. Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine sont toujours présents au niveau de la jonction synaptique et pourraient être impliqués dans le guidage de l'axone en croissance vers la zone de contact synaptique (Pizzi et al. 2006).

Pour finir, l'association d'un neurotransmetteur neuromusculaire à un embranchement, comme je viens de le présenter (Figure 2.3) est à nuancer et reste vraie si l'on considère qu'il s'agit du neurotransmetteur majeur de la transmission neuromusculaire. En effet, les publications de ces

dernières années montrent que le dogme un neurone/un neurotransmetteur n'est plus si évident et qu'en réalité la transmission synaptique peut être modulée via la synthèse et la libération de plusieurs neurotransmetteurs au niveau d'un seul et même neurone. Ceci est également vrai au niveau de la jonction neuromusculaire. Il a en effet été démontré chez les Vertébrés, que le motoneurone synthétise, en plus de l'acétylcholine, de la dopamine et du GABA (Chan-Palay 1982 – étude chez les Mammifères dont l'homme) et qu'il libère du glutamate en tant que co-transmetteur capable de potentialiser l'excitation médiée par l'acétylcholine (Waerhaug & Ottersen 1993, Fu et al. 1995, Malomouzh et al. 2003).

Incidentement, au vu de l'ensemble de ces données, même s'il était confirmé que l'acétylcholine ne soit pas le neurotransmetteur de la transmission neuromusculaire (ou même qu'elle ne soit pas un neurotransmetteur) chez les Cténaïres, cela n'aurait pas d'incidence sur la question de l'homologie de la cellule nerveuse.

L'innervation neuromusculaire à l'échelle des Eumétazoaires

Les cellules musculaires et les cellules nerveuses sont présentes chez les Cténaïres, les Cnidaires et les Bilatériens. L'existence de jonctions neuromusculaires, c'est-à-dire de synapses chimiques formées par le contact entre l'extrémité axonale d'un motoneurone et la membrane post-synaptique d'une fibre musculaire, est largement démontrée au sein de ces différents clades (Hernandez-Nicaise 1991, Westfall 1996, Gilbert 2013). Associée à la question de l'homologie de chacun de ces deux types cellulaires, s'ajoute alors la question de l'homologie de la jonction neuromusculaire. Cette question n'est que très rarement discutée et l'homologie apparaît souvent comme admise, au moins à l'échelle des Bilatériens.

L'exploration morpho-anatomique de l'innervation musculaire à l'échelle des Deutérostomiens montre que la jonction neuromusculaire telle qu'on la présente communément chez les Vertébrés est en réalité un caractère dérivé (Ruppert 2005) et que l'état ancestral de l'innervation musculaire des Deutérostomiens semble correspondre à une communication via l'apposition d'un épithélium nerveux et d'un épithélium musculaire (séparés par une lame basale), sans mise en jeu de contacts synaptiques, ni de prolongements neuronaux. Ceci a des implications fortes concernant l'homologie de la jonction neuromusculaire à l'échelle des Métazoaires.

La jonction neuromusculaire des Vertébrés

L'organisation ultra-structurale de la jonction neuromusculaire des Vertébrés est bien décrite dans le cas de l'innervation des muscles striés squelettiques et reste le modèle d'organisation de la jonction neuromusculaire (Figure 2.4 A). Cette organisation est en réalité spécifique des Vertébrés (Ruppert 2005). Les motoneurones ont leur corps cellulaire localisé au niveau des noyaux moteurs du tronc cérébral ou de la corne ventrale de la moelle épinière. Ils émettent de longs prolongements (axones) permettant l'innervation des muscles striés via la réalisation de contacts synaptiques. Une cellule musculaire striée est innervée par un seul motoneurone alors qu'un motoneurone peut innover plusieurs cellules musculaires grâce à la ramification de son extrémité terminale. Au niveau de l'extrémité terminale de chaque ramification, l'axone s'arborise à la surface de la cellule musculaire (Figure 2.4 B). Ses fines terminaisons présentent de nombreuses varicosités qui se logent dans des dépressions à la surface de la cellule musculaire et forment alors le contact synaptique. Les membranes plasmiques de l'élément présynaptique et de la cellule musculaire sont étroitement accolées et ne sont séparées que par un espace de 50 nm de diamètre (fente synaptique). L'élément présynaptique est caractérisé par la présence de nombreuses vésicules présynaptiques, de mitochondries pouvant occuper jusqu'à 40% de l'aire de l'extrémité terminale, d'éléments du cytosquelette et de réticulum endoplasmique souvent peu apparents (et s'étendant du corps cellulaire du motoneurone à l'extrémité synaptique) (Figure 2.4 C). La membrane neuronale des extrémités synaptiques présente des spécialisations, denses aux électrons, appelées « zones actives » (annotées dans la Figure 2.4 C), au niveau desquelles on peut observer des vésicules d'exocytoses accolées constituant un pool de vésicules rapidement mobilisables pour la transmission synaptique (Figure 2.4 C). La membrane plasmique de la cellule musculaire présente aussi des spécialisations restreintes aux zones de contacts synaptiques : elle présente des replis, impliqués dans le couplage excitation-contraction de la cellule musculaire. La communication neuromusculaire est donc permise par la mise en jeu de prolongements axoniques spécialisés dans la conduction depuis le système nerveux central (moelle épinière), jusqu'à la cellule musculaire et aboutissant à une zone nettement spécialisée dans la transmission synaptique. Cette régionalisation des prolongements axoniques du motoneurone permet une transmission et un codage très rapide de l'information. L'innervation musculaire est mise en place, au cours du développement embryonnaire, par croissance des axones des motoneurones, depuis le tube neural jusqu'aux myotubes (issus de la fusion de myocytes) (Gilbert 2013). Il existe une mise en place concertée de ces deux types cellulaires avec un développement coordonné au cours du développement embryonnaire (Sanes & Lichtman 2001).

La jonction neuromusculaire des Vertébrés présente donc différentes caractéristiques dont certaines vont nous intéresser plus particulièrement afin de réaliser des comparaisons avec les jonctions neuromusculaires à l'échelle des Métazoaires. Parmi celles-ci, on trouve principalement :

- l'existence d'un contact synaptique, spécialisé morphologiquement et fonctionnellement, entre l'extrémité d'un prolongement axonal et la cellule musculaire,

- une régionalisation de l'axone avec une zone de conduction (axone) et une zone de transmission synaptique restreinte spatialement (extrémité axonale et plaque motrice),
- une source d'excitation « centralisée » (moëlle épinière).

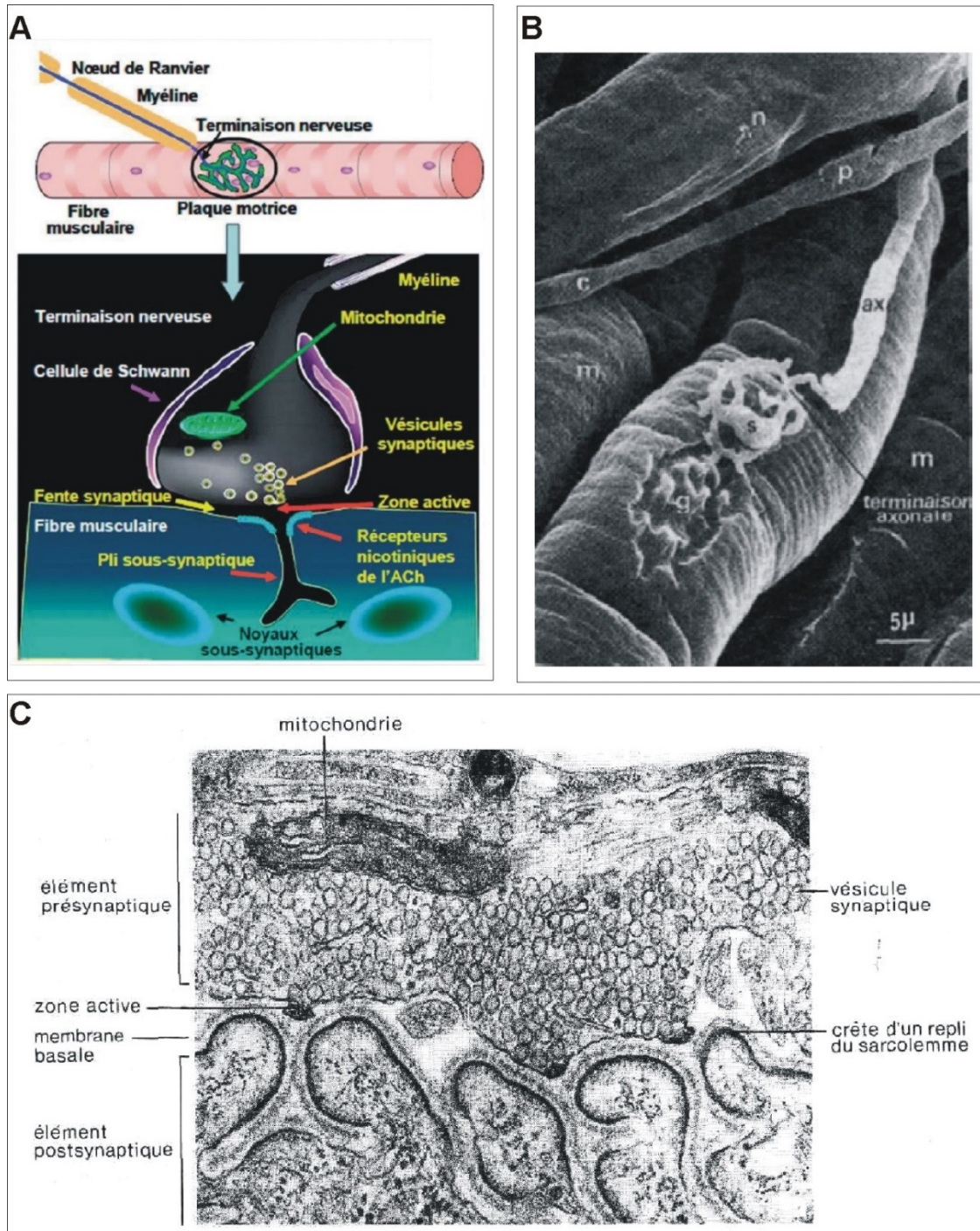


Figure 2.4 La jonction neuromusculaire des Vertébrés. A) Représentation schématique de la jonction neuromusculaire de souris, à partir des données de microscopie optique et électronique selon des coupes réalisées dans l'axe du rameau nerveux et perpendiculaires à la fente synaptique. B) Jonction neuromusculaire de rat en microscopie électronique à balayage (MEB). On y observe l'importante arborisation terminale de l'axone. La partie terminale de l'axone (ax) a été détachée de la cellule musculaire (m) afin de montrer la gouttière synaptique (g) ; c : capillaire sanguin ; n : nerf moteur ; s : noyau de la cellule de Schwann. C) Jonction neuromusculaire de Batracien (en coupe)

observée en microscopie électronique à transmission (MET). Dans la terminaison axonale, on distingue des mitochondries et de très nombreuses vésicules. La membrane plasmique axonale présente des figures d'exocytose. Dans la fente synaptique se situe la membrane basale. La membrane musculaire post-synaptique présente de nombreux replis. A) Molgo et al. (2009), B) D'après Matsuda et al. (1988), C) Image Pécot-Dechavassine.

Comparaison de l'innervation musculaire à l'échelle des Deutérostomiens

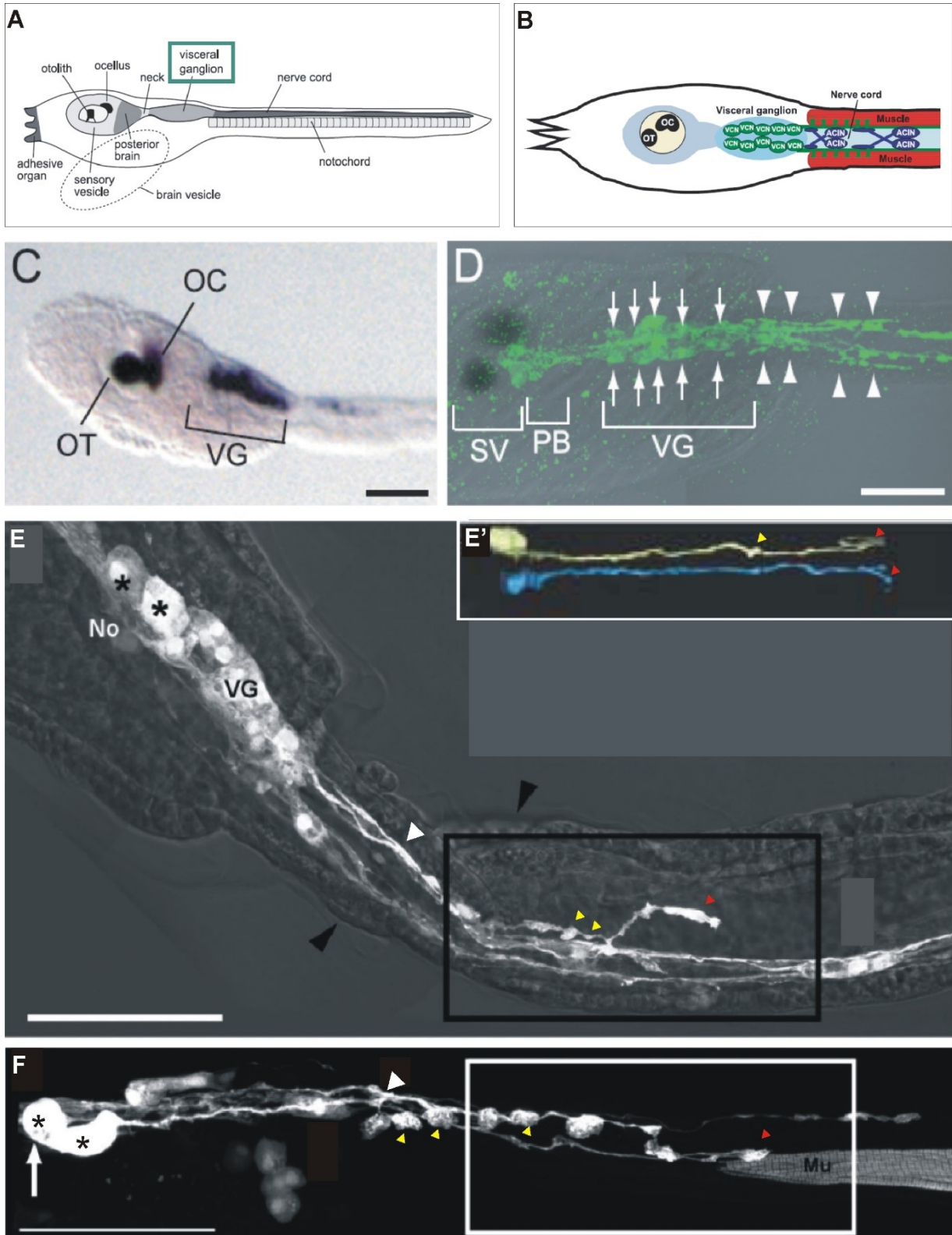
La comparaison des différents types d'innervation musculaire à l'échelle des Deutérostomiens permet de se rendre compte que la jonction neuromusculaire telle qu'on la connaît classiquement est en réalité un caractère dérivé des Vertébrés.

A l'échelle des Chordés, en plus de la jonction neuromusculaire des Vertébrés présentée dans le paragraphe précédent, deux autres types d'innervations musculaires peuvent être observés.

Chez les Urochordés (Figure 2.5), qui sont le groupe-frère des Vertébrés (Delsuc et al. 2006), l'innervation musculaire se réalise aussi via des jonctions neuromusculaires, c'est-à-dire via un contact synaptique entre l'extrémité de projections axonales (provenant du système nerveux central) et les cellules musculaires (Meinertzhagen & Okamura 2001, Imai & Meinertzhagen 2007, Horie et al. 2009). La larve d'ascidie est un bon modèle d'étude pour caractériser les jonctions neuromusculaires mises en jeu (Figure 2.5). Le système nerveux central de la larve d'ascidie, dérivé du tube neural comme chez les Vertébrés, est divisé en trois parties : la vésicule sensorielle antérieure, le ganglion viscéral et le cordon nerveux caudal (Figure 2.5 A - Meinertzhagen & Okamura 2001; Meinertzhagen et al. 2004). Les cellules musculaires sont disposées, en position latérale, selon deux lignes longitudinales (Figure 2.5 A). Chaque ligne est composée de plusieurs rangées de cellules musculaires empilées selon l'axe dorso-

Figure 2.5 La jonction neuromusculaire des Urochordés (chez la larve d'ascidie). A) Représentation schématique du système nerveux central de la larve d'ascidie. La larve d'ascidie possède un tube nerveux dorsal ainsi qu'une notochorde située sous le tube nerveux. Les corps cellulaires des motoneurones sont localisés au niveau du ganglion viscéral (encadré en vert). B) Représentation schématique du système nerveux moteur. Les motoneurones, dont les corps cellulaires sont localisés au sein du ganglion viscéral (VCN – en vert), projettent leurs axones au niveau des cellules musculaires dorsales les plus antérieures. Il existe 5 motoneurones de chaque côté. La musculature est organisée selon deux lignes longitudinales figurées en rouge. C-D) Mise en évidence de la nature cholinergique des motoneurones. Visualisation des neurones cholinergiques à l'aide de l'étude de l'expression (hybridation *in situ*) du gène *CiVACHT* (transporteur vésiculaire de l'acétylcholine) en C) et à l'aide d'un anticorps anti-VACHT en immunofluorescence en D). Les motoneurones du ganglion viscéral (VG) sont marqués. Leurs corps cellulaires sont indiqués par des flèches blanches et le contact entre l'extrémité de leurs prolongements et les cellules musculaires par une tête de flèche blanche. E) Vue dorsale de motoneurones (corps cellulaire dans le ganglion viscéral (VG) indiqués par des étoiles noires). Larve d'ascidie au stade L6 ; les neurones sont GFP positifs et l'image est superposée avec l'image en DIC. Les axones de motoneurones sont indiqués par une tête de flèche blanche. La zone encadrée en noir correspond à l'extrémité des prolongements axonaux où l'on peut voir les différentes varicosités le long de l'axone (têtes de flèches jaunes) ainsi que leur fusion au niveau de l'extrémité de l'axone (tête de flèche rouge). *No* : notochorde, *VG* : ganglion

viscéral. E') Reconstruction 3D d'une paire de motoneurones. F) Innervation des cellules musculaires dorsales les plus antérieures (Mu) par deux motoneurones (corps cellulaires indiqués par les étoiles noires). Image en microscopie à fluorescence, neurones GFP-positifs. Le contact synaptique se fait au niveau de l'extrémité du prolongement axonal du motoneurone (tête de flèche rouge). De nombreuses varicosités sont présentes le long de l'axone (têtes de flèche jaunes). *Mu* : *cellules musculaires*. Echelles : C-D : 20 μm ; E : 50 μm ; F : 25 μm . A-D) Horie et al. (2009), E,F) Imai & Meinertzhagen. (2007), E' : Meinertzhagen & Okamura (2001).



ventral de l'animal (3 chez *Ciona intestinalis*). Les corps cellulaires des motoneurones sont localisés au niveau du ganglion viscéral et projettent leurs axones uniquement au niveau des cellules musculaires dorsales les plus antérieures (Figures 2.5 B,D). La stimulation électrique des autres myocytes se fait via des synapses électriques de type jonction gap permettant un couplage électrique entre les myocytes d'une même ligne (Meinertzhagen & Okamura 2001). La musculature de la larve d'ascidie fonctionne donc sous la forme de deux syncytiums fonctionnels. Le long de l'axone d'un même motoneurone, on peut observer différentes protrusions de morphologies variables (plus ou moins larges), qui fusionnent à l'extrémité de l'axone pour former une large zone de contact synaptique (Figure 2.5 E,E',F – Imai & Meinertzhager 2007). C'est au niveau de cette extrémité que se réalise le contact avec les cellules musculaires (Figure 2.5 F). Contrairement aux motoneurones des Vertébrés, les axones des motoneurones des ascidies ne présentent pas de régionalisation avec une zone spécialisée dans la conduction et une zone spécialisée dans la transmission synaptique. En effet, on observe des boutons synaptiques sur une grande majorité du prolongement axonal (Figure 2.5 E,F).

Chez les Céphalochordés (Figure 2.6), on se rend compte que l'innervation musculaire n'est pas de type « jonction neuromusculaire » mais met en jeu la simple apposition de deux épithéliums (Flood 1966, Flood et al. 1969, Ruppert 2005). L'innervation musculaire est permise par un contact indirect entre la membrane plasmique des cellules nerveuses et celle des cellules musculaires, via une lame basale (Flood et al. 1969, Ruppert 2005). Cette fine barrière permettrait la diffusion du neurotransmetteur, à faible distance et à travers une surface d'échange non spécialisée se rapprochant de la communication de type paracrine. Les motoneurones sont confinés au sein de l'épithélium monostratifié du tube neural (on parle de neuro-épithélium) alors que les fibres musculaires sont localisées au sein de l'épithélium mésodermique sous-jacent (on parle de myoépithélium) (Figure 2.6 A,B). Ces deux épithéliums sont séparés par une fine lame basale (Figure 2.6 C,D). Les cellules musculaires réalisent des projections qui correspondent à des extrémités non contractiles (*muscle tails*, annotés T sur les Figures 2.6 B,C) qui baignent dans la matrice extracellulaire au contact du neuroépithélium (Flood 1966, Guthrie & Banks 1969, Lacalli & Kelly, 1999). Cette organisation unique (avec des *muscle tails*) constituerait une autapomorphie des Céphalochordés (Ruppert 2005). Les motoneurones présents au sein du neuro-épithélium possèdent des prolongements qui parcourent longitudinalement le tube neural (Figure 2.6 B, cadre bleu) et de petites projections collatérales qui présentent une extrémité élargie, au contact de la lame basale, au niveau de laquelle se fait la libération du neurotransmetteur. L'innervation musculaire des Céphalochordés semble donc représenter un cas

intermédiaire entre la communication synaptique localisée et spécialisée et la communication de type paracrine diffuse.

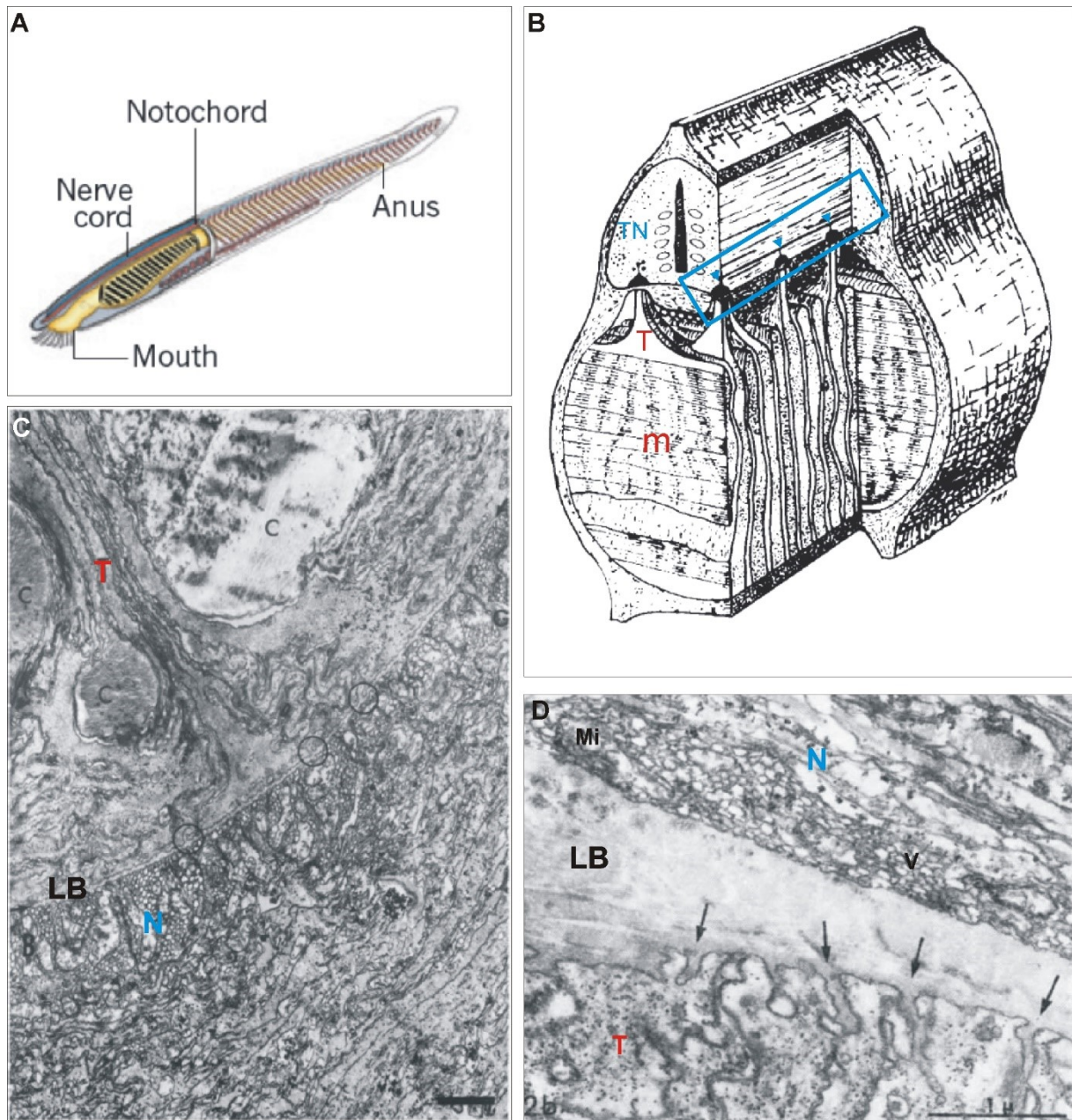


Figure 2.6 L'innervation musculaire des Céphalochordés. A) Représentation schématique de l'amphioxus. Les muscles (en rouge) et le tube nerveux (en bleu) sont localisés à proximité, en position dorsale. B) Schéma d'une coupe transversale d'amphioxus mettant en évidence les relations entre les muscles (m) et le tube nerveux (TN). Les cellules myoépithéliales possèdent des expansions (T: *muscle tails*) qui s'étendent jusqu'au tube nerveux. Les motoneurones parcourent longitudinalement le tube nerveux (encadré bleu) et présentent de petites projections collatérales (têtes de flèches bleues) avec une extrémité élargie au contact de la lame basale. C) Image en MET permettant de visualiser le myoépithélium et le neuroépithélium du tube neural, en coupe transversale (*Branchiostoma lanceolatum*). On peut voir l'extrémité d'une cellule nerveuse (N) du neuroépithélium, l'extrémité d'une expansion musculaire (T) et la lame basale (LB) située entre les deux épithéliums. C : *fibres de collagène*. D) Grossissement au niveau de la zone d'échange entre le neuroépithélium (N) et le myoépithélium (T). On peut noter la présence de vésicules (v) au niveau des

extrémités des projections latérales des neurones. Les flèches noires indiquent les petites invaginations présentes au niveau des expansions des cellules musculaires (T : *muscle tails*). LB : *lame basale*, M : *cellule musculaire myoépithéliale*, Mi : *mitochondrie*, N : *neurone du neuroépithélium*, T : *muscle tail*. Echelles : C) x15000, D) 20 000. A) Lowe et al. (2015), B,D) Flood (1969), C) Flood (1970).

Une innervation musculaire mettant en jeu l'apposition de deux épithéliums séparés par une matrice extracellulaire est aussi observée chez les Echinodermes (Figure 2.7 - Florey & Cahill 1977) et les Hémichordés (Figure 2.8 - Ptérobranchés, Dilly, 1972, Ruppert 1997). Au sein de ces embranchements par contre, aucune spécialisation spatiale ni morphologique n'est observée. L'innervation musculaire se fait via une communication de type paracrine. Ceci laisse penser que cet arrangement de la communication neuromusculaire soit représentatif de l'organisation primitive de l'innervation musculaire chez l'ancêtre commun des Deutérostomiens. Le remplacement d'une musculature myoépithéliale par une musculature d'origine mésenchymateuse, et la mise en place d'une innervation musculaire de type jonction neuromusculaire (avec contact synaptique) seraient des synapomorphies du clade Olfactores (Urochordés + Vertébrés) d'après Ruppert et al. 2005.

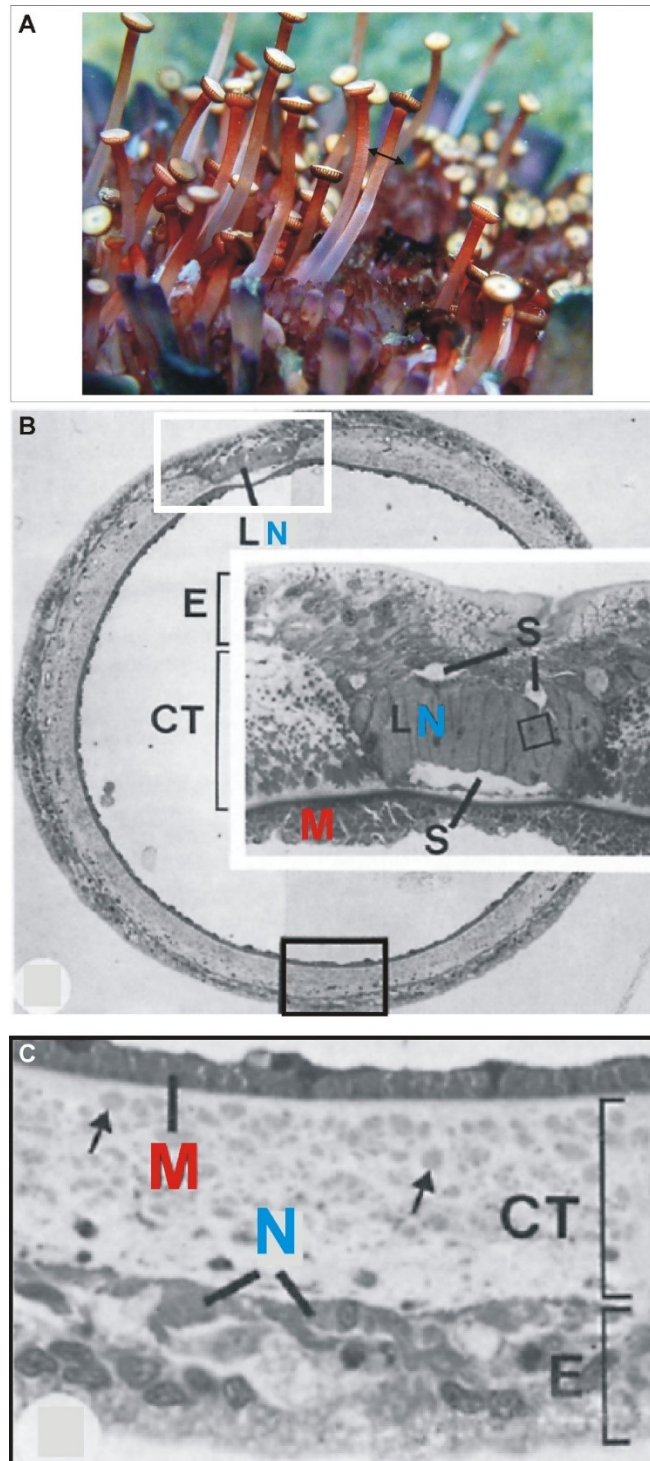


Figure 2.7 L'innervation musculaire des Echinodermes. A) Pieds ambulacraires d'oursin. B) Coupe transversale d'un pied ambulacraire d'*Echinus esculentus* (trait de coupe figuré en A) montrant l'organisation générale des tissus. Insert : Grossissement de la zone encadrée en blanc où l'on peut voir les cellules nerveuses orientées longitudinalement par rapport à l'axe du pied ambulacraire au sein du neuroépithélium (LN), ainsi que le myoépithélium localisé en position interne (M). C) Grossissement de la zone encadrée en noir en B) où l'on peut voir la surface d'échange (CT) entre le neuroépithélium (E) composé de cellules nerveuses (N) et le myoépithélium (M). *CT* : matrice extracellulaire séparant les deux épithéliums, *E* : neuroépithélium, *LN* : neurones longitudinaux neuroépithéliaux, *M* : cellules musculaires du myoépithélium. Echelles : B : x150 ; Insert en B : x370 ; C : x800. A) Image Sébastien Vasquez, B-C) Florey & Cahill (1977).

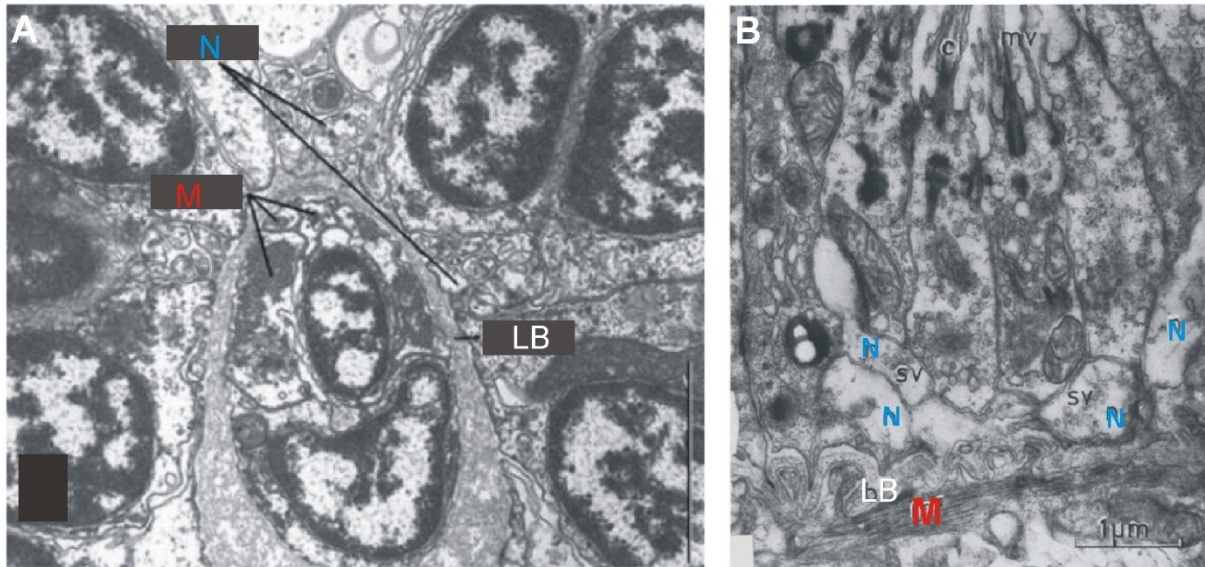


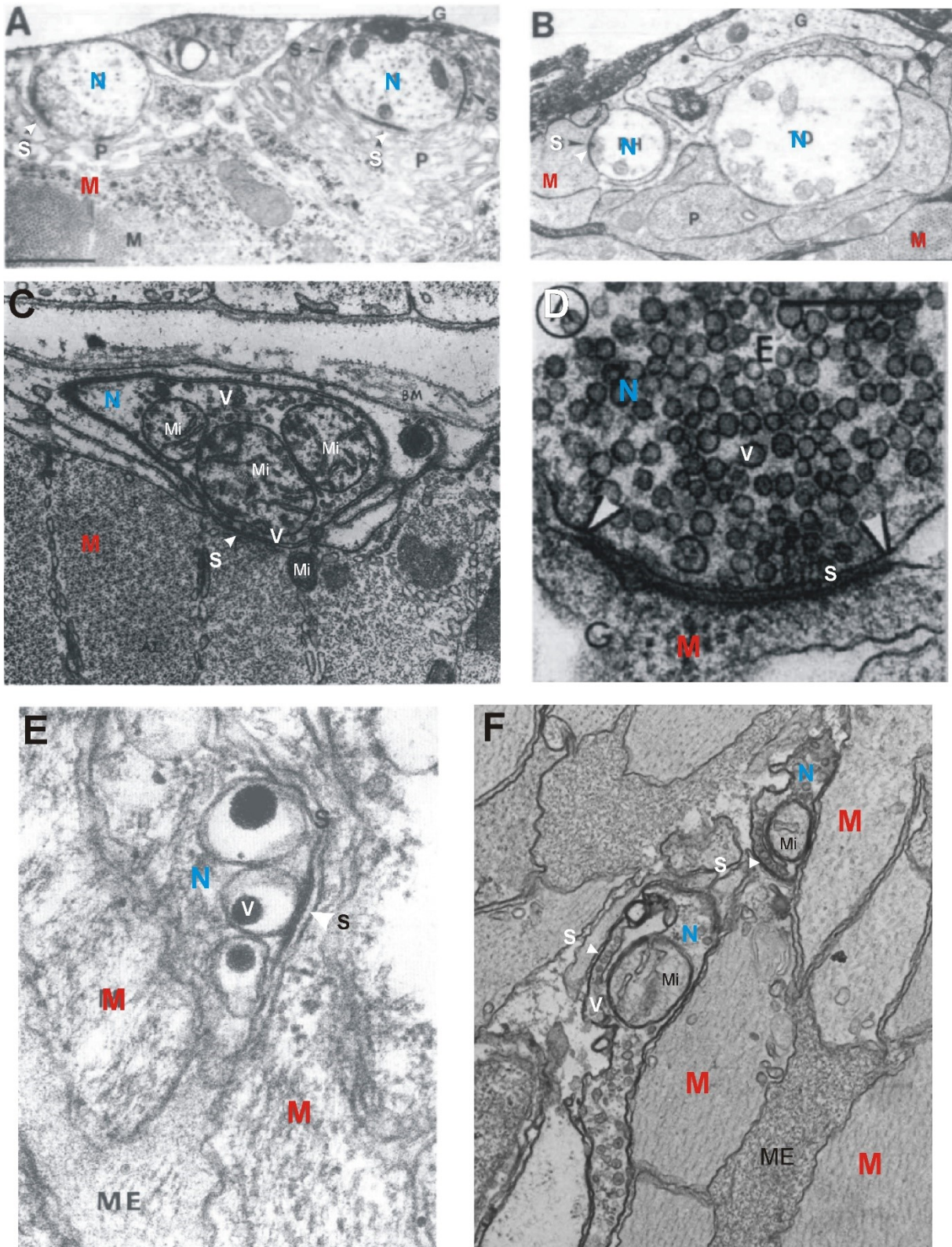
Figure 2.8 L'innervation musculaire des Hémichordés. A) Coupe transversale au niveau d'un tentacule de *Cephalodiscus gracilis* où l'on peut voir la zone d'échange (LB) entre le neuroépithélium composé de cellules nerveuses (N) et le myoépithélium composé de cellules musculaires (M). B) Grossissement au niveau de la zone d'échange (LB) entre le neuroépithélium (N) et le myoépithélium (M) du tentacule de *Rhabdopleura compacta*. On peut y observer la présence de vésicules au niveau des cellules nerveuses (sv). LB : lame basale. Echelles : A) 2 μm , 1 μm . A) Ruppert (2005), B) Dilly (1972).

Hypothèses à l'échelle des Métazoaires

Si l'on s'intéresse maintenant à l'innervation musculaire en dehors des Deutérostomiens, on se rend compte que l'innervation de type « jonction neuromusculaire » est largement répandue chez les Protostomiens (Figure 2.9 A-D - Atwood & Cooper 1995, Wolf 2014, Satterlie 2015), les Cnidaires (Figure 2.9 E - Westfall 1996, Satterlie 2002, Satterlie 2015) et chez les Cténares (Figure 2.9 F – Hernandez-Nicaise 1991, Jager et al. 2011a).

Figure 2.9 Mise en évidence de jonctions neuromusculaires au sein des Protostomiens (A-D), des Cnidaires (E) et des Cténares (F) en MET. On peut voir sur ces images l'extrémité des axones des motoneurones (N) réaliser des contacts synaptiques spécialisés (S) avec des cellules musculaires (M). A) Jonctions neuromusculaires au niveau du muscle 6 de la larve de *Drosophila*. La zone de contact synaptique est indiquée par un S. B) Jonctions neuromusculaires chez l'Ecrevisse. C) Grossissement au niveau d'une jonction neuromusculaire de criquet. D) Jonction neuromusculaire chez l'Ecrevisse. Les têtes de flèches blanches indiquent les limites de la membrane présynaptique. E) Grossissement au niveau d'une jonction neuromusculaire au niveau du tentacule de *Pelmatohydra pseudoligactis* (Cnidaire). La zone de contact synaptique est indiquée par une tête de flèche blanche. ME : mésoglée. F) Jonctions neuromusculaires au niveau du tentacule de *Pleurobrachia pileus*. Deux synapses sont visibles. Les zones de contact synaptique sont indiquées par un S et une tête de flèche blanche. Ces deux synapses présentent une organisation typique en triade synaptique avec les 3 éléments : mitochondrie, réticulum endoplasmique, couche de vésicules de neurotransmetteurs. N : Extrémités des motoneurones, M : cellule musculaire, ME : mésoglée, Mi : mitochondrie, S : synapse, V :

vésicules Echelles : D : 0,25 μm ; E : x82100. A-B) Atwood & Cooper (1995), C) Usherwood (1967)
 E) Westfall (1996), F) Image Cyrielle Dayraud.



De nombreux exemples à l'échelle des Protostomiens montrent la mise en jeu de motoneurones émettant des prolongements axonaux depuis une zone centralisée (unique source d'excitation) à distance des muscles innervés et présentant une différenciation à leur extrémité spécialisée dans la transmission synaptique (Usherwood 1967, Kohsaka et al. 2012, Satterlie 2015). Je vais prendre ici l'exemple de la larve de drosophile (Figure 2.10 - Kohsaka et al. 2012). L'innervation de la musculature des différents segments abdominaux de la larve se fait via la projection d'axones issus de corps cellulaires localisés au sein de la chaîne nerveuse ventrale (Figure 2.10 A). Chaque muscle consiste en une seule cellule multi-nucléée, issue de la fusion de myoblastes et diffère donc des muscles des Vertébrés (qui consistent en de nombreuses fibres musculaires accolées entre elles). Une cellule musculaire peut être innervée par un ou plusieurs motoneurones. Une cartographie précise de l'innervation musculaire de la larve de drosophile a été réalisée (Landgraf et al. 1997). Les muscles d'un même héli-segment abdominal sont innervés par des motoneurones ayant leurs corps cellulaires localisés dans la même zone de la chaîne

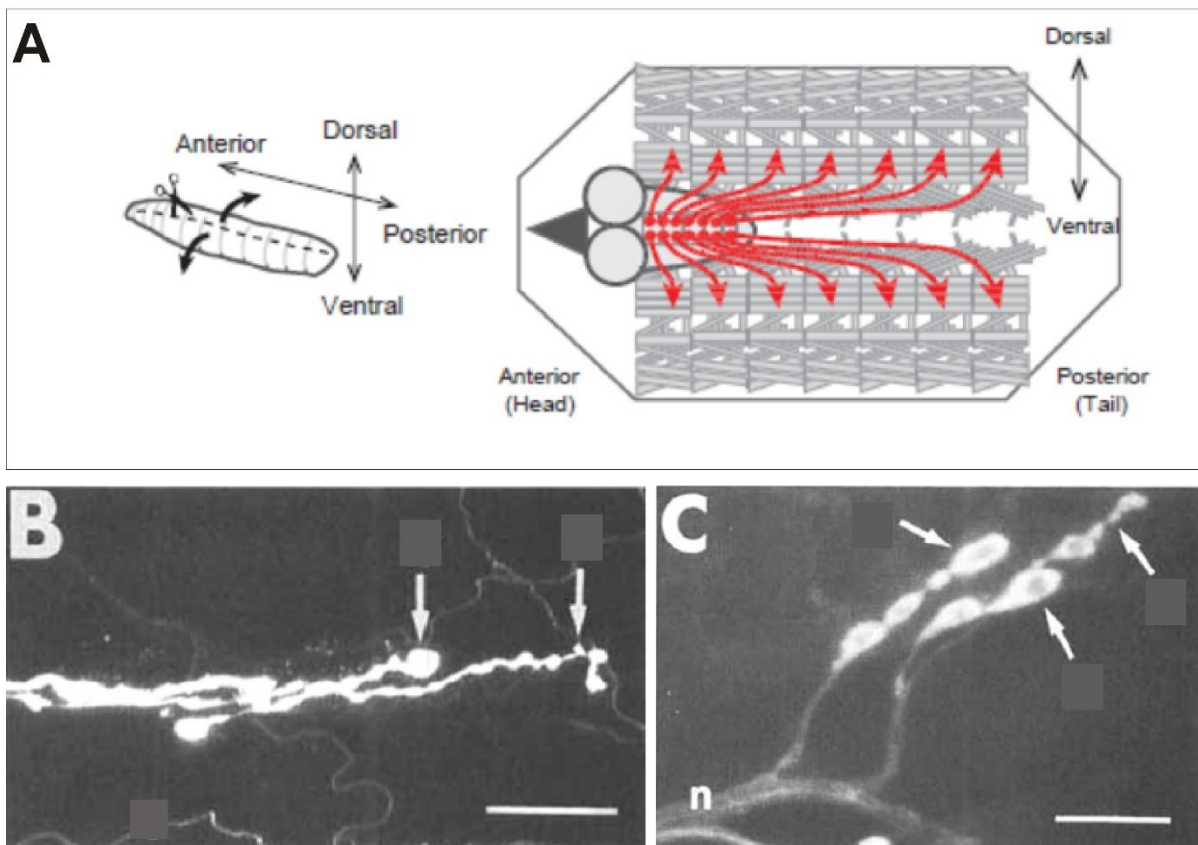


Figure 2.10 Détails de l'innervation musculaire de la larve de *Drosophile*. A) Schéma de l'innervation de la musculature par des motoneurones dont les corps cellulaires sont localisés au sein de la chaîne nerveuse ventrale. B-C) Extrémités des prolongements axonaux des motoneurones (Immunofluorescence anti-HRP, microscopie confocale) se connectant au niveau de cellules

musculaires. Les extrémités sont renflées et possèdent de nombreux boutons synaptiques ; elles sont indiquées par des flèches. Echelles : B : 25 μm ; C : 10 μm . A) Kohsaka et al. (2012), B-C) Atwood et al. (1993).

nerveuse ventrale. A l'extrémité du prolongement axonal, on observe une zone spécialisée dans la transmission synaptique avec de nombreux boutons synaptiques plus ou moins restreints à la région terminale en fonction du type de motoneurones (Figure 2.10 B,C – Atwood et al. 1993). Il a été démontré que la reconnaissance entre un motoneurone précis et la cellule musculaire cible, ainsi que la spécialisation des membranes pré- et post-synaptiques se font de manière concertée et stéréotypée, au cours du développement. De nombreuses interactions chimiques, attractives et/ou répulsives (Kurusu et al. 2008), ainsi que des reconnaissances « physiques » et moléculaires via la différenciation des membranes pré- et post- synaptiques en de nombreux filopodes, permettent la mise en place de la jonction neuromusculaire (Kohsaka et al. 2007; Kohsaka & Nose 2009). On retrouve donc, comme chez les Vertébrés, un développement coordonné des cellules nerveuses et musculaires indispensable à la mise en place de la jonction neuromusculaire.

Le cas des Nématodes est par contre très étonnant. L'innervation musculaire se réalise via des synapses entre cellule nerveuse et cellule musculaire mais ce sont les cellules musculaires qui émettent des prolongements (non contractiles) permettant le contact avec les corps cellulaires des motoneurones et la mise en place des synapses (Figure 2.11 – Wright 1991). Les motoneurones n'ont pas d'axone mais présentent au niveau de leur membrane plasmique une zone de contact synaptique spécialisée (Figure 2.11 C, flèches blanches). Les prolongements des cellules musculaires se ramifient à proximité des cellules nerveuses de sorte que chaque cellule musculaire reçoit plusieurs afférences synaptiques. Ce mode d'innervation, qu'on le qualifie de « jonction neuromusculaire » ou non, présente donc des caractéristiques bien différentes de celles des Vertébrés.

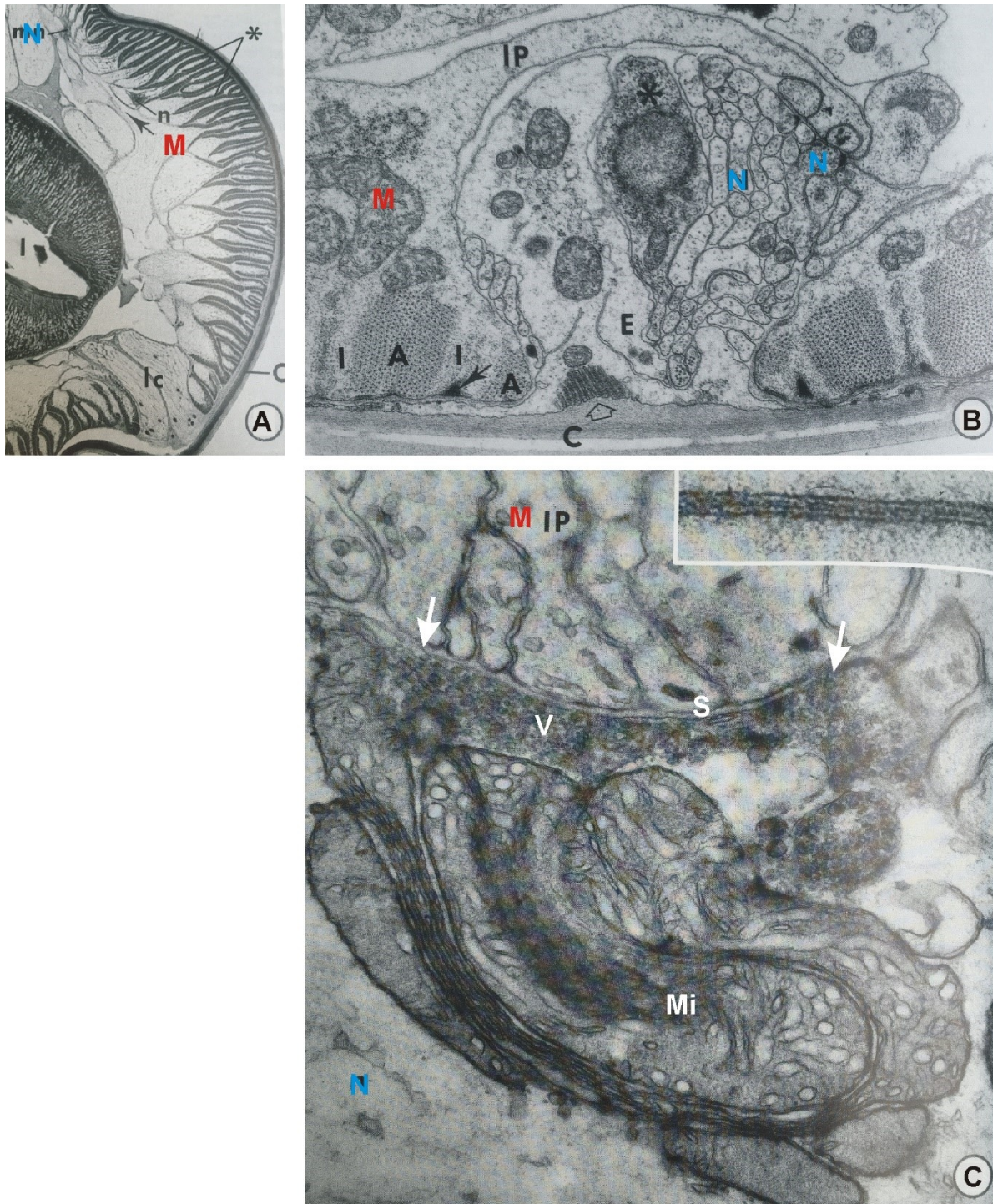


Figure 2.11 L'innervation musculaire des Nématodes. A) Coupe transversale au niveau du corps de *Toxascaris* où l'on peut voir la musculature (M) au niveau externe, sous l'épiderme. Les myofibrilles des cellules musculaires sont marquées en noir (étoile noire). On peut observer le prolongement non contractile d'une cellule musculaire (flèche noire) qui se projette au niveau d'une cellule nerveuse (N). B) Coupe transversale au niveau du cordon nerveux ventral de *Caenorhabditis* où l'on peut voir le prolongement (IP) d'une cellule musculaire (M) allant au contact des cellules nerveuses (N) du cordon nerveux. C) Synapse (S) entre un neurone (N) et les prolongements (IP) de cellules musculaires (M) chez *Ascaris*. Les limites de la zone de contact synaptique sont indiquées par des flèches blanches. En haut : jonctions gap entre les membranes plasmiques des prolongements des muscles. *Mi* : mitochondrie, *v* : vésicules. Echelles : A : x30 ; B : x 28 000, C : x 190 000. A-C) Wright (1991).

On observe aussi des jonctions neuromusculaires chez les Cnidaires (Figure 2.9 E) et chez les Cténares (Figure 2.9 F). Chez les Cnidaires, elles ont été principalement étudiées chez les Cuboméduses et les Scyphoméduses chez lesquelles les cellules musculaires striées sont innervées individuellement via un réseau nerveux diffus. Les cellules nerveuses envoient leurs prolongements (neurites) vers les cellules musculaires. Un seul neurite peut réaliser des contacts synaptiques avec plusieurs cellules musculaires (Satterlie 2002, Satterlie 2015) et ces contacts synaptiques se réalisent à différents endroits le long du neurite. Conduction et transmission synaptiques ne sont donc pas régionalisées. On peut émettre l'hypothèse que cette absence de régionalisation soit liée à l'organisation de l'innervation motrice sous la forme d'un réseau nerveux diffus. Cependant, il semble que chez d'autres Cnidaires des motoneurones ne présentant qu'une dilatation terminale en contact avec une cellule musculaire soient aussi présents (Westfall 1996 – les espèces concernées ne sont pas précisées). Chez les Cténares, l'innervation des cellules musculaires se réalise, comme chez les Cnidaires, grâce à un réseau nerveux, via des prolongements des cellules nerveuses et des synapses. La structure de la jonction neuromusculaire est surtout documentée en microscopie électronique à transmission (Hernandez-Nicaise 1991, Thèse Cyrielle Dayraud 2011) et les données en microscopie à fluorescence sont peu nombreuses (Jager et al. 2011a). On retrouve, au niveau pré-synaptique, une organisation en triade, spécifique des synapses des Cténares (Figure 2.9 F). Il est important ici de noter que les jonctions neuromusculaires qui ont été étudiées présentent une différenciation (dilatation) uniquement au niveau de l'extrémité terminale du neurite, zone de contact avec la cellule musculaire et que le neurite semble donc être régionalisé (Thèse Hernandez-Nicaise 1974, Hernandez-Nicaise 1991).

L'innervation musculaire de type « jonction neuromusculaire » est donc largement répandue à l'échelle des Métazoaires et présente des spécificités en fonction des embranchements. La réalisation d'une optimisation du caractère « absence/présence de jonction neuromusculaire » selon le critère de parcimonie (Figure 2.12) ne permet pas de trancher entre l'homologie et la convergence pour les jonctions neuromusculaires présentes respectivement chez le clade « Urochordés + Vertébrés », chez les Protostomiens, et chez les Cnidaires et chez les Cténares. De plus, l'innervation selon l'apposition d'un neuroépithélium et d'un myoépithélium chez les Echinodermes et les Hémichordés, et la situation « intermédiaire » des Céphalochordés suggèrent fortement que la communication paracrine soit l'état ancestral de l'innervation musculaire des Deutérostomiens et que la jonction neuromusculaire des Vertébrés et des Urochordés soit un caractère dérivé. Ceci implique que les jonctions neuromusculaires ne sont pas des structures homologues à l'échelle des Bilatériens. Ces structures semblent avoir émergé de contraintes morpho-anatomiques en lien étroit avec l'organisation du système nerveux et de la musculature qui semblent avoir évolué de manière parallèle et concertée. La coordination et la communication très étroites entre ces deux types cellulaires sont d'ailleurs reflétées par les mécanismes mis en jeu lors de l'établissement de la jonction neuromusculaire, au cours du

développement embryonnaire, mis en évidence chez les Vertébrés et la *Drosophila* (Sanes & Lichtman 2001, Kohsaka 2012).

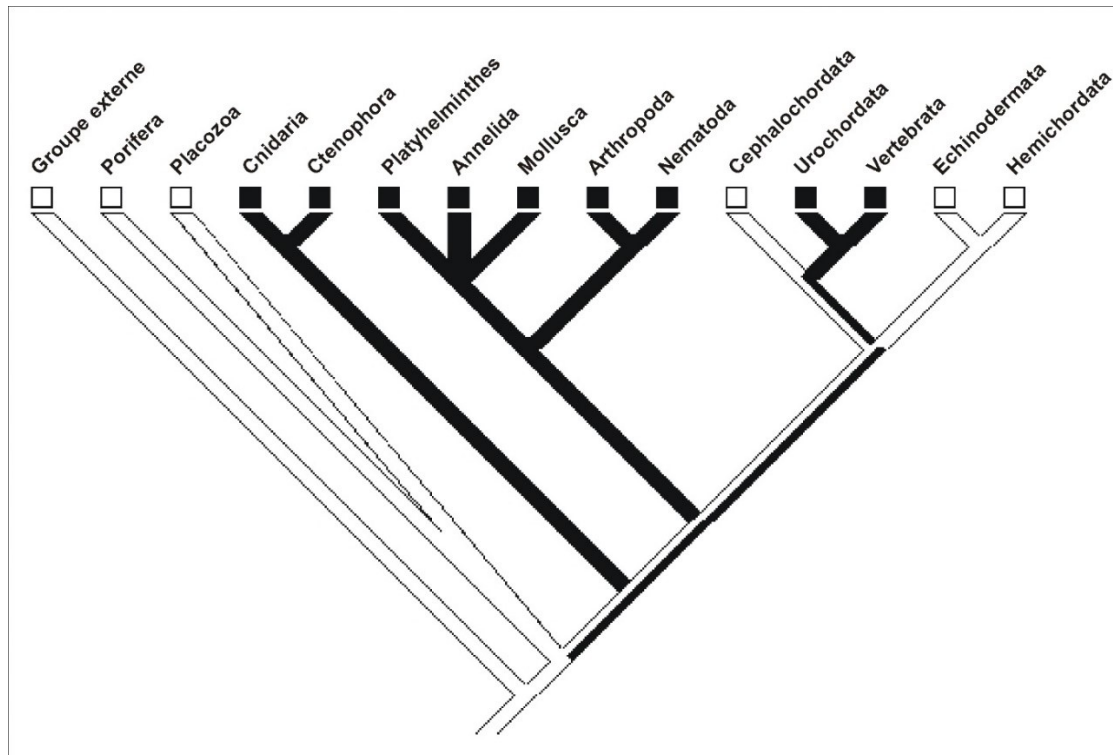


Figure 2.12 Optimisation du caractère "absence / présence de jonction neuromusculaire" réalisée avec Mesquite v. 2.74 selon le critère de parcimonie, sur une phylogénie des Métazoaires correspondant, pour les Bilateria, à un consensus des études phylogénomiques des dix dernières années, et en dehors des Bilateria, à l'hypothèse de monophylie des Eumétazoaires et des Coelentérés. Les carrés blancs indiquent l'absence de jonction neuromusculaire chez les taxons correspondants, et les carrés noirs la présence. Les branches bicolores sont ambiguës (les deux états sont équiparcimonieux). Ainsi cette optimisation ne permet pas de trancher entre homologie et convergence pour les jonctions neuromusculaires présentes respectivement chez le clade Urochordés + Vertébrés, chez les Protostomiens, et chez les Cnidaires et Cténares.

2.1.3 Précisions concernant les cellules musculaires des Cténares : excitabilité et couplage excitation-contraction

L'excitabilité d'une cellule musculaire constitue l'une des caractéristiques essentielles de la physiologie de ce type cellulaire. Suite à sa stimulation, le couplage excitation-contraction permet la réponse de la cellule cible. Les propriétés d'excitabilité des cellules musculaires ainsi que le mécanisme moléculaire à la base de ce couplage ont largement été étudiés chez les Bilatériens (avec mise en jeu de calcium exogène et parfois endogène). Les études chez les Cnidaires (Lin & Spencer 2001) et les Cténares (Hernandez-Nicaise 1984, Thèse Chrystelle Cario-Toumaniantz 1996) sont plus

rare mais mettent en évidence l'excitabilité ainsi qu'un couplage de nature calcique (origine extracellulaire et parfois intracellulaire). La question de l'acétylcholine en tant que messager de la contraction musculaire chez les Cténaïres étant l'une des questions centrales de ma thèse, il est important de faire un état des lieux de la physiologie et de l'excitabilité de ces cellules.

Les caractéristiques de l'excitabilité des cellules musculaires de Cténaïres ont été principalement étudiées chez *Mnemiopsis* et *Beroe*, qui ont la particularité de posséder des fibres musculaires géantes au niveau de la mésoglée, facilitant ainsi l'expérimentation (Figure 2.13) (Hernandez-Nicaise 1984). Les expériences ont été réalisées sur des cellules musculaires isolées grâce à une dissociation enzymatique. La viabilité des cellules musculaires isolées a d'abord été testée (Nicaise et al. 1982, Hernandez-Nicaise et al. 1982) : leur contraction peut être observée suite à une stimulation mécanique ou chimique (figure 2.13 A-C) (Nicaise et al. 1982, Thèse Chrystelle Cario-Toumaniantz 1996) et leur organisation générale, ainsi que membranaire et intracellulaire, ne diffèrent pas de celle observée au sein de tissus intacts (Hernandez-Nicaise & Amsellem 1980, G. Nicaise et al. 1982).

L'enregistrement des courants ioniques membranaires (voltage-clamp et patch-clamp) sur cellules isolées a permis de mettre en évidence la génération et la propagation de trains de potentiels d'actions suite à une stimulation (Figure 2.13 D). De plus, il est important de préciser que la contraction et la dépolarisation membranaire sont strictement dépendantes de la présence de calcium dans le milieu extracellulaire et qu'elles peuvent être déclenchées par l'application de fortes concentrations en potassium (solution hyperosmotique KCl 100 mM) ou par l'injection d'un courant dépolarisant à l'origine de la genèse de potentiels d'actions. Ces résultats attestent donc de l'excitabilité des cellules musculaires de Cténaïres.

En ce qui concerne le couplage excitation-contraction, l'implication de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire a été démontrée grâce à la mise en œuvre de techniques d'imagerie calcique. Ces expériences n'ont été réalisées que chez *Beroe ovata* (Thèse Chrystelle Cario-Toumaniantz 1996). L'imagerie calcique étant une des techniques que j'ai pu mettre en place chez *Pleurobrachia pileus* afin d'étudier les réponses des cellules musculaires de l'appareil tentaculaire, je vais présenter ici quelques-uns des résultats obtenus chez *Beroe ovata* afin de pouvoir les comparer et aider à l'interprétation de ceux obtenus chez notre modèle.

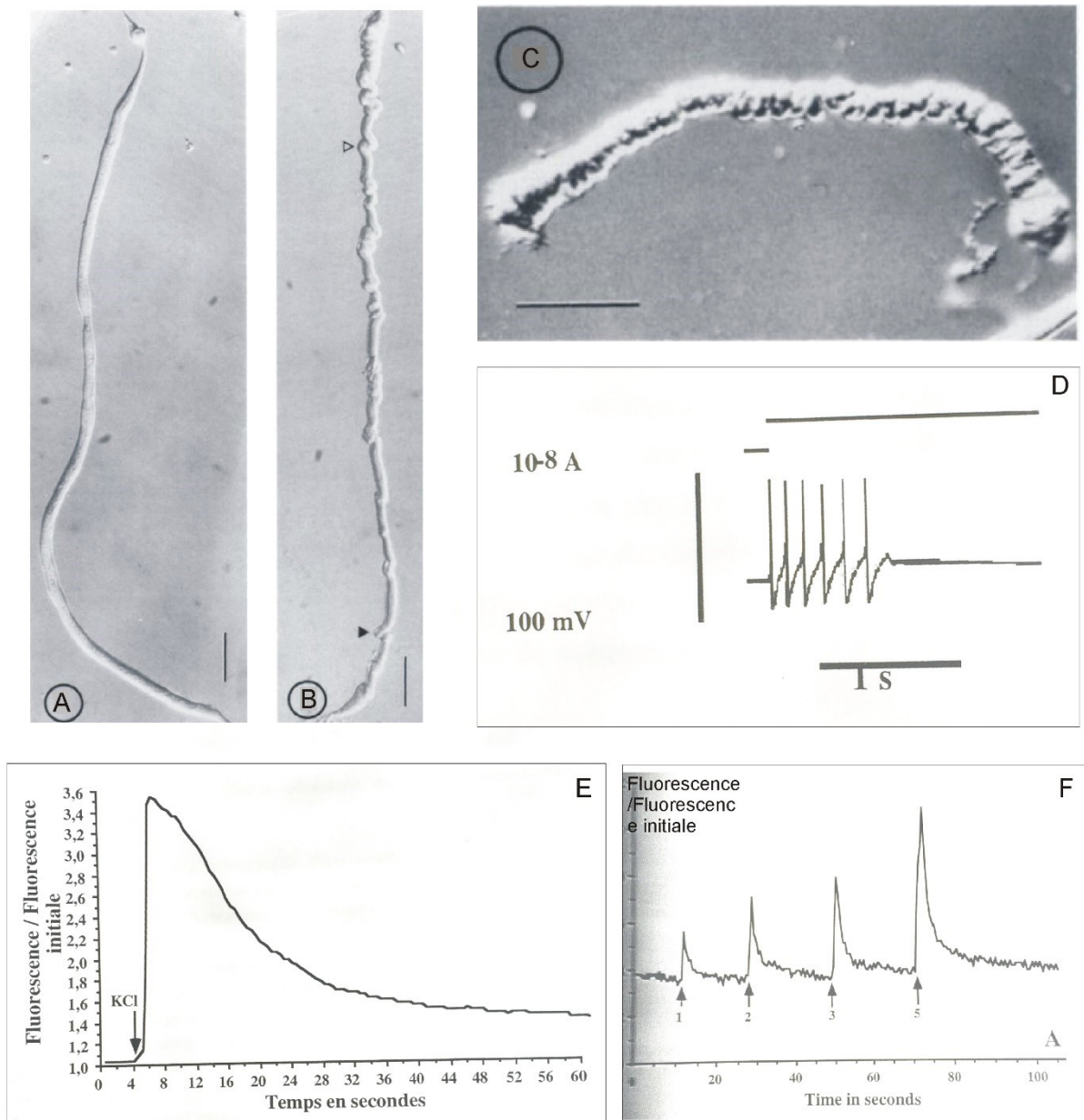


Figure 2.13 Morphologie et excitabilité de cellules musculaires isolées de Cténaires. A-C) Cellules musculaires isolées de *Mnemiopsis* (fibres musculaires longitudinales). Images Nomarski. A) Cellule musculaire détendue. B) Cellule musculaire en partie contractée. On peut observer de petits enroulements de la cellule (têtes de flèches). C) Cellule musculaire complètement contractée. D) Train de potentiels d’actions enregistré au niveau d’une fibre musculaire lisse longitudinale de *Beroe ovata*, à la suite d’une longue stimulation dépolarisante. E) Effet de l’application localisée d’eau de mer artificielle hyperpotassique (100 mM) sur l’intensité de fluorescence d’une cellule musculaire lisse longitudinale de *Beroe ovata*, chargée en Fluo-3AM. La variation de fluorescence normalisée reflète les variations de la concentration calcique intracellulaire. Expérience de voltage-clamp. F) Effets de stimulations électriques répétées (1 à 5) sur l’intensité de fluorescence d’une cellule musculaire lisse longitudinale chargée en Fluo-3AM. Le retour à une intensité de fluorescence de base est de plus en plus long (5 secondes après la première stimulation, 15 à 20 secondes après la 5^{ème}). La variation de fluorescence normalisée reflète les variations de la concentration calcique intracellulaire. Echelles : A-C : 100 μ m. A-C) Hernandez-Nicaise et al. 1984. D) Bilbault et al. (1988) E-F) Thèse Chrystelle Cario-Toumaniantz (1996).

La technique d'imagerie calcique consiste en l'utilisation de sondes fluorescentes (sondes calciques) dont la fluorescence est proportionnelle à la concentration calcique. Les sondes qui ont été utilisées chez *Beroe ovata* sont les sondes Fura2AM et Fluo3AM alors que chez *Pleurobrachia pileus*, j'ai utilisé une sonde « dernière génération » Fluo4AM, connue pour être plus stable et limitant le photobleaching (Gee et al. 2000). Ces trois sondes ont la particularité de porter une queue AM (acétométhylester) qui les rend insensibles au calcium et perméantes, c'est-à-dire capables de franchir la membrane plasmique. Une fois dans le cytoplasme, le groupement AM est hydrolysé par les estérases endogènes, libérant ainsi la forme active de la sonde, séquestrée au niveau intracellulaire, qui devient ainsi sensible au calcium.

Les expériences chez *Beroe ovata* montrent que l'application d'une eau de mer artificielle hyperosmotique (KCl 100 mM) entraîne bien une élévation transitoire de la concentration calcique intracellulaire. Cette réponse est mise en évidence par l'augmentation de l'intensité de fluorescence de la sonde calcique (Figure 2.13 E). Ce type de réponse, qui sera vérifié chez *Pleurobrachia pileus*, met en évidence que la cellule est vivante, excitable et que son excitation est relayée par la mise en jeu d'influx calciques.

La stimulation électrique de la cellule entraîne aussi une augmentation du calcium intracellulaire. On observe une augmentation de la concentration calcique intracellulaire lors de stimulations électriques répétées, le retour à une concentration calcique de base étant de plus en plus long (5 secondes après la première stimulation, 15 à 20 secondes après la 5ème - Figure 2.13 F). Enfin, il est important de préciser que l'on peut observer une hétérogénéité dans l'organisation spatiale du calcium intracellulaire. La fluorescence et donc le calcium semblent séquestrés au niveau de sous-domaines de la cellule musculaire (Figure 2.14 A,B), peut-être au niveau du réticulum endoplasmique ou des mitochondries (Hernandez-Nicaise et al. 1980). La variation de la fluorescence intracellulaire, suite à un stimulus, n'est donc pas uniformément distribuée à travers la fibre. Lorsque l'on mesure cette intensité au niveau de différents sous-domaines, on peut observer des réponses différentes en fonction des régions (Figure 2.14 C) : en terme d'intensité, de latence et de retour à la normale.

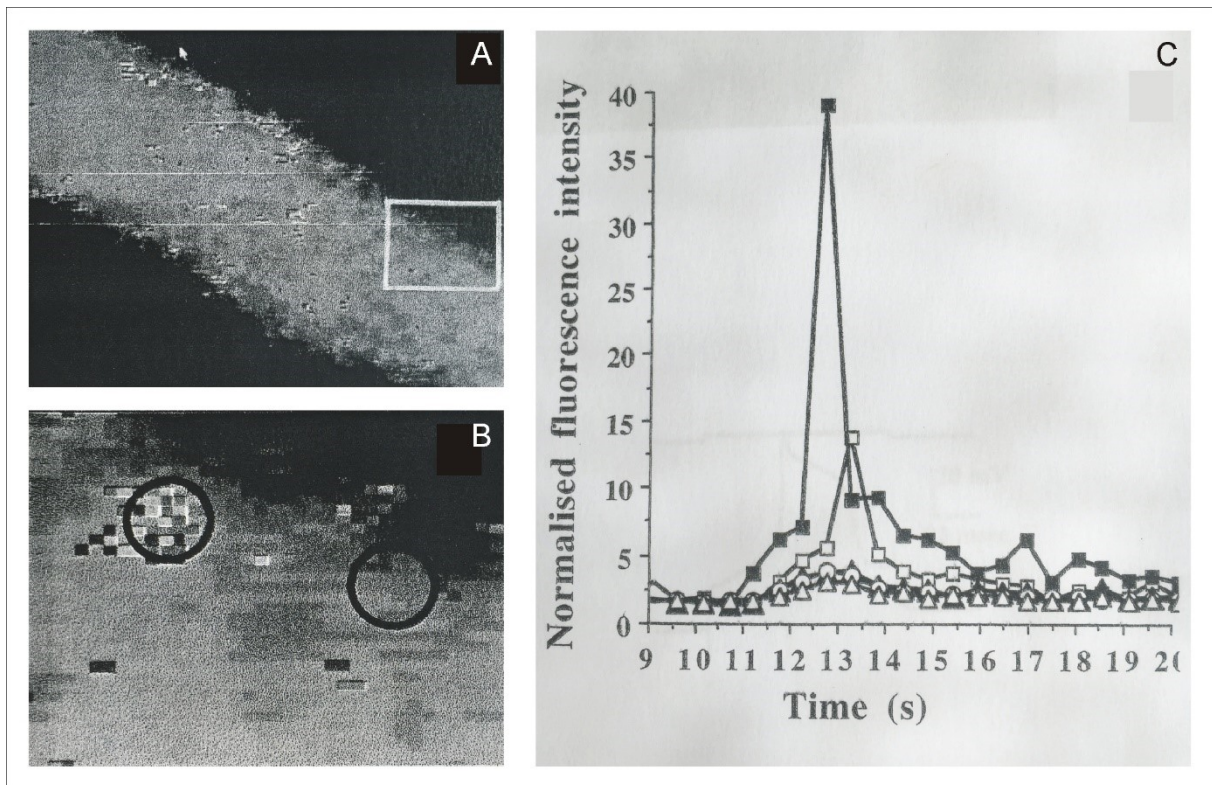


Figure 2.14 Enregistrement de l'intensité de fluorescence au niveau de sous-domaines d'une cellule musculaire lisse longitudinale de *Beroe ovata* chargée en Fura-2AM et stimulée électriquement (voltage-clamp). A) Visualisation de la répartition de la fluorescence sous la forme de sous-domaines de la cellule musculaire. B) Grossissement de la zone encadrée en A. C) Variation de l'intensité de fluorescence, normalisée par rapport à la fluorescence initiale, suite à une stimulation électrique. Mesures réalisées au niveau : de la cellule entière (variation de l'intensité moyenne de fluorescence), ronds vides ; des zones encerclées en B (carrés pleins) et d'une zone où l'intensité de fluorescence ne varie pas (triangles vides). A-C) Thèse Chrystelle Cario-Toumaniantz (1996).

2.1.4 Le système cholinergique à l'échelle des Eumétazoaires

Le système cholinergique à l'échelle des Bilatériens

La large présence de la molécule d'acétylcholine en contexte neural et non neural pose la question des processus de synthèse, de transport, de libération et de dégradation (rassemblés sous le terme de système cholinergique) mis en jeu en fonction des contextes cellulaires et des organismes.

Chez les Bilatériens, la voie de biosynthèse de l'acétylcholine a principalement été étudiée dans le cas particulier de la synapse cholinergique. Les neurones qui synthétisent de l'acétylcholine sont dits cholinergiques et sont répartis au sein du système nerveux central (mémoire et apprentissage) et périphérique (système nerveux autonome et effet cardiomodérateur par exemple – système nerveux somatique et contraction musculaire). Le mécanisme de biosynthèse est aujourd'hui

un cas d'école et semble être conservé à l'échelle des Bilatériens. Il a en effet été décrit chez les Vertébrés, les Nématodes (Towers et al. 2005), les Mollusques (Church et al. 1993), ou encore chez les Urochordés (Ohmori & Sasaki 1977).

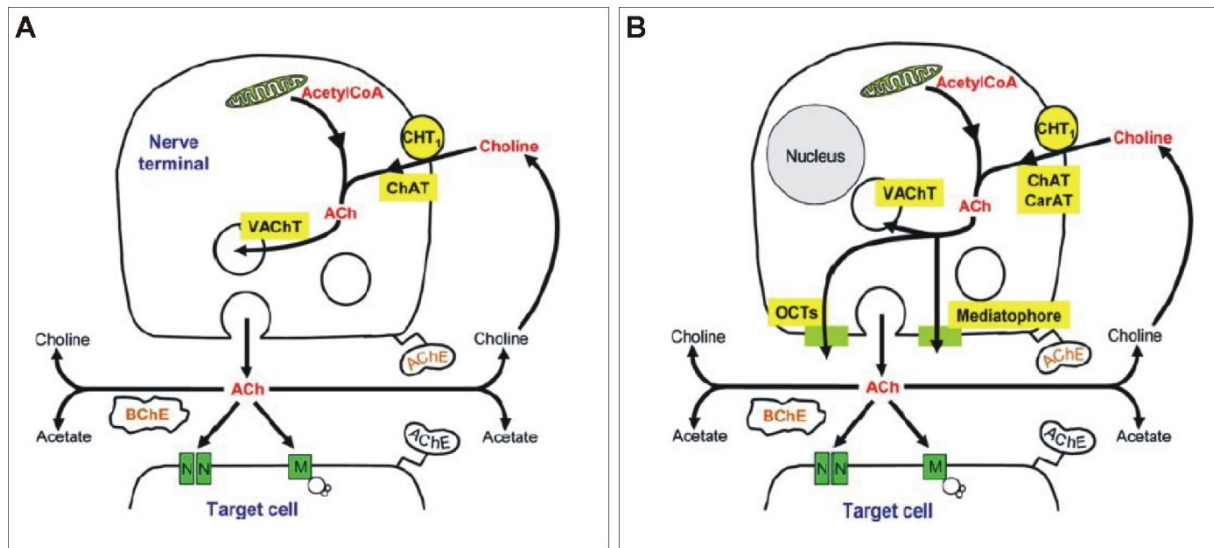


Figure 2.15 Schéma du système cholinergique en contexte neural (A) et non neural (B). Les étapes de synthèse, transport, libération, recyclage ainsi que les récepteurs de l'acétylcholine sont figurés. *ACh* : Acétylcholine, *AChE* : acétylcholinestérase, *BChE* : butyrylcholinestérase, *ChAT* : choline acétyltransférase, *CHT₁* : Transporteur de haute affinité de la choline, *M* : Récepteur muscarinique (GPCR), *N* : Récepteur nicotinique (canal ionique), *VAcHT* : Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine. D'après Kummer et al. (2008).

La choline acétyltransférase (ChAT) synthétise l'acétylcholine au niveau du bouton synaptique, en utilisant comme substrat la choline et l'acétyl-coenzymeA (acétyl-CoA) (Figure 2.15 A). L'acétyl-CoA provient de la mitochondrie alors que la choline est importée depuis l'espace extracellulaire grâce à l'activité du transporteur de haute affinité de la choline (CHT₁⁵), qui est un symport Na⁺/choline appartenant à la même famille que les transporteurs Na⁺/glucose. Cette entrée de choline constitue l'étape limitante de la synthèse d'acétylcholine. L'acétylcholine est ensuite transloquée dans des vésicules grâce à un transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VAcHT) fonctionnant comme un antiport H⁺/ACh. Jusqu'à 10 000 molécules d'acétylcholine peuvent être stockées dans une vésicule ; on parle d'une libération par quantum. Ces vésicules sont ensuite libérées par exocytose suite à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire provoquée par l'arrivée d'un potentiel d'action. L'acétylcholine peut alors se fixer au niveau de la membrane post-synaptique, sur deux types de récepteurs : les récepteurs muscariniques métabotropiques (récepteurs à

⁵ Le transporteur de haute affinité de la choline de l'homme est nommé CHT1 bien qu'un seul paralogue soit présent au sein de son génome.

7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G – superfamille des GPCR) et les récepteurs nicotiques ionotropiques (récepteurs canaux appartenant à la superfamille des cys-loop récepteurs).

L'effet de l'acétylcholine est transitoire et contrôlé spatialement grâce à sa dégradation, au niveau extracellulaire, en acétate et en choline par l'acétylcholinestérase (AChE). L'acétylcholinestérase est une sérine protéase spécifique de l'acétylcholine (Figure 2.16) L'hydrolyse de l'acétylcholine se fait au niveau d'une triade catalytique (formée d'une sérine S, d'une histidine H et d'un glutamate E), logée au fond d'une profonde gorge catalytique (Figure 2.16 – Dvir et al. 2010). Le site catalytique est surmonté de résidus aromatiques dont certains, à proximité de la triade catalytique, permettent la fixation de l'ion ammonium de la choline (site catalytique anionique de fixation de la choline) alors que d'autres bordent toute la gorge catalytique et permettent d'y faire entrer l'acétylcholine (site anionique périphérique). La recapture et donc le recyclage de la choline sont assurés par le transporteur de haute affinité de la choline (CHT1) (Kummer et al. 2008).

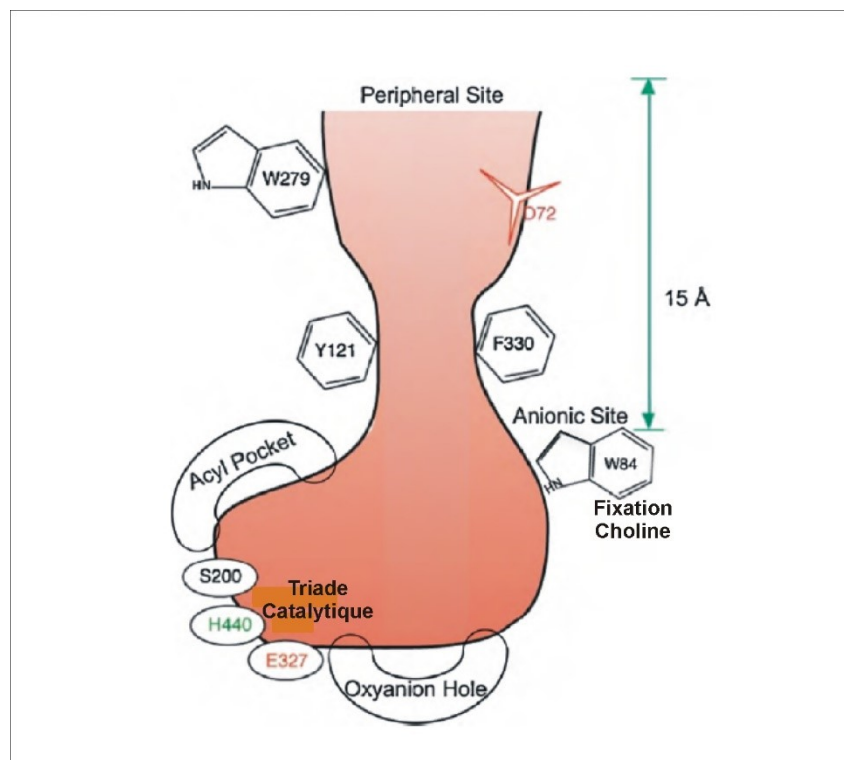


Figure 2.16 Vue schématique de la gorge catalytique de l'acétylcholinestérase. Au fond de la gorge catalytique, différents sites confèrent la spécificité du substrat : la triade catalytique (composée d'une sérine S, une histidine H et un glutamate E) et le site de fixation de la choline. Les résidus aromatiques présents au niveau du site périphérique (juste au-dessus du fond de la gorge) permettent de faire entrer l'acétylcholine jusqu'au site de catalyse. D'après Dvir et al. (2010).

Si l'on s'intéresse maintenant au système cholinergique en contexte non-neural, au sein des Bilatériens, il a principalement été étudié chez les Mammifères. Il apparait alors clairement que la plupart des acteurs du système cholinergique présentés précédemment en contexte neural ne sont pas

spécifiques des cellules nerveuses (Wessler et al. 2001a). Cependant, il est important de noter qu'en ce qui concerne la synthèse, le transport et la libération de l'acétylcholine, une plus grande diversité d'acteurs peut être mise en jeu (Figure 2.15 B). Ces acteurs sont dépendants du type cellulaire et présentent souvent une spécificité moins grande vis-à-vis de l'acétylcholine.

Ainsi, la synthèse de l'acétylcholine peut également être réalisée par la carnitine acétyltransférase (CrAT) (Lips et al. 2007, Kummer et al. 2008). ChAT et CrAT appartiennent à la famille des « CoA-dépendant acyltransférases », incluant également la carnitine octanoyltransférase (CrOT) et les carnitines palmitoyltransférases (CPT) (Green et al. 2010). Ces enzymes réalisent des réactions similaires de transfert de chaînes d'acides gras. ChAT utilise la choline comme substrat alors que CrAT, CrOT et les CPT utilisent majoritairement la carnitine (Figure 2.17). Contrairement à CrOT et aux CPT qui prennent en charge de longues chaînes d'acyl-CoA, ChAT et CrAT ont une spécificité uniquement vis-à-vis des courtes chaînes d'acétyl-CoA. Cependant, ce système paraît être assez labile, puisque des études de mutagenèse dirigée ont montré que la spécificité des enzymes pour leur substrat (choline vs. carnitine) et pour leur co-substrat (chaînes courtes vs. chaînes moyennes et longues d'acides gras) pouvait être facilement modifiée par des mutations ponctuelles (Cordente et al. 2006, Green et al. 2010).

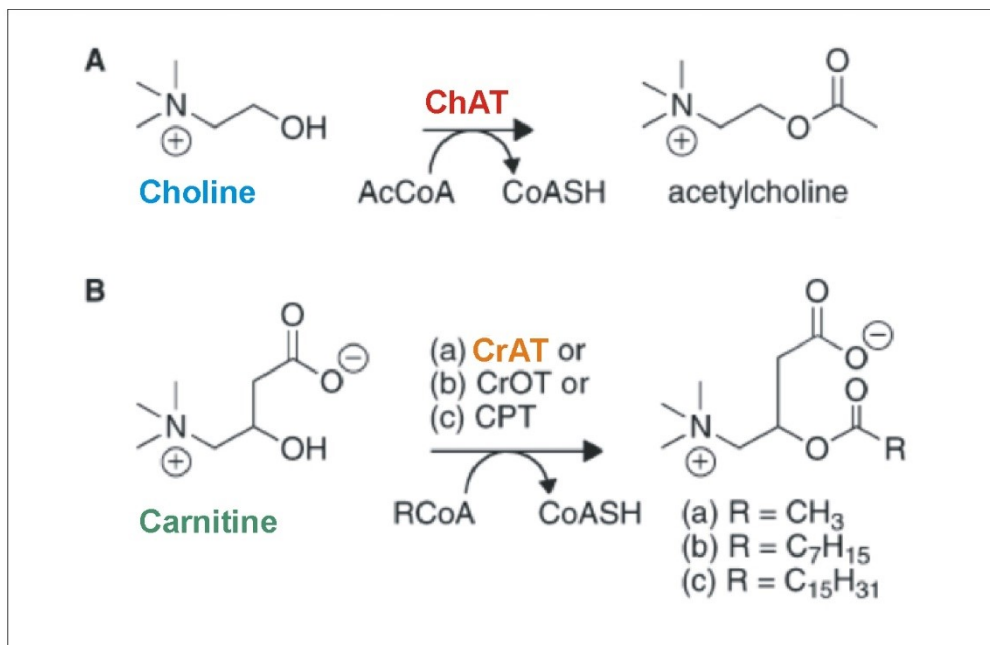


Figure 2.17 Spécificités de substrat et de co-substrat des enzymes ChAT, CrAT, CrOT et CPT. ChAT : Choline acétyltransférase. CrAT : carnitine acétyltransférase, CrOT : carnitine octanoyltransférase, CPT : carnitine palmitoyltransférase. D'après Green et al. (2010).

En ce qui concerne la libération de l'acétylcholine, le transporteur vésiculaire VACht qui assure le stockage de l'acétylcholine au sein de vésicules d'exocytose n'est pas toujours présent dans les cellules cholinergiques non neurales. La libération de l'acétylcholine peut alors se faire de manière directe à partir du cytoplasme, grâce à des transporteurs membranaires. Deux types de tels transporteurs ont aujourd'hui été mis en évidence : les transporteurs polyspécifiques de cations organiques (OCT) (Wessler et al. 2001b, Lips et al. 2005), et un protéolipide appelé le médiateur (Morel 2003).

Seul le processus de recyclage de la choline par le transporteur de haute affinité de la choline Na⁺-dépendant CHT1 semble être spécifique des cellules nerveuses. Cette spécificité neuronale a été caractérisée chez le nématode *C. elegans* (Okuda et al. 2000, Matthies et al. 2006), chez le lépidoptère *Trichoplusia ni* (McLean et al. 2005) et chez les Vertébrés. Quelques rares cas de présence de CHT1 en contexte non neural ont cependant été mis en évidence chez le rat et chez l'homme : au niveau de cellules épithéliales de la peau et de la trachée (Haberberger et al. 2002, Pfeil et al. 2003a ; Pfeil et al. 2003b). Ces quelques cas connus de fonctions non neurales de CHT1 pourraient représenter une situation dérivée propre aux mammifères, ou au contraire être liés à une implication plus ancienne de ce transporteur en contexte non neural. Il est important de noter ici que la choline est une molécule indispensable au métabolisme basal de toutes les cellules (elle participe par exemple à la synthèse des phospholipides membranaires) et donc que son entrée dans la cellule est indispensable. Toutes les cellules possèdent donc un transporteur de la choline, et en contexte non-neural, une grande variété de transporteurs Na⁺- indépendants à faible ou moyenne affinité (comme les transporteurs des familles CTL et OCT) sont mis en jeu selon les types cellulaires (Michel et al. 2006, Kummer et al. 2008).

Pour finir, en ce qui concerne l'hydrolyse de l'acétylcholine, principalement via l'acétylcholinestérase, il est intéressant de noter que chez l'homme, même s'il s'agit de la même protéine impliquée (un seul paralogue est présent chez l'Homme), il existe une nette différence d'activité de cette enzyme en contexte neural et non-neural (Wessler et al. 2015). En effet, le pH au niveau des jonctions synaptiques correspond au pH optimum d'activité enzymatique alors que le pH maintenu au niveau du milieu extracellulaire bordant les cellules neurales libérant de l'acétylcholine est sous-optimal pour son activité. Ceci est à relier avec l'importance du caractère transitoire du signal en contexte neural (dégradation rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses) et avec la nécessité de la diffusion du messager paracrine en contexte non neural. Une autre enzyme, la butyrylcholinestérase (BChE), est capable d'hydrolyser l'acétylcholine. Elle présente une spécificité moins grande que l'acétylcholinestérase pour l'acétylcholine.

Le système cholinergique chez les Cnidaires et les Cténares et son association au système nerveux.

En dehors des Bilatériens, l'existence d'un système cholinergique en contexte neural reste encore débattue.

Chez les Cnidaires, la neurotransmission se fait principalement via des neuropeptides (Grimmelikhuijzen & Hauser 2012) et, en ce qui concerne le système cholinergique, les données apparaissent plus ou moins contradictoires. Des approches pharmacologiques ont montré que l'emploi d'agonistes et antagonistes des récepteurs nicotiniques et muscariniques (de Bilatériens) de l'acétylcholine a des effets sur la fréquence et l'intensité des contractions musculaires et sur la décharge des cnidocytes (Lentz & Barnett 1963, Scemes & Mendes, 1986 ; Kass-Simon et Pierobon, 2007). Par exemple, chez l'Hydre, l'emploi d'acétylcholine exogène et d'autres agonistes cholinergiques stimule la contraction musculaire, l'utilisation d'antagonistes de récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine l'inhibe alors que l'utilisation d'atropine, antagoniste muscarinique de l'acétylcholine la stimule de manière très significative (Kass-Simon & Passano 1978).

L'analyse du génome de *Nematostella vectensis* permet de conclure à la présence de 20 orthologues de gènes liés à la fonction cholinergique : 3 ChAT, 5 AChE et 12 sous-unités de récepteurs nicotiniques (Anctil, 2009). Chez *Clytia hemisphaerica*, la détection d'acétylcholine par immunofluorescence (données non publiées, Thèse Cyrielle Dayraud) met en évidence une localisation nerveuse au niveau de la sous-ombrelle, le long de cordons nerveux bordant les canaux radiaires (Figure 2.18). Ce sont les résultats contradictoires concernant l'activité de l'acétylcholinestérase qui nourrissent le débat. L'acétylcholinestérase est présente chez les Cnidaires (2 paralogues chez *Nematostella vectensis* et 1 seul chez *Hydra magnipapillata* - Takahashi & Hamaue 2010) et les principaux résidus essentiels à la catalyse sont conservés (Denker et al. 2008a, Takahashi & Hamaue 2010). Cependant, même si son activité a été détectée au niveau de cellules neurosensorielles de l'hydre (Lentz & Barnettrj 1961 ; 1963), ces données ont été remises en question par Erzen et Bzin en 1978, selon lesquels ces résultats ne seraient pas reproductibles. Une nouvelle technique d'étude de l'activité de l'AChE chez l'Hydre (Takashi & Hamaue, 2010) va dans le sens de l'absence d'activité au niveau nerveux et met en évidence une large expression au niveau des cellules épithéliales de l'endoderme et de l'ectoderme. Cette activité endodermique, non associée aux cellules nerveuses, est confirmée chez *Clytia hemisphaerica* (Denker et al. 2008a). Une étude récente chez *N. vectensis* (Oren et al. 2014) a étudié l'expression d'un des orthologues de l'AChE (mis en évidence par Anctil (2009)) et conclut à la non association du système cholinergique au contexte neural. Ces résultats restent à nuancer puisqu'un seul paralogue (parmi les 7 présents chez *N. vectensis* – Anctil 2009) a été étudié et qu'un marqueur non pan-neural a été utilisé pour repérer les cellules nerveuses (cellules RFamides positives). La majorité des résultats qui prêtent à confusion concernent donc

l'acétylcholinestérase. Cependant, il ne faut pas oublier qu'il s'agit d'une enzyme extracellulaire largement ubiquitaire et donc pour laquelle l'association à un type cellulaire précis est très difficile à caractériser et que l'expression d'un gène codant l'AChE dans une cellule non neurale n'exclut pas que l'enzyme puisse hydrolyser de l'acétylcholine produite par un neurone. Les données restent donc peu nombreuses aujourd'hui. Leurs contradictions ne permettent pas de conclure à l'existence ou non d'une transmission nerveuse de type cholinergique les Cnidaires.

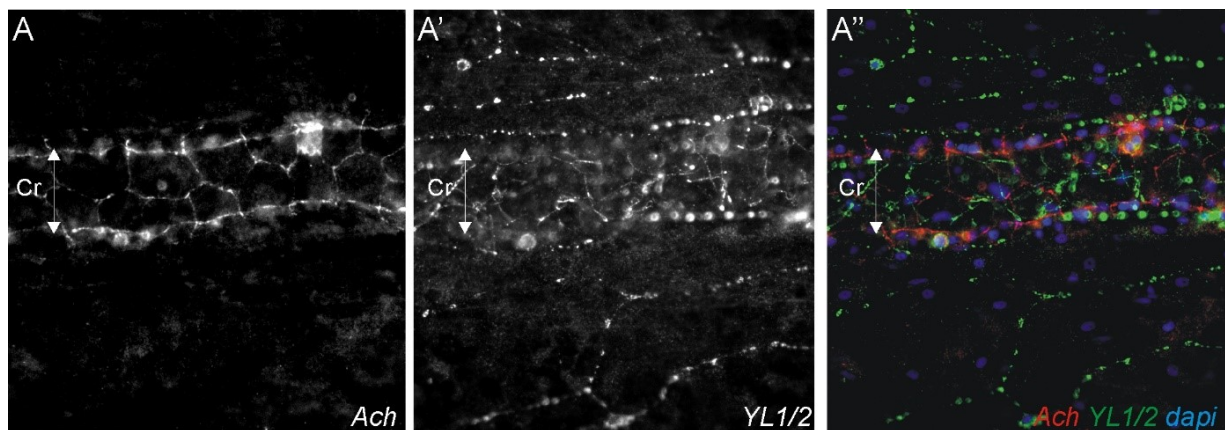


Figure 2.18 Immuno-localisation de l'acétylcholine au niveau de structures nerveuses de *Clytia hemisphaerica*. Détection de l'acétylcholine (ACh en rouge) le long des condensations nerveuses bordant les canaux radiaires. Contre-marquage YL1/2 et Dapi. Cr : canal radiaire. Thèse Cyrielle Dayraud (2011).

En ce qui concerne les Cténaïres, la situation est encore plus complexe et confuse, comme j'ai pu le souligner précédemment. De récentes publications concluent à l'absence complète d'un système cholinergique que ce soit en contexte neural ou non neural et donc à l'absence d'utilisation de l'acétylcholine comme messager intercellulaire chez les Cténaïres (Moroz et al. 2014, Ryan et al. 2014, Moroz et al. 2015). Ainsi ces articles montrent, d'après l'analyse des génomes complets de *Mnemiopsis leidyi* et *Pleurobrachia bachei*, l'absence d'acteurs clés du système cholinergique : absence des enzymes de synthèse et des récepteurs (nicotiniques et muscariniques). L'acétylcholine elle-même n'a pu être détectée à l'aide de techniques de spectrométrie de masse (ESI-MS), suggérant pour les auteurs son absence (Moroz et al. 2014). Ces résultats ont été complétés par des approches pharmacologiques et électrophysiologiques mettant en évidence que l'acétylcholine n'a d'effet ni sur les battements ciliaires des cellules des peignes, ni sur l'excitation de cellules musculaires isolées (fibres musculaires mésogléennes) (Moroz et al. 2014). Cependant, quelques rares données antérieures

sont en contradiction avec ces résultats. Des études pharmacologiques suggèrent l'implication d'un mécanisme cholinergique dans différents phénomènes : la luminescence des photocytes localisés au sein des canaux méridiens endodermiques (sous-jacents aux rangées de peignes) chez *Mnemiopsis* (Anctil, 1985), la nage et les battements ciliaires de *Beroe ovata* (Thèse Hernandez-Nicaise, 1974). Une activité acétylcholinestérase a aussi été détectée à proximité de cellules nerveuses chez *Beroe ovata*, au niveau de l'espace extracellulaire de synapses interneurales, neuro-musculaires, neuro-glandulaires et neurociliaires (synapses joignant des neurones aux *polster cells* des rangées de peignes) (Thèse Hernandez-Nicaise, 1974).

2.2 Article 1 : Existence d'un système cholinergique chez le Cténaire *Pleurobrachia pileus* : implications concernant l'origine du système nerveux

Coste, A., Jager, M., Alié, A., Dayraud, C., Mourot, A., Klein, J., Faure, P., Chambon J.-P., Bleuven, C., Queinnec, E., Le Guyader, H., Manuel, M. Existence of a cholinergic nervous system in the ctenophore *Pleurobrachia pileus* : new insights on the origin of the nervous system.

En cours de préparation pour soumission au journal Nature. Il est donné ici une version extensive préliminaire et en français.

Résumé

L'existence d'une transmission nerveuse cholinergique chez les Cténaïres a été jusqu'à maintenant une question largement controversée. Nous présentons ici des résultats allant à l'encontre de récentes publications concluant à l'absence totale d'acétylcholine et d'un système cholinergique chez les Cténaïres (Moroz et al. 2014, Moroz 2015). Notre étude chez *Pleurobrachia pileus* met en évidence la présence d'acétylcholine ainsi que sa nette association avec les systèmes nerveux et neurosensoriel de l'animal. Des orthologues clairs du transporteur de haute affinité de la choline (*PpiCHT1* et *PpiCHT2*) et de l'acétylcholinestérase ont été identifiés. La forte corrélation de l'expression des paralogues *PpiCHT1* ou *PpiCHT2* et de l'activité acétylcholinestérase avec l'immunolocalisation de l'acétylcholine ainsi que la mise en évidence de cellules cibles de l'acétylcholine (imagerie calcique et approche pharmacologique) permettent de conclure à l'existence d'un système cholinergique fonctionnel. Ce système est de plus associé aux cellules nerveuses dans de nombreux territoires, témoin d'une transmission nerveuse cholinergique chez les Cténaïres. Ceci implique *de facto* l'existence d'une enzyme synthétisant l'acétylcholine. L'étude d'expression du gène *PpiCPT2.2*, qui appartient au groupe d'orthologie proche de celui des enzymes ChAT/CrAT, coïncide fortement avec les territoires cholinergiques mis en évidence et permet de proposer que cette protéine joue ce rôle suite à un phénomène de co-optation. En ce qui concerne les récepteurs de l'acétylcholine, dont nous mettons indirectement en évidence l'existence, le mystère reste entier. Les récepteurs nicotiniques ont été perdus chez les Cténaïres, mais l'analyse phylogénétique des récepteurs métabotropiques montre qu'il est impossible de conclure à l'absence d'un récepteur fonctionnel de l'acétylcholine. L'ensemble de ces résultats constitue donc un faisceau d'arguments permettant d'émettre l'hypothèse du recrutement de la signalisation cholinergique au niveau neural chez l'ancêtre commun des Cténaïres et des Bilatériens et ne vont donc pas dans le sens d'une origine indépendante de leur système nerveux.

Introduction

L'acétylcholine a été le premier neurotransmetteur identifié dans le système nerveux des Mammifères. Un grand nombre d'études ont permis de caractériser le fonctionnement des synapses cholinergiques chez les Mammifères et ont amené à attribuer à l'acétylcholine le rôle classique de neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire (Prix Nobel de médecine, H. Dale et O. Lewis, 1936). Cette image de neurotransmetteur modèle reste encore aujourd'hui bien ancrée dans les esprits, et ne tient pas compte du fait que l'acétylcholine est en réalité une molécule signal répartie dans l'ensemble de l'arbre du vivant (Wessler et al. 2001a, Horiuchi et al. 2003) et qui, de ce fait, n'est pas exclusivement associée aux cellules nerveuses. Au sein même des Vertébrés, de récentes études ont mis en évidence la présence d'acétylcholine, et du système cholinergique associé (ensemble des processus de synthèse, de transport, de libération et de dégradation de l'acétylcholine), au niveau d'un grand nombre de cellules non nerveuses, en lien avec une grande diversité de fonctions (Tucek, 1982, Wessler et Kirkpatrick, 2008, Kummer et al. 2008, Duncan & Collison 2003, Wessler et al. 2001a, Fujii et al. 2008, Resende & Adhikari 2009, Tang et al. 2012, Grando et al. 2012). Dans ces contextes, l'acétylcholine est libérée en tant que messenger paracrine ou autocrine et ne répond donc plus à la définition stricte de neurotransmetteur.

L'acétylcholine a été utilisée en tant que molécule signal bien avant l'apparition de la cellule nerveuse. Différents scénarios concernant l'origine évolutive des neurotransmetteurs émettent alors l'hypothèse du recrutement, par les cellules nerveuses, de messagers paracrines préexistants (Nickel 2010, Harris & Zahavi 2013, Harris et al. 2014). Dans le cadre du problème de l'homologie de la cellule nerveuse, la question n'est donc plus celle de la présence du neurotransmetteur et du système associé mais celle de son recrutement par les cellules nerveuses.

L'association de l'acétylcholine et du système cholinergique aux cellules nerveuses est largement démontrée à l'échelle des Bilatériens. En dehors des Bilatériens, l'existence d'un système cholinergique en contexte neural reste encore débattue. Les données chez les Cnidaires n'ont pas permis de conclure à l'implication du système cholinergique dans la transmission nerveuse. La présence d'enzymes de synthèse (Choline acétyltransférase ChAT et Carnitine acétyltransférase CrAT) et de dégradation (Acétylcholinestérase AChE) de l'acétylcholine ainsi que de récepteurs nicotiques a été mise en évidence dans le génome de *Nematostella vectensis* (Anctil, 2009). Des approches pharmacologiques utilisant des agonistes et antagonistes des récepteurs nicotiques et muscariniques de l'acétylcholine ont aussi permis notamment de mettre en évidence une réponse au niveau musculaire (Kass-Simon et Pierobon, 2007). Toutefois, les données concernant l'acétylcholinestérase semblent suggérer que cette enzyme ne soit pas impliquée en contexte neural (Takashi & Hamaue, 2010, Denker et al. 2008a, Oren et al. 2014). En ce qui concerne les Cténares, la situation est encore plus complexe. Des études pharmacologiques ont mis en évidence l'implication de l'acétylcholine dans le contrôle de la luminescence des Cténares (Thèse Hernandez-Nicaise 1974, Anctil, 1985), la présence de l'acétylcholinestérase a été mise en évidence dans le génome de

Mnemiopsis leidyi (Ryan et al. 2014) et son activité a été détectée au niveau de synapses (Hernandez-Nicaise, Thèse 1974). Ces données vont donc dans le sens de l'existence d'un système cholinergique chez les Cténaïres. Cependant, des publications récentes concluent à l'absence de la quasi-totalité des neurotransmetteurs classiques, dont l'acétylcholine, ainsi que des systèmes associés (enzymes de synthèse et récepteurs principalement) chez les Cténaïres (Moroz et al. 2014, Moroz 2015). Les auteurs présentent ces résultats comme des arguments forts en faveur d'une origine indépendante du système nerveux des Cténaïres par rapport à celui des Cnidaires et des Bilatériens.

Dans ce contexte, je me suis intéressée à la question de l'existence d'un système cholinergique et de son association au système nerveux chez le Cténaïre *Pleurobrachia pileus*. Pour cela, j'ai eu recours à une grande diversité d'approches à différentes échelles. J'ai recherché la présence d'acétylcholine grâce à une technique de détection ultrasensible spécifique de l'acétylcholine (ED-HPLC) et caractérisé son immunolocalisation à l'aide d'un anticorps commercial. Des analyses d'orthologie m'ont permis de déterminer la présence ou l'absence de différents acteurs du système cholinergique (ChAT/CrAT, CHT, VAcHT, AChE, récepteurs nicotiques et muscariniques de l'acétylcholine) et j'ai pu étudier l'expression (hybridation *in situ*) ou l'activité (test d'activité enzymatique) de certains d'entre eux. Afin de tester d'éventuels effets de l'acétylcholine sur des cellules cibles, à l'échelle cellulaire et à celle de l'organisme, j'ai eu recours à des expériences d'imagerie calcique ainsi qu'à une approche pharmacologique.

Matériels et méthodes

Récolte des spécimens et fixation

Les individus adultes de *Pleurobrachia pileus* ont été récoltés à Gravelines (France), durant la période de reproduction, de Mars à Juin, à l'aide d'un filet à plancton et ont été maintenus en vie au laboratoire sous une circulation continue d'eau de mer artificielle, à 16°C. Ils ont été fixés à 4°C, dans du paraformaldéhyde 4% dilué dans 50% eau de mer et 50% PBT (10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Tween 20) pendant 1 heure (pour les expériences d'hybridation *in situ*) ou pendant 30 minutes (pour les expériences d'immunolocalisation), puis rincés 3 fois dans du PBT. Ils ont ensuite été déshydratés selon un gradient croissant d'éthanol et stockés à -20°C dans du méthanol.

Analyses phylogénétiques

Pour chaque gène étudié, le jeu de données a été constitué en réalisant des blasts (BlastP) de la protéine humaine de référence contre les protéines prédites à partir des génomes complets de l'échantillonnage taxonomique suivant : *Rhizopus delemar* (*Rde*), *Batrachochytrium dendrobatidis*

(*Bde*), *Capsaspora owczarzaki* (Cow, Ichthyosporea), *Monosiga brevicollis* (Mbr, Choanoflagellata), *Amphimedon queenslandica* (Aqu, Porifera, Demospongiae), *Sycon ciliatum* (Sci, Porifera, Calcarea), *Trichoplax adhaerens* (Tad, Placozoa), *Nematostella vectensis* (Nve, Cnidaria, Anthozoa), *Hydra magnipapillata* (Hma, Cnidaria, Hydrozoa), *Lottia gigantea* (Lgi, Lophotrochozoa, Mollusca), *Drosophila melanogaster* (Dme, Ecdysozoa, Arthropoda), *Strongylocentrotus purpuratus* (Spu, Deuterostomia, Echinodermata), *Branchiostoma floridae* (Bfl, Deuterostomia, Chordata, Cephalochordata), *Ciona intestinalis* (Cin, Deuterostomia, Chordata, Urochordata), *Danio rerio* (Dre, Deuterostomia, Chordata, Vertebrata, Teleostea), *Xenopus tropicalis* (Xtr, Deuterostomia, Chordata, Vertebrata, Amphibia) et *Homo sapiens* (Hsa). De plus, des recherches de type tBlastN, à l'aide de la même protéine de référence, ont été réalisées au sein du génome complet des Cténaïres *Mnemiopsis leidyi* et *Pleurobrachia bachei*, des transcriptomes que nous possédons pour les Cténaïres *Pleurobrachia pileus* (Ppi), *Coeloplana sp.* (Csp), *Vallicula multiformis* (Vmu), *Lampea panzerina* (Lpa), et pour le Cnidaire *Clytia hemisphaerica* (Che). Le seuil d'e-value utilisé a été déterminé empiriquement pour chaque famille de protéines, après avoir réalisé un blast de la protéine humaine sur le génome humain. Ceci a permis de récupérer des séquences appartenant à d'autres groupes d'orthologie proches du groupe d'intérêt afin de pouvoir raciner l'arbre. Ces séquences ont été utilisées pour constituer un alignement en acides aminés, réalisé automatiquement par MUSCLE (Edgar, 2004) puis examiné et éventuellement corrigé à la main sous BioEdit (Hall 1999). Les analyses phylogénétiques en Maximum de Vraisemblance (ML) ont été effectuées sous PhyML (PhyML. 3.1. Guindon & Gascuel 2003) avec le modèle LG, une loi de distribution gamma à 4 catégories et une proportion de sites invariants optimisée. La robustesse statistique a été évaluée par 100 réplicats de bootstraps. Les bootstraps supérieurs à 50% ont été reportés sur les arbres.

Détection de la présence d'acétylcholine par HPLC-ED (high-performance liquid chromatography with electrochemical detection)

En ce qui concerne cette partie, la préparation des échantillons a été faite au sein de notre laboratoire et la détection de l'acétylcholine a été faite en collaboration avec le Pr. Klein, au sein de son laboratoire (Department of Pharmacology, Goethe University, Francfort, Allemagne).

Cette technique de détection est spécifique de la détection de l'acétylcholine (Tsai, 2000 – Figure 1). Elle est basée sur la séparation de l'acétylcholine et de la choline par chromatographie échangeuse de cations (colonne analytique). Différentes fractions sont alors récupérées en fonction du temps de rétention des molécules. Le temps de rétention de la choline pour un échantillon standard est de 7,2 minutes alors que celui de l'acétylcholine est de 11,3 minutes. Chacune des fractions circule ensuite au niveau d'un réacteur (colonne du réacteur) au sein duquel les enzymes de dégradation de l'acétylcholine et de la choline sont immobilisées (acétylcholinestérase et choline oxydase). Ces réactions génèrent du peroxyde d'hydrogène qui est ensuite mesuré (détecteur électrochimique). La

détection de peroxyde d'hydrogène pour un temps de rétention de 7,2 minutes est donc témoin de la présence de choline au sein de l'échantillon alors que sa détection pour un temps de rétention de 11,3 minutes est témoin de la présence d'acétylcholine. Chaque échantillon est testé en présence et en l'absence de réacteur (témoin négatif). Des solutions standard de concentrations connues en acétylcholine ont été utilisées en parallèle comme témoins positifs.

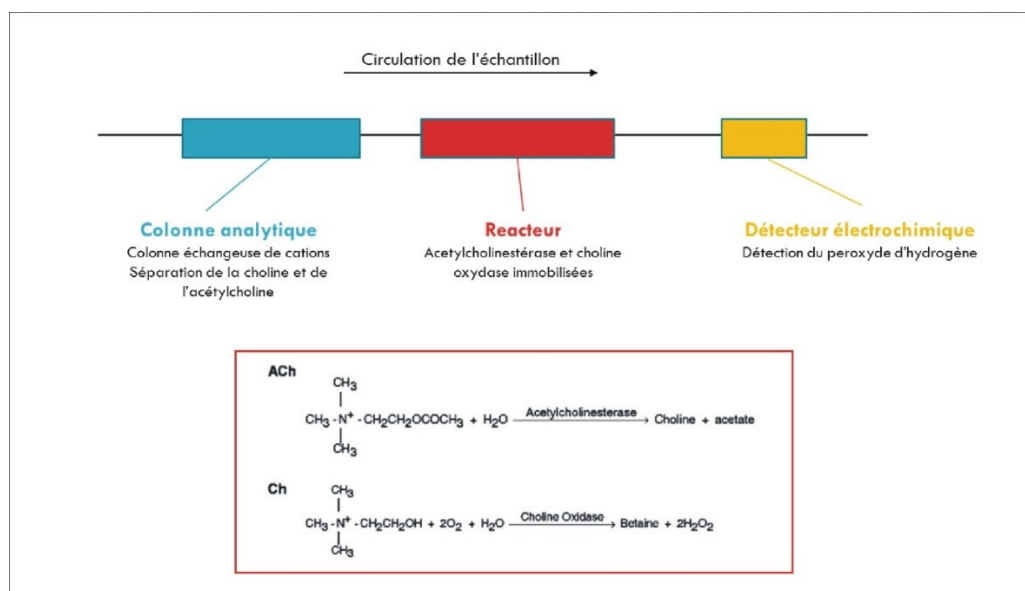


Figure 1 Représentation schématique de la technique de détection spécifique de l'acétylcholine et de la choline par ED-HPLC. En rouge sont encadrées les réactions ayant lieu au sein du réacteur par l'acétylcholinestérase et la choline oxydase immobilisées.

La détection d'acétylcholine chez *Pleurobrachia pileus* a été réalisée sur des échantillons de tentacules (N=20) prélevés sur des animaux mis à jeûner durant 24h dans une eau de mer artificielle filtrée. Les tentacules ont été rapidement sectionnés et placés dans le solvant d'extraction (85 % acetone/15 % acide formique 1 N - pH=5 – volume égal à 10 fois le volume de tissus) dans la glace. L'homogénéisation des tissus a été réalisée à l'aide d'une microsonde à ultrasons. Le surnageant a été récupéré (4°C, 14 000 rpm, 15min) et désséché à l'aide d'une centrifugeuse à vide. Les échantillons ont ensuite été dissous dans l'éluant de l'HPLC (0,1M tampon sodium phosphate pH 7,5 – 5mM chlorure de tétraméthylamonium) à l'aide d'un auto-injecteur (Gynkotek Gina) et immédiatement injectés dans la colonne analytique. Le système HPLC est composé d'une pompe de type Gynkotek 300, d'une colonne échangeuse de cations (Bakerbond Sulfopropyl 5μ, 60 x 4,6mm), d'un réacteur avec la choline oxydase (EC 1.1.3.17) et l'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) (Biometra, Göttingen, Germany) immobilisées et d'un détecteur électrochimique (Biometra EP 20, Göttingen, Germany). Le peroxyde d'hydrogène formé au sein du réacteur est détecté à l'aide d'une électrode de platine (+0,5V). Il s'agit d'une des techniques les plus sensibles de détection de l'acétylcholine, la limite de détection de l'acétylcholine étant de l'ordre de la femtomole (Barkhimer et al. 2008).

Hybridations *in situ*

Après une réhydratation progressive en PBT, les échantillons ont été transférés dans du tampon d'hybridation (HB : 5× SSC, 50% formamide, 0.1% sulfoxide de diméthyle (DMSO), 50 µg/ml héparine, 0.1% tween), pré-hybridés pendant 2 heures à 55°C, dans du HB avec du tRNA (100 µg/ml tRNA) et enfin l'hybridation a été réalisée pendant 48h à 55°C, en présence des sondes ARN couplée à la digoxygénine (DIG) (100 ng de sonde par condition). Les échantillons ont ensuite été rincés deux fois 30 minutes dans du HB à 60°C, puis 2 fois 10 minutes dans du HB/PBT (1:1) et dans du PBT à température ambiante. Après 60 minutes d'incubation dans du *Blocking Reagent* (Roche), les échantillons ont été incubés 4 heures en présence d'un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (1/2000, Roche) puis rincés en PBT1X et transférés en TMN (100 mM Tris-Hcl pH 8,5-9, 50 mM MgCl₂, levamisol 2 mM, 0,1% Tween). La révélation est réalisée en présence de NBT/BCIP, à l'obscurité. Les conditions « sans sonde » et en présence d'une sonde « sens » ont servi de témoins négatifs. Les échantillons ont enfin été marqués au DAPI (1 mg/mL) pendant 15 minutes et montés en présence de Citifluor. Les coupes transversales des tentilles et des peignes ont été réalisées à l'aide d'un cryostat Leica CM1860 (14 µm d'épaisseur). Les images en microscopie ont été prises à l'aide d'un microscope Olympus BX61, équipé d'une caméra Q-imaging, et à l'aide du logiciel Image Pro plus® (Mediacybernetics).

Immunofluorescence

Après une réhydratation progressive en PBST (10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.5 + Triton-X100 0.01%), les échantillons ont été perméabilisés (Triton-X100 0.2% en PBS, puis 0.01% en PBS, 10 min à température ambiante). Après une saturation en sérum albumine bovine (BSA 1% - 1h), ils ont été incubés pendant 4 heures, à température ambiante avec les anticorps primaires suivants : anti- α -tubuline tyrosylée (YL1/2 rat - dilution 1:1,000, Serotec), anti-acétylcholine (lapin - dilution 1 :500, Abcam). Après plusieurs lavages en PBST (Triton-X100 0.01%), les échantillons ont été incubés avec l'anticorps secondaire approprié : Alexa Fluor 568 goat anti-rat IgG et Alexa Fluors 488 goat anti-rabbit IgG (1:1,000, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les dilutions des anticorps primaires et secondaires ont été faites en PBST. Le marquage phalloïdine a été réalisé grâce à l'incubation de spécimens fixés mais non déshydratés en présence de Phalloidin-TRITC (10 mg/mL en PBST Sigma, Saint-Quentin, Fallovier, France) pendant 45 minutes. Tous les échantillons ont été incubés en présence de DAPI (1 mg/mL) permettant la visualisation de l'ADN puis montés en Citifluor. Les images de microscopie ont été réalisées à l'aide d'un microscope Olympus BX61,

équipé d'une caméra Q-imaging, et à l'aide du logiciel Image Pro plus® (Mediacybernetics). Les acquisitions confocales ont été obtenues avec un microscope confocal (Leica SP5), à l'aide du logiciel Leica LAS-AF.

Détection de l'activité acétylcholinestérase

L'activité acétylcholinestérase a été détectée à l'aide de la méthode décrite par Karnovsky et Roots (Karnovsky & Roots 1964), en utilisant l'acétylthiocholine iodide comme substrat et en présence de ferricyanure de potassium permettant l'obtention d'une coloration verte lorsque l'enzyme est active. Les échantillons ont été fixés en PAF (4%) pendant 20 minutes à 4°C puis rincés 4 fois en PBT1X avant l'incubation dans la solution de révélation. L'inhibition spécifique de l'acétylcholinestérase (contrôle négatif) a été vérifiée en présence de néostigmine (10^{-2} M).

Dissociation des tissus tentaculaires de *P. pileus* et imagerie calcique

J'ai pu réaliser les expériences d'imagerie calcique au sein du laboratoire de Bruno Cauli (Cortical Network and Neurovascular Coupling, Neuroscience Paris Seine, UPMC) avec la collaboration d'Alexandre Mourot et de Philippe Faure (Neurophysiologie et Comportements UMR 8246, CNRS, UPMC).

Les tentacules ont été prélevés et placés dans de l'eau de mer artificielle dépourvue de calcium et de magnésium (ASW Ca-Mg Free : 486 mM NaCl – 20 mM KCl – 10 mM Hepes – 70 mM Glucose – 1 mM EGTA – 1 mM EDTA – pH=7,4, tube « low-binding » eppendorf 1,5 ml) à 35°C durant 45 minutes. Le tube doit être maintenu ouvert en permanence et régulièrement agité afin de maintenir l'oxygénation des cellules. Après avoir laissé reposer l'échantillon à température ambiante pendant 10 minutes, la dissociation a été terminée mécaniquement par agitation à l'aide de pipettes en verre de diamètre décroissant. Les cellules dissociées ont ensuite été déposées sur des lamelles (Fisher #12-545-82) préalablement traités à la poly-lysine (0,5 mg/ml) diluée dans du tampon borate (0,1 M - 1.24 g acide borique, 1.90 g Borate de sodium dans 400 ml d'H₂O - pH 8,5). Après adhérence des cellules à la lamelle (30 minutes à 18°C), celles-ci ont été incubées en présence de fluo4AM (5 µM – F14201 LifeTechnologies) dilué dans de l'eau de mer pauvre en calcium (LowCa ASW : 476,6 mM NaCl – 9,72 mM KCl – 1,7 mM CaCl₂ – 24,2 mM MgCl₂ – 27 mM MgSO₄ – 10 mM Hepes– pH 7,4) durant 1h30 à 2h à 18°C. La lamelle a ensuite été placée dans le système d'imagerie calcique maintenu à 18°C équipé d'un microscope Olympus BX51WI. Les images ont été acquises à l'aide d'une caméra digitale CCD (CoolSnap HQ2, Roper Scientific) et du logiciel Imaging Workbench 6.0.25 (INDEC BioSystems). Les cellules sont d'abord visualisées en lumière infrarouge (IR), à l'objectif 60x (LUMPlan FL/IR 60x/0.90 W) ou 40x (LUMPlan FL N 40x/0.80 W) avec un gradient de contraste de Dodt (DGC, Dodt & Zieglansberger, 1998). Une fois qu'une cellule musculaire en bon état a été

détectée, différentes zones (ROI) de la cellule ont été définies à l'aide du logiciel Imaging Workbench (voir exemple sur la Figure 2). L'intensité moyenne de fluorescence a été mesurée au cours du temps, au niveau de chaque zone. Les images ont été acquises toutes les 0,5 ou 1 secondes et les cellules ont été excitées à 470 nm à l'aide d'une LED (CoolLED, Precise Excite). Un filtre passe-bande tri-bande 387/478/555 (FF01-387/478/555, Semrock) a été utilisé pour l'excitation, un filtre FF410/504/582/669-Di01 pour le miroir dichroïque, ainsi qu'un filtre passe-bande quadri-bande (FF01-440/521/607/700, Semrock) pour l'émission. Différentes solutions ont été perfusées dans le système au cours du temps afin de détecter d'éventuelles variations de l'intensité de fluorescence. Ces solutions correspondent à des solutions d'eau de mer artificielle (ASW : 460,6 mM NaCl – 9,72 mM KCl – 9,86 mM CaCl₂ – 24,2 mM MgCl₂ – 27 mM MgSO₄ – 10 mM Hepes – pH 8.0), de carbamylcholine (1 mM - ASW) ou de glutamate (1 mM – ASW).

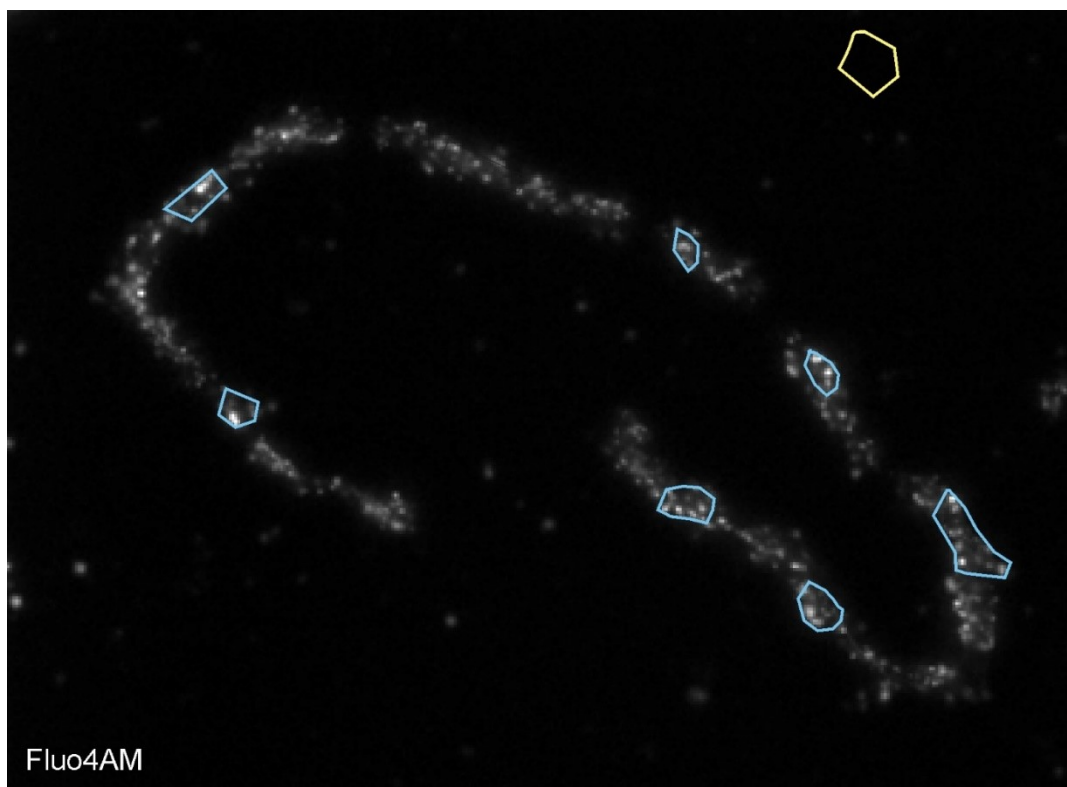


Figure 2 Exemple de cellule musculaire chargée en Fluo4AM (sonde calcique) observée en microscopie à fluorescence lors de l'expérience d'imagerie calcique. Les formes (bleues et jaunes) représentent les différentes zones (ROI) définies avant l'expérience et au niveau desquelles l'intensité moyenne de fluorescence est mesurée au cours du temps.

Approche pharmacologique

Les animaux ont été placés dans des flacons de culture cellulaire (faisant office de micro-aquariums), dans de l'eau de mer artificielle tamponnée (ASW) à 16°C. Les drogues (Sigma) testées ont été la carbamylcholine chlorure (Cch 0,01 – 10 mM), l'atropine sulfate (Atp : 0,01 – 10 mM) et la

tubocurarine hydrochloride pentahydrate (curare - $2,3 \cdot 10^{-3}$ M, 10^{-4} M et 10^{-5} M). Les animaux ont été placés dans de l'eau de mer pendant 1 minute, puis placés en présence de la drogue pendant 10 à 20 minutes (dépendant du délai d'observation des effets) au cours desquelles 2 à 3 stimulations mécaniques ont été réalisées à l'aide d'une pipette en verre approchées de la surface du corps (entre deux rangées de peignes). Le milieu a été ensuite renouvelé plusieurs fois à l'aide d'eau de mer artificielle. Les conditions en présence d'atropine et de curare ont été testées 7 fois alors que la condition en présence de carbamylcholine n'a pu être testée que 3 fois. Pour chaque concentration et molécule testée, un flacon contenant un animal témoin (en présence d'eau de mer artificielle) a été placé à côté du flacon contenant un animal sur lequel l'effet de la drogue a été testé et les deux ont été filmés à l'aide d'un appareil photo Nikon E5100. Le comportement de nage, le taux de rétractation des tentacules ainsi que la morphologie générale des animaux ont été analysés tout au long de l'expérience.

Résultats

Détection de la présence d'acétylcholine chez *P. pileus* par HPLC-ED

La technique de détection de l'acétylcholine par HPLC-ED a permis de détecter la présence d'acétylcholine au niveau du système tentaculaire (tentacules + tentilles) de *Pleurobrachia pileus*. Cette technique est spécifique de la détection de la choline et de l'acétylcholine. On peut observer deux pics (Figure 3 – courbe « échantillon testé avec réacteur »). Le premier pic à 7,2 minutes, correspondant au temps de rétention de la choline (voir Matériels et Méthodes), met en évidence la présence de choline (263 picomoles). Le second, à 11 minutes, correspondant au temps de rétention de l'acétylcholine (11,3 min +/- 2%), met en évidence la présence d'acétylcholine (49.2 femtomoles). Ces deux pics sont absents lorsque l'expérience est réalisée en absence de réacteur (Figure 3 – courbe « contrôle échantillon testé sans réacteur »). La quantité d'acétylcholine est faible, mais au-dessus du seuil de détection de cette technologie.

Détection de l'acétylcholine par immunofluorescence au niveau de types cellulaires nerveux et non nerveux de *P. pileus*

Depuis ces dernières années, quelques études utilisent des anticorps de synthèse dirigés contre des neurotransmetteurs ou des neuropeptides afin de caractériser le système nerveux de Bilatériens (Maric et al. 2001) ou de Cténaïres (Jager et al. 2011a). Nous avons donc décidé d'utiliser un anticorps dirigé contre l'acétylcholine commercialisé par Abcam, afin d'étudier la localisation de cette molécule chez *P. pileus*.

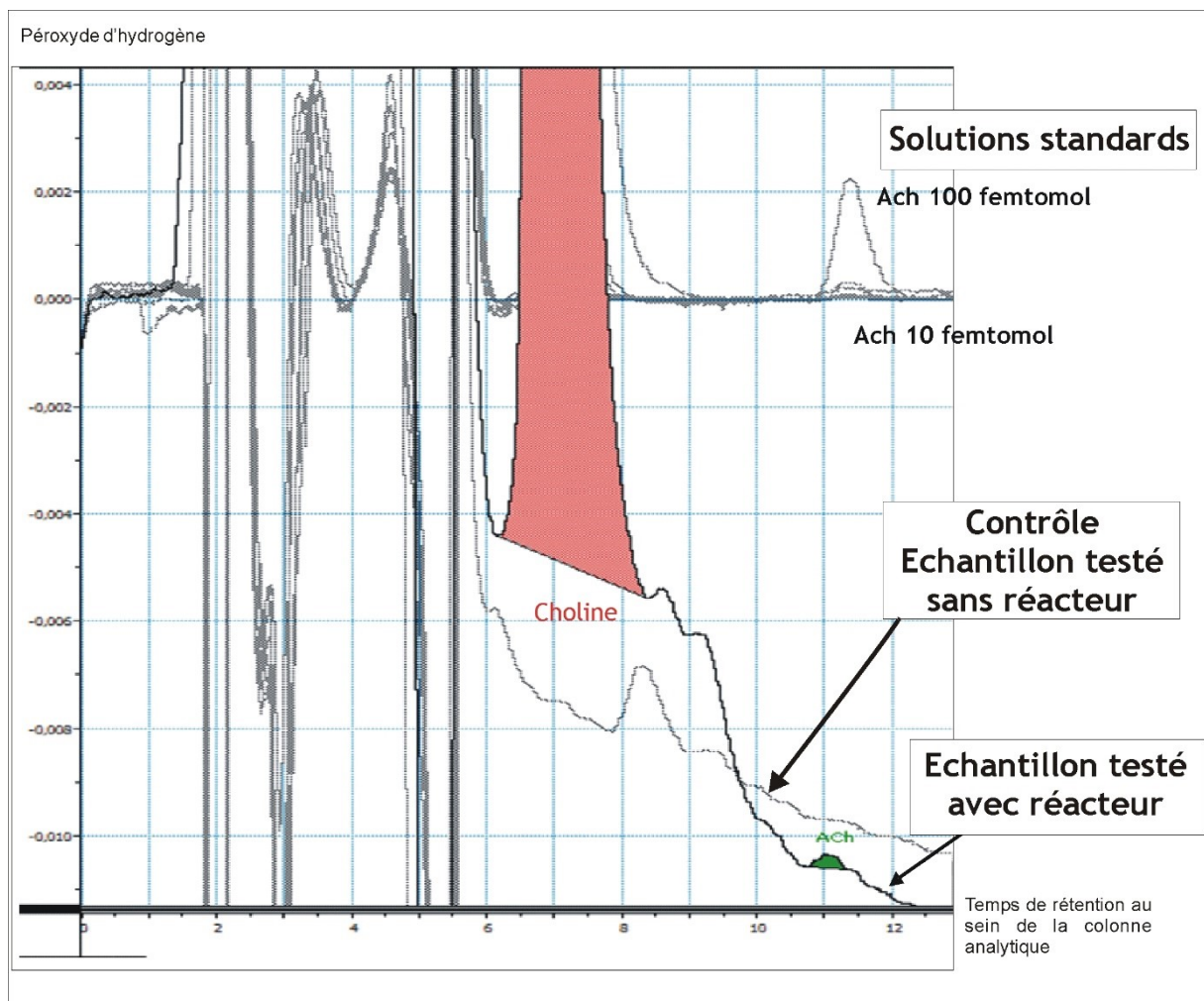


Figure 3 Détection d'acétylcholine et de choline au sein du système tentaculaire (tentacules + tentilles) de *P. pileus*. En abscisse est indiqué le temps de rétention au sein de la colonne analytique de chaque fraction. En ordonnée est indiqué le peroxyde d'hydrogène détecté. Les différentes courbes visualisées correspondent à différentes conditions expérimentales. Les courbes du haut correspondent aux solutions standards d'acétylcholine pour des concentrations de 10 et 100 femtomoles. Le temps de rétention de l'acétylcholine est de 11,3 minutes. Des solutions standards de choline (temps de rétention de 7,2 minutes) ont aussi été testées mais ne sont pas représentées sur cette figure. La courbe intermédiaire présentant un premier pic rouge à 7,2 minutes et un second pic vert à 11 minutes correspond à l'échantillon de tentacules et de tentilles testé. Ces deux pics mettent en évidence la présence de choline et d'acétylcholine dans l'échantillon. La courbe noire en bas de la figure correspond à l'échantillon testé sans réacteur et constitue donc un témoin négatif de la réaction. Aucun pic correspondant au temps de rétention de la choline ou de l'acétylcholine n'est observé.

Localisation de l'acétylcholine au niveau de cellules nerveuses et de cellules neurosensorielles de P. pileus

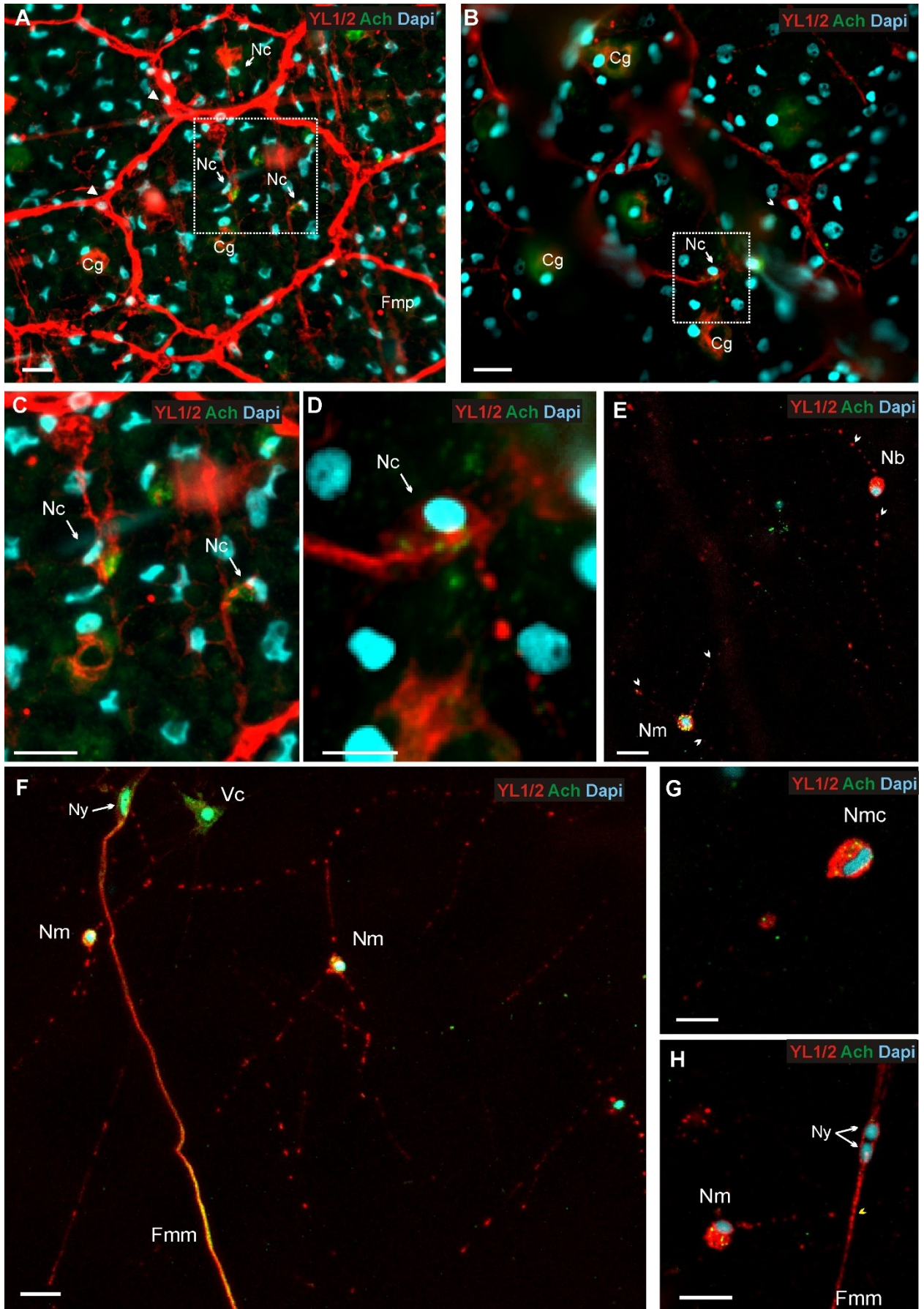
P. pileus présente deux réseaux nerveux distincts (Jager et al. 2011a) : un plexus nerveux compact et polygonal au niveau de l'épithélium ectodermique, ainsi qu'un réseau nerveux plus diffus au niveau de la mésoglée. L'utilisation de l'anticorps anti-acétylcholine montre une sous-population de neurones cholinergiques au niveau épithélial (Figure 4A-D) ainsi qu'au niveau mésogléen (Figure

4E-H). Les corps cellulaires de ces neurones sont marqués. Les cellules nerveuses cholinergiques épithéliales correspondent à une petite proportion des neurones épithéliaux et semblent être concentrées uniquement à proximité du pôle aboral. Les cellules marquées correspondent à des neurones localisés au niveau des segments du plexus (Figure 4B,D) ou à l'intérieur des mailles mais connectés au plexus (Figure 4A,C). La proportion de neurones mésogléens cholinergiques est beaucoup plus importante (Figure 4E-F). Des neurones bi- et multi-polaires sont marqués. On peut observer pour certains d'entre eux un contact entre un neurite et une fibre musculaire mésogléenne (Figure 4H). Certaines cellules musculaires présentent un marquage acétylcholine sur une partie de leur longueur (Figure 4F). L'aspect ponctué du marquage au niveau du corps cellulaire des neurones épithéliaux et mésogléens pourrait faire penser à de petites vésicules de sécrétion intracellulaires contenant de l'acétylcholine.

Au niveau des tentilles, on peut observer que les deux cordons nerveux présents le long de l'axe du tentille sont marqués par l'anticorps anti-acétylcholine (Figure 5 A,A',A''). Les cordons ne sont pas marqués sur toute la longueur du tentille et ceci semble être en lien avec la difficulté de pénétration de l'anticorps au niveau du système tentaculaire. Au niveau des tentacules par contre, le marquage n'est pas associé aux structures nerveuses. Ni les deux cordons localisés au centre du tentacule, ni le manchon nerveux présent en périphérie du tentacule, ne semblent être marqués. L'acétylcholine semble être localisée au niveau de certaines cellules musculaires enchevêtrées entre les cellules nerveuses du tentacule (Figure 5B,B',B'').

Figure 4 Immunolocalisation de l'acétylcholine (ACh) au niveau des systèmes nerveux épidermique (A-D) et mésogléen (E-H). Contre-marquage YL1/2 et Dapi. A) Cellules nerveuses épidermiques acétylcholine-positives connectées aux mailles du réseau nerveux polygonal. Leur corps cellulaire (Nc) est indiqué par une flèche. B) Cellule nerveuse du réseau nerveux polygonal épidermique. Son corps cellulaire (Nc) est inséré au niveau des segments du réseau. C) Grossissement de la zone encadrée en A. D) Grossissement de la zone encadrée en B. En C et en D, on observe l'association du marquage acétylcholine avec le corps cellulaire (Nc) des neurones. Le marquage est ponctué. E-H) Système nerveux mésogléen en microscopie confocale. E) Cellules nerveuses mésogléennes bipolaires (Nb) et multipolaire (Nm) présentant un marquage acétylcholine. Les neurites de ces neurones sont indiqués par des têtes de flèches blanches. F) Réseau nerveux mésogléen dont une large diversité de cellules sont marquées par l'acétylcholine : des neurones mésogléens (Nm), une fibre musculaire mésogléenne (Fmm) et une cellule à vacuole (Vc). On note à droite un neurone mésogléen ne présentant pas d'acétylcholine. G) Grossissement du corps cellulaire d'un neurone acétylcholine-positif. Le marquage acétylcholine est ponctué. H) Grossissement d'une zone de contact (tête de flèche jaune) entre le neurite d'un neurone mésogléen (Nm) ACh-positif et une fibre musculaire mésogléenne (Fmm). *Cg, cellules*

glandulaires, Fmm : Fibre musculaire mésogléenne, Fmp : Fibre musculaire pariétale, Nb : Neurone bipolaire, Nc : corps cellulaire de neurone du réseau épidermique, Nm : neurone multipolaire, Ny : noyau de cellule musculaire, Vc : cellule à vacuole. Echelles : A,B, E, F : 10 µm, C,D,G,H : 5 µm.



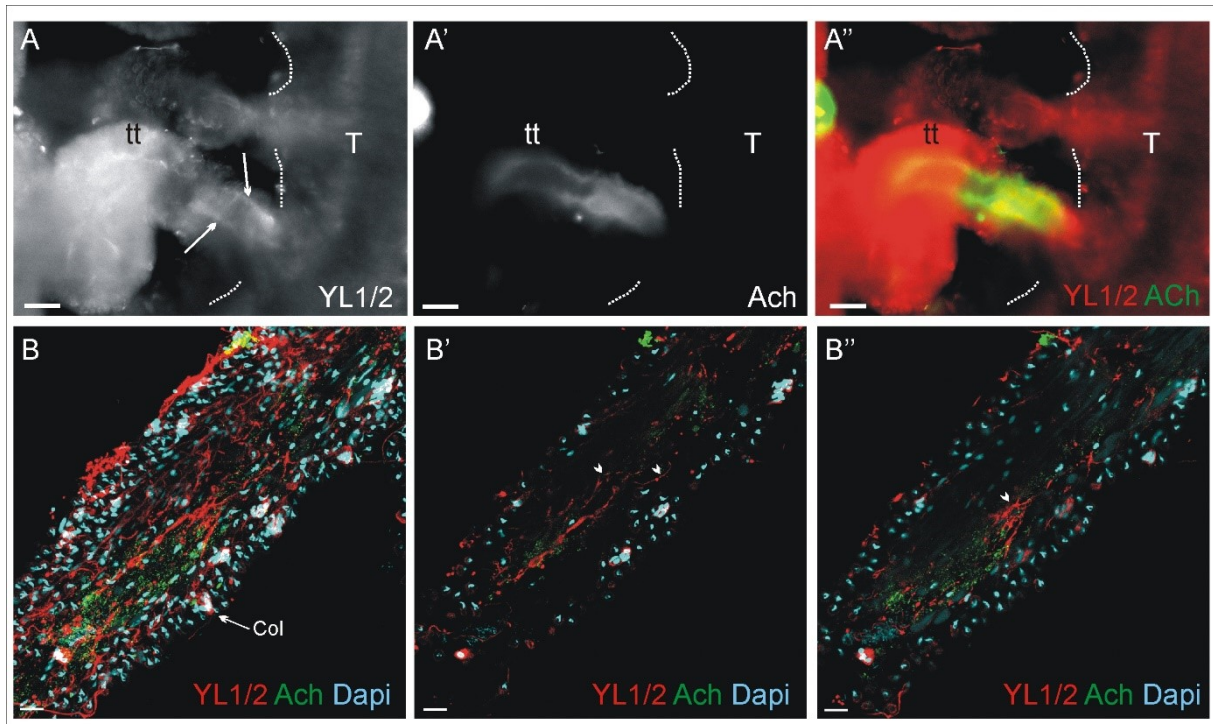


Figure 5 Immunolocalisation de l'acétylcholine au niveau d'un tentille (A-A'') et d'un tentacule (B-B''). Contre-marquage YL1/2 et Dapi. A) Marquage YL1/2 et A') Marquage ACh, au niveau d'un tentille (tt). Les cordons nerveux sont indiqués par les flèches. A'') Colocalisation de l'acétylcholine et du marquage YL1/2 dans les cordons nerveux du tentille. Les traits en pointillés délimitent le tentacule. B-B'') Images de microscopie confocale au niveau d'un tentacule. Immunomarquage ACh, YL1/2, Dapi. B) Projection maximale des différents plans focaux. On observe les cordons nerveux YL/2 positifs au centre du tentacule, les colloblastes (col) à la périphérie. Le marquage acétylcholine est ponctué et semble réparti sur une surface importante du tentacule. B'-B') Images confocales obtenues au niveau de différents plans focaux. On peut voir les neurites des cordons nerveux (têtes de flèches blanches). Aucune colocalisation n'a pu être observée entre le marquage acétylcholine et YL1/2 et l'acétylcholine semble être aux cellules musculaires du tentacule. Col : colloblaste, T : tentacule, tt : tentille. Echelles : A-A'' : 25 μ m ; B-B'' : 10 μ m.

On observe de plus la localisation de l'acétylcholine au niveau du système nerveux épidermique associé à la bouche. L'observation du marquage acétylcholine met en évidence une forte concentration de cellules acétylcholine-positives au niveau de la bouche (Figure 6A,B), zone au niveau de laquelle le réseau nerveux épidermique est très dense et orienté parallèlement à la bouche (Figure 6C). L'observation en microscopie confocale (Figure 6D,E) met en évidence un marquage au niveau de corps cellulaires de cellules nerveuses. Le marquage acétylcholine est toujours associé à un noyau (Figure 6D) et beaucoup de ces corps cellulaires acétylcholine-positifs sont, soit associés à des prolongements nerveux (mis en évidence par le marquage YL1/2) (Figure 6D, E-E', têtes de flèches blanches), soit eux-mêmes YL1/2 positifs (Figure 6D, E-E', flèches blanches).

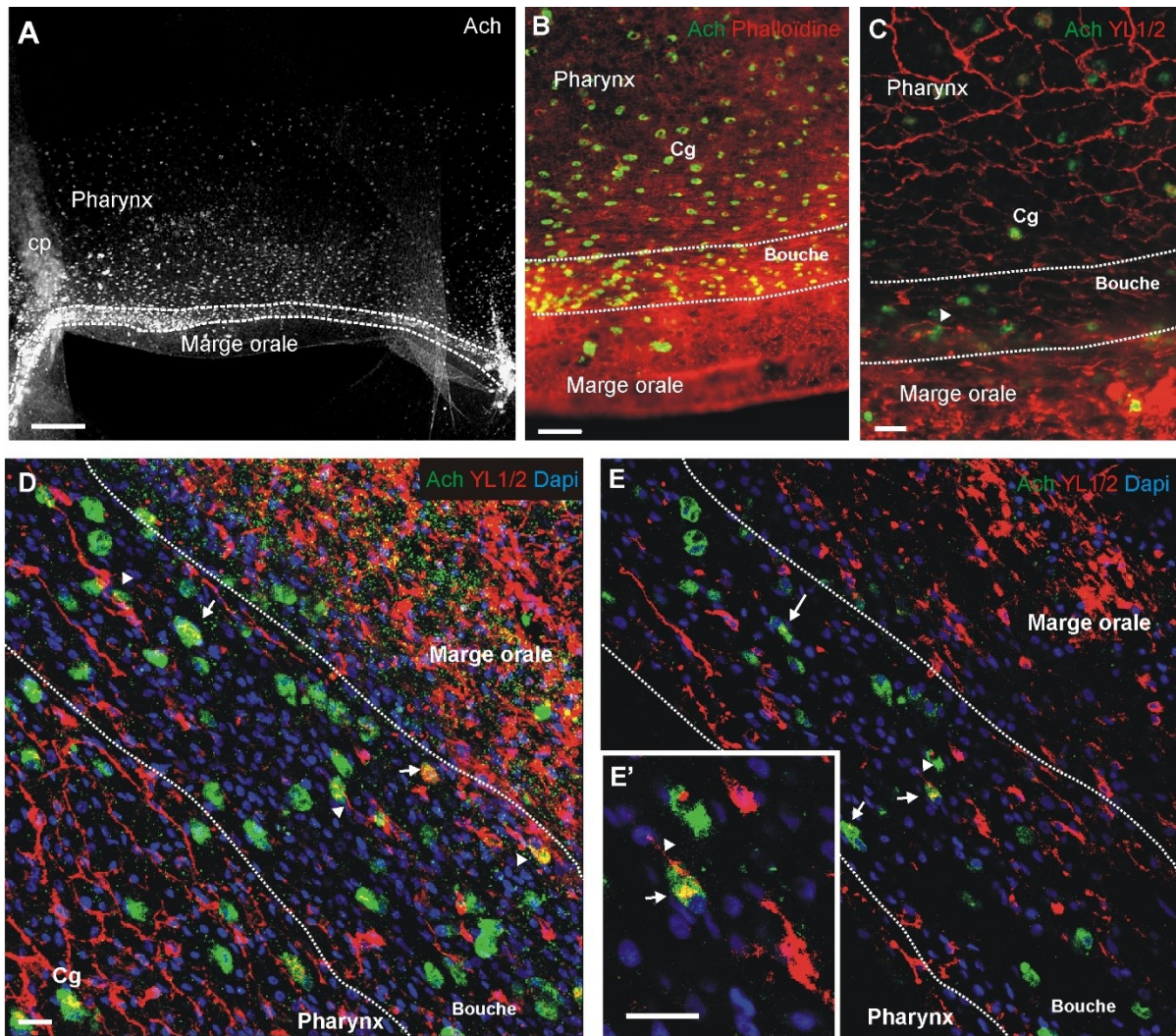


Figure 6 : Immunolocalisation de l'acétylcholine au niveau du système nerveux épidermique de la bouche. A) Vue générale de l'extrémité orale de l'animal. Immunomarquage acétylcholine fortement concentré au niveau de la bouche (délimitée par des traits en pointillés). Marquage quasiment absent au niveau de la marge orale. B) Immunolocalisation de l'acétylcholine et contre-marquage phalloïdine. C) Contre-marquage acétylcholine/YL1/2 où l'on peut voir l'aspect du réseau nerveux épidermique au niveau de la bouche. On observe une forte augmentation de la densité du réseau ainsi qu'une orientation privilégiée parallèle à la bouche (tête de flèche blanche). D-E') Images de microscopie confocale mettant en évidence l'association du marquage acétylcholine avec le système nerveux de la bouche. D) Projection maximale. E) image au niveau d'un seul plan focal. E') Grossissement de E. Les cellules acétylcholine-positives sont aussi YL1/2-positives (flèches blanches) ou sont associées avec des neurites marquée en YL1/2 (têtes de flèches blanches) et semblent donc correspondre à des neurones. Cg : cellule glandulaire. Echelles : A : 200 μ m, B-C : 25 μ m, D-E' : 10 μ m.

Au niveau du complexe aboral, de l'acétylcholine a été détectée uniquement au niveau des champs polaires. On observe un marquage le long d'une ligne continue, bordant les corps Z, au niveau du bord interne de la zone marginale des champs polaires (Figure 7A-D). Ce marquage évoque celui obtenu lors de l'utilisation des anticorps anti-Noradrénaline, anti-Vmat2 (*catecholamine transporter*), anti-TH (*tyrosine hydroxylase enzyme*) et anti-L-dopa (Jager et al. 2013 et Chapitre 1, page 67).

En ce qui concerne les peignes, une proportion importante de cellules des peignes sont acétylcholine-positives (Figure 8). Ces cellules sont localisées uniquement au niveau de la moitié

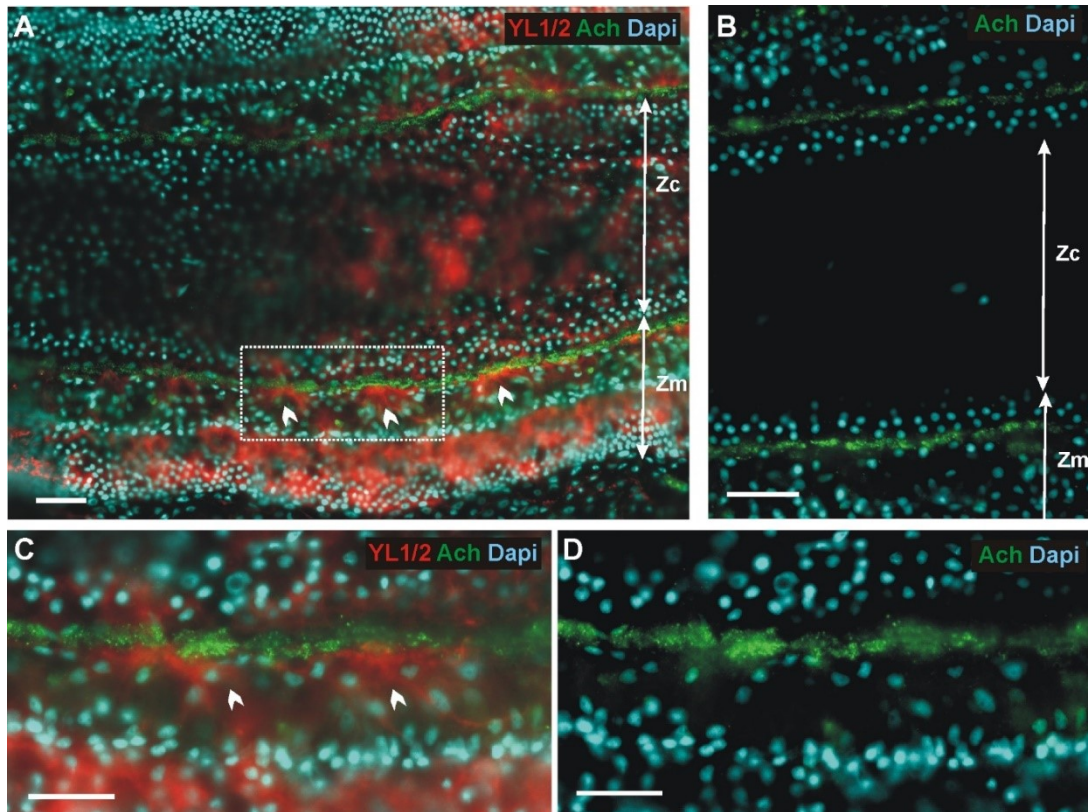
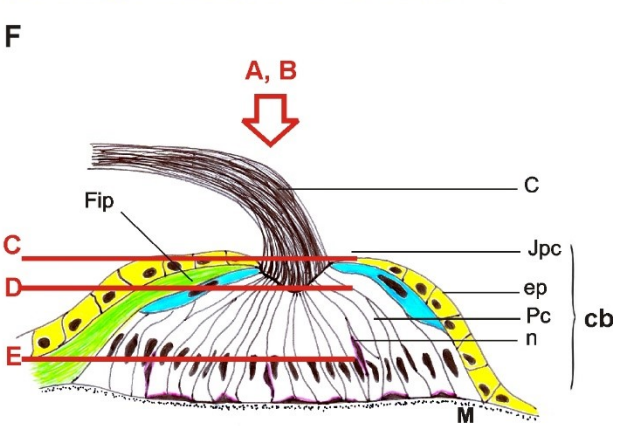
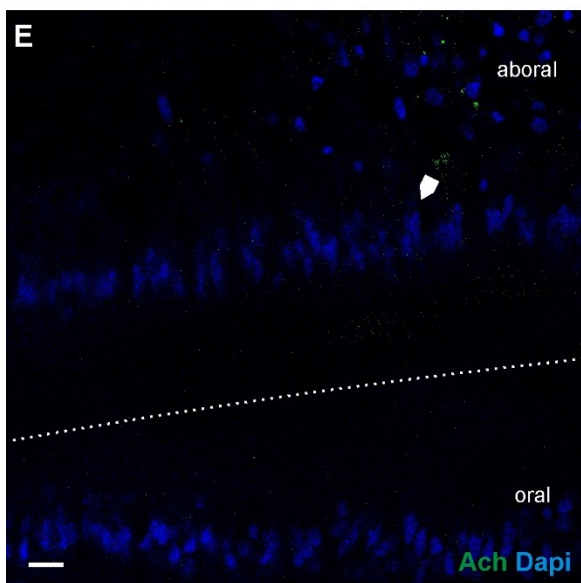
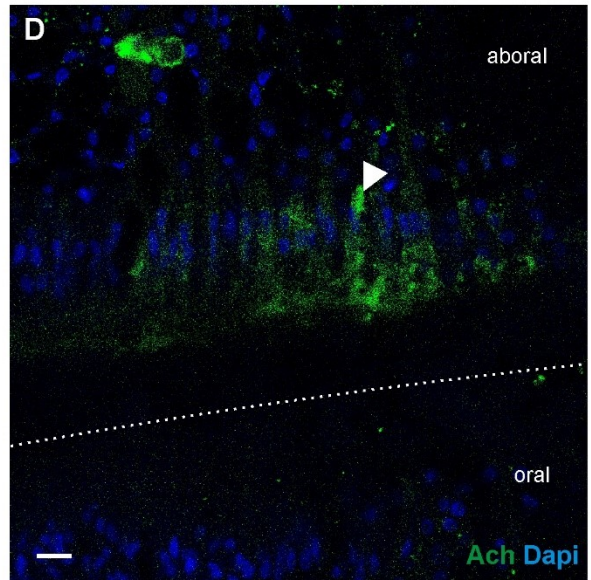
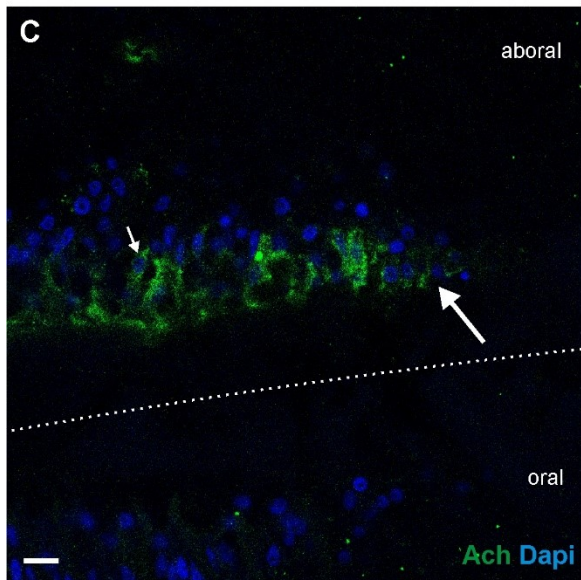
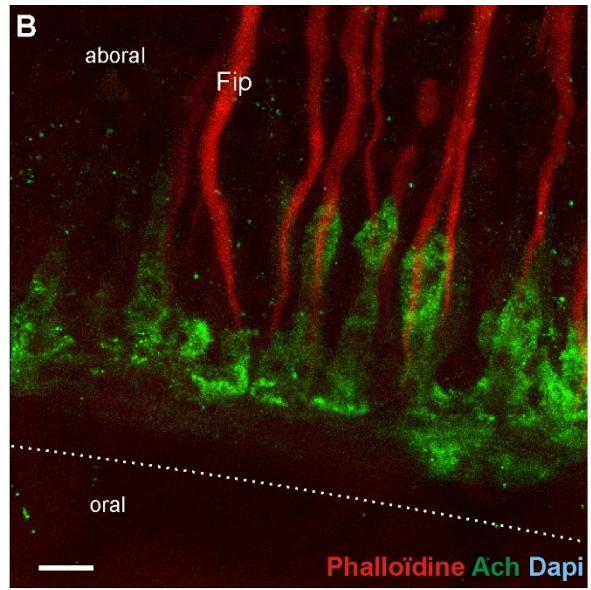
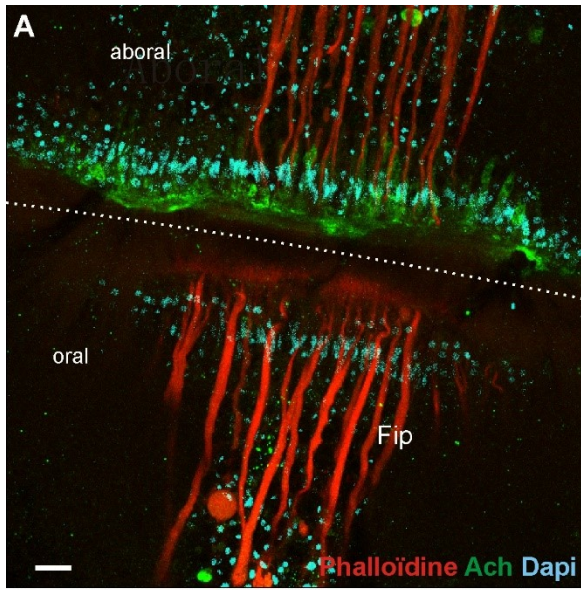


Figure 7 : Immunolocalisation de l'acétylcholine (ACh) au niveau de la bordure interne de la zone marginale des champs polaires. A) Contre marquage YL1/2 et Dapi mettant en évidence le marquage acétylcholine au niveau d'une ligne localisée sur le bord interne de la zone marginale (Zm). Cette ligne se situe à proximité et en position interne par rapport aux corps Z (indiqués par des têtes de flèches blanches). B) Visualisation de la ligne acétylcholine positive sur le bord interne de la zone marginale (Zm). C-D) Grossissements de la zone encadrée en A. Les têtes de flèches blanches en A et C indiquent les corps Z pour lesquels les neurites sont bien visibles. Zc : zone centrale, Zm : zone marginale. Echelles : A : 20 μm ; B : 25 μm ; C-D : 10 μm .

Figure 8 : Immunolocalisation de l'acétylcholine au niveau des rangées de peignes. Contre marquage phalloïdine en rouge et Dapi en bleu. A) Peigne vu de dessus sur lequel on observe un marquage acétylcholine localisé au niveau aboral du peigne. La ligne en pointillé permet de visualiser la ligne médiane du peigne. Fip : Fibres inter-peignes. B) Grossissement au niveau aboral du peigne sur lequel on observe l'extrémité des fibres inter-peignes (Fip) en étroit contact avec les cellules acétylcholine-positives du peigne. C-E) Images en microscopie confocale au niveau de différents plans focaux répartis sur la hauteur du coussinet basilaire du peigne (cb en F). Les différents niveaux sont indiqués en F). C) Localisation de l'acétylcholine au niveau superficiel du peigne. Les cellules marquées possèdent un noyau rond (flèches blanches) et correspondent aux cellules de l'épiderme du peigne (ep en jaune en F). D) Localisation de l'acétylcholine à un niveau plus profond du peigne correspondant à la zone des *polster cells* en différenciation. Les cellules marquées possèdent un noyau allongé (têtes de flèches blanches). E) Image en profondeur. Aucun marquage acétylcholine. Les noyaux allongés (tête de flèche blanche) sont ceux des *polster cells* différenciées localisées à la base du coussinet basilaire du peigne (cb en F). F) Schéma d'un peigne en coupe transversale où les différents niveaux des plans focaux visualisés sur les images C à E sont indiqués. C : palette de cils, cb : coussinet basilaire, Ep : épiderme, Fip : fibres inter-peignes, Jpc : *polster cell* en cours de différenciation, M : mésogée, n : neurone, Pc : *polster cell* mature. Echelles : A : 20 μm , A-E : 10 μm .



aborale de chaque peigne (Figure 8A,B). Un noyau étant toujours associé au marquage, l'acétylcholine semble être présente au niveau de leur cytoplasme (Figure 8C-D). L'analyse du marquage à différents niveaux de profondeur d'un peigne vu de dessus (Figure 8C,D,E) suggère que différents types cellulaires sont marqués. On observe pour commencer un marquage de cellules localisées en superficie du peigne (Figure 8A,C). Ces cellules possèdent un noyau rond et sont différentes des *polster cells* qui possèdent un noyau allongé. Il s'agirait de cellules localisées au niveau de l'épithélium du peigne (voir Chapitre 1, Figure 1.32 G-G', page 58). Un second type cellulaire est marqué (Figure 8D). Il s'agit de cellules avec un noyau allongé, localisée plus profondément au sein du peigne et qui semblent correspondre à des *polster cells* en cours de différenciation ou encore à des neurones intercalés entre les *polster cells* (Figure 8F). Aucun marquage n'est associé aux noyaux les plus profonds (Figure 8E) qui correspondent aux *polster cells* matures localisées plus profondément (Figure 8F). Il est intéressant de noter que l'extrémité des fibres inter-peignes (phalloïdine positives), qui se connectent au pôle aboral de chaque peigne, semble coïncider avec le marquage acétylcholine (Figure 8B), autrement dit, elles sont en contact étroit avec les cellules acétylcholine-positives.

Localisation de l'acétylcholine au niveau de cellules non nerveuses de P. pileus

Au niveau de la mésoglée et de l'épiderme, on peut observer des cellules acétylcholine-positives qui ne semblent pas être de nature neuronale. Au sein de la mésoglée, une sous-population de cellules à vacuoles est marquée (Figure 9A-B). Ces cellules mésenchymateuses (Jager et al. 2011a) ont une morphologie parfois rapprochée de celle de cellules nerveuses, mais leur richesse en actine (phalloïdine-positives) et la morphologie de leurs prolongements permettent de les en distinguer. Le marquage des cellules à vacuoles est localisé au niveau de leur corps cellulaire et a un aspect ponctué, qui rappelle celui observé au niveau des neurones mésogléens (Figure 9A) et épithéliaux. Au niveau épithélial, on observe un marquage au niveau de cellules glandulaires (Figure 9C-D). Seules les cellules glandulaires de type spumeux sont marquées (Figure 9D) ; les cellules glandulaires de type granuleux ne présentent aucun marquage (Figure 9C). L'aspect du marquage est différent de celui des neurones ou des cellules à vacuoles et semble être beaucoup plus homogène au sein du cytoplasme (Figure 9D).

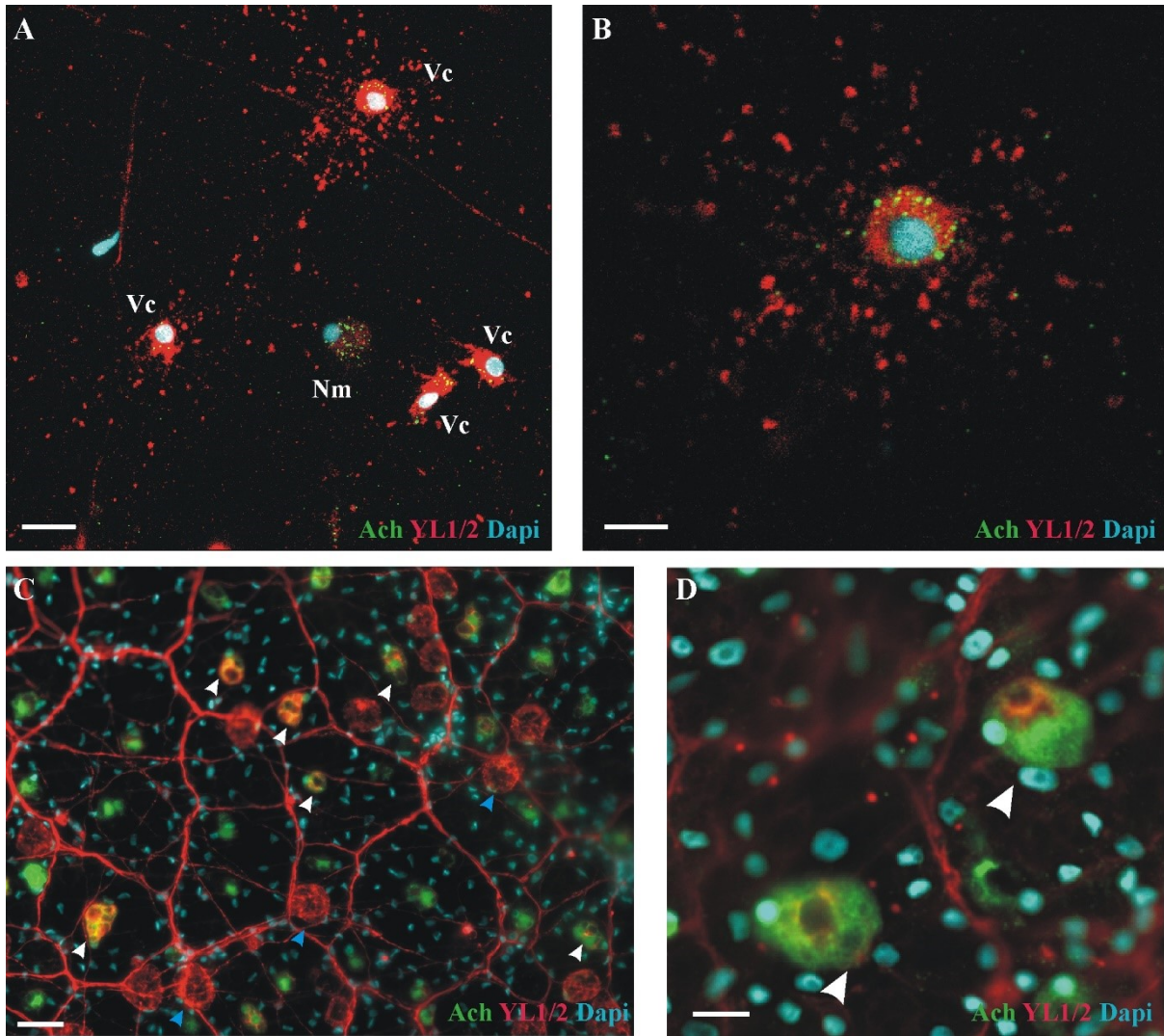


Figure 9 Immunolocalisation de l'acétylcholine au niveau de cellules non nerveuses de la mésoglée (A-B) et de l'épiderme (C-D). Contre marquage YL1/2 en rouge et Dapi en bleu. A-B) Images en microscopie confocale au niveau de la mésoglée. Projections maximales. A) Vue générale du réseau mésogléen où l'on observe des cellules à vacuoles (Vc, cellule de Franc) acétylcholine-positives. Ces cellules possèdent de nombreux prolongements. On observe de plus un neurone mésogléen acétylcholine-positif (Nm). *Nm* : Neurone mésogléen, *Vc* : cellule à vacuole. B) Grossissement au niveau d'une cellule à vacuole. L'aspect du marquage acétylcholine est ponctué. C) Cellules glandulaires de l'épiderme acétylcholine-positives. Un seul type de cellules glandulaires (cellules spumeuses, têtes de flèches blanches) est marqué. Les cellules glandulaires de type granulaire (têtes de flèches bleues) ne sont pas marquées. D) Grossissement au niveau de cellule glandulaire spumeuse acétylcholine-positives (têtes de flèches blanches). Echelles : A, D : 10 μm ; B : 5 μm ; C : 25 μm .

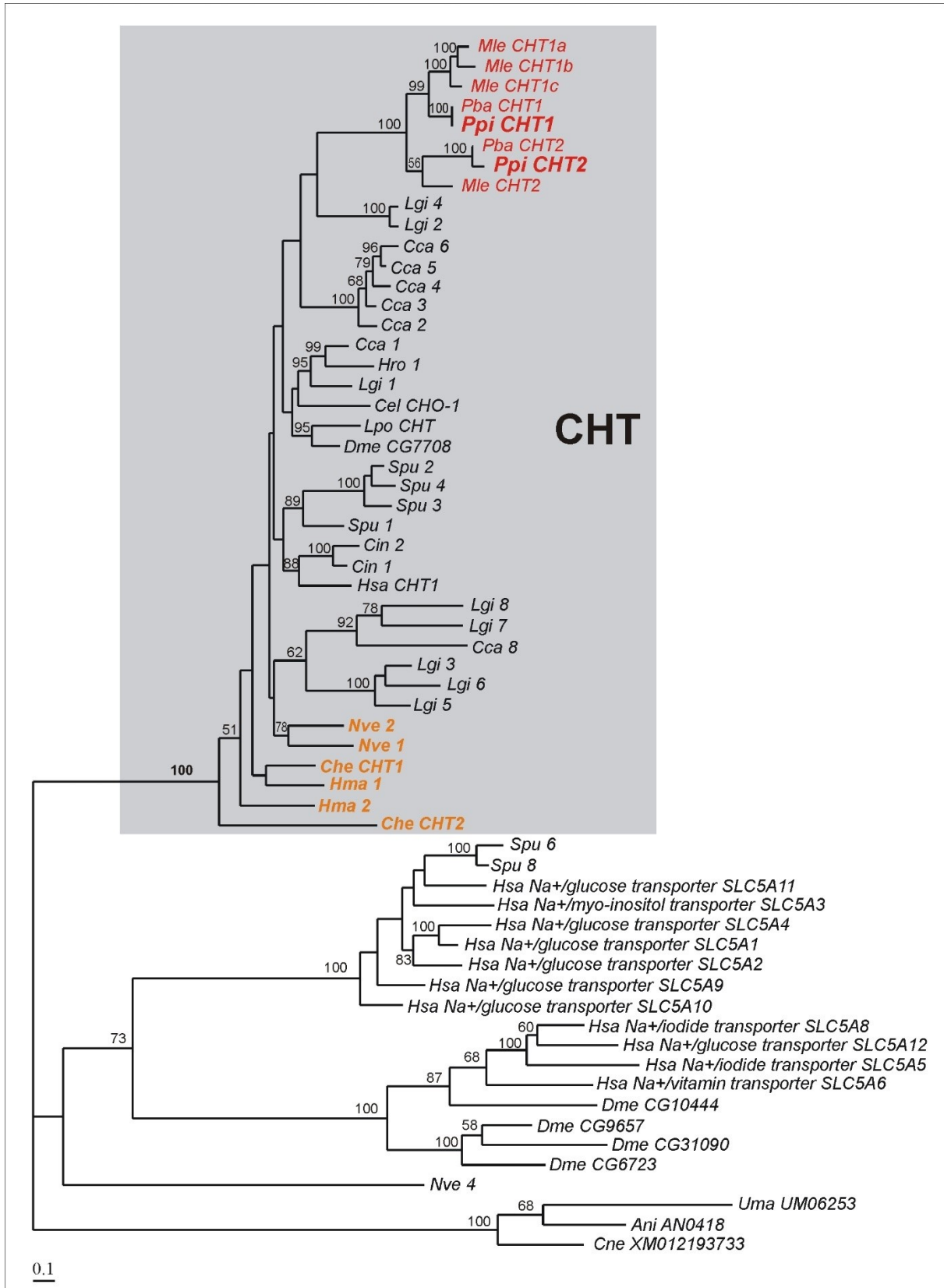
Analyses phylogénétiques des différents acteurs du système cholinergique

Les Cténaïres possèdent plusieurs paralogues de la famille des Transporteurs de Haute affinité de la Choline (CHT)

Le transporteur de haute affinité de la choline (CHT) fait partie de la famille multigénique des co-transporteurs à Na⁺. L'analyse phylogénétique montre que les transporteurs CHT forment un groupe d'orthologie dont la monophylie est fortement soutenue (Figure 10). Les deux espèces du genre *Pleurobrachia* présentent 2 paralogues (CHT1 et CHT2) issus d'une duplication spécifique aux Cténaïres. *Mnemiopsis leidyi* présente 4 paralogues, dont 3 sont issus de duplications supplémentaires de CHT1. Aucun orthologue n'a pu être détecté au sein des génomes de Placozoaires, de Spongiaires et en dehors des Métazoaires, de Choanoflagellés, Ichthyosporidés et de champignons. Cette famille semble donc propre aux Cténaïres, aux Cnidaires et aux Bilatériens et constitue donc une synapomorphie moléculaire des Eumétazoaires. Un seul paralogue est présent au sein du génome humain, alors que la plupart des espèces de l'échantillonnage taxonomique présentent plusieurs paralogues (à l'exception de *D. melanogaster* et de *C. elegans*).

Figure 10 : Arbre des co-transporteurs à Na⁺, obtenu en Maximum de Vraisemblance à partir des séquences protéiques. Pour ne pas surcharger l'arbre, les séquences non-CHT n'ont été incluses dans cette analyse que pour l'homme, la drosophile, l'oursin, les Cnidaires. La racine est représentée par trois séquences de champignons (*Ani* : *Aspergillus nidulans* ; *Uma* : *Ustilago maydis* ; *Cne* : *Cryptococcus neoformans*). En l'absence de nom ou de numéro de code disponibles dans les bases de données, les gènes sont désignés par des numéros arbitraires placés après les abréviations de noms d'espèces. Les valeurs de bootstrap associées aux différentes branches sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 50%. Abréviations des noms d'espèces : *Ani* : *Aspergillus niger* (Fungi, Ascomycota), *Cne* : *Cryptococcus neoformans* (Fungi, Basidiomycota) ; *Cca* : *Capitella capitata* (annélide) ; *Cel* : *Caenorhabditis elegans* (nématode) ; *Che* : *Clytia hemisphaerica* (cnidaire, hydrozoaire) ; *Cin* : *Ciona intestinalis* (urochordé) ; *Dme* : *Drosophila melanogaster* (arthropode) ; *Hma* : *Hydra magnipapillata* (cnidaire, hydrozoaire) ; *Hro* : *Helobdella robusta* (annélide) ; *Hsa* : *Homo sapiens* ; *Lgi* : *Lottia gigantea* (mollusque) ; *Lpo* : *Limulus polyphemus* (arthropode) ; *Mle* : *Mnemiopsis leidyi* (cténaire) ; *Nve* : *Nematostella vectensis* (cnidaire, anthozoaire) ; *Pba* : *Pleurobrachia bachei* *Ppi* : *Pleurobrachia pileus*

(cténaire) ; *Spu* : *Strongylocentrotus purpuratus* (échinoderme) ; *Uma* : *Ustilago maydis* (Fungi, Basidiomycota).



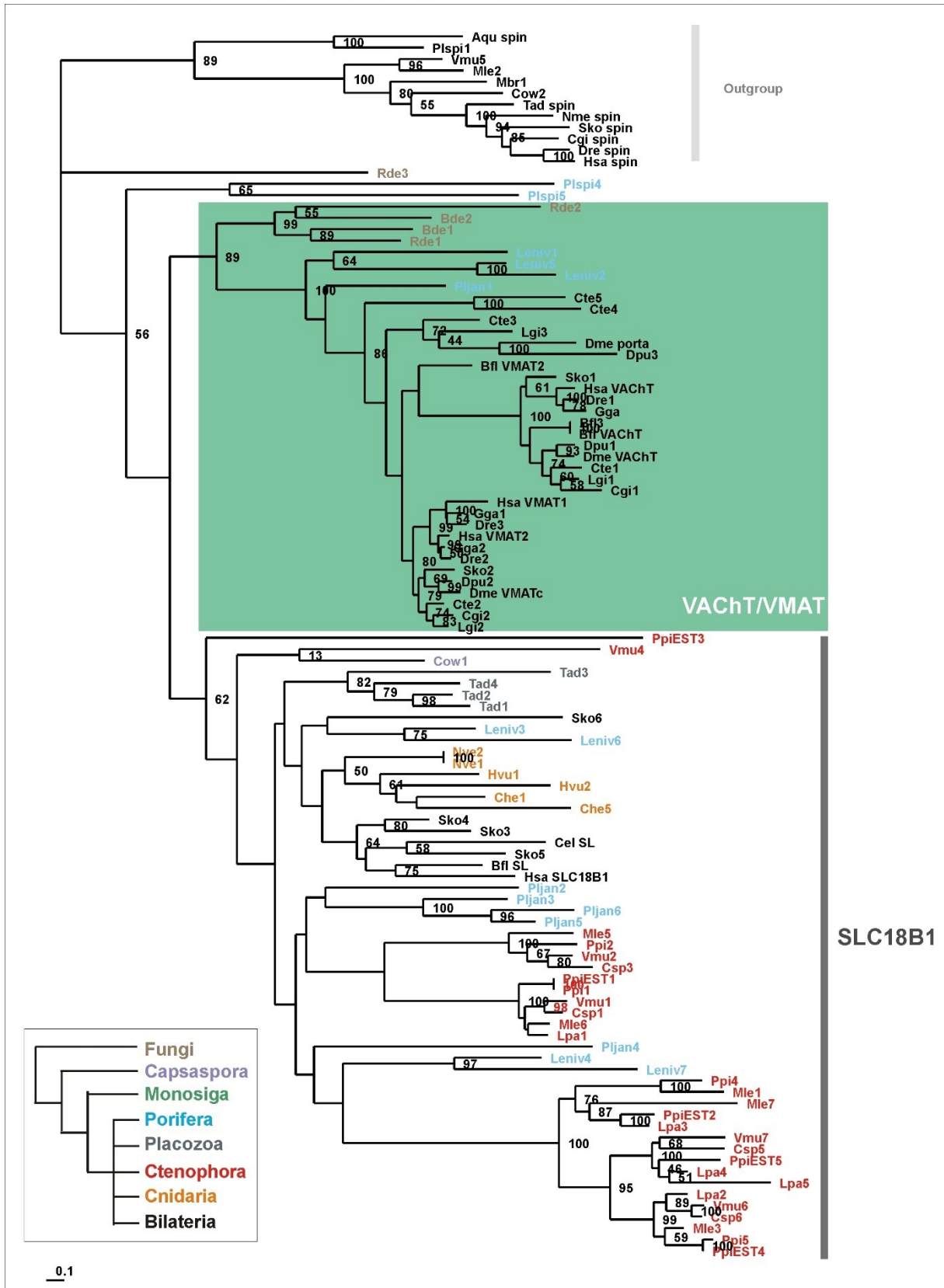
Les Cténaïres ne possèdent pas d'orthologue des enzymes de synthèse de l'acétylcholine (ChAT-CRAT)

L'analyse phylogénétique des acyltransférases CoA-dépendantes montre trois groupes d'orthologie dont on retrouve des représentants à l'échelle des Opisthocontes (chez les champignons *Rhizopus delemar* (Rde), *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bde), chez *Capsaspora owczarzaki* (Cow), *Monosiga brevicolis* (Mbre) et les Métazoaires) : le groupe des ChAT/CrAT/CrOT, le groupe des CPT1 et le groupe des CPT2 (Figure 11). Les Cténaïres présentent des orthologues au sein des groupes CPT1 et CPT2 mais aucun orthologue n'est détecté au sein du groupe ChAT/CrAT/CrOT. Le groupe d'orthologie ChAT/CrAT/CrOT présente cependant des séquences de *Capsaspora owczarzaki* (Opisthoconte), de Spongiaire, de Placozoaire, de Cnidaires et de Bilatériens. On peut donc conclure à une perte chez les Cténaïres. En ce qui concerne les groupes CPT1 et CPT2, tous les taxons sont représentés à l'échelle des Opisthocontes. Les Cténaïres présentent un orthologue de CPT1 et deux paralogues au sein des CPT2 (CPT2.1 et CPT2.2). Cette duplication au sein des CPT2 est spécifique des Cténaïres et est assez remarquable car tous les autres taxons échantillonnés ne possèdent qu'un seul paralogue. On note de plus la longue branche d'un des deux paralogues (CPT2.2).

Les Cténaïres ne possèdent pas d'orthologue du Transporteur Vésiculaire de l'Acétylcholine (VACHT)

L'analyse phylogénétique présentée dans la figure 12 regroupe les séquences de gènes appartenant à la grande famille des « Major facilitator Superfamily » (Lawal & Krantz, 2013) : les transporteurs vésiculaires de l'acétylcholine (VACHT), les transporteurs vésiculaires de monoamines (VMATs), les protéines SLC18B1 (fonction non identifiée) et les protéines Spinster-like (transporteurs de sphingolipides) qui permettent d'enraciner l'arbre. Deux groupes d'orthologie sont identifiés : le groupe d'orthologie VACHT/VMATs et le groupe d'orthologie SLC18B1. Les Cténaïres ne présentent pas d'orthologue de VACHT. La présence de séquences de Bilatériens, de Spongiaires et de non-Métazoaires au sein du groupe VACHT/VMATs permet de conclure à une perte chez les Cténaïres, tout comme chez les Cnidaires et les Placozoaires. La duplication VACHT/VMATs est spécifique des Bilatériens. Au sein du groupe SLC18B1, les Cténaïres présentent de nombreux paralogues issus de duplications successives.

Figure 12 Arbre des transporteurs de la famille VACHT (transporteur vésiculaire de l'acétylcholine) obtenu en Maximum de Vraisemblance à partir de séquences protéiques. L'arbre est raciné sur quelques séquences de gènes codant pour les protéines Spinster-like, protéines appartenant à la famille des Major Facilitator Superfamily à laquelle appartient VACHT. Le groupe d'orthologie VACHT/VMAT est encadré en vert et le groupe d'orthologie SLC18B1 est annoté en gris. Les séquences de Champignons sont indiquées en marron, de *Capsaspora* en mauve, de *Monosiga* en vert, des Eponges en bleu, des Placozoaires en gris, des Cténaïres en rouge, des Cnidaires en orange et des Bilatériens en noir. Les valeurs de bootstrap sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 50%. Abréviations : **Dre** : *Danio rerio* (Vertebrata) ; **Gga** : *Gallus gallus* (Vertebrata) ; **Leniv** : *Leuconia nivea* (Porifera, Calcarea) ; **Pljan** : *Plakina janusi* (Porifera, Homoscleromorpha) ; **Plspi** : *Pleraplysilla spiniferre* (Porifera, Demospongiae). Pour les autres espèces, voir légende des Figures 10 et 11.

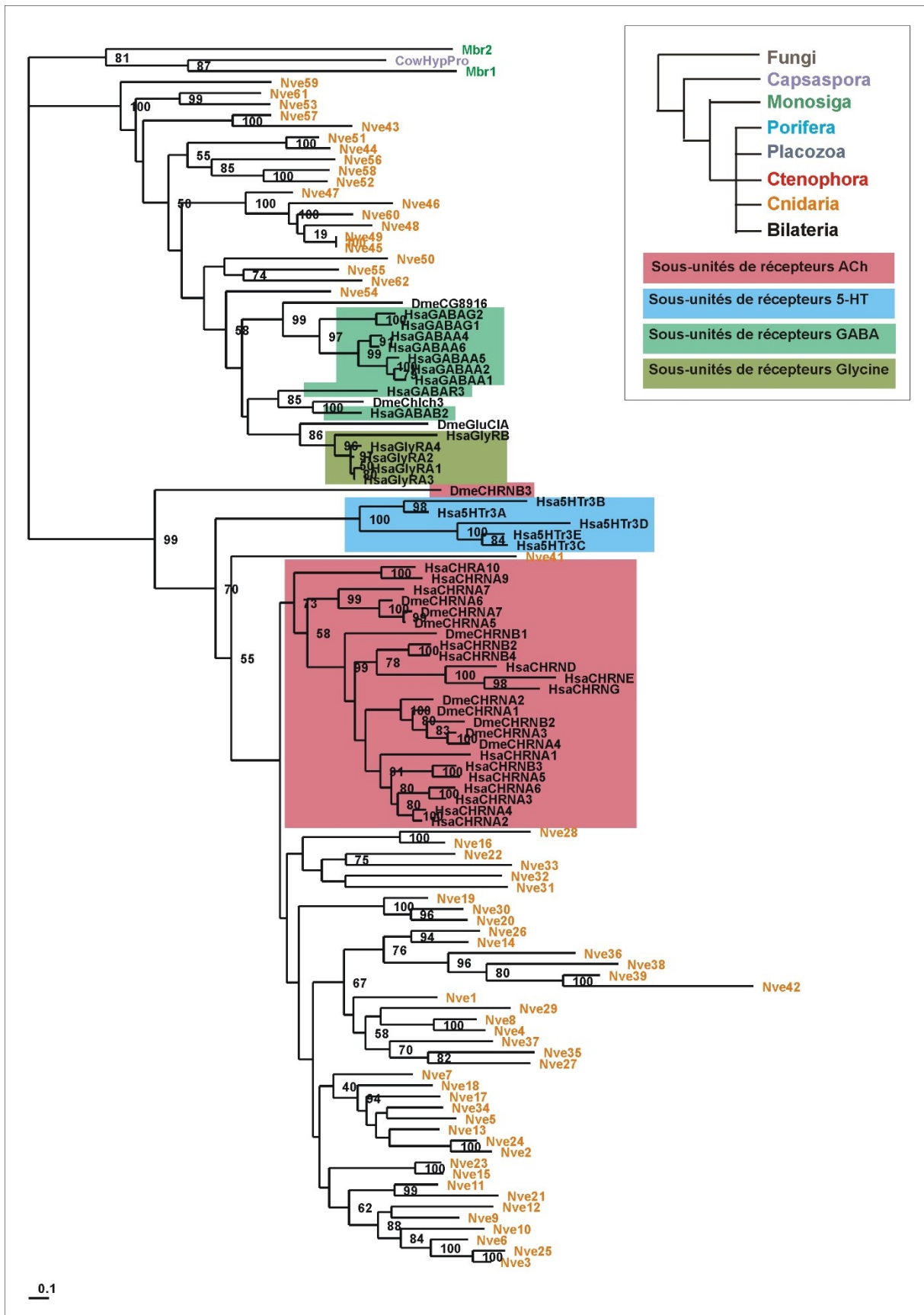


Récepteurs à l'acétylcholine (nicotiniques et muscariniques)

L'analyse phylogénétique présentée sur la Figure 13 correspond à la recherche d'orthologues des différentes sous-unités des cys-loop récepteurs de l'Homme. Les cys-loop récepteurs sont les récepteurs ionotropiques à l'acétylcholine (récepteurs nicotiniques), à la sérotonine (5-HT), au GABA et à la glycine. Ils sont composés de 5 sous-unités. Il existe 5 types de sous-unités (α , β , δ , ϵ , γ), les récepteurs de l'acétylcholine étant composés d'au moins 2 sous-unités α (sur les 5 qui constituent le récepteur), permettant la liaison à l'acétylcholine. Aucun orthologue de sous-unités de cys-loop récepteurs n'est présent chez les Cténophores, les Porifères ou chez les Fungi. Ainsi, cette famille de récepteurs ionotropiques est complètement absente au sein de ces embranchements. On note cependant la présence d'orthologues chez *Monosiga brevicollis* (Mbr – Choanoflagellata) et chez *Capsaspora owczarzaki* (Cow - Ichthyosporea). Ceci suggère l'existence d'orthologues de sous-unités de cys-loop récepteurs chez l'ancêtre commun des Opisthocontes. L'absence de cys-loop récepteurs chez les Cténaïres et les Porifères serait donc liée à des pertes probablement indépendantes et non à une absence ancestrale. On peut donc conclure que si les Cténaïres ont des récepteurs à l'acétylcholine, cela ne peut pas être des homologues du récepteur nicotinique des Bilatériens. On observe de plus que l'ensemble des gènes codant pour les sous-unités des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine de Bilatériens forment un groupe monophylétique (la séquence de la Drosophile *DmeCHRN3* étant divergente, sa position est à nuancer). Le cas des gènes codant pour les sous-unités des récepteurs de la sérotonine (5-HT) est similaire. Les Cnidaires (*Nematostella vectensis*) possèdent de nombreuses séquences orthologues des sous-unités des récepteurs à l'acétylcholine dont la position est toutefois peu soutenue.

Figure 13 Arbre des différentes sous-unités des cys-loop récepteurs obtenu en Maximum de Vraisemblance à partir de séquences protéiques. Les sous-unités des récepteurs de l'acétylcholine sont encadrées en rouge, celles des récepteurs de la sérotonine (5-HT) en bleu, celles des récepteurs du GABA en vert clair et celles des récepteurs de la glycine en vert foncé. Les sous-unités qui ne sont pas encadrées en couleurs correspondent à des récepteurs liant d'autres ligands (en ce qui concerne les Bilatériens) ou pour lesquels la fonction n'a pas été caractérisée (en ce qui concerne les autres taxons). En ce qui concerne les Bilatériens, la nomenclature utilisée pour les noms de séquences est la suivante : [Taxon, Ligand, type de sous-unité]. Les sous-unités de type α , β , δ , ϵ , γ sont indiquées respectivement par la lettre A, B, D, E, G. Les séquences de Champignons sont indiquées en marron, de *Capsaspora* en mauve, de *Monosiga* en vert, des Eponges en bleu, des Placozoaires en gris, des Cténaïres en rouge, des Cnidaires en orange et des Bilatériens en noir. Les valeurs

de bootstrap sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 50%. Pour les noms d'espèces voir légende de la Figure 10.



Les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine sont des récepteurs métabotropiques qui appartiennent à la grande famille des GPCR (Récepteurs couplés aux protéines G).

L'analyse phylogénétique présentée sur la Figure 14 montre que tous les récepteurs métabotropiques à de petites amines (acétylcholine, adrénaline, histamine, dopamine, sérotonine, octopamine) caractérisés chez les bilatériens forment un groupe monophylétique. On ne trouve pas de protéines orthologues à ce groupe chez *Monosiga brevicollis* (Mbr – Choanoflagellata), chez *Capsaspora owczarzaki* (Cow - Ichthyosporea), ni chez les Porifères (Aqu – *Amphimedon queenslandica*). En revanche, ce groupe comporte de nombreux gènes de Cnidaires, et seulement 3 gènes de Cténares. On observe au sein des bilatériens, que les relations d'orthologie ne semblent pas être en lien avec l'association d'un récepteur à un ligand donné. Par exemple, les récepteurs à la sérotonine (en orange sur la Figure 14), ou encore à l'adrénaline (en violet sur la Figure 14), forment des ensembles très polyphylétiques. Ceci montre donc que ces récepteurs changent facilement de ligand, au cours de l'évolution. Ainsi, pour un récepteur de ce groupe qui n'a pas encore été caractérisé fonctionnellement, il est impossible de savoir quel est son ligand. On ne peut donc pas conclure que les Cténares ne possèdent pas (fonctionnellement) de récepteur à l'acétylcholine (comme cela est affirmé par Moroz et al. 2014). Il est possible que les 3 gènes de Cténares mis en évidence dans cette analyse codent pour des récepteurs à tel ou tel de ces neurotransmetteurs, et l'un d'entre eux pourrait très bien être un récepteur de l'acétylcholine.

Figure 14 Arbre des récepteurs métabotropiques de l'acétylcholine et autres petites amines, obtenu en Maximum de Vraisemblance à partir de séquences protéiques. Les récepteurs métabotropiques de l'acétylcholine appartiennent à la grande famille des GPCR (Récepteurs couplés aux protéines G). L'arbre est raciné sur 4 séquences de Spongiaires. Le groupe d'orthologie contenant les récepteurs métabotropiques « à de petites amines » des Bilatériens en encadré en noir. Il s'agit des récepteurs à l'acétylcholine, l'adrénaline, l'histamine, la dopamine, la sérotonine et à l'octopamine. Chez les Bilatériens, une couleur a été donnée à la séquence en fonction du type de ligand lié par le récepteur (l'adrénaline en violet, l'histamine en bleu foncé, l'acétylcholine en rouge, la dopamine en bleu clair, la sérotonine en orange et l'octopamine en vert. De plus, les séquences de Cténares sont encadrées en rouge et celles de Cnidaires en orange. Il est important de noter que les séquences de *Pleurobrachia pileus* n'ont pas été intégrées à l'analyse (Cténares représentés seulement par *Mnemiopsis leidy*). Les valeurs de bootstrap sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 50%. Pour les noms d'espèces, voir légende de la Figure 10.

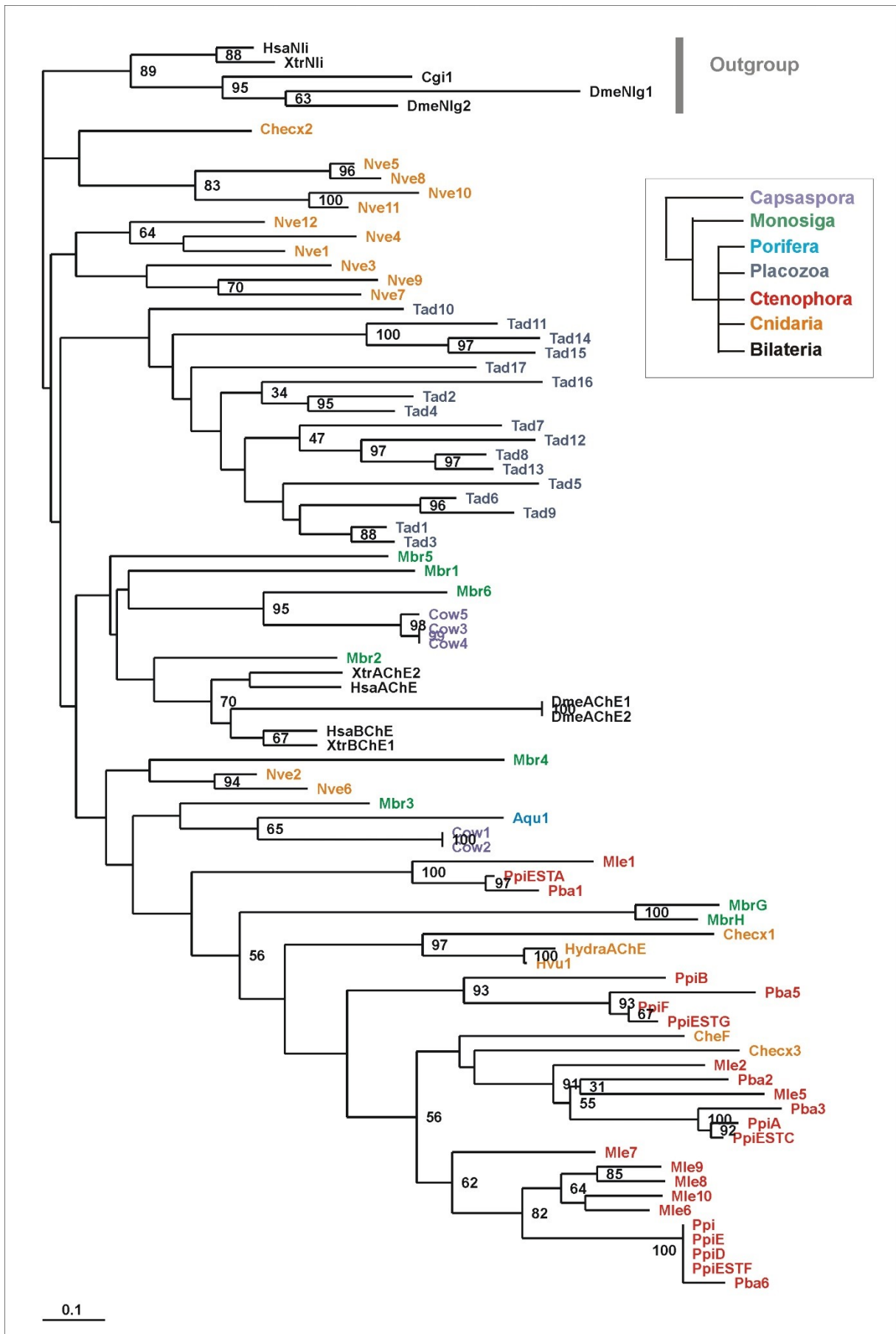
Enzyme de dégradation de l'acétylcholine (AChE)

La topologie présentée Figure 15 présente une analyse phylogénétique des cholinestérases (Acétylcholinestérase, AChE, et Butyrylcholinestérase, BChE), enracinée sur quelques séquences de Neurologines (protéines formant, avec les cholinestérases, une sous-famille des CO-estérases, Pezzementi & Chatonnet 2010). Les nœuds étant peu soutenus, la reconstruction de l'histoire évolutive des gènes est difficile. On observe cependant la présence d'orthologues de l'acétylcholinestérase chez l'ensemble des Métazoaires ainsi qu'à l'échelle des Opisthocontes (présence chez *Monosiga brevicollis* et *Capsaspora owczarzaki*). Les séquences de Bilatériens sont regroupées au sein d'un même clade. La duplication AChE/BChE est propre aux Bilatériens. Les séquences de Cténaïres sont issues de nombreuses duplications.

L'acétylcholinestérase est une sérine protéase spécifique de l'acétylcholine dont les sites nécessaires à la catalyse enzymatique sont conservés à l'échelle des Bilatériens et des Cnidaires (Denker et al. 2008a, Takahashi & Hamaue 2010, Dvir et al. 2010 – voir Figure 2.16, Chapitre 2). L'alignement des séquences de Cténaïres avec les zones connues pour être impliquées dans la fonction catalytique des protéines de Bilatériens est présenté sur la Figure 16. On observe alors que pour une grande partie des séquences de Cténaïres, la plupart des résidus aromatiques de la gorge catalytique (c à g) ainsi que la sérine du site actif (h) sont conservés. Le site périphérique anionique (a) semble conservé uniquement pour la séquence PpiESTD et le site de liaison à la choline (b) n'est conservé dans aucune des séquences. Ces deux sites ne sont pas non plus conservés au sein des séquences de Cnidaires, pour lesquelles une activité acétylcholinestérase a pourtant été mise en évidence (Denker et al. 2008a, Takahashi & Hamaue 2010). Ces résultats suggèrent donc la conservation d'une activité de type acétylcholinestérase pour les protéines de Cténaïres mais avec une modification de la conformation du site de liaison de la choline.

Figure 15 Arbre des enzymes de la famille AChE (acétylcholinestérase) obtenu en Maximum de vraisemblance à partir de séquences protéiques. L'arbre est raciné sur des séquences de neurologines, appartenant comme l'AChE à la famille des CO-estérases. Les séquences de *Capsaspora* sont indiquées en

mauve, de *Monosiga* en vert, des Eponges en bleu, des Placozoaires en gris, des Cténaïres en rouge, des Cnidaires en orange et des Bilatériens en noir. Pour les noms d'espèces voir les légendes des Figures 10 et 11.



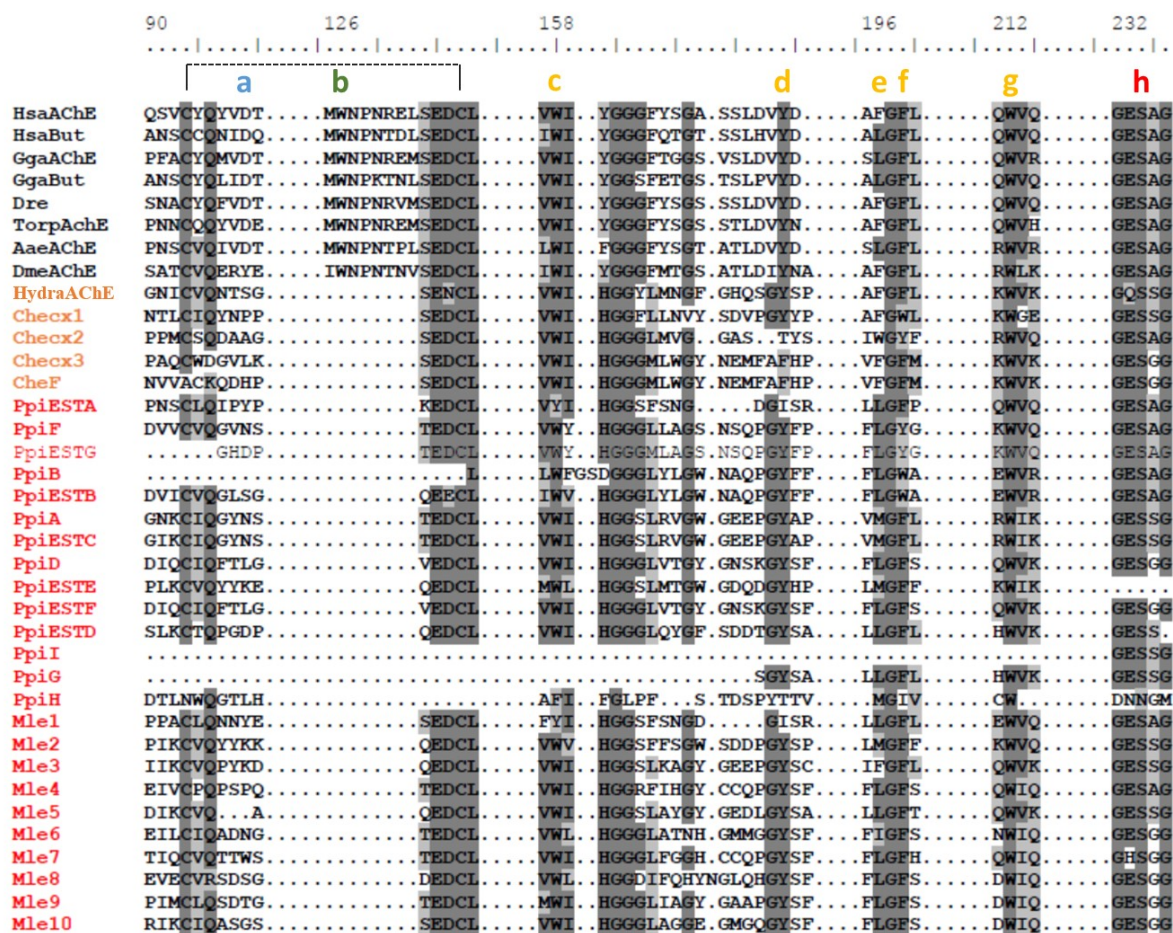


Figure 16 Alignement en acides aminés des positions critiques du site actif de l'acétylcholinestérase des protéines de Bilatériens avec celles de Cnidaires (en orange) et de Cténaïres (en rouge). Avec en a) le site périphérique anionique, en b) le site de liaison de la choline, de c à g) les résidus aromatiques de la gorge catalytique et en h) la sérine du site actif. Le pont disulfure présent au niveau du site actif est indiqué par un trait en pointillé. Les positions conservées sont indiquées en gris. Les chiffres indiqués au-dessus de la figure font référence à la protéine acétylcholinestérase humaine (HsaAChE) et indiquent la position de l'acide aminé au début de chaque bloc.

Détection d'une activité acétylcholinestérase chez *P. pileus*

Détection d'une activité acétylcholinestérase au niveau de cellules nerveuses et de cellules neurosensorielles de P. pileus

La détection de l'activité acétylcholinestérase à l'aide la technique de Karnovsky et Roots (Karnovsky & Roots 1964), met en évidence une activité au niveau de différentes structures nerveuses ou neurosensorielles de l'animal. Cette activité est complètement inhibée en présence de néostigmine ($10^{-2}M$). L'un des résultats les plus spectaculaires concerne la nette association de l'activité acétylcholinestérase avec le réseau nerveux mésogléen de l'axe tentaculaire, organisé selon deux

cordons nerveux orientés longitudinalement par rapport à l'axe du tentacule (Figure 17A,B). On observe

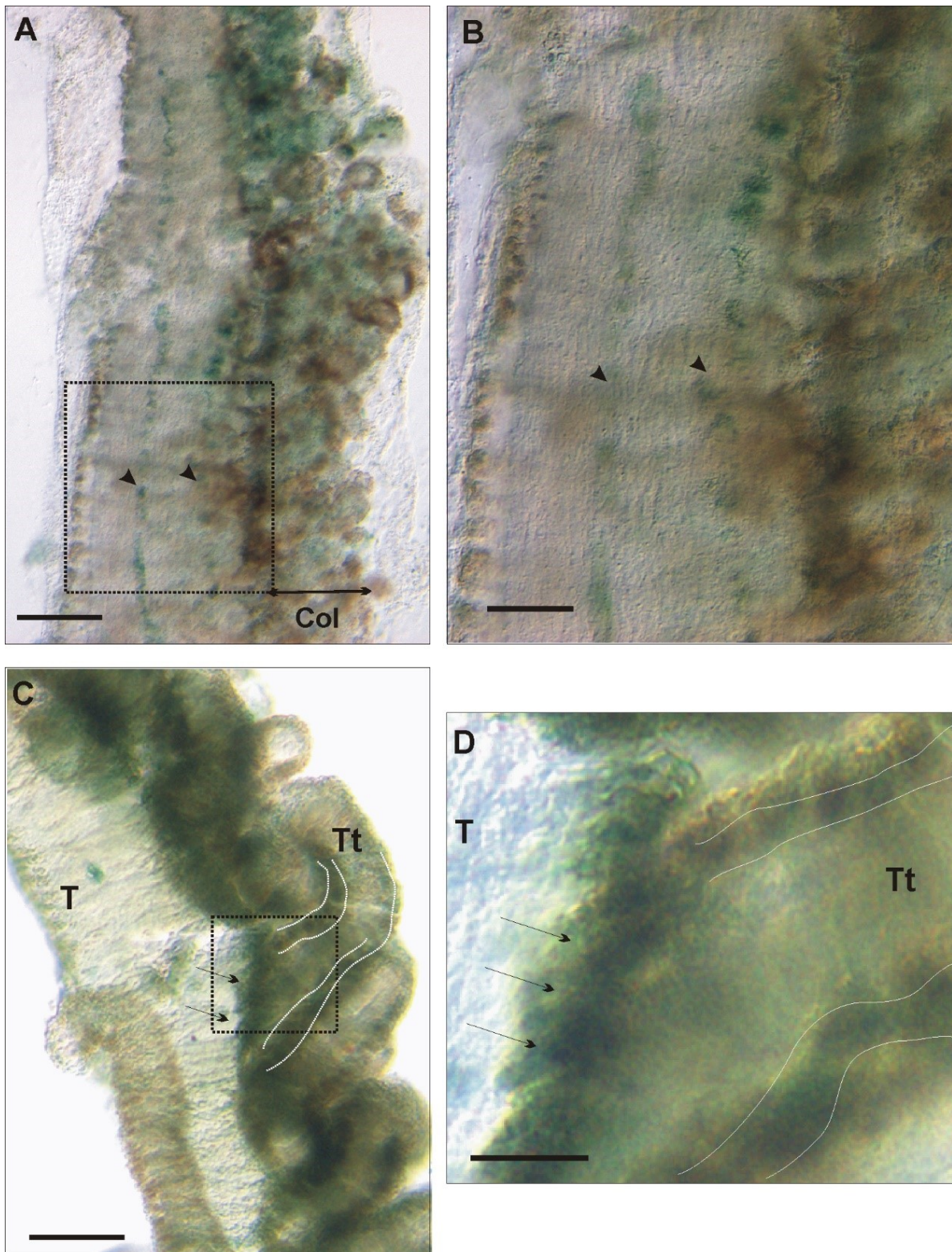


Figure 17 Activité acétylcholinestérase au niveau du tentacule (A-B) et des tentilles (C-D) de *P. pileus*. Activité détectée en vert. A) Détection de l'activité acétylcholinestérase au niveau des cordons nerveux du tentacule (têtes de flèches noires). Les colloblastes (col) semblent aussi marqués mais la spécificité du marquage est difficile à déterminer. B) Grossissement de la zone encadrée en A. C) Détection de l'activité

acétylcholinestérase à proximité des cordons nerveux des tentilles (zone délimitée en pointillés) et au niveau de la zone d'insertion du tentille au tentacule (flèches noires). *T* : tentacule, *Tt* : tentille. D) Grossissement de la zone encadrée en C. Echelles : A, C : 100 μm ; B : 50 μm , D : 25 μm .

en effet un marquage très fin qui semble associé aux deux cordons nerveux du tentacule. Au niveau des tentilles, un marquage selon deux lignes parallèles à l'axe du tentille est aussi observé (Figure 17C,D, zone délimitée en pointillés blancs). Ces lignes sont plus épaisses qu'au niveau du tentacule. Elles pourraient correspondre, ou se situer à proximité, des deux cordons nerveux présents au sein du tentille. Pour finir, une activité acétylcholinestérase est aussi détectée dans la zone d'insertion du tentille au niveau du tentacule (Figure 17C,D, flèche) qui correspond à une zone de densification intense du réseau nerveux. Au niveau des peignes (Figure 18A), on observe un marquage intense distribué au niveau de l'épithélium autour des peignes, avec une tendance à l'accumulation au niveau superficiel des peignes, en position aborale (Figure 18B, tête de flèches noires).

Pour finir, une activité acétylcholinestérase est détectée au niveau de la bouche (Figure 19). Le type cellulaire auquel le marquage est associé est difficile à déterminer. Cependant, la forte densité du réseau nerveux épithélial associé à la bouche permet d'émettre l'hypothèse qu'il soit associé à des cellules nerveuses du réseau épidermique de la bouche ou à des cellules localisées à proximité. On note que la marge orale n'est pas marquée (Figure 19A).

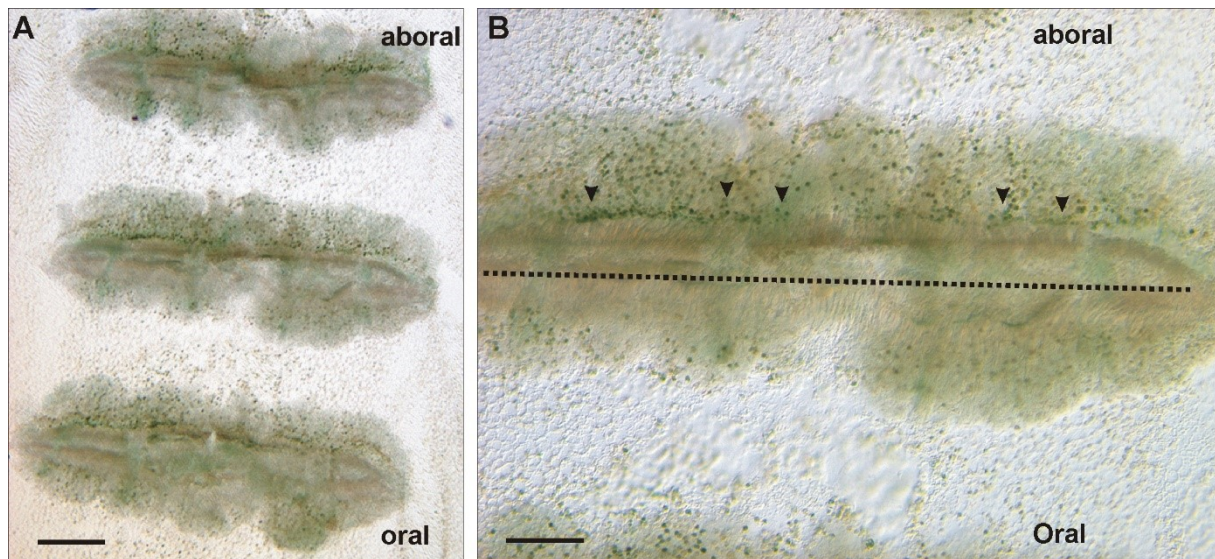


Figure 18 Activité acétylcholinestérase au niveau des peignes (A-B) de *P. pileus*. Activité détectée en vert. On détecte une activité au niveau de l'épithélium du peigne avec une accumulation au niveau aboral du peigne (têtes de flèches noires en B). La ligne en pointillés noirs représente la ligne médiane du peigne. Echelles : A : 200 μm ; B : 100 μm .

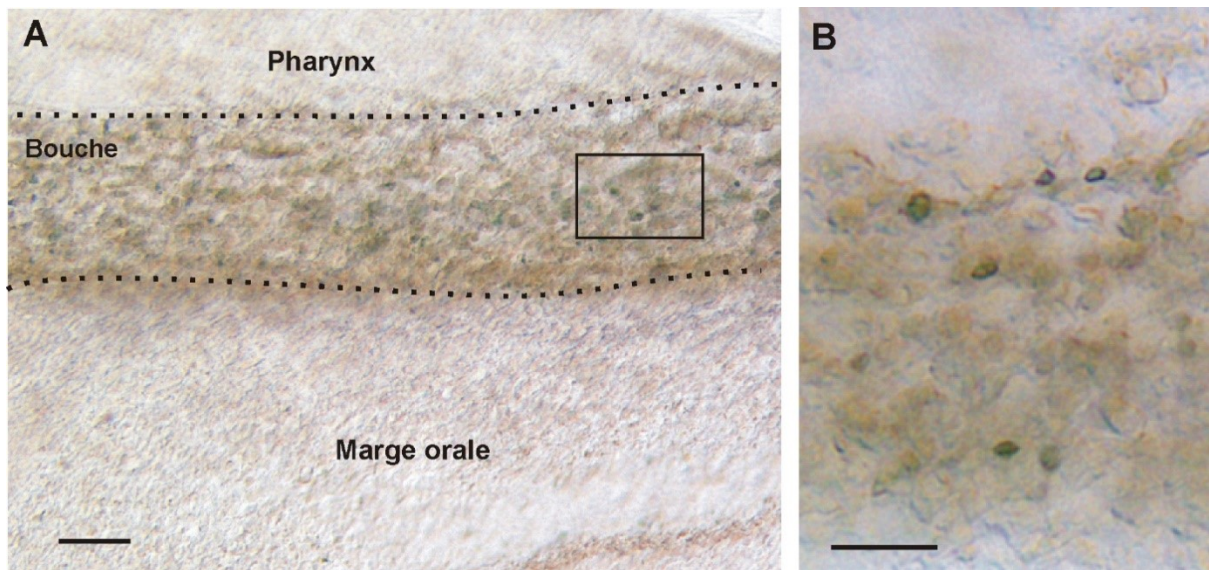


Figure 19 **Activité acétylcholinestérase au niveau de la bouche de *P. pileus*.** Activité détectée en vert. A) Vue générale de la bouche (délimitée par des pointillés noirs. B) Grossissement de la zone encadrée en A). Echelles : A : 50 μm ; B : 20 μm .

Détection d'une activité acétylcholinestérase au niveau de cellules non nerveuses de P. pileus

Une activité acétylcholinestérase est aussi largement détectée en dehors du contexte neural (Figure 20). On observe en effet pour commencer, au niveau épidermique, un marquage de certaines cellules glandulaires (Figure 20A,B). De plus, une activité acétylcholinestérase est largement détectée dans les territoires endodermiques de l'animal (Figure 20C-G) : au niveau des canaux endodermiques de la racine tentaculaire (Figure 20C), des canaux méridiens sous-jacents aux rangées de peignes (Figure 20D), du pharynx et des canaux paragastriques (Figure 20E,F) ainsi que du canal aboral (Figure 20G).

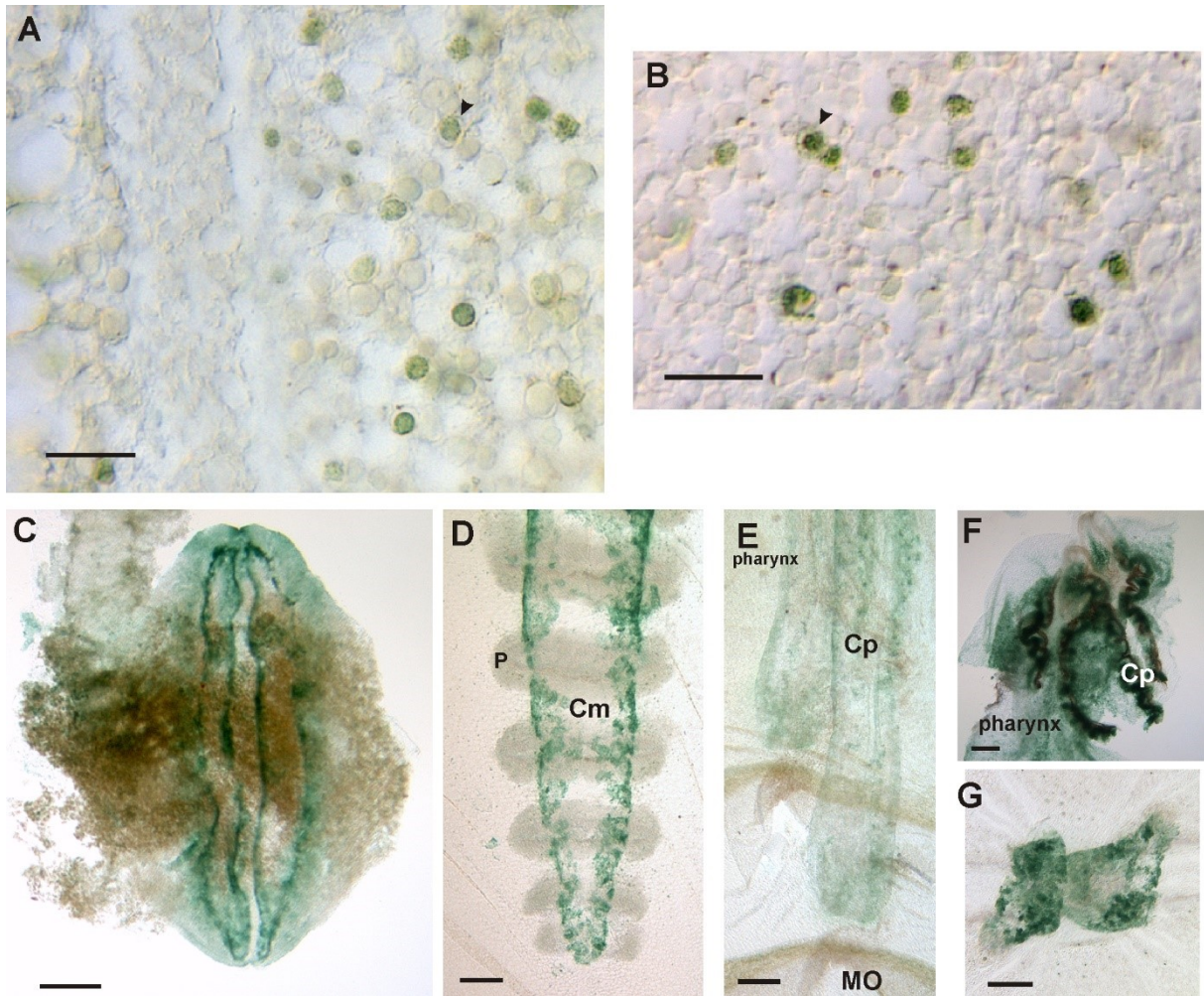


Figure 20. Activité acétylcholinestérase au niveau de cellules non nerveuses de *P. pileus*. Activité détectée en vert. A-B) Activité acétylcholinestérase au niveau de cellules glandulaires de l'épiderme. C) Activité acétylcholinestérase au niveau des canaux endodermiques de la racine tentaculaire. D) Activité acétylcholinestérase au niveau des canaux méridiens (Cm) sous-jacents aux rangées de peignes (P). E) Activité acétylcholinestérase au niveau du pharynx et des canaux paragastriques. On note que la marge orale (MO) n'est pas marquée. F) Activité acétylcholinestérase au niveau du pharynx et des canaux paragastriques (Cp). G) Activité acétylcholinestérase au niveau du canal aboral. Echelles : A-B) 25 μ m ; C-F) 200 μ m.

Expression de *PpiCHT1* au niveau de cellules nerveuses, neurosensorielles et de territoires non nerveux

CHT est le seul gène qui semble réellement spécifique des neurones cholinergiques chez les Bilatériens. Il est en effet largement utilisé comme marqueur de ces derniers en biologie du développement. L'orthologie avec les séquences de Cténares est très fortement soutenue (Figure 10). Chez *Pleurobrachia pileus*, il existe 2 paralogues, *PpiCHT1* et *PpiCHT2* et je vais commencer par décrire l'expression du premier.

On observe pour commencer une expression au niveau des deux cordons nerveux des tentilles (Figure 21). En coupes transversale et longitudinale, l'expression est restreinte au niveau de cellules orientées longitudinalement et parallèlement à l'axe du tentille (Figures 21B,F). Ce type d'expression est très semblable à celui de la β -tubuline (Figure 21C,G) ainsi qu'au marquage neural obtenu lors de l'utilisation de l'anticorps YL1/2 (anti- β -tubuline-tyrosylée – Figure 21A). Les cellules exprimant *PpiCHTI* sont encerclées par deux masses cellulaires non marquées (Figure 21B) correspondant aux cellules musculaires mises en évidence par l'expression de la myosine *PpiMHCb1* (orthologue de la chaîne lourde de la myosine des muscles striés des Bilatériens – Figure 21D,H). Toutes ces données vont donc dans le sens de l'expression de *PpiCHTI* au niveau des cellules nerveuses du tentille (schématisation du tentille en coupe transversale – Figure 21E)

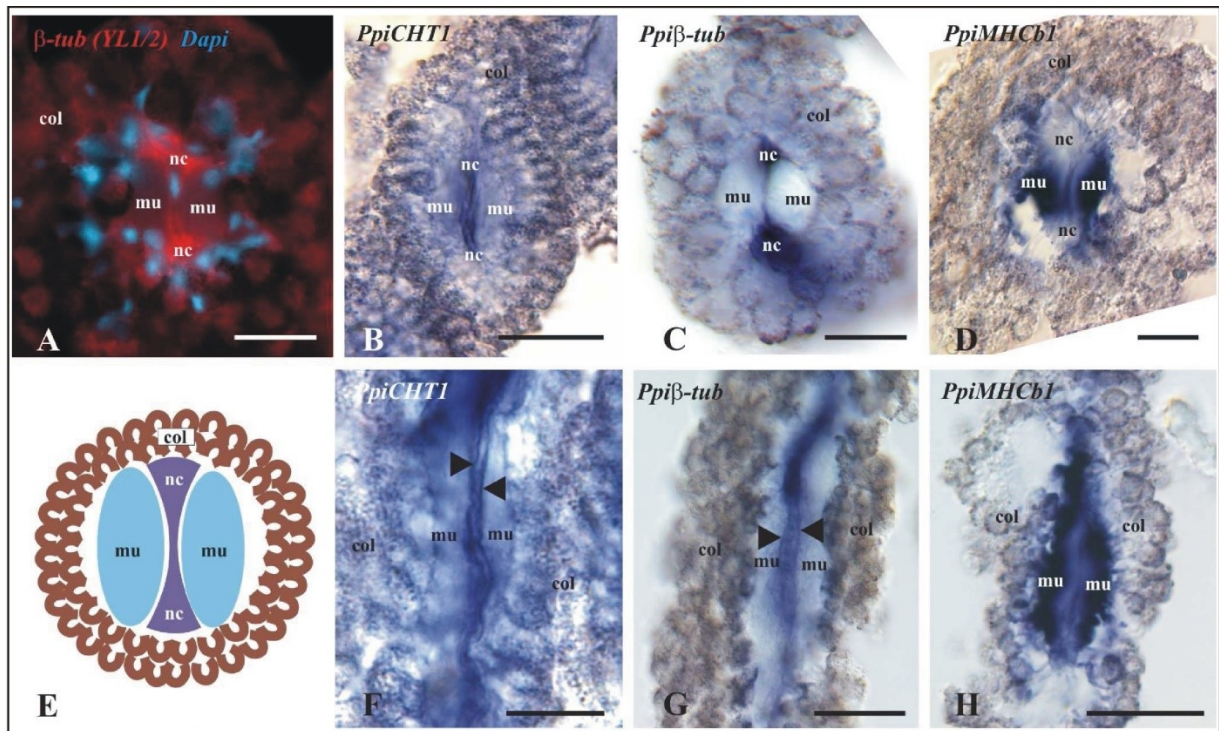


Figure 21 Expression de *PpiCHTI* au niveau des tentilles de *P. pileus*. Son expression est comparée à celle d'un marqueur du système nerveux (*Ppi β -tub* = β -tubuline) et d'un marqueur musculaire (*PpiMHCb1* = chaîne lourde de la myosine du groupe b). A-D) Cryosections de tentilles en coupe transversale (noter que la coupe B est légèrement oblique). (A) Marquage immunofluorescent avec l'anticorps anti- β -tubuline tyrosylée (YL1/2, en rouge) et marquage Dapi (en bleu). Le marquage YL1/2 met en évidence les deux cordons nerveux (nc) reliés par une connexion transverse. (B) Expression de *PpiCHTI* au niveau des cordons nerveux et de leur connexion. (C) Expression de *Ppi β -tub* également au niveau des deux cordons nerveux. (D) Expression de *PpiMHCb1* au niveau des deux masses musculaires (mu). (E) Schéma récapitulant l'organisation du tentille en coupe transversale. (F-H) Cryosections longitudinales de tentilles. (F) Expression de *PpiCHTI* dans les deux cordons nerveux (indiqués par les têtes de flèches). (G) Expression de *Ppi β -tub* également dans les deux cordons nerveux (têtes de flèches). (H) Expression de *PpiMHCb1* dans les deux muscles longitudinaux (mu). col : colloblastes, mu : muscles, nc : cordons nerveux. Echelles : A, C, D : 40 μ m ; B, G, H : 100 μ m ; F : 70 μ m. Images Alexandre Alié (Thèse, 2010).

PpiCHT1 est aussi exprimé au niveau des peignes, sous la forme de spots irréguliers répartis sur le pourtour du peigne (Figure 22A-D). Les extrémités des peignes sont marquées et correspondent aux zones de cellules souches et de progéniteurs. Lorsque l'on prolonge le temps de révélation (Figures 22C,D), on observe un gradient décroissant d'intensité des extrémités vers le centre du peigne (flèches noires en C) et D) ainsi qu'un marquage asymétrique, plus intense dans la moitié aborale du peigne (Figure 22D). Les coupes transversales sériées réalisées à différents niveaux du peigne (Figures 22E-H), permettent d'apporter des informations concernant les types cellulaires marqués. On observe ainsi des marquages symétriques (Figure 22G-G') ou asymétriques (Figure 22H-H') en lien avec la répartition des spots marqués tout autour du peigne (visible sur les peignes vus de dessus sur les Figures 22A-D). Les cellules marquées possèdent un noyau rond et sont localisées au niveau de la couche épidermique de revêtement du peigne (couche localisée au niveau le plus superficiel du peigne, notée ep en E',F',G',H'). Ces cellules pourraient correspondre aux neurones localisés au niveau de l'épiderme du peigne. On observe en effet parmi celles-ci, des cellules possédant des prolongements (Figure 22G-G' et 23A,A') évoquant fortement la morphologie de neurones. Pour finir, sur les coupes réalisées au niveau des extrémités des peignes, on observe une expression au centre du coussinet du peigne, en position basale (Figure 22E,E'). Ces cellules ne semblent pas correspondre aux *polster cells* matures (que l'on trouve aussi au centre du coussinet) puisque le marquage ne semble pas être associé à un cytoplasme allongé caractéristique de ces cellules.

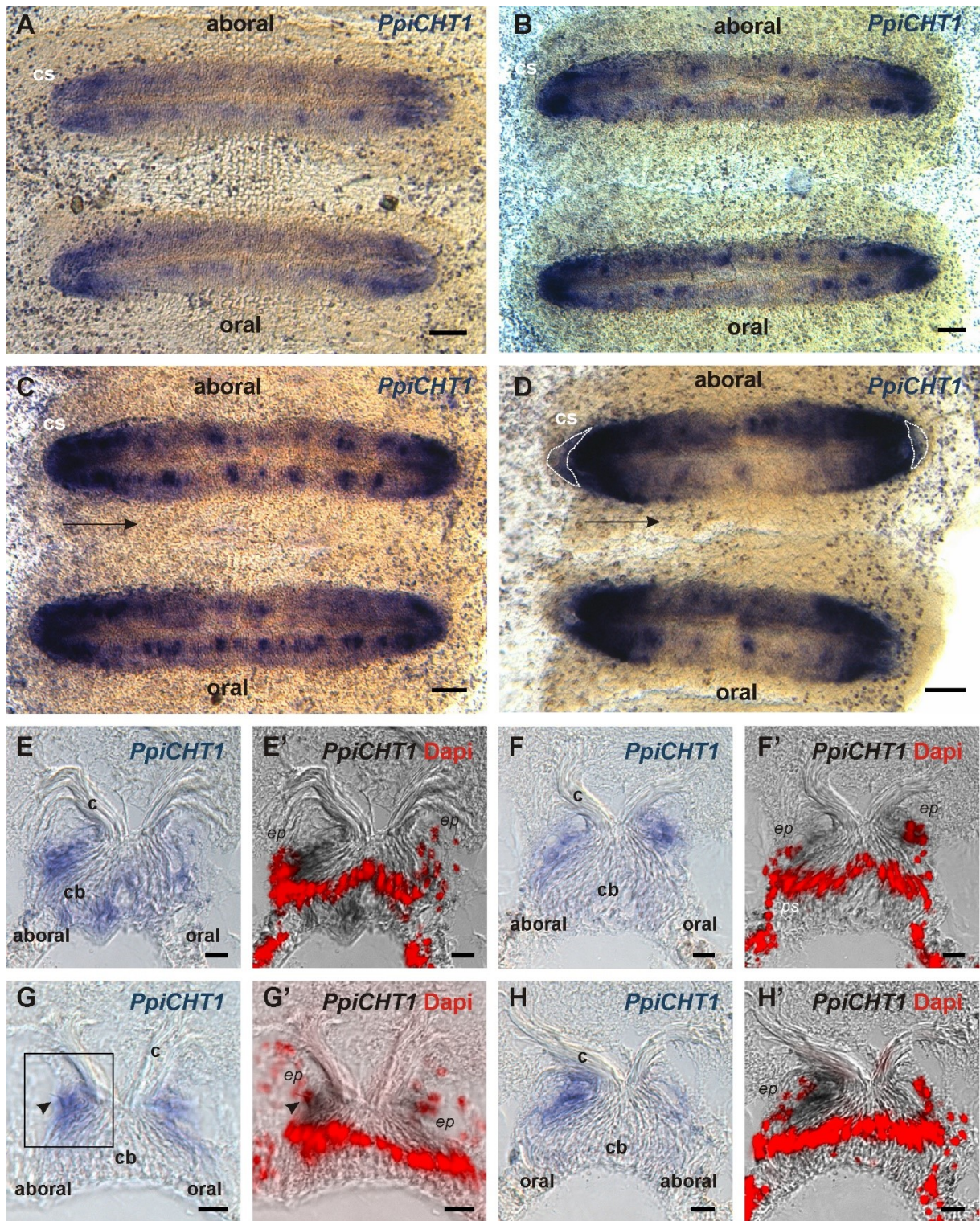


Figure 22 Expression de *PpiCHT1* au niveau des peignes de *P. pileus*. A-D) Expression de *PpiCHT1* au niveau de peignes vus de dessus, après des temps de révélation plus ou moins longs. Expression sous la forme de spots et selon un gradient décroissant (figuré par une flèche noire) des extrémités vers le centre du peigne. D) Expression de *PpiCHT1* qui semble plus intense au niveau aboral lorsque le temps de révélation est important. E-H) Cryosections de peignes en coupe transversale et contre-marquage Dapi (en rouge) réalisées à différents niveaux le long des peignes. Expression de *PpiCHT1* au niveau de cellules de l'épiderme (ep) présentant un noyau rond. Certaines de ces cellules présentent un prolongement (tête de flèche noire) évoquant la morphologie de neurones (G-G'), grossissement présenté sur la Figure 23. Au niveau des extrémités du peigne (E-E'), un marquage est observé au centre du coussinet basilaire (cb). *c* : cils du peigne, *cb* : coussinet basilaire du peigne, *cs* : zone des cellules souches, *ep* : épiderme. Echelles : A-D : 50 μ m ; E-H : 10 μ m.

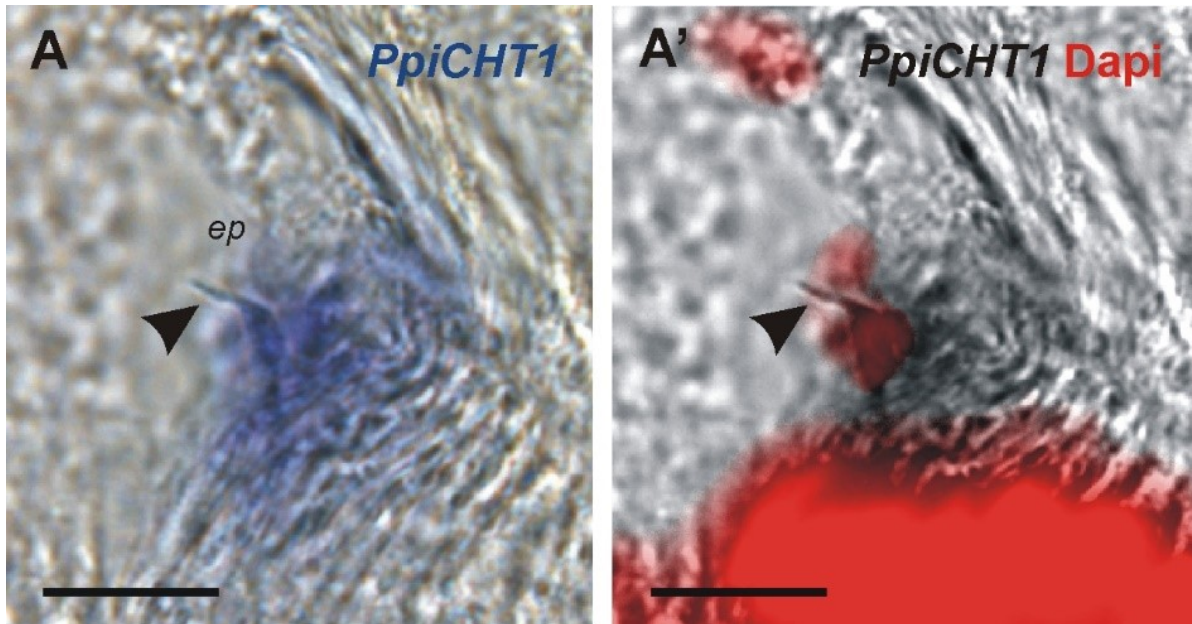


Figure 23 Grossissement de la zone encadrée sur la Figure 22G. Expression de *PpiCHT1* au niveau d'une cellule nerveuse putative : cellule épidermique du peigne, présentant un prolongement (tête de flèche) et un noyau rond (A', en rouge). Echelles : A-A' : 10 μ m.

On observe une expression de *PpiCHT1* au niveau du complexe aboral, avec une expression aux abords de l'organe apical (Figure 24A, têtes de flèches blanches), au niveau des extrémités proximales des champs polaires (Figure 24A, entourés en pointillés) ainsi que le long de la bordure interne de la zone marginale (Figure 24B). On note de plus un marquage plus diffus au niveau de la zone centrale des champs polaires.

Une expression très restreinte, localisée au niveau de la bouche (à la limite entre le pharynx et la marge orale) est aussi observée (Figure 24C-C''). *PpiCHT1* s'exprime sous la forme de longs cordons parallèles à la bouche (Figure 24D, têtes de flèches blanches) qui évoque le système nerveux très condensé au niveau de la région orale (voir marquage YL1/2 sur la Figure 6D-E, page 139).

Pour finir, *PpiCHT1* est aussi exprimé au niveau de territoires non nerveux, comme on peut l'observer au niveau de la gonade femelle (Figure 25). On observe un marquage sous la forme de spots répartis le long de la gonade femelle (Figure 25A, têtes de flèches blanches). Ce marquage est associé aux ovocytes en cours d'accroissement (Figures 25C-C' en coupe transversale et agrandissement en 25D-D') ainsi qu'aux cellules nourricières entourant l'ovocyte (Figure 25D,D'). Un léger marquage diffus est observé au niveau de la gonade mâle (Figure 25A).

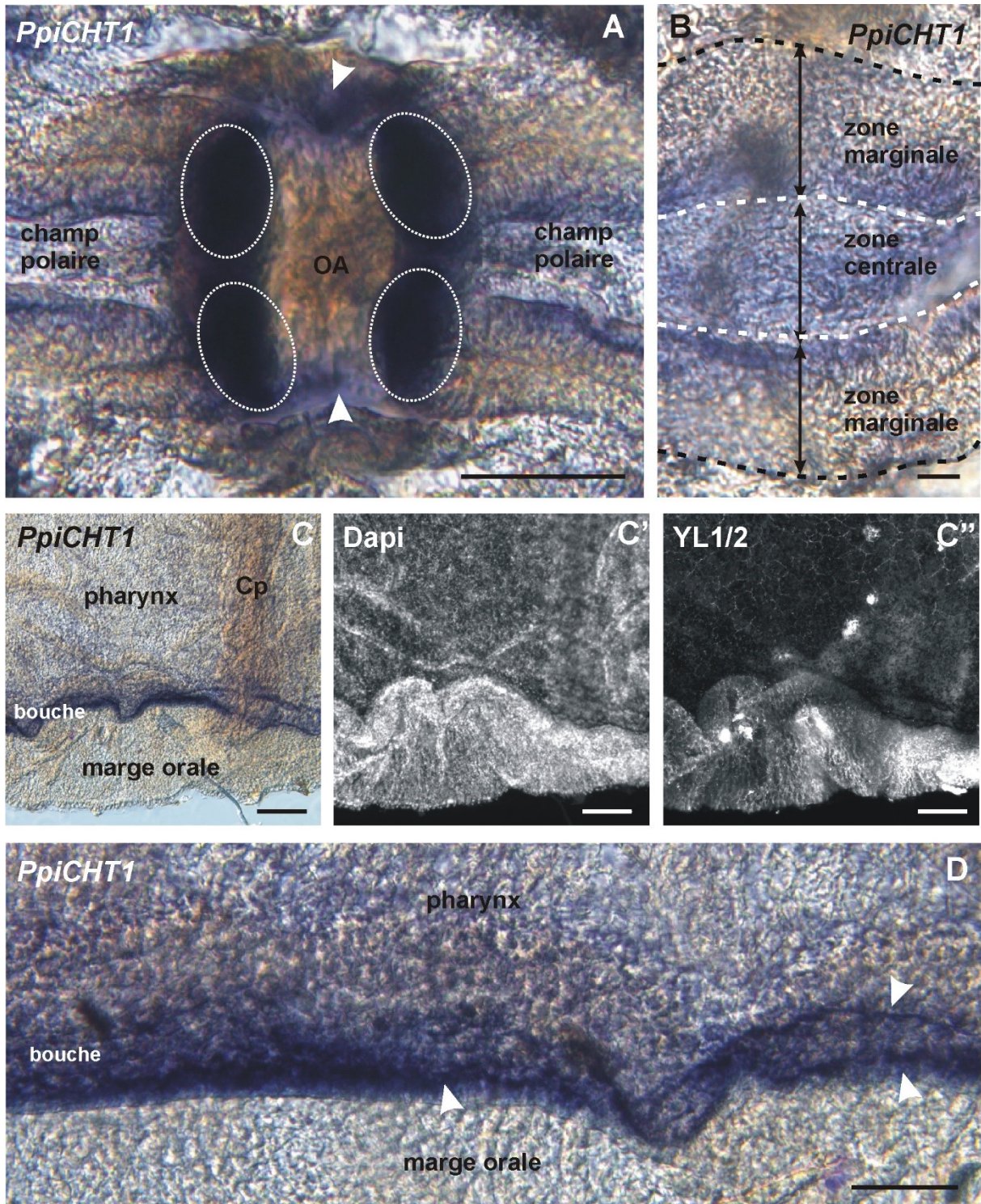


Figure 24 Expression de *PpiCHT1* au niveau du complexe aboral de *P. pileus*. A) Expression de *PpiCHT1* au niveau de l'organe apical (OA). Expression restreinte à la bordure de l'organe apical (têtes de flèches blanches). On note de plus une expression intense au niveau des extrémités proximales des champs polaires (zones encerclées en blanc). B) Expression de *PpiCHT1* au niveau des champs polaires restreinte à la partie interne de la zone marginale. Un marquage diffus est aussi observé au niveau de la zone centrale. C-D) Expression de *PpiCHT1* au niveau de la bouche. C-C'') Vue générale de l'extrémité orale où se trouve la bouche. Aucun marquage au niveau des canaux paragastriques (Cp). D) Grossissement au niveau de la bouche. Expression de *PpiCHT1* sous la forme de lignes parallèles à la bouche (têtes de flèches blanches). Echelles : A, D : 50 μ m ; B : 10 μ m ; C-C' : 100 μ m.

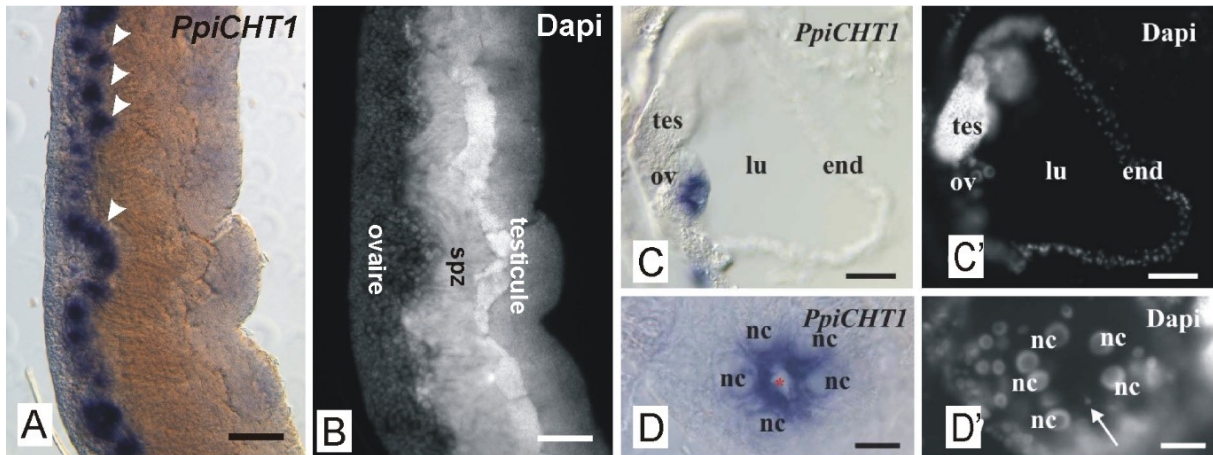


Figure 25 Expression de *PpiCHT1* au niveau des gonades de *P. pileus*. A) Expression de *PpiCHT1* au niveau du canal méridien, sous la forme de spots isolés (têtes de flèches blanches). B) Contre-marquage Dapi permettant de localiser la zone d'expression de *PpiCHT1* au niveau de l'ovaire. C) Cryosection transversale d'un canal méridien montrant une tache isolée de marquage *PpiCHT1* dans l'ovaire (ov). C') Contre-marquage au Dapi de l'image C. D) Grossissement au niveau de l'ovaire montrant l'expression au niveau d'un ovocyte (dont la masse centrale de vitellus est indiquée par l'astérisque rouge) et de cellules nourricières (nc) entourant l'ovocyte. D') Contre-marquage au Dapi de l'image D). La flèche blanche indique le noyau de l'ovocyte. end : épithélium endodermique du canal méridien, lu : lumière du canal méridien, nc : cellules nourricières, ov : ovaire, tes : testicule. Echelles : A-B : 100 μm ; C-C' : 50 μm , D-D' : 10 μm . C-D') Images Alexandre Alié (Thèse, 2010).

Expression de *PpiCHT2* au niveau endodermique, dans l'ensemble de l'épithélium du système gastrovasculaire.

PpiCHT2 présente un patron d'expression complètement différent de celui de *PpiCHT1*. Son expression est associée à l'ensemble des canaux endodermiques du système gastrovasculaire ainsi qu'à la paroi du pharynx (Figure 26). En revanche, il n'est pas exprimé au niveau de la marge orale (délimitée en pointillées sur la Figure 26). Enfin, aucune expression épidermique n'a été détectée.

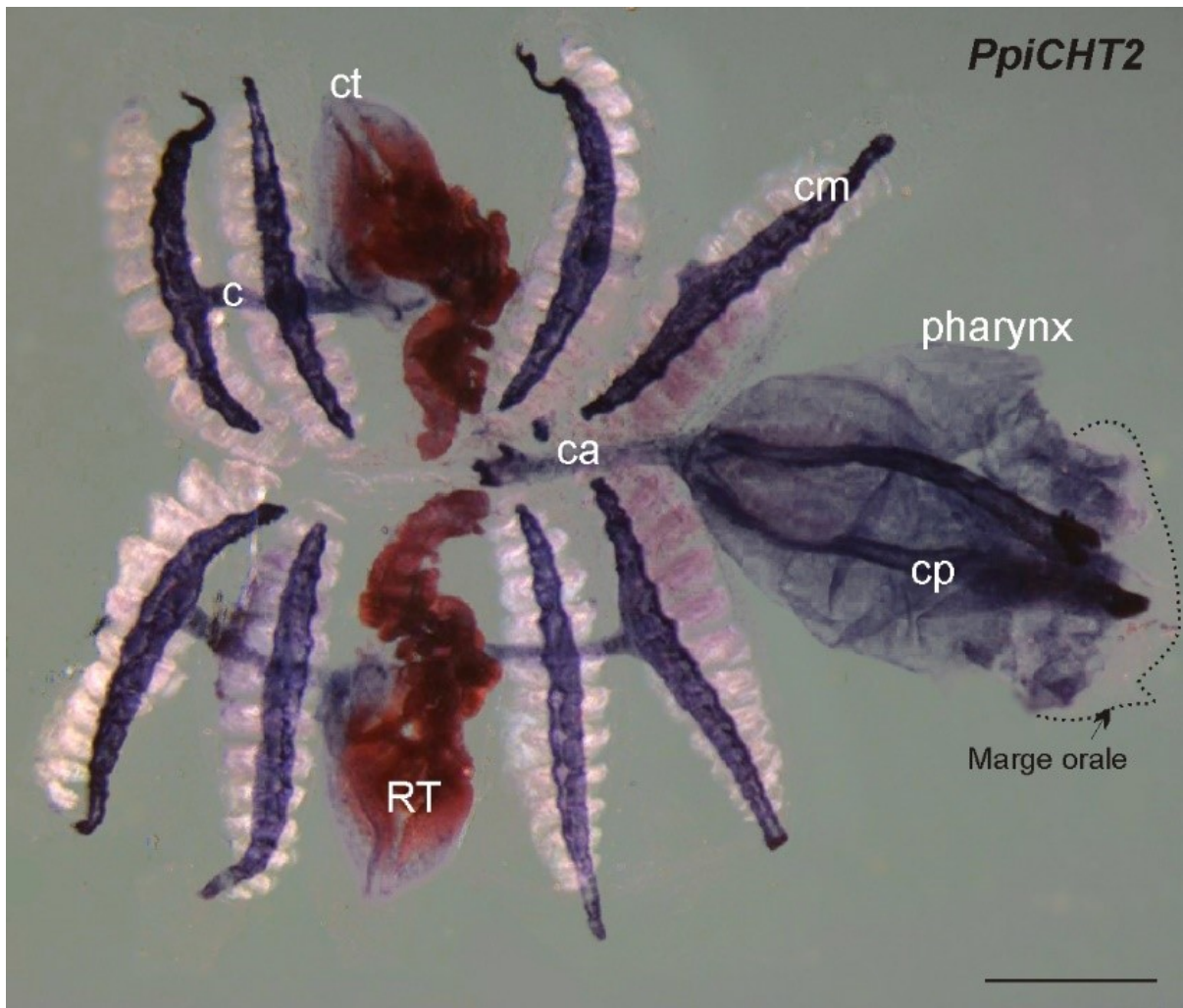


Figure 26 Expression de *PpiCHT2*. L'image montre un individu *in toto* après dissection mettant en évidence les différents canaux du système gastrovasculaire, où s'exprime le gène. On note l'absence d'expression au niveau de la marge orale. *c* : canal adradial, *ca* : canal aboral, *cm* : canal méridien, *cp* : canaux paragastriques, *ct* : canaux de la racine tentaculaire, *RT* : racine tentaculaire. Echelle : 0,5 cm. Image Alexandre Alié (Thèse, 2010).

Expression des gènes de la famille CPT

Les gènes de la famille des CPT (carnitines palmitoyltransférases), CPT1 et CPT2 chez les Mammifères, codent pour des acyltransférases impliquées dans le transfert de longues chaînes d'acides gras. Ils interviennent dans de nombreuses réactions du métabolisme basal des cellules. Le patron d'expression attendu pour des gènes de cette famille est donc largement ubiquitaire. Chez *Pleurobrachia pileus*, il existe un orthologue du gène CPT1 (*PpiCPT1*) et deux orthologues du gène CPT2 (*PpiCPT2.1* et *PpiCPT2.2*) issus d'une duplication spécifique des Cténaïres (Figure 11, page 147). *PpiCPT1* et *PpiCPT2.1* s'expriment de manière plus ou moins ubiquitaire au sein du corps de *P. pileus*, avec seulement des différences d'intensité en fonction des territoires. L'expression de

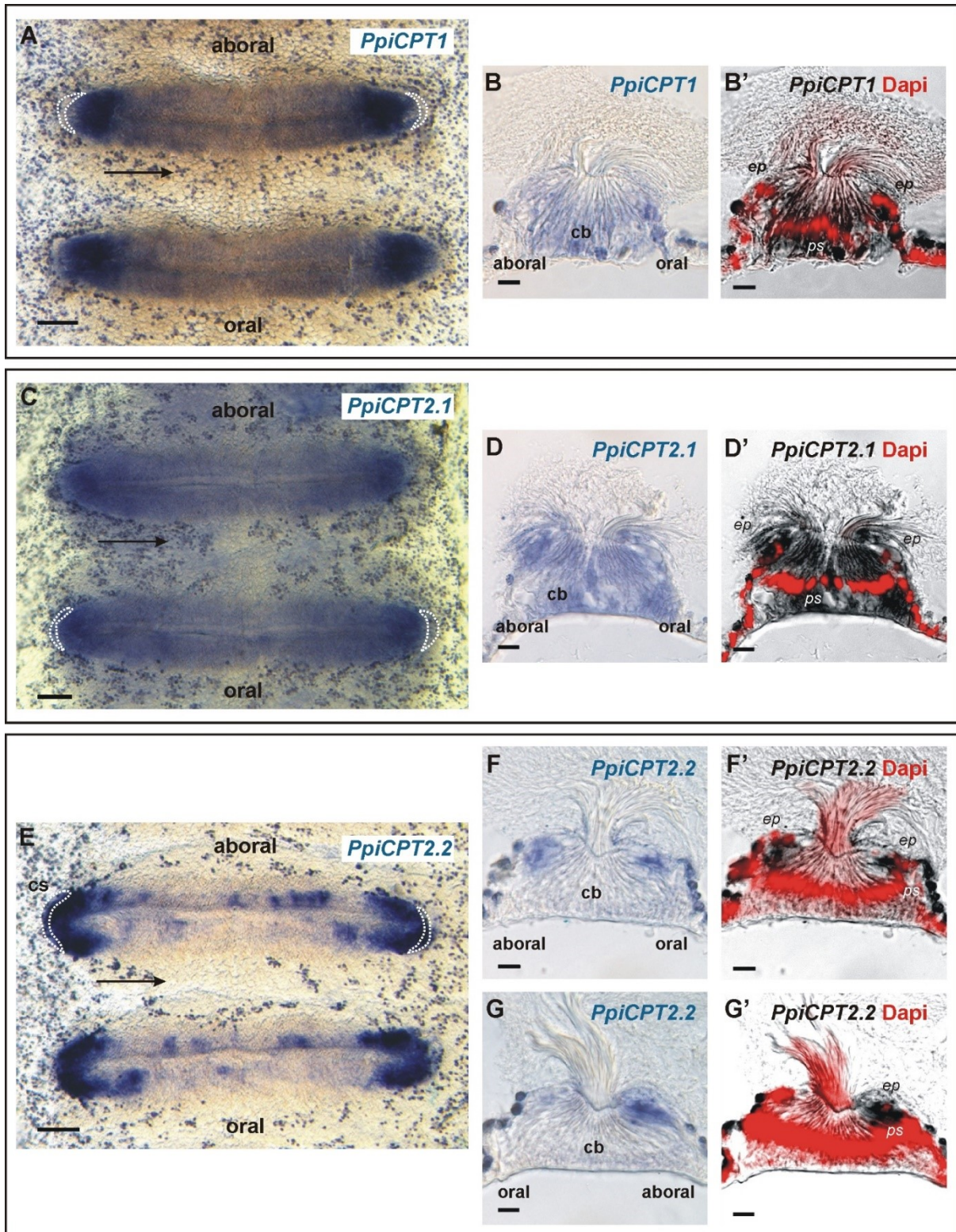
PpiCPT2.2 est très différente. Il s'exprime de manière très localisée au niveau des territoires épidermiques et mime complètement la somme des territoires d'expression de *PpiCHT1* et *PpiCHT2*.

Ainsi, ces gènes s'expriment tout d'abord au niveau des peignes (Figure 27). *PpiCPT1* et *PpiCPT2.1* s'expriment de façon similaire sous la forme d'un gradient décroissant d'expression des extrémités vers le centre du peigne (Figures 27A,C). On note cependant qu'aucune expression n'est observée au niveau de la zone des cellules souches. L'étude des coupes transversales (Figures 27B,B',D,D') met en évidence une expression au niveau de l'intégralité des *polster cells* du peigne (*polster cells* en cours de différenciation et *polster cells* matures) ainsi qu'au niveau de la couverture épithéliale. En ce qui concerne *PpiCPT2.2*, on observe une expression sous la forme de spots irréguliers répartis sur le pourtour du peigne (Figure 27E) qui mime l'expression de *PpiCHT1* (Figure 22A-D). On observe de même, une expression intense au niveau des extrémités du peigne ainsi qu'un gradient décroissant d'intensité des extrémités vers le centre du peigne (Figure 27E). Les coupes transversales (Figures 27F-G') mettent en évidence, comme pour *PpiCHT1*, une expression restreinte au niveau des cellules de la couche épidermique (noyaux ronds et localisation superficielle).

Au niveau des champs polaires, on observe une expression de *PpiCPT1* et de *PpiCPT2.1* de manière intense sur l'ensemble de la zone marginale ainsi que de façon plus diffuse au niveau de la zone centrale (Figures 28A, B). En ce qui concerne *PpiCPT2.2*, son expression est restreinte au niveau de la zone interne de la zone marginale (Figure 28C) et est donc similaire à celle de *PpiCHT1*. Au niveau de l'organe aboral, *PpiCPT1* et *PpiCPT2.1* semblent s'exprimer de manière plus ou moins diffuse au niveau du plancher épithélial alors que l'expression de *PpiCPT2.2* mime aussi celle de *PpiCHT1* avec une expression qui semble restreinte au niveau de la bordure de l'organe apical et une expression intense aux extrémités des champs polaires à proximité de l'organe apical (données non montrées).

Figure 27 Expression des gènes de la famille CPT au niveau des peignes de *P. pileus*. A-B' Expression de *PpiCPT1*. A) Expression de *PpiCPT1* sur un peigne en vue de dessus. Expression selon un gradient d'intensité des extrémités vers le centre du peigne (figuré par une flèche noire). Pas d'expression au niveau de l'extrémité terminale correspondant à la zone de cellules souches (figurée en pointillés). B-B') Cryosection en coupe transversale d'un peigne et contre-marquage Dapi. Expression au niveau de l'épiderme (ep) et de toutes les *polster cells* (ps) du coussinet basilaire (cb) du peigne. C-D') Expression de *PpiCPT2.1*. Expression de *PpiCPT2.1* sur un peigne en vue de dessus. Expression selon un gradient d'intensité des extrémités vers le centre du peigne (figuré par une flèche noire). Pas d'expression au niveau de l'extrémité terminale correspondant à la zone de cellules souches (figurée en pointillés). D-D') Cryosections en coupe transversale d'un peigne. Contre-marquage Dapi. Expression au niveau de l'épiderme (ep) et de toutes les *polster cells* (ps) du coussinet basilaire (cb) du peigne. E-G') Expression de *PpiCPT2.2*. E) Expression au niveau d'un peigne vu de dessus. Expression sous la forme de spots irréguliers tout autour du peigne. Gradient décroissant d'intensité des extrémités vers le

centre du peigne (flèche noire). Expression au niveau des cellules souches (cs, zone entourée en pointillés). F-G') Cryosections en coupe transversale et contre-marquages Dapi. Expression uniquement au niveau de l'épiderme (ep). Le contre-marquage Dapi met en évidence l'expression au niveau de cellules à noyau rond. *cb* : coussinet basilaire, *cs* : zone des cellules souches, *ep* : épiderme, *ps* : polster cells. Echelles : A, C, E : 50 μ m ; B-B', D-D', F-G' : 10 μ m.



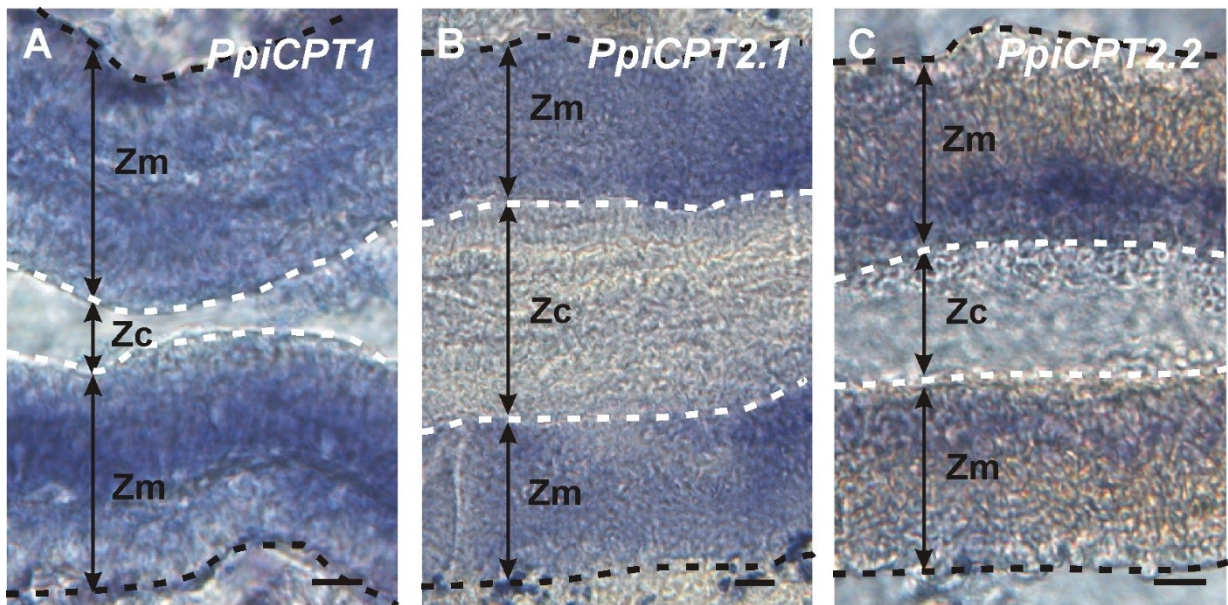


Figure 28 Expression des gènes de la famille CPT au niveau des champs polaires de *P. pileus*. A) Expression de *PpiCPT1*. Expression intense dans la zone marginale (Zm) et plus diffuse dans la zone centrale (Zc). B) Expression de *PpiCPT2.1*. Expression intense dans la zone marginale (Zm) et plus diffuse dans la zone centrale (Zc). C) Expression de *PpiCPT2.2* restreinte à la partie interne de la zone médiane (Zm). Echelles : A-C : 10 μ m.

Une expression est aussi observée au niveau de la zone de la bouche (Figure 29). *PpiCPT1* s'exprime dans l'intégralité de l'épithélium du pharynx, au niveau des canaux paragastriques endodermiques ainsi qu'au niveau de la marge orale (Figure 29A-A''). Le marquage correspondant à l'expression de *PpiCPT2.1* s'étend aux mêmes territoires : pharynx, canaux paragastriques, marge orale (Figure 29B-B''). L'aspect du marquage concernant *PpiCPT2.2* est de nouveau bien différent (Figure 29C-C''). On observe un marquage diffus au niveau du pharynx et des canaux paragastriques. Mais par ailleurs, un marquage très fin, sous la forme de lignes parallèles à la bouche est observé au niveau de la bouche (Figure 29D, têtes de flèches noires) et rappelle très fortement celui de *PpiCHT1* (Figure 24C,D). La marge orale en revanche n'exprime pas *PpiCPT2.2* (Figure 29D,G).

Pour finir, une expression est observée au niveau des gonades. L'expression de *PpiCPT1* est restreinte au niveau des spermatozoïdes matures (Figure 30A-A'). *PpiCPT2.1* s'exprime au niveau des spermatozoïdes matures ainsi qu'au niveau de l'ovaire (Figure 30B-B'). *PpiCPT2.2* par contre n'est pas exprimé au niveau des spermatozoïdes matures mais est exprimé dans l'intégralité des gonades mâle et femelle (Figure 30C-C').

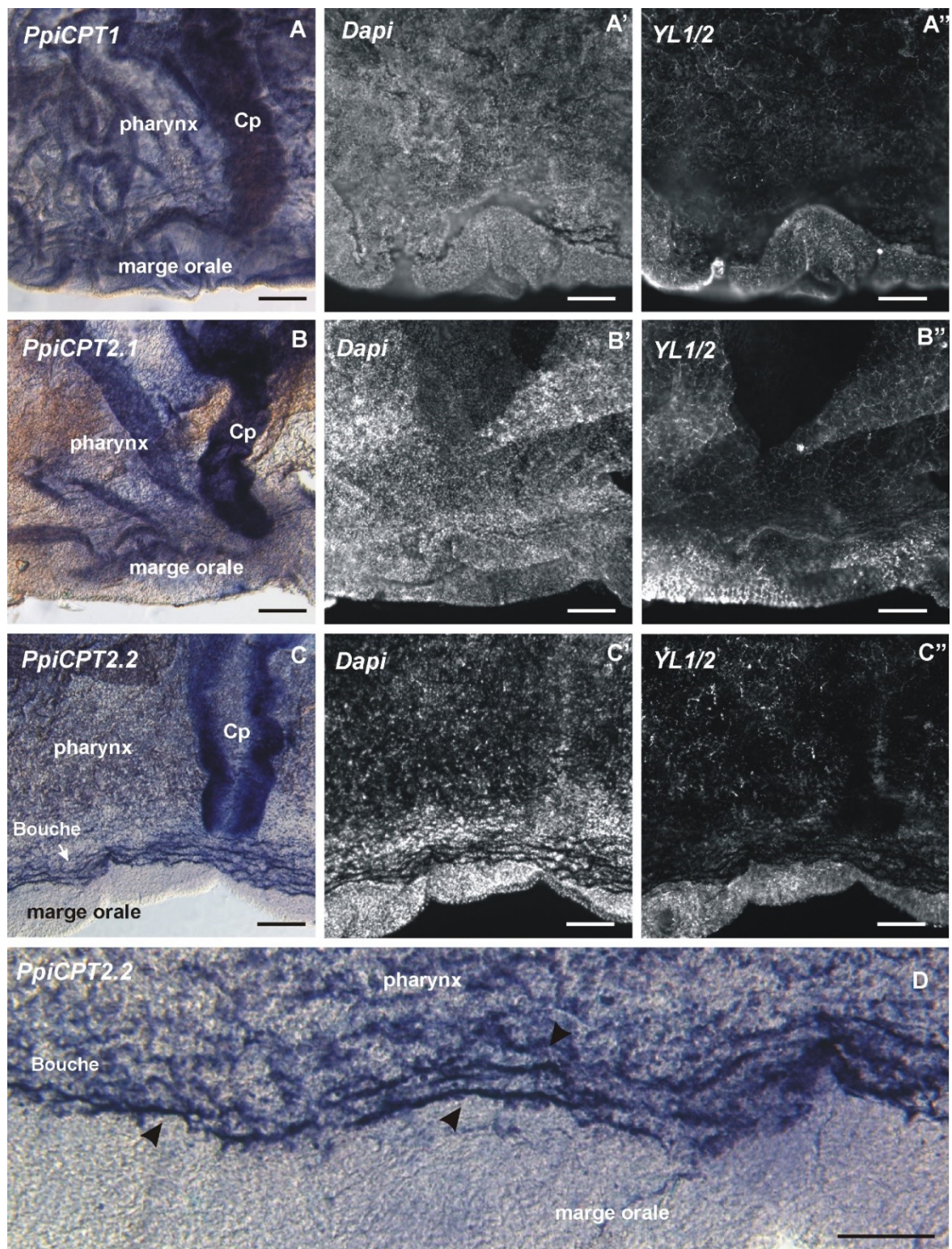


Figure 29 Expression des gènes de la famille CPT au niveau de la bouche et du pharynx de *P. pileus*. A-A'') Expression de *PpiCPT1* et contre-marquages Dapi (A') et YL1/2 (A'') permettant de repérer les zones d'expression. Expression de *PpiCPT1* au niveau du pharynx, des canaux paragastriques (Cp) et de la marge orale. B-B'') Expression de *PpiCPT2.1* et contre-marquages Dapi (B') et YL1/2 (B''). Expression intense au niveau des canaux paragastriques et plus diffuse au niveau du pharynx et de la marge orale. C-C'') Expression de *PpiCPT2.2* et contre-marquages Dapi (C') et YL1/2 (C''). Expression diffuse au niveau des canaux paragastriques et de l'épithélium du pharynx et expression sous forme de lignes internes d'orientation circulaire au niveau de la bouche. D) Grossissement au niveau de la bouche. Expression de *PpiCPT2.2* sous la forme de

lignes (têtes de flèches noires) parallèles à la bouche. La marge orale n'est pas marquée. *Cp* : canaux paragastriques. Echelles : A-C'' : 100 μm ; D : 50 μm .

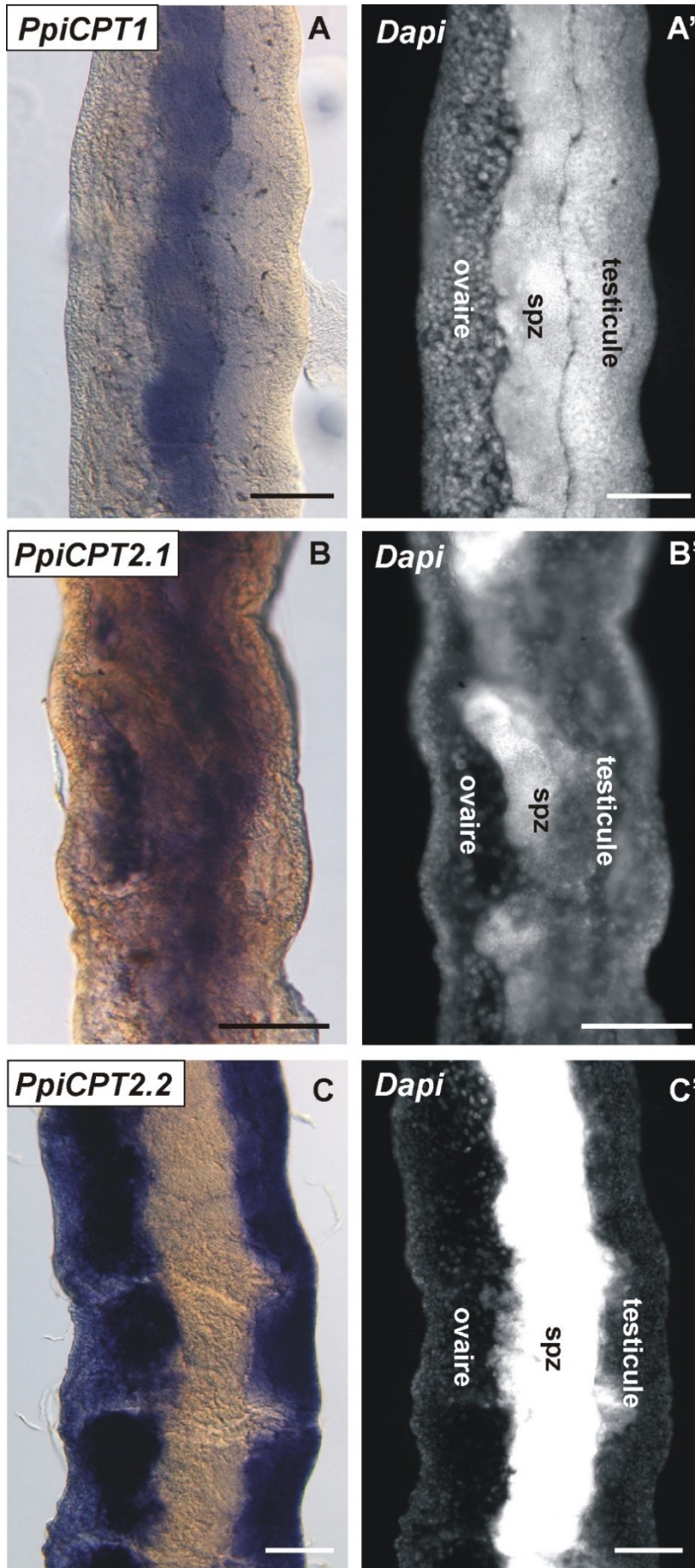
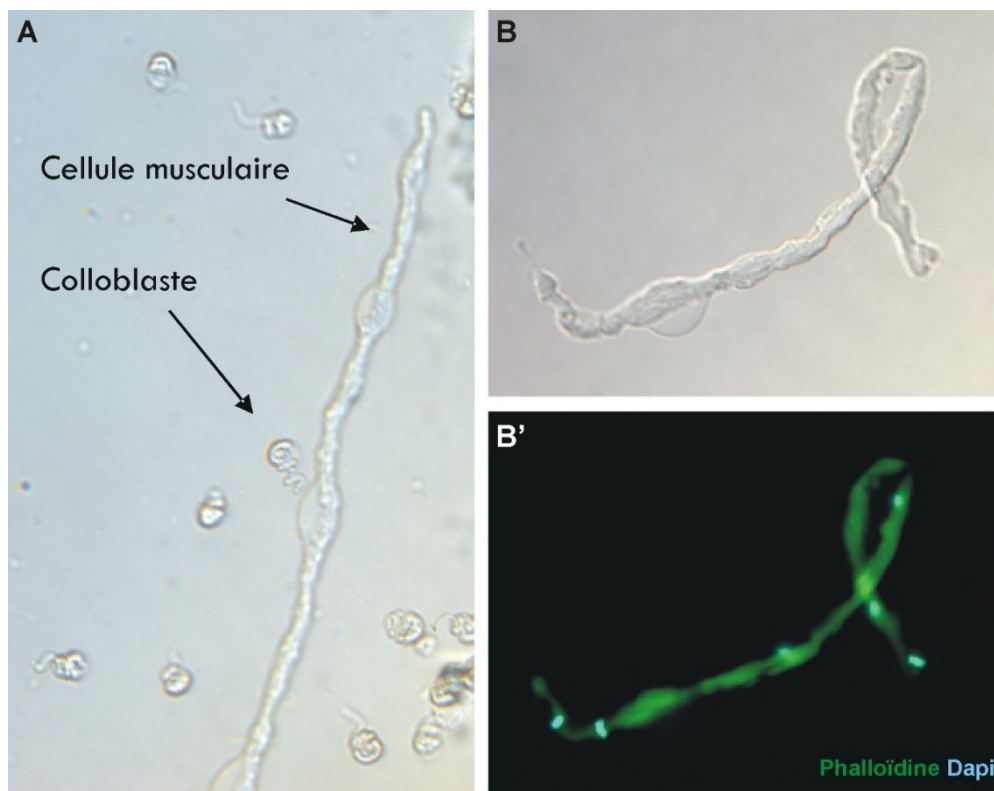


Figure 30 Expression des gènes de la famille CPT au niveau des gonades de *P. pileus*. Etudes d'expression et contre-marquages Dapi permettant de localiser le marquage obtenu en hybridation *in situ*. A-A') Expression de *PpiCPT1* au niveau des spermatozoïdes matures. B-B') Expression de *PpiCPT2.1* au niveau des spermatozoïdes matures et de l'ovaire. C-C') Expression de *PpiCPT2.2* au niveau des gonades mâle et femelle sans expression au niveau des spermatozoïdes matures. *spz* : spermatozoïdes. Echelles : A-C' : 100 µm.

Les cellules musculaires des tentacules/tentilles de *P. pileus* sont des cellules cibles de l'acétylcholine.

Les expériences d'imagerie calcique ont été réalisées sur des cellules musculaires isolées de tentacules/tentilles. La nature musculaire ainsi que la viabilité des cellules étudiées, suite aux étapes de dissociation et d'incubation en présence de la sonde calcique, ont été vérifiées. La morphologie (forme allongée), le caractère plurinucléé ainsi que le marquage phalloïdine permettent de certifier qu'il s'agit bien de cellules musculaires (Figure 31). Le marquage au bleu trypan ainsi que la réponse de ces cellules à de fortes concentrations potassiques permettent de conclure à leur viabilité ainsi qu'au



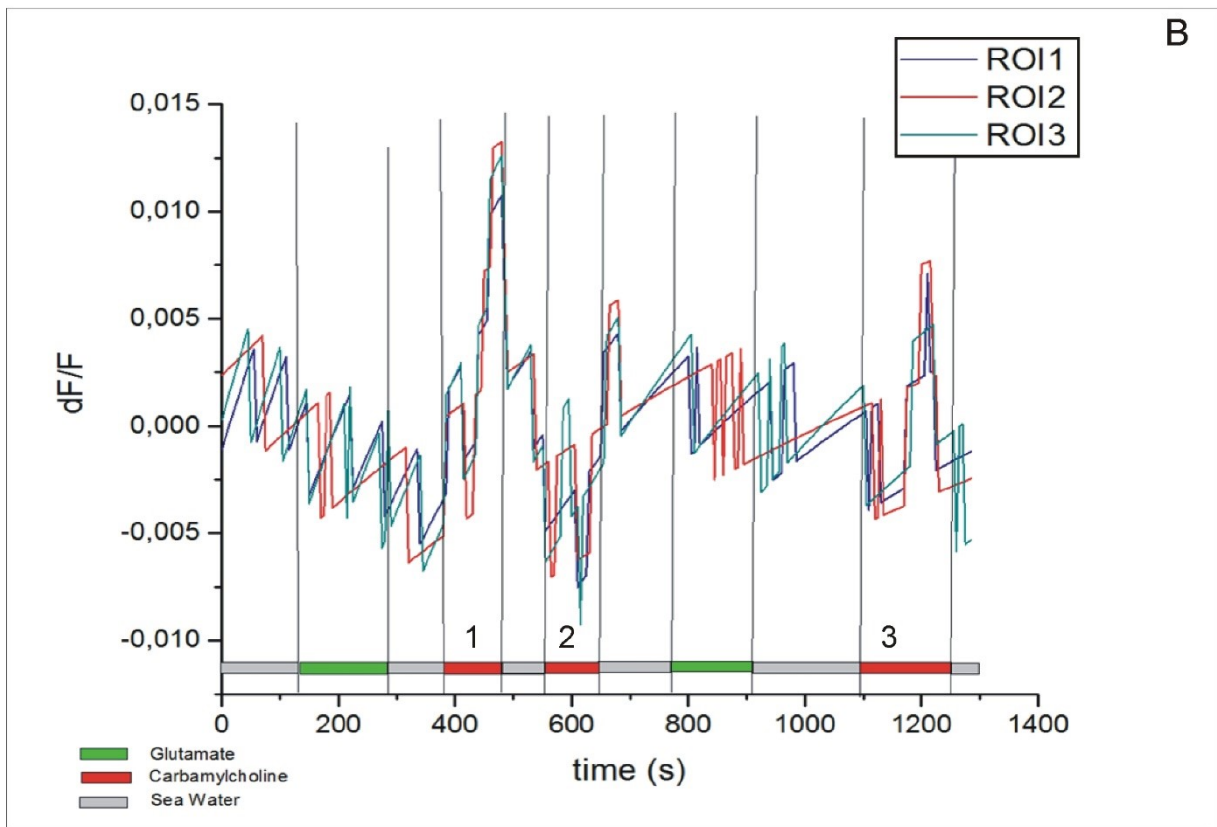
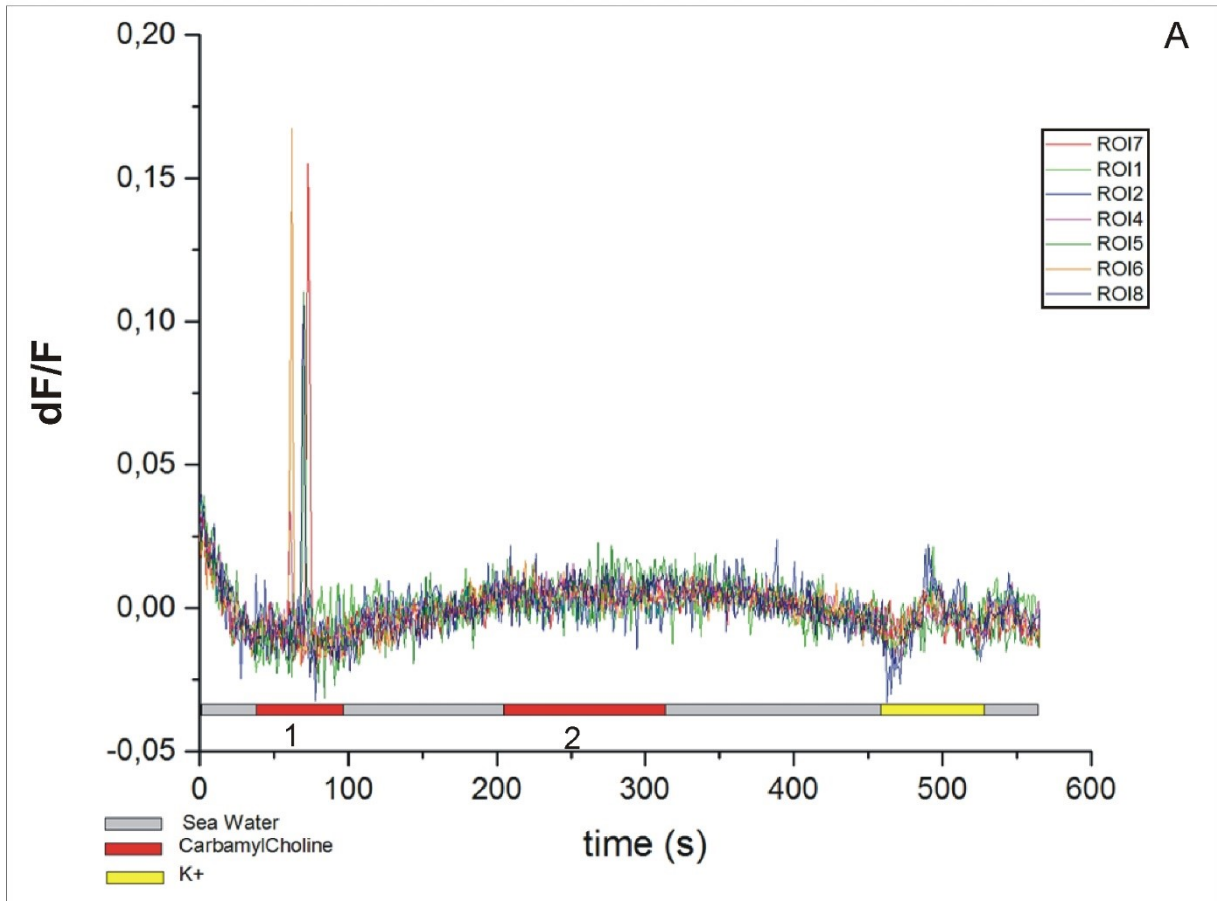
maintien de l'intégrité de leur membrane et de leur excitabilité.

Figure 31 Cellules musculaires isolées du système tentaculaire de *P. pileus*. A) Cellule musculaire et colloblastes isolés observés en DIC. B-B') Observation d'une cellule musculaire isolée en DIC (B) et en microscopie à fluorescence après un marquage phalloïdine (en vert) et un contre-marquage Dapi (en bleu). La morphologie allongée, le marquage phalloïdine-positif et le caractère plurinucléé de cette cellule permettent de conclure qu'il s'agit d'une cellule musculaire.

Les expériences d'imagerie calcique mettent en évidence une réponse des cellules musculaires lors de la perfusion de carbamylcholine (analogue non hydrolysable de l'acétylcholine – 1mM). Je présente ici les résultats issus de deux expériences (Figure 32). J'ai pu obtenir une réponse à la carbamylcholine lors de 4 expériences indépendantes. Sur la Figure 32A, on peut voir que lors de la perfusion de carbamylcholine, on observe une augmentation de l'intensité de fluorescence de la sonde calcique, reflet de l'augmentation de concentration calcique intracellulaire. Les cellules musculaires répondent donc à la carbamylcholine, ce qui suggère la présence de récepteurs au niveau de leur membrane plasmique. Aucune réponse n'est observée lors de la seconde perfusion de carbamylcholine (2 sur la Figure 32A, 110 secondes après la 1ère). La cellule semble pourtant avoir conservé l'intégrité de sa membrane plasmique et être toujours vivante puisqu'elle répond à la perfusion d'eau de mer hyperpotassique (en jaune sur la Figure 32A). Ces résultats suggèrent qu'un délai minimum entre deux perfusions soit nécessaire et donc que les récepteurs sont inactivés. Sur la Figure 32B, on observe de nouveau une réponse lors de la 1ère perfusion de carbamylcholine. Lors de la seconde perfusion, (100 secondes après la 1^{ère}), on note une légère variation de fluorescence. Lors de la 3^{ème} perfusion (450 secondes après la 2^{ème}), une variation plus intense est observée. On remarque de plus que le déroulement de la réponse est très similaire à celui observé lors de la 1^{ère} perfusion mais que son amplitude est moindre. Ces résultats suggèrent donc que ces récepteurs sont inactivés puis réactivés (après un certain délai). Les cellules musculaires du système tentaculaire de *P. pileus* semblent donc être des cellules cibles de l'acétylcholine. En revanche, aucune réponse n'a été observée au niveau des colloblastes en présence de carbamylcholine.

Au cours de cette expérience (Figure 32B), l'effet du glutamate (1mM) a aussi été testé et n'a entraîné aucune modification de la fluorescence. Cependant, seulement deux expériences ont été réalisées en présence de glutamate.

Figure 32 Présentation de deux résultats (A, B) obtenus lors des expériences d'imagerie calcique. Les cellules musculaires sont chargées en Fluo4AM (sonde calcique) dont l'intensité de fluorescence reflète la concentration calcique intracellulaire. Les courbes présentent la variation de l'intensité de fluorescence, normalisée par rapport à la fluorescence initiale, en fonction du temps. La fluorescence est mesurée au niveau de différentes zones de la cellule (ROI) définies préalablement (voir Matériel et Méthodes). Sous les courbes, la perfusion de carbamylcholine est indiquée en rouge, de glutamate en vert et d'eau de mer en gris. Les chiffres indiqués correspondent aux perfusions successives de carbamylcholine.



L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes nicotiques et muscariniques entraîne une modification du comportement et de la morphologie générale de *P. pileus*

L'utilisation d'agonistes (carbamylocholines) et d'antagonistes compétitifs des récepteurs nicotiques et muscariniques (respectivement curare et atropine) a entraîné des effets dose-dépendants et réversibles sur le comportement et la morphologie de *Pleurobrachia pileus*. Les effets concernent principalement la contraction de cellules musculaires (musculature des tentacules et tentilles, de la bouche, du corps de l'animal), ainsi qu'une modification du comportement de nage et de perception de la gravité.

Dans de l'eau de mer artificielle, *P. pileus* adopte une position verticale (axe oral-aboral parallèle à la gravité – Figure 33A,A') avec la bouche orientée soit vers le haut, soit vers le bas. Il alterne entre ces deux positions. On parle de changement de « moods » (humeurs) de l'animal (Tamm 1982). Quelques secondes après son introduction dans le flacon, l'animal se place donc à la verticale et détend ses tentacules et ses tentilles. La stimulation mécanique (à l'aide d'une pipette en verre touchant la surface de son corps entre 2 rangées de peignes) entraîne une rétractation de ses tentacules ainsi que la contraction des tentilles. Il adopte alors le mood « bouche vers le haut » et finit par détendre ses tentacules et ses tentilles après quelques secondes. Lorsque l'animal est stimulé alors que ses tentacules sont contractés, il procède alors à un bref relâchement de ceux-ci suivi de leur contraction. L'orientation horizontale est très rarement observée en eau de mer et cesse lorsque l'on stimule l'animal (pipette en verre approchée de la surface de son corps).

Effets de l'atropine sur le comportement de P. pileus

L'effet de l'atropine est dose-dépendant. Les concentrations de 10 mM, 1 mM, 0,1 mM et 0,01 mM ont été testées. La concentration de 0,01 mM n'a aucune conséquence alors que pour des concentrations croissantes, on observe des effets plus rapides et plus intenses. Des vidéos concernant les concentrations de 10mM (Vidéo 1) et de 1 mM (Vidéo 2) sont présentées en ligne sur le site <http://aliciacoste.wix.com/ppileus>.

L'introduction de l'atropine à 10 mM entraîne la rétractation complète des tentacules au sein de la gaine tentaculaire, de façon quasi-immédiate (Figure 33 – Vidéo 1). Pour les concentrations de 1 mM (Vidéo 2) et de 0,1 mM, on observe des cycles de contraction-relâchement des tentacules, respectivement pendant 3 à 6 minutes et pendant 10 à 15 minutes, les mouvements de contraction étant brefs et saccadés. Ces cycles sont suivis de la contraction complète des tentacules et des tentilles et de leur rétractation au sein de la gaine. La stimulation mécanique de l'animal n'entraîne aucune modification de cet état de contraction. Un changement de forme de l'animal est aussi observé, avec une diminution de sa taille selon l'axe oral-aboral (Figure 33B), une contraction de l'épithélium

(Figure 33C, surface du corps côtelée) ainsi qu'une augmentation de l'ouverture de sa bouche (Figure 33B,C). Le diamètre d'ouverture de la bouche semble d'autant plus important que la concentration en atropine est élevée. On observe de plus que le comportement de nage de l'animal est modifié. Par moment, sans aucune stimulation extérieure, il se met à tourner sur lui-même, grâce à l'inversion du sens de battement de certaines de ses rangées de peignes. Il adopte le comportement mis en jeu habituellement lors de la capture d'une proie (Tamm 1982). Il finit ensuite par se stabiliser, verticalement la bouche vers le bas, ou horizontalement au fond de la bouteille, sans réagir aux stimulations mécaniques. Pour finir, on observe la libération d'un mucus gélatineux qui pourrait correspondre à la dégranulation de cellules glandulaires (Figure 33C).

Ces effets sont complètement réversibles pour les concentrations de 1 mM et 0,1 mM. L'animal reprend sa forme initiale, referme sa bouche, détend de nouveau tentacules et tentilles et se replace de manière verticale. Pour la concentration de 10 mM, la forme initiale de l'animal n'est pas toujours retrouvée mais l'animal finit par détendre ses tentacules et ses tentilles (Figure 33D). La disparition des effets prend d'autant plus de temps que la concentration pendant le traitement est élevée.

Effets du curare sur le comportement de P. pileus

L'effet du curare est dose-dépendant. Les concentrations de $2,3 \cdot 10^{-3}$ M, 10^{-4} M et 10^{-5} M ont été testées. La concentration de 10^{-5} M n'a aucune conséquence alors que pour des concentrations croissantes, on observe des effets plus rapides et plus intenses. Une vidéo concernant la concentration de 10^{-4} M (Vidéo 3) est présentée en ligne sur le site <http://aliciacoste.wix.com/ppileus>.

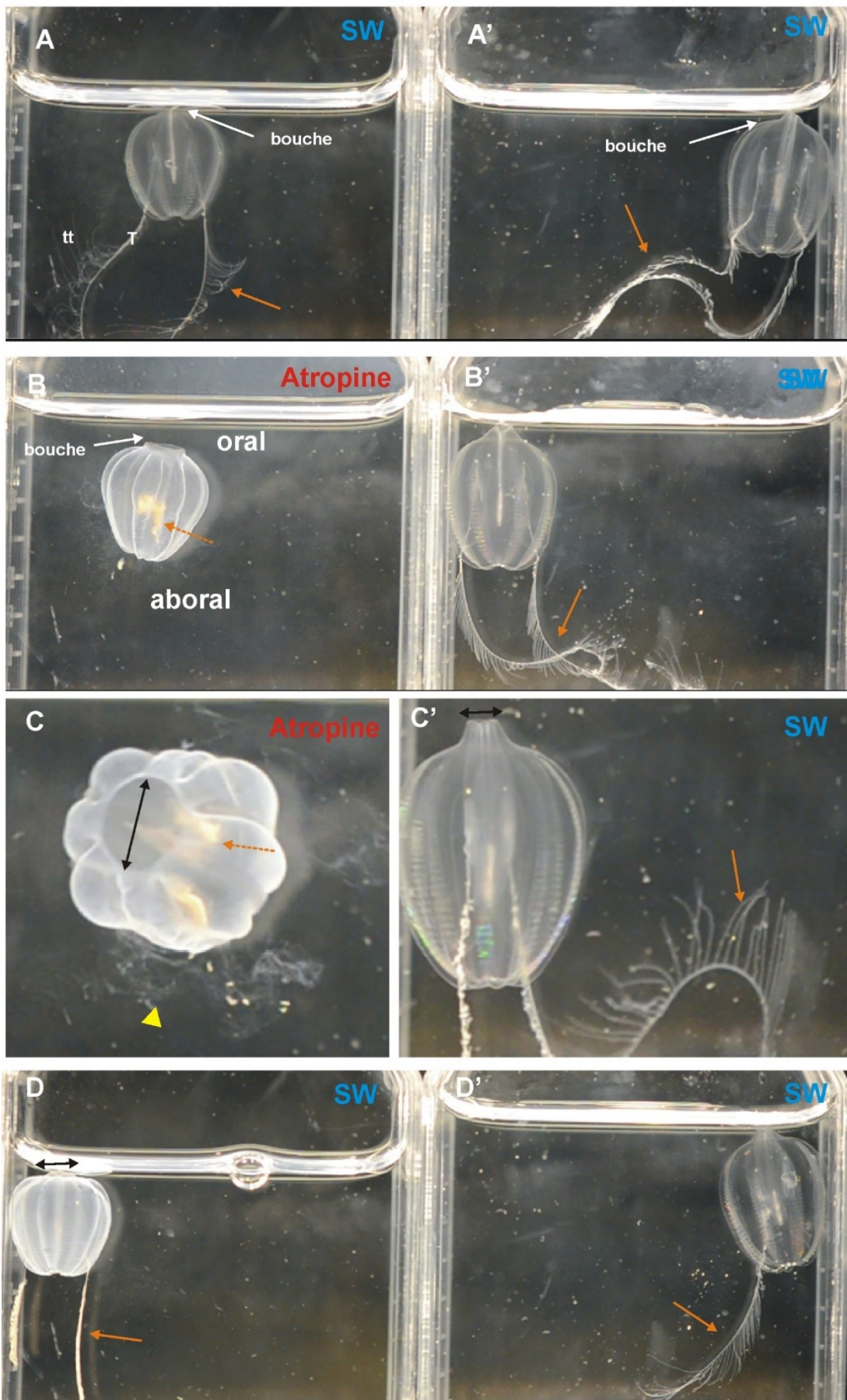
L'introduction de curare à $2,3 \cdot 10^{-3}$ M entraîne la contraction immédiate des tentilles et des tentacules. A 10^{-4} M (Figure 34, Vidéo 3), on observe des cycles de contraction-relâchement des tentacules (la contraction étant brusque et le relâchement plus lent). Au bout d'une moyenne de 6 minutes, l'animal contracte complètement ses tentacules et ses tentilles qu'il rétracte au sein de la gaine tentaculaire (Figure 34B'). Un changement de forme général est observé avec un allongement selon l'axe oral-aboral et une fermeture de la bouche. Une fois l'appareil tentaculaire (tentacules + tentilles) complètement rétracté, l'animal adopte toujours une position horizontale au fond de la bouteille qu'il ne quitte pas en cas de stimulation mécanique. Enfin, un liquide gélatineux est aussi sécrété. Ces effets sont réversibles pour toutes les concentrations testées (Figure 34C').

Figure 33 Effets de l'atropine (10 mM), sur la morphologie et le comportement de *P. pileus*. A-A') Condition initiale. B,C-B',C') Effets après ajout du milieu (atropine en B, C et eau de mer (SW) en B', C'). D-D') Effets après retrait du milieu et ajout d'eau de mer (répété 5 fois). La composition du milieu (eau de mer, SW ou atropine) est indiquée pour chaque image. A-A') Les animaux sont en position verticale, la bouche orientée vers le haut et leurs tentacules (T) et tentilles (tt) sont détendus (flèche orange pleine). B, C) En présence d'atropine, l'animal contracte immédiatement ses tentacules et ses tentilles et les rétracte dans la gaine tentaculaire (flèche orange en pointillés). On observe de plus une diminution de sa taille selon l'axe oral-aboral, une nette augmentation de l'ouverture de sa bouche (double flèche noire en C) ainsi que la libération d'un mucus gélatineux (tête de flèche jaune en C). B'-C') Effet de l'ajout d'eau de mer (SW). Les tentacules et tentilles restent détendus (flèche orange), la bouche fermée (double flèche noire en C') et aucune modification de la taille de l'organisme n'est observée. D) L'animal déploie de nouveau ses tentacules et ses tentilles (flèche orange), il

referme sa bouche (double flèche noire) mais conserve sa forme arrondie. D') Le renouvellement de l'eau de mer n'entraîne aucune modification du comportement ni de la morphologie du témoin.

Atropine 10mM

Témoin Eau de mer



Témoin Eau de mer

Curare $10^{-4}M$

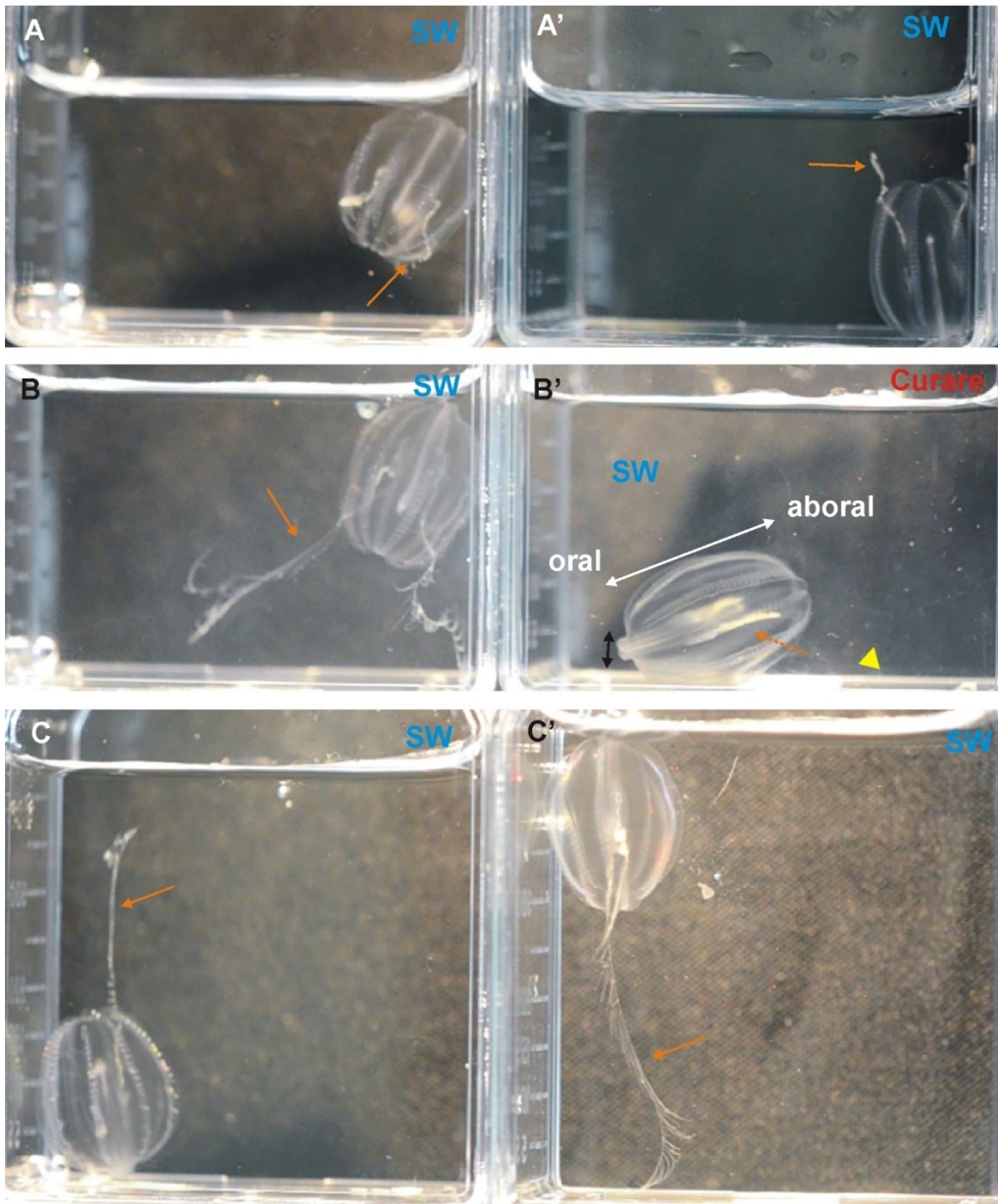


Figure 34 Effets du curare ($10^{-4}M$) sur la morphologie et le comportement de *P. pileus*. A-A') Condition initiale, eau de mer (SW). B-B') Effets après ajout du milieu (SW en B, curare en B'). C-C') Effets après retrait du milieu et ajout d'eau de mer (répété 5 fois). La composition du milieu (eau de mer SW ou curare) est indiquée pour chaque image. A-A') Les animaux ont leurs tentacules et tentilles détendus (flèches pleines oranges). B) L'animal a ses tentacules et tentilles détendus (flèche pleine orange). B') L'animal a ses tentacules et tentilles complètement contractés et rétractés dans la gaine tentaculaire (flèche orange en pointillés) et est orienté horizontalement. On observe de plus un allongement de l'animal selon l'axe oral-aboral (double flèche blanche), la fermeture extrême de la bouche (double flèche noire) ainsi que la libération d'un mucus gélatineux (tête de flèche jaune). C) Animal avec tentacules et tentilles détendus. C') L'animal reprend une position verticale, la bouche vers le haut et détend de nouveau ses tentacules et ses tentilles

Effets de la carbamylcholine sur le comportement de P. pileus

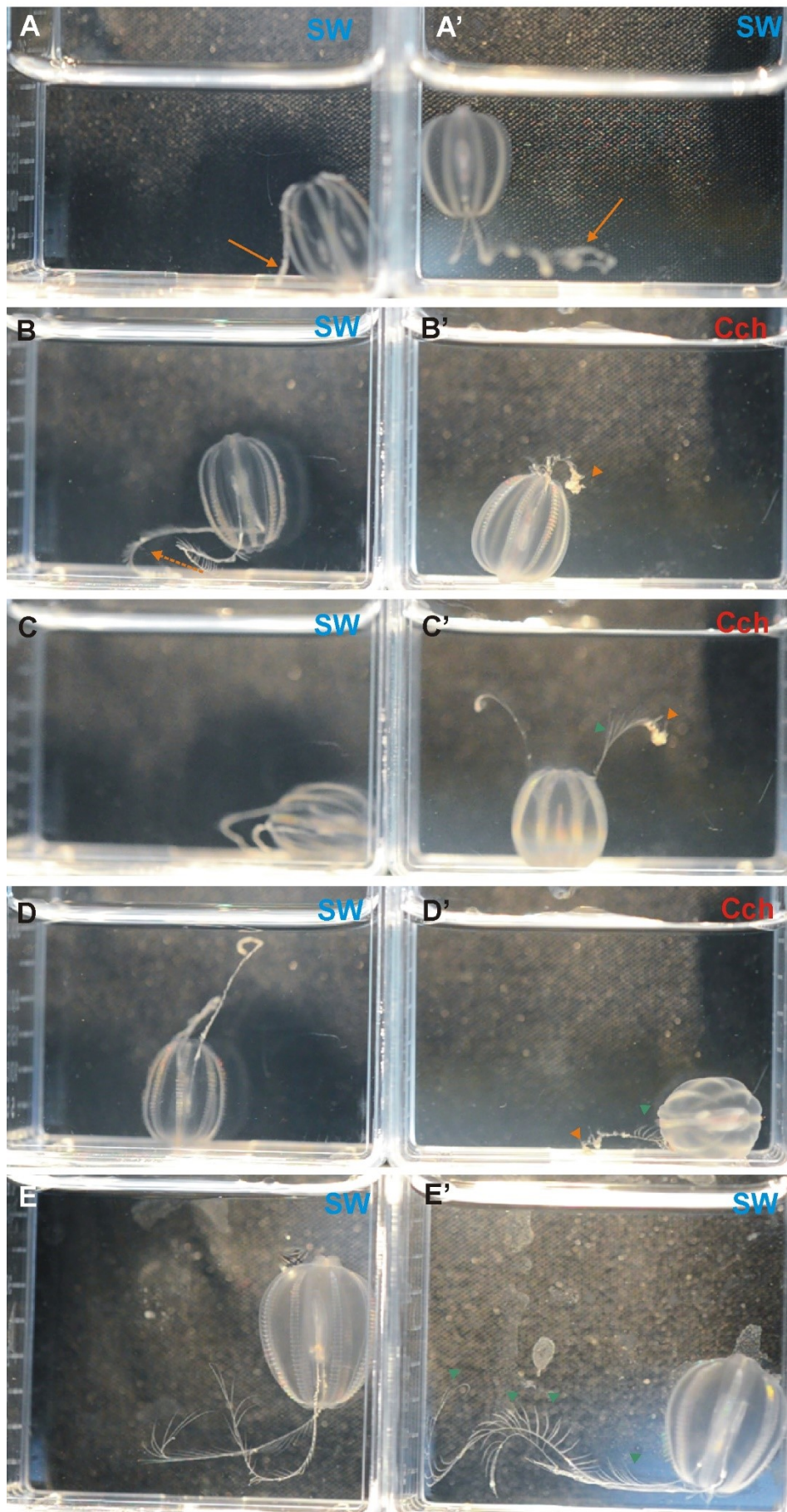
Les effets de la carbamylcholine sont beaucoup moins nets que ceux observés précédemment en présence des antagonistes nicotiques et muscariniques. Une seule concentration a pu être testée (10^{-3} M) et une vidéo (Vidéo 4) est présentée en ligne sur le site <http://aliciacoste.wix.com/ppileus>. L'ajout de carbamylcholine semble affecter l'état de contraction des tentilles qui se contractent dès l'introduction de l'agoniste (Figure 35B'). L'état de contraction des tentacules est variable au cours du temps. Les tentilles situés vers l'extrémité des tentacules restent contractés alors que les tentilles plus proches du corps de l'animal se détendent au bout de quelques minutes (Figure 35C'). Par moment, sans aucune stimulation extérieure, l'animal se met à tourner sur lui-même, grâce à l'inversement du sens de battement de certaines de ses rangées de peignes (Figure 36A). Il adopte donc le comportement mis en jeu normalement lors de la capture d'une proie (Tamm 1982). Il finit ensuite par se stabiliser horizontalement au fond de la bouteille, sans réagir aux stimulations mécaniques (Figure 35D'). On observe de plus des mouvements répétés d'ouverture et de fermeture de la bouche (Figure 36B,C) ainsi que la libération de mucus.

Figure 35 Effets de la carbamylcholine (Cch, $10^{-3}M$) sur la morphologie et le comportement de *P. pileus*.
A-A') Condition initiale, eau de mer (SW). B,C,D-B',C',D') Effets après introduction de la solution (SW en B et C, Cch en B',C',D'). Ces images correspondent à des temps différents après l'introduction du milieu. E-E') Effets après retrait du milieu et ajout d'eau de mer (répété 5 fois). La composition du milieu (eau de mer SW ou Cch) est indiquée pour chaque image. A-A') Les animaux ont leurs tentacules et tentilles détendus (flèches pleines oranges). C,D,E) l'animal conserve ses tentacules détendus et change d'orientation au cours de l'expérience. B') Effets immédiats de l'introduction de Cch (quelques secondes). Tous les tentilles se contractent (tête de flèche orange). L'état de contraction du tentacule est variable au cours du temps et en fonction des individus mais celui-ci n'est jamais rétracté dans la gaine. C') Six minutes en moyenne après l'introduction de Cch. Les tentilles à l'extrémité du tentacule restent contractés (tête de flèche orange) alors que les autres se détendent (tête de flèche verte). D') L'animal finit par se stabiliser horizontalement au fond de la bouteille. Les tentilles situés aux extrémités restent contractés (tête de flèche orange) et les autres détendus (tête de flèche

verte). E') L'animal reprend une position verticale et détend complètement tous ses tentilles ainsi que ses tentacules.

Témoïn Eau de mer

Carbamylcholine 10-3M



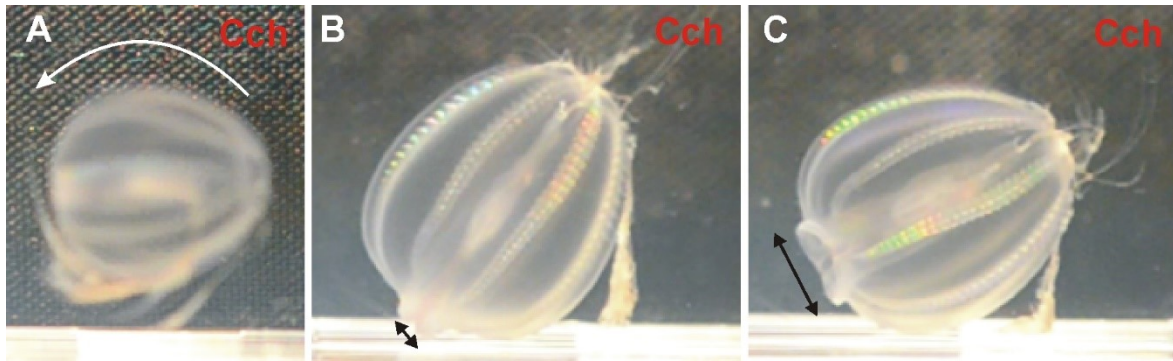


Figure 36 Modifications comportementales de *P. pileus* en présence de carbamylcholine (Cch, $10^{-3}M$). A) Animal adoptant le comportement mis en jeu lors de la capture d'une proie. L'animal tourne sur lui-même grâce à l'inversion du sens de battement de ses peignes. B-C) Mouvements d'ouverture/fermeture de la bouche répétés. La double flèche noire indique le diamètre d'ouverture de la bouche.

Discussion

Nos résultats sont en contradiction avec les récentes publications qui concluent à l'absence complète de l'acétylcholine et d'un système cholinergique chez les Cténaïres (Moroz et al. 2014, Moroz 2015). En effet, nous mettons ici en évidence non seulement la présence des principaux acteurs du système cholinergique - l'acétylcholine elle-même (ACh), le Transporteur de Haute Affinité de la Choline (CHT) et l'acétylcholinestérase (AChE) – mais aussi leur colocalisation au sein de différents tissus dont des territoires nerveux de *Pleurobrachia pileus* ainsi que l'effet de l'acétylcholine au niveau de cellules cibles (cellules musculaires) (Tableau 1). Ces résultats suggèrent donc l'existence d'un système cholinergique fonctionnel ainsi que l'utilisation de l'acétylcholine en tant que molécule signal au sein des Cténaïres et notamment au sein du système nerveux.

La molécule acétylcholine a été mise en évidence pour la première fois chez un Cténaïre. Sa détection au niveau du système tentaculaire (tentacules + tentilles) de *P. pileus* suggère sa présence dans le reste de l'animal. La technique de détection à laquelle nous avons eu recours est extrêmement sensible et spécifique de la détection de l'acétylcholine. L'extrême fragilité de cette molécule ainsi que l'utilisation d'autres techniques de détection non spécifiques de l'acétylcholine pourraient expliquer que Moroz et ses collaborateurs ne soient pas parvenus à la détecter (Moroz et al. 2014). La présence des paralogues *PpiCHT1* et *PpiCHT2* dont l'orthologie avec les gènes de Bilatériens est très fortement soutenue ainsi que d'orthologues de l'acétylcholinestérase dont les principaux résidus nécessaires à l'hydrolyse de l'acétylcholine sont conservés sont aussi des arguments forts en faveur de l'existence d'un système cholinergique chez les Cténaïres. CHT est particulièrement intéressant puisqu'il constitue une innovation des Eumétazoaires et qu'il est le seul acteur du système cholinergique qui

semble être spécifiquement associé au système nerveux chez les Bilatériens (Brandon et al. 2004, Black & Rylett

2012). Il est en effet largement utilisé comme marqueur du système nerveux cholinergique chez les Bilatériens.

		Système tentaculaire				Epiderme				Mésogée			Organe aboral		Peignes		Canaux endo. Pharynx	
		Tentille		Tentacule		SN	Muscles	Cellules glandulaires	Bouche SN	SN	Muscles	Cellules de Franc (VC)	Organe apical	Champs polaires	SN epith	Polster cells		
Cellules cholinergiques putatives	Det. ACh	■				■				■			■		■		■	
	AC Ach	■			?	■		■	■	■	?	■		■	■	■	■	
	Activité AChE	■		■				■	■						■			■
	CHT	■							■					■	■	■		■
Cellules cibles	Imagerie calcique		■		■													
	Pharmaco		■		■			■	■		■		■			■		■

Tableau 1 : Bilan des territoires cholinergiques et des cellules cibles de l'acétylcholine chez *P. pileus*. Ce tableau récapitule les différents territoires cholinergiques putatifs mis en évidence par la détection de l'acétylcholine par ED-HPLC (Det. ACh), l'immunomarquage acétylcholine (AC Ach), l'activité acétylcholinestérase (Activité AChE) et l'expression des paralogues *PpiCHT1* et *PpiCHT2* (CHT). Les différentes cellules cibles potentielles déduites des expériences d'imagerie calcique et de l'approche pharmacologique (Pharmaco) sont aussi indiquées.

De manière spectaculaire l'immuno-détection de l'acétylcholine, l'étude de l'activité acétylcholinestérase et de l'expression des paralogues *PpiCHT1* et *PpiCHT2* montrent une nette co-localisation de ces marqueurs reconnus du système cholinergique, qui dans le cas de *PpiCHT1* est largement associée aux territoires nerveux de *Pleurobrachia pileus* (Tableau 1). Les résultats les plus spectaculaires concernent les systèmes nerveux associés aux tentilles et à la bouche pour lesquels on observe une colocalisation des trois marqueurs du système cholinergique (expression de *PpiCHT1*, activité acétylcholinestérase et immunolocalisation de l'acétylcholine). L'association de ces trois marqueurs est aussi observée au niveau de l'épithélium des peignes où des populations de neurones ont été mises en évidence (Hernandez-Nicaise 1991) et suggère une innervation cholinergique des peignes. La mise en évidence précise d'une localisation nerveuse demande à y être précisée, cependant l'identification des cellules nerveuses à l'aide de l'anticorps YL1/2 n'a pu être réalisée au niveau des peignes qui sont recouverts d'une épaisse couche de cils fortement YL1/2-positifs rendant l'observation impossible. Une nette association au système nerveux est aussi mise en évidence par la présence d'acétylcholine au niveau de sous-populations de neurones mésogléens et épidermiques. Il existerait donc des neurones cholinergiques au sein de ces deux systèmes nerveux. Au niveau des champs polaires, l'association à des cellules nerveuses semble moins évidente et aucune activité acétylcholinestérase n'a été détectée. La ligne interne de la zone marginale est marquée par l'anticorps

anti-acétylcholine. Cette ligne est aussi marquée lors de l'utilisation d'anticorps dirigés contre les catécholamines (Jager et al. 2013) mais aucun argument ne permet de conclure qu'il s'agit de cellules nerveuses, ni même de cellules. On note cependant que *PpiCHT1* s'exprime dans la partie la plus interne de cette zone marginale, comprenant la zone où l'acétylcholine a été détectée.

On peut noter de plus une bonne coïncidence des territoires négatifs pour tous les marqueurs, en particulier au niveau de la marge orale : anti-acétylcholine négative, pas d'expression de *PpiCHT1*, ni de *PpiCHT2* et absence d'activité acétylcholinestérase.

L'existence d'un système cholinergique en contexte non neural, comme cela a pu être largement démontré à l'échelle des Bilatériens, a aussi été mise en évidence chez *P. pileus*. L'expression du paralogue *PpiCHT2* est largement associée aux territoires endodermiques ainsi qu'au pharynx (d'origine ectodermique) où l'activité acétylcholinestérase a ainsi été détectée (Tableau 1). Une spécialisation fonctionnelle aurait donc eu lieu après la duplication spécifique des Cténaïres. Il est intéressant de noter que cette spécialisation fonctionnelle ne semble pas être liée à la nature neurale ou non neurale des cellules puisque *PpiCHT1* est aussi exprimé au niveau des ovocytes. D'autres types cellulaires non nerveux semblent utiliser le système cholinergique et ont été mis en évidence par la détection de l'acétylcholine associée ou non à celle de l'activité acétylcholinestérase. Les cellules glandulaires (de type spumeux) de l'épiderme ainsi que les cellules à vacuoles de la mésoglée semblent ainsi être de type cholinergique. Certains muscles mésogléens du corps de l'animal et de l'axe du tentacule sont aussi marqués par l'anticorps anti-acétylcholine. Ce marquage est difficile à interpréter. On peut se demander si ces cellules musculaires sont capables de synthétiser de l'acétylcholine comme cela a été démontré chez les Vertébrés (Tucek 1982).

Il est important de noter ici qu'il n'est pas toujours évident de détecter la présence de chacun des marqueurs au niveau des différents tissus de l'animal et plus particulièrement au niveau du système nerveux (Tableau 1). L'analyse de l'expression de *PpiCHT1* par la technique d'hybridation *in situ* est particulièrement délicate lorsqu'il s'agit de cellules isolées et donc au niveau des neurones épidermiques et mésogléens par exemple. La synthèse d'un anticorps spécifique de *PpiCHT1* permettrait de vérifier de façon très précise son association avec les neurones mésogléens et cholinergiques. L'activité de l'acétylcholinestérase étant extracellulaire, on ne s'attend pas nécessairement à une localisation au sein des cellules nerveuses elles-mêmes. Pour finir, il est important de noter que la spécificité de l'anticorps dirigé contre l'acétylcholine reste à nuancer du fait de la petite taille de cette molécule. Cependant, le marquage uniquement au niveau de certaines sous-populations cellulaires ainsi que sa colocalisation avec les autres marqueurs du système cholinergique vont dans le sens d'un marquage spécifique.

La mise en évidence de cellules cibles de l'acétylcholine par les expériences d'imageries calciques et par les approches pharmacologiques est un argument fort en faveur de l'existence de ce

système cholinergique chez les Cténaïres. Nous mettons ici en évidence la réponse des cellules musculaires du système tentaculaire à l'acétylcholine. Ceci suggère donc fortement l'utilisation de l'acétylcholine comme neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire chez les Cténaïres. Différentes hypothèses pourraient expliquer que Moroz et ses collaborateurs n'aient obtenu aucune réponse lors de la réalisation d'expériences similaires chez *Pleurobrachia bachei* (Moroz et al. 2014) alors qu'ils ont obtenu des signaux en présence de glutamate. On peut suggérer que cette différence soit due au type de cellules musculaires utilisées lors de l'expérience, puisque ces auteurs disent avoir réalisé leurs expériences sur des cellules musculaires pariétales de l'épiderme. Il est ainsi connu que chez les Crustacés, le type de neurotransmetteur (acétylcholine ou glutamate) peut être différent en fonction du type de cellule musculaire impliqué (Atwood 1976, Kawagoe 1981). On peut de plus noter, d'après la grande expertise de la morpho-anatomie de *Pleurobrachia* présente au sein de notre laboratoire, que la morphologie des cellules utilisées dans ces expériences ne correspond pas à celle de cellules musculaires (Moroz et al. 2014, Extended Data Figure 7e) et qu'une erreur d'identification du type cellulaire pourrait expliquer l'absence de réponse. Dans nos expériences, l'analyse de la morphologie, de la taille ainsi que le marquage phalloïdine des cellules que nous avons testées nous permettent de conclure avec certitude qu'il s'agit de cellules musculaires. La dernière hypothèse tient compte des aspects techniques de cette expérience dont les modifications essentielles portent sur le type de dissociation et sur l'utilisation de carbamylcholine à la place de l'acétylcholine. L'utilisation d'une dissociation thermique à la place d'une dissociation enzymatique permet de limiter l'altération des protéines membranaires et donc des récepteurs potentiels de l'acétylcholine et l'utilisation de carbamylcholine (analogue non hydrolysable de l'acétylcholine) permet d'éviter, au cours de l'expérience, la dégradation de l'acétylcholine, connue pour être très rapidement hydrolysable. Il est important de plus de noter que cette expérience est très difficile à mettre en œuvre et que l'absence de réponse peut être due dans de nombreux cas à des problèmes techniques. Enfin, la mise en évidence de modifications morphologiques et comportementales de *Pleurobrachia pileus* suite à l'application d'un agoniste (carbamylcholine) et d'antagonistes des récepteurs nicotiniques et muscariniques de Bilatériens (curare et atropine) suggère la présence de cellules cibles à l'échelle de l'organisme. De manière remarquable, les territoires qui semblent être touchés coïncident complètement avec les territoires cholinergiques nerveux et non nerveux mis en évidence (Tableau 1). On observe ainsi la contraction de cellules musculaires au niveau des systèmes tentaculaire, épidermique et mésogléen (expliquant les changements de forme), des mouvements d'ouverture/fermeture de la bouche, des modifications de battement des peignes ainsi que la dégranulation de cellules glandulaires. Tous les types cellulaires concernés présentent au moins l'un des marqueurs du système cholinergique utilisés dans notre étude. Bien sûr, ces résultats restent à nuancer car on ne peut pas exclure qu'une partie des effets observés soit non spécifique (en lien avec la toxicité de la molécule ou le stress induit).

Même si l'existence d'un système cholinergique et son association au système nerveux semblent désormais avérés, certains points restent énigmatiques. En effet, la perte de l'orthologue de ChAT/CrAT (enzymes de synthèse de l'acétylcholine) chez les Cténaïres est très surprenante. La présence d'acétylcholine implique cependant forcément la présence d'une enzyme réalisant la synthèse de l'acétylcholine chez les Cténaïres. Les enzymes ChAT/CrAT appartiennent à la grande famille des COA-acyltransférases (enzymes assurant le transfert de chaînes d'acides gras), et l'hypothèse la plus probable est qu'un phénomène de co-option ait eu lieu et qu'une autre enzyme de cette famille joue désormais ce rôle. La duplication spécifique des Cténaïres au sein du groupe d'orthologie des CPT2 (carnitines palmitoyltransférases 2), paraît alors particulièrement intéressante. Ces enzymes étant impliquées dans le métabolisme basal chez les Mammifères, elles présentent une expression plus ou moins ubiquitaire. L'étude de l'expression des trois gènes *CPT* de *P. pileus* (*PpiCPT1* et les deux paralogues issus de la duplication spécifique des Cténaïres *PpiCPT2.1* et *PpiCPT2.2*) montre de manière spectaculaire que l'un d'entre eux ne présente pas le pattern ubiquitaire attendu. En effet, l'expression de *PpiCPT2.2* mime complètement la somme des patterns d'expression de *PpiCHT1* et *PpiCHT2*. Ce gène est ainsi exprimé dans tous les territoires où l'un des deux transporteurs de haute affinité de la choline, spécifiques du système cholinergique est exprimé. De même, *PpiCPT2.2* n'est pas exprimé dans les territoires négatifs pour les marqueurs du système cholinergique comme la marge orale, alors que *PpiCPT1* et *PpiCPT2.1* le sont.

Notre hypothèse est donc que le paralogue *PpiCPT2.2* soit l'enzyme responsable de la synthèse de l'acétylcholine. La longue branche portant le groupe des CPT2.2 des Cténaïres (Figure 11, page 147) va aussi dans ce sens. De plus, des expériences de mutagenèse dirigée ont mis en évidence que la présence de mutations ponctuelles au niveau des enzymes ChAT et CrAT humaines entraînait un changement de comportement de ces enzymes permettant un fonctionnement de type CPT (Cordente et al. 2006, Green et al. 2010). Il est alors facile d'imaginer que suite à la forte divergence du CPT2.2, cette protéine ait acquis la capacité de synthétiser de l'acétylcholine chez l'ancêtre commun des Cténaïres. Il serait alors intéressant de tester, *in vitro*, la capacité de synthèse de l'acétylcholine de cette protéine afin de valider notre hypothèse. En ce qui concerne les gènes *PpiCPT1* et *PpiCPT2.1*, leur expression apparaît plus ou moins ubiquitaire, en lien avec la conservation probable de leur rôle dans le métabolisme basal des cellules.

Une nouvelle question se pose en ce qui concerne les récepteurs. La mise en évidence d'effets sur des cellules cibles (imagerie calcique et approches pharmacologiques) constitue une preuve indirecte de leur existence, notamment au niveau des cellules musculaires. L'analyse d'orthologie des récepteurs nicotiniques met en évidence une perte chez les Cténaïres. Celle des récepteurs muscariniques par contre permet de proposer 3 gènes codant potentiellement pour des récepteurs de l'acétylcholine de type GPCR. Il serait alors intéressant de réaliser l'étude de l'expression de ces 3 gènes afin de voir si l'un d'entre eux présente un pattern allant dans ce sens. On peut noter ici que les

effets obtenus lors des approches pharmacologiques peuvent paraître surprenants car le curare entraîne un effet, alors que les récepteurs nicotiniques sont absents. De plus, les effets observés sont contraires à ceux obtenus chez les Bilatériens. Cependant, ces antagonistes sont des inhibiteurs compétitifs des récepteurs et on peut alors émettre l'hypothèse que le site de liaison de l'acétylcholine des récepteurs des Cténares ait une conformation qui permette la fixation de ces molécules (sans être homologue des récepteurs nicotiniques pour le curare) et que cette fixation entraîne des effets différents de ceux observés chez les Bilatériens. Il a aussi été décrit un effet de l'atropine sur la stimulation de la contraction musculaire chez les Cnidaires (Kass-Simon & Pierobon 2007).

Pour finir, la perte de l'orthologue du transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VAChT) chez les Cténares ne va pas à l'encontre de l'existence d'un système cholinergique puisqu'il a été mis en évidence que les étapes de transport et de libération de l'acétylcholine pouvaient être médiés par d'autres protéines chez les Bilatériens (Kummer et al. 2008, Wessler & Kirkpatrick 2008). Chez ces derniers, en contexte non neural, la libération de l'acétylcholine peut se faire directement à partir du cytoplasme, grâce à des protéines appartenant à la famille des OCTs (Transporteurs de cations organiques). La recherche d'orthologue de ces transporteurs chez les Cténares pourrait alors être intéressante.

L'ensemble de ces résultats met donc en évidence la présence d'un système cholinergique fonctionnel en contexte nerveux et non nerveux chez les Cténares. Le mystère de l'enzyme de synthèse ainsi que des récepteurs de l'acétylcholine n'est que partiellement résolu. Cependant, le fait que CHT soit une synapomorphie moléculaire des Eumétazoaires est un argument fort pour penser que le système nerveux cholinergique des Cténares est homologue à celui des Cnidaires et des Bilatériens. Corrélativement, la mise en évidence d'un système cholinergique associé aux cellules nerveuses chez les Cténares appuie l'hypothèse d'homologie de leurs neurones avec ceux des Cnidaires et des Bilatériens, plutôt que le scénario de convergence proposé par Moroz et al. (2014).

Chapitre 3

Aspects de l'évolution du contrôle de la prolifération cellulaire abordés dans le contexte des « tapis roulants cellulaires »

Mon travail concernant l'évolution des mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire s'est inscrit dans le cadre de l'exploitation des tapis roulants cellulaires de *Pleurobrachia pileus* et de *Clytia hemisphaerica*. Je vais commencer par présenter ce que sont les tapis roulants cellulaires avant de décrire précisément l'organisation morpho-anatomique des tapis roulants de nos deux modèles.

3.1 Les tapis roulants cellulaires

3.1.1 Concept de « tapis roulant cellulaire », exemples à travers les Métazoaires et intérêts expérimentaux

Un tapis roulant cellulaire (Devès & Bourrat 2012) est caractérisé par la production des types cellulaires constitutifs d'un organe ou d'un tissu, de manière régulée et orientée spatialement à partir d'une population localisée de cellules souches et de progéniteurs en prolifération. On y observe une ségrégation spatio-temporelle des différents stades du lignage cellulaire, avec la délimitation plus ou moins nette de différentes zones : 1) cellules souches, 2) progéniteurs en prolifération active, 3) cellules sortant du cycle cellulaire, 4) cellules en différenciation et cellules matures (Figure 3.1). Les tapis roulants cellulaires sont donc caractérisés par une zone de cellules souches restreinte spatialement ainsi que par une organisation polarisée (niche de cellules souches à un pôle et cellules différenciées à l'autre).

La croissance d'un organe ou d'un tissu selon un fonctionnement en tapis roulant cellulaire a été observée chez différents Métazoaires très éloignés phylogénétiquement (Denker et al. 2008b, Alié et al. 2011, Dayraud et al. 2012, Devès & Bourrat 2012). Toutefois, peu d'exemples sont décrits en

détail dans la littérature. Il s'agit de systèmes analogues présentant le même type d'organisation et de dynamique.

A l'échelle des Bilatériens, des tapis roulants cellulaires ont été principalement décrits chez les Vertébrés (Devès & Bourrat 2012). On en trouve par exemple au niveau des cryptes intestinales des Mammifères (Figure 3.1 A - Marshman et al. 2002), au niveau de la rétine des Téléostéens et des Amphibiens (Figure 3.1 B - Perron et al 1998, Nguyen et al. 1999) ou encore du toit optique (zone du cerveau) du Médaka (Figure 3.1 C - Devès & Bourrat 2012, Thèse Mathilde Devès 2012). Ces tapis roulants sont présents chez les embryons et chez l'adulte. Un exemple de tapis roulant cellulaire a aussi été décrit chez les Protostomiens, au niveau du ganglion cérébral des escargots (Zakharov et al. 1998).

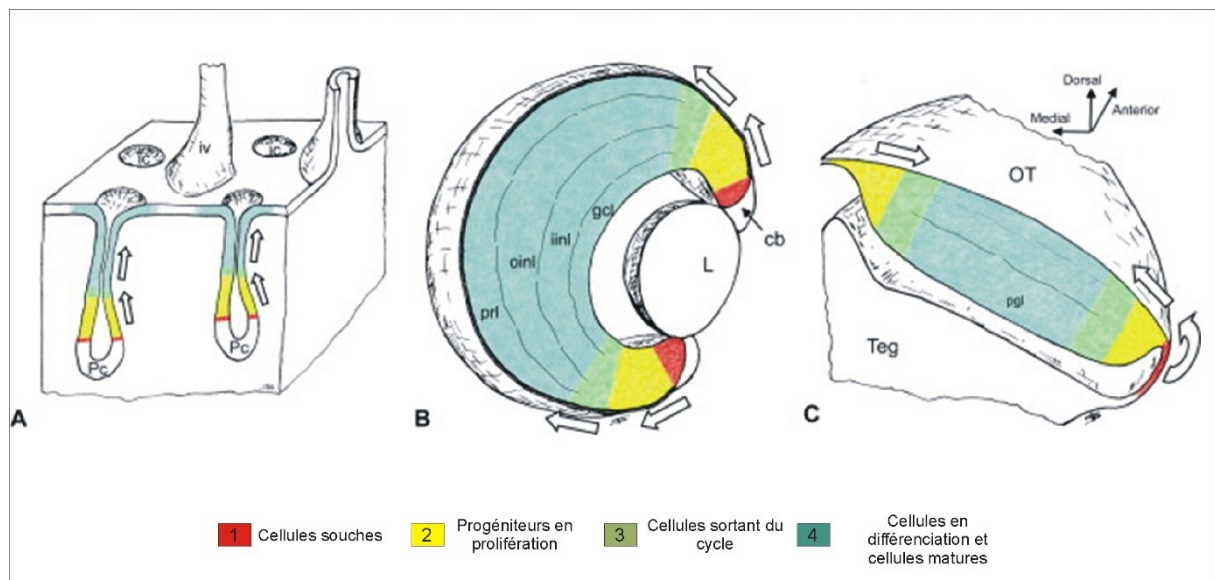


Figure 3.1 Représentation schématique de trois exemples de tapis roulants cellulaires d'organismes Bilatériens. A) Cryptes intestinales de Mammifères. B) Rétine d'un Téléostéen ou d'un Amphibien. C) Toit optique d'un Téléostéen. La zone de cellules souches est figurée en rouge (1), la zone des progéniteurs en prolifération active en jaune (2), la zone de sortie du cycle cellulaire en vert (3) et la zone des cellules différenciées en bleu (4). Les flèches indiquent le sens de déplacement des cellules au sein du tapis roulant. Cb : corps ciliaire, gcl : couche de cellules ganglionnaires, iinl : partie interne de la couche nucléaire interne, ic : crypte intestinale, iv : villosités intestinales, L : lentille, oinl : partie externe de la couche nucléaire interne, OT : toit optic, Pc : cellules de Paneth, prl : couche des photorécepteurs, Teg : tegmentum. Devès & Bourrat (2012).

En dehors des Bilatériens, *Clytia hemisphaerica* et *Pleurobrachia pileus* sont les deux seules espèces, faisant l'objet d'études en laboratoire, chez qui des tapis roulants cellulaires ont été caractérisés (Figure 3.2 - Denker et al. 2008b, Alié et al. 2011, Dayraud et al. 2012). Ces tapis roulants sont présents chez les adultes (chez la méduse pour *Clytia hemisphaerica*) et sont situés au niveau de renflements à la base des tentacules : la racine tentaculaire chez *Pleurobrachia pileus* et le bulbe

tentaculaire chez *Clytia hemisphaerica*. Ils sont le siège d'un processus continu de régénération des tissus tentaculaires.

De par leur organisation et leur dynamique, les tapis roulants constituent un bon modèle d'exploration des processus de contrôle des cellules souches, de la prolifération, de la sortie du cycle ainsi que de la différenciation cellulaire et donc plus largement du contrôle du destin cellulaire. Une fois la caractérisation spatiale et temporelle précise du tapis roulant faite, il est possible de l'utiliser comme modèle prédictif dans la mise en évidence d'acteurs et/ou de voies de signalisation impliqués dans l'une des étapes du lignage cellulaire. En effet, la localisation de l'expression d'un gène peut être traduite en terme de *timing* d'expression par rapport aux différents stades du lignage cellulaire et dans un second temps, ceci peut permettre d'émettre des hypothèses concernant sa fonction. Cette approche a été utilisée dans la recherche de gènes impliqués dans l'arrêt de la prolifération cellulaire au sein du toit optique du Médaka (Candal et al. 2004, Candal et al. 2007). L'hypothèse de travail formulée par les auteurs est qu'un gène dont l'expression est restreinte à la zone de transition entre zone de prolifération (zone 1) et zone de différenciation (zone 3) est potentiellement impliqué dans la régulation de la sortie du cycle cellulaire. Associés à des études fonctionnelles, ces résultats ont permis de mettre en évidence, *in vivo*, deux nouveaux régulateurs négatifs de la prolifération : GADD45- γ (Candal et al. 2004) et *Insm1* (Candal et al. 2007). La recherche de régulateurs négatifs de la prolifération à l'aide du toit optique du Médaka a été poursuivie par la constitution d'une liste de gènes connus pour être impliqués dans l'arrêt de la prolifération chez les Mammifères, *in vivo* ou en contexte de culture cellulaire. Un criblage des patterns de leurs orthologues chez le Médaka au niveau du toit optique a été réalisé par hybridation *in situ* (données non publiées, Thèse Mathilde Devès 2012). Parmi une liste de 150 gènes, 3 d'entre eux présentent une expression en bande restreinte à la zone des cellules sortant du cycle, qui suggère la conservation d'un rôle dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire. Un autre exemple de l'utilisation d'un tapis roulant cellulaire dans ce contexte est celui de la mise en évidence de la régulation de la prolifération par la voie Wnt canonique au niveau de la rétine de Xénope (Denayer et al. 2008). Cette approche par gène candidat, utilisant comme support un tapis roulant cellulaire, est rare aujourd'hui et est particulièrement adaptée chez les espèces pour lesquelles les approches fonctionnelles ne sont pas encore disponibles, comme c'est le cas chez *Pleurobrachia pileus* et *Clytia hemisphaerica*.

Ce type d'approche demeure évidemment très discutable puisque l'hybridation *in situ* permet d'appréhender l'expression d'un gène et ne donne donc pas d'information au niveau protéique et encore moins au niveau fonctionnel. Il existe en effet une fenêtre de temps entre la transcription d'un gène et la maturation d'une protéine, qui se reflète au niveau du tapis roulant par un décalage entre le lieu d'expression du gène et la zone où la protéine est effectivement présente. De plus, de nombreux mécanismes post-transcriptionnels et post-traductionnels peuvent intervenir et jouer sur la forme active de la protéine et/ou sur sa localisation subcellulaire (souvent liée à l'activité de la protéine). Une

protéine intervenant dans une voie de transduction intracellulaire peut ainsi être présente (et donc son gène exprimé) que la voie soit active ou non. La présence des acteurs d'une voie de signalisation (et donc l'expression des gènes dont ils sont issus) ne présage en rien de leurs interactions et est donc difficilement interprétable en terme de fonction le long des tapis roulants cellulaires.

L'étude de mécanismes impliqués dans le contrôle de la balance prolifération/sortie du cycle au niveau des tapis roulants cellulaires d'un Cnidaire et d'un Cténaire présente toutefois de nets avantages lorsque l'on veut les aborder d'un point de vu évolutif. *Clytia hemisphaerica* et *Pleurobrachia pileus* étant les deux seuls organismes non-Bilatériens étudiés à posséder des tapis roulants cellulaires, l'intérêt de ces modèles pour des approches évolutives à l'échelle des Eumétazoaires est évident.

3.1.2 Exploration morpho-anatomique et caractérisation cellulaire et moléculaire des tapis roulants de *P. pileus* et *C. hemisphaerica* : une multiplicité d'approches

Pleurobrachia pileus et *Clytia hemisphaerica* possèdent des tapis roulants cellulaires au niveau de renflements situés à la base des tentacules qui sont le siège, tout au long de la vie, d'un processus intense et continu de régénération des tissus tentaculaires (voir Figures 1.8 et 1.24 pour la localisation du bulbe tentaculaire et de la racine tentaculaire au sein de l'organisme des deux modèles).

Chez *Pleurobrachia pileus*, deux types de tapis roulants cellulaires sont présents au niveau de la racine tentaculaire (Figure 3.2 A, C). Ils permettent la régénération, en continu, des tentacules et des tentilles. Trente-six heures seraient nécessaires pour la régénération du tentacule entier (Hernandez-Nicaise & Franc 1996). La racine tentaculaire est capable de produire tous les types cellulaires de l'appareil tentaculaire, avec en particulier genèse des composants des systèmes nerveux, épithéliaux et musculaires. Cette racine est orientée selon l'axe oral-aboral de l'animal et est logée dans la gaine tentaculaire. En ce qui concerne son organisation générale (Figure 3.2 A), on observe sur la face externe l'émergence du tentacule, et la face interne présente trois bourrelets longitudinaux : les crêtes latérales de nature ectodermique et la crête médiane de nature mésogléenne. En coupe transversale (Figure 3.2 C) elle présente deux expansions latérales (correspondants aux bourrelets latéraux) et une zone centrale proéminente (correspondant au bourrelet médian).

Un premier type de tapis roulant, localisé au niveau des expansions latérales sous la forme de deux tapis roulants symétriques, est à l'origine des colloblastes du tentacule et des tentilles (Figure 3.2 C – flèches bleues). Un second tapis roulant donne naissance aux cellules musculaires et nerveuses du tentacule (Figure 3.2 C – flèches roses) (Alié et al. 2011, Dayraud et al. 2012, Thèse Cyrielle Dayraud

2011) au niveau du bourrelet médian. Les cellules souches sont restreintes au niveau des extrémités de ces tapis roulants. Les différentes étapes de production des colloblastes et des cellules musculaires ont été bien caractérisées (Alié et al. 2011, Dayraud et al. 2012, Thèse Cyrielle Dayraud 2012).

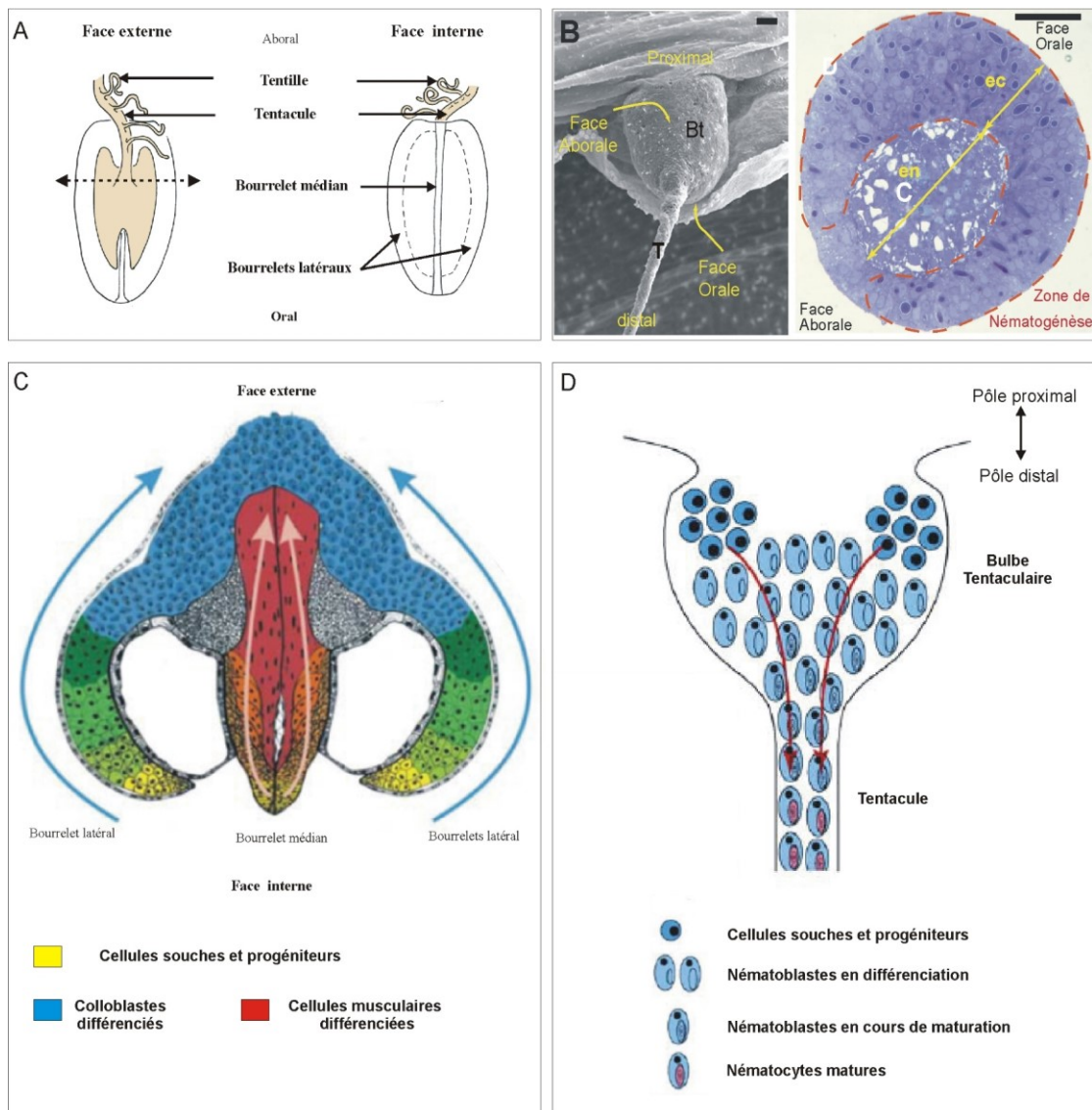


Figure 3.2 Présentation générale des tapis roulants cellulaires de *P. pileus* et *C. hemisphaerica*. A) Schémas de la racine tentaculaire de *P. pileus* en vue externe et en vue interne. B) Bulbe tentaculaire de *C. hemisphaerica*, visible en MEB à gauche et en coupe transversale à droite. On peut visualiser les deux faces orales et aborales du bulbe, la zone de nématogénèse au niveau de l'ectoderme du bulbe ainsi que son interruption au niveau de la face aborale. Bt : bulbe tentaculaire, ec : ectoderme, en : endoderme, T : tentacule. C) Tapis roulants cellulaires de *P. pileus* au niveau de la racine tentaculaire en coupe transversale. Localisation du niveau de coupe en A. En jaune sont figurés les cellules souches et les progéniteurs en prolifération, en bleu les colloblastes différenciés (progression selon les flèches bleues) et en rouge les cellules musculaires différenciées (progression selon les flèches roses). D) Tapis roulant cellulaire du bulbe tentaculaire de *C. hemisphaerica* où l'on peut visualiser le gradient spatio-temporel de différenciation des nématocytes (progression selon les flèches rouges).

Cependant, en ce qui concerne la production des cordons nerveux du tentacule, nous possédons peu de données. La formation des tentilles se fait de manière indépendante dans une zone localisée au niveau de l'extrémité orale de la racine tentaculaire.

Chez *Clytia hemisphaerica*, l'ectoderme du bulbe tentaculaire, renflement à la base du tentacule, est spécialisé dans la production de nématocytes, principal type cellulaire constitutif des tentacules (Figure 3.2 B). Le bulbe est un territoire spécialisé dans la nématogenèse, processus qui s'organise en un tapis roulant cellulaire. On observe un pool de cellules souches localisé à la base du bulbe, puis selon l'axe proximo-distal du bulbe, la prolifération, la différenciation puis la maturation progressive des nématoblastes. Ceci permet la formation de nématocytes matures et fonctionnels au niveau du tentacule. On observe donc, le long de cet axe, quatre zones successives (Figure 3.2 D - Denker et al. 2008b) : la zone la plus proximale des progéniteurs indifférenciés et des cellules souches, la zone des nématoblastes en cours de différenciation et début de maturation, la zone de maturation tardive (zone la plus distale du bulbe) et la zone des nématocytes matures au niveau du tentacule.

Ce fonctionnement en tapis roulant cellulaire est caractéristique de la phase méduse de *Clytia hemisphaerica* et n'a pas été décrit chez d'autres Cnidaires. Aucune nématogenèse n'a lieu au sein du polype de *Clytia hemisphaerica* car la production des nématocytes se fait au niveau des stolons, parties communes de la colonie. Chez l'Hydre (polype solitaire), les nématoblastes sont produits de manière continue à partir de cellules souches interstitielles dispersées au sein de l'ectoderme de la colonne du polype (David & Gierer 1974). Suite à la première division d'une cellule souche, l'une des deux cellules filles subit des divisions successives et synchronisées permettant la formation d'un *cluster* de 4 à 32 cellules. La différenciation des nématoblastes a lieu de manière concomitante aux divisions cellulaires (Rich & Tardent 1969, Tardent et al. 1971). On parle de clusters de nématoblastes. Une fois les divisions terminées, les étapes de maturation ont lieu, les cellules étant toujours associées au sein du cluster. La maturation terminée, le cluster est rompu, les cellules sont libérées individuellement et migrent vers le tentacule. On peut émettre l'hypothèse que dans la méduse de *Clytia hemisphaerica*, la mise en place des nématocytes selon un fonctionnement en tapis roulant cellulaire soit contrainte par la localisation restreinte des populations de cellules souches à la base du tentacule, à distance de la zone d'émergence du tentacule. Le bulbe tentaculaire est une synapomorphie du clade Hydroidolina (qui comprend la plupart des espèces d'Hydrozoaires) (Collins et al. 2006). Peu d'études ont été réalisées chez d'autres espèces que *Clytia hemisphaerica*, mais chez *Podocoryne carnea* (Hydroidolina), les cellules souches sont aussi restreintes à la base du bulbe tentaculaire (Seipel et al. 2004), et il serait intéressant d'étudier la conservation du fonctionnement en tapis cellulaire de la nématogenèse chez cette espèce et plus largement au sein du clade Hydroidolina.

Mise en évidence des tapis roulants cellulaires chez *Clytia hemisphaerica* et *Pleurobrachia pileus* : approche dynamique

La dynamique et le fonctionnement en tapis roulant cellulaire ont pu être mis en évidence, au niveau du bulbe de *Clytia hemisphaerica* et de la racine de *Pleurobrachia pileus*, à l'aide d'expériences d'incorporation d'analogues de la thymidine (témoins de la réplication pré-mitotique – BrdU, Bromodésoxyuridine chez *Clytia hemisphaerica*, Denker et al. 2008b - EdU, Ethynyl-deoxyuridine, chez *Pleurobrachia pileus*, Alié et al. 2011). Ces expériences ont ainsi permis de mettre en évidence la présence de cellules en prolifération (incorporation de l'analogue suite à un pulse) à l'une des extrémités du tissu concerné ainsi que le déplacement polarisé des cellules vers l'autre extrémité (déplacement polarisé du marquage en fonction de la durée de la chasse).

Chez *Clytia hemisphaerica*, l'incorporation de BrdU au cours d'un pulse court (30 minutes) met en évidence la présence de cellules en prolifération dans la zone la plus proximale du bulbe (Figure 3.3 A – zone a et partie proximale de la zone b). Au cours des chasses plus ou moins longues (Figures 3.3 B-F), on observe un déplacement des cellules le long de l'axe proximo-distal, depuis la base du bulbe (partie proximale), jusqu'à l'extrémité du tentacule (partie distale). Après 48h de chasse (Figure 3.3 F), plus aucune cellule n'est marquée au niveau du bulbe.

Chez *Pleurobrachia pileus* (Figure 3.4), l'incorporation d'EdU (pulse 12h), suivie de chasse plus ou moins longue, est témoin d'un flux de cellules le long des tapis roulants latéraux (colloblastiques – Figure 3.4 A-C) et médian (Figures 3.4 D-E) de la racine tentaculaire. Les cellules en prolifération sont localisées au niveau des extrémités des zones latérales (Figure 3.4 A-A') et de la zone médiane (de façon moins étendue – Figure 3.4 D). Après les périodes de chasse (24h et 5 jours), on observe un déplacement des cellules vers des positions plus proximales par rapport au tentacule (Figures 3.4 B,B',C,C',E).

Approche morphologique et moléculaire de la ségrégation spatiale des tapis roulants cellulaires de *P. pileus* et *C. hemisphaerica*.

L'observation de la morphologie, de l'organisation intracellulaire ainsi que l'utilisation de marqueurs moléculaires caractéristiques des différents stades d'un lignage cellulaire, au niveau du bulbe de *Clytia hemisphaerica* et de la racine tentaculaire de *Pleurobrachia pileus*, ont permis de mettre en évidence une ségrégation spatiale et donc un fonctionnement en tapis roulant cellulaire et de caractériser précisément leur organisation.

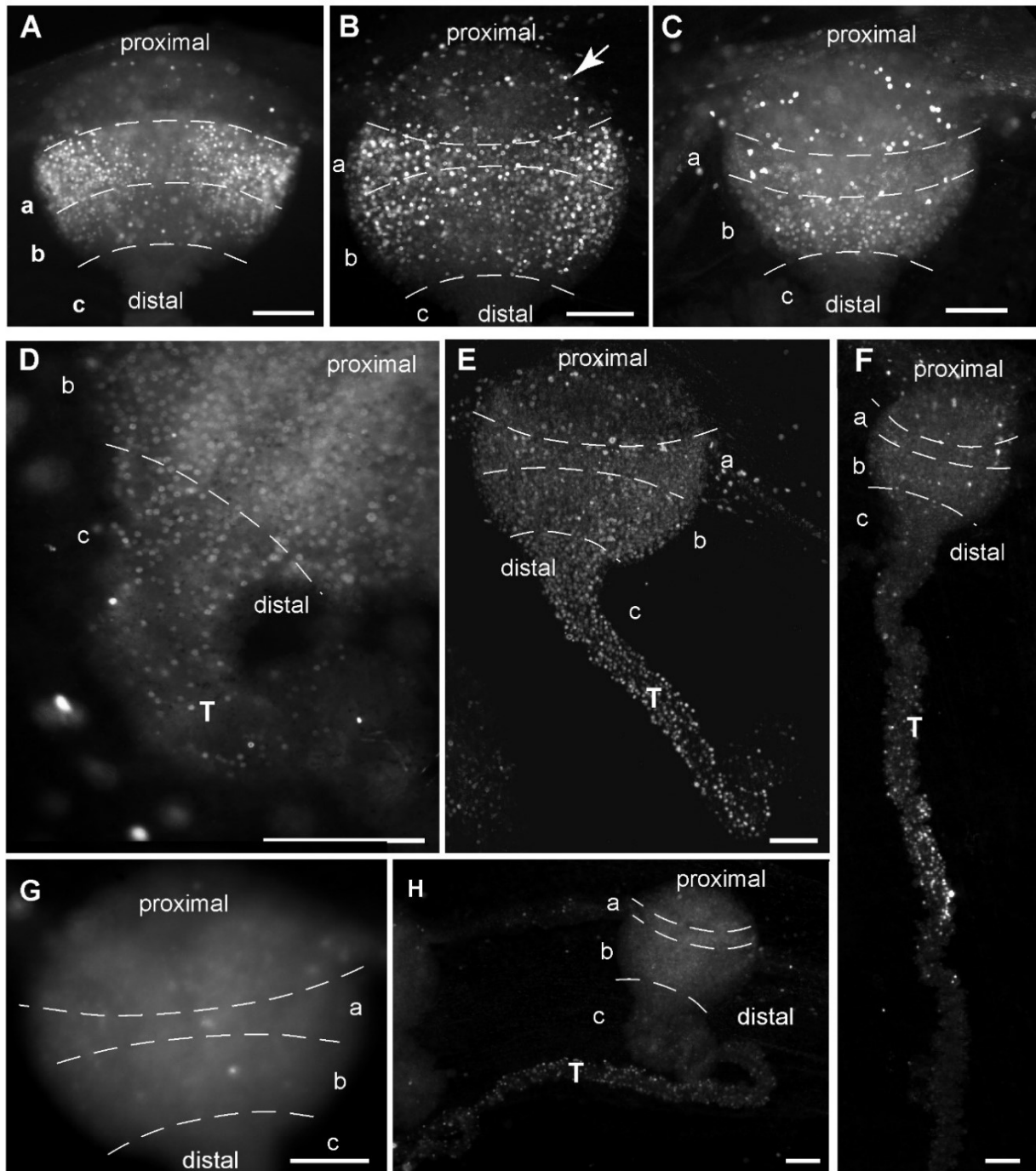


Figure 3.3 Dynamique du tapis roulant du bulbe tentaculaire de *C. hemisphaerica* mise en évidence par des expériences d'incorporation de BrdU. A) Pulse BrdU de 30 minutes, pas de chasse. Mise en évidence de cellules en prolifération (incorporant le BrdU) principalement au niveau de la zone la plus proximale du bulbe (zone a) ainsi que dans la moitié proximale de la zone b (zone intermédiaire le long de l'axe proximo-distal du bulbe). B-H) Marquage BrdU après différents temps de chasse (pulse 30min). B) Chasse de 2h. Le marquage s'étend jusqu'au niveau distal de la zone b. Flèche blanche : noyaux isolés au niveau du bord de l'ombrelle. C) Chasse de 8h. La zone b est complètement marquée. Quelques noyaux sont BrdU-positifs au niveau de la zone a. D) Chasse de 16 heures. Les noyaux marqués ont atteint la zone c. E) Chasse 24h. Le premier tiers du tentacule est marqué. F) Chasse 48h. Les noyaux marqués sont localisés au milieu du tentacule. G) Chasse 48h. Grossissement au niveau du bulbe tentaculaire mettant en évidence l'absence de noyaux marqués. H) Chasse 72h. La partie la plus distale du tentacule est marquée. a : zone proximale du bulbe, zone b : zone intermédiaire, c : zone distale du bulbe, T : tentacule. Echelles : 25 μ m. D'après Denker et al. (2008b).

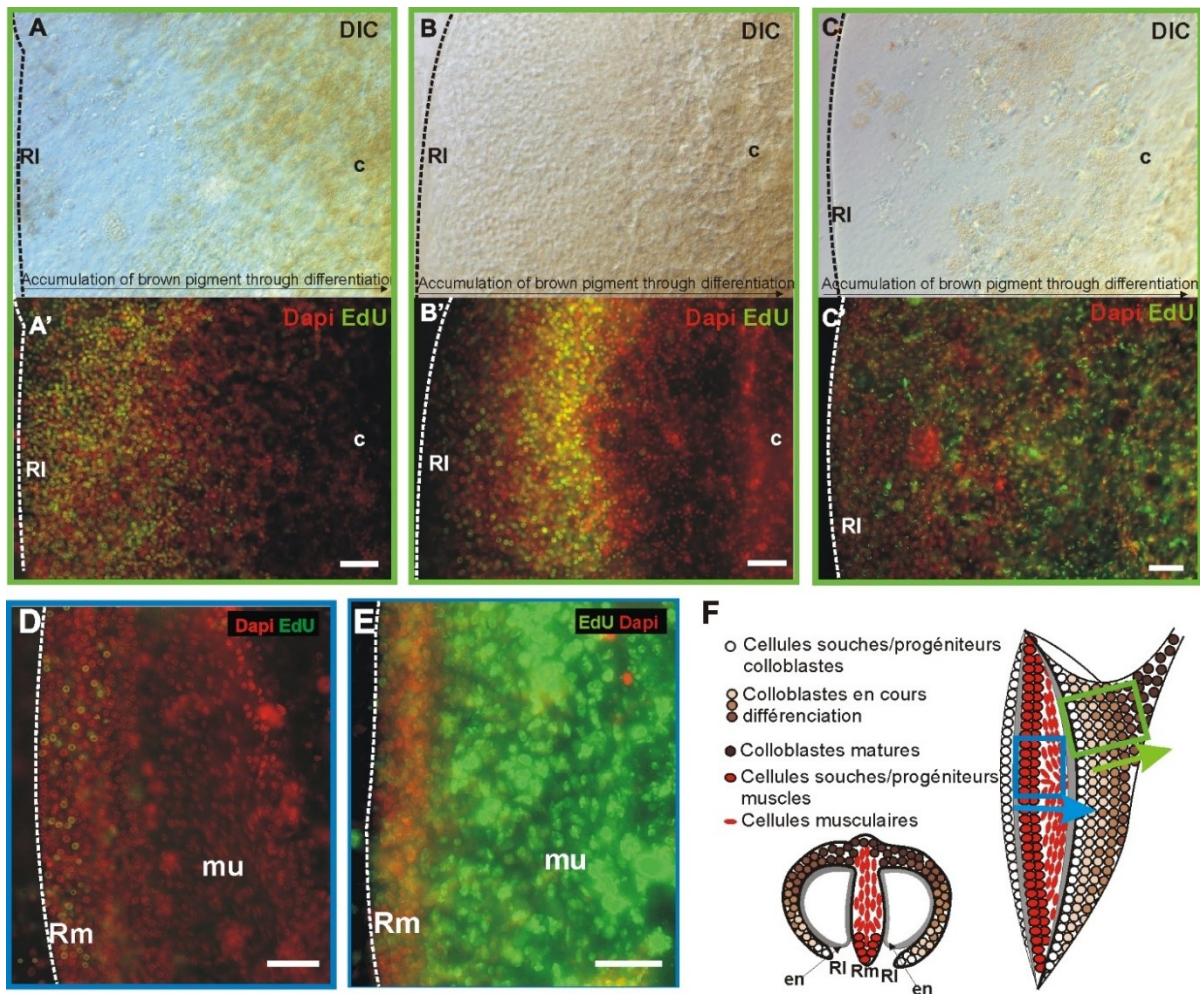


Figure 3.4 Dynamique des tapis roulants colloblastiques (A-C) et musculaire (D,E) de la racine tentaculaire de *P. pileus*, mise en évidence par des expériences d'incorporation d'EdU. A-A') Pulse EdU de 12h (pas de chasse) au niveau de l'expansion latérale de la racine tentaculaire (encadré vert en F). Les lignes en pointillés matérialisent le bord du bourrelet latéral (RI : ride latérale). A) Vue en DIC où l'on peut voir le gradient de pigmentation marron, caractéristique des colloblastes en différenciation. A') Image en microscopie à fluorescence avec un contre-marquage Dapi de la préparation présentée en A. Les noyaux marqués EdU sont localisés à proximité de la ride latérale (RI), et dans la zone non pigmentée. B-B') Similaire à A-A' avec une chasse de 24h. B') Les noyaux marqués se trouvent à une distance plus importante de la ride latérale (RI) qu'en A'. C-C') Similaire à A-A' avec une chasse de 5 jours. Les noyaux marqués se trouvent dans la zone des cellules pigmentées. On note que quelques noyaux sont marqués au niveau de la ride latérale (RI). D) Pulse EdU de 12h (pas de chasse), au niveau de l'expansion médiane (encadré bleu dans F). Contre-marquage Dapi. Les lignes en pointillés matérialisent le bord de la ride médiane (Rm). Les noyaux marqués sont localisés au niveau de la ride médiane (Rm). E) Similaire à D) avec une chasse de 5 jours. Les noyaux marqués correspondent principalement aux noyaux de cellules musculaires en différenciation (mu). On note que quelques noyaux sont marqués au niveau de la ride médiane. F) Schémas des tapis roulants musculaire et colloblastique de la racine tentaculaire en coupe transversale (à gauche) et en vue longitudinale (à droite). Le déplacement des cellules, déduit des observations en (A-C) et (D-E) est figuré respectivement par les flèches vertes et bleues. *c* : colloblastes, *en* : canal endodermique, *mu* : cellules musculaires, *RI* : ride latérale, *Rm* : ride médiane. Echelles : A-E : 25 μ m. A-F : D'après Alié et al. 2011.

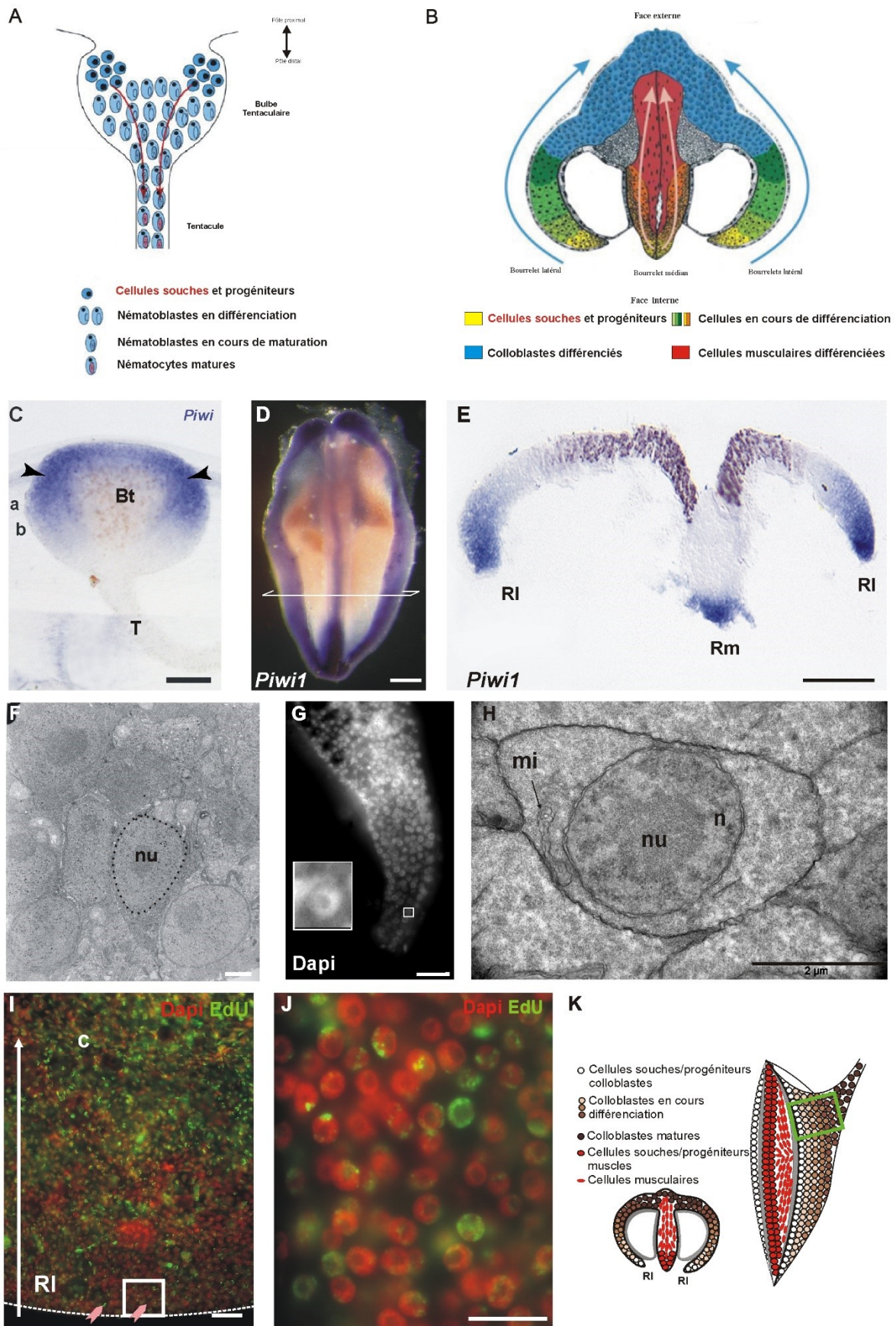
Arguments indirects ayant permis l'identification de pools de cellules souches aux extrémités des tapis roulants (Figure 3.5)

La restriction de la niche des cellules souches à une extrémité des tapis roulants de *Clytia hemisphaerica* et de *Pleurobrachia pileus* a pu être mise en évidence à l'aide de gènes marqueurs de cellules souches, tels que *Piwi*, *Vasa*, *PL10* et *Bruno* (Alié et al. 2011, Denker et al. 2008b, Leclère et al. 2012). L'expression au niveau du bulbe de *Clytia hemisphaerica* se situe dans la zone la plus proximale (Figure 3.5 C - zone a marquée et s'étendant sous la forme d'un croissant au niveau proximal de la zone b). Chez *Pleurobrachia pileus* l'expression de ces mêmes gènes au niveau de la racine tentaculaire *in toto* (en vue interne) se présente sous la forme de trois lignes longitudinales étroites, on parle d'un marquage « en grain de café » qui correspond, en coupe transversale, à un marquage restreint au niveau le plus distal de chacun des trois bourrelets longitudinaux (Figure 3.5 D,E).

Des arguments cytologiques permettant de supposer l'identification de cellules souches vont aussi dans le sens d'une localisation des cellules souches restreinte à une extrémité des tapis roulant. Des observations en microscopie électronique à transmission et à fluorescence (marquage Dapi) ont ainsi permis de mettre en évidence des cellules indifférenciées à fort rapport nucléo-cytoplasmique, à gros nucléole, à fort degré de condensation de l'hétérochromatine et avec un cytoplasme pauvre en organites (Figure 3.5 F,G,H).

Figure 3.5 Identification d'une zone restreinte de cellules souches au sein des tapis roulants de *C. hemisphaerica* (A, C, F) et de *P. pileus* (B, D-E, G-K). A) Schéma de la localisation des cellules souches au niveau du bulbe tentaculaire de *C. hemisphaerica*. B) Schéma de la localisation des cellules souches (en jaune) au niveau des tapis roulants de la racine tentaculaire de *P. pileus*. Racine tentaculaire en coupe transversale. C-E) Expression des marqueurs de cellules souches *ChePiwi* et *PpiPiwi1*. C) Expression de *ChePiwi* au niveau de la zone proximale du bulbe de *C. hemisphaerica*. La zone d'expression correspond à la zone a et à la partie la plus proximale de la zone b de la figure 3.3. Le bulbe est légèrement tourné (partie proximale vers l'avant) permettant de voir la continuité du marquage *Piwi*. *Bt* : bulbe tentaculaire, *T* : tentacule. D) Expression de *PpiPiwi* au niveau de la racine tentaculaire *in toto* de *P. pileus* (face interne). Les trois lignes longitudinales marquées correspondent aux rides longitudinales et à la ride médiane (Rl et Rm en E). E) Expression de *PpiPiwi* au niveau d'une coupe transversale de racine tentaculaire (trait de coupe figuré en D.) Le marquage est très restreint au niveau de l'extrémité médiane (Rm) et plus étendu au niveau des extrémités latérales (Rl). F-H) Marqueurs cytologiques de cellules souches. F) Image en MET de cellules interstitielles putatives localisées au niveau de l'extrémité proximale du bulbe de *C. hemisphaerica*. Ces cellules ont un fort rapport nucléocytoplasmique ainsi qu'un important nucléole (nu). Le noyau est délimité en pointillés. G) Marquage Dapi d'une expansion latérale de racine tentaculaire de *P. pileus* (cryosection transversale). On observe, au niveau de l'extrémité, des cellules à gros nucléole (grossissement présenté sur la figure). H) Image en MET d'une cellule souche putative de colloblastes, observée au niveau de l'extrémité de l'expansion latérale. *mi* : mitochondrie, *n* : noyau, *nu* : nucléole. (I-J) Expérience d'incorporation d'EdU avec une rétention à long terme (Pulse 12h, chasse 5 jours) au niveau d'une expansion latérale (encadré bleu en K). Rétention du marquage au niveau de cellules localisées au niveau de la ride latérale (flèches roses). La flèche blanche représente le sens de déplacement des cellules le long du tapis roulant. J) Grossissement de la zone encadrée en I. Cellules souches putatives ayant retenu l'EdU. K)

Schémas des tapis roulants musculaires et colloblastique de la racine tentaculaire en coupe transversale (à gauche) et en vue longitudinale (à droite). La zone encadrée en vert correspond à la zone étudiée en (I-J). *RI* : *ride latérale*. Echelles : C, I : 25 μm ; D : 200 μm ; E : 50 μm ; F : 1 μm ; G : 25 μm ; H : 2 μm ; J : 5 μm . A) D'après Houlston et al. 2010, B) D'après Dayraud et al. 2012, C, F) Denker et al. 2008b, D-E, G-K) D'après Alié et al. (2011).



Chez *Pleurobrachia pileus*, les expériences d'incorporation d'EdU, avec une rétention à long terme (pulse long de 12 heures suivi d'une chasse très longue de 5 jours) permettent de mettre en évidence plus précisément la présence de cellules souches, sur la base de l'importante durée de leur cycle cellulaire (par rapport à celui des progéniteurs en prolifération active). Ces expériences ont été uniquement réalisées chez *Pleurobrachia pileus*. Au niveau des tapis roulants latéraux et médians (Figure 3.5 I,J,K – Alié et al. 2011), ces expériences montrent la présence de cellules souches restreintes aux extrémités les plus distales.

Des zones de prolifération délimitées spatialement (Figure 3.6)

Les zones de prolifération des tapis roulants sont restreintes spatialement dans les 2/3 proximaux du bulbe de *Clytia hemisphaerica* et vers les extrémités des expansions latérales et médianes de *Pleurobrachia pileus* (Figures 3.6 A,B).

Chez *Clytia hemisphaerica*, l'utilisation de marqueurs de prolifération (BrdU et phospho-histone H3, marqueur de la chromatine mitotique) mettent en évidence une zone de prolifération qui s'étend de la base du bulbe jusqu'aux deux tiers de sa hauteur (Figure 3.6 C,E). Cette zone comprend la zone des cellules souches mais est bien plus étendue. Ceci est probablement en relation avec la poursuite des divisions cellulaires au cours de la différenciation des nématoblastes mise en évidence chez l'Hydre (Galliot 2006). En ce qui concerne la racine tentaculaire de *Pleurobrachia pileus*, l'incorporation d'EdU montre un marquage très restreint au niveau de l'extrémité de la zone médiane (Figure 3.6 F) alors qu'il s'étend, au niveau des zones latérales, depuis l'extrémité distale de chaque expansion jusqu'à une zone à partir de laquelle les cellules acquièrent une pigmentation marron, témoin de la différenciation des colloblastes (accumulation de pigments au sein des granules P) (Figure 3.6 D,D').

On remarque pour finir une absence totale de cellules prolifératives tout le long des tentacules de *Clytia hemisphaerica* et de *Pleurobrachia pileus*, permettant de conclure à une croissance et à une production cellulaire uniquement en position basale (bulbe tentaculaire et racine tentaculaire).

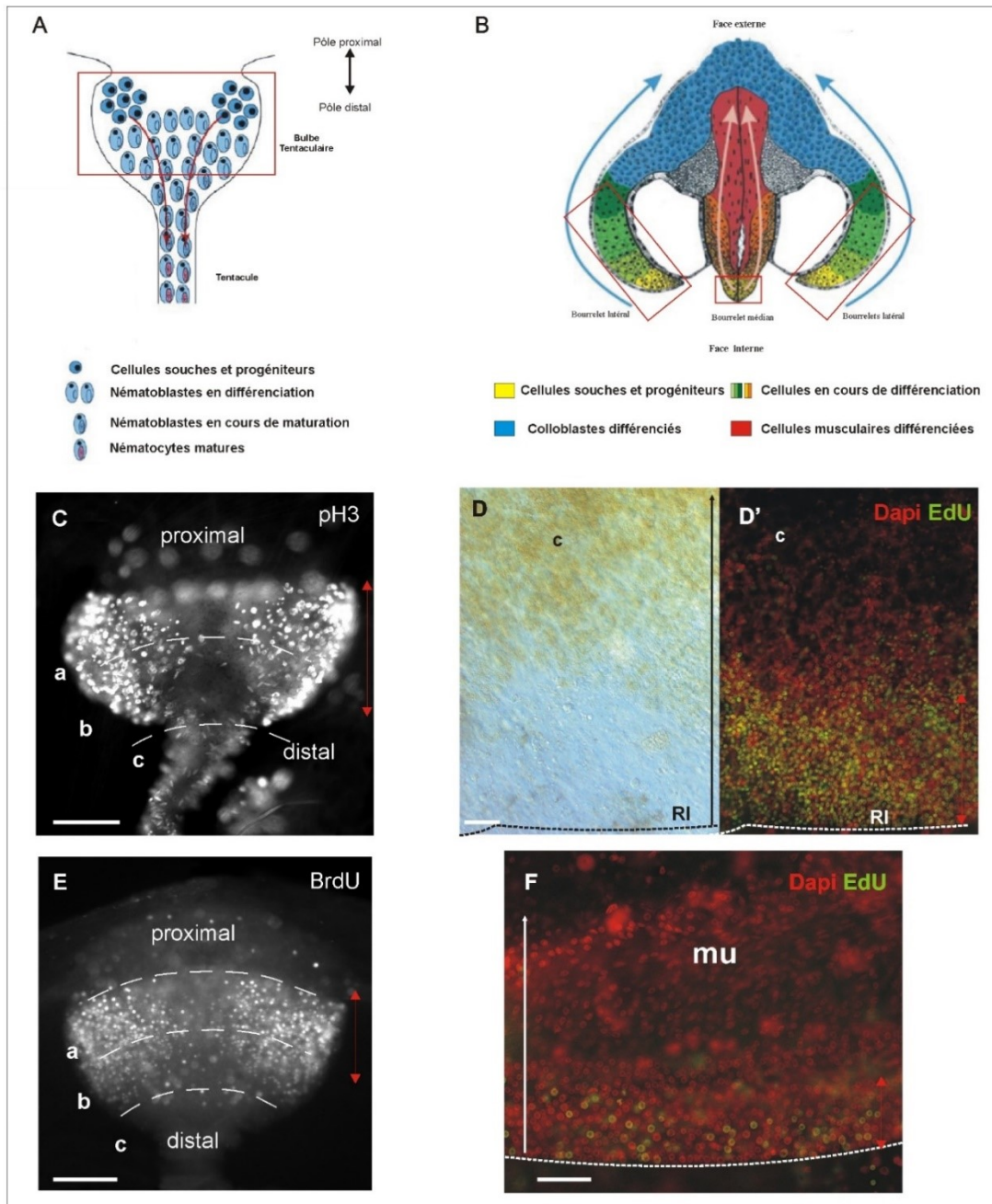


Figure 3.6 Identification des zones de prolifération au sein des tapis roulants de *C. hemisphaerica* (A, C, E) et de *P. pileus* (B, D-D', F). A) Schéma de la localisation de la zone de prolifération au niveau du bulbe tentaculaire de *C. hemisphaerica*. Zone de prolifération encadrée en rouge. B) Schéma de la localisation des cellules en prolifération (encadrés rouge) au niveau des tapis roulants de la racine tentaculaire de *P. pileus*. Racine tentaculaire en coupe transversale. C) Immuno-marquage anti-phosphoHistoneH3 (pH3). D-D') Expérience d'incorporation d'EdU au niveau de l'expansion latérale de la racine tentaculaire (tapis roulant des colloblastes). Pulse 12h, pas de chasse. Contre-marquage Dapi. Les cellules en prolifération sont localisées au niveau de l'extrémité de l'expansion, près de la ride latérale (RI). Aucune cellule n'est marquée dans la zone pigmentée qui correspond à la zone de différenciation des colloblastes (c). La flèche noire représente le sens de déplacement des cellules le long du tapis roulant. E) Expérience d'incorporation de BrdU au niveau du bulbe de *C. hemisphaerica*. Pulse 30 minutes, pas de chasse. Les cellules en prolifération marquées sont localisées dans la zone proximale (zone a) du bulbe ainsi que dans la partie proximale de la zone b. Les flèches rouges permettent de localiser la zone de prolifération. F) Expérience d'incorporation d'EdU au niveau de la zone médiane de la racine tentaculaire de *P. pileus* (tapis roulant musculaire). Pulse 12h, pas de chasse. Contre-marquage Dapi. Les cellules marquées sont localisées au niveau de l'extrémité de la ride médiane. La flèche blanche indique le sens de déplacement des cellules au sein du tapis roulant. *mu* : cellules musculaires. Echelles : A, F : 25 μ m. A)

D'après Houliston et al. 2010, B) D'après Dayraud et al. 2012, C, D) Denker et al. 2008b, D-D', F) D'après Alié et al. 2011.

Une répartition spatiale des différentes étapes de différenciation le long du tapis roulant

L'observation et la comparaison de l'expression de gènes marqueurs de différenciation et de maturation, en lien avec celle des gènes marqueurs des cellules souches donnent une idée de l'arrangement spatial des tapis roulants. L'expression des gènes marqueurs de cellules souches, de cellules en cours de différenciation et de cellules matures présentent une distribution séquentielle le long du tapis roulant cellulaire, témoin de la ségrégation spatiale de ces étapes.

Ainsi, chez *Clytia hemisphaerica*, on a pu mettre en évidence une ségrégation spatiale de l'expression de marqueurs de cellules souches (*ChePiwi*, *CheVasa*, *CheBruno*, *ChePL10*), de différenciation au sens large (*Chemcol3-4a*, les protéines minicollagène faisant partie des composants majoritaires de la capsule des nématocystes), de différenciation tardive (*CheDkk3*) et de maturation (*CheNOWA*) (Figure 3.7 A-D. - Denker et al. 2008b, Leclère et al. 2012). Ces études d'expression ont été complétées par l'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques des étapes tardives de nématogénèse et du stade mature des nématocytes (stades pour lequel on ne dispose pas de marqueur spécifique en hybridation *in situ* – Figure 3.7 E,F) : un dérivé de la rhodamine, le tétraméthyl-rhodamine-6-isothiocyanate (TRITC) marque sélectivement les nématoblastes en phase finale de différenciation (Figure 3.7 E –Denker et al. 2008b) alors que la fluorescence orange du DAPI permet de détecter le poly- γ -glutamate synthétisé par les nématoblastes en différenciation terminale et présent dans les nématocystes matures (Figure 3.7 F - Denker et al. 2008b).

Chez *Pleurobrachia pileus*, l'expression de la Myosine IIb (*PpiMHCIIb1* – Dayraud et al. 2012), permet de localiser la zone de différenciation des cellules musculaires au niveau du tapis roulant médian (Figure 3.8C). Nous ne possédons actuellement pas de données d'expression de marqueurs de différenciation des colloblastes ou de marqueurs plus tardifs de la différenciation des cellules musculaires.

Les observations en microscopie électronique à transmission permettent de confirmer et de préciser la ségrégation spatiale.

Chez *Clytia hemisphaerica*, au cours de la différenciation et de la maturation d'un nématocyte, il y a mise en place du nématocyste (capsule) contenant le filament urticant. Cette mise en place progressive est observée le long du tapis roulant (Figure 3.9). En position la plus proximale, on observe quelques cellules interstitielles ainsi que des nématoblastes précoces présentant un important réticulum endoplasmique et l'ébauche d'une capsule naissante (Figure 3.9 A,B). Les nématoblastes plus tardifs présentent une capsule plus importante. On peut observer le tubule naissant au sein du cytoplasme (Figure 3.9 C, tête de flèche noire), qui s'invagine ensuite au sein de la capsule (Figure 3.9

D). La capsule finit par occuper la majeure partie du cytoplasme des nématocytes matures (Figure 3.9 E). Au niveau le plus distal du bulbe, comme au sein du tentacule, on peut observer les nématocytes les plus matures repérables grâce à la faible densité aux électrons du contenu de leur capsule (Figure 3.9 F). La quantification du pourcentage relatif des différents stades le long de l'axe du bulbe a permis de préciser la ségrégation spatiale (Figure 3.9 G - Denker et al. 2008b).

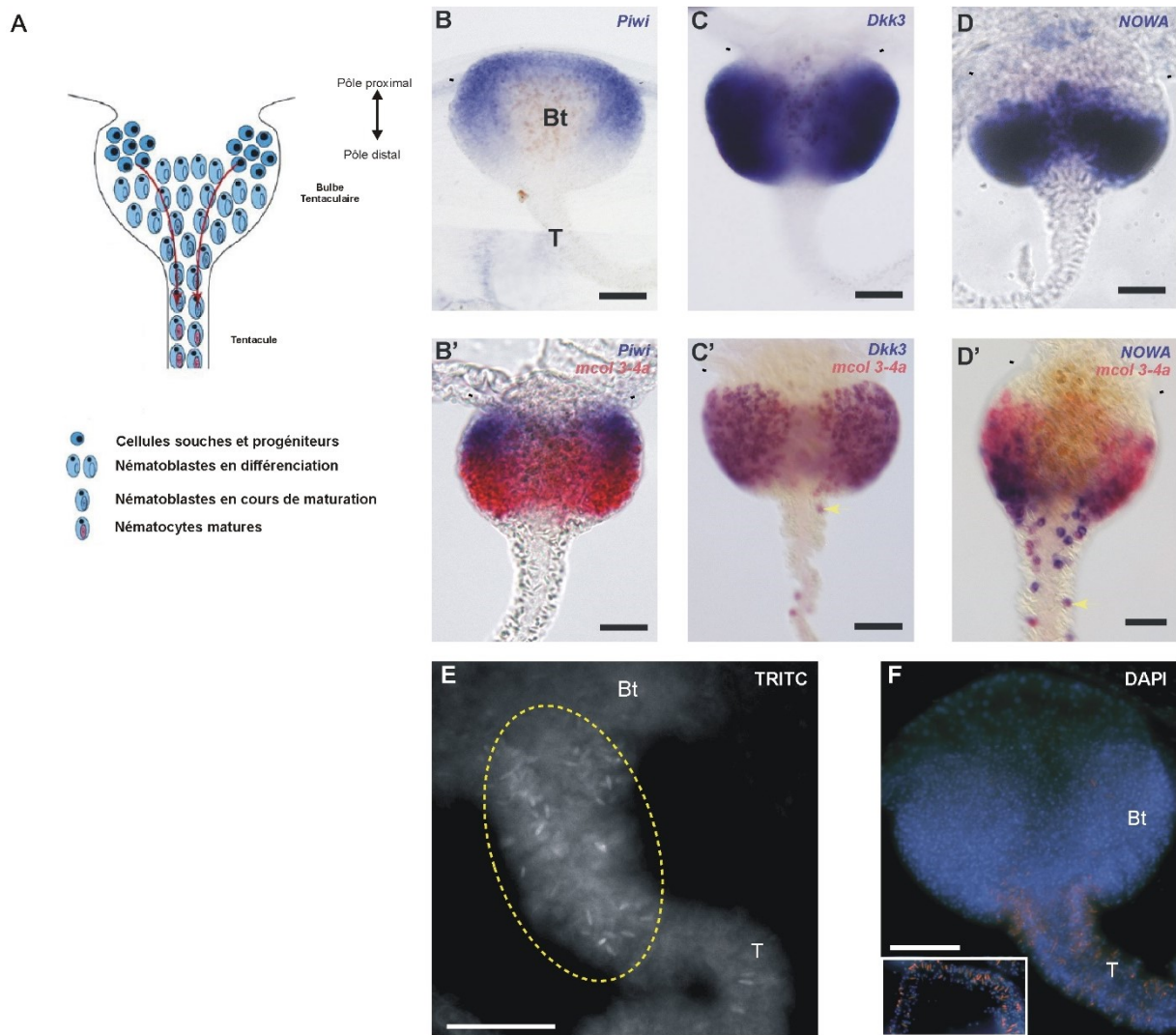


Figure 3.7 Répartition spatiale des étapes de différenciation le long du tapis roulant bulbaire de *C. hemisphaerica*. A) Schéma de la répartition spatiale des étapes de différenciation et de maturation des nématocytes au sein du bulbe tentaculaire. B-D') Expression séquentielle de différents marqueurs au niveau du bulbe. Bulbes en vue aborale (La zone non marquée correspond à la zone d'interruption de la nématogenèse). B-D) Hybridations *in situ* simples. B) Expression de Piwi (marqueur de cellules souches). C) Expression de Dkk3 (marqueur de différenciation tardive). D) Expression de NOWA (marqueur de maturation). (B', C', D') Doubles hybridations *in situ*. Etude de la localisation de l'expression des gènes précédents par rapport à celle de minicollagène 3-4a (marqueur de différenciation au sens large). E) Marquage TRITC (marqueur de nématoblastes en phase finale de différenciation) après une incubation de 30 minutes. La zone marquée met en évidence les capsules des nématoblastes en phase précoce de maturation (zone entourée en pointillés jaunes). F) Marquage DAPI. Les noyaux sont marqués en bleu et les capsules contenant du poly- γ -glutamate en orange (nématoblastes en différenciation terminale et nématocytes matures). Encadré : vue générale du tentacule. Bt :

bulbe tentaculaire, *T* : tentacule. Echelles : A-F : 25 μ m. A) D'après Houliston et al. (2010), B-F) D'après Denker et al. (2008b).

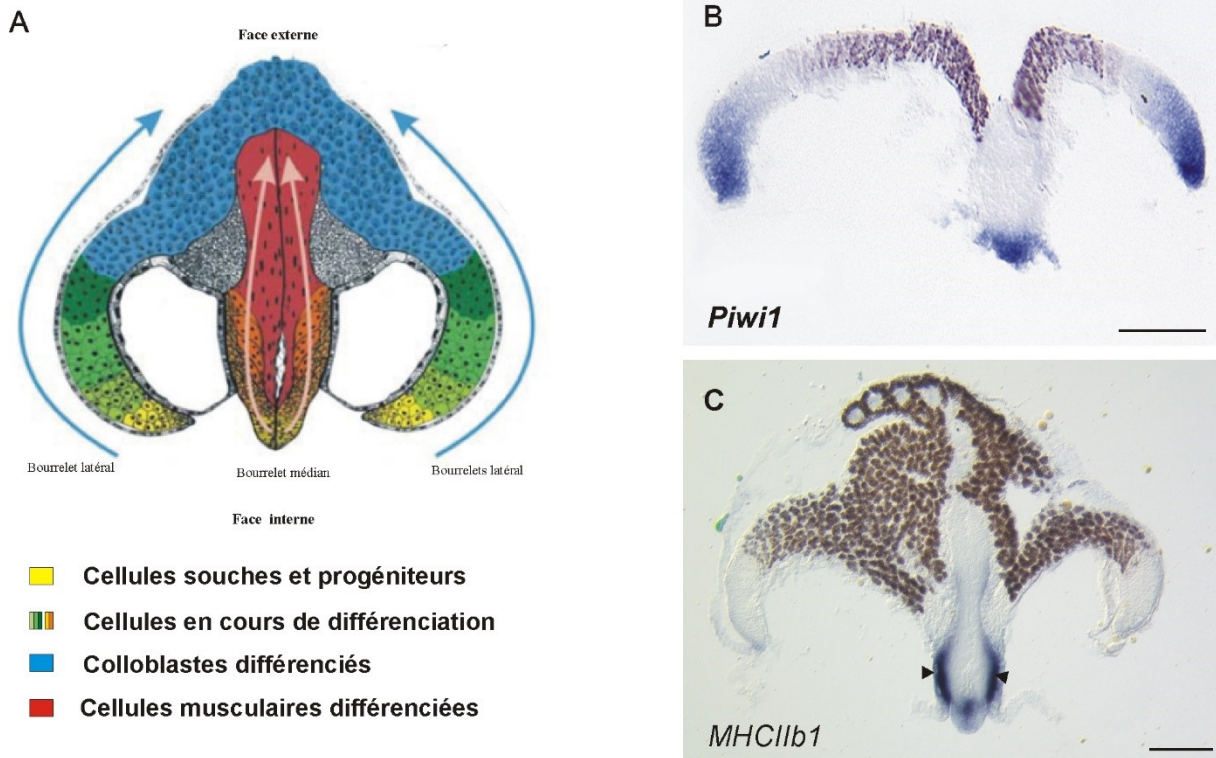
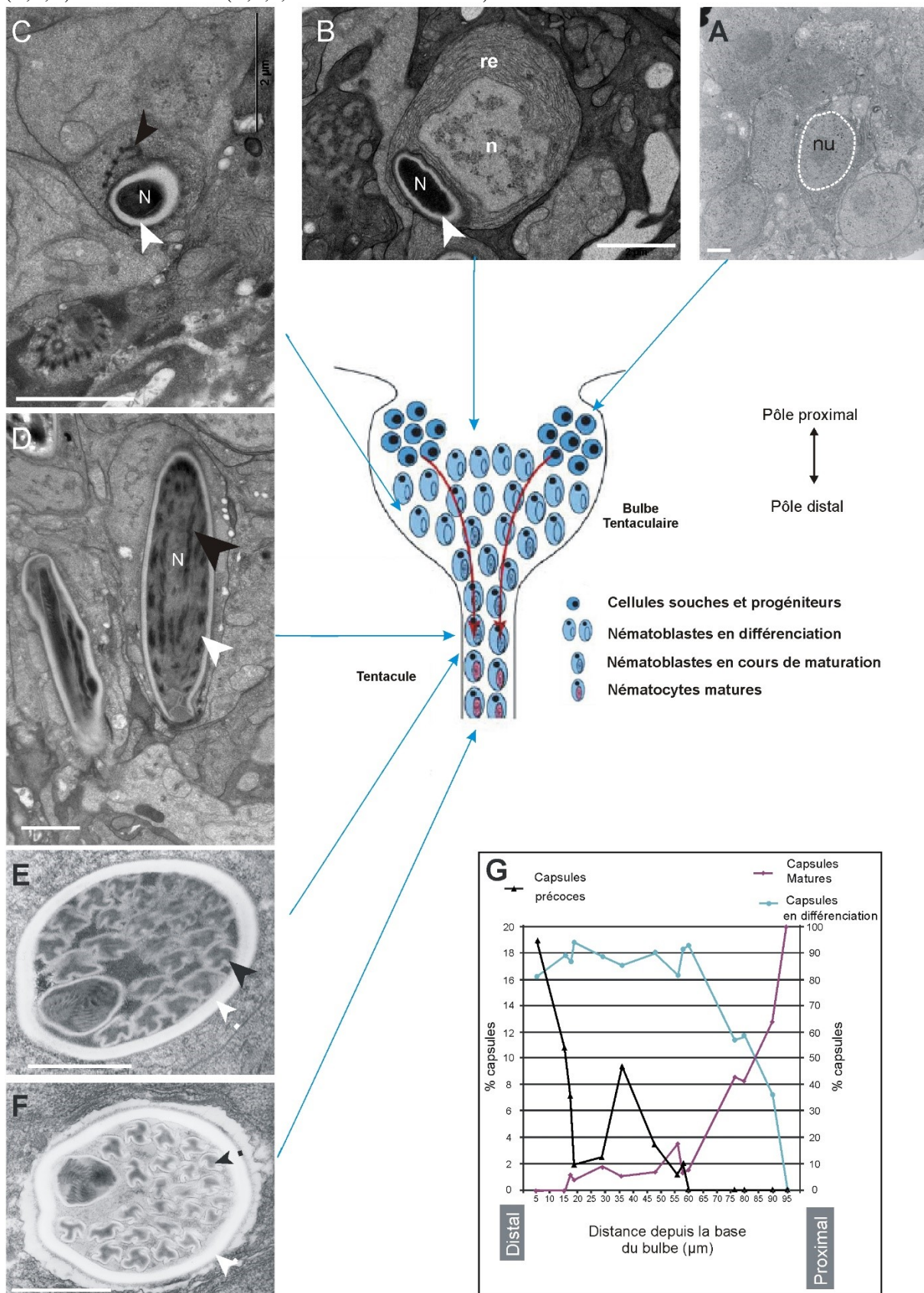


Figure 3.8 Régionalisation spatiale d'un marqueur de différenciation dans le tapis roulant musculaire de *P. pileus*. A) Schéma des tapis roulants cellulaires au niveau de la racine tentaculaire de *P. pileus*. Coupe transversale. B) Expression de *PpiPiwi* (marqueur de cellules souches) au niveau des extrémités des tapis roulants de la racine tentaculaire en coupe transversale. C) Expression de *PpiMHCIib1* (marqueur de différenciation des cellules musculaires) au niveau d'une coupe transversale de racine tentaculaire. La zone d'expression (têtes de flèches noires) est restreinte au niveau intermédiaire du tapis roulant musculaire. Echelles : B, C : 200 μ m. A, C) D'après Dayraud et al. (2012). B) D'après Alié et al. (2011).

Chez *Pleurobrachia pileus*, on a pu suivre en microscopie électronique, la différenciation des colloblastes (Figure 3.10 B-D) et des cellules musculaires (Figure 3.10 B'-D') au sein des deux tapis roulants (Alié et al. 2011, Dayraud et al. 2012, Thèse Cyrielle Dayraud 2012). Au niveau des tapis roulants latéraux, les extrémités distales présentent des cellules souches et progéniteurs indifférenciés (Figure 3.10 B), puis au niveau intermédiaire, des colloblastes en cours de différenciation présentant

Figure 3.9 Mise en évidence du gradient spatial de différenciation le long du bulbe tentaculaire de *C. hemisphaerica* en microscopie électronique à transmission (MET). A) Cellules interstitielles putatives à gros nucléole (nu) et à fort rapport nucléo-cytoplasmique. Le noyau est entouré par un cercle blanc en pointillé. B) Jeune nématoblaste (nématocyte en différenciation) contenant un primordium de capsule noté N et indiqué par une tête de flèche blanche et du réticulum endoplasmique rugueux très développé (re). C) Nématoblaste avec une capsule en développement (tête de flèche blanche) et un tubule (tête de flèche noire) formé dans le cytoplasme en dehors de la capsule. D) Nématocyte non mature (tête de flèche blanche). Le tubule a été invaginé à l'intérieur de la capsule (tête de flèche noire). E) Nématocyte en cours de maturation avec une matrice dense aux électrons. F) Nématocyte mature (matrice faiblement dense aux électrons). G) Graphique mettant en évidence la proportion des trois stades de différenciation/maturation des capsules le long de l'axe proximo-distal du bulbe. *N* : capsule,

n : noyau, *re* : réticulum endoplasmique. Echelles : A, E, F : 1 μm ; B, C, D : 2 μm . Images de Cyrielle Dayraud (B,C,D) et de Elsa Denker (A,E,F,G – Denker et al. 2008b)



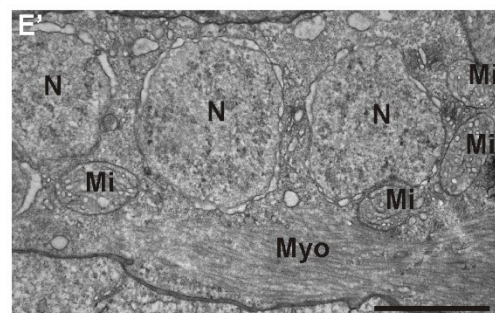
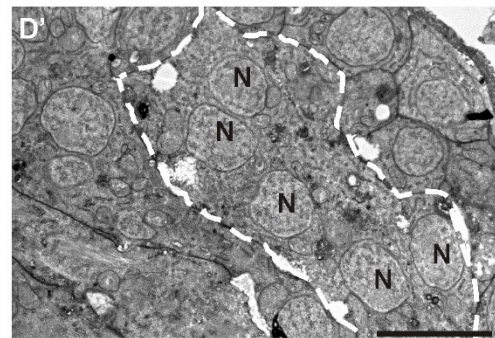
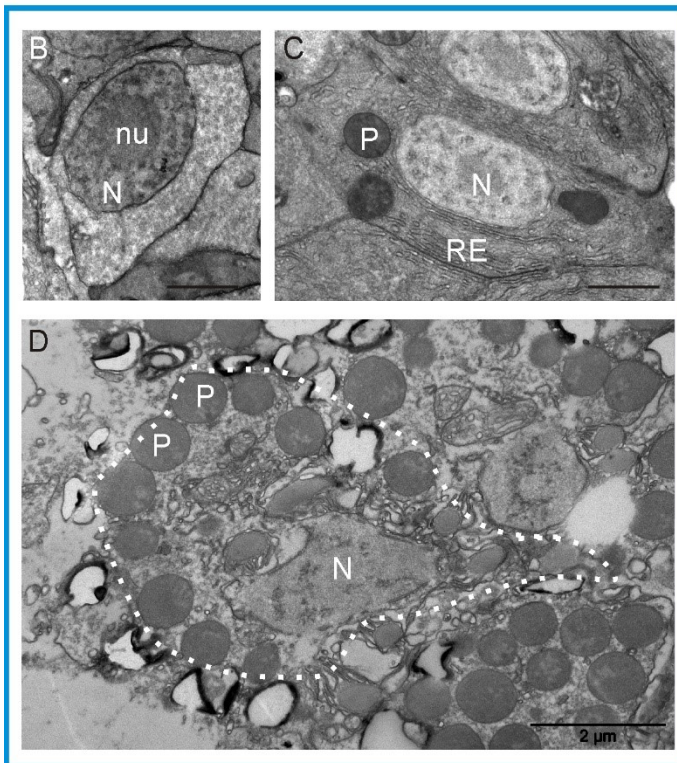
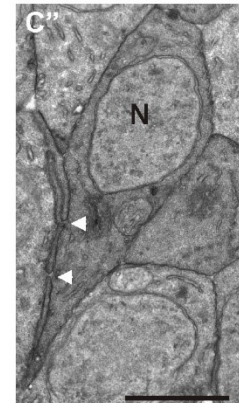
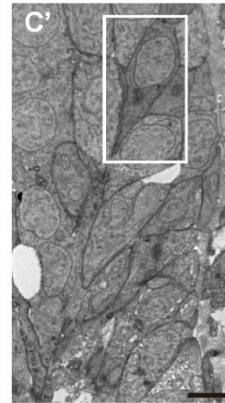
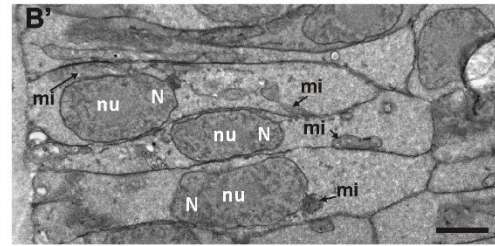
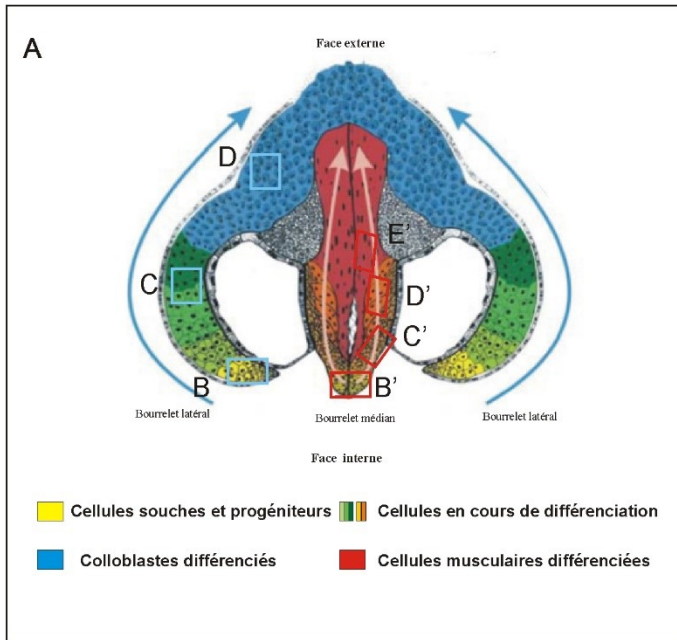


Figure 3.10 Mise en évidence du gradient spatial de différenciation des tapis roulants de la racine tentaculaire de *P. pileus* en microscopie électronique à transmission (MET). A) Schéma des tapis roulants de la racine tentaculaire où sont figurés les différentes zones correspondants aux clichés B à D pour le tapis roulant colloblastique (encadrés bleus) et B' à E' pour le tapis roulant musculaire (encadrés rouges). Racine tentaculaire en coupe transversale. B-D) Stades du lignage cellulaire colloblastique observés en MET, le long des expansions latérales de la racine tentaculaire. B) Cellule souche putative ou progéniteur indifférencié de colloblaste localisé dans l'extrémité distale de l'expansion latérale. Cellule à fort rapport nucléocytoplasmique, gros nucléole (nu) et peu d'organites. (C) Colloblaste en début de différenciation, des granules (P) sont visibles et le réticulum endoplasmique (RE) est développé. D) Colloblaste au niveau du tentacule (délimité par le trait en pointillé). On observe la présence de nombreux granules (P). B'-E') Stades du lignage cellulaire musculaire observés en MET, le long de l'expansion médiane de la racine tentaculaire. B') Progéniteurs uninucléés de cellules musculaires, de forme allongée caractéristique. Ces cellules ont un gros nucléole (nu) et un fort rapport nucléocytoplasmique. C') Progéniteurs uninucléés, connectés entre eux par des ponts cytoplasmiques et orientés de manière oblique. C'') Grossissement de la zone encadrée en C'. Les têtes de flèches blanches montrent les ponts cytoplasmiques ainsi que les interdigitations des membranes plasmiques de deux progéniteurs adjacents. D') Cellule musculaire plurinucléée en cours de différenciation (le trait en pointillé délimite une cellule musculaire). Cette cellule dérive de la fusion de plusieurs progéniteurs. Ces cellules sont riches en mitochondries (mi) et sont dépourvues de myofilaments. E') Cellule musculaire mature avec des myofilaments (Myo). *Mi* : mitochondrie, *Myo* : myofilaments, *N* : noyau, *nu* : nucléole, *P* : granules *P*, *RE* : réticulum endoplasmique. Echelles : B-C : 1 µm ; D, B', C', C'', E' : 2 µm ; D' : 5 µm. B-D) Images de Cyrielle Dayraud, (Thèse 2011). B'-E') D'après Dayraud et al. (2012

quelques granules P ainsi qu'un réticulum endoplasmique développé (Figure 3.10 C), et enfin des colloblastes différenciés riches en granulations (Figure 3.10 D). Au niveau du tapis roulant médian (Figure 3.10 B'-E'), on peut observer, à son extrémité, des progéniteurs uninucléés indifférenciés possédant une forme allongée, caractéristique de progéniteurs de cellules musculaires (Figure 3.10 B' - Franc, 1985 – Dayraud et al. 2012). Puis latéralement, on observe des progéniteurs toujours uninucléés, connectés entre eux par des ponts cytoplasmiques et orientés de manière oblique (Figure 3.10 C' - C''). On observe ensuite des cellules plurinucléées, issues de la fusion des progéniteurs, et sans myofilaments (Figure 3.10 D') et enfin en position plus interne, des cellules musculaires différenciées contenant des myofilaments denses et de nombreuses mitochondries (Figure 3.10 E').

Discussion autour de la ségrégation spatiale du tapis roulant de *C. hemisphaerica*

La ségrégation spatiale du bulbe de *Clytia hemisphaerica* n'est pas aussi nette que l'on pourrait l'imaginer. En effet, la ségrégation spatiale des différents marqueurs n'est valable que pour des marqueurs impliqués dans des étapes bien différentes (cellules souches vs. différenciation vs. cellules matures). La transition entre chacune des étapes de différenciation n'est pas très bien délimitée spatialement et des cellules à différentes étapes de différenciation/maturation peuvent être observées au même niveau du bulbe. Ceci est mis en évidence lors de la quantification des pourcentages relatifs

des différents stades cellulaires qui varient le long du tapis roulant (Figure 3.9 G) puisque l'on observe par exemple quelques nématocytes matures au sein de la zone de différenciation. On peut émettre l'hypothèse qu'il existe une désynchronisation dans le timing de déplacement des cellules le long du tapis roulant permettant d'expliquer le tri très imparfait. De plus, il est important de noter que les zones de prolifération et de différenciation se chevauchent et donc que la transition entre arrêt de la prolifération et différenciation n'est pas nette. Les stades précoces de différenciation semblent conserver la possibilité de se diviser, à l'image de ce qui est décrit lors de la nématogenèse de l'Hydre (Rich & Tardent 1969, Tardent et al. 1971). Le tri des stades cellulaires paraît beaucoup plus net dans les deux tapis roulants de la racine tentaculaire de *Pleurobrachia pileus*.

3.2 Objectifs de mon travail

Les gènes et voies de signalisation impliqués dans le contrôle négatif de la prolifération sont très peu étudiés *in vivo*, ou ne le sont que chez un faible nombre d'espèces appartenant principalement aux Bilatériens (majoritairement chez la souris et la drosophile) (Devès & Bourrat 2012). Leur étude est en effet principalement réalisée au niveau de cellules tumorales en culture. Ainsi, l'analyse à l'échelle des Métazoaires des mécanismes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et donc leur approche d'un point de vue évolutif sont peu développés.

Je m'intéresse ici principalement à l'évolution de certains mécanismes de régulation de la sortie du cycle cellulaire connus chez les Bilatériens. J'ai étudié, pour commencer, l'évolution de la voie Hippo, voie de signalisation connue comme étant impliquée dans le contrôle de la balance prolifération/sortie du cycle cellulaire et dans le contrôle de la taille des organes chez la Drosophile et les Mammifères. Je me suis posé la question de la conservation des acteurs et des rôles de la voie Hippo chez le Cténaire *Pleurobrachia pileus* et le Cnidaire *Clytia hemisphaerica*, grâce à son étude dans le contexte des tapis roulants cellulaires. Dans un second volet de ma thèse, j'ai exploité des données générées dans l'équipe sur l'expression différentielle des gènes le long du tapis roulant cellulaire du bulbe tentaculaire de *Clytia hemisphaerica* (microdissection et séquençage de transcriptomes). Dans ce cadre, je me suis focalisée sur l'expression différentielle d'une liste de gènes, orthologues de gènes connus pour être impliqués dans le contrôle négatif de la prolifération chez les Vertébrés afin d'émettre des hypothèses concernant la conservation de leur rôle dans l'arrêt de la prolifération cellulaire chez *Clytia hemisphaerica*.

3.3 Evolution de la voie Hippo : étude le long des tapis roulants cellulaires d'un Cnidaire et d'un Cténaire

3.3.1 Présentation de la voie Hippo telle qu'elle est connue chez la Drosophile et les Mammifères

La voie de signalisation Hippo a été découverte récemment, au cours des 15 dernières années. Une conservation des acteurs ainsi que de ses fonctions a été mise en évidence entre la Drosophile et les Mammifères. Cette voie de signalisation a un rôle prépondérant puisqu'elle est impliquée, à l'échelle cellulaire, dans le contrôle de la balance prolifération/arrêt de la prolifération, dans le contrôle de la survie cellulaire (via une régulation de l'apoptose) ainsi que dans le contrôle de la destinée cellulaire (engagement dans une voie de différenciation). Ce rôle central n'explique qu'en partie l'intérêt particulier que représente cette voie. En effet, la voie Hippo est impliquée à l'échelle de l'organisme, dans le contrôle de la taille des organes et sa découverte en fait la principale voie connue actuellement pour permettre à un organe d'atteindre la « bonne » taille. Elle permet la régulation du nombre de cellules d'un organe via un contrôle à l'échelle cellulaire de la prolifération et de l'apoptose mais aussi une intégration de ces informations à l'échelle de l'organe/du tissu via des interactions intercellulaires. Cette voie ayant été découverte récemment et ayant fait l'objet de très nombreuses études chez la Drosophile et les Mammifères, je vais tenter ici d'en faire une présentation globale, qui ne se veut pas exhaustive mais au cours de laquelle je vais tenter de mettre en évidence la complexité et les particularités étonnantes de cette voie. Deux nomenclatures sont utilisées dans la littérature pour nommer les gènes en fonction de l'organisme étudié (Drosophile ou Mammifères) ; la correspondance entre ces deux nomenclatures est présentée dans le tableau 3.1.

Dynamique et rôles de la voie Hippo à l'échelle moléculaire et cellulaire

La voie Hippo : un module central

Chez la Drosophile et les Mammifères, pour lesquels les acteurs, leurs interactions ainsi que la plupart des fonctions sont conservés, l'activation de la voie de signalisation Hippo entraîne un arrêt de la prolifération cellulaire ainsi qu'une activation de l'apoptose (Huang et al. 2005, Edgar 2006). Le centre de la voie est composé de 5 acteurs principaux : Hippo, Warts, Salvador, Mats et Yorkie chez la Drosophile (Figure 3.11 A) et respectivement Mst1/2, Lats1/2, Sav1, Mob1A/B et Yap/Taz chez les Mammifères (Figure 3.11 B). La voie est considérée comme active lorsque Hippo est

activée par phosphorylation et initie une cascade de phosphorylation au sein de laquelle Warts, Salvador et Mats

<i>D. melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>	Fonction protéine	Composition en domaines
Cœur de la voie			
Hpo	MST1/2	Ser/Thr kinase – Famille Ste20	Domaine Kinase, Domaine SARAH
Sav	Sav1/WW45	Protéine adaptatrice	Domaine de liaison au domaine FERM, 2 domaines WW, Domaine SARAH
Mats	Mob1A, Mob1B	Co-facteur	Domaine MOB
Warts	LATS1/2	Ser/Thr kinase – Famille NDR	Domaine Kinase
Yki	YAP/TAZ	Co-activateur transcriptionnel	Domaine TEAD-binding (TBD), 2 domaines WW (1 pour TAZ), Domaine de liaison à la protéine 14-3-3, Domaine PDZ-binding
Sd	TEAD1-4	Facteur de transcription	Domaine de liaison à l'ADN (TEA), Domaine de liaison à YAP/TAZ/Yki
Régulateurs de la voie			
Mer	Mer	Protéine adaptatrice	Domaine FERM
Kibra	KIBRA	Protéine adaptatrice	2 domaines WW, Domaine C2
Ex	Ex1	Protéine adaptatrice	Domaine FERM
Ajuba	Ajuba	Protéine adaptatrice	3 domaines LIM
Fat	FAT4	Récepteur	Domaines Cadhérines
Dachsous	DCHS1	Ligand du récepteur Fat	Domaines Cadhérines
Dachs		Inhibe Warts	Myosine

Tableau 3.1 Correspondance entre la nomenclature utilisée chez *Drosophila melanogaster* et chez *Homo sapiens*. La fonction de la protéine ainsi que sa composition en domaines est indiquée.

sont impliquées. Une fois activée par phosphorylation, Hippo, complexée à Salvador, phosphoryle Warts et Mats (Wu et al. 2003, Wei et al. 2007, Zhao et al. 2010). L'activation de Warts est dépendante de sa phosphorylation et de son interaction avec Mats (Tapon et al. 2002, Kango-Singh et al. 2002, Lai et al. 2005). Warts phosphoryle alors le co-activateur transcriptionnel Yorkie, entraînant ainsi sa translocation hors du noyau (Zhao et al. 2007, Hao et al. 2008). Cette cascade aboutit donc à l'inhibition de l'activité de la protéine Yorkie en tant que co-activateur transcriptionnel. L'inhibition de Yorkie se fait par phosphorylation au niveau de trois sites indépendants dont l'un d'entre eux

permet sa fixation à la protéine 14-3-3 (*phosphopeptide binding protein*) et sa rétention dans le cytoplasme. L'inhibition de Yorkie peut aussi se faire (de façon plus minoritaire) via l'interaction directe avec certains des acteurs de la voie en lien avec la présence de domaines d'interactions protéiques dans sa séquence. La présence

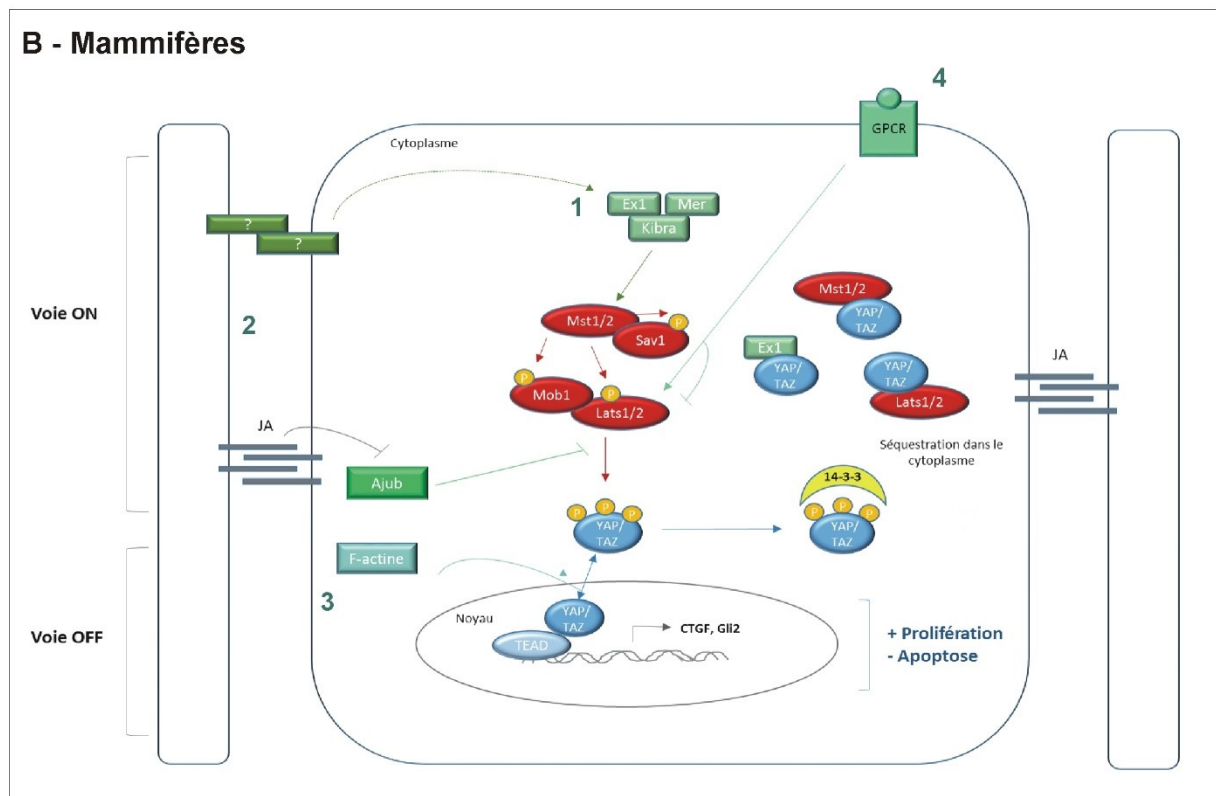
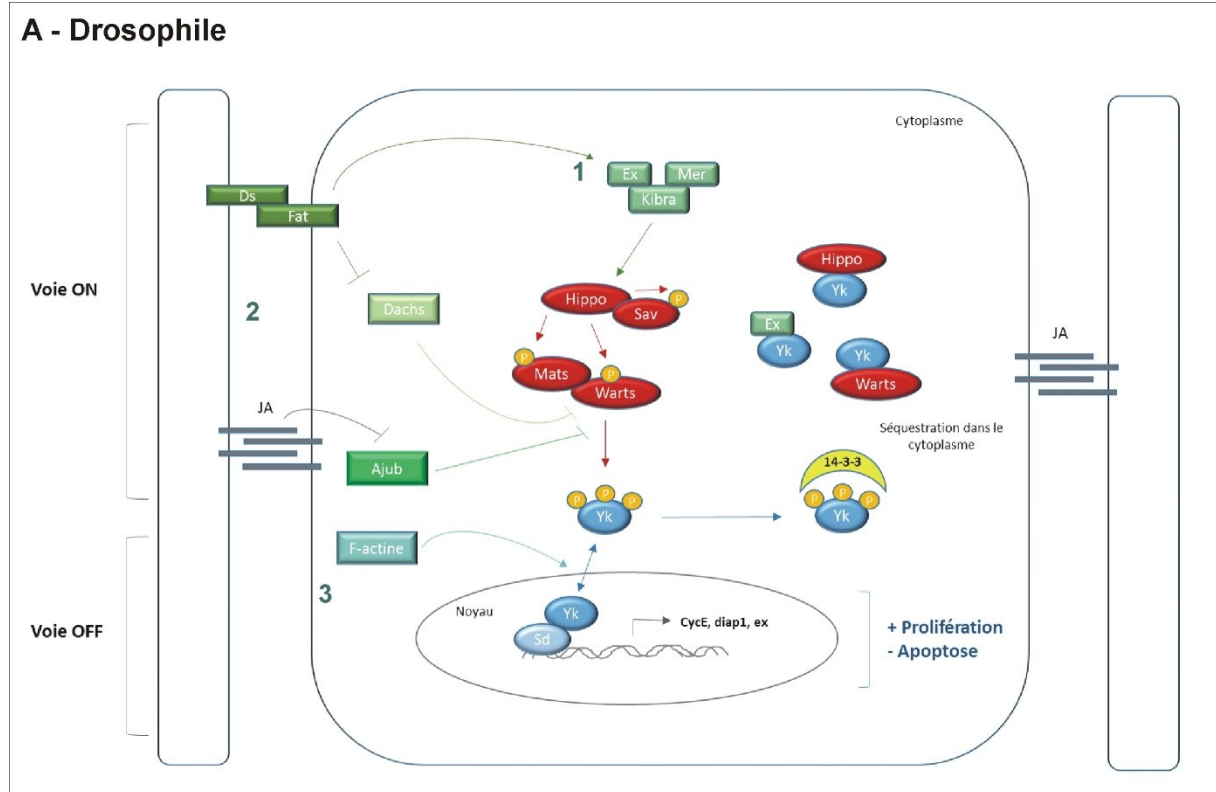


Figure 3.11 Schémas des principaux acteurs de la voie Hippo chez la Drosophile (A) et chez les Mammifères (B). Les 4 acteurs du centre de la voie sont indiqués en rouge et en bleu foncé pour Yorkie (YAP/TAZ). Les différents mécanismes qui régulent en amont l'activation de la voie Hippo cités dans le texte sont figurés en vert et numérotés comme dans le texte. *Ajub* : *Ajuba*, *Ds* : *Dachsous*, *Ex* : *Expanded*, *Ft* : *Fat*, *GPCR* : *Récepteur couplé aux protéines G*, *JA* : *jonctions adhérentes*, *Mer* : *Merlin*, *Sd* : *Scalloped*, *Yk* : *Yorkie*

de domaines WW dans la protéine Yorkie lui permet d'interagir avec un motif présent dans la séquence des protéines Expanded, Warts et Hippo. Lorsque la voie Hippo est inactive, Yorkie est nucléaire et active des facteurs de transcription aboutissant à l'expression de différents gènes cibles impliqués principalement dans la stimulation de la prolifération et dans l'inhibition de l'apoptose (Huang et al. 2005). Hpo, Sav, Wts et Mats, en inhibant l'activité de Yorkie, agissent alors comme des inhibiteurs de la prolifération (et entrent donc dans la catégorie des suppresseurs de tumeurs). Yorkie est le seul co-activateur transcriptionnel de la voie mis en évidence aujourd'hui. Le principal facteur de transcription avec lequel Yorkie interagit décrit est Scalloped mais d'autres facteurs de transcription ont été mis en évidence en fonction des espèces et des tissus (Johnson & Halder 2014). Nous verrons par la suite qu'une grande diversité de gènes cibles peuvent être régulés en fonction des types cellulaires et des espèces. Les régulateurs en amont aboutissant à la phosphorylation de Hippo et donc à l'activation de la voie sont aussi nombreux, restent encore mal connus et sont variables en fonction des espèces et des tissus. La particularité de la voie Hippo, par rapport aux autres voies de signalisation classiques, est donc l'absence de messager extracellulaire et de récepteur dédié.

La voie Hippo : une grande diversité de gènes cibles et d'effets

Même si le premier rôle de Yorkie (Yap/Taz) à avoir été mis en évidence est son implication dans la stimulation de la prolifération cellulaire et dans l'inhibition de l'apoptose, les études ultérieures ont montré une grande diversité de rôles en fonction des types cellulaires. En effet, Yorkie est aussi impliqué dans le contrôle du destin cellulaire (engagement dans une voie de différenciation) ainsi que dans l'intégration d'informations provenant d'autres voies de signalisation (Edgar 2006, Halder & Johnson 2011, Kodaka & Hata 2015). De manière très intéressante, ces différents rôles peuvent être médiés par Yorkie (Yap/Taz), selon les cas, en position nucléaire ou cytoplasmique. Le switch nucléo-cytoplasmique de Yorkie consécutif à l'activation de la voie Hippo semble donc essentiel à l'activité de Yorkie dans de nombreux contextes cellulaires.

Lorsque Yorkie est dans le noyau (voie Hippo inactivée), la diversité d'effets engendrés est liée à au-moins deux phénomènes : 1) la diversité des partenaires de Yorkie (Yap/Taz) ainsi que 2) la diversité des gènes cibles en fonction du partenaire, du contexte cellulaire et de l'espèce considérée.

Yorkie (Yap-Taz) interagit majoritairement avec Scalloped (TEAD1-4) (Goulev et al. 2008, Wu et al. 2008, Zhao et al. 2008, Zhang et al. 2009b). Ce complexe semble être toujours impliqué dans le cas du contrôle de la prolifération et de l'apoptose. Leur interaction met en jeu la partie C-terminale

de Scalloped (TEAD1-4) où se trouve le domaine de liaison à Yorkie (*Yk/YAP-binding domain*) ainsi que la partie N-terminale de Yorkie (Yap/Taz) où se trouve le domaine TBD (*TEAD-binding domain*) (Tableau 3.1).

D'autres facteurs de transcription ont été mis en évidence en tant que partenaires de Yorkie (Yap/Taz) (Strano et al. 2001, Komuro et al. 2003, Omerovic et al. 2004, Peng et al. 2009, Alarcon et al. 2009, Hiemer & Varelas 2013). Yorkie (Yap/Taz) interagit avec ces protéines via son/ses domaine(s) WW (Yorkie et Yap possèdent 2 domaines WW alors que Taz n'en possède qu'un seul – Tableau 3.1). Ces facteurs de transcription sont variables en fonction des tissus et des espèces. Parmi ceux-ci on trouve par exemple, chez les Mammifères, RUNX2, Pax3, MyoD, PPARy (*peroxisome proliferator-activated receptor*) (Hiemer & Varelas 2013) ou encore, chez la Drosophile, Homeothorax (Hth) et Teashirt (Tsh) (Peng et al. 2009).

Une grande diversité de gènes cibles sont impliqués en fonction du facteur de transcription mis en jeu, du type cellulaire mais aussi de l'espèce considérée (Hiemer & Varelas 2013, Kodaka & Hata 2015). On observe ainsi la régulation de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération, de l'apoptose ou encore de la différenciation. Chez la drosophile par exemple, l'interaction de Yorkie avec Scalloped induit l'expression de gènes cibles tels que les gènes codant pour la cycline E (régulateur du cycle cellulaire – Tapon et al. 2002), Myc (activateur de la croissance cellulaire – Stocker 2011), diap1 (facteur anti-apoptotique – Wu et al. 2003), le micro-RNA bantam (activateur de la prolifération et de la survie cellulaire – Thompson & Cohen 2006). Chez les Mammifères, l'interaction de YAP/TAZ avec TEAD1-4 stimule l'expression des gènes tels que *Bric5* et *Bric2* (orthologues de diap1, facteurs anti-apoptotiques – Zhao et al. 2008, Hao et al. 2008), CTGF, FGF1 (cytokines – Zhao et al. 2007, Hao et al. 2008), AREG (membre de la famille EGF – Zhang et al. 2009a). L'interaction de YAP/TAZ avec les facteurs de transcription RUNX2, Pax3, MyoD et PPARy entraîne l'expression de gènes impliqués respectivement dans la différenciation des ostéoblastes, des progéniteurs neuronaux, des myoblastes et des adipocytes (Hiemer & Varelas 2013). L'interaction de YAP avec TEAD(1-4) peut aussi stimuler l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la différenciation. Par exemple, au cours du développement des voies aériennes, ce complexe stimule l'expression de *Sox2* qui est requis pour la détermination des progéniteurs en cellules épithéliales (Mahoney et al. 2014).

Pour finir, lorsque Yorkie (YAP/TAZ) est localisé au niveau du noyau, il peut réguler indirectement l'expression de certains gènes via le recrutement d'autres protéines (Kodaka & Hata 2015). Par exemple, l'accumulation de YAP et de TAZ au niveau du noyau entraîne le recrutement nucléaire de la protéine SHP2 (Tyrosine phosphatase) qui déphosphoryle la parafibromine et stimule alors la transcription des gènes sous le contrôle des facteurs de transcription TCF et TEAD(1-4) (Tsutsumi et al. 2013).

Lorsque la voie Hippo est activée, Yorkie (Yap/Taz) est transloqué hors du noyau (Figure 3.11). Ce switch nucléo-cytoplasmique conservé chez la Drosophile et les Mammifères n'a pas pour unique rôle d'inhiber le rôle de Yorkie (Yap/Taz) en tant que co-activateur transcriptionnel. En effet, des données récentes ont montré que la séquestration de Yorkie (Yap/Taz) dans le cytoplasme était indispensable à la réalisation de différents mécanismes moléculaires.

Pour commencer, nous pouvons prendre l'exemple de la régulation par YAP de l'activité de la protéine ASPP1 (protéine impliquée dans la stimulation de l'expression de gènes pro-apoptotiques). Cette protéine peut exercer son rôle lorsqu'elle est transloquée dans le noyau suite à sa phosphorylation par LATS2 (orthologue de Warts). Lorsque la protéine YAP1 est située dans le cytoplasme, elle inhibe l'interaction entre LATS (orthologue de Warts) et ASPP1 et empêche donc la mise en jeu de son activité pro-apoptotique (Aylon et al. 2010, Kodaka & Hata 2015).

La localisation cytoplasmique de Yorkie (Yap/Taz) et son maintien ont aussi été démontrée, dans de nombreux systèmes, comme étant indispensables aux étapes de différenciation. Chez la souris, on observe ce cas par exemple au niveau de l'épithélium des voies aériennes au cours du développement ainsi que chez l'adulte (Mahoney et al. 2014), au niveau de l'épiderme de la peau (Lee et al. 2008, Zhang et al. 2011) ou encore au niveau de l'intestin (Camargo et al. 2007). Chez la Drosophile, on retrouve un rôle similaire au niveau de l'intestin ainsi que du lobe optique (Ren et al. 2010, Reddy et al. 2010). Le switch nucléo-cytoplasmique est alors indispensable au contrôle de la balance prolifération/différenciation. Les mécanismes moléculaires impliqués sont encore peu connus.

Pour finir, la localisation de Yorkie (Yap/Taz) au niveau du cytoplasme permet l'interconnexion de la voie Hippo avec d'autres voies de signalisation telles que les voies de signalisation TGF- β , Wnt, Notch, IGF (Varelas & Wrana 2012, Kodaka & Hata 2015). Par exemple, lorsque Taz est localisé au niveau cytoplasmique, il joue le rôle d'inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine (Varelas et al. 2010). Taz inhibe l'activation des protéines DVL, protéines impliquées dans l'inhibition du complexe de dégradation de la β -caténine. Lorsque Taz est cytoplasmique, la voie Wnt est donc inhibée. Cette interconnexion avec d'autres voies de signalisation lors de sa localisation cytoplasmique pourrait expliquer dans certains cas le rôle indispensable de Yorkie (Yap/Taz) dans les étapes de différenciation cellulaire (décrit dans le paragraphe précédent).

La voie Hippo : une grande diversité de régulateurs en amont

La voie Hippo peut être activée via une grande diversité de régulateurs, souvent interconnectés (Figure 3.11, acteurs en vert). Ils varient en fonction des contextes tissulaires ainsi que des espèces. On peut distinguer quatre grands modes de régulation : 1) via des régulateurs intracellulaires jouant sur la cascade de phosphorylation de la voie ; 2) via des communications intercellulaires mettant en jeu des

interactions entre protéines membranaires ; 3) via l'interaction avec le cytosquelette d'actine ; 4) via la réception de molécules diffusibles extracellulaires par des récepteurs couplés aux protéines G (Halder & Johnson 2011, Johnson & Halder 2014).

1) Régulation via des acteurs intracellulaires jouant sur la cascade de phosphorylation : exemple du complexe Expanded/Merlin/Kibra

Expanded, Merlin et Kibra sont des protéines adaptatrices formant un complexe multi-protéique localisé au niveau subapical de cellules épithéliales (McCartney et al. 2000). Il a été mis en évidence, chez la Drosophile, que ces protéines interagissent directement avec les composants du centre de la voie Hippo : Expanded avec Hippo, Merlin et Kibra avec Salvador (Yu et al. 2010) ; les détails moléculaires mis en jeu dans l'activation de Hippo et Salvador sont inconnus. De plus, Expanded peut interagir directement avec Yorkie, le séquestrer hors du noyau et donc inhiber son activité au niveau transcriptionnel (Badouel et al. 2009). Les protéines Merlin et Expanded possèdent un domaine FERM (elles appartiennent à la famille 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) connu comme jouant le rôle d'adaptateur entre des protéines transmembranaires et le cytosquelette et sont présentées comme étant de bons candidats pour médier l'information entre un (des) récepteur(s) transmembranaire(s) et la cascade de signalisation Hippo (Pan 2010). Ces trois protéines pourraient jouer un rôle partiellement redondant dans la régulation de la voie Hippo et l'importance de chaque membre semble varier en fonction du contexte tissulaire (Pan 2010, Yu et al. 2010). Les fonctions de Kibra et de Merlin sont conservées chez les Mammifères (Yu et al. 2010) mais l'implication de la protéine Expanded dans la régulation de la voie Hippo n'a pas été démontrée chez ces derniers.

2) Régulation via des communications intercellulaires mettant en jeu des interactions entre protéines membranaires

Exemple de l'interaction Fat/Dachsous

Fat est une protéine transmembranaire de type protocadhérine atypique localisée au niveau de la membrane plasmique apicale (Mao et al. 2009). Son implication dans la régulation de la voie Hippo n'a été mise en évidence que chez la Drosophile (Bennet & Harvey 2006, Tyler & Baker 2007). Fat est un activateur de la voie Hippo. La liaison entre Fat et le centre de la voie Hippo est encore mal connue. Fat pourrait être impliquée dans la stabilisation de la protéine Expanded et dans le maintien de sa localisation à proximité de la membrane plasmique (Willecke et al. 2006). De plus, Fat inhibe l'activité de la protéine Dachs, impliquée dans l'inhibition de Warts (Mao et al. 2006, Cho et al. 2006).

L'activité de Fat est régulée par la liaison avec son ligand Dachsous (Ds), une autre protocadhérine atypique. Leur interaction est régulée par la phosphorylation de leurs domaines

extracellulaires par la protéine kinase Four-jointed (Fj). De manière très intéressante, Fat et Dachous n'agissent pas comme des ligands classiques et l'activation de Fat et donc l'induction de la voie Hippo ne sont pas liées à la quantité absolue de protéines interagissant ensemble au niveau membranaire. Ds et Fj sont exprimés selon deux gradients opposés et Fat est inactivée (et donc la voie Hippo inactive) lorsque deux cellules voisines présentent Ds ou Fj en quantité différente (Willecke et al. 2008). Yorkie est alors actif et la prolifération est stimulée.

Exemple du recrutement de la protéine Ajuba par les jonctions adhérentes

La découverte de l'existence d'un lien entre la mise en place de jonctions d'adhérence et l'inhibition de la prolifération a permis de comprendre les bases moléculaires du phénomène d'inhibition par contact. Les protéines de la famille Ajuba LIM (Ajuba, LIMD1 et WTIP) des Mammifères ainsi que leur unique orthologue chez la Drosophile (Ajuba) sont des protéines adaptatrices mises en évidence comme étant des régulateurs négatifs de la voie Hippo (Das Thakur et al. 2010). Ces protéines interagissent physiquement avec Warts (Lats1/2) et Salvador (Sav1) et empêchent alors la phosphorylation et donc l'inactivation de Yorkie (Yap/Taz). La formation de contacts cellulaires via des jonctions adhérentes permet le recrutement à la membrane des protéines Ajuba (Marie et al. 2003). C'est par exemple le cas lors de la confluence de cellules. Il est alors supposé que le recrutement de la protéine Ajuba au niveau des jonctions cellulaires permette d'inhiber son activité et donc de lever l'inhibition de la voie Hippo. Cette protéine permettrait de médier l'inhibition de la prolifération observée au cours du phénomène d'inhibition par contact.

3) Régulation via le cytosquelette d'actine

Il a été mis en évidence qu'une augmentation de la densité des fibres d'actine (fibres de stress) entraîne la localisation nucléaire de Yorkie (YAP/TAZ) (Sansores-Garcia et al. 2011, Fernandez et al. 2011). Ce mécanisme pourrait être mis en jeu en fonction d'informations provenant de l'environnement cellulaire voisin puisque de telles modifications du cytosquelette d'actine sont généralement entraînées suite à des contacts cellule-cellule.

4) Régulation via la réception de molécules diffusibles extracellulaires par des récepteurs couplés aux protéines G

Récemment, des récepteurs couplés aux protéines G ainsi que leurs agonistes ont été mis en évidence comme étant des régulateurs de la voie Hippo chez les Mammifères (Yu et al. 2012). Ceci a

constitué la première mise en évidence d'une régulation de la voie Hippo via des molécules diffusibles extracellulaires. Par exemple, la fixation de l'épinéphrine ou du glucagon sur leur récepteur entraîne la stimulation de l'activité de Lats1/2 (orthologue de Warts) alors que la fixation de l'acide lysophosphatidique (LPA) ou la sphingosine 1P (S1P) sur leur récepteur entraîne son inhibition. En ce qui concerne le LPA et la S1P, le signal serait relayé via une modulation du cytosquelette d'actine par des RhoGTPases.

Voie Hippo et contrôle de la taille des organes : intégration de processus moléculaires et cellulaires à l'échelle de l'organe

Historiquement, la découverte de la voie Hippo a découlé de l'observation de mutants de *Drosophile* présentant une hyperplasie spectaculaire au niveau des tissus mutés (Badouel et al. 2009). La perte de fonction de l'un des 4 composants du centre de la voie, Hippo, Warts, Mats et Salvador ou la surexpression de Yorkie entraînent des phénotypes très similaires ayant permis de supposer leur implication au sein de la même voie de signalisation (Figure 3.12 – Kango-Singh & Singh 2009). Le phénotype des mutants est caractérisé par une importante hyperplasie des disques imaginaux ainsi que des structures adultes correspondantes (Xu et al. 1995, Udan et al. 2003, Saucedo & Edgar 2007). Le gène *Hippo* est d'ailleurs nommé ainsi du fait de l'aspect de la tête des drosophiles mutées pour ce gène au niveau des disques imaginaux des yeux, rappelant la peau d'un hippopotame (Udan et al. 2003). Ces mutants sont de plus résistants à différents signaux pro-apoptotiques qui sont normalement mis en jeu lors de la présence d'un excès de cellules (Harvey et al. 2003, Jia et al. 2003, Pantalacci et al. 2003, Wu et al. 2003). Ces résultats ont permis de montrer que l'hyperplasie observée était due à la conjonction de la dérégulation de deux mécanismes moléculaires : 1) dérégulation de la prolifération cellulaire avec une prolifération plus rapide chez les mutants et non interrompue une fois que l'organe a atteint « la bonne taille » et 2) dérégulation de l'apoptose.

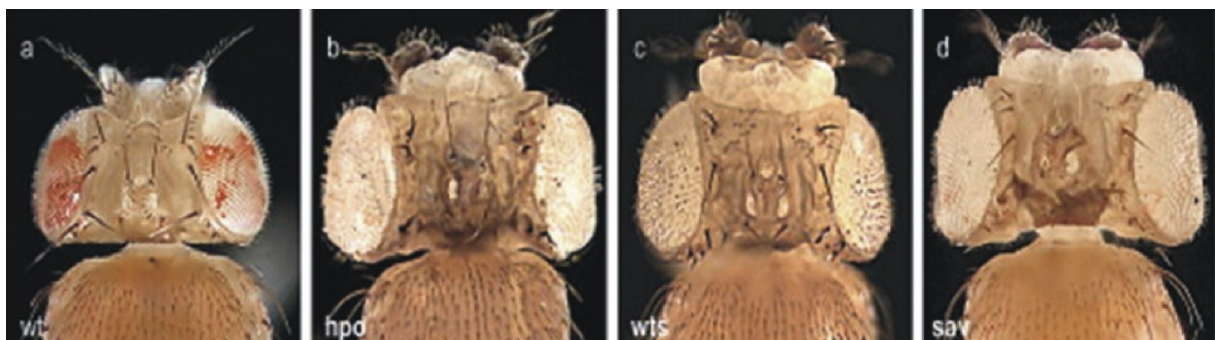


Figure 3.12 Mise en évidence des acteurs du centre de la voie Hippo et du rôle de cette voie dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de la taille des organes chez la *Drosophile*. Comparaison de

phénotypes de mutants des acteurs de la voie Hippo au niveau de la tête de Drosophiles. a-d) La comparaison des phénotypes des mutants Hippo (b), Warts (c) et Salvador (d) avec celui d'une drosophile sauvage (a, wt) montre une augmentation de la prolifération au niveau des tissus de la tête (notamment les yeux) aussi qu'une importante augmentation de la taille générale de la tête. Kango-Singh & Singh (2009).

Les orthologues des acteurs du centre de la voie étant conservés chez les Mammifères, une conservation de son rôle dans le contrôle de la taille d'un organe a été recherchée. Elle a été mise en évidence par l'obtention d'une hyperplasie du foie suite à la surexpression de YAP (orthologue de Yorkie) ou à la perte de fonction de Mst1/2 (orthologues de Hippo) ou de WW45 (orthologues de Salvador) entraînent une hyperplasie de cet organe (Camargo et al. 2007, Song et al. 2010, Lee et al. 2010).

Cependant le lien entre la voie Hippo et le contrôle de la taille dépend des tissus. Dans certains tissus comme la peau et l'intestin aucune hyperplasie n'est observée chez les mutants mais il y a une augmentation de la zone des cellules souches, au détriment de la zone des cellules différenciées (Camargo et al. 2007, Zhang et al. 2011). Ainsi, dans certains tissus, la voie Hippo aurait un rôle de contrôle de la taille de l'organe alors que dans d'autres elle n'exercerait que son rôle « primaire » de régulateur de la sortie du cycle cellulaire. Ceci a aussi été démontré chez la Drosophile dans le cas particulier du lobe optique (Reddy et al. 2010). Cette implication de la voie Hippo dans la limitation de la zone de prolifération est observée au cours du développement ainsi qu'au niveau des organes/tissus adultes possédant des cellules souches et donc capables de régénération.

Bases moléculaires du contrôle de la taille d'un organe : communications intercellulaires et intégration à l'échelle de l'organe

La croissance d'un organe implique la mise en jeu d'interactions cellulaires qui puissent être intégrées à l'échelle de l'organe pour que celui-ci puisse atteindre et ne dépasse pas « la bonne taille ». Il s'agit alors pour les cellules d'un même organe de moduler leur comportement en fonction de la taille même de l'organe en croissance. De récentes études ont permis de mettre en évidence les bases moléculaires de cette intégration à l'échelle de l'organe chez la Drosophile. Les gradients de concentration de Dachsous (Ds) et Four-jointed (Fj), orientés selon un axe de polarité de l'organe, permettraient de jouer ce rôle de senseur de la taille de l'organe. En effet, des drosophiles présentant une expression uniforme de Ds et Fj possèdent des ailes ainsi qu'une taille générale réduites (Rogulja et al. 2008, Willecke et al. 2008). Deux modèles (non exclusifs) ont alors été proposés pour expliquer le rôle de ces gradients dans le contrôle de la taille : 1) le modèle des coordonnées polaires (*polar*

coordinate model - Rogulja et al. 2008, Willecke et al. 2008) et 2) le modèle d'anticipation (*feedforward model* – Zecca & Struhl 2010).

1) *Modèle des coordonnées polaires (Figure 3.13)*

Le modèle des coordonnées polaires propose que la croissance d'un organe mette en jeu un gradient d'informations de position (Figure 3.13). Les cellules voisines comparent leur information de position et se mettent à proliférer si leur différence excède un certain seuil. Les nouvelles cellules se positionnent entre les anciennes, ce qui implique l'intercalation de valeurs intermédiaires. Ceci a lieu jusqu'à ce que la différence soit en dessous de la valeur seuil. Les cellules cessent alors de proliférer. Ce modèle explique alors qu'un organe cesse de croître une fois que la taille appropriée est atteinte. Le ou les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce modèle doivent alors répondre à deux critères - donner une information de position et réguler la prolifération cellulaire – auxquels répond parfaitement la voie de signalisation Hippo médiée par le système Fat/Ds/Fj. En effet, nous avons vu que la voie Hippo est inactivée (et donc la prolifération activée) lorsque deux cellules voisines présentent des quantités différentes de Ds ou Fj.

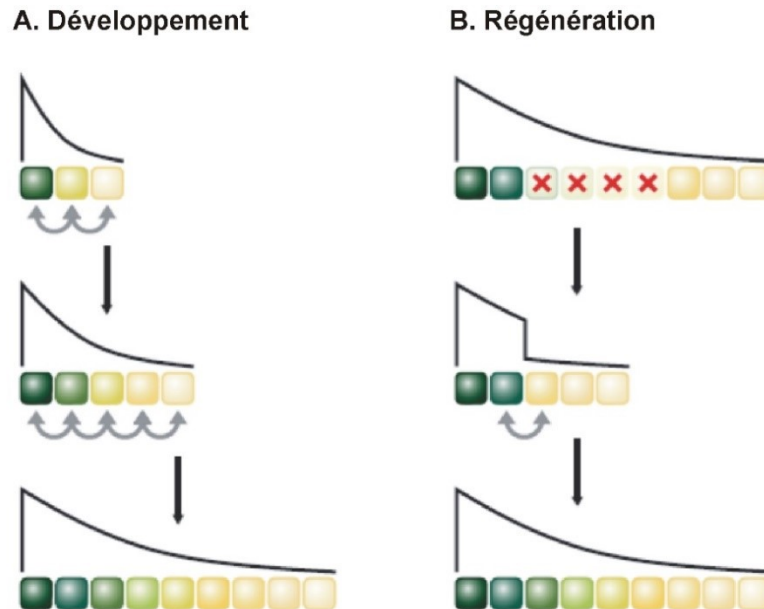


Figure 3.13 **Modèle des coordonnées polaires et contrôle de la taille des organes et des tissus par la voie Hippo.** A-B) Représentation schématique du modèle des coordonnées polaires au cours du développement normal (A) et en contexte de régénération (B). Chaque cellule est représentée par un carré. Le gradient de couleur ainsi que la courbe (en haut de chaque schéma) représentent le gradient d'information de position, c'est-à-dire ici le gradient d'activité de Dachsous (en lien avec son gradient d'expression). Quand la différence entre deux cellules voisines dépasse un certain seuil, la prolifération est activée au niveau de cette zone de discontinuité, ce qui entraîne l'intercalation de cellules ayant des valeurs intermédiaires. L'activation de la prolifération est maintenue jusqu'à ce que le gradient soit « lissé » et que la différence entre deux cellules

voisines soit en dessous d'un certain seuil. A) En contexte de développement normal, ce seuil est atteint lorsque l'organe a atteint sa taille finale. B) En contexte de régénération, après ablation d'une partie des cellules (croix rouges), deux cellules se retrouvent voisines, avec des informations de positions très différentes. La prolifération est alors stimulée, ce qui permet l'intercalation de cellules jusqu'à ce que la taille finale de l'organe soit restaurée. D'après Halder & Johnson 2011.

2) Le modèle d'anticipation (Figure 3.14)

Ce modèle permettrait d'expliquer le contrôle de la taille des ailes de *Drosophila* (Zecca & Struhl, 2010). Les protéines Fat/Ds/Fj agissent en entraînant le recrutement de nouvelles cellules au niveau du primordium de l'aile. Les cellules du primordium de l'aile expriment *Vg* (vestigial) qui spécifie leur déterminisme cellulaire en tant que cellule de l'aile. *Vg* stimule l'expression de *Fj* et inhibe l'expression de *Ds*, ce qui implique des gradients de concentration opposés au niveau des cellules du primordium de l'aile et en dehors (Figure 3.14). L'activité de Fat est alors inhibée (par de fortes différences de concentration en *Ds* et/ou *Fj*) au niveau des cellules à la bordure du primordium de l'aile. Ceci induit l'inhibition de la voie Hippo et donc l'activation de Yorkie qui stimule la prolifération ainsi que l'expression de gènes, dont *Vg*, impliqués dans le déterminisme de ces cellules pour devenir des cellules de l'aile. Ceci entraîne alors le recrutement au sein du primordium de l'aile, des cellules voisines. Au niveau de ces nouvelles cellules de l'aile, *Vg* stimule l'expression de *Fj* et inhibe celle de *Ds* ce qui entraîne un déplacement des gradients de concentration et permet la mise en jeu d'un nouveau cycle au niveau de la nouvelle bordure du primordium et le recrutement de nouvelles cellules de l'aile.

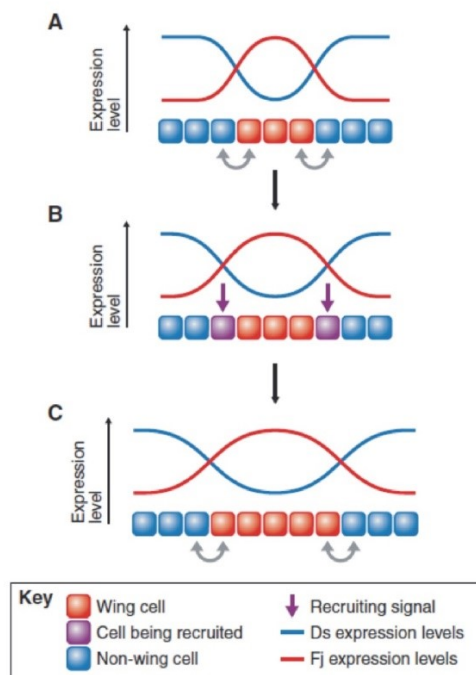


Figure 3.14 Modèle d'anticipation et contrôle de la taille d'un organe par la voie Hippo. Exemple du primordium de l'aile de *Drosophila*. Les gradients d'expression de *Dachsous* (Ds) et de *Four-jointed* (Fj) sont représentés en bleu et en rouge. A) Les cellules du primordium de l'aile (carrés rouges) ont été déterminées pour être des cellules de l'aile et expriment le gène *vestigial* (*Vg*), ce qui induit la stimulation de l'expression de *Fj* et inhibe celle de *Ds*. Inversement, les cellules non déterminées (carrés bleus) expriment faiblement *Fj* et fortement *Ds*. Les cellules situées aux abords du primordium de l'aile présentent donc de fortes différences de concentration en *Ds* et *Fj* (flèches grises), ce qui inhibe *Fat* et donc la voie Hippo. B) L'inhibition de la voie Hippo stimule la prolifération et l'expression de gènes cibles tels que *Vg* au niveau des cellules de la bordure du primordium de l'aile (carré violet). Ces cellules deviennent donc déterminées à devenir des cellules de l'aile, ce qui entraîne l'expansion du primordium de l'aile grâce au recrutement de nouvelles cellules (flèches violettes). C) L'expression de *Vg* au sein des cellules nouvellement recrutées stimule l'expression de *Fj* et inhibe celle de *Ds*, ce qui entraîne le déplacement des gradients d'expression. Un nouveau cycle peut alors recommencer.

Chez les Mammifères, il existe un orthologue de *Fat* (*Fat4*), deux orthologues de *Ds* (*Dchs1-2*) et un orthologue de *Fj* (*Fjx1*) (Nakajima et al. 2001, Rock et al. 2005, Tanoue & Takeichi 2005) mais leur lien avec la voie Hippo n'a pas été étudié.

Il est intéressant de noter ici que ces modèles ne semblent pas pouvoir s'appliquer aux tapis roulants cellulaires, puisque dans ce cas, toutes les cellules le long de l'axe de polarité de l'organe/du tissu en croissance ne conservent pas la capacité de prolifération et que la prolifération est restreinte à l'un des pôles.

3.3.2 Article 2 : Comparative study of Hippo pathway genes in cellular conveyor belts of a ctenophore and a cnidarian

Comparative study of Hippo pathway genes in cellular conveyor belts of a ctenophore and a cnidarian

Alicia Coste¹, Muriel Jager¹, Jean-Philippe Chambon¹ and Michaël Manuel^{1*}

Article soumis au journal EvoDevo

* Correspondence: michael.manuel@upmc.fr

¹Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UMR 7138 Evolution Paris-Seine UPMC CNRS, Case 05, 4^{ème} étage, Bâtiment A, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France

Abstract

Background: The Hippo pathway regulates growth rate and organ size in fly and mouse, notably through control of cell proliferation. Molecular interactions at the heart of this pathway are known to have originated in the unicellular ancestry of metazoans. They notably involve a cascade of phosphorylations triggered by the kinase Hippo, with subsequent nuclear to cytoplasmic shift of Yorkie localisation, preventing its binding to the transcription factor Scalloped, thereby silencing proliferation genes. There is few comparative expression data of Hippo pathway genes in non-model animal species, and notably none in non-bilaterian phyla.

Results: All core Hippo pathway genes could be retrieved from the ctenophore *Pleurobrachia pileus* and the hydrozoan cnidarian *Clytia hemisphaerica*, with the important exception of Yorkie in ctenophore. Expression study of the Hippo, Salvador and Scalloped genes in tentacle “cellular conveyor belts” of these two organisms revealed striking differences. In *P. pileus*, their transcripts were detected only in areas where undifferentiated progenitors intensely proliferate and where expression of cyclins B and D was also seen. In *C. hemisphaerica*, these 3 genes and Yorkie are expressed not only in the proliferating but also in the differentiation zone of the tentacle bulb, and in mature tentacle cells. However, using an antibody designed against the *C. hemisphaerica* Yorkie protein, we show in two distinct cell lineages of the medusa that Yorkie localisation is predominantly nuclear in areas of active cell proliferation and mainly cytoplasmic elsewhere.

Conclusions: This is the first evidence of nucleo-cytoplasmic Yorkie shift in association with the arrest of cell proliferation in a cnidarian, strongly evoking the cell division-promoting role of this protein and its inhibition by the activated Hippo pathway in bilaterian models. Our results furthermore highlight important differences in terms of deployment and regulation of Hippo pathway genes between cnidarians and ctenophores.

Keywords: cell proliferation, Cnidaria, Ctenophora, development, evolution, growth, Hippo pathway, Yorkie

Background

In the context of a multicellular organism, basic cellular processes such as cell proliferation, differentiation and apoptosis have to be finely tuned in time and space to ensure correct and coordinated cell turn-over, growth rate and size at the tissue, organ and organism levels. In recent years, the Hippo pathway has emerged as a major actor of this orchestration [1–6]. Functional studies in fly have revealed that the kinase Hippo (Hpo) negatively regulates cell proliferation and organ size and promotes apoptosis, and inversely that the downstream transcriptional co-activator Yorkie (Yki) enhances cell proliferation rates and organ size whilst limiting apoptosis [2–4, 7–9]. It was later discovered that orthologues of these and other components of the Hippo pathway have essentially similar functions in mammals in a wide variety of developmental stages and tissues [1, 4, 10–12]. This prompted the suggestion that the Hippo pathway has a conserved role at the phylogenetic level of Bilateria in negative regulation of tissue and organ size, through inhibition of Yki notably leading to cell cycle exit. These effects are triggered in response to multiple cues from the cell environment and in the context of an intense cross-talk with other key signalling pathways such as Wnt, TGF- β and Notch [12–14].

A critical aspect of the regulatory logic of the Hippo pathway is modulation of the behaviour of the Yki protein (in mammals represented by two paralogues called YAP and TAZ). In the inactive pathway state, this protein translocates to the cell nucleus where it can bind to a variety of transcription factors to affect gene transcription. Effects on cell proliferation are principally mediated through Yki binding to Scalloped (Sd) (in mammals, TEAD transcription factors) [2, 4, 15–18]. Activated Sd enhances the transcription of genes driving stemness and cell division [5] (examples of identified target genes include *CyclinE*, *Myc*, *FoxO*, *e2f1*, *wingless*; [19]). When the Hippo pathway is activated, the kinase Hpo (in mammals, MST) together with its adaptor protein Salvador (Sav) (in mammals, SAV, also called WW45) phosphorylates the complex formed by Warts (Wts) (in mammals, LATS) and Mats (in mammals, MOB1) [20–22]. Then Warts phosphorylates Yki at a critical serin residue (S127 in human YAP) [2, 4, 23–25]. As a consequence, Yki is sequestered in the cytoplasm, notably through interaction with the 14-3-3 protein [26, 27]. Not only this prevents Yki from activating Sd in the nucleus (thus down-regulating genes associated with stem cells and cell division), but also it allows Yki to exert specific functions in the cytoplasm, including effects on cell fate and differentiation,

documented in a number of systems [12, 28–31]. These core components of the Hippo pathway stand at the node of a complex network of interactions [5, 12]. Regulatory inputs upstream of Hpo are multiple and have only started to be unveiled (reviewed in [2, 4, 12]). In addition, there are Yki-independent effects of Hpo, as well as Hpo-independent regulations of Yki [12], further illustrating the complexity hiding behind what we call the “Hippo pathway”.

The Hippo pathway is evolutionarily conserved far beyond the clade of bilaterian animals. Comparative genomic studies have identified orthologues of most Hippo pathway members in non-bilaterian animal phyla (cnidarians, placozoans, sponges) as well as in the closest unicellular relatives of metazoans: choanoflagellates (e.g. *Monosiga brevicollis*) and ichthyosporids (e.g. *Capsaspora owczarzaki*) [32–34]. According to the analyses performed by Sebé-Pedrós et al. [34], the core components originated sequentially in this order: Mats in a remote eukaryote ancestor; Hpo and Sd in a common ancestor of unikonts (amebozoans, fungi, metazoans and their kins); Warts in an ancestor of opisthokonts (the least inclusive clade containing fungi and animals); Yki in an exclusive ancestor of holozoans (*Capsaspora*, choanoflagellates and metazoans); Sav after the divergence of *Capsaspora*. The same study found evidence for secondary losses of Hpo in non-chytrid fungi and the choanoflagellate *Monosiga* (Hpo present in the other choanoflagellate *Salpingoeca*), and of Sd in chytrids.

Furthermore, recent experimental data suggest that the growth-regulatory function of Hippo pathway genes has its roots in a common ancestor of holozoans. Thus, co-expression of the *Capsaspora* versions of Yki and Sd led to significant eye tissue overgrowth in *Drosophila melanogaster*, and conversely overexpression of *Capsaspora* Hpo resulted in smaller eyes [34]. Similar phenotypes were obtained from heterologous expression in fly eye imaginal disks of the Yki genes from the placozoan *Trichoplax adhaerens* and the cnidarian *Nematostella vectensis* [19]. It was furthermore demonstrated that the Yki and Sd proteins of *Capsaspora* bind together, that *Capsaspora* Hpo induces phosphorylation of fly and *Capsaspora* Yorkies in cell cultures and of fly Yki *in vivo*. The molecular regulation mechanisms at the heart the Hippo pathway therefore clearly emerged before the evolutionary origin of multicellular animals.

However, there is still a critical lack of data in non-model metazoans on the expression and function of core Hippo pathway components, as well as on the subcellular localisation of Yki in relation to the

proliferative capacities of cells. Apart from fly and mammals, the Hippo pathway has been substantially investigated only in flatworms (Platyhelminthes), with contradictory conclusions as to the conservation of the role of Yki, depending on the species studied. In *Macrostomum lignano*, Yki promotes cell proliferation and growth, like in *Drosophila* and mouse [35], but in the other flatworm *Schmidtea mediterranea*, Yorkie is ubiquitously expressed, has a restrictive influence on cell proliferation, and is involved in morphogenesis of the excretory system [36]. Since flatworms are thought to be particularly important to understanding the early evolution of stem cell regulation mechanisms in bilaterians, this contrasted picture precludes firm conclusions concerning the extent of conservation of Yki and Hpo pathway functions. At a higher evolutionary level, up to now orthologues of Hpo pathway genes from animal lineages that diverged before the bilaterians have been studied only in the context of heterologous expression in fly.

In this contribution, we present the first expression study of core Hpo pathway genes in two non-bilaterian phyla, ctenophores and cnidarians, and the first data on Yki subcellular localisation in relation to cell proliferation in a cnidarian. Ctenophores and cnidarians are traditionally thought to be phylogenetically closer to the Bilateria than sponges and placozoans, notably because they possess nerve cells, muscle cells and a gut (synapomorphies of Eumetazoa). Recently, phylogenomic studies have confirmed a close relationship between cnidarians and bilaterians, but many of these analyses have come up with a highly unconventional placement of ctenophores as sister-group to all other metazoans (including sponges and placozoans) [37–40]. The position of ctenophores is currently hotly debated given that other phylogenomic studies have suggested that an artefact known as “long branch attraction” was in fact responsible for this basal placement [41–44] (but see [40]) and obtained trees compatible with the classical monophyly of Eumetazoa.

Irrespective of this phylogenetic controversy, the two species investigated here, the ctenophore *Pleurobrachia pileus* and the hydrozoan medusa *Clytia hemisphaerica*, are of special interest to addressing molecular aspects of cell proliferation and differentiation in non-bilaterian animals, owing to the existence of “cellular conveyor belts” [45] in the proximal part of their tentacles. Cellular conveyor belts are cell renewal systems in which stem cells are spatially restricted (at one extremity of the belt) and cellular stages of proliferation, cell cycle exit and the successive steps of differentiation are spatially ordered in a sequence that recapitulates their timely succession. A seminal example in bilaterians is the vertebrate intestinal crypt [45]. Such systems offer a decisive advantage in organisms for which advanced techniques of cellular biology and gene functional

studies are not available, because the association of a given gene expression pattern, or any other cell feature, with a given cell state (from stem cells to mature differentiated cells) can be deduced from the cell position along the conveyor belt [45].

Cellular conveyor belts housed in proximal swellings of *P. pileus* and *C. hemisphaerica* tentacles are involved in their constant and intense regeneration needed to compensate tentacle injury during feeding. They have been previously characterised at the cellular and molecular level notably through electron microscopy study, monitoring of proliferating nuclei after BrdU or EdU incorporation, and expression analyses of stem cell and differentiation genes [46–51]. In the *P. pileus* tentacle root, there is a central conveyor belt that provides tentacle mesogleal cells (muscle cells, and probably also other cell types including neurons) and two symmetrical lateral conveyor belts mainly involved in the production of colloblasts, the ctenophore-specific adhesive cells used to catch preys (main cell type of the tentacle ectoderm). Each one of these three conveyor belts corresponds to a flattened expansion visible in transverse section on the internal side (i.e. the side facing the body axis) of the tentacle root, with the stem cells concentrated along a ridge forming the distal margin of the expansion. The *C. hemisphaerica* tentacle bulb is more simply organised, with a single conveyor belt in the ectoderm, oriented from proximal to distal. The stem cells are located close to the insertion point of the bulb on the umbrella periphery. This cellular conveyor belt is thought to provide all ectodermal cells of the tentacle, notably the cnidarian-specific stinging cells or nematocytes.

In this study, we first looked for the orthologues in cnidarians and ctenophores of core Hpo pathway genes, through Blast searches and phylogenetic analyses. Whereas all searched genes could be identified in cnidarians, a Yorkie orthologue is apparently absent from ctenophore genomes despite presence of the other core Hpo pathway genes. Then we analysed the expression of cyclins B and D (as markers of cell proliferation) and of the core Hpo pathway genes Hpo, Sav and Sd in the tentacle root of *P. pileus* and Hpo, Sav, Yki and Sd in the tentacle bulb of *C. hemisphaerica*. Significant differences in transcript distribution of orthologous genes were observed between the cellular conveyor belts of these two organisms. Using an antibody specifically designed to recognise *C. hemisphaerica* Yorkie, associated with EdU labelling of proliferating nuclei, we finally show that the subcellular localisation of this protein varies between cells (from entirely cytoplasmic to entirely nuclear), and that there is strong correlation across the medusa tissues between areas of predominantly nuclear Yki localisation and of intense cell proliferation.

Methods

Animal collection and fixation

Adult specimens of *Pleurobrachia pileus* were collected using plankton nets in Roscoff and in Gravelines (France) during their reproductive season, between March and June. The field work done in the context of this work did not involve any endangered or protected species and did not require any specific permission. Living adult *P. pileus* specimens were transferred into filtered natural seawater and kept in the lab at 16°C. After 24h of starvation, they were fixed at 4°C in 4% paraformaldehyde in 50% seawater and 50% PBT (10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Tween 20) for 30 min then washed three times in PBT and dehydrated through a graded series of ethanol and stored in methanol at -20°C. Medusae of *Clytia hemisphaerica* were obtained in our laboratory by culture of polyp colonies established since several years from strains initially provided by Evelyn Houliston (Villefranche-sur-mer) and raised as previously described [52], except that artificial seawater (Red Sea®) was used. Medusae were left unfed during 24h before fixation. For *in situ* hybridisation, medusae were fixed during 40 min at 4°C in 3.7% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in PBT. For immunofluorescence, they were fixed for 30 min at room temperature in paraformaldehyde 4% in PBT. After fixation, medusae were dehydrated as described above.

In situ hybridisation

The *in situ* hybridisation (ISH) protocol for *P. pileus* was as described in [50]. Following whole-mount ISH, specimens were micro-dissected. Tentacle roots were extracted from the body for separate observation. Negative controls (with a sense probe and without any RNA probe) performed in parallel showed no staining after extensive revelation, except, as reported previously (e.g., [48]), occasionally in isolated cells of the non-specialised ectodermal epithelium (between adjacent comb rows; around the apical organ), but not in tentacle roots. Transverse cryo-sectioning of tentacle roots after whole mount ISH was performed using a Leica CM1860 cryostat at a thickness of 14 µm, as described in [49]. *In situ* hybridisation of *C. hemisphaerica* medusae was performed as in [47]. After post-fixation and DAPI staining, samples were mounted in Citifluor®. All DIC images were obtained with an Olympus BX61 microscope using a Q-imaging Camera with Image Pro plus® software (Mediacybernetics).

Gene phylogenies

Data sets were built by blasting (BlastP) human proteins on NCBI against predicted proteins from the complete genomes of *Capsaspora owczarzaki* (Ichthyosporea), *Monosiga brevicollis* (Choanoflagellata), *Amphimedon queenslandica* (Porifera, Demospongiae), *Sycon ciliatum* (Porifera, Calcarea) *Trichoplax adhaerens* (Placozoa), *Nematostella vectensis* (Cnidaria, Anthozoa), *Hydra magnipapillata* (Cnidaria, Hydrozoa), *Lottia gigantea* (Lophotrochozoa, Mollusca), *Drosophila melanogaster* (Ecdysozoa, Arthropoda), *Strongylocentrotus purpuratus* (Deuterostomia, Echinodermata), *Branchiostoma floridae* (Deuterostomia, Chordata, Cephalochordata), *Ciona intestinalis* (Deuterostomia, Chordata, Urochordata), *Danio rerio* (Deuterostomia, Chordata, Vertebrata, Teleostea), *Xenopus tropicalis* (Deuterostomia, Chordata, Vertebrata, Amphibia) and *Homo sapiens*. In addition, Blast (tBlastN) searches with the same query sequences were performed on the full genome of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and our transcriptome assembly of the other ctenophore *Pleurobrachia pileus*, and on the current transcriptome assembly of the hydrozoan cnidarian *Clytia hemisphaerica*. In the case of Yorkie, since no orthologue was found in the *M. leidyi* genome and the *P. pileus* transcriptome (see Results), the genome of *Pleurobrachia bachei* was blasted as well.

For these Blast searches, an e-value threshold was determined empirically for each protein family, after blasting the human protein against the human genome, in order to retrieve not only the orthology group of interest but also at least one additional orthology group of the same multigenic family, in order to root the tree. Thus, closest orthology groups used for rooting were Nedd4 for Yorkie, membrane-associated guanylate kinase WW and PDZ domain-containing protein (MAGI) for Salvador, Mob kinase activator 3 for Mats and Serine Threonin Kinase 38 for Warts. In the alignment built for analysis of Hippo, a more extended sampling of several subfamilies of kinases close to Hippo was selected as outgroup (from the genome of *Branchiostoma floridae*). Because Scalloped is an isolated family of transcription factors (no paralogy above phylum level), in this case the tree was rooted taxonomically using sequences from *Capsaspora owczarzaki* and *Monosiga brevicollis*.

Since Yorkie and Salvador both contain multiple WW domains, for these two gene families we first built an alignment of WW domains only, in order to determine their orthologies (i.e. which WW domain of a given gene in a given species correspond to which WW domain in other genes). When several WW domains were present in the same protein they were labelled alphabetically according to their position starting from the N-terminal extremity (i.e. for Yorkie: Yki a and Yki b correspond to

the first and second WW domains respectively; for Nedd4, WW domains labelled from a to e). Results of WW domain analyses were taken into account to build combined alignments; for Yorkie, of the TEAD-binding (TBD) domain and the two WW domains (TBD domain replaced with missing data for Nedd4 proteins); for Salvador, of the SARA domain and the two WW domains.

Alignments were constructed automatically using MUSCLE [53]. They were visually checked, and ambiguously-aligned parts were removed in BioEdit [54]. Alignments in Fasta format are provided as Additional file 1. Phylogenetic analyses were carried out from the amino-acid alignments by Maximum-Likelihood (ML) using the PhyML 3.1. program [55] with the LG model of amino-acid substitution and a BioNJ tree as the input tree. A gamma distribution with four categories was used and the gamma shape parameter and the proportion of invariant sites were optimised during the searches. ML bootstrap (100 replicates) values higher than 50% are indicated on the trees (Fig. 1 and Additional file 2).

Immuno-cyto-localisation with an anti-CheYorkie antibody

Stepwise rehydration of fixed medusae was performed using PBS (10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.5) + Triton-X100 0.01%, followed by sample permeabilisation (Triton-X100 0.2% in PBS, then 0.01% in PBS, 10 min at room temperature). After blocking with 1% bovine serum albumin (BSA), samples were incubated for 4 hours at room temperature or overnight at 4°C with a polyclonal antibody against *C. hemisphaerica* Yorkie (1/100 serum dilution, see next paragraph for antibody validation), produced by Eurogentec (Speedy 28-day polyclonal packages) in rabbit against the peptide H-CFNRRTTWDDPRKAHS-NH₂. After being washed with PBS + Triton-X100 0.01%, samples were incubated overnight at 4°C with the secondary antibody Alexa Fluor[®] 568 goat anti-rabbit IgG (1/2000 dilution, Molecular probes). Samples were finally stained with Dapi (1µg/ml) for 15 min for DNA visualisation, washed three times for 15 min in PBS + Triton-X100 0.01% and mounted on slides for microscope observation. Fluorescence labelling was monitored with a confocal microscope (Leica SP5) and images were acquired using Leica LAS-AF software.

Validation of the anti-CheYki antibody by SDS-PAGE and Western-blot

Medusae were sonicated on ice in RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.6, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Morthovanadate, 0.1% SDS) supplemented with

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Molecular Biochemicals). Lysates were then clarified by centrifugation. Samples were diluted in sample buffer [56] and incubated at 85°C for 5 min. Total proteins were separated on a 12.5% SDS gel and transferred onto nitrocellulose membrane. The blot was blocked with 5% BSA in TBS-Tween (Tris 50mM, NaCl 150 mM, pH 7.6, 0.1% tween 20), incubated with the anti-CheYki rabbit antiserum (see previous paragraph) diluted 1/250 in TBS-Tween or alternatively (for control) with rabbit pre-immune serum diluted 1/250 in TBS-Tween, overnight at 4°C. Then the blot was washed in TBS-Tween, incubated for 1h with the secondary antibody (HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody, diluted 1/30000), then washed in TBS-Tween. Labelled proteins were detected using the ECL chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia Biotech). Results are shown in Additional file 4.

EdU labelling of proliferating nuclei

EdU incorporation assays were done using the Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit from Invitrogen (Durham, NC, USA). Medusae were incubated in artificial sea water containing 100 µM EdU, for two hours, then they were immediately fixed in PFA 4%, 50% sea water, 50% PBS + Triton-X100 0.01%. After fixation for 30 min at room temperature, the samples were blocked with 3% BSA in PBS + Triton-X100 0.01%, then permeabilised in PBS triton X100 0.5% for 20 min. After washing with 3% BSA in PBS + Triton-X100 0.01%, animals were incubated in the EdU detection solution as indicated by the manufacturer. All samples were labelled with anti-CheYki antibody (as described above) and finally stained with Dapi and mounted as described for ISH experiments.

Results

The ctenophore repertoire of Hippo pathway genes and cyclins, and other lessons from the gene phylogenies

Several previous studies have addressed the origin and evolution of Hippo pathway genes [19, 32–34], but this one is the first to encompass ctenophores. In addition, published trees of Hpo and Yki [32, 33] did not include closest paralogs (i.e., were unrooted) which is problematic for orthology assessment, whereas in the present study all phylogenetic trees are rooted. Presence/absence scorings deduced from these trees for core Hippo signalling pathway genes (Hpo, Sav, Mats, Warts) as well as the transcriptional co-activator Yki and the transcription factor Sd are summarised on Table 1, and the trees are shown in Fig. 1 for Yki and in Additional file 2 for the other genes (see also comment on the cyclin tree in Additional file 2).

The most remarkable finding from these analyses is the absence in ctenophores of a true orthologue of Yorkie (Fig. 1, Table 1), whereas clear single orthologues of the other core Hippo signalling pathway genes Hpo, Mats, Warts, Sav and Sd are present (Additional file 2 and Table 1). Ctenophore WW domains with the closest similarity to Yki WW domains fall in the tree close to WW domains from bilaterian Nedd4 proteins, rather than with the first or second WW domain of Yki (Fig. 1a). Combined analysis of the conserved Yorkie domains (the TBD domain and the two WW domains; Fig. 1b; see Methods) likewise fail to identify any Yki orthologue in ctenophores. Since the non-metazoan holozoans *Capsaspora owczarzaki* and *Monosiga brevicollis* both possess a clear Yki orthologue (Fig. 1a, 1b) as previously shown [34], the absence in ctenophores is clearly derived. However, the situation is in fact more complex given that in the released version of genome-predicted *M. leidyi* proteins, there is a sequence annotated as Yki (here referred to as MleYki-like), which contains a TEAD-binding (TBD) domain and two WW domains. In bilaterians, this secondary structure and the TBD domain itself are unique to Yorkie. The TBD domain predicted from MleYki-like aligns reasonably well with Yorkie TBD domains from various organisms (Fig. 1c) so that primary homology seems likely. However, at least the first WW domain of MleYki-like (“Mle Yki-like a” in Fig. 1a) is clearly more related to WW domains present in Nedd4 proteins, than to the first WW domain of metazoan Yki proteins. The second MleYki-like WW domain (“Mle Yki-like b” in Fig. 1a) is particularly divergent (long branch in Fig. 1a) but also

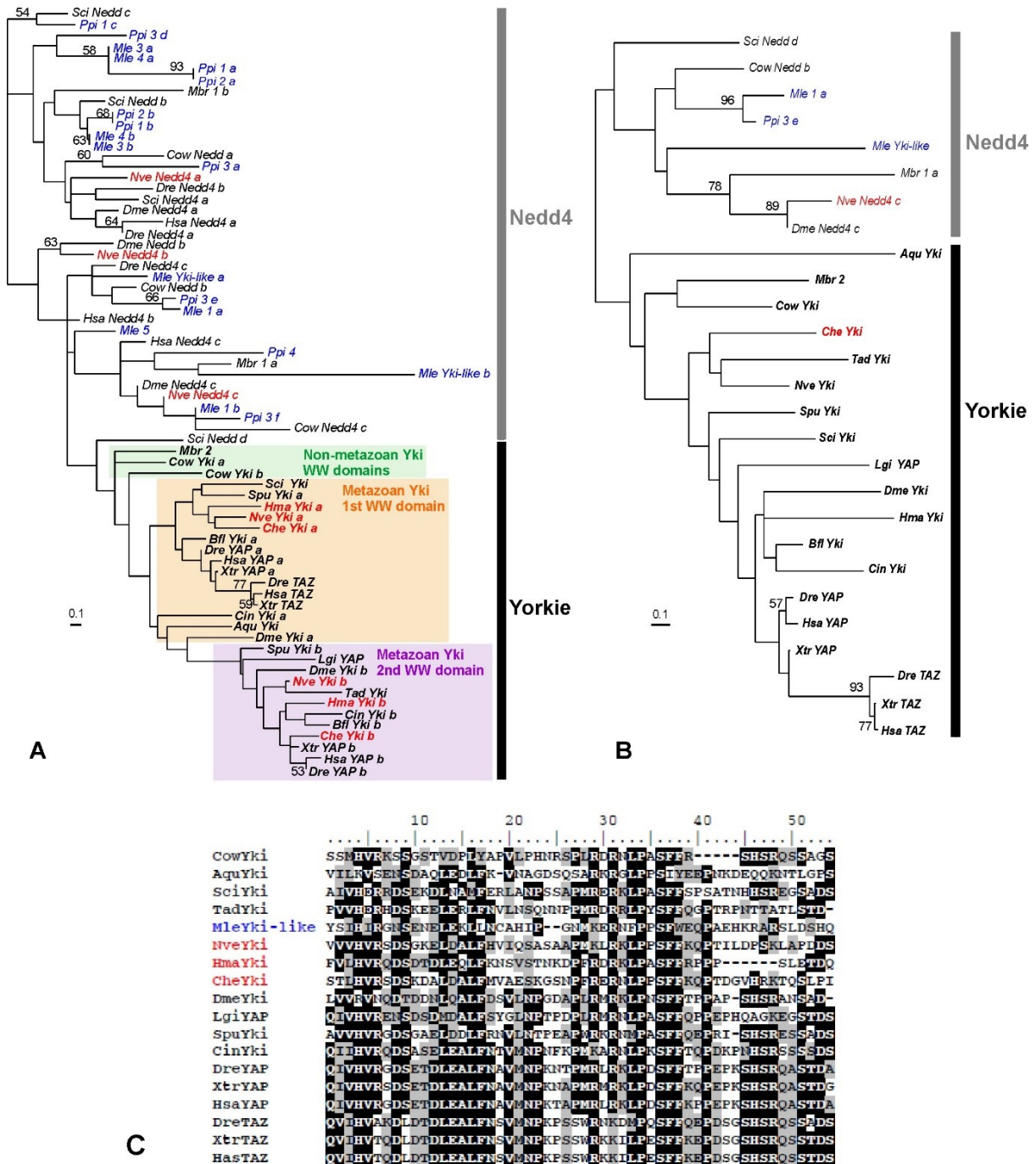


Fig. 1 Rooted phylogenetic analyses of Yorkie sequences. **a** Analysis of aligned WW domains (multiple WW domains of the same protein numbered sequentially with letters: a, b, c, etc.). WW domains of Nedd4 were used to root the tree. **b** Combined analysis of the TBD domain and the two WW domains. In **(a, b)** sequences from ctenophores are in blue and sequences from cnidarians in red; support values are indicated next to the branches when higher than 50%. **c** Alignment of the TBD domains of MleYki-like (in blue) with Yki TBD domains from various organisms (cnidarians in red). Species names are indicated by a three-letter code (see taxonomy in Methods): *Aqu*: *Amphimedon queenslandica*, *Bfl*: *Branchiostoma floridae*, *Cin*: *Ciona intestinalis*, *Cow*: *Capsaspora owczarzakii*, *Dme*: *Drosophila melanogaster*, *Dre*: *Danio rerio*, *Hma*: *Hydra magnipapillata*, *Hsa*: *Homo sapiens*, *Lgi*: *Lottia gigantea*, *Mbr*: *Monosiga brevicollis*, *Nve*: *Nematostella vectensis*, *Sci*: *Sycon ciliatum*, *Spu*: *Strongylocentrotus purpuratus*, *Tad*: *Trichoplax adhaerens*, *Xtr*: *Xenopus tropicalis*. Scale bar: inferred number of substitution per site.

appears nested within Nedd4 WW domains. Curiously, MleYki-like could not be retrieved among *M. leidyi* ESTs available in the NCBI database. Furthermore this protein is absent from our assembly of the *Pleurobrachia pileus* transcriptome, as well as from the published genome of *Pleurobrachia bachei* genome, and it is also missing among the extensive *P. bachei* mRNA data (from all developmental stages including adult) available in Neurobase (<http://neurobase.rc.ufl.edu/pleurobrachia/blast#>).

Outside ctenophores, our analyses identified a Yorkie orthologue in *Hydra magnipapillata* (as in other cnidarians) contrary to Zhu et al. [32]. Other instances of Yki absences in metazoans according to the same study were in fact due to insufficient genome coverage since we could recover Yki orthologues in the tunicate *Oikopleura* and the acarid *Ixodes* (analyses not shown). In addition, there are noteworthy observations emerging from the analysis of the WW domains present in Yki proteins (Fig. 1a). It has been previously stressed that the secondary structure of Yki in the holozoan *Capsaspora* is identical to that of most metazoan Yki, i.e. with the TBD domain and two WW domains [19]. However, our domain analysis shows that the two WW domains of *Capsaspora* Yki are not respectively orthologous to the first and second WW domains of metazoan Yki proteins (Fig. 1a). Therefore, these two WW domains of *Capsaspora* Yki originated from a domain doubling independent from a similar event that gave the secondary structure typical of metazoan Yorkie. In our sampling, three metazoan taxa have instead Yki proteins with a single WW domain, but the tree topology clearly indicate that this corresponds to three convergent events whereby one of the WW domains was lost: in sponges (*A. queenslandica* and *S. ciliatum*) (loss of the second WW domain), in the placozoan *T. adhaerens* (loss of the first WW domain), and in the vertebrate Yki paralogue TAZ (loss of the second WW domain, both domains being present in the other vertebrate paralogue YAP).

Concerning the other Hippo pathway genes, we could identify a clear choanoflagellate Hpo orthologue (see Table 1 and Additional file 2) which was apparently overlooked in a previous study [34]. Reciprocally, our analyses of Sav sequences, which unlike previous studies included outgroups sequences to root the WW domain and combined trees (see Additional file 2 for details), revealed that previous identification of Sav orthologues in the demosponge *Amphimedon queenslandica* and the placozoan *Trichoplax adhaerens* [32, 34] were erroneous, the gene being secondarily lost in both lineages independently (as deduced from the presence of Sav in *M. brevicollis* and in the calcisponge *S. ciliatum*) (Table 1).

Expression of two cyclins and three Hpo pathway genes in a ctenophore cellular conveyor belt

In the tentacle root of the ctenophore *Pleurobrachia pileus*, cyclin B (*PpiCycB*) and the cyclin D paralogue *PpiCycD1* have similar expression patterns. In whole-mount views, staining is seen along the three longitudinal ridges housing the stem cells that continuously provide progenitors of colloblasts (lateral ridges) and tentacle core cells (median ridge) (Fig. 2a, 2c). Examination of transverse cryosections indicate that transcripts of these two genes are restricted to the distal part of these three ridges (Fig. 2b, 2d) and are turned off along the corresponding cellular conveyor belts before entry into the differentiation zone (materialised in the lateral ridges by apparition of a brown pigment in the differentiating colloblasts). These expression patterns are closely similar to those previously published for markers of stem cells and undifferentiated progenitors, namely Piwi, Vasa, Bruno and PL10 [49]. The other cyclin D paralogue *PpiCycD2* is also expressed at the distal extremity of the median ridge (Fig. 2e, 2f, but in the lateral ridges it is only weakly expressed at distal extremity and has maximal expression in an intermediate zone between distal extremity and differentiation zone (Fig. 2f).

We examined the expression in the *P. pileus* tentacle root of three orthologues of vertebrates and fly core Hippo pathway components. *PpiSav* and *PpiSd* are expressed similarly as *PpiCycB* and *PpiCycD1* (and stem cell markers) (Fig. 2i-l), whereas *PpiHpo* transcripts are distributed more alike those of *PpiCycD2* (Fig. 2g, 2h). These patterns are compatible with a possible role of these Hippo pathway genes in controlling cell cycle exit and arrest of cell proliferation in ctenophore, like in bilaterian models.

Expression of two cyclins and four Hpo pathway genes in a cnidarian cellular conveyor belt

In the *C. hemisphaerica* tentacle bulb (the cellular conveyor belt responsible for cell renewal at the base of tentacle) *CheCycB* is expressed in two symmetrical areas located in the proximal half of the tentacle bulb (Fig. 3a). This is where populations of interstitial stem cells have been previously identified, notably based on expression of stem cell marker genes [46, 47, 51]. Transcripts of *CheCycD* show a more extended distribution along the bulb axis, being excluded only from the most distal area

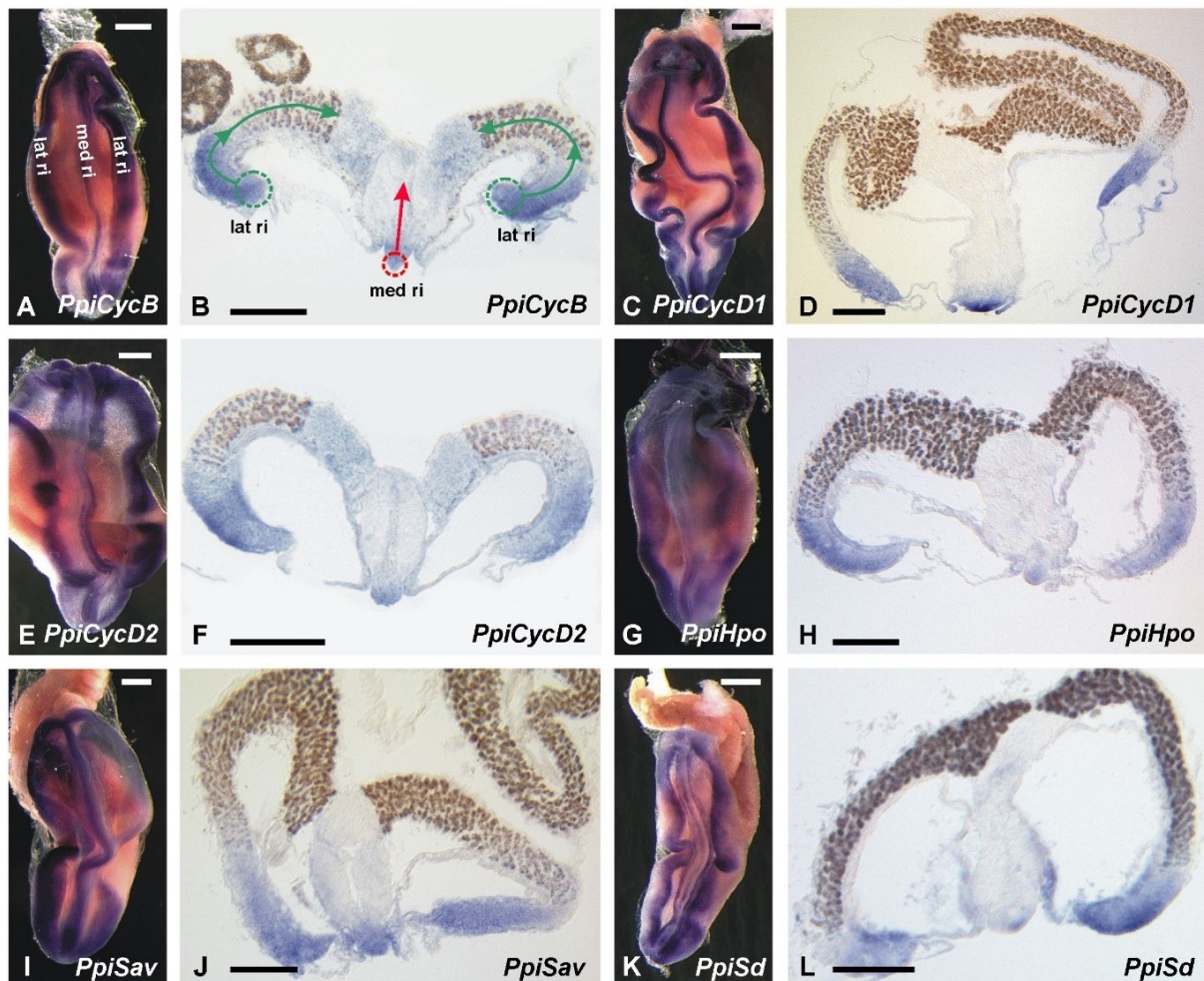


Fig. 2 Expression of (a-b) *PpiCycB*, (c-d) *PpiCycD1*, (e-f) *PpiCycD2*, (g-h) *PpiHpo*, (i-j) *PpiSav*, (k-l) *PpiSd* in the tentacle root of *P. pileus*. (a, c, e, g, i, k) are whole mount views of tentacle root (internal side) and (b, d, f, h, j, l) are transverse cryosection towards the middle of the tentacle root (internal side on the bottom). In (b), dotted line circles indicate the position of stem cells (in green: ectodermal stem cells of the lateral ridges, in red: mesogleal stem cells of the median ridge) as described in previous studies [48, 49]. Arrows materialise the displacement of cells along the ectodermal (green) and mesogleal (red) cellular conveyor belts. Note that the brown colour in (b, d, f, h, j, l) corresponds to a pigment that appears in the cytoplasm of colloblasts during their differentiation. *lat ri* lateral ridge, *med ri* median ridge. Scale bars: 100 μ m.

of nematogenic ectoderm (Fig. 3b). This might reflect maintenance of cyclin D expression after cell cycle exit and during differentiation in *C. hemisphaerica*, which would be reminiscent of the maintained expression of *Cycin D3* (unlike the other cyclins) during differentiation in the context of spermatogenesis in mammals [57].

The *C. hemisphaerica* homologues of Hippo pathway genes investigated here show expression features very different from those of cyclins in the tentacle bulb. Indeed *CheHpo* (Fig. 3c) and *CheSav* (Fig. 3d) transcripts were detected not only throughout the tentacle bulb nematogenic ectoderm, but

also at strong level in the mature tentacle. This is also true for *CheYki* albeit with lower HIS signal in the tentacle (Fig. 3e). *CheSd* displays strongest expression in the nematogenic ectoderm of proximal two-thirds of the bulb, with weaker but detectable expression in the bulb tip and the tentacle as well (Fig. 3f). Outside from the tentacular system, these four genes appear to be more or less ubiquitously expressed throughout the medusa (Additional file 3).

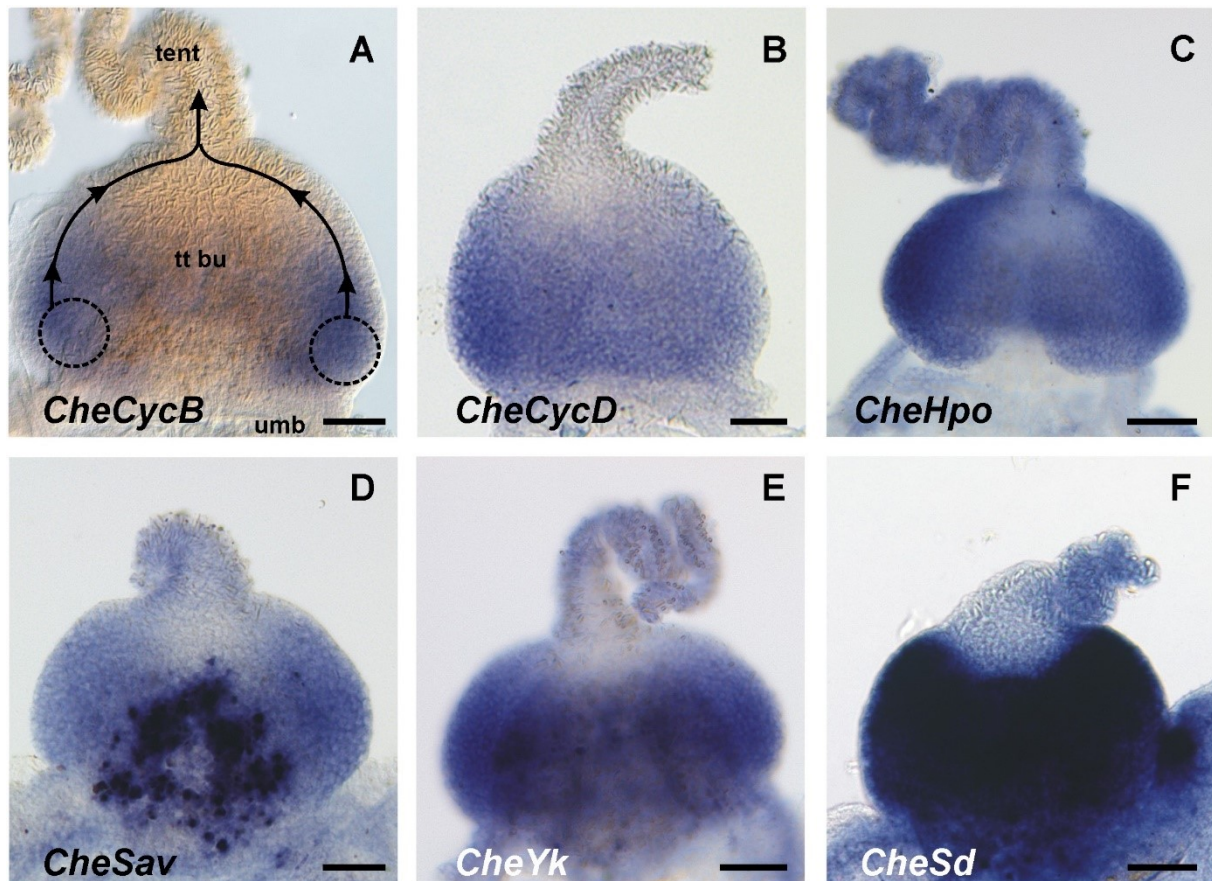


Fig. 3 Expression of (a) *CheCycB*, (b) *CheCycD*, (c) *CheHpo*, (d) *CheSav*, (e) *CheYki* and (f) *CheSd* in the tentacle bulb of the *C. hemisphaerica* medusa. In (a), dotted line circles indicate the position of stem cells as described in previous studies [46, 51] and arrows materialise the displacement of cells along the cellular conveyor belt of the bulb ectoderm. *tent* tentacle, *tt bu* tentacle bulb, *umb* periphery of the umbrella. Scale bars: 50 μm .

Immunolocalisation of Yorkie in the *C. hemisphaerica* medusa

We designed an antibody specifically targeting the *C. hemisphaerica* Yorkie protein (see antibody validation in Additional file 4). In bilaterians, Yorkie is translocated into the nucleus when the Hippo pathway is inactive, whereas this protein is cytoplasmic if the pathway is active (see Background). We used this antibody to look for differences in subcellular localisation of the Yorkie protein within

medusa tissues. Since we know that cellular proliferation is restricted to specific areas of the medusa, this offers the opportunity of comparing the localisation of Yorkie in highly proliferative tissues vs. non proliferative ones. Prior to fixation and treatment with the anti-Yorkie antibody, living medusae were incubated during 2 hours with the thymidine analogue EdU in order to label replicating nuclei; before observation all nuclei were in addition stained using Dapi.

A first important observation is that anti-Yorkie immunofluorescence was detected in all tissues throughout the medusa body (but not in all cells), in consistence with *in situ* hybridisation showing ubiquitous expression of *CheYki* in the medusa. The characteristics of the anti-Yorkie staining are as expected. When present it is localised either in the nucleus, or in the cytoplasm, or in both (see examples on Figs. 4f, 4j, 5i, 5p and the graphs of Figs. 4k, 4l, 5q, 5r). As visible in Fig. 4f and Additional file 7, nuclei with and without Yorkie are sometimes observed in neighbouring cells of the same tissue.

We observed spectacular correlation at the tissue level, in terms of Yorkie predominantly nuclear vs. cytoplasmic localisation, when comparing proliferative and non proliferative areas of the medusa. In the tentacle bulb ectoderm, EdU was incorporated in many nuclei of the proximal two-thirds, whereas no EdU positive nuclei were detected in the upper bulb ectoderm and tentacle (Fig. 4a, 4b), in consistence with previously-published data [46]. In the proliferative zone of the tentacle bulb ectoderm, many nuclei contained anti-Yorkie immunofluorescence (Fig. 4a, 4b, 4e, 4f). In contrast, in the distal-most part of the bulb and in the tentacle ectoderm, the Yorkie protein was not detected in nuclei but many cells harboured strong cytoplasmic signal. Rather unexpectedly, this signal appears to be associated with the capsule (nematocyst) of nematocysts (area boxed in red in Fig. 4b; detailed view in Fig. 4i, 4j) (see also movie of confocal Z-section of the tentacle bulb in Additional file 5). The correlation was even more impressive in the epithelium of the exumbrella. After a 2 hours pulse, many EdU-labelled nuclei were observed in the peripheral region of this epithelium (*z per* in Fig. 5b), whereas positive nuclei were almost absent from the rest of the exumbrella (*z cen* in Fig. 5b; see Dapi counter-staining in Fig. 5a). This observation indicates that this epithelium grows by peripheral extension, and suggests that the exumbrella behaves as a centripetal cellular conveyor belt. Throughout the non-proliferative exumbrella epithelium, anti-Yorkie immunofluorescence when present was detected in vast majority in cell cytoplasm (Fig. 5c–i, 5q) (with exceptional weak staining in nuclei, see bottom-right corner of Fig. 5c–e). By contrast in the peripheral, proliferative epithelium of the exumbrella, the anti-Yorkie signal localised exclusively to the cell nuclei (Fig. 5j–p,

5r). Curiously, the Yorkie protein behaves differently in the subumbrellar epithelium (Additional file 6). Here, all positive cells have Yorkie in the nuclei, and such nuclei are present throughout the epithelium whereas EdU-labelled nuclei are mostly concentrated close to the radial canals. In the manubrium, cell proliferation does not seem to be particularly localised, and cells with Yorkie in the nucleus, in the cytoplasm or both are mixed up throughout the manubrium ectoderm (Additional file 7).

Fig. 4 Immunolocalisation of Yorkie and EdU labelling of proliferative nuclei in the *C. hemisphaerica* tentacle bulb. **a** Confocal longitudinal section of the whole tentacle bulb and base of tentacle, showing anti-Yki (red) and EdU (green) staining. **b** Same section as in **(a)** with Dapi staining of nuclei (blue) added. White asterisks in **(a-b)** correspond to artefacts or an unknown cell type. **c-f** higher magnification view of the area boxed in green in **(b)**, showing Dapi **(c)**, EdU **(d)** and anti-Yki **(e)** staining. **f** Combination of the three signals (anti-Yki in red, Dapi in blue, EdU in green). **g-j** higher magnification view of the area boxed in red in **(b)**, showing Dapi **(g)**, EdU **(h)** and anti-Yki **(i)** staining; **(j)** combination of the three signals (anti-Yki in red, Dapi in blue, EdU in green). The structure visible in **(i)** and coloured in red in **(j)** is a nematocyst. **k** Graph of fluorescence intensity for Dapi, EdU and anti-Yki (see legend on the right) along the yellow arrow in **(f)**. **l** Graph of fluorescence intensity for Dapi,

EdU and anti-Yki (see legend on the left) along the yellow arrow in (j). *tent* tentacle, *tt bu* tentacle bulb. Scale bars: (a-b) 20 μ m, (c-f) 5 μ m, (g-j) 10 μ m.

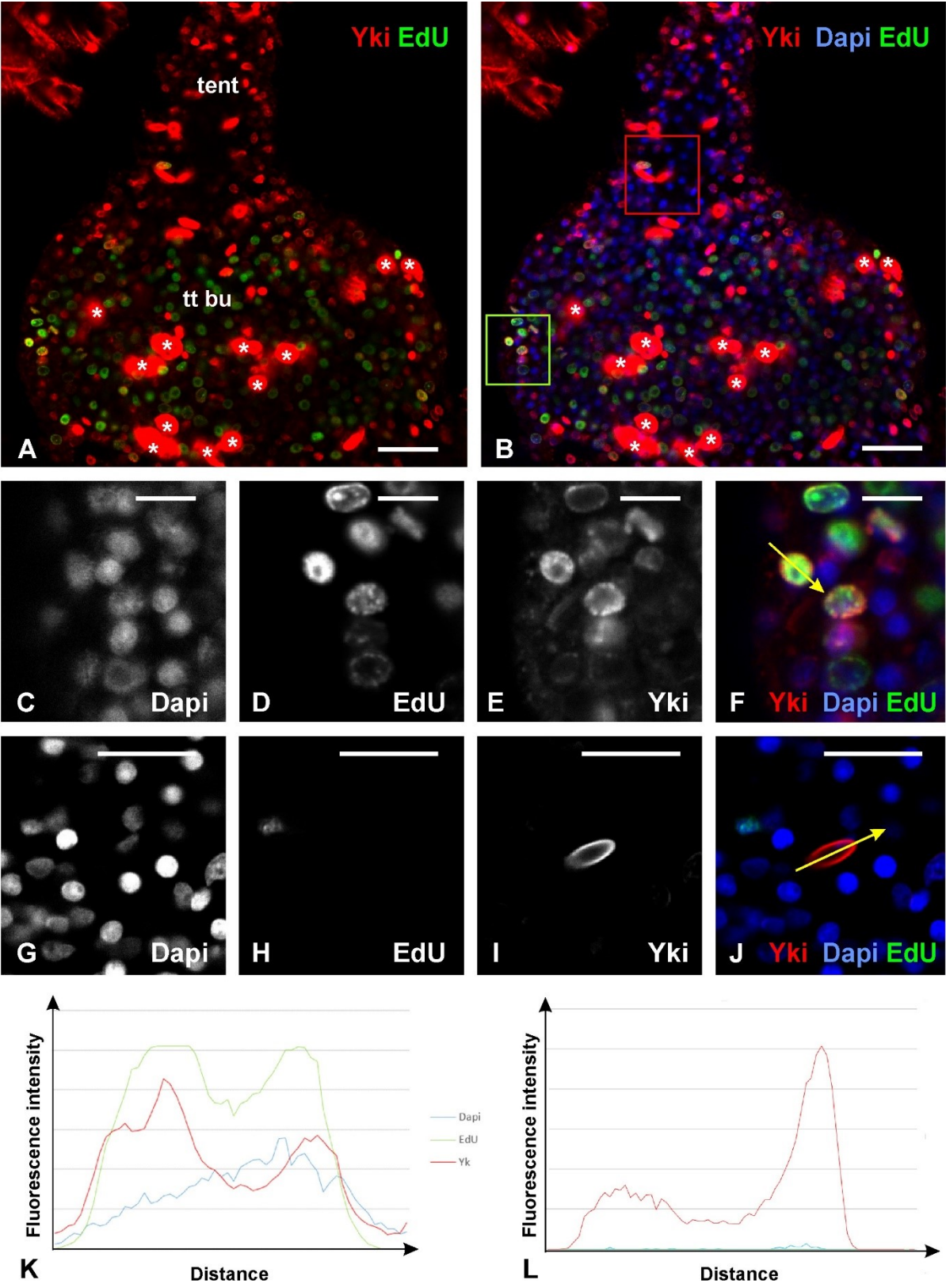
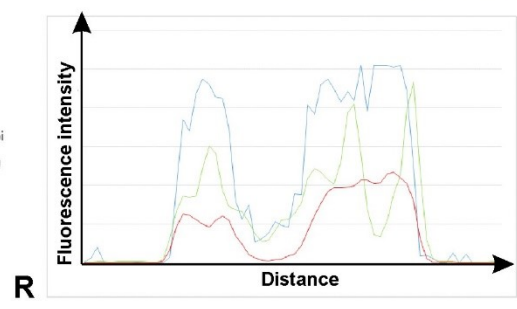
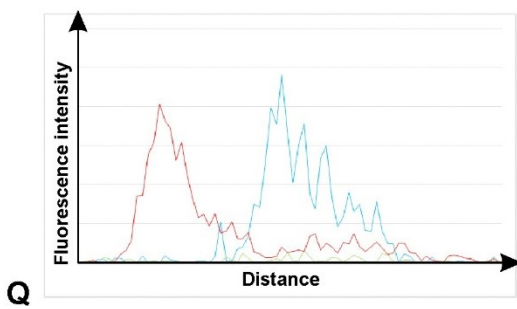
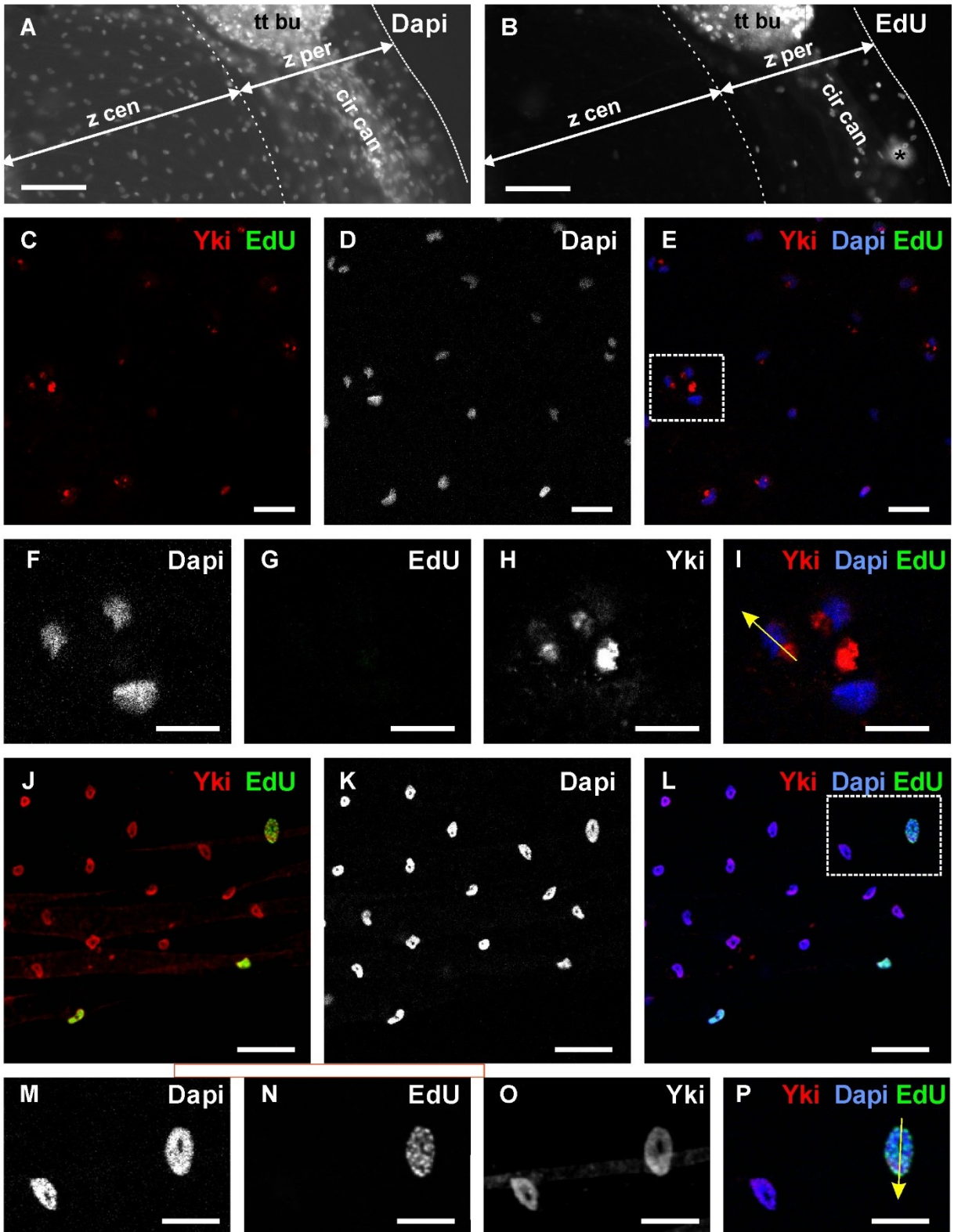


Fig. 5 Immunolocalisation of Yorkie and EdU labelling of proliferative nuclei in the *C. hemisphaerica* exumbrellar epidermis. **a** Partial view of Dapi-stained medusa; focus on the exumbrellar epidermis. **b** EdU counterstaining (following 2 hour pulse) in the same medusa. *cir can* circular endodermal canal; *tt bu* tentacle bulb; *z cen* central region of the exumbrellar epidermis; *z per* peripheral region of the exumbrellar epidermis. The asterisk in **(b)** corresponds to an artefact. **c-e** Detailed view of the central area of the exumbrellar epidermis (*z cen* in **a-b**) with anti-Yki (red in **c, e**), EdU (green in **c, e**) and Dapi (white in **d**; blue in **e**) staining. **f-i** Higher magnification view of the area boxed with dotted line in **(e)**, showing Dapi (**f**), EdU (**g**) and anti-Yki (**h**) staining; **(i)** combination of the three signals (anti-Yki in red, Dapi in blue, EdU in green). **j-l** Detailed view of the peripheral area of the exumbrellar epidermis (*z per* in **a-b**) with anti-Yki (red in **j, l**), EdU (green in **j, l**) and Dapi (white in **k**; blue in **l**) staining. **m-p** Higher magnification view of the area boxed with dotted line in **(l)**, showing Dapi (**m**), EdU (**n**) and anti-Yki (**o**) staining; **(p)** combination of the three signals (anti-Yki in red, Dapi in blue, EdU in green).

q Graph of fluorescence intensity for Dapi, EdU and anti-Yki (see legend on the right) along the yellow arrow in **(i)**. **r** Graph of fluorescence intensity for Dapi, EdU and anti-Yki (see legend on the left) along the yellow arrow in **(p)**. Scale bars: (a-b) 50 μm , (c-h) 20 μm , (i-p) 10 μm .



Discussion

Loss of Yorkie in ctenophores?

The Yki protein is highly conserved at deep evolutionary level and the absence of a clear Yki orthologue in ctenophore genomes reported here is unprecedented among metazoans. Indeed, previous reports of Yki losses in several organisms (hydra, the tunicate *Oikopleura*, amphioxus, the acarian *Ixodes scapularis*; [32, 33]) were in fact due to insufficient genome coverage and Yki orthologues were later recovered from these genomes ([33] for amphioxus; this study for hydra, *Ixodes* and *Oikopleura*). For ctenophores we currently have two genomes and extensive transcriptome data for several other species [38, 39] so that it seems unlikely that a typical Yki orthologue would have been overlooked. The presence of Yki orthologues in *Capsaspora*, choanoflagellates and sponges (Fig. 1) implies that the situation in ctenophores is derived and thus, incidentally, has no bearing on the presently hotly debated phylogenetic position of ctenophores with respect to other early-diverging metazoan lineages.

The enigmatic sequence called MleYki-like in Fig. 1a–c might have originated from a recombination of domains, between the TBD domain of an ancestral Yki protein and WW domains from an ancestral Nedd4 protein. If this scenario is true, then MleYki-like could perhaps be functionally equivalent to Yki even if not being a Yki orthologue in the strict phylogenetic sense. However, this gene from the *M. leidy* genome assembly has apparently no counterpart in the *P. bachei* genome, and no corresponding sequence could be detected in *P. bachei* RNAseq data, *P. pileus* transcriptome assembly, and NCBI *M. leidy* ESTs. Thus it is at present unclear whether MleYki-like corresponds to a real and functional ctenophore protein. Alternatively, it could be the result of an assembly error, a pseudogene, or a contaminant from another organism.

The apparent absence of a Yki orthologue in ctenophores is particularly puzzling in light of the presence of well-conserved orthologues of all other core Hippo pathway genes (Hpo, Sav, Mats, Warts, and the transcription factor Sd). In addition, Hpo, Sav and Sd are expressed along both cellular conveyor belts of the ctenophore tentacle root in the proliferation zone and turned off in the early differentiation zone, consistent with an involvement of activated Hippo pathway in the arrest of cell proliferation and engagement in differentiation like in mammals and fly [2, 4, 5]. In these bilaterian

models, the Hippo pathway regulates cell proliferation mainly by modulating the subcellular localisation of Yorkie. Intriguingly, the large majority of residues that are involved in Sd binding with nuclear Yorkie [58] are conserved in ctenophore Sd (data not shown). These molecular interactions were already established in a common ancestor of metazoans and *Capsaspora* [34]. A hypothesis that would be worse testing in future studies could be maintenance of a functional Hippo pathway regulating cell proliferation through Sd in ctenophores, despite replacement of Yki by an alternative co-activator (the Yki-like protein mentioned above, or another one to be uncovered). Ctenophores are highly derived metazoans at the anatomical level [47, 59]. Lack of a typical Yorkie, whereas other Hippo pathway genes are present, adds to several emerging lines of evidence pointing to equally eccentric characteristics for this phylum at the level of molecular biology (e.g. very unusual features of the mitochondrial genome, [60, 61]; high amino-acid replacement rate in nuclear proteins, [38, 42]; presence of a paralogue of muscular myosin heavy chain II with non-muscular expression, [50]).

Diverging expression characteristics of Hpo, Sav and Sd in ctenophore vs. cnidarian cellular conveyor belts

The tentacle root of the ctenophore *P. pileus* and the tentacle bulb of the hydrozoan cnidarian *C. hemisphaerica* are analogous systems both providing differentiating cells at an intense rate for the continuously growing tentacle, and both with localised stem cells furnishing daughter cells that proliferate and differentiate along ordered cellular conveyor belts. However, in ctenophore, transcripts of the Hpo, Sav and Sd genes are detected only in the proliferation zone (as previously characterised by Alié et al. [49]) along conveyor belts of the tentacle root (Fig. 2g–l), whereas these genes are expressed along the whole proximo-distal axis of the tentacle bulb of *C. hemisphaerica* (Fig. 3c, 3d, 3f). They remain expressed in the medusa tentacles, where there is no cell division and only fully differentiated cells. This necessarily implies different regulatory logics for these genes in cellular lineages of ctenophore vs. hydrozoan medusa (with repression of Hpo, Sav and Sd in differentiating cells of the former but not of the later). Nevertheless, ubiquitous expression of these genes along the *C. hemisphaerica* conveyor belt does not preclude a role for the Hippo pathway in this system in regulating the equilibrium between proliferating progenitors and cells exiting the cell cycle to undergo differentiation (and ultimately, size of the tentacle bulb and the rhythm of tentacle growth). Indeed we know from functional studies in mammals and fly that the molecular functions of Hpo and Sd are principally regulated at the post-transcriptional level (through phosphorylation for the former, and through binding to co-activator for the latter), so that these proteins can lead to

drastically different functional outputs in different cell populations even with similar levels of transcription at the gene level.

Nuclear vs. cytoplasmic Yorkie in the medusa correlates with the proliferative capacity of tissues

This is furthermore well illustrated by the behaviour of *C. hemisphaerica* Yki at the transcript vs. protein levels. In the medusa, *in situ* hybridisation revealed ubiquitous distribution of Yki transcripts (Fig. 3e, Additional file 3). In bilaterians, Yki expression is instead restricted to stem cells and proliferating progenitors in some systems (e.g., in the mammalian intestinal crypts [1] and the developing mouse forebrain [62]), but in other systems, Yki expression is maintained in post-mitotic cells, with several reported instances of important functions of cytoplasmic Yki (e.g., regulation of cell fate in fly retinal photoreceptors [63]; see below for additional Yki cytoplasmic functions). Likewise in the planarian *Schmidtea mediterranea*, Yki expression is ubiquitous rather than restricted to the totipotent neoblasts [36]. When turning to the subcellular distribution of the Yki protein in the *C. hemisphaerica* medusa, it appears that some cells have Yki in the nucleus, others in the cytoplasm, or in both the nucleus and cytoplasm, and this is reminiscent of the behaviour of Yki in mammals and fly, where post-transcriptional regulation affecting the localisation of Yki is critical to the control of proliferating activity by this protein.

Previous studies using heterologous expression in *Drosophila* of transgenic Yki and Sd from various organisms (including *Capsaspora* and *Monosiga*) have revealed the ancient origin of a mechanism by which Yki regulates cell proliferation and organ size through binding with Sd [19, 34]. The present contribution provides the first direct evidence in a non-bilaterian animal of a link between nuclear vs. cytoplasmic localisation of Yki, and the propensity of a tissue to undergo cellular proliferation. This represents a powerful additional line of evidence that promotion of cell proliferation by nuclear Yki is a fundamental and ancient mechanism in animal biology, which predated the origin of the Bilateria. Incidentally, a corollary is that negative regulation of proliferation by Yki as reported in the flatworm *Schmidtea mediterranea* [36] (unlike the other flatworm *Macrostomum lignano* [35]) is certainly a derived situation reflecting changes in the molecular mechanisms of stem cell and proliferation control in this particular lineage of the Platyhelminthes.

The correlation between Yki subcellular localisation and levels of cell proliferation in tissues is clear in the *C. hemisphaerica* tentacle bulb, with Yki-positive nuclei restricted to the proliferation zone in the basal half, whereas in the distal bulb portion and in the tentacle, Yki immunoreactivity is exclusively seen in cell cytoplasm (Fig. 4). A similar situation is observed in the medusa exumbrellar epidermis, with Yki in nuclei in the peripheral zone (where EdU was found incorporated in numerous nuclei following a 2 h pulse), but in the cytoplasm in the rest of the exumbrella (no EdU incorporation) (Fig. 5). Thus the behaviour of Yki in the tentacle bulb and exumbrella of *C. hemisphaerica* closely resembles that previously characterised for Yki with respect to EdU staining in a bilaterian cellular conveyor belt (vertebrate embryonic lens, [63]). Additional experimental work is required to confirm if as suggested by these observations, Yki in cnidarians like its bilaterian counterparts play a role in promoting cell division, possibly through binding to Sd, and if transfer of Yki to the cytoplasm is mediated by phosphorylation when the Hippo pathway is activated, thereby promoting cell cycle exit. Rather intriguingly, unlike the situation in the exumbrella and tentacle bulb, nuclear Yki was observed throughout the subumbrellar epidermis (no Yki immunoreactivity in cytoplasm) whereas cell proliferation (monitored by EdU incorporation) seems restricted to the vicinity of the radial canals (Additional file 6). Thus the control of epithelial growth in the two faces (oral and aboral) of the medusa seems to obey different regulatory mechanisms. This is not so surprising since in bilaterians, it is known that the Hippo pathway can have different outputs depending on the cell context [2]. For example, the mammalian Yki paralogue YAP does not promote proliferation of progenitors in the hematopoietic system and in the heart, unlike in most other embryonic and adult cell renewal systems.

A rather unexpected additional finding was that in differentiated nematocytes of the medusa tentacles, the Yki protein localises to nematocysts (the capsules housing the coiled tubule of nematocytes) (Fig. 4j). This observation is suggestive of a specific role of cytoplasmic Yki in nematocytes. There are substantial indications in bilaterians that Yki activity is not limited to its transcriptional co-activator role in the nucleus but that there are also cytoplasmic functions of Yki [12]. In developing and adult epithelial airways a nuclear to cytoplasmic shift in Yap localisation is crucial for Sox2 expression and the specification and differentiation of epithelial progenitors [30]. Moreover, mammalian cytoplasmic YAP can have an important role in cell adhesion and polarity [31]. For example, YAP forms a complex with polarity complex proteins Crb, Pals1 and Patj at the apical side of cells [64]. Accumulation of cytoplasmic YAP was observed at the apical extremity of differentiated lens cells [63], and it was proposed that YAP could structurally stabilise assembled apical polarity complex proteins at epithelial cell apical junctions. In addition, the other mammalian

Yki paralogue TAZ is known to interact with cilia-related proteins and double mutants of this gene develop polycystic kidneys [12]. Cytoplasmic YAP and TAZ also play an important role in regulating β -catenin [65]. We therefore hypothesise that cytoplasmic Yki acquired a novel role during cnidarian evolution in the context of the specialised capsule (nematocyst) of nematocytes.

Conclusions

In this study we obtained the first indirect evidence for a conserved role of the Hippo pathway in regulation of cell proliferation and growth in a ctenophore and a cnidarian. The co-activator Yki has been secondarily lost or uniquely modified through protein domain recombination in ctenophores, implying substantial changes in the protein interactions that mediate Hippo inputs in this particular non-bilaterian lineage. In the medusa of the cnidarian *C. hemisphaerica*, nuclear localisation of Yki strongly correlates with areas of intense cellular proliferation, at least in the tentacle bulb and in the exumbrellar epidermis. This finding strengthens the hypothesis of an ancient role of Yki switches from the nucleus to the cytoplasm in the arrest of cell proliferation and initiation of differentiation.

The perspectives for further experimental work are manifold. It would be desirable to describe the distribution of Yki in nuclei vs. cytoplasm in other life stages of *C. hemisphaerica* (embryonic development, planula larva, polyp colony) using the anti-CheYki antibody designed in this study. In addition to monitoring areas of cell division with EdU as in the present work, it would also be of interest to look for a link between Yki localisation and apoptosis, since in bilaterians nuclear Yki not only promote cell division but also inhibits apoptosis [66]. Drugs affecting the Hpo pathway would be extremely useful to better understanding its functions (notably with respect to organ size), especially since tools to inactivate or upregulate specific genes in *P. pileus* or in the *C. hemisphaerica* adults (polyps and medusae) are not yet established. In fly and mammals systems, involvement of the Hippo pathway and Yki in regulation of organ size is under control of the membrane proteins Fat and Ds [2, 4], with polarised gradient of Ds expression along the organ axis being thought to be a particularly important cue [6]. It would therefore be interesting to investigate the expression and function of their homologues in *C. hemisphaerica* (and *P. pileus*) and correlatively, the potential links between the Hippo pathway and planar cell polarity. Possible cross-talks between the Hpo pathway and other signalling pathways such as the Insuline/IGF, Wnt and Notch pathways (abundantly

documented in bilaterians [12, 67]) would also be very much worse investigating in cnidarians and ctenophores.

Additional files (Fournis en Annexe, page 307)

Additional file 1: Alignments used to build the trees. All alignments are given in Fasta format.

Additional file 2: Phylogenetic analysis of Cyclins and core Hippo pathway genes (other than Yorkie). Maximum likelihood trees are shown for Cyclins (page 2), Sav WW domains (page 4), Sav combined WW and SARA domains (page 5), Hippo (page 6), Warts (page 7), Mats (page 8) and Sd (page 9).

Additional file 4: Validation of the anti-CheYorkie antibody by Western-blot. Lanes 1 and 2: equivalent total protein extracts from *C. hemisphaerica* medusae, after electrophoresis, transfer onto nitrocellulose membrane, and Ponceau red staining. Lane 3: the nitrocellulose membrane of lane 1 was incubated with antiserum against CheYorkie (see Methods for the revelation procedure). The three bands around 38 Kd can be interpreted as different phosphorylation states of the CheYorkie protein (the composition of the lysate solution allows for conservation of phosphorylations). The size of the predicted CheYorkie protein (based on the corresponding contig in the transcriptome assembly) is 351 amino-acid, corresponding to about $351 \times 110 = 38.61$ Kd. Lane 4: the nitrocellulose membrane of lane 2 was incubated with preimmune serum (negative control).

Additional file 5: Movie showing confocal Z-sections of a *C. hemisphaerica* medusa tentacle bulb. The preparation was stained with anti-Yorkie antibody (red), EdU (2-hours pulse; green) and Dapi (blue).

Additional file 6: Anti-Yorkie immunoreactivity in the *C. hemisphaerica* sub-umbrellar epidermis. The three pictures are focused on the sub-umbrella. *rad can*: radial canal; *tent*: tentacle (superimposed). (A) and (B) are conventional epifluorescence microscopy views; (C) is a confocal section.

Additional file 7: Anti-Yorkie immunoreactivity in the *C. hemisphaerica* manubrium. Confocal section in the manubrium epidermis, with graphs of Dapi and anti-Yorkie immunofluorescence according to the four coloured arrows on the picture.

Abbreviations

BSA: bovine serum albumin; Dapi: 4',6-diamidino-2-phenylindole; DIC: differential interference contrast; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; EdU: 5-ethynyl-2-deoxyuridine; EST: expressed sequence tag; Hpo: Hippo; ISH: *in situ* hybridisation; ML: maximum likelihood; PBS: phosphate-buffered saline; PBT: phosphate-buffered saline with tween; PFA: paraformaldehyde; RNAseq: RNA sequencing; Sav: Salvador; Sd: Scalloped; SDS: sodium dodecyl sulfate; TBD: TEAD-binding domain; TBS: tris-buffered saline; Yki: Yorkie.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MM and AC designed the study. AC, MJ and MM collected *P. pileus* specimens. AC conducted the phylogenetic analyses (with the help of MM) and performed *in situ* hybridisation, cryo-sectioning, cell proliferation assays and immunofluorescence (with help from MJ). JPC and MJ performed anti-Yorkie antibody validation. AC and MM analysed the data. MM wrote the paper. All authors have read, revised and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the director and staff of the “Station Biologique” in Roscoff (France), notably Gilles Maron and Laurent Lévêque for their help in animal collection. The initiation of this project resulted from stimulating discussions with Franck Bourrat. We thank Karen Pottin for useful technical advice concerning cryo-sectioning. We are grateful to Hervé Le Guyader for insightful comments on a previous version of the manuscript. This work was supported by a grant from the “Agence Nationale de la Recherche” ANR-09-BLAN-0236-01 DiploDevo and a grant by the COMUE Sorbonne Universités “INDIBIO” (Convergence program).

Author details

¹Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UMR 7138 Evolution Paris-Seine UPMC CNRS, Case 05, 4^{ème} étage, Bâtiment A, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France.

References

1. Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R et al. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr Biol.* 2007;17:2054–60.
2. Badouel C, Garg A, McNeill H. Herding Hippos: regulating growth in flies and man. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:837–43.
3. Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell.* 2010;19:491–505.
4. Liu H., Jiang D, Chi F, Zhao B. The Hippo pathway regulates stem cell proliferation, self-renewal, and differentiation. *Protein Cell.* 2012;3:291–304.
5. Hiemer SE, Varelas X. Stem cell regulation by the Hippo pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830:2323–34.
6. Sun G, Irvine KD. Control of growth during regeneration. *Curr Top Dev Biol.* 2014;108:95–120.
7. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell.* 2005;122:421–34.
8. Kango-Singh M, Singh A. Regulation of organ size: insights from the *Drosophila* Hippo signaling pathway. *Dev Dyn.* 2009;238: 1627–37.
9. Enderle L, McNeill H. Hippo gains weight: added insights and complexity to pathway control. *Sci Signal.* 2013;6:re7.
10. Song H, Mak KK, Topol L, Yun K, Garrett L, Chen Y et al. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:1431–36.
11. Lee KP, Lee JH, Kim TS, Kim TH, Park HD, Byun JS et al. The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:8248–53.
12. Kodaka M, Hata Y. The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72:285–306.
13. Varelas X, Miller BW, Sopko R, Song S, Gregorieff A, Fellouse FA et al. The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell.* 2010a;18:579–91.
14. Varelas X, Wrana JL. Coordinating developmental signaling: novel roles for the Hippo pathway. *Trends Cell Biol.* 2012;22:88–96.
15. Goulev Y, Fauny JD, Gonzalez-Marti B, Flagiello D, Silber J, Zider A. SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr Biol.* 2008;18:435–41.
16. Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell.* 2008;14:388–98.
17. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 2008;22:1962–71.
18. Zhang X, Milton CC, Humbert PO, Harvey KF. Transcriptional output of the Salvador/warts/hippo pathway is controlled in distinct fashions in *Drosophila melanogaster* and mammalian cell lines. *Cancer Res.* 2009;69:6033–41.
19. Ikmi A, Gaertner B, Seidel C, Srivastava M, Zeitlinger J, Gibson MC. Molecular evolution of the Yap/Yorkie proto-oncogene and elucidation of its core transcriptional program. *Mol Biol Evol* 2014;31:1375–90.
20. Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with Salvador and warts. *Cell.* 2003;114:445–56.

21. Wei X, Shimizu T, Lai ZC. Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *EMBO J*. 2007;26:1772–81.
22. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev*. 2010;24:862–74.
23. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*. 2007;21:2747–61.
24. Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell*. 2007;130:1120–33.
25. Hao Y, Chun A, Cheung K, Rashidi B, Yang X. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem*. 2008;283:5496–509.
26. Oh H, Irvine KD. In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Development*. 2008;135:1081–88.
27. Ren F, Zhang L, Jiang J. Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Dev Biol*. 2010;337:303–12.
28. Lee JH, Kim TS, Yang TH, Koo BK, Oh SP, Lee KP et al. A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse. *EMBO J*. 2008;27:1231–42.
29. Reddy BV, Rauskolb C, Irvine KD. Influence of fat-hippo and notch signaling on the proliferation and differentiation of *Drosophila* optic neuroepithelia. *Development*. 2010;137:2397–408.
30. Mahoney JE, Mori M, Szymaniak AD, Varelas X, Cardoso WV. The hippo pathway effector Yap controls patterning and differentiation of airway epithelial progenitors. *Dev Cell*. 2014;30:137–50.
31. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*. 2014;141:1614–26.
32. Zhu H, Zhou Z, Wang D, Liu W, Zhu H. Hippo pathway genes developed varied exon numbers and coevolved functional domains in metazoans for species specific growth control. *BMC Evol Biol*. 2013;13:76.
33. Hilman D, Gat U. The evolutionary history of YAP and the Hippo/YAP pathway. *Mol Biol Evol*. 2011;28:2403–17.
34. Seb e-Pedr os A, Zheng Y, Ruiz-Trillo I, Pan D. Premetazoan origin of the Hippo signaling pathway. *Cell Reports*. 2012;1:13–20.
35. Demircan T, Berezikov E. The Hippo pathway regulates stem cells during homeostasis and regeneration of the flatworm *Macrostomum lignano*. *Stem Cells Dev*. 2013;22:2174–85.
36. Lin AYT, Pearson BJ. Planarian yorkie/YAP functions to integrate adult stem cell proliferation, organ homeostasis and maintenance of axial patterning. *Development*. 2014;141:1197–208.
37. Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA et al. Broad phylogenetic sampling improves the resolution of the animal tree of life. *Nature*. 2008;452:745–49.
38. Ryan JF, Pang K, Schnitzler CE, Nguyen, A-D, Moreland RT, Simmons DK et al. The genome of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and its implications for cell type evolution. *Science*. 2013;342:1242592.
39. Moroz LL, Kocot KM, Citarella MR, Dosung S, Norekian TP, Povolotskaya IS et al. The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems. *Nature*. 2014;510:109–114.
40. Whelan NV, Kocot KM, Moroz LL, Halanych KM. Error, signal, and the placement of *Ctenophora* sister to all other animals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:5773–78.
41. Pick KS, Philippe H, Schreiber F, Erpenbeck D, Jackson DJ, Wrede P et al. Improved phylogenomic taxon sampling noticeably affects non-bilaterian relationships. *Mol Biol Evol*. 2010;27:1983–87.

42. Philippe H, Derelle R, Lopez P, Pick K, Borchiellini C, Boury-Esnault N et al. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr Biol*. 2009;19:706–12.
43. Philippe H, Brinkmann H, Lavrov DV, Littlewood DTJ, Manuel M, Wörheide G, Baurain D. Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough. *PLoS Biol*. 2011;9:e1000602.
44. Nosenko T, Schreiber F, Adamska M, Adamski M, Eitel M, Hammel J et al. Deep metazoan phylogeny: when different genes tell different stories. *Mol Phylogenet Evol*. 2013;67:223–33.
45. Devès M, Bourrat F. Transcriptional mechanisms of developmental cell cycle arrest: problems and models. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23:290–97.
46. Denker E, Manuel M, Leclère L, Le Guyader H, Rabet N. Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria). *Dev Biol*. 2008;315:99–113.
47. Jager M, Quéinnec E, Le Guyader H, Manuel M. Multiple Sox genes are expressed in stem cells or in differentiating neuro-sensory cells in the hydrozoan *Clytia hemisphaerica*. *Evo Devo*. 2011;2:12.
48. Jager M, Dayraud C, Mialot A, Quéinnec E, Le Guyader H, Manuel M. Evidence for involvement of Wnt signalling in body polarities, cell proliferation, and the neurosensory system in an adult ctenophore. *PLOS ONE*. 2013;8:e84363.
49. Alié A, Leclère L, Jager M, Dayraud C, Chang P, Le Guyader H et al. Somatic stem cells express Piwi and Vasa genes in an adult ctenophore : ancient association of « germline genes » with stemness. *Dev Biol*. 2011;350:183–97.
50. Dayraud C, Alié A, Jager M, Chang P, Le Guyader H, Manuel M, Quéinnec E. Independent specialisation of myosin II paralogues in muscle vs. non-muscle functions during early animal evolution: a ctenophore perspective. *BMC Evol. Biol*. 2012;12:107.
51. Leclère L, Jager M, Barreau C, Chang P, Le Guyader H, Manuel M, Houliston, E. Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian *Clytia*. *Dev Biol*. 2012;364:236–48.
52. Chevalier S, Martin A, Leclère L, Amiel A, Houliston E. Polarised expression of FoxB and FoxQ2 genes during development of the hydrozoan *Clytia hemisphaerica*. *Dev Genes Evol*. 2006;216:709–20.
53. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:1792–97.
54. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Sympos Series*. 1999;41:95–98.
55. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 2010;59:307–321.
56. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–85.
57. Wolgemuth DJ, Roberts SS. Regulating mitosis and meiosis in the male germ line: critical functions for cyclins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010;365:1653–62.
58. Li Z, Zhao B, Wang P, Chen F, Dong Z, Yang H. Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes Dev*. 2010; 235–240.
59. Dunn CW, Leys SP, Haddock SHD. The hidden biology of sponges and ctenophores. *Trends Ecol Evol*. 2015;30:282–91.
60. Kohn AB, Citarella MR, Kocot KM, Bobkova YV, Halanych KM, Moroz LL. Rapid evolution of the compact and unusual mitochondrial genome in the ctenophore, *Pleurobrachia bachei*. *Mol Phylogenet Evol*. 2012;63:203–7.

61. Osigus H-J, Eitel M, Bernt M, Donath A, Schierwater, B. Mitogenomics at the base of Metazoa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2013;69:339-351.
62. Li Y, Hibbs MA, Gard AL, Shylo NA, Yun K. Genome-wide analysis of N11CD/RBPJ targets in vivo reveals direct transcriptional regulation of Wnt, SHH, and Hippo pathway effectors by Notch1. *Stem Cells.* 2012;30:741–52.
63. Song JY, Park R, Kim JY, Hughes L, Lu L, Kim S et al. Dual function of Yap in the regulation of lens progenitor cells and cellular polarity. *Dev Biol.* 2014;386:281–290.
64. Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen B et al. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Dev Cell.* 2010b;19:831–844.
65. Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S et al. YAP/TAZ incorporation in the b-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell.* 2014;158:157–70.
66. Hamilton G, O’Neill E. Hippo pathway and apoptosis. In: Oren M, Aylon Y, editors. *The Hippo signalling pathway and cancer.* New York: Springer Science & Business Media; 2013. p. 117–145.
67. Straßburger K, Tiebe M, Pinna F, Breuhahn K, Teleman AA. Insulin/IGF signaling drives cell proliferation in part via Yorkie/YAP. *Dev Biol.* 2012;367:187–96.

3.3.3 Complément 1 de l'article : Etude par transcriptomique différentielle de l'expression des acteurs de la voie Hippo le long du tapis roulant du bulbe tentaculaire de *Clytia hemisphaerica*

Afin de pouvoir identifier les gènes exprimés différemment le long du tapis roulant cellulaire de *Clytia hemisphaerica*, une expérience de transcriptomique quantitative a été réalisée au niveau du système tentaculaire (bulbe tentaculaire + tentacule). Le *design* de l'expérience est présenté sur la Figure 3.15. L'expression des gènes a été comparée entre trois zones : la moitié proximale du bulbe (échantillon C1), la moitié distale du bulbe, comprenant aussi la partie la plus proximale du tentacule (échantillon C2) et le tentacule (échantillon C3).

Les données obtenues permettent de comparer de manière quantitative l'expression des gènes de la voie Hippo dans ces trois zones, apportant ainsi un complément précieux aux données d'hybridation *in situ* présentées dans l'article. En effet, il est bien connu que l'intensité du marquage obtenu en hybridation *in situ* colorimétrique ne reflète que très imparfaitement le niveau d'expression d'un gène.

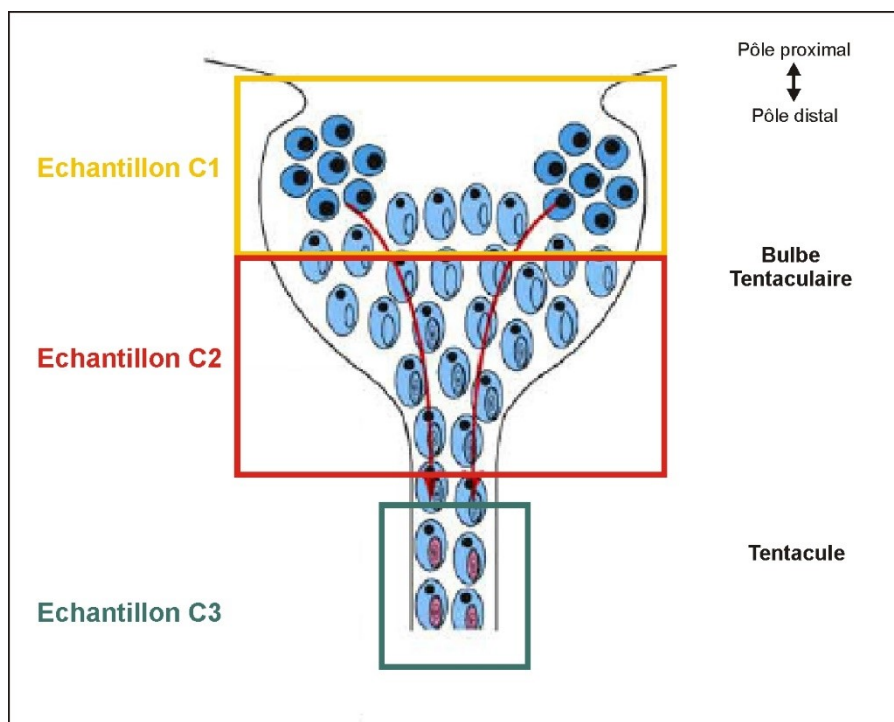


Figure 3.15 Schématisation des différentes zones du bulbe disséqué pour l'obtention des données de transcriptomique différentielle. Les trois types d'échantillons sont répartis le long de l'axe proximo-distal du

bulbe. L'échantillon C1 correspond à la moitié proximale du bulbe, l'échantillon C2 à la moitié distale du bulbe (comprenant aussi une petite portion de tentacule) et l'échantillon C3 au tentacule.

Matériels et Méthodes

Préparation des échantillons, obtention et traitement des données transcriptomiques

Voir Matériel et Méthodes de la sous-partie 3.4, page 270.

Etude de l'expression différentielle des acteurs de la voie Hippo

En ce qui concerne les gènes *Hippo* (Hpo), *Mats* (Mts), *Warts* (Wts), *Salvador* (Sav), *Scalloped* (Sd), *Yorkie* (Yk) et *Merlin* (Mer), les relations d'orthologie ont été déterminées à l'aide d'analyses phylogénétiques (Article 2). Pour les orthologues de *Fat* et *Dachsous*, les relations d'orthologie ont été déterminées à l'aide de Blasts réciproques et de l'analyse de la structure en domaines des protéines (ces protéines possèdent de multiples répétitions de domaines cadhérines, rendant l'analyse phylogénétique non réalisable). Les données d'expression différentielle des *contigs* correspondants aux différents orthologues ont été étudiées. Le critère pour considérer qu'un gène est différentiellement exprimé est un $\log_2\text{FoldChange_cond2-cond1} \leq 1$ ou ≥ 1 ainsi qu'une « p-value » (p-adj) ajoutée inférieure à 0,05. Le « $\log_2\text{FoldChange_cond2-cond1}$ » représente le \log_2 du ratio du nombre moyen de lectures entre les conditions 1 et 2.

Résultats

Les résultats concernant l'étude de l'expression des acteurs de la voie Hippo le long du tapis roulant sont résumés dans le tableau 3.2. On observe trois catégories : i) les gènes exprimés de manière équivalente tout le long du tapis roulant : *Sav*, *Mer*, *Sd*, *Hpo*, ii) les gènes exprimés majoritairement au niveau du tentacule (C3) et de manière équivalente au niveau des deux moitiés du bulbe (C1 et C2) : *Wts*, *Mts* et *Yorkie*, iii) les gènes exprimés selon un gradient croissant le long du bulbe tentaculaire (de C1 à C3) : *Fat* et *Dachsous* (Ds).

Type d'expression	C1=C2=C3	C3>C1=C2	C3>C2>C1
Gènes concernés	Mer	Wts	Fat
	Hpo	Mts	Ds
	Sav	Yk	
	Sd		

Tableau 3.2 Expression différentielle des gènes de la voie Hippo entre les différentes zones du bulbe. C1, C2, C3 correspondent aux différentes zones représentées sur la Figure 3.15.

Discussion

Les acteurs de la voie Hippo sont en majorité exprimés de manière uniforme le long du tapis roulant cellulaire du bulbe (*Salvador*, *Merlin*, *Scalloped*, et *Hippo*), comme ceci était suggéré par l'étude de leur patron d'expression (Article 2).

L'expression majoritaire de Yorkie, Warts, Mats, Fat et Dachsous au niveau de la zone des cellules matures (C3) va dans le sens de la conservation d'un rôle important de la voie Hippo dans les étapes terminales de différenciation et de maturation. Le cas de Yorkie est particulièrement intéressant car sa surexpression au niveau du tentacule, en lien avec sa localisation cytoplasmique associée aux nématocystes (article 2), suggère l'émergence d'une fonction importante de cette protéine chez les Cnidaires, en lien avec l'acquisition des nématocytes. En effet, des études d'expression quantitatives de Yorkie au sein de systèmes Mammifères ont montré que même si la présence de Yorkie au niveau cytoplasmique est indispensable pour les étapes de différenciation, son expression est généralement fortement diminuée au niveau des cellules différenciées par rapport aux cellules en prolifération (Mahoney et al. 2014).

L'expression de Fat et Dachsous sous la forme d'un gradient croissant le long du tapis roulant cellulaire de *Clytia hemisphaerica* apparaît comme particulièrement intéressante dans le cadre de l'étude de la conservation de la dynamique et des fonctions de la voie Hippo à l'échelle des Cnidaires. En effet, l'activation de la voie Hippo par l'interaction Fat/Dachsous a été mise en évidence chez la drosophile (Bennet & Harvey 2006, Tyler & Baker 2007, Willecke et al. 2008) et de manière remarquable, l'activation de Fat (et donc de la voie Hippo) est liée à la mise en place d'un gradient de concentration concernant la protéine Dachsous (Willecke et al. 2008). Le gradient d'expression de Dachsous le long du tapis roulant de *Clytia hemisphaerica* suggère la mise en place d'un gradient protéique et pourrait donc être cohérente avec la conservation d'un contrôle de la voie Hippo par l'interaction Fat/Dachsous. Chez la Drosophile, ce gradient de concentration, en lien avec l'activation de la voie Hippo a été démontré comme étant le mécanisme mis en jeu dans le contrôle de la taille des organes (Halder & Johnson 2011) et ce mécanisme pourrait donc être conservé chez les Cnidaires. Il est important de noter ici que les modèles moléculaires proposés chez la Drosophile (modèle des coordonnées polaires et modèle d'anticipation – page 232) ne semblent pas être applicables aux tapis roulants cellulaires, comme souligné plus haut. Un autre modèle reste donc à concevoir dans ce contexte et devrait impliquer un gradient de concentration de Fat, associé à celui de Dachsous, comme observé chez *Clytia hemisphaerica*. Il serait intéressant d'obtenir des données d'expression quantitatives de Fat et Dachsous le long de tapis roulants cellulaires de modèles bilatériens. Des expériences fonctionnelles d'inactivation et de surexpression des gènes de la voie Hippo semblent

évidemment indispensables pour pouvoir conclure à la conservation de son rôle de régulateur de la taille chez les Cnidaires.

3.3.4 Complément 2 de l'article : Localisation des zones d'apoptose au niveau du système tentaculaire de *Clytia hemisphaerica*

Introduction

Chez les Mammifères et la Drosophile, la voie Hippo a un rôle central dans le contrôle de la balance entre prolifération, différenciation et mort cellulaire. En lien avec l'étude de la voie Hippo, je me suis intéressée aux zones d'apoptose au niveau du bulbe tentaculaire de *Clytia hemisphaerica*. Cet aspect n'avait encore jamais été étudié chez la méduse de *Clytia hemisphaerica* et ce travail préliminaire s'inscrit dans une démarche d'exploration et de localisation de cellules apoptotiques au niveau du bulbe et du tentacule. L'observation de cellules apoptotiques au niveau du tapis roulant du bulbe, en lien avec sa ségrégation spatiale, permet d'émettre des hypothèses concernant le(s) stade(s) du lignage cellulaire concerné(s) ainsi que les rôles de l'apoptose chez la méduse *Clytia hemisphaerica*.

L'apoptose est un mécanisme moléculaire conservé à l'échelle des Métazoaires dont les rôles dans la mise en place, le contrôle de la taille, le maintien ainsi que la réparation d'un organe ont été mis en évidence (Cikala 1999, Wiens 2003, Reiter et al. 2012, Zmasek & Godzik 2013, Von Der Chevallerie 2014, Sakamaki 2015). De nombreux rôles de l'apoptose ont été caractérisés, que ce soit au cours du développement ou chez l'adulte, en conditions pathologiques ou non. En effet, l'apoptose est impliquée dans l'élimination de cellules ayant subi des dommages de l'ADN ou des infections virales (Chowdhury et al. 2006) mais est aussi parfois indispensable au cours de la différenciation cellulaire (la différenciation terminale des spermatides par exemple, Feinstein-Rotkop & Arama, 2009) ainsi qu'au cours du développement d'un organisme (élimination de cellules redondantes, non fonctionnelles, contrôle de la densité de cellules - Meier et al. 2000).

Chez les Cnidaires, l'apoptose a été particulièrement étudiée chez l'Hydre (Reiter et al. 2012, Galliot 2012). Les tissus de l'Hydre sont le siège d'un renouvellement permanent et d'une fine régulation de la balance entre prolifération, différenciation et mort cellulaire (Galliot & Ghila, 2010). En dehors de tout stimulus exogène, et en condition de nourrissage régulier, les zones d'apoptose sont restreintes aux extrémités de l'animal, au niveau des tentacules et du disque basal, au niveau desquels se trouvent les cellules différenciées les plus « anciennes » (Figure 3.16 A - Martinez & Bridge, 2012). De « nouvelles » cellules différenciées, provenant de la colonne (zone de prolifération et de

différenciation), les remplacent alors. L'apoptose est donc impliquée dans le renouvellement cellulaire. Lorsque

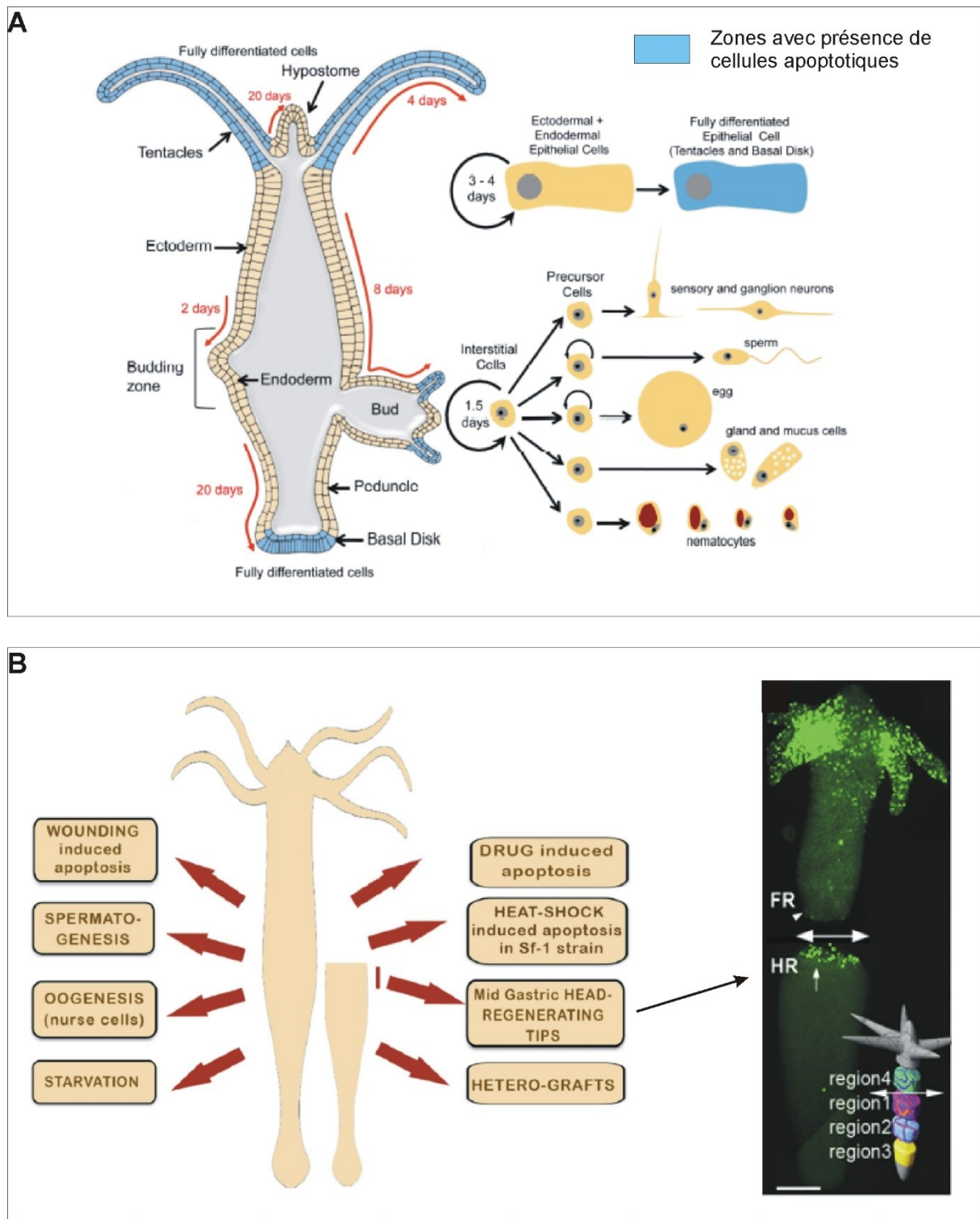


Figure 3.16 L'apoptose chez l'Hydre : localisation et contextes. A) Localisation des zones d'apoptose en conditions normales (en bleu). Les zones d'apoptose sont restreintes aux extrémités de l'animal ; seules les cellules différenciées sont touchées. On note aussi sur ce schéma les différents devenir des cellules interstitielles endodermiques et ectodermiques ainsi que leur migration vers les extrémités de l'animal. B) A gauche, schéma

des différents contextes où l'apoptose peut être induite. A droite, marquage TUNEL de l'hydre après une section au niveau de la colonne de l'animal. On observe des cellules apoptotiques au niveau de la zone orale en régénération. On note de plus que les tentacules sont marqués (apoptose en conditions normales). B) gauche : Martinez & Bridge, (2012), Reiter et al. (2012), B) droite Chera et al. (2009).

l'homéostasie de l'organisme est perturbée par un stimulus extérieur (jeûne, drogues, blessure, choc thermique) ou en période de gamétogenèse, les zones d'apoptose peuvent s'étendre au niveau de la colonne de l'animal (Reiter et al. 2012). Huit différents contextes ont été mis en évidence (Figure 3.16 B - Reiter et al. 2012) :

- 1) En cas de jeûne, une partie des cellules épithéliales et interstitielles entre en apoptose et est phagocytée par les cellules épithéliales voisines. Ceci permettrait d'éliminer les cellules en excès et de fournir une sorte de ressource en nutriments endogène (Bosch & David 1984, Bottger & Alexandrova, 2007).
- 2) Au cours de l'ovogenèse, les cellules nourricières, qui entourent l'ovocyte, entrent en apoptose et sont phagocytées par l'ovocyte. Cette entrée en apoptose est sous le contrôle de l'ovocyte et est indispensable à l'ovogenèse (Miller et al. 2000, Technau et al. 2003).
- 3) Au cours de la spermatogenèse, certains précurseurs de spermatozoïdes entrent en apoptose et sont phagocytés par les cellules épithéliales voisines (Kuznetsov et al. 2001).
- 4) Après une lésion, une population importante de nématocytes en cours de différenciation entre en apoptose (Fujisawa & David 1984). Leur apoptose serait stimulée par la libération d'un facteur toxique libéré par les parties lésées qui entrent alors en régénération.
- 5) Après une section au milieu de la colonne de l'animal, on observe, uniquement dans la moitié mettant en jeu la régénération de la partie orale de l'animal, une entrée en apoptose des cellules interstitielles localisées à proximité du plan de section (Figure 3.16 B, droite - Chera et al. 2009, Galliot and Chera 2010, Chera et al. 2011).
- 6) Après une exposition à différentes drogues pro-apoptotiques (colchicine, wortmannine, colcemide), cellules interstitielles, nématoblastes, nématocytes et cellules nerveuses entrent en apoptose sans que les cellules épithéliales soient touchées (Reiter et al. 2012).
- 7) Après un choc thermique, chez les souches mutantes thermosensibles sf-1, certaines cellules interstitielles entrent en apoptose (Reiter et al. 2012).
- 8) Après une hétérogreffe, on observe une entrée en apoptose des cellules localisées à la frontière du tissu greffé (Kuznetsov et al. 2002).

Contrairement aux conditions physiologiques, pour lesquelles l'apoptose touche uniquement des cellules différenciées en lien avec le renouvellement cellulaire, en cas de déséquilibre homéostatique, cellules interstitielles et précurseurs en cours de différenciation sont principalement touchés.

Matériel et Méthodes

Des méduses âgées de 3 jours (stade 8 bulbes, bulbes de 1^{ère} génération matures, c'est-à-dire portant des tentacules, 2^{ème} génération sous forme de bourgeons de bulbes) et de 10 jours (stade 12 bulbes, bulbes de 1^{ère} et de 2^{ème} génération matures, 3^{ème} génération sous forme de bourgeons de bulbes) ont été fixées à 4°C, pendant 30 minutes en paraformaldéhyde 4% dilué dans du PBT (PBS : 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.5 + 0.1% Tween 20). Les échantillons ont ensuite été rincés plusieurs fois en PBT puis déshydratés selon une série de concentrations croissantes en éthanol (éthanol + PBT) et stockés dans du méthanol à -20°C. La réhydratation a été réalisée selon une série de concentrations croissantes en PBST (PBS + Triton X100 0.01%) suivie d'une étape de perméabilisation en Triton-X100 (PBS 1X - triton X100 0.2%, 10 minutes à température ambiante). Les échantillons ont ensuite été saturés à l'aide d'une solution de sérum albumine bovine (PBST 0,01% + BSA 3%, 2 fois 10 minutes puis PBST 0,01% + BSA 1% pendant 30 minutes à température ambiante). Puis ils ont été incubés, pendant 1h10 à l'abri de la lumière, en présence de la solution TUNEL (TdT + dUTP couplés à la fluorescéine, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche) selon les recommandations du fabricant. Les méduses ont enfin été rincées plusieurs fois en PBST (PBS + Triton-X 100 0.01%) puis incubées en présence de Dapi (1µg/ml), rincées en PBST (PBS + Triton-X 100 0.01%) et montées en Citifluor pour l'observation au microscope. Des méduses témoins ont été traitées à la DNase (0,5mg/ml, 10 minutes à température ambiante) puis placées soit en présence de la solution TUNEL, soit uniquement en présence des dUTP couplés à la fluorescéine (témoin négatif de réaction). Les acquisitions ont été faites à l'aide d'un microscope Olympus BX61 utilisant une caméra Q-imaging et via le logiciel Image Pro Plus (Mediacybernetics, Bethesda, MD).

Résultats

Les méduses âgées de 3 jours (stade 8 bulbes, bulbes de 1^{ère} génération matures, 2^{ème} génération sous forme de bourgeons de bulbes – Figure 3.17) présentent des cellules apoptotiques localisées principalement au niveau des tentacules (Figure 3.17 A-B''). Tous les tentacules ne sont pas marqués. Ces cellules sont distribuées le long du tentacule et/ou au niveau de son extrémité (Figures 3.17 A-B''). On peut de plus noter que la densité de cellules en apoptose au niveau des extrémités est plus importante (Figure 3.17 B). On observe une faible proportion de cellules en apoptose au niveau de l'ectoderme proximal de certains bulbes matures de 1^{ère} génération (Figure 3.17 C-C''). Aucune

cellule en apoptose n'est présente au niveau des bourgeons de bulbes en cours de croissance et de développement.

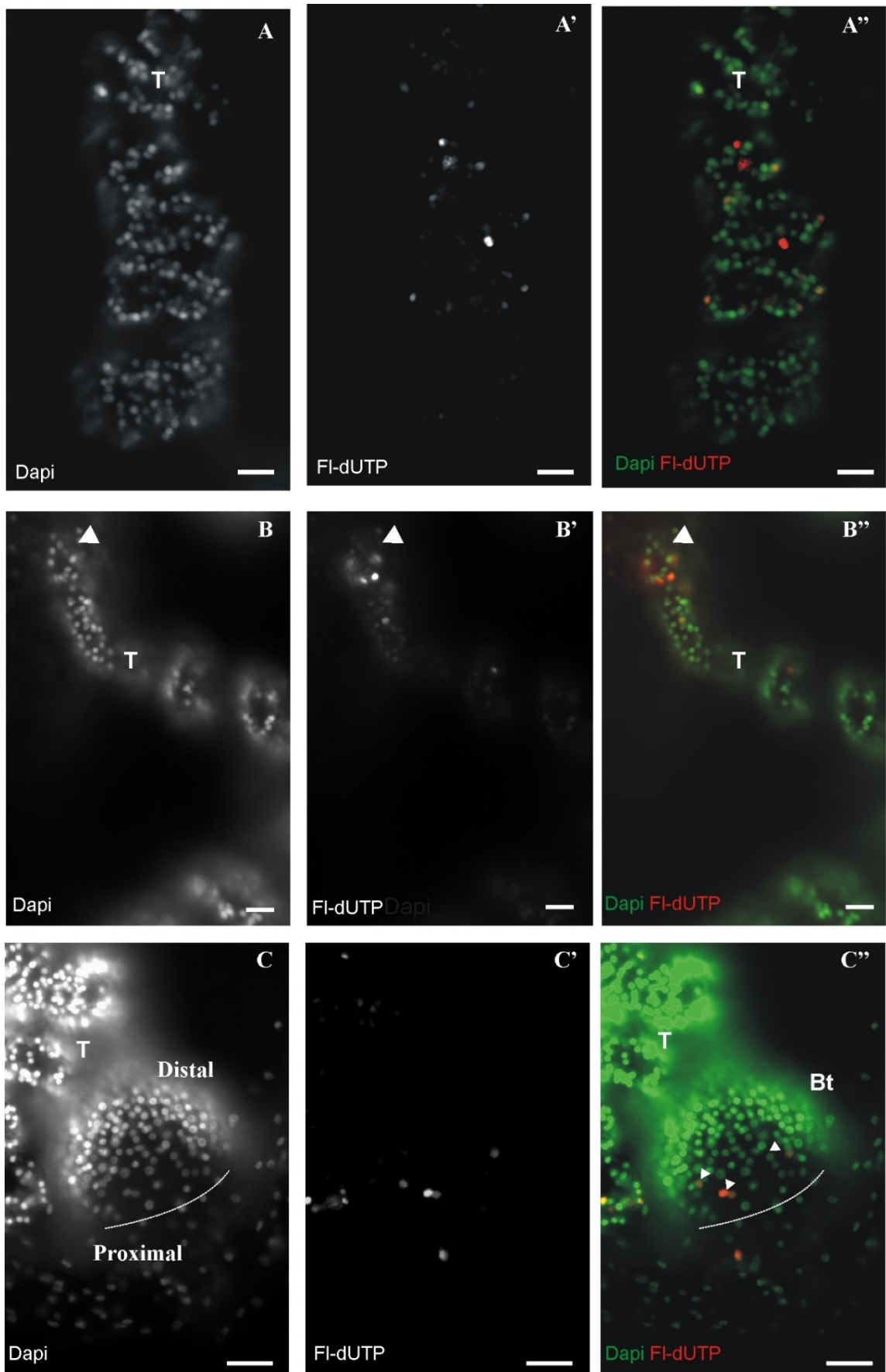


Figure 3.17 Localisation de cellules apoptotiques au niveau du système tentaculaire de méduses de 3 jours. Les cellules apoptotiques sont marquées en rouge (dUTP couplés à la fluorescéine, FI-dUTP) et un contre-marquage DAPI a été réalisé. A-B'') Cellules apoptotiques au niveau de tentacules (T). A-A'') Cellules apoptotiques localisées le long d'un tentacule de bulbe de 1^{ère} génération. B-B'') Cellules apoptotique, en quantité importante, localisées à l'extrémité du tentacule (tête de flèche blanche). C-C'') Cellules apoptotiques au niveau de l'ectoderme du bulbe, dans la zone proximale (têtes de flèches blanches en C''). L'insertion du bulbe au niveau du bord de l'ombrelle est figurée par une ligne en pointillés blancs. *Bt* : bulbe tentaculaire, *T* : tentacule. Echelles : A-A' : 25 µm ; B-C' : 10 µm.

Les méduses de 10 jours (stade 12 bulbes, bulbes de 1^{ère} et de 2^{ème} génération matures, bulbes de 3^{ème} génération sous forme de bourgeons de bulbes – Figure 3.18) présentent aussi un nombre important de cellules apoptotiques le long du tentacule et/ou à son extrémité avec une densité plus forte à l'extrémité (Figure 3.18A-A''). Tous les tentacules ne sont pas marqués et aucun lien avec la génération de bulbe n'est observé. L'ectoderme nématogénique de certains bulbes matures (de 1^{ère} et de 2^{ème} génération indifféremment) présente une proportion de cellules en apoptose beaucoup plus importante que pour les méduses de 3 jours (Figure 3.18 C-D''). Certaines de ces cellules sont présentes au niveau proximal du bulbe (Figure 3.18 D-D''), mais la grande majorité est localisée au niveau le plus distal du bulbe (Figures 3.18 B-C''). On observe de plus, une forte proportion de cellules apoptotiques au niveau de certains bourgeons de bulbes (Figure 3.18 E-E'').

Les méduses témoins traitées en l'absence de dUTP couplés à la fluorescéine (témoin négatif de réaction) ne présentent aucun noyau positif alors que les méduses témoins traitées à la DNase (témoin positif de réactif) présentent une proportion de noyaux positifs beaucoup plus importante que les méduses non traitées (Figure 3.19).

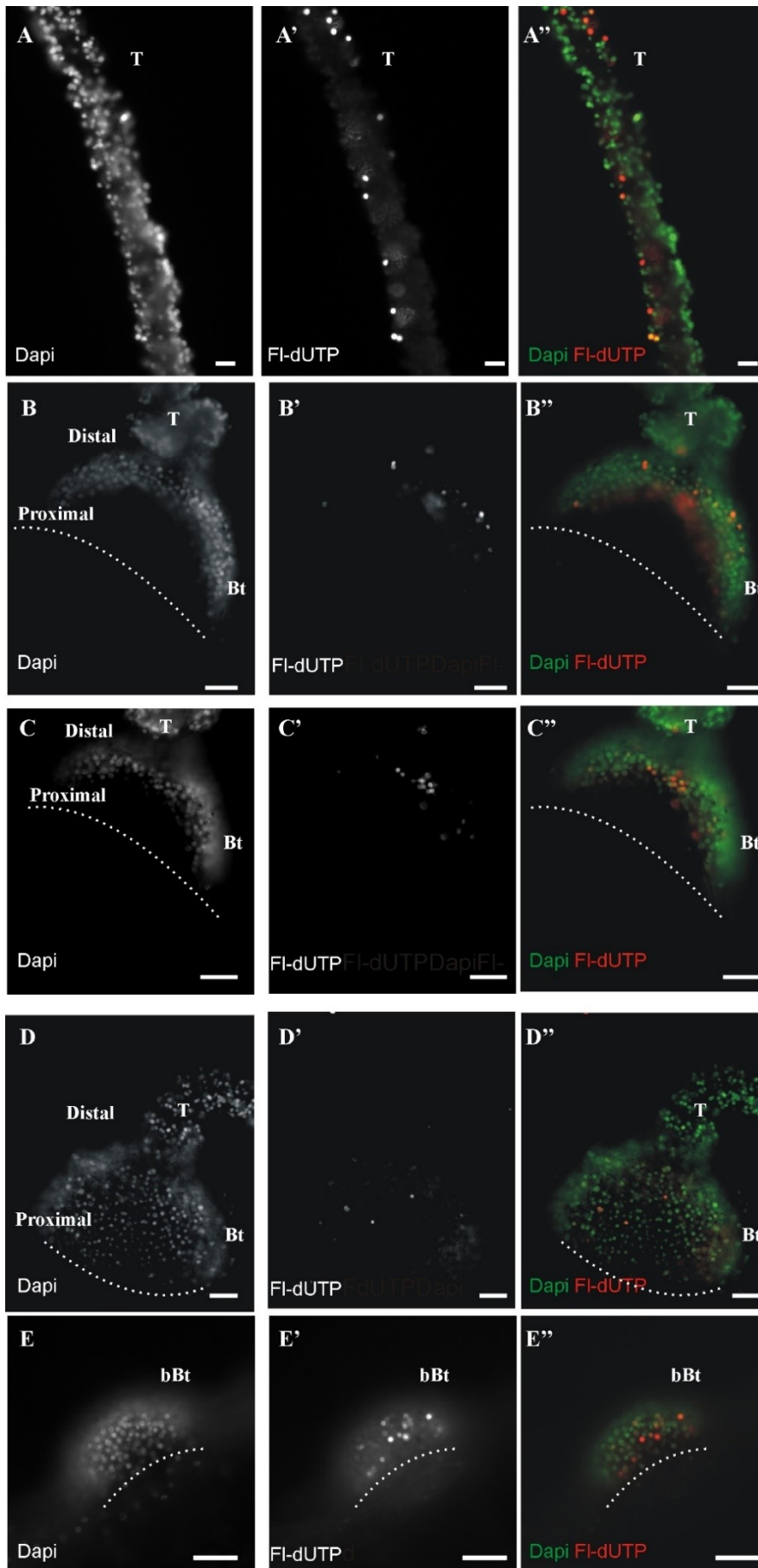


Figure 3.18 Localisation de cellules apoptotiques au niveau du système tentaculaire de méduses de 10 jours. Les cellules apoptotiques sont marquées en rouge (dUTP couplés à la fluorescéine, FI-dUTP) et un contre-marquage DAPI a été réalisé. A-A'') Cellules apoptotiques le long d'un tentacule d'un bulbe de 1^{ère} génération. B-C'') Cellules apoptotiques au niveau de l'ectoderme distal du bulbe, en proportion importante. La zone d'insertion du tentacule au niveau du bord de l'ombrelle est figurée par un trait en pointillé. Sur B-B'' on observe que les cellules apoptotiques sont réparties dans l'ensemble de l'ectoderme distal, alors que en C-C'', les cellules apoptotiques semblent être localisées dans une zone restreinte de l'ectoderme distal du bulbe. D-D'') Cellules apoptotiques au niveau de l'ectoderme proximal du bulbe (en faible proportion). E-E'') Cellules apoptotiques réparties dans l'ectoderme d'un bourgeon de bulbe de 3^{ème} génération. La zone d'insertion du bulbe au niveau du bord de l'ombrelle est figurée par un trait en pointillé. *Bt* : bulbe tentaculaire, *bBt* : bourgeon de bulbe, *T* : tentacule. Echelles : A-E'' : 25 µm.

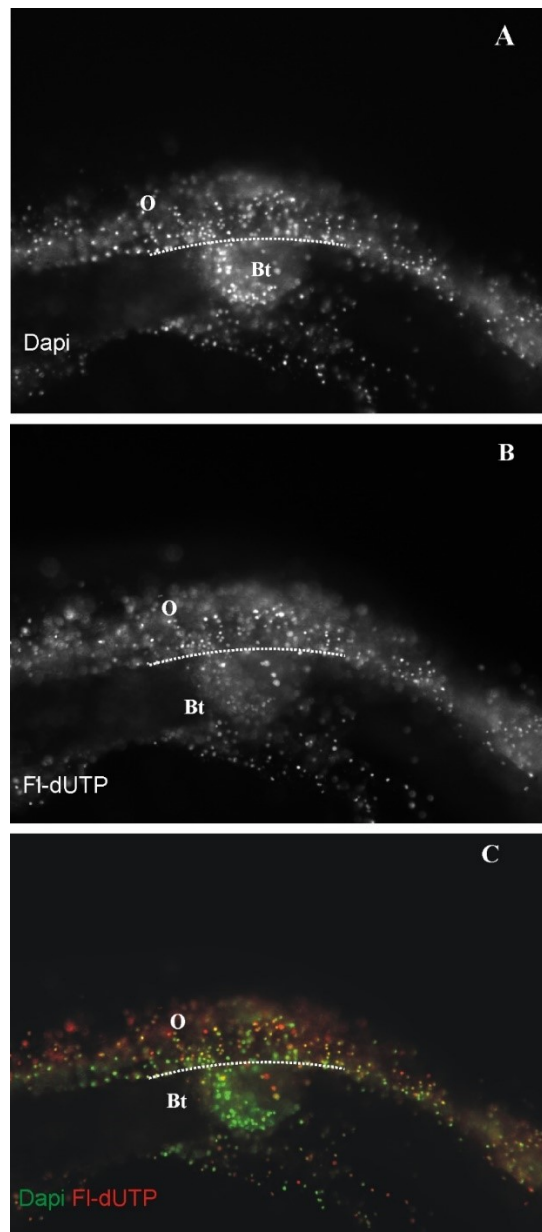


Figure 3.19 Visualisation des cellules apoptotiques après traitement d'une méduse de 3 jours à la DNase. Les cellules apoptotiques sont marquées en rouge (dUTP couplés à la fluorescéine, FI-dUTP) et un contre-marquage DAPI a été réalisé. On observe une très forte proportion de cellules apoptotiques au niveau de

l'ectoderme du bulbe mais aussi au niveau de toute l'ombrelle (o). La zone d'insertion du bulbe au niveau du bord de l'ombrelle est figurée par un trait en pointillé. *Bt* : bulbe tentaculaire, *o* : ombrelle.

Discussion

Chez la méduse de *Clytia hemisphaerica*, la répartition spatiale des cellules apoptotiques au niveau du tapis roulant du bulbe tentaculaire permet de mettre en évidence une entrée en apoptose au niveau de cellules matures (au niveau du tentacule), de cellules en cours de différenciation (partie distale du bulbe) et probablement de progéniteurs en prolifération indifférenciés ou en différenciation précoce (partie proximale du bulbe et bourgeons de bulbes). La présence de cellules apoptotiques, au niveau de certains tentacules uniquement, en forte proportion aux extrémités, et ceci quel que soit le stade de la méduse, suggère la mise en jeu du programme apoptotique, suite à une lésion, en lien avec la capture des proies par exemple. La stimulation de l'apoptose des nématocytes suite à une lésion a aussi été suggérée chez l'Hydre (Fujisawa & David 1984).

Il est intéressant de noter qu'au cours des étapes de nématogénèse, l'apoptose semble n'intervenir que très ponctuellement dans la zone de prolifération du bulbe, en ce qui concerne les progéniteurs indifférenciés ou en phase de différenciation précoce (cellules de la zone proximale du bulbe) et ceci quel que soit le stade de la méduse. Les rares cellules apoptotiques pourraient correspondre aux cellules ayant subi des erreurs au cours de l'une des étapes du cycle cellulaire. Chez les méduses plus âgées uniquement, l'apoptose semble toucher majoritairement les cellules sorties du cycle cellulaire, en phase de différenciation terminale et de maturation (zone distale du bulbe). Il semble alors qu'une fois les cellules sorties du cycle, un contrôle de la balance différenciation/mort cellulaire soit mis en jeu et que la mort cellulaire soit activée pour certaines cellules. Ce contrôle pourrait être lié au contrôle du nombre de cellules produites et nécessaires à la régénération du tentacule. L'absence de ce type de cellules apoptotiques chez les méduses de 3 jours (plus jeunes) suggère que l'apoptose ne soit activée qu'une fois que les bulbes matures aient cessé leur croissance et aient donc atteint leur taille optimale (méduses de 10 jours).

On peut remarquer de plus, que la zone du bulbe où l'on observe l'entrée en apoptose d'une quantité importante de cellules correspond à la zone à partir de laquelle Yorkie est transloqué hors du noyau (Article 2). Ces résultats suggèrent la possibilité de l'existence d'un lien entre la mise en jeu de l'apoptose et l'activation de la voie Hippo. Des modifications de cette répartition suite à l'inactivation d'un des acteurs de la voie Hippo permettraient de tester l'hypothèse de la conservation du rôle de cette voie dans le contrôle de l'apoptose.

Le mécanisme de contrôle de la nématogénèse et du nombre de cellules produites semble se différencier de celui mis en jeu chez l'Hydre pour laquelle l'apoptose ne touche que les nématocytes différenciés les plus « anciens » aux extrémités des tentacules (Martinez & Bridge, 2012). On peut alors se demander si ces différences de contrôle de la densité cellulaire via l'apoptose sont contraintes par l'organisation spatiale de la nématogénèse et/ou par la morphologie de l'appareil tentaculaire. En

effet, la nématogénèse de l'Hydre se réalise de manière diffuse, à partir de cellules interstitielles localisées dans toute la colonne de l'animal qui migrent vers les tentacules. Le contrôle de la quantité de cellules produites semble donc difficilement réalisable au cours des différentes étapes de nématogénèse et un contrôle direct au sein de la zone fonctionnelle semble être la stratégie la plus simple. Au niveau des bulbes de *Clytia hemisphaerica* par contre, la ségrégation spatio-temporelle de la nématogénèse permet des interactions étroites entre cellules se situant aux mêmes étapes de la nématogénèse et pourrait donc permettre un contrôle fin du nombre de cellules sortant du cycle cellulaire et dirigées vers les processus de différenciation et de maturation. L'organisation en tapis roulant cellulaire ne semble cependant pas contraindre à elle seule la localisation des zones apoptotiques puisqu'au niveau des cryptes intestinales des Mammifères, l'apoptose est localisée à l'extrémité du tapis roulant, au niveau terminal de la villosité (Burke et al. 2007). On peut alors émettre l'hypothèse que la morphologie du bulbe tentaculaire, très large et possédant un grand nombre de cellules par rapport au tentacule (goulet d'étranglement) représente une contrainte spatiale qui impose l'élimination d'un nombre important de cellules non nécessaires à la régénération du tentacule.

3.4 Transcriptomique différentielle le long du tapis roulant de *Clytia hemisphaerica* et mise en évidence de gènes potentiellement impliqués dans l'arrêt de la prolifération cellulaire

L'analyse de transcriptomique quantitative au niveau de trois zones successives (selon l'axe proximo-distal) du système tentaculaire de *Clytia hemisphaerica* permet de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés le long du tapis roulant cellulaire (Figure 3.20). La zone de transition entre prolifération et différenciation (zone de sortie du cycle cellulaire) est localisée au sein de l'échantillon C2. Dans la perspective de recherche d'une signature transcriptomique de l'arrêt de la prolifération cellulaire, je me suis intéressée à l'expression d'orthologues de gènes ayant, chez l'homme, un rôle documenté dans l'arrêt de la prolifération (régulateurs négatifs de la prolifération).

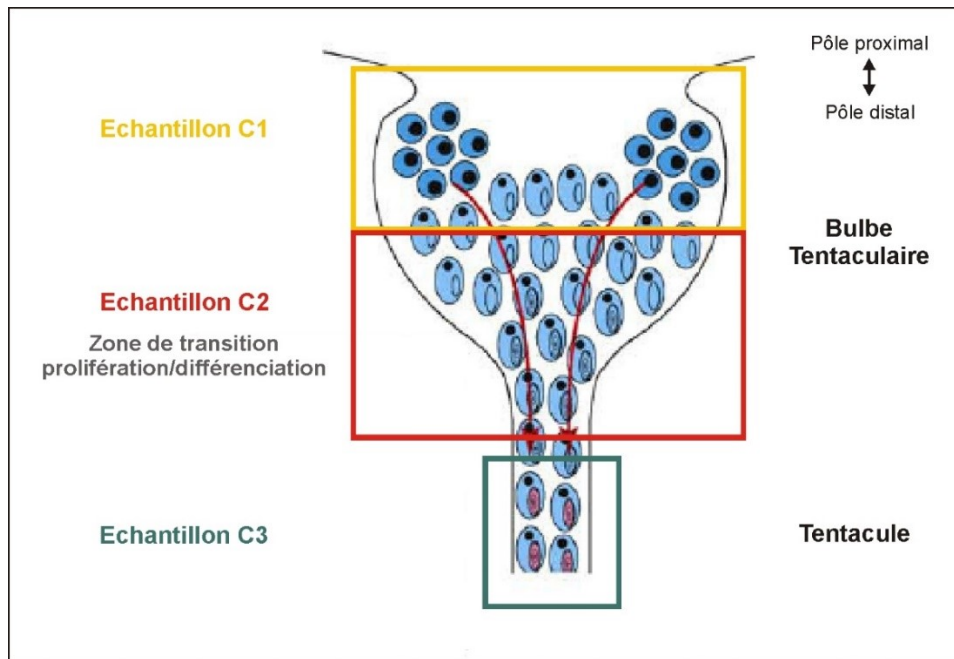


Figure 3.20 Schématisation des différentes zones du bulbe disséqué pour l'obtention des données de transcriptomique différentielle. Les trois types d'échantillons sont répartis le long de l'axe proximo-distal du bulbe. L'échantillon C1 correspond à la moitié proximale du bulbe, l'échantillon C2 à la moitié distale du bulbe (comprenant une portion de tentacule) et l'échantillon C3 au tentacule. La zone C2 comprend à la zone de transition entre la prolifération et la différenciation.

Matériels et Méthodes

Analyses transcriptomiques

La micro-dissection des échantillons et les préparations d'ARN totaux ont été faites dans notre laboratoire (par Michaël Manuel pour les micro-dissections et par Muriel Jager pour la préparation des ARN). Toutes les étapes ultérieures (depuis la purification des ARNm jusqu'aux analyses bioinformatiques) ont été réalisées à la plateforme IBENS de génomique (qui s'appelle désormais Genomic Paris Centre) à l'École Normale Supérieure, Paris. A la plateforme, Corinne Blugeon a pris en charge les manipulations à la paillasse, et Sophie Lemoine a fait les analyses bioinformatiques.

Micro-dissections

Les trois échantillons (C1, C2, C3) comparés dans cette expérience ont été micro-disséqués de la manière suivante. Toutes les méduses disséquées étaient au stade 16 bulbes. Uniquement les bulbes de la 2ème à la 4ème génération ont été utilisés (c'est-à-dire que les bulbes situés dans le prolongement des canaux radiaires n'ont pas été disséqués). Les méduses vivantes ont été immobilisées à l'aide de minuties dans une boîte de Pétri contenant de l'eau de mer filtrée à 0.2 µm dont le fond était recouvert d'une couche d'agarose (1.7% dans eau de mer). Des pinces fines ont été utilisées pour saisir le tentacule et tirer délicatement dessus pour que le bulbe tentaculaire prenne une position étendue. Le

bulbe a alors été coupé proprement à la moitié de sa hauteur avec des micro-ciseaux de chirurgie. Puis le tentacule a été coupé légèrement au-dessus de son point d'insertion sur la moitié distale du bulbe. Ainsi ont été obtenus les échantillons C2 (moitié distale du bulbe avec une courte portion de tentacule) et C3 (uniquement tentacule) (Figure 3.20). Le reste du bulbe a alors été séparé de la méduse avec les micro-ciseaux. L'échantillon C1 ainsi obtenu comporte la partie proximale du bulbe ainsi qu'un étroit liseré du bord de l'ombrelle. Deux réplicats biologiques ont été préparés pour chacun des trois échantillons (pour chaque réplicat ont été utilisés 80 bulbes provenant d'environ 7 méduses ; toutes les méduses étant issues de reproduction clonale à partir de la même souche Z4B de polypes).

Préparation des ARN

Les ARN totaux ont été préparés en utilisant le kit RNAqueous Micro Kit (Ambion). Immédiatement après la micro-dissection, le matériel biologique vivant (par série d'échantillons provenant de 10 à 16 bulbes) a été mis dans un tube de 1.5 ml en présence de 10 volumes (300 μ l) de la solution de lyse du kit, puis le tube a été immédiatement vortexé pendant quelques secondes et congelé à l'azote liquide, avant stockage à -80°C . Après réunion du matériel correspondant à un même échantillon (C1 à C3) et réplicat, la préparation d'ARN total a été entreprise selon les instructions du fabricant du kit. A la fin de la procédure, l'ARN a été élué deux fois avec 10 μ l de la solution d'élué. L'ARN total a alors été traité à la DNase I, qui a ensuite été inactivée (ces deux étapes selon les instructions du fabricant du kit RNAqueous Micro Kit). La préparation a ensuite été purifiée au moyen du kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen) (élué deux fois avec 14 μ l d'eau dépourvue de RNase), puis contrôlée pour la quantité par Nanodrop et pour la qualité par Bioanalyzer. Environ 500 ng d'ARN total par échantillon ont été utilisés pour la purification des ARNm sur colonne oligodT. Puis des banques de cDNA non-directionnelles ont été construites en utilisant le kit TruSeq RNA Library Prep Kit (Illumina) selon les instructions du fabricant.

Séquençage

Des lectures simples de 50 bases ont été produites sur un séquenceur Illumina HiSeq 2000. Environ 60 millions de lectures ont été obtenues par échantillons en deux *runs* (trois échantillons *taggés* mélangés par run de séquençage ; un run fournissant environ 180 millions de lectures).

Analyses bioinformatiques

Les lectures brutes (sorties du séquenceur) ont été filtrées pour éliminer les lectures de mauvaise qualité (Qscore ≤ 12), les motifs polyN, et les lectures très courtes (longueur ≤ 11). Puis les lectures ont été alignées (« mapping ») sur le transcriptome de référence de *C. hemisphaerica* (assemblé et annoté par Tsuyochi Momose, version été 2011), en utilisant le logiciel Bowtie 0.12.9 (options : -best -k 2). Les *reads* ne s'alignant pas ont été supprimés. Les données ont été normalisées, puis pour chaque contig du transcriptome de référence le nombre de lectures associées a été compté et reporté

dans un fichier de sortie. Pour la construction des fichiers d'expression, la méthode d'analyse statistique différentielle du package DESeq a été employée (voir documentation complète à l'adresse suivante : <http://www-huber.embl.de/users/anders/DESeq/>). Les fichiers d'expression contiennent les colonnes suivantes : id : numéro de code du gène dans l'assemblage de référence du transcriptome; baseMean : nombre moyen de lectures pour les deux conditions comparées ; baseMean_cond1 : nombre moyen de lectures pour la première condition ; baseMean_cond2 : nombre moyen de lectures pour la seconde condition ; FoldChange_cond2-cond1: ratio du nombre moyen de lectures entre les deux conditions ; log2FoldChange_cond2-cond1 : log2 du ratio précédent; pval : « p-value » brute (avant correction de Benjamini & Hochberg); padj : « p-value » ajustée (après correction de Benjamini & Hochberg).

Recherche chez *Clytia hemisphaerica* d'orthologues de gènes connus pour être impliqués dans l'arrêt de la prolifération chez l'homme.

Cette étape a été permise grâce à l'utilisation d'une liste de 409 gènes humains connus pour être impliqués dans l'arrêt de la prolifération. Cette liste (HsaProlif) a été établie par Mathilde Devès et Frank Bourrat, à partir de données bibliographiques, dans le but de réaliser un crible d'expression d'une sélection de gènes au niveau du tapis roulant cellulaire du toit optique du Médaka (Thèse Mathilde Devès, 2012). L'ensemble des séquences protéiques de *Clytia hemisphaerica* (CheProtéines) ont été obtenues à partir de la traduction dans toutes les phases de lecture de chaque contig issu de l'assemblage des données transcriptomiques. Les relations d'orthologie ont été établies par une méthode automatisée, à l'aide de OrthoMCL (Li et al. 2003). Un BLASTP (all-against-all – seuil e-value 1e-10, I=1,5) a permis de comparer toutes les séquences du jeu de données composé des protéines des listes HsaProlif et CheProtéines et d'obtenir des clusters de séquences composés d'orthologues putatifs.

Résultats

378 clusters ont été obtenus à la suite de l'analyse OrthoMCL, dont 98 présentent des séquences protéiques de *Clytia hemisphaerica*. Parmi ces 98 clusters d'orthologues, 13 clusters sont composés de deux contigs de *Clytia hemisphaerica* et 2 d'entre eux correspondent à des gènes différents et sont donc des paralogues de *Clytia hemisphaerica*. Une liste de 111 contigs (liste CheProlif) a donc été obtenue. L'étude de l'expression différentielle de ces gènes met en évidence différents profils d'expression dont certains sont particulièrement intéressants dans le cadre de cette étude (Tableau 3.3) : i) les gènes surexprimés significativement dans l'une des trois zones du bulbe par rapport aux deux autres (54,5%), ii) les gènes exprimés de manière uniforme dans les trois zones du

bulbe (19%), iii) les gènes exprimés de manière équivalente dans la zone intermédiaire (C2) et dans l'une des deux autres zones mais de façon significativement différente dans l'autre. Les proportions de gènes correspondant aux différents

Profil d'expression	Données transcriptomiques globales	CheProlif	Significativité
	%	%	
Surexprimés dans une zone	25,25	54,5	*
C3> C1,C2	15	27	*
C2>C3,C1	2	12	*
C1>C2,C3	7	13	*
C1=C2=C3	40	19	*
C1=C2 < C3	9	12	
C1=C2 > C3	12	24	*
C2=C3 > C1	2	8	*
C2=C3 < C1	2	2	
C1=C3 > C2	0	0	
C1=C3 < C2	0	2	

Tableau 3.3 Comparaison de la proportion de gènes, de la liste CheProlif et des données transcriptomiques globales, exprimés selon les différents profils d'expression. La significativité des différences observées, indiquée par un astérisque, a été évaluée à l'aide du test de Chi2 de conformité à 1 degré de liberté.

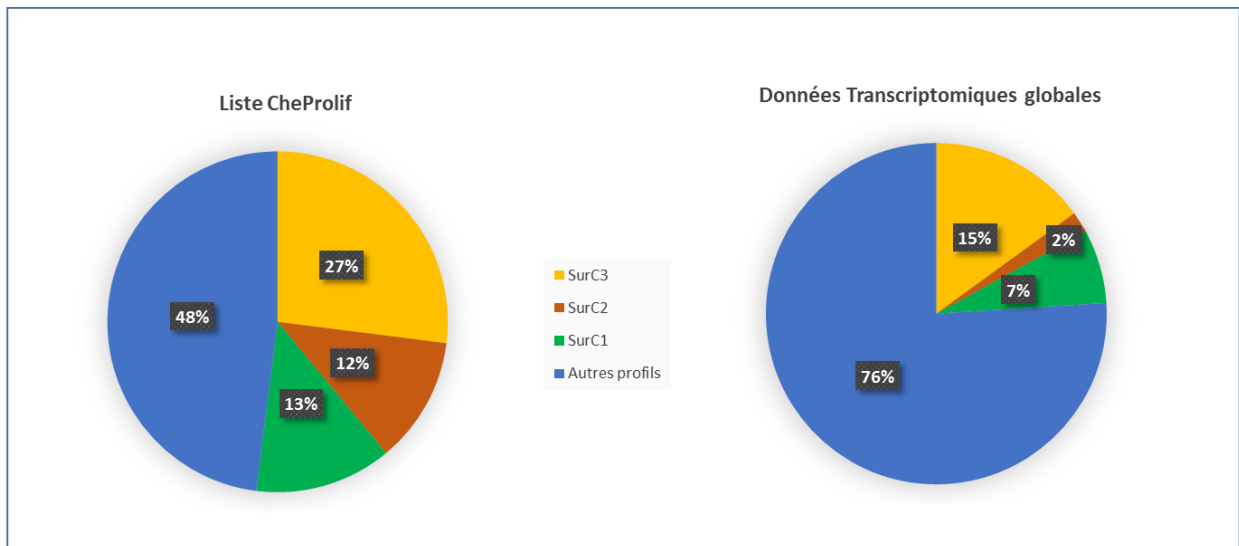


Figure 3.21. Graphique mettant en évidence la forte proportion de gènes surexprimés dans l’une des trois zones du bulbe (C1 en jaune, C2 en orange et C3 en vert) dans la liste CheProlif par rapport aux données transcriptomiques globales.

profils d’expression ont été comparées aux proportions observées pour la totalité du transcriptome de *Clytia hemisphaerica* (Tableau 3.3 – Données transcriptomiques globales). La significativité des différences observées a été évaluée à l’aide du test de Chi2 de conformité à 1 degré de liberté. Le premier résultat très intéressant concerne la très forte proportion de gènes (de la liste CheProlif) dont l’expression est significativement supérieure dans l’une des trois zones du bulbe (54,5% contre 25,25% dans les données transcriptomiques globales – Tableau 3.3, Figure 3.21). De manière encore plus intéressante, on observe que 12% des gènes sont surexprimés dans la zone intermédiaire du bulbe (C2) alors que ce type d’expression est très peu représenté dans les données transcriptomiques globales (seulement 2% des gènes sont surexprimés au niveau C2) (Figure 3.21). La proportion de gènes surexprimés au niveau de C3 est aussi très importante puisqu’elle est de 27% (par rapport à 15% au sein des données transcriptomiques globales) (Figure 3.21). On observe ensuite que 19% des gènes de la liste CheProlif sont exprimés de manière uniforme le long du tapis roulant du bulbe (Tableau 3.3). Ceci représente une proportion importante mais ce type d’expression uniforme est bien plus représenté dans les données transcriptomiques globales (40%). Il y a donc, parmi la liste d’orthologues, significativement plus de gènes différentiellement exprimés le long du tapis roulant. Pour finir, une forte proportion de gènes (24%) de la liste CheProlif sont exprimés de manière équivalente au niveau de C1 et C2 et présentent une expression plus faible au niveau de C3 alors que cette proportion n’est que de 12% au sein des données globales (Tableau 3.3). De même une proportion non négligeable de gènes (8% contre 2% dans les données transcriptomiques globales) est exprimée de manière équivalente au niveau de C2 et C3 et majoritairement par rapport à C1 (Tableau 3.3).

Discussion

Le résultat majeur de cette étude d'expression différentielle le long du bulbe de *Clytia hemisphaerica* est la proportion de gènes de la liste CheProlif surexprimés au niveau de la zone de transition entre la zone proliférative et la zone dépourvue de cellules en prolifération (C2), significativement plus importante que dans les données transcriptomiques globales, où ce type d'expression est très peu représenté. Ceci suggère l'existence d'une signature transcriptomique de l'arrêt de la prolifération cellulaire au niveau de la zone intermédiaire du tapis roulant de *Clytia hemisphaerica*. On peut émettre l'hypothèse de la conservation du rôle d'une proportion importante de ces gènes dans le contrôle de la balance prolifération/sortie du cycle cellulaire ainsi qu'une implication directe dans l'arrêt de la prolifération cellulaire. Ce résultat peut être comparé avec ceux obtenus lors du criblage d'expression différentielle des orthologues du Médaka le long du toit optique, pour lequel 3 des 28 gènes criblés s'exprimant dans le toit optique présentent une expression majoritaire au niveau de la zone de transition entre cellules en prolifération et cellules différenciées. Parmi ces trois gènes (*Brn3a*, *BTGI* et *NRF1*), l'orthologue *Brn3a* de *Clytia hemisphaerica* présente aussi une expression majoritaire dans la zone de transition (C2), ce qui suggère très fortement la conservation de son rôle de régulateur négatif de la prolifération cellulaire à grande échelle évolutive. Les deux autres gènes (*BTGI* et *NRF1*) s'expriment de manière uniforme dans les trois zones.

L'expression (parfois majoritaire ou équivalente à la zone de transition) de certains orthologues dans les zones des cellules en prolifération (C1) ou des cellules matures (C3) ne permet pas d'exclure la conservation du rôle de ces protéines dans le contrôle négatif de la prolifération.

Différents facteurs peuvent permettre de comprendre la proportion importante de gènes au niveau de la zone de prolifération (C1). Le premier est lié au fonctionnement même du tapis roulant cellulaire qui implique un décalage entre le lieu d'expression d'un gène et la zone où la protéine est effectivement mature. Le second est lié aux différents mécanismes post-transcriptionnels pouvant intervenir et jouer sur la forme active d'une protéine. La présence des acteurs d'une voie de signalisation (et donc l'expression des gènes dont ils sont issus) ne présage en rien de leurs interactions et est donc difficilement interprétable en terme de fonction le long des tapis roulants cellulaires.

L'expression de certains orthologues dans la zone des cellules matures (C3), parfois majoritaire ou équivalente à la zone de transition (C2), peut se comprendre par le fait que de nombreuses protéines ou voies de signalisation impliquées dans l'arrêt de la prolifération sont aussi impliquées dans le maintien de l'état non prolifératif des cellules différenciées (Pajalunga et al. 2007) ainsi que dans les étapes de différenciation (Galderisi et al. 2003).

Ces résultats mettent donc en évidence l'intérêt ainsi que les limites de l'utilisation des tapis roulants cellulaires, en tant que modèles prédictifs, pour l'étude de l'implication d'un acteur dans l'activation ou l'inhibition de la prolifération cellulaire. Le contrôle de la balance prolifération/sortie du cycle cellulaire peut, dans de nombreux cas, se réaliser de manière indirecte ou mettre en jeu des interactions entre acteurs à un moment précis (activation d'une voie de signalisation par exemple) qui ne peuvent être reflétés par des données d'expression.

Conclusions générales et perspectives

Conservation de la voie Hippo dans le contrôle de l'arrêt de la prolifération et de la taille des organes chez les Cténaïres et les Cnidaires ? (Chapitre 3)

Le travail concernant la voie Hippo, réalisé chez *P. pileus* et *C. hemisphaerica*, constitue la première étude comparative de cette voie en dehors des Bilatériens. Les résultats suggèrent indirectement la conservation du rôle de la voie Hippo dans le contrôle de la prolifération et de la croissance chez les Cténaïres et les Cnidaires. Il s'agit de plus de la première mise en évidence d'un *switch* nucléo-cytoplasmique de Yorkie en lien avec l'arrêt de la prolifération chez un Cnidaire. Le mécanisme de régulation de la voie Hippo semble avoir été modifié chez les Cténaïres pour lesquels la perte secondaire de Yorkie semble être l'hypothèse la plus vraisemblable mais reste un point énigmatique.

Des approches fonctionnelles permettraient de confirmer le rôle de la voie Hippo dans l'arrêt de la prolifération mais aussi dans la régulation de la taille des organes chez nos deux modèles. Il serait par exemple intéressant de regarder si le *pattern* d'expression des acteurs de la voie, ainsi que la localisation nucléaire ou cytoplasmique de Yorkie chez *C. hemisphaerica* sont modifiées lors de l'altération de la croissance de l'animal à l'aide d'agents pharmacologiques. Le DAPT et la Rapamycine, pour lesquels j'ai pu suggérer un effet sur la croissance de *C. hemisphaerica* (Chapitre 1, page 40), inhibent respectivement les voies Notch et mTOR connues pour interagir avec la voie Hippo chez les Bilatériens, et sont donc de bons candidats. De plus, l'inhibition de l'expression des acteurs du centre de la voie (ou la surexpression de Yorkie chez *C. hemisphaerica*) permettraient de démontrer, de manière directe, la conservation du rôle de la voie. La technique d'ARN interférence est actuellement en cours de mise au point chez *C. hemisphaerica*, au sein de notre laboratoire et en collaboration avec le laboratoire d'Evelyn Houliston (Villefranche-sur-mer). Le système bulbe tentaculaire serait de nouveau particulièrement adapté à cette étude, puisqu'il serait alors relativement aisé de visualiser une perturbation du contrôle de l'arrêt de la prolifération et de sa taille générale. L'inhibition de l'expression de *Fat* et *Dachsous* apparaît aussi comme particulièrement intéressante. Ces protéines sont connues pour avoir un rôle crucial dans le contrôle de la taille des organes chez la Drosophile, notamment via l'expression de *Dachsous* sous la forme de gradients. Les données de transcriptomique différentielle au niveau du bulbe tentaculaire de *C. hemisphaerica* ayant mis en évidence la présence d'un gradient d'expression de *Fat* et *Dachsous* le long de l'axe du bulbe, ces résultats suggèrent fortement la conservation de leur rôle dans le contrôle de la taille des organes chez

C. hemisphaerica. Pour finir, la mise au point de la technique TUNEL et la caractérisation des zones d'apoptose au niveau du bulbe tentaculaire de *C. hemisphaerica*, réalisées dans le cadre de ce travail, permettront de tester la conservation de la voie Hippo dans le contrôle de l'apoptose, une fois les approches fonctionnelles mises au point.

Signatures transcriptomiques de l'arrêt de la prolifération le long de tapis roulants cellulaires (Chapitre 3)

L'étude de l'expression différentielle d'orthologues de gènes humains connus pour être impliqués dans l'arrêt de la prolifération m'a permis d'établir une liste de gènes dont les fonctions pourraient être conservées chez les Cnidaires. L'analyse en détail de cette liste n'a pas été faite. Il serait intéressant par exemple, de rechercher dans la bibliographie des informations concernant leur expression et leur fonction en dehors des Bilatériens ainsi que de valider les résultats obtenus en RNAseq au moyen de l'hybridation *in situ* (après vérification des relations d'orthologie par des analyses phylogénétiques) au niveau du bulbe de *C. hemisphaerica*. La mise au point de l'ARN interférence serait de nouveau très utile afin de confirmer le rôle de ces gènes dans le contrôle négatif de la prolifération.

La réalisation d'autres types d'analyses à partir des données d'expression différentielle dans le bulbe de *C. hemisphaerica* fait aussi partie des perspectives et est actuellement en cours au sein de notre laboratoire (Thèse Thomas Condamine). L'étude de l'expression différentielle de gènes liés à l'état de cellule souche ou impliqués dans la différenciation des cellules neurosensorielles serait potentiellement très intéressante.

L'obtention de données de transcriptomique différentielle au niveau des tapis roulants cellulaires de *P. pileus* permettrait de réaliser le même type d'analyse, dans une démarche comparative. La génération de ces données nécessiterait la dissection des tapis roulants de *P. pileus* par la technique de microdissection laser (Laser Cutting Microdissection) qui semble adaptable chez notre organisme.

Existence d'un système nerveux cholinergique chez les Cténares et apports concernant l'homologie de la cellule nerveuse (Chapitre 2).

Le résultat majeur de cette étude est l'existence d'un système nerveux cholinergique chez les Cténares, mis en évidence à l'aide d'une large diversité d'approches, de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'organisme. Ces approches ont allié des techniques classiques de biologie moléculaire

(analyses phylogénétiques, études d'expression et immuno-marquages), à des techniques pointues d'imagerie (calcique/confocale) et de détection biochimique (ED-HPLC) ou encore à des approches fonctionnelles (approche pharmacologique). J'ai pu obtenir ces résultats en m'appuyant sur l'expertise existant au sein de notre laboratoire concernant la morpho-anatomie du système nerveux de *Pleurobrachia pileus* et les techniques de microscopie à épi-fluorescence et confocale mais aussi à l'aide de collaborations cruciales avec des laboratoires de neurosciences (imagerie calcique – B. Cauli, Cortical Network and Neurovascular Coupling, Neuroscience Paris Seine, UPMC ; A. Mourot et P. Faure, Neurophysiologie et Comportements UMR 8246, CNRS, UPMC) et de biochimie (ED-HPLC – J. Klein, Department of Pharmacology, Goethe University, Francfort, Allemagne). L'ensemble des données va dans le sens de l'existence d'une transmission cholinergique fonctionnelle (colocalisation des acteurs, conservation de la fonction de certains acteurs, cellules cibles) notamment associée au système nerveux de *Pleurobrachia pileus*.

Afin de publier ces résultats à court terme, quelques résultats demandent à être reproduits et complétés, notamment en ce qui concerne la détection de l'acétylcholine par ED-HPLC. Une faible quantité d'acétylcholine a en effet été détectée et ceci est en lien avec la faible proportion de tentacules utilisés lors de cette expérience. La quantité d'animaux que nous avons pu collecter au moment de cette expérience était en effet très limitée (Novembre 2014). De nouveaux échantillons ont été préparés en augmentant la quantité de tentacules et en essayant d'optimiser la technique d'extraction après les récoltes réalisées au printemps 2015. Nous attendons actuellement que le laboratoire avec lequel nous collaborons puisse reproduire l'expérience. En ce qui concerne la technique d'imagerie calcique, il serait important d'obtenir une réponse à la carbamylcholine pour un plus grand nombre d'échantillons ainsi que de tester d'autres neurotransmetteurs classiques. Cependant, il est important de noter que le protocole expérimental est très délicat, en lien avec la dissociation, la survie des cellules dissociées (limitée par la durée nécessaire pour avoir une pénétration suffisante du fluorochrome qui est difficile en eau de mer), sa dégradation par la lumière, ou encore avec les problèmes techniques inhérents au système d'imagerie calcique, etc. Pour tenter de palier à ces problèmes techniques, nous avons essayé le patch-clamp (configuration cellule-entière) sur les cellules musculaires dissociées, afin de tenter de visualiser la modification des courants membranaires lors de la perfusion d'acétylcholine (expérience réalisée grâce à la collaboration d'Alexandre Mourot, Neurophysiologie et Comportements UMR 8246, CNRS, UPMC). Cette technique présente l'avantage d'être réalisable directement après la dissociation des cellules. Cependant, elle demande un choix très précis des concentrations intracellulaires et extracellulaires à appliquer. Nous avons essayé celles proposées par Moroz et ses collaborateurs (Moroz et al. 2014 – sur des cellules musculaires pariétales de *P. bachei*) et par Dubas et ses collaborateurs (Dubas et al. 1988 – sur des cellules musculaires géantes de *Mnemiopsis*) mais nous ne sommes parvenus à enregistrer aucun courant ionique dans les conditions contrôles (sans perfusion d'acétylcholine). Maintenant que la technique de dissociation est

bien maîtrisée, il serait intéressant de tenter de nouveau cette expérience dans le but d'avoir des résultats plus facilement reproductibles. Un dernier aspect sur lequel nos résultats risquent d'être discutés concerne la spécificité de l'anticorps dirigé contre l'acétylcholine. Afin de répondre à cet argument, nous avons testé cet anticorps au niveau de zones cholinergiques du cerveau de souris (expérience réalisée au sein du laboratoire de Philippe Faure, Neurophysiologie et Comportements UMR 8246, CNRS, UPMC). Un contre-marquage à l'aide d'un anticorps anti-ChAT a été réalisé afin de localiser les neurones cholinergiques. On a alors observé un marquage acétylcholine positif au niveau de la majorité des neurones et, même si l'intensité du marquage semble plus intense au niveau des neurones ChAT positifs, cette expérience demande à être reproduite. Il semble nécessaire de modifier la dilution de l'anticorps anti-acétylcholine. Pour finir, l'une des pièces manquantes de notre argumentaire consiste en la mise en évidence directe de la synthèse d'acétylcholine par la protéine PpiCPT2.2. Nous avons pour cela réfléchi à un protocole expérimental qui consisterait à faire exprimer cette protéine en système hétérologue (système bactérien) et à tester la synthèse d'acétylcholine (à partir de choline et d'acétyl-coenzyme A) par une technique de détection autoradiographique. Ce test serait aussi appliqué aux protéines CPT1 et CPT2 de *P. pileus* (témoins négatifs) ainsi qu'à la protéine humaine ChAT (témoins positif). Pour cela, nous avons contacté un collaborateur (Mickael Poidevin, Gif-sur-Yvette) qui a l'expertise ainsi que le matériel nécessaire pour la réalisation de cette expérience. Nous espérons pouvoir mettre en place ce projet à la rentrée 2015.

L'intérêt de ces résultats apparaît comme majeur puisque, depuis la publication de Moroz et ses collaborateurs (Moroz et al. 2014), l'absence des neurotransmetteurs classiques chez les Cténaïres, même si souvent discutée, reste l'un des points forts de l'argumentaire en faveur de l'origine indépendante du système nerveux des Cténaïres par rapport à celui des Cnidaires et des Bilatériens. On peut alors se demander en quoi ces résultats représentent un argument en faveur de l'homologie de la cellule nerveuse.

Cette question au centre du débat, alimentée par les publications récentes plaçant les Cténaïres « à la base », reste complexe et ne semble pas trouver de réponse si l'on considère le neurone comme un caractère unique. En effet, la difficulté de la compréhension de l'évolution de la cellule nerveuse semble être liée au fait que si l'on déconstruit la cellule nerveuse en ses différents composants, bon nombre d'entre eux ne sont pas des innovations des Eumétazoaires mais ont été recrutés à partir d'éléments anciens. Il ne s'agit donc pas d'innovations en lien avec l'acquisition d'un système nerveux. C'est le cas pour les neurotransmetteurs classiques, pour lesquels les cellules nerveuses auraient recruté des systèmes de communication paracrine préexistants. La question fondamentale n'est donc pas celle de la présence d'un neurotransmetteur et du système associé mais plutôt celle de son recrutement en contexte nerveux. Celui-ci peut s'être fait de façon unique chez l'ancêtre commun des Eumétazoaires ou plusieurs fois de façon indépendante. Là encore, la question est complexe et le scénario peut être différent en fonction du système de neurotransmission mais aussi, en fonction des

acteurs de chaque système de transmission. En ce qui concerne le système cholinergique, nous possédons toutefois un argument majeur qui permettrait de trancher en faveur d'un recrutement unique. En effet, le gène codant pour le transporteur à haute affinité de la choline (CHT) constitue une innovation des Eumétazoaires et est connu comme étant spécifique du système nerveux (Brandon 2004, Black & Rylett 2012), à l'exception de quelques rares cas chez les Mammifères mais aussi chez les Cténares comme nous avons pu le démontrer. On peut alors supposer que cette acquisition chez l'ancêtre commun des Eumétazoaires représente l'innovation clé ayant permis le recrutement du système cholinergique par la cellule nerveuse. Son expression en quelques sites non nerveux chez les Cténares et les Mammifères pourrait être témoin de son utilisation ancestrale à la fois en contexte neural et en contexte non neural chez l'ancêtre commun des Eumétazoaires. Ce scénario implique donc *de facto* que l'ancêtre commun des Eumétazoaires avait des cellules nerveuses et donc l'homologie. De plus, il ne peut se comprendre que dans le cas de la monophylie des Eumétazoaires. L'étude du système cholinergique des Cténares apparaît alors comme un élément clé de la compréhension de l'évolution des Eumétazoaires et de leur système nerveux.

La question de l'homologie de la cellule nerveuse ne semble donc pouvoir se résoudre que si l'on envisage séparément l'évolution de chacun des éléments qui la constitue et une évolution mosaïque de chacun de ses composants apparaît comme étant le scénario le plus vraisemblable.

Bibliographie

- Alarcón, C., Zaromytidou, A.-I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A.N., Manova-Todorova, K., Macias, M.J., Sapkota, G., Pan, D., Massagué, J., 2009. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* 139, 757–769. doi:10.1016/j.cell.2009.09.035
- Alberts, B., Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, 2011. *Biologie moléculaire de la cellule* 4e édition.
- Alexopoulos, H., Böttger, A., Fischer, S., Levin, A., Wolf, A., Fujisawa, T., Hayakawa, S., Gojobori, T., Davies, J.A., David, C.N., Bacon, J.P., 2004. Evolution of gap junctions: the missing link? *Curr. Biol.* 14, R879–880. doi:10.1016/j.cub.2004.09.067
- Alié, A., 2010. *Etudes anatomiques et moléculaires chez le cténaire Pleurobrachia pileus : aspects de l'évolution des cellules souches et du système neuro-sensoriel*. UPMC, Paris.
- Alié, A., Leclère, L., Jager, M., Dayraud, C., Chang, P., Le Guyader, H., Quéinnec, E., Manuel, M., 2011. Somatic stem cells express Piwi and Vasa genes in an adult ctenophore: Ancient association of “germline genes” with stemness. *Developmental Biology* 350, 183–197. doi:10.1016/j.ydbio.2010.10.019
- Alié, A., Manuel, M., 2010. The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans. *BMC Evol. Biol.* 10, 34. doi:10.1186/1471-2148-10-34
- Ancil, D.M., 1985. Ultrastructure of the luminescent system of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Cell Tissue Res.* 242, 333–340. doi:10.1007/BF00214545
- Ancil, M., 2009. Chemical transmission in the sea anemone *Nematostella vectensis*: A genomic perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 4, 268–289. doi:10.1016/j.cbd.2009.07.001
- Ancil, M., Grimmelikhuijzen, C.J., 1989. Excitatory action of the native neuropeptide anthoramide on muscles in the pennatulid *Renilla köllikeri*. *Gen. Pharmacol.* 20, 381–384.
- Anderson, P.A., Grünert, U., 1988. Three-dimensional structure of bidirectional, excitatory chemical synapses in the jellyfish *Cyanea capillata*. *Synapse* 2, 606–613. doi:10.1002/syn.890020605
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J., 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.
- Atwood, H.L., 1976. Organization and synaptic physiology of crustacean neuromuscular systems. *Prog. Neurobiol.* 7, 291–391.
- Atwood, H.L., Cooper, R.L., 1995. Functional and Structural Parallels in Crustacean and *Drosophila* Neuromuscular Systems. *American Zoologist* 35, 556–565.
- Atwood, H.L., Govind, C.K., Wu, C.F., 1993. Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J. Neurobiol.* 24, 1008–1024. doi:10.1002/neu.480240803
- Aylon, Y., Ofir-Rosenfeld, Y., Yabuta, N., Lapi, E., Nojima, H., Lu, X., Oren, M., 2010. The *Lats2* tumor suppressor augments p53-mediated apoptosis by promoting the nuclear proapoptotic function of ASPP1. *Genes Dev.* 24, 2420–2429. doi:10.1101/gad.1954410
- Badouel, C., Garg, A., McNeill, H., 2009. Herding Hippos: regulating growth in flies and

- man. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 837–843. doi:10.1016/j.ceb.2009.09.010
- Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., Tiunova, A., Born, T.L., Usman, N., Staroverov, D., Lukyanov, S., Panchin, Y., 2004. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 83, 706–716. doi:10.1016/j.ygeno.2003.09.025
- Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., Hall, M.N., 1996. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell* 7, 25–42. doi:10.1091/mbc.7.1.25
- Bardou, I., Maubert, E., Leprince, J., Chichery, R., Cocquerelle, C., Launay, S., Vivien, D., Vaudry, H., Agin, V., 2009. Distribution of oxytocin-like and vasopressin-like immunoreactivities within the central nervous system of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Cell Tissue Res.* 336, 249–266. doi:10.1007/s00441-009-0763-4
- Barkhimer, T.V., Kirchhoff, J.R., Hudson, R.A., Messer Jr, W.S., Viranga Tillekeratne, L.M., 2008. Electrochemical detection of acetylcholine and choline: application to the quantitative nonradiochemical evaluation of choline transport. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392, 651–662. doi:10.1007/s00216-008-2307-2
- Bateman, J.M., McNeill, H., 2004. Temporal control of differentiation by the insulin receptor/tor pathway in *Drosophila*. *Cell* 119, 87–96.
- Bennett, F.C., Harvey, K.F., 2006. Fat cadherin modulates organ size in *Drosophila* via the Salvador/Warts/Hippo signaling pathway. *Curr. Biol.* 16, 2101–2110. doi:10.1016/j.cub.2006.09.045
- Biallas, S., Wilker, S., Lips, K.S., Kummer, W., Grando, S.A., Padberg, W., Grau, V., 2007. Immunohistochemical detection of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha9 and alpha10 in rat lung isografts and allografts. *Life Sci.* 80, 2286–2289. doi:10.1016/j.lfs.2007.01.043
- Bigelow, H., 1926. Plankton of the offshore waters of the Gulf of Maine., U.S. Bureau of Fisheries. ed, Doc. 968. Government Print Office, Washington.
- Bigelow, H.B., 1912. The ctenophores of the “Albatross” expedition. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 369–404.
- Bilbaut, A., Meech, R.W., Hernandez-Nicaise, M.L., 1988. Isolated giant smooth muscle fibres in *Beroe ovata* : ionic dependence of action potentials reveals two distinct types of fibre. *J. exp. Biol.* 135, 343–36.
- Binyon J., 1972. Physiology of nerves and muscles., in: *Physiology of Echinoderms*. Oxford, pp. 175–199.
- Bisaglia, M., Greggio, E., Beltramini, M., Bubacco, L., 2013. Dysfunction of dopamine homeostasis: clues in the hunt for novel Parkinson’s disease therapies. *FASEB J* 27, 2101–2110. doi:10.1096/fj.12-226852
- Black, S.A.G., Rylett, R.J., 2012. Choline transporter CHT regulation and function in cholinergic neurons. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 12, 114–121.
- Blanchet, M.-R., Israël-Assayag, E., Daleau, P., Beaulieu, M.-J., Cormier, Y., 2006. Dimethylphenylpiperazinium, a nicotinic receptor agonist, downregulates inflammation in monocytes/macrophages through PI3K and PLC chronic activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 291, L757–763. doi:10.1152/ajplung.00409.2005
- Borchiellini, C., Manuel, M., Alivon, E., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Le Parco, Y., 2001. Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *Journal of Evolutionary Biology* 14, 171–179. doi:10.1046/j.1420-9101.2001.00244.x
- Bosch, T.C., David, C.N., 1984. Growth regulation in *Hydra*: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev. Biol.* 104, 161–171.

- Böttger, A., Alexandrova, O., 2007. Programmed cell death in Hydra. *Semin. Cancer Biol.* 17, 134–146. doi:10.1016/j.semcancer.2006.11.008
- Bouché, N., Lacombe, B., Fromm, H., 2003. GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends Cell Biol.* 13, 607–610.
- Brandon, E.P., 2004. Choline Transporter 1 Maintains Cholinergic Function in Choline Acetyltransferase Haploinsufficiency. *Journal of Neuroscience* 24, 5459–5466. doi:10.1523/JNEUROSCI.1106-04.2004
- Bray, S.J., 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 678–689. doi:10.1038/nrm2009
- Brown, A., Li, Y., Slaughter, T., Black, M.M., 1993. Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. *J. Cell. Sci.* 104 (Pt 2), 339–352.
- Brown, D.A., 2006. Acetylcholine. *Br J Pharmacol* 147, S120–S126. doi:10.1038/sj.bjp.0706474
- Brunelli, G., Spano, P., Barlati, S., Guarneri, B., Barbon, A., Bresciani, R., Pizzi, M., 2005. Glutamatergic reinnervation through peripheral nerve graft dictates assembly of glutamatergic synapses at rat skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8752–8757. doi:10.1073/pnas.0500530102
- Brusca, Brusca, 2005. *Invertebrates - Second Edition*, 2 edition. ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A., Monyer, H., 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13644–13649. doi:10.1073/pnas.2233464100
- Bullock, T.H., Horridge, G.A., 1965. *Structure and function in the nervous systems of invertebrates*. W. H. Freeman.
- Burke, J.P., Mulsow, J.J., O’Keane, C., Docherty, N.G., Watson, R.W.G., O’Connell, P.R., 2007. Fibrogenesis in Crohn’s Disease. *The American Journal of Gastroenterology* 102, 439–448. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.01010.x
- Buzgariu, W., Chera, S., Galliot, B., 2008. Chapter Twenty-Six Methods to Investigate Autophagy During Starvation and Regeneration in Hydra, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 409–437.
- Caldwell, H.K., Lee, H.-J., Macbeth, A.H., Young, W.S., 2008. Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Prog. Neurobiol.* 84, 1–24. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.10.007
- Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., Brummelkamp, T.R., 2007. YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Current Biology* 17, 2054–2060. doi:10.1016/j.cub.2007.10.039
- Campos, F., Sobrino, T., Ramos-Cabrer, P., Argibay, B., Agulla, J., Pérez-Mato, M., Rodríguez-González, R., Brea, D., Castillo, J., 2011. Neuroprotection by glutamate oxaloacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 1378–1386. doi:10.1038/jcbfm.2011.3
- Candal, E., Alunni, A., Thermes, V., Jamen, F., Joly, J.-S., Bourrat, F., 2007. Ol-insm1b, a SNAG family transcription factor involved in cell cycle arrest during medaka development. *Developmental Biology* 309, 1–17. doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.038
- Candal, E., Thermes, V., Joly, J.-S., Bourrat, F., 2004. Medaka as a model system for the characterisation of cell cycle regulators: a functional analysis of Ol-Gadd45 γ during early embryogenesis. *Mechanisms of Development, Medaka* 121, 945–958. doi:10.1016/j.mod.2004.03.007
- Candiani, S., Lacalli, T.C., Parodi, M., Oliveri, D., Pestarino, M., 2008. The cholinergic gene locus in amphioxus: Molecular characterization and developmental expression

- patterns. *Developmental Dynamics* 237, 1399–1411. doi:10.1002/dvdy.21541
- Cario, C., Nicaise, G., Hernandez-Nicaise, M.L., 1996. Cytochemical localization of Ca(2+)-ATPases and demonstration of ATP-dependent calcium sequestration in giant smooth muscle fibres of *Beroë*. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 17, 85–94.
- Cario-Toumaniantz, C., 1996. Le couplage excitation-contraction des fibres musculaires lisses géantes de *Beroë ovata* : supports structuraux et signalisation calcique. Ph. D Thesis Nice-Sophia Antipolis.
- Caudle, W.M., Richardson, J.R., Wang, M.Z., Taylor, T.N., Guillot, T.S., McCormack, A.L., Colebrooke, R.E., Di Monte, D.A., Emson, P.C., Miller, G.W., 2007. Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *J. Neurosci.* 27, 8138–8148. doi:10.1523/JNEUROSCI.0319-07.2007
- Chan, J.P., Staab, T.A., Wang, H., Mazzasette, C., Butte, Z., Sieburth, D., 2013. Extrasynaptic muscarinic acetylcholine receptors on neuronal cell bodies regulate presynaptic function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 33, 14146–14159. doi:10.1523/JNEUROSCI.1359-13.2013
- Chan-Palay, V., Engel, A.G., Wu, J.Y., Palay, S.L., 1982. Coexistence in human and primate neuromuscular junctions of enzymes synthesizing acetylcholine, catecholamine, taurine, and gamma-aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7027–7030.
- Chapman, D.M., 1985. X-RAY Microanalysis of Selected Coelenterate Statoliths. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 65, 617 – 627. doi:10.1017/S0025315400052462
- Chen, J., Zheng, X.F., Brown, E.J., Schreiber, S.L., 1995. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4947–4951.
- Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.-C., Galliot, B., 2009. Apoptotic Cells Provide an Unexpected Source of Wnt3 Signaling to Drive Hydra Head Regeneration. *Developmental Cell* 17, 279–289. doi:10.1016/j.devcel.2009.07.014
- Chera, S., Ghila, L., Wenger, Y., Galliot, B., 2011. Injury-induced activation of the MAPK/CREB pathway triggers apoptosis-induced compensatory proliferation in hydra head regeneration. *Dev. Growth Differ.* 53, 186–201. doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01250.x
- Cho, E., Feng, Y., Rauskolb, C., Maitra, S., Fehon, R., Irvine, K.D., 2006. Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat. Genet.* 38, 1142–1150. doi:10.1038/ng1887
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K., 2006. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11, 506–525. doi:10.2478/s11658-006-0041-3
- Chun, C., 1880. Die ctenophoren des golfes von Neapel, und der angrenzenden meeresabschnitte. Eine monographie von Carl Chun. W. Engelmann, Leipzig.
- Chun, K., 2012. Die Ctenophoren Der Plankton-expedition Nabu Press.
- Church, P.J., Whim, M.D., Lloyd, P.E., 1993. Modulation of neuromuscular transmission by conventional and peptide transmitters released from excitatory and inhibitory motor neurons in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 13, 2790–2800.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Böttger, A., David, C.N., 1999. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. *Curr. Biol.* 9, 959–962.
- Collins, A.G., Schuchert, P., Marques, A.C., Jankowski, T., Medina, M., Schierwater, B., 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst. Biol.* 55, 97–115. doi:10.1080/10635150500433615

- Cordente, A.G., López-Viñas, E., Vázquez, M.I., Gómez-Puertas, P., Asins, G., Serra, D., Hegardt, F.G., 2006. Mutagenesis of specific amino acids converts carnitine acetyltransferase into carnitine palmitoyltransferase. *Biochemistry* 45, 6133–6141. doi:10.1021/bi0602664
- Dale, H.H., 1914. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 147–190.
- David, C.N., Gierer, A., 1974. Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. III. Nerve and nematocyte differentiation. *J. Cell. Sci.* 16, 359–375.
- Dayraud, C., 2011. Origine et Evolution des muscles et du système neuro-musculaire : Approches morpho-anatomique et moléculaire chez le cténaire *Pleurobrachia pileus*. UPMC, Paris.
- Dayraud, C., Alié, A., Jager, M., Chang, P., Le Guyader, H., Manuel, M., Quéinnec, E., 2012. Independent specialisation of myosin II paralogues in muscle vs. non-muscle functions during early animal evolution: a ctenophore perspective. *BMC Evolutionary Biology* 12, 107. doi:10.1186/1471-2148-12-107
- Delgado, L.M., Couve, E., Schmachtenberg, O., 2010. GABA and glutamate immunoreactivity in tentacles of the sea anemone *Phymactis papillosa* (LESSON 1830). *J. Morphol.* 271, 845–852. doi:10.1002/jmor.10838
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., Philippe, H., 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439, 965–968. doi:10.1038/nature04336
- Denayer, T., Locker, M., Borday, C., Deroo, T., Janssens, S., Hecht, A., van Roy, F., Perron, M., Vleminckx, K., 2008. Canonical Wnt signaling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic *Xenopus* eyes. *Stem Cells* 26, 2063–2074. doi:10.1634/stemcells.2007-0900
- Denker, E., Chatonnet, A., Rabet, N., 2008a. Acetylcholinesterase activity in *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria). *Chemico-Biological Interactions* 175, 125–128. doi:10.1016/j.cbi.2008.03.004
- Denker, E., Manuel, M., Leclère, L., Le Guyader, H., Rabet, N., 2008b. Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria). *Dev. Biol.* 315, 99–113. doi:10.1016/j.ydbio.2007.12.023
- Derelle, R., Manuel, M., 2007. Ancient connection between NKL genes and the mesoderm? Insights from *Tlx* expression in a ctenophore. *Dev. Genes Evol.* 217, 253–261. doi:10.1007/s00427-007-0131-x
- Dermietzel, R., Spray, D.C., 1993. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci.* 16, 186–192.
- Descarries, L., 1998. The hypothesis of an ambient level of acetylcholine in the central nervous system. *J. Physiol. Paris* 92, 215–220.
- Descarries, L., Gisiger, V., Steriade, M., 1997. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 53, 603–625.
- Descarries, L., Mechawar, N., 2000. Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog. Brain Res.* 125, 27–47. doi:10.1016/S0079-6123(00)25005-X
- Devès, M., 2012. Arrêt de la prolifération cellulaire pendant le développement embryonnaire : Etude transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs au cours de la croissance du système nerveux central chez le Médaka *Oryzias latipes*. Paris Sud.
- Devès, M., Bourrat, F., 2012. Transcriptional mechanisms of developmental cell cycle arrest: Problems and models. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23, 290–297. doi:10.1016/j.semcdb.2012.03.003

- Devlin, C.L., 2001. The pharmacology of gamma-aminobutyric acid and acetylcholine receptors at the echinoderm neuromuscular junction. *J. Exp. Biol.* 204, 887–896.
- Dibble, C.C., Manning, B.D., 2013. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat. Cell Biol.* 15, 555–564. doi:10.1038/ncb2763
- Dilly, P.N., 1972. The structures of the tentacles of *Rhabdopleura compacta* (Hemichordata) with special reference to neurociliary control. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 129, 20–39.
- Di Sansebastiano, G.-P., Fornaciari, S., Barozzi, F., Piro, G., Arru, L., 2014. New Insights on Plant Cell Elongation: A Role for Acetylcholine. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 4565–4582. doi:10.3390/ijms15034565
- Dotz, H.U., Zieglgänsberger, W., 1998. Visualization of neuronal form and function in brain slices by infrared videomicroscopy. *Histochem. J.* 30, 141–152.
- Drewes, L.R., Singh, A.K., 1988. Choline transport and metabolism in soman- or sarin-intoxicated brain. *J. Neurochem.* 50, 868–875.
- Droz, B., Rambourg, A., Koenig, H.L., 1975. The smooth endoplasmic reticulum: structure and role in the renewal of axonal membrane and synaptic vesicles by fast axonal transport. *Brain Res.* 93, 1–13.
- Dubas, F., Stein, P.G., Anderson, P.A.V., 1988. Ionic Currents of Smooth Muscle Cells Isolated from the Ctenophore *Mnemiopsis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 233, 99–121.
- Duncan, G., Collison, D., 2003. Role of the non-neuronal cholinergic system in the eye. *Life Sciences* 72, 2013–2019. doi:10.1016/S0024-3205(03)00064-X
- Dunlap, H.L., 1966. *Oogenesis in the Ctenophora*. University of Washington, Seattle, Washington.
- Dunlap-Pianka, H., 1974. Ctenophora, in: *Reproduction of Marine Invertebrates. Acoelomate and Pseudocoelomate Metazoans*, I. Giese, A.C., Pearse, J.S., New-York, pp. 281–304.
- Dunn, C.W., Hejnal, A., Matus, D.Q., Pang, K., Browne, W.E., Smith, S.A., Seaver, E., Rouse, G.W., Obst, M., Edgecombe, G.D., Sørensen, M.V., Haddock, S.H.D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R.M., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., Giribet, G., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745–749. doi:10.1038/nature06614
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., Sussman, J.L., 2010. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions* 187, 10–22. doi:10.1016/j.cbi.2010.01.042
- Edgar, B.A., 2006. From cell structure to transcription: Hippo forges a new path. *Cell* 124, 267–273. doi:10.1016/j.cell.2006.01.005
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- Ehebauer, M., Hayward, P., Martinez-Arias, A., 2006. Notch signaling pathway. *Sci. STKE* 2006, cm7. doi:10.1126/stke.3642006cm7
- Eimer, T., 1880. Versuche über Künstliche Theilbarkeit von *Beroë Ovatus*. *Archiv f. mikrosk. Anatomie* 17, 213–240. doi:10.1007/BF02952577
- Elliott, G.R.D., Leys, S.P., 2010. Evidence for glutamate, GABA and NO in coordinating behaviour in the sponge, *Ephydatia muelleri* (Demospongiae, Spongillidae). *J. Exp. Biol.* 213, 2310–2321. doi:10.1242/jeb.039859
- Erzen, I., Brzin, M., 1978. Cholinergic mechanisms in hydra. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol.* 59, 39–43.
- Falk-Vairant, J., Israel, M., Bruner, J., Stinnakre, J., Meunier, F.M., Gaultier, P., Meunier, F.A., Lesbats, B., Synguelakis, M., Correges, P., Dunant, Y., 1996. Enhancement of quantal transmitter release and mediatoaphore expression by cyclic AMP in fibroblasts

- loaded with acetylcholine. *Neuroscience* 75, 353–360.
- Feinstein-Rotkopf, Y., Arama, E., 2009. Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes. *Apoptosis* 14, 980–995. doi:10.1007/s10495-009-0346-6
- Fernández, B.G., Gaspar, P., Brás-Pereira, C., Jezowska, B., Rebelo, S.R., Janody, F., 2011. Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development* 138, 2337–2346. doi:10.1242/dev.063545
- Fishwick, K.J., Li, R.A., Halley, P., Deng, P., Storey, K.G., 2010. Initiation of neuronal differentiation requires PI3-kinase/TOR signalling in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology* 338, 215–225. doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.001
- Flood, P.R., 1970. The connection between spinal cord and notochord in amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 103, 115–128.
- Flood, P.R., 1966. A peculiar mode of muscular innervation in amphioxus. Light and electron microscopic studies of the so-called ventral roots. *Journal of Comparative Neurology* 126, 181–217.
- Flood, P.R., Guthrie, D.M., Banks, J.R., 1969. Paramyosin muscle in the notochord of *Amphioxus*. *Nature* 222, 87–88.
- Florey, E., Cahill, M.A., 1977. Ultrastructure of sea urchin tube feet. Evidence for connective tissue involvement in motor control. *Cell Tissue Res.* 177, 195–214.
- Forde, B.G., Lea, P.J., 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J. Exp. Bot.* 58, 2339–2358. doi:10.1093/jxb/erm121
- Franc, J., 1985. La mésogée des cténaires: approches ultrastructurale, biochimique et métabolique. Claude Bernard, Lyon I.
- Fujii, T., Takada-Takatori, Y., Kawashima, K., 2008. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 186–192.
- Fujisawa, T., David, C.N., 1984. Loss of differentiating nematocytes induced by regeneration and wound healing in *Hydra*. *J. Cell. Sci.* 68, 243–255.
- Fu, W.M., Liou, J.C., Lee, Y.H., Liou, H.C., 1995. Potentiation of neurotransmitter release by activation of presynaptic glutamate receptors at developing neuromuscular synapses of *Xenopus*. *J. Physiol. (Lond.)* 489 (Pt 3), 813–823.
- Galderisi, U., Jori, F.P., Giordano, A., 2003. Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 22, 5208–5219. doi:10.1038/sj.onc.1206558
- Galliot, B., 2012. *Hydra*, a fruitful model system for 270 years. *The International Journal of Developmental Biology* 56, 411–423. doi:10.1387/ijdb.120086bg
- Galliot, B., Chera, S., 2010. The *Hydra* model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration. *Trends Cell Biol.* 20, 514–523. doi:10.1016/j.tcb.2010.05.006
- Galliot, B., Ghila, L., 2010. Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Molecular Reproduction and Development* 77, 837–855. doi:10.1002/mrd.21206
- Galliot, B., Miljkovic-Licina, M., de Rosa, R., Chera, S., 2006. *Hydra*, a niche for cell and developmental plasticity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 492–502. doi:10.1016/j.semcdb.2006.05.005
- Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., Chera, S., 2009. Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Developmental Biology* 332, 2–24. doi:10.1016/j.ydbio.2009.05.563
- Gammelsaeter, R., Frøyland, M., Aragón, C., Danbolt, N.C., Fortin, D., Storm-Mathisen, J., Davanger, S., Gundersen, V., 2004. Glycine, GABA and their transporters in

- pancreatic islets of Langerhans: evidence for a paracrine transmitter interplay. *J. Cell. Sci.* 117, 3749–3758. doi:10.1242/jcs.01209
- Gardner, C.R., Walker, R.J., 1982. The roles of putative neurotransmitters and neuromodulators in annelids and related invertebrates. *Prog. Neurobiol.* 18, 81–120.
- Gazave, E., Lapébie, P., Richards, G.S., Brunet, F., Ereskovsky, A.V., Degnan, B.M., Borchiellini, C., Vervoort, M., Renard, E., 2009. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evol. Biol.* 9, 249. doi:10.1186/1471-2148-9-249
- Gee, K.R., Brown, K.A., Chen, W.N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., Johnson, I., 2000. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 97–106. doi:10.1054/ceca.1999.0095
- Gerschenfeld, H.M., 1973. Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.* 53, 1–119.
- Geuna, S., 2007. Spinal cord injury treatment by induction of a shift from cholinergic to glutamatergic innervation of muscle fibers. *Muscle & Nerve* 35, 5–7. doi:10.1002/mus.20687
- Gilbert, S.F., 2013. *Developmental Biology (Looseleaf)*, Tenth Edition, 10 edition. ed. Sinauer Associates, Inc.
- Goulev, Y., Fauny, J.D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., Zider, A., 2008. SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 18, 435–441. doi:10.1016/j.cub.2008.02.034
- Grando, S.A., Kawashima, K., Kirkpatrick, C.J., Meurs, H., Wessler, I., 2012. The non-neuronal cholinergic system: basic science, therapeutic implications and new perspectives. *Life Sci.* 91, 969–972. doi:10.1016/j.lfs.2012.10.004
- Greenamyre, J.T., Porter, R.H., 1994. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* 44, S7–13.
- Green, K.D., Porter, V.R., Zhang, Y., Garneau-Tsodikova, S., 2010. Redesign of Cosubstrate Specificity and Identification of Important Residues for Substrate Binding to hChAT. *Biochemistry* 49, 6219–6227. doi:10.1021/bi1007996
- Grimmelikhuijzen, C.J., Dierickx, K., Boer, G.J., 1982. Oxytocin/vasopressin-like immunoreactivity is present in the nervous system of hydra. *Neuroscience* 7, 3191–3199.
- Grimmelikhuijzen, C.J., Leviev, I., Carstensen, K., 1996. Peptides in the nervous systems of cnidarians: structure, function, and biosynthesis. *Int. Rev. Cytol.* 167, 37–89.
- Grimmelikhuijzen, C.J.P., Hauser, F., 2012. Mini-review: The evolution of neuropeptide signaling. *Regulatory Peptides* 177, S6–S9. doi:10.1016/j.regpep.2012.05.001
- Grishina, I.B., 2015. Mini-review: Does Notch promote or suppress cancer? New findings and old controversies. *Am J Clin Exp Urol* 3, 24–27.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Guthrie, D.M., Banks, J.R., 1969. The development of patterned activity by implanted ganglia and their peripheral connexions in *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* 50, 255–273.
- Haberberger, R.V., Pfeil, U., Lips, K.S., Kummer, W., 2002. Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J. Invest. Dermatol.* 119, 943–948. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.00182.x
- Halder, G., Johnson, R.L., 2011. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138, 9–22. doi:10.1242/dev.045500

- Han, J., Wang, B., Xiao, Z., Gao, Y., Zhao, Y., Zhang, J., Chen, B., Wang, X., Dai, J., 2008. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin. *Molecular and Cellular Neuroscience* 39, 118–124. doi:10.1016/j.mcn.2008.06.003
- Hao, Y., Chun, A., Cheung, K., Rashidi, B., Yang, X., 2008. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J. Biol. Chem.* 283, 5496–5509. doi:10.1074/jbc.M709037200
- Harris, K.D., Weiss, M., Zahavi, A., 2014. Why are neurotransmitters neurotoxic? An evolutionary perspective. *F1000Res* 3, 179. doi:10.12688/f1000research.4828.2
- Harris, K.D., Zahavi, A., 2013. The evolution of ACh and GABA as neurotransmitters: A hypothesis. *Medical Hypotheses* 81, 760–762. doi:10.1016/j.mehy.2013.07.045
- Harvey, K.F., Pflieger, C.M., Hariharan, I.K., 2003. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 114, 457–467.
- Hayashi, M., Morimoto, R., Yamamoto, A., Moriyama, Y., 2003. Expression and localization of vesicular glutamate transporters in pancreatic islets, upper gastrointestinal tract, and testis. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1375–1390.
- Hay, N., Sonenberg, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926–1945. doi:10.1101/gad.1212704
- Heider, K., 1927. Über das Nervensystem von *Beroe ovata*. *Nachrichten der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Math.-phys. Kl.*
- Heitman, J., Movva, N.R., Hall, M.N., 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905–909.
- Hejnol, A., Obst, M., Stamatakis, A., Ott, M., Rouse, G.W., Edgecombe, G.D., Martinez, P., Baguñà, J., Bailly, X., Jondelius, U., Wiens, M., Müller, W.E.G., Seaver, E., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., Giribet, G., Dunn, C.W., 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc. Biol. Sci.* 276, 4261–4270. doi:10.1098/rspb.2009.0896
- Hernandez-Nicaise, M., 1991. Ctenophora, in: *Microscopic Anatomy of the Invertebrates*. Harrison FW, Westfall JA, New York, p. p 359–418.
- Hernandez-Nicaise, M.-L., 1974. Système nerveux et intégration chez les Cténaïres: étude ultrastructurale et comportementale.
- Hernandez-Nicaise, M.L., 1973a. The nervous system of ctenophores. III. Ultrastructure of synapses. *J. Neurocytol.* 2, 249–263.
- Hernandez-Nicaise, M.L., 1973b. [The nervous system of ctenophores. II. The nervous elements of the mesoglea of beroids and cydippids (author's transl)]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 143, 117–133.
- Hernandez-Nicaise, M.L., 1973c. [The nervous system of ctenophores. I. Structure and ultrastructure of the epithelial nerve-nets]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 137, 223–250.
- Hernandez-Nicaise, M.L., 1968a. [Distribution and ultrastructure of symmetrical synapses in the Ctenaire nervous system]. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.* 267, 1731–1734.
- Hernandez-Nicaise, M.L., 1968b. Specialized connexions between nerve cells and mesenchymal cells in ctenophores. *Nature* 217, 1075–1076.
- Hernandez-Nicaise, M.L., Amsellem, J., 1980a. Ultrastructure of the giant smooth muscle fiber of the ctenophore *Beroe ovata*. *J. Ultrastruct. Res.* 72, 151–168.
- Hernandez-Nicaise, M.L., Bilbaut, A., Malaval, L., Nicaise, G., 1982. Isolation of functional giant smooth muscle cells from an invertebrate: structural features of relaxed and contracted fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1884–1888.
- Hernandez-Nicaise, M.L., Mackie, G.O., Meech, R.W., 1980b. Giant smooth muscle cells of *Beroë*. Ultrastructure, innervation, and electrical properties. *J. Gen. Physiol.* 75, 79–

- Hernandez-Nicaise, M.-L., Nicaise, G., Malaval, L., 1984. Giant Smooth Muscle Fibers of the Ctenophore *Mnemiopsis leydii*: Ultrastructural Study of in situ and Isolated Cells. *Biological Bulletin* 167, 210–228. doi:10.2307/1541349
- Hertwig, R., 1880. Ueber den Bau der Ctenophoren. *Jena Z Naturwiss* 93–457.
- Hiemer, S.E., Varelas, X., 2013. Stem cell regulation by the Hippo pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2323–2334. doi:10.1016/j.bbagen.2012.07.005
- Holtmann, M., Thurm, U., 2001. Mono- and oligo-vesicular synapses and their connectivity in a Cnidarian sensory epithelium (*Coryne tubulosa*). *J. Comp. Neurol.* 432, 537–549.
- Horie, T., Nakagawa, M., Sasakura, Y., Kusakabe, T.G., 2009. Cell type and function of neurons in the ascidian nervous system: Nervous system of the ascidian larva. *Development, Growth & Differentiation* 51, 207–220. doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01105.x
- Horiuchi, Y., Kimura, R., Kato, N., Fujii, T., Seki, M., Endo, T., Kato, T., Kawashima, K., 2003. Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sciences* 72, 1745–1756. doi:10.1016/S0024-3205(02)02478-5
- Horridge, G.A., 1965. RELATIONS BETWEEN NERVES AND CILIA IN CTENOPHORES. *Am. Zool.* 5, 357–375.
- Horridge, G., Mackay, B., 1964. Neurociliary synapses in Pleurobrachia (Ctenophora). *J. CELL SCI* 3, 163.
- Horridge, G., Mackay, B., 1962. Naked axons and symmetrical synapses in coelenterates. *J. CELL SCI* 3, 531.
- Houliston, E., Momose, T., Manuel, M., 2010. *Clytia hemisphaerica*: a jellyfish cousin joins the laboratory. *Trends Genet.* 26, 159–167. doi:10.1016/j.tig.2010.01.008
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., Pan, D., 2005. The Hippo Signaling Pathway Coordinately Regulates Cell Proliferation and Apoptosis by Inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122, 421–434. doi:10.1016/j.cell.2005.06.007
- Hufnagel, L.A., Kass-simon, G., 1988. Functional anatomy of nematocyte innervation in battery cell complexes of the hydra tentacle.
- Ikmi, A., Gaertner, B., Seidel, C., Srivastava, M., Zeitlinger, J., Gibson, M.C., 2014. Molecular Evolution of the Yap/Yorkie Proto-Oncogene and Elucidation of Its Core Transcriptional Program. *Molecular Biology and Evolution* 31, 1375–1390. doi:10.1093/molbev/msu071
- Imai, J.H., Meinertzhagen, I.A., 2007. Neurons of the ascidian larval nervous system in *Ciona intestinalis*: I. Central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 501, 316–334. doi:10.1002/cne.21246
- Jacinto, E., Lorberg, A., 2008. TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochemical Journal* 410, 19–37. doi:10.1042/BJ20071518
- Jager, M., Chiori, R., Alié, A., Dayraud, C., Quéinnec, E., Manuel, M., 2011a. New insights on ctenophore neural anatomy: Immunofluorescence study in *Pleurobrachia pileus* (Müller, 1776). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 316B, 171–187. doi:10.1002/jez.b.21386
- Jager, M., Dayraud, C., Mialot, A., Quéinnec, E., le Guyader, H., Manuel, M., 2013. Evidence for Involvement of Wnt Signalling in Body Polarities, Cell Proliferation, and the Neuro-Sensory System in an Adult Ctenophore. *PLoS ONE* 8, e84363. doi:10.1371/journal.pone.0084363
- Jager, M., Quéinnec, E., Chiori, R., Le Guyader, H., Manuel, M., 2008. Insights into the early evolution of SOX genes from expression analyses in a ctenophore. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 310, 650–667. doi:10.1002/jez.b.21244
- Jager, M., Quéinnec, E., Houliston, E., Manuel, M., 2006. Expansion of the SOX gene family

- predated the emergence of the Bilateria. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 468–477. doi:10.1016/j.ympev.2005.12.005
- Jager, M., Quéinnec, E., Le Guyader, H., Manuel, M., 2011b. Multiple Sox genes are expressed in stem cells or in differentiating neuro-sensory cells in the hydrozoan *Clytia hemisphaerica*. *Evodevo* 2, 12. doi:10.1186/2041-9139-2-12
- Jékely, G., 2013. Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 8702–8707. doi:10.1073/pnas.1221833110
- Jia, J., Zhang, W., Wang, B., Trinko, R., Jiang, J., 2003. The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev.* 17, 2514–2519. doi:10.1101/gad.1134003
- Johnson, R., Halder, G., 2014. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 13, 63–79. doi:10.1038/nrd4161
- Johnson, W.S., Allen, D.M., 2012. *Zooplankton of the Atlantic and Gulf Coasts: A Guide to Their Identification and Ecology*. JHU Press.
- Jones, C.E., Underwood, C.K., Coulson, E.J., Taylor, P.J., 2007. Copper induced oxidation of serotonin: analysis of products and toxicity. *J. Neurochem.* 102, 1035–1043. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04602.x
- Jorgensen, E.M., 2014. Animal evolution: looking for the first nervous system. *Curr. Biol.* 24, R655–658. doi:10.1016/j.cub.2014.06.036
- Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., Verstreken, P., Hiesinger, P.R., Bellen, H.J., Halder, G., 2002. Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development* 129, 5719–5730.
- Kango-Singh, M., Singh, A., 2009. Regulation of organ size: insights from the *Drosophila* Hippo signaling pathway. *Dev. Dyn.* 238, 1627–1637. doi:10.1002/dvdy.21996
- Karczmar, A.G., 1996. The Otto Loewi Lecture. Loewi's discovery and the XXI century. *Prog. Brain Res.* 109, 1–27, xvii. doi:10.1016/S0079-6123(08)62084-1
- Karnovsky, M.J., Roots, L., 1964. A "DIRECT-COLORING" THIOCHOLINE METHOD FOR CHOLINESTERASES. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 12, 219–221. doi:10.1177/12.3.219
- Käsbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, C.N., Dall'Armi, E., Staudigl, A., Stiening, B., Böttger, A., 2006. The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*. *Developmental Biology* 303, 376–390. doi:10.1016/j.ydbio.2006.11.022
- Kass-Simon, G., 1988. Towards a neuroethology of nematocyst discharge in the tentacles of *Hydra*, in: *The Biology of Nematocysts*. D.A. Hessinger and H.M. Lenhoff., San Diego, pp. 531–541.
- Kass-Simon, G., Pannaccione, A., Pierobon, P., 2003. GABA and glutamate receptors are involved in modulating pacemaker activity in hydra. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 136, 329–342.
- Kass-Simon, G., Passano, L.M., 1978. A neuropharmacological analysis of the pacemakers and conducting tissues of *Hydra attenuata*. *J. Comp. Physiol.* 128, 71–79. doi:10.1007/BF00668375
- Kass-Simon, G., Pierobon, P., 2007. Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146, 9–25. doi:10.1016/j.cbpa.2006.09.008
- Kass-Simon, G., Scappaticci, Jr., A.A., 2002. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Canadian Journal of Zoology* 80, 1772–1794. doi:10.1139/z02-135
- Kass-Simon, G., Zompa, M.A., Scappaticci, A.A., Zackroff, R.V., Hufnagel, L.A., 2009. Nucleolar binding of an anti-NMDA receptor antibody in hydra: a non-canonical role

- for an NMDA receptor protein? *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 311, 763–775. doi:10.1002/jez.563
- Kawagoe, R., Onodera, K., Takeuchi, A., 1981. Release of glutamate from the crayfish neuromuscular junction. *The Journal of Physiology* 312, 225–236. doi:10.1113/jphysiol.1981.sp013625
- Kodaka, M., Hata, Y., 2015. The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 285–306. doi:10.1007/s00018-014-1742-9
- Kohsaka, H., Nose, A., 2009. Target recognition at the tips of postsynaptic filopodia: accumulation and function of Capricious. *Development* 136, 1127–1135. doi:10.1242/dev.027920
- Kohsaka, H., Okusawa, S., Itakura, Y., Fushiki, A., Nose, A., 2012. Development of larval motor circuits in *Drosophila*. *Development, Growth & Differentiation* 54, 408–419. doi:10.1111/j.1440-169X.2012.01347.x
- Kohsaka, H., Takasu, E., Nose, A., 2007. In vivo induction of postsynaptic molecular assembly by the cell adhesion molecule Fasciclin2. *J. Cell Biol.* 179, 1289–1300. doi:10.1083/jcb.200705154
- Komuro, A., Nagai, M., Navin, N.E., Sudol, M., 2003. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 278, 33334–33341. doi:10.1074/jbc.M305597200
- Kumar, N.M., Gilula, N.B., 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381–388.
- Kummer, W., Lips, K.S., 2006. Non-neuronal acetylcholine release and its contribution to COPD pathology. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 3, 47–52. doi:10.1016/j.ddmec.2006.02.008
- Kummer, W., Lips, K.S., Pfeil, U., 2008. The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochemistry and Cell Biology* 130, 219–234. doi:10.1007/s00418-008-0455-2
- Kurusu, M., Cording, A., Taniguchi, M., Menon, K., Suzuki, E., Zinn, K., 2008. A screen of cell-surface molecules identifies leucine-rich repeat proteins as key mediators of synaptic target selection. *Neuron* 59, 972–985. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.037
- Kuznetsov, S.G., Anton-Erxleben, F., Bosch, T.C.G., 2002. Epithelial interactions in *Hydra*: apoptosis in interspecies grafts is induced by detachment from the extracellular matrix. *J. Exp. Biol.* 205, 3809–3817.
- Kuznetsov, S., Lyanguzowa, M., Bosch, T.C., 2001. Role of epithelial cells and programmed cell death in *Hydra* spermatogenesis. *Zoology (Jena)* 104, 25–31. doi:10.1078/0944-2006-00005
- Lacalli, T.C., Kelly, S.J., 1999. Somatic motoneurons in amphioxus larvae: cell types, cell position and innervation patterns. *Acta Zoologica* 80, 113–124. doi:10.1046/j.1463-6395.1999.80220004.x
- Lai, Z.-C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, L.-L., Li, Y., 2005. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell* 120, 675–685. doi:10.1016/j.cell.2004.12.036
- Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G.M., Bate, M., 1997. The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motoneurons of *Drosophila*. *J. Neurosci.* 17, 9642–9655.
- Larousse.fr: encyclopédie et dictionnaires gratuits en ligne [WWW Document], n.d. URL <http://www.larousse.fr/> (accessed 8.13.15).
- Lawal, H.O., Krantz, D.E., 2013. SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Mol. Aspects Med.* 34, 360–372. doi:10.1016/j.mam.2012.07.005

- Layden, M.J., Martindale, M.Q., 2014. Non-canonical Notch signaling represents an ancestral mechanism to regulate neural differentiation. *Evodevo* 5, 30. doi:10.1186/2041-9139-5-30
- Layden, M.J., Meyer, N.P., Pang, K., Seaver, E.C., Martindale, M.Q., 2010. Expression and phylogenetic analysis of the *zic* gene family in the evolution and development of metazoans. *Evodevo* 1, 12. doi:10.1186/2041-9139-1-12
- Leclère, L., Jager, M., Barreau, C., Chang, P., Le Guyader, H., Manuel, M., Houliston, E., 2012. Maternally localized germ plasm mRNAs and germ cell/stem cell formation in the cnidarian *Clytia*. *Developmental Biology* 364, 236–248. doi:10.1016/j.ydbio.2012.01.018
- Lee, J.-H., Kim, T.-S., Yang, T.-H., Koo, B.-K., Oh, S.-P., Lee, K.-P., Oh, H.-J., Lee, S.-H., Kong, Y.-Y., Kim, J.-M., Lim, D.-S., 2008. A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse. *EMBO J.* 27, 1231–1242. doi:10.1038/emboj.2008.63
- Lee, K.-P., Lee, J.-H., Kim, T.-S., Kim, T.-H., Park, H.-D., Byun, J.-S., Kim, M.-C., Jeong, W.-I., Calvisi, D.F., Kim, J.-M., Lim, D.-S., 2010. The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 8248–8253. doi:10.1073/pnas.0912203107
- Lentz, T.L., Barnett, R.J., 1963. THE ROLE OF THE NERVOUS SYSTEM IN REGENERATING HYDRA: THE EFFECT OF NEUROPHARMACOLOGICAL AGENTS. *J. Exp. Zool.* 154, 305–327.
- Lentz, T.L., Barnett, R.J., 1961. Enzyme histochemistry of Hydra. *J. Exp. Zool.* 147, 125–149.
- Li, L., Stoeckert, C.J., Roos, D.S., 2003. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Res.* 13, 2178–2189. doi:10.1101/gr.1224503
- Lingle, C., Auerbach, A., 1983a. Comparison of excitatory currents activated by different transmitters on crustacean muscle. I. Acetylcholine-activated channels. *J. Gen. Physiol.* 81, 547–569.
- Lingle, C., Auerbach, A., 1983b. Comparison of excitatory currents activated by different transmitters on crustacean muscle. II. Glutamate-activated currents and comparison with acetylcholine currents present on the same muscle. *J. Gen. Physiol.* 81, 571–588.
- Lin, Y.C., Spencer, A.N., 2001. Localisation of intracellular calcium stores in the striated muscles of the jellyfish *Polyorchis penicillatus*: possible involvement in excitation-contraction coupling. *J. Exp. Biol.* 204, 3727–3736.
- Lips, K.S., Volk, C., Schmitt, B.M., Pfeil, U., Arndt, P., Miska, D., Ermert, L., Kummer, W., Koepsell, H., 2005. Polyspecific Cation Transporters Mediate Luminal Release of Acetylcholine from Bronchial Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33, 79–88. doi:10.1165/rcmb.2004-0363OC
- Lips, K.S., Wunsch, J., Zarghooni, S., Bschleipfer, T., Schukowski, K., Weidner, W., Wessler, I., Schwantes, U., Koepsell, H., Kummer, W., 2007. Acetylcholine and Molecular Components of its Synthesis and Release Machinery in the Urothelium. *European Urology* 51, 1042–1053. doi:10.1016/j.eururo.2006.10.028
- Long, X., Müller, F., Avruch, J., 2004. TOR action in mammalian cells and in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 279, 115–138.
- Long, X., Spycher, C., Han, Z.S., Rose, A.M., Müller, F., Avruch, J., 2002. TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. *Curr. Biol.* 12, 1448–1461.
- Lowe, C.J., Clarke, D.N., Medeiros, D.M., Rokhsar, D.S., Gerhart, J., 2015. The deuterostome context of chordate origins. *Nature* 520, 456–465. doi:10.1038/nature14434
- Lukasiuk, K., Pitkänen, A., 2000. GABA(A)-mediated toxicity of hippocampal neurons in

- vitro. *J. Neurochem.* 74, 2445–2454.
- Mackie, G.O., Mills, C.E., Singla, C.L., 1988. Structure and function of the prehensile tentilla of *Euplokamis* (Ctenophora, Cydippida). *Zoomorphology* 107, 319–337. doi:10.1007/BF00312216
- Mahoney, J.E., Mori, M., Szymaniak, A.D., Varelas, X., Cardoso, W.V., 2014. The Hippo Pathway Effector Yap Controls Patterning and Differentiation of Airway Epithelial Progenitors. *Developmental Cell* 30, 137–150. doi:10.1016/j.devcel.2014.06.003
- Makky, K., Mayer, A.N., 2007. Zebrafish Offers New Perspective on Developmental Role of TOR Signaling. *Organogenesis* 3, 67–69.
- Malagelada, C., Lopez-Toledano, M.A., Willett, R.T., Jin, Z.H., Shelanski, M.L., Greene, L.A., 2011. RTP801/REDD1 Regulates the Timing of Cortical Neurogenesis and Neuron Migration. *Journal of Neuroscience* 31, 3186–3196. doi:10.1523/JNEUROSCI.4011-10.2011
- Malomouzh, A.I., Mukhtarov, M.R., Nikolsky, E.E., Vyskocil, F., Lieberman, E.M., Urazaev, A.K., 2003. Glutamate regulation of non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction. *J. Neurochem.* 85, 206–213.
- Manuel, M., Borchiellini, C., Alivon, E., Le Parco, Y., Vacelet, J., Boury-Esnault, N., 2003. Phylogeny and evolution of calcareous sponges: monophyly of calcinea and calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. *Syst. Biol.* 52, 311–333.
- Mao, Y., Kucuk, B., Irvine, K.D., 2009. *Drosophila* lowfat, a novel modulator of Fat signaling. *Development* 136, 3223–3233. doi:10.1242/dev.036152
- Mao, Y., Rauskolb, C., Cho, E., Hu, W.-L., Hayter, H., Minihan, G., Katz, F.N., Irvine, K.D., 2006. Dachs: an unconventional myosin that functions downstream of Fat to regulate growth, affinity and gene expression in *Drosophila*. *Development* 133, 2539–2551. doi:10.1242/dev.02427
- Maric, D., Liu, Q.Y., Maric, I., Chaudry, S., Chang, Y.H., Smith, S.V., Sieghart, W., Fritschy, J.M., Barker, J.L., 2001. GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA(A) autoreceptor/Cl⁻ channels. *J. Neurosci.* 21, 2343–2360.
- Marie, H., Pratt, S.J., Betson, M., Epple, H., Kittler, J.T., Meek, L., Moss, S.J., Troyanovsky, S., Attwell, D., Longmore, G.D., Braga, V.M.M., 2003. The LIM protein Ajuba is recruited to cadherin-dependent cell junctions through an association with alpha-catenin. *J. Biol. Chem.* 278, 1220–1228. doi:10.1074/jbc.M205391200
- Mariscal, R.N., Bigger, C.H., McLean, R.B., 1976. The form and function of cnidarian spirocysts. 1. Ultrastructure of the capsule exterior and relationship to the tentacle sensory surface. *Cell Tissue Res.* 168, 465–474.
- Mariscal, R.N., McLean, R.B., Hand, C., 1977. The form and function of cnidarian spirocysts. 3. Ultrastructure of the thread and the function of spirocysts. *Cell Tissue Res.* 178, 427–433.
- Marlow, H., Arendt, D., 2014. Evolution: ctenophore genomes and the origin of neurons. *Curr. Biol.* 24, R757–761. doi:10.1016/j.cub.2014.06.057
- Marlow, H., Roettinger, E., Boekhout, M., Martindale, M.Q., 2012. Functional roles of Notch signaling in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev. Biol.* 362, 295–308. doi:10.1016/j.ydbio.2011.11.012
- Marshman, E., Booth, C., Potten, C.S., 2002. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91–98. doi:10.1002/bies.10028
- Martínez, D.E., Bridge, D., 2012. Hydra, the everlasting embryo, confronts aging. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 479–487. doi:10.1387/ijdb.113461dm
- Matsuda, Y., Oki, S., Kitaoka, K., Nagano, Y., Nojima, M., Desaki, J., 1988. Scanning

- electron microscopic study of denervated and reinnervated neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 11, 1266–1271. doi:10.1002/mus.880111211
- Matthies, D.S., Fleming, P.A., Wilkes, D.M., Blakely, R.D., 2006. The *Caenorhabditis elegans* choline transporter CHO-1 sustains acetylcholine synthesis and motor function in an activity-dependent manner. *J. Neurosci.* 26, 6200–6212. doi:10.1523/JNEUROSCI.5036-05.2006
- Mayor, A.G., 1912. *Ctenophores of the Atlantic coast of North America*, by Alfred Goldsborough Mayer ... Carnegie Institution of Washington, Washington, D.C.,.
- McCartney, B.M., Kulikaukas, R.M., LaJeunesse, D.R., Fehon, R.G., 2000. The neurofibromatosis-2 homologue, Merlin, and the tumor suppressor expanded function together in *Drosophila* to regulate cell proliferation and differentiation. *Development* 127, 1315–1324.
- McFARLANE, I.D., Graff, D., Grimmelikhuijzen, C.J.P., 1987. Excitatory Actions of Antho-RFamide, An Anthozoan Neuropeptide, on Muscles and Conducting Systems in the Sea Anemone *Calliactis Parasitica*. *J Exp Biol* 133, 157–168.
- McLean, H., Verellen, L., Caveney, S., Donly, C., 2005. Molecular cloning and functional characterization of a neuronal choline transporter from *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 61–72. doi:10.1016/j.ibmb.2004.10.005
- Meier, P., Finch, A., Evan, G., 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407, 796–801. doi:10.1038/35037734
- Meinertzhagen, I.A., Lemaire, P., Okamura, Y., 2004. The neurobiology of the ascidian tadpole larva: recent developments in an ancient chordate. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 453–485. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144255
- Meinertzhagen, I.A., Okamura, Y., 2001. The larval ascidian nervous system: the chordate brain from its small beginnings. *Trends Neurosci.* 24, 401–410.
- Michel, V., Yuan, Z., Ramsbair, S., Bakovic, M., 2006. Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 231, 490–504.
- Mikulski, Z., Hartmann, P., Jositsch, G., Zasłona, Z., Lips, K.S., Pfeil, U., Kurzen, H., Lohmeyer, J., Clauss, W.G., Grau, V., Fronius, M., Kummer, W., 2010. Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration. *Respir. Res.* 11, 133. doi:10.1186/1465-9921-11-133
- Miller, M.A., Technau, U., Smith, K.M., Steele, R.E., 2000. Oocyte development in *Hydra* involves selection from competent precursor cells. *Dev. Biol.* 224, 326–338. doi:10.1006/dbio.2000.9790
- Mills, 1996. Medusae, siphonophores and ctenophores of the Alborán Sea, southwestern Mediterranean. *Scientia Marina* 60, 145–163.
- Molgo, J., Colasante, C., Benoit, E., Poulain, B., 2009. Rappels structuraux et fonctionnels de la jonction neuromusculaire squelettique, in: *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*. Presented at the Journées annuelles du Groupe de Dermatologie Esthétique et Correctrice de la Société Française de Dermatologie (gDEC), Masson.
- Morel, N., 2003. Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H⁺ATPase. *Biol. Cell* 95, 453–457.
- Moretti, J., 2012. Déubiquitinations dans la voie de signalisation Notch. UPMC, Paris.
- Moroz, L.L., 2015. Convergent evolution of neural systems in ctenophores. *J. Exp. Biol.* 218, 598–611. doi:10.1242/jeb.110692
- Moroz, L.L., Kocot, K.M., Citarella, M.R., Dosung, S., Norekian, T.P., Povolotskaya, I.S., Grigorenko, A.P., Dailey, C., Berezikov, E., Buckley, K.M., Ptitsyn, A., Reshetov, D., Mukherjee, K., Moroz, T.P., Bobkova, Y., Yu, F., Kapitonov, V.V., Jurka, J., Bobkov, Y.V., Swore, J.J., Girardo, D.O., Fodor, A., Gusev, F., Sanford, R., Bruders, R., Kittler, E., Mills, C.E., Rast, J.P., Derelle, R., Solovyev, V.V., Kondrashov, F.A.,

- Swalla, B.J., Sweedler, J.V., Rogaev, E.I., Halanych, K.M., Kohn, A.B., 2014. The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems. *Nature* 510, 109–114. doi:10.1038/nature13400
- Moser, F., 1903. *Die Ctenophoren der Siboga-Expedition*. E.J. Brill, Leiden.
- Moss, A.G., Tamm, S.L., 1993. Patterns of electrical activity in comb plates of feeding *Pleurobrachia* (Ctenophora). *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 339, 1–16. doi:10.1098/rstb.1993.0001
- Moss, A.G., Tamm, S.L., 1986. Electrophysiological control of ciliary motor responses in the ctenophore *Pleurobrachia*. *J. Comp. Physiol. A* 158, 311–330.
- Müller, O.F., 1776. *Zoologiae Danicae prodromus: seu Animalium Daniae et Norvegiae indigenarum; characteres, nomina, et synonyma imprimis popularium / Auctore Othone Friderico Müller ... Impensis auctoris. typis Hallageriis, Havniae :*
- Nakajima, D., Nakayama, M., Kikuno, R., Hirose, M., Nagase, T., Ohara, O., 2001. Identification of three novel non-classical cadherin genes through comprehensive analysis of large cDNAs. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 94, 85–95.
- Nayak, T.K., Bruhova, I., Chakraborty, S., Gupta, S., Zheng, W., Auerbach, A., 2014. Functional differences between neurotransmitter binding sites of muscle acetylcholine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 17660–17665. doi:10.1073/pnas.1414378111
- Nguyen, V., Deschet, K., Henrich, T., Godet, E., Joly, J.-S., Wittbrodt, J., Chourrout, D., Bourrat, F., 1999. Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (*Oryzias latipes*): A morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation. *J. Comp. Neurol.* 413, 385–404. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19991025)413:3<385::AID-CNE3>3.0.CO;2-P
- Nicaise, G., Hernandez-Nicaise, M.L., Malaval, L., 1982. Electron microscopy and x-ray microanalysis of calcium-binding sites of the plasma membrane of *Beroë* giant smooth muscle fibre. *J. Cell. Sci.* 55, 353–364.
- Nickel, M., 2010. Evolutionary emergence of synaptic nervous systems: what can we learn from the non-synaptic, nerveless Porifera? *Invertebrate Biology* 129, 1–16. doi:10.1111/j.1744-7410.2010.00193.x
- Nielsen, C., Scharff, N., Eibye-Jacobsen, D., 1996. Cladistic analyses of the animal kingdom. *Biological Journal of the Linnean Society* 57, 385–410. doi:10.1111/j.1095-8312.1996.tb01857.x
- Nikitin, M., 2014. Bioinformatic prediction of *Trichoplax adhaerens* regulatory peptides. *General and Comparative Endocrinology* 212, 145–155. doi:10.1016/j.ygcen.2014.03.049
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Taniguchi, T., Agata, K., 2010. Analysis of motor function modulated by cholinergic neurons in planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience* 168, 18–30. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.03.038
- Noda, T., Ohsumi, Y., 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 3963–3966.
- Nosenko, T., Schreiber, F., Adamska, M., Adamski, M., Eitel, M., Hammel, J., Maldonado, M., Müller, W.E.G., Nickel, M., Schierwater, B., Vacelet, J., Wiens, M., Wörheide, G., 2013. Deep metazoan phylogeny: when different genes tell different stories. *Mol. Phylogenet. Evol.* 67, 223–233. doi:10.1016/j.ympev.2013.01.010
- Nüchter, T., Benoit, M., Engel, U., Ozbek, S., Holstein, T.W., 2006. Nanosecond-scale kinetics of nematocyst discharge. *Curr. Biol.* 16, R316–318. doi:10.1016/j.cub.2006.03.089
- Ohmori, H., Sasaki, S., 1977. Development of neuromuscular transmission in a larval tunicate. *J. Physiol. (Lond.)* 269, 221–254.

- Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T., Katsura, I., 2000. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat. Neurosci.* 3, 120–125. doi:10.1038/72059
- Oliver, D., Brinkmann, M., Sieger, T., Thurm, U., 2008. Hydrozoan nematocytes send and receive synaptic signals induced by mechano-chemical stimuli. *J. Exp. Biol.* 211, 2876–2888. doi:10.1242/jeb.018515
- Omerovic, J., Puggioni, E.M.R., Napoletano, S., Visco, V., Fraioli, R., Frati, L., Gulino, A., Alimandi, M., 2004. Ligand-regulated association of ErbB-4 to the transcriptional co-activator YAP65 controls transcription at the nuclear level. *Exp. Cell Res.* 294, 469–479. doi:10.1016/j.yexcr.2003.12.002
- Oren, M., Brickner, I., Brikner, I., Appelbaum, L., Levy, O., 2014. Fast neurotransmission related genes are expressed in non nervous endoderm in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *PLoS ONE* 9, e93832. doi:10.1371/journal.pone.0093832
- Osborne, R.H., 1996. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol. Ther.* 69, 117–142.
- Pajalunga, D., Mazzola, A., Salzano, A.M., Biferi, M.G., De Luca, G., Crescenzi, M., 2007. Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states. *The Journal of Cell Biology* 176, 807–818. doi:10.1083/jcb.200608109
- Palay, S.L., 1956. Structure and function in the neuron. *Prog Neurobiol* 1, 64–82.
- Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., Lukyanov, S., 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol.* 10, R473–474.
- Panchin, Y.V., 2005. Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J. Exp. Biol.* 208, 1415–1419. doi:10.1242/jeb.01547
- Pan, D., 2010. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* 19, 491–505. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011
- Pantalacci, S., Tapon, N., Léopold, P., 2003. The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 5, 921–927. doi:10.1038/ncb1051
- Peng, H.W., Slattery, M., Mann, R.S., 2009. Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev.* 23, 2307–2319. doi:10.1101/gad.1820009
- Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M.L., Harris, W.A., 1998. The Genetic Sequence of Retinal Development in the Ciliary Margin of the *Xenopus* Eye. *Developmental Biology* 199, 185–200. doi:10.1006/dbio.1998.8939
- Peters, G.H., Wang, C., Cruys-Bagger, N., Velardez, G.F., Madsen, J.J., Westh, P., 2013. Binding of serotonin to lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 2164–2171. doi:10.1021/ja306681d
- Peterson, K.J., Eernisse, D.J., 2001. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evol. Dev.* 3, 170–205.
- Pezzementi, L., Chatonnet, A., 2010. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. *Chem. Biol. Interact.* 187, 27–33. doi:10.1016/j.cbi.2010.03.043
- Pfeil, U., Haberberger, R.V., Lips, K.S., Eberling, L., Grau, V., Kummer, W., 2003a. Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sciences* 72, 2087–2090. doi:10.1016/S0024-3205(03)00088-2
- Pfeil, U., Lips, K.S., Eberling, L., Grau, V., Haberberger, R.V., Kummer, W., 2003b. Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 473–477. doi:10.1165/rcmb.2002-0190OC
- Phelan, P., 2005. Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1711, 225–245. doi:10.1016/j.bbamem.2004.10.004
- Philippe, H., Brinkmann, H., Lavrov, D.V., Littlewood, D.T.J., Manuel, M., Wörheide, G.,

- Baurain, D., 2011. Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough. *PLoS Biol.* 9, e1000602. doi:10.1371/journal.pbio.1000602
- Philippe, H., Derelle, R., Lopez, P., Pick, K., Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Renard, E., Houlston, E., Quéinnec, E., Da Silva, C., Wincker, P., Le Guyader, H., Leys, S., Jackson, D.J., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Morgenstern, B., Wörheide, G., Manuel, M., 2009. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr. Biol.* 19, 706–712. doi:10.1016/j.cub.2009.02.052
- Pierobon, P., 2012. Coordinated modulation of cellular signaling through ligand-gated ion channels in *Hydra vulgaris* (Cnidaria, Hydrozoa). *The International Journal of Developmental Biology* 56, 551–565. doi:10.1387/ijdb.113464pp
- Pizzi, M., Brunelli, G., Barlati, S., Spano, P., 2006. Glutamatergic innervation of rat skeletal muscle by supraspinal neurons: a new paradigm in spinal cord injury repair. *Current Opinion in Neurobiology* 16, 323–328. doi:10.1016/j.conb.2006.05.013
- Podar, M., Haddock, S.H., Sogin, M.L., Harbison, G.R., 2001. A molecular phylogenetic framework for the phylum Ctenophora using 18S rRNA genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21, 218–230. doi:10.1006/mpev.2001.1036
- Proskocil, B.J., Sekhon, H.S., Jia, Y., Savchenko, V., Blakely, R.D., Lindstrom, J., Spindel, E.R., 2004. Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 145, 2498–2506. doi:10.1210/en.2003-1728
- Purcell, J.E., 1977. Aggressive Function and Induced Development of Catch Tentacles in the Sea Anemone *Metridium senile* (Coelenterata, Actiniaria). *Biological Bulletin* 153, 355–368. doi:10.2307/1540441
- Radtke, F., Schweisguth, F., Pear, W., 2005. The Notch “gospel.” *EMBO Rep* 6, 1120–1125. doi:10.1038/sj.embor.7400585
- Ranck, J.L., Tocanne, J.F., 1982. Choline and acetylcholine induce interdigitation of hydrocarbon chains in dipalmitoylphosphatidylglycerol lamellar phase with stiff chains. *FEBS Lett.* 143, 171–174.
- Reddy, B.V.V.G., Rauskolb, C., Irvine, K.D., 2010. Influence of Fat-Hippo and Notch signaling on the proliferation and differentiation of *Drosophila* optic neuroepithelia. *Development* 137, 2397–2408. doi:10.1242/dev.050013
- Reiter, S., Crescenzi, M., Galliot, B., Buzgariu, W., 2012. Hydra, a versatile model to study the homeostatic and developmental functions of cell death. *The International Journal of Developmental Biology* 56, 593–604. doi:10.1387/ijdb.123499sr
- Ren, F., Zhang, L., Jiang, J., 2010. Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Developmental Biology* 337, 303–312. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.046
- Resende, R.R., Adhikari, A., 2009. Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Communication and Signaling* 7, 20. doi:10.1186/1478-811X-7-20
- Rich, F., Tardent, P., 1969. [Studies of differentiation of nematocytes in *Hydra attenuata* Pall]. *Rev. Suisse Zool.* 76, 779–787.
- Riesgo, A., Farrar, N., Windsor, P.J., Giribet, G., Leys, S.P., 2014. The analysis of eight transcriptomes from all poriferan classes reveals surprising genetic complexity in sponges. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1102–1120. doi:10.1093/molbev/msu057
- Rock, R., Schrauth, S., Gessler, M., 2005. Expression of mouse *dchs1*, *fjx1*, and *fat-j* suggests conservation of the planar cell polarity pathway identified in *Drosophila*. *Dev. Dyn.* 234, 747–755. doi:10.1002/dvdy.20515
- Rogulja, D., Rauskolb, C., Irvine, K.D., 2008. Morphogen control of wing growth through the Fat signaling pathway. *Dev. Cell* 15, 309–321. doi:10.1016/j.devcel.2008.06.003

- Rosas-García, V.M., Gandour, R.D., 1997. Conformationally-Dependent Free Energies of Solvation. An Explanation for the Large Group-Transfer Potential of Acetylcarnitine. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 7587–7588. doi:10.1021/ja963804g
- Ruppert, E.E., 2005. Key characters uniting hemichordates and chordates: homologies or homoplasies? *Canadian Journal of Zoology* 83, 8–23. doi:10.1139/z04-158
- Ruppert, E.E., 1997. Introduction: microscopic anatomy of the notochord, heterochrony, and chordate evolution., in: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. F.W. Harrison and E.E. Ruppert. Wiley–Liss, New York, pp. 1–13.
- Russell, R.C., Fang, C., Guan, K.-L., 2011. An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology. *Development* 138, 3343–3356. doi:10.1242/dev.058230
- Ryan, J.F., 2014. Did the ctenophore nervous system evolve independently? *Zoology* 117, 225–226. doi:10.1016/j.zool.2014.06.001
- Ryan, J.F., Pang, K., NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin, J.C., Martindale, M.Q., Baxevanis, A.D., 2010. The homeodomain complement of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* suggests that Ctenophora and Porifera diverged prior to the ParaHoxozoa. *Evodevo* 1, 9. doi:10.1186/2041-9139-1-9
- Ryan, J.F., Pang, K., Schnitzler, C.E., Nguyen, A.-D., Moreland, R.T., Simmons, D.K., Koch, B.J., Francis, W.R., Havlak, P., NISC Comparative Sequencing Program, Smith, S.A., Putnam, N.H., Haddock, S.H.D., Dunn, C.W., Wolfsberg, T.G., Mullikin, J.C., Martindale, M.Q., Baxevanis, A.D., 2013. The genome of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and its implications for cell type evolution. *Science* 342, 1242592. doi:10.1126/science.1242592
- Sakamaki, K., Imai, K., Tomii, K., Miller, D.J., 2015. Evolutionary analyses of caspase-8 and its paralogs: Deep origins of the apoptotic signaling pathways. *BioEssays* 37, 767–776. doi:10.1002/bies.201500010
- Sanes, J.R., Lichtman, J.W., 2001. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 791–805. doi:10.1038/35097557
- Sansores-Garcia, L., Bossuyt, W., Wada, K.-I., Yonemura, S., Tao, C., Sasaki, H., Halder, G., 2011. Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J.* 30, 2325–2335. doi:10.1038/emboj.2011.157
- Sato, E., Koyama, S., Okubo, Y., Kubo, K., Sekiguchi, M., 1998. Acetylcholine stimulates alveolar macrophages to release inflammatory cell chemotactic activity. *Am. J. Physiol.* 274, L970–979.
- Satterlie, R.A., 2015. Cnidarian Nerve Nets and Neuromuscular Efficiency. *Integrative and Comparative Biology*. doi:10.1093/icb/icv067
- Satterlie, R.A., 2002. Neuronal control of swimming in jellyfish: a comparative story. *Canadian Journal of Zoology* 80, 1654–1669. doi:10.1139/z02-132
- Saucedo, L.J., Edgar, B.A., 2007. Filling out the Hippo pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 613–621. doi:10.1038/nrm2221
- Scappaticci, A.A., Kass-Simon, G., 2008. NMDA and GABA B receptors are involved in controlling nematocyst discharge in hydra. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 150, 415–422. doi:10.1016/j.cbpa.2008.04.606
- Scemes, E., Garcia Mendes, E., 1986. Cholinergic mechanism in *Liriope tetraphylla* (Cnidaria, Hydrozoa). *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 83, 171–178.
- Schnitzler, C.E., Simmons, D.K., Pang, K., Martindale, M.Q., Baxevanis, A.D., 2014. Expression of multiple Sox genes through embryonic development in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* is spatially restricted to zones of cell proliferation. *Evodevo* 5, 15. doi:10.1186/2041-9139-5-15

- Schram, F., 1991. Cladistic analysis of metazoan phyla and the placement of fossil problematica., in: *The Early Evolution of Metazoa and the Significance of Problematic Taxa*. Cambridge Univ, pp. 35–46.
- Schuchert, P., 1993. *Trichoplax adhaerens* (Phylum Placozoa) has Cells that React with Antibodies Against the Neuropeptide RFamide. *Acta Zoologica* 74, 115–117. doi:10.1111/j.1463-6395.1993.tb01227.x
- Schuske, K., Beg, A.A., Jorgensen, E.M., 2004. The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends in Neurosciences* 27, 407–414. doi:10.1016/j.tins.2004.05.005
- Schweisguth, F., 2000. Fonctions et régulation de l'activité de signalisation du récepteur Notch. *médecine/sciences* 16, 186. doi:10.4267/10608/1620
- Seipel, K., Schmid, V., 2005. Evolution of striated muscle: jellyfish and the origin of triploblasty. *Dev. Biol.* 282, 14–26. doi:10.1016/j.ydbio.2005.03.032
- Seipel, K., Yanze, N., Schmid, V., 2004. The germ line and somatic stem cell gene *Cniwi* in the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1–7.
- Sekhon, H.S., Song, P., Jia, Y., Lindstrom, J., Spindel, E.R., 2005. Expression of *lynx1* in developing lung and its modulation by prenatal nicotine exposure. *Cell Tissue Res.* 320, 287–297. doi:10.1007/s00441-005-1077-9
- Sheldon, A.L., Robinson, M.B., 2007. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem. Int.* 51, 333–355. doi:10.1016/j.neuint.2007.03.012
- Shimobayashi, M., Hall, M.N., 2014. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 155–162. doi:10.1038/nrm3757
- Simionato, E., Ledent, V., Richards, G., Thomas-Chollier, M., Kerner, P., Coornaert, D., Degnan, B.M., Vervoort, M., 2007. Origin and diversification of the basic helix-loop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. *BMC Evol. Biol.* 7, 33. doi:10.1186/1471-2148-7-33
- Simion, P., 2014. *Les cténophores : de leur position dans l'arbre des métazoaires (approche phylogénomique) à leur diversité taxonomique (phylogénie moléculaire et anatomie comparée)*. UPMC, Paris.
- Simmons, D.K., Pang, K., Martindale, M.Q., 2012. Lim homeobox genes in the Ctenophore *Mnemiopsis leidyi*: the evolution of neural cell type specification. *Evodevo* 3, 2. doi:10.1186/2041-9139-3-2
- Smith, Q.R., 2000. Transport of Glutamate and Other Amino Acids at the Blood-Brain Barrier. *J. Nutr.* 130, 1016S–1022S.
- Song, H., Mak, K.K., Topol, L., Yun, K., Hu, J., Garrett, L., Chen, Y., Park, O., Chang, J., Simpson, R.M., Wang, C.-Y., Gao, B., Jiang, J., Yang, Y., 2010. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 1431–1436. doi:10.1073/pnas.0911409107
- Sperling, E.A., Peterson, K.J., Pisani, D., 2009. Phylogenetic-signal dissection of nuclear housekeeping genes supports the paraphyly of sponges and the monophyly of Eumetazoa. *Mol. Biol. Evol.* 26, 2261–2274. doi:10.1093/molbev/msp148
- Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N.H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., Carpenter, M.L., Signorovitch, A.Y., Moreno, M.A., Kamm, K., Grimwood, J., Schmutz, J., Shapiro, H., Grigoriev, I.V., Buss, L.W., Schierwater, B., Dellaporta, S.L., Rokhsar, D.S., 2008. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature* 454, 955–960. doi:10.1038/nature07191
- Srivastava, M., Simakov, O., Chapman, J., Fahey, B., Gauthier, M.E.A., Mitros, T., Richards, G.S., Conaco, C., Dacre, M., Hellsten, U., Larroux, C., Putnam, N.H., Stanke, M.,

- Adamska, M., Darling, A., Degnan, S.M., Oakley, T.H., Plachetzki, D.C., Zhai, Y., Adamski, M., Calcino, A., Cummins, S.F., Goodstein, D.M., Harris, C., Jackson, D.J., Leys, S.P., Shu, S., Woodcroft, B.J., Vervoort, M., Kosik, K.S., Manning, G., Degnan, B.M., Rokhsar, D.S., 2010. The Amphimedon queenslandica genome and the evolution of animal complexity. *Nature* 466, 720–726. doi:10.1038/nature09201
- Stocker, H., 2011. Growth control: Myc and Yorkie get connected. *Curr. Biol.* 21, R37–39. doi:10.1016/j.cub.2010.11.057
- Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, A., Oren, M., Sudol, M., Cesareni, G., Blandino, G., 2001. Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 276, 15164–15173. doi:10.1074/jbc.M010484200
- Südhof, T.C., 2012. The presynaptic active zone. *Neuron* 75, 11–25. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.012
- Sugiyama, K., Tezuka, T., 2011. Acetylcholine promotes the emergence and elongation of lateral roots of *Raphanus sativus*. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1545–1553. doi:10.4161/psb.6.10.16876
- Takahashi, T., Hamaue, N., 2010. Molecular characterization of Hydra acetylcholinesterase and its catalytic activity. *FEBS Letters* 584, 511–516. doi:10.1016/j.febslet.2009.11.081
- Takahashi, T., Takeda, N., 2015. Insight into the Molecular and Functional Diversity of Cnidarian Neuropeptides. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 2610–2625. doi:10.3390/ijms16022610
- Takaku, Y., Hwang, J.S., Wolf, A., Böttger, A., Shimizu, H., David, C.N., Gojobori, T., 2014. Innexin gap junctions in nerve cells coordinate spontaneous contractile behavior in Hydra polyps. *Scientific Reports* 4. doi:10.1038/srep03573
- Tamm, S., 1982. Ctenophora, in: *Electrical Conduction and Behaviour in “Simple” Invertebrates*. Shelton GAB, Oxford, pp. 266–358.
- Tamm, S.L., 2014. Cilia and the life of ctenophores. *Invertebrate Biology* 133, 1–46. doi:10.1111/ivb.12042
- Tamm, S.L., 1973. Mechanisms of Ciliary Co-Ordination in Ctenophores. *J Exp Biol* 59, 231–245.
- Tamm, S.L., Moss, A.G., 1985. Unilateral ciliary reversal and motor responses during prey capture by the ctenophore *Pleurobrachia*. *J. Exp. Biol.* 114, 443–461.
- Tamm, S.L., Tamm, S., 2002. Novel bridge of axon-like processes of epithelial cells in the aboral sense organ of ctenophores. *Journal of Morphology* 254, 99–120. doi:10.1002/jmor.10019
- Tamm, S., Tamm, S.L., 1995. A giant nerve net with multi-effector synapses underlying epithelial adhesive strips in the mouth of *Beroë* (Ctenophora). *J. Neurocytol.* 24, 711–723.
- Tang, J.-M., Yuan, J., Li, Q., Wang, J.-N., Kong, X., Zheng, F., Zhang, L., Chen, L., Guo, L.-Y., Huang, Y.-H., Yang, J.-Y., Chen, S.-Y., 2012. Acetylcholine induces mesenchymal stem cell migration via Ca²⁺ /PKC/ERK1/2 signal pathway. *J. Cell. Biochem.* 113, 2704–2713. doi:10.1002/jcb.24148
- Tanoue, T., Takeichi, M., 2005. New insights into Fat cadherins. *J. Cell. Sci.* 118, 2347–2353. doi:10.1242/jcs.02398
- Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C.R., Schiripo, T.A., Haber, D.A., Hariharan, I.K., 2002. *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 110, 467–478.
- Tardent, P., Rich, F., Schneider, V., 1971. The polarity of stenothele differentiation in *Hydra attenuata* Pall. *Dev. Biol.* 24, 596–608.

- Technau, U., Miller, M.A., Bridge, D., Steele, R.E., 2003. Arrested apoptosis of nurse cells during Hydra oogenesis and embryogenesis. *Dev. Biol.* 260, 191–206.
- Technau, U., Steele, R.E., 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development* 138, 1447–1458. doi:10.1242/dev.048959
- Thakur, M. Das, Feng, Y., Jagannathan, R., Seppa, M.J., Skeath, J.B., Longmore, G.D., 2010. Ajuba LIM proteins are negative regulators of the Hippo signaling pathway. *Curr. Biol.* 20, 657–662. doi:10.1016/j.cub.2010.02.035
- Thompson, B.J., Cohen, S.M., 2006. The Hippo pathway regulates the bantam microRNA to control cell proliferation and apoptosis in *Drosophila*. *Cell* 126, 767–774. doi:10.1016/j.cell.2006.07.013
- Towers, P.R., Edwards, B., Richmond, J.E., Sattelle, D.B., 2005. The *Caenorhabditis elegans* lev-8 gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *Journal of Neurochemistry* 93, 1–9. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02951.x
- Tsai, T.H., 2000. Separation methods used in the determination of choline and acetylcholine. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 747, 111–122.
- Tsutsumi, R., Masoudi, M., Takahashi, A., Fujii, Y., Hayashi, T., Kikuchi, I., Satou, Y., Taira, M., Hatakeyama, M., 2013. YAP and TAZ, Hippo signaling targets, act as a rheostat for nuclear SHP2 function. *Dev. Cell* 26, 658–665. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.013
- Tucek, S., 1982. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 322, 53–69.
- Tyler, D.M., Baker, N.E., 2007. Expanded and fat regulate growth and differentiation in the *Drosophila* eye through multiple signaling pathways. *Dev. Biol.* 305, 187–201. doi:10.1016/j.ydbio.2007.02.004
- Udan, R.S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., Halder, G., 2003. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat. Cell Biol.* 5, 914–920. doi:10.1038/ncb1050
- University, A.Z.P. of Z.T.-A., Center, B.D.A.Z.P.E. of P.P.V., 1997. *The Handicap Principle : A Missing Piece of Darwin's Puzzle: A Missing Piece of Darwin's Puzzle*. Oxford University Press, USA.
- Usherwood, P.N., 1967. Insect neuromuscular mechanisms. *American zoologist* 7, 553–582.
- Varelas, X., Miller, B.W., Sopko, R., Song, S., Gregorieff, A., Fellouse, F.A., Sakuma, R., Pawson, T., Hunziker, W., McNeill, H., Wrana, J.L., Attisano, L., 2010. The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev. Cell* 18, 579–591. doi:10.1016/j.devcel.2010.03.007
- Varelas, X., Wrana, J.L., 2012. Coordinating developmental signaling: novel roles for the Hippo pathway. *Trends in Cell Biology* 22, 88–96. doi:10.1016/j.tcb.2011.10.002
- Vézina, C., Kudelski, A., Sehgal, S.N., 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 28, 721–726.
- Vizi, E., Rózsa, B., Mayer, A., Kiss, J.P., Zelles, T., Lendvai, B., 2004. Further evidence for the functional role of nonsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 499–508. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.018
- Vizi, E.S., Lábos, E., 1991. Non-synaptic interactions at presynaptic level. *Prog. Neurobiol.* 37, 145–163.
- Von Der Chevallerie, K., Rolfes, S., Schierwater, B., 2014. Inhibitors of the p53-Mdm2 interaction increase programmed cell death and produce abnormal phenotypes in the placozoon *Trichoplax adhaerens* (F.E. Schulze). *Development Genes and Evolution* 224, 79–85. doi:10.1007/s00427-014-0465-0
- Waerhaug, O., Ottersen, O.P., 1993. Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry.

- Anat. Embryol. 188, 501–513.
- Watanabe, H., Fujisawa, T., Holstein, T.W., 2009. Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system: Cnidarian nervous system. *Development, Growth & Differentiation* 51, 167–183. doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01103.x
- Weber, J., 1990. Poly(γ -glutamic acid)s are the major constituents of nematocysts in Hydra (Hydrozoa, Cnidaria). *J. Biol. Chem.* 265, 9664–9669.
- Weber, J., 1989. Nematocysts (stinging capsules of Cnidaria) as Donnan-potential-dominated osmotic systems. *Eur. J. Biochem.* 184, 465–476.
- Wei, X., Shimizu, T., Lai, Z.-C., 2007. Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in *Drosophila*. *The EMBO journal* 26, 1772–1781.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J., 2001a. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn. J. Pharmacol.* 85, 2–10.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., 2008. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology* 154, 1558–1571.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., Racké, K., 1999. The cholinergic “pitfall”: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 198–205.
- Wessler, I., Michel-Schmidt, R., Kirkpatrick, C.J., 2015. pH-dependent hydrolysis of acetylcholine: Consequences for non-neuronal acetylcholine. *Int. Immunopharmacol.* doi:10.1016/j.intimp.2015.04.039
- Wessler, I., Roth, E., Deutsch, C., Brockerhoff, P., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J., Kilbinger, H., 2001b. Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *British journal of pharmacology* 134, 951–956.
- Westfall, J.A., 1996. Ultrastructure of synapses in the first-evolved nervous systems. *Journal of neurocytology* 25, 735–746.
- Westfall, J.A., Elliott, C.F., 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. doi:10.1002/jmor.1075
- Westfall, J.A., Landers, D.D., McCallum, J.D., 1998. Different nematocytes have different synapses in the sea anemone *Aiptasia pallida* (Cnidaria, Anthozoa). *J. Morphol.* 238, 53–62. doi:10.1002/(SICI)1097-4687(199810)238:1<53::AID-JMOR4>3.0.CO;2-O
- Wiens, M., Krasko, A., Perovic, S., Müller, W.E.G., 2003. Caspase-mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1593, 179–189. doi:10.1016/S0167-4889(02)00388-9
- Willecke, M., Hamaratoglu, F., Kango-Singh, M., Udan, R., Chen, C.-L., Tao, C., Zhang, X., Halder, G., 2006. The fat cadherin acts through the hippo tumor-suppressor pathway to regulate tissue size. *Curr. Biol.* 16, 2090–2100. doi:10.1016/j.cub.2006.09.005
- Willecke, M., Hamaratoglu, F., Sansores-Garcia, L., Tao, C., Halder, G., 2008. Boundaries of Dachsous Cadherin activity modulate the Hippo signaling pathway to induce cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14897–14902. doi:10.1073/pnas.0805201105
- Williams, R.B., 1975. Catch-tentacles in sea anemones: occurrence in *Haliplanella luciae* (Verrill) and a review of current knowledge. *Journal of Natural History* 9, 241–248. doi:10.1080/00222937500770161
- Wolf, H., 2014. Inhibitory motoneurons in arthropod motor control: organisation, function, evolution. *Journal of Comparative Physiology A* 200, 693–710. doi:10.1007/s00359-014-0922-2
- Wright, K.A., 1991. Nematoda., in: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Harrison FW.

- Ruppert E.E., New-York, pp. 111–196.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J., Pan, D., 2003. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 114, 445–456.
- Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., Pan, D., 2008. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev. Cell* 14, 388–398. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.007
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., Yu, W., 1995. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* 121, 1053–1063.
- Yen, M.R., Saier, M.H., 2007. Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 94, 5–14. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.03.006
- Yu, F.-X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., Fu, X.-D., Mills, G.B., Guan, K.-L., 2012. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 150, 780–791. doi:10.1016/j.cell.2012.06.037
- Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W.-M., Pan, D., 2010. Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev. Cell* 18, 288–299. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.012
- Zahavi, A., 1975. Mate selection—a selection for a handicap. *J. Theor. Biol.* 53, 205–214.
- Zahavi, A., Zahavi, A., 1997. *The Handicap Principle: A Missing Piece of Darwin’s Puzzle*. Oxford University Press.
- Zakharov, I.S., N. L. Hayes, Ierusalimsky, V.N., Nowakowski, R.S., Balaban, P.M., 1998. Postembryonic neurogenesis in the procerobrium of the terrestrial snail, *Helix lucorum* L. *J. Neurobiol.* 35, 271–276. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(19980605)35:3<271::AID-NEU4>3.0.CO;2-W
- Zecca, M., Struhl, G., 2010. A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to *Drosophila* wing growth. *PLoS Biol.* 8, e1000386. doi:10.1371/journal.pbio.1000386
- Zhang, H., Pasolli, H.A., Fuchs, E., 2011. Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2270–2275. doi:10.1073/pnas.1019603108
- Zhang, J., Ji, J.-Y., Yu, M., Overholtzer, M., Smolen, G.A., Wang, R., Brugge, J.S., Dyson, N.J., Haber, D.A., 2009a. YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. *Nat. Cell Biol.* 11, 1444–1450. doi:10.1038/ncb1993
- Zhang, X., Milton, C.C., Humbert, P.O., Harvey, K.F., 2009b. Transcriptional output of the Salvador/warts/hippo pathway is controlled in distinct fashions in *Drosophila melanogaster* and mammalian cell lines. *Cancer Res.* 69, 6033–6041. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4592
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y., Guan, K.-L., 2010. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev.* 24, 72–85. doi:10.1101/gad.1843810
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.-C., Guan, K.-L., 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 21, 2747–2761. doi:10.1101/gad.1602907
- Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J.D., Wang, C.-Y., Chinnaiyan,

- A.M., Lai, Z.-C., Guan, K.-L., 2008. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 22, 1962–1971. doi:10.1101/gad.1664408
- Zmasek, C.M., Godzik, A., 2013. Evolution of the Animal Apoptosis Network. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a008649–a008649. doi:10.1101/cshperspect.a008649
- Zrzavý, J., Mihulka, S., Kepka, P., Bezděk, A., Tietz, D., 1998. Phylogeny of the Metazoa Based on Morphological and 18S Ribosomal DNA Evidence. *Cladistics* 14, 249–285. doi:10.1111/j.1096-0031.1998.tb00338.x

Annexe

Additional files Article 2

Comparative study of Hippo pathway genes in cellular conveyor belts of a ctenophore and a cnidarian

Alicia Coste¹, Muriel Jager¹, Jean-Philippe Chambon¹ and Michaël Manuel

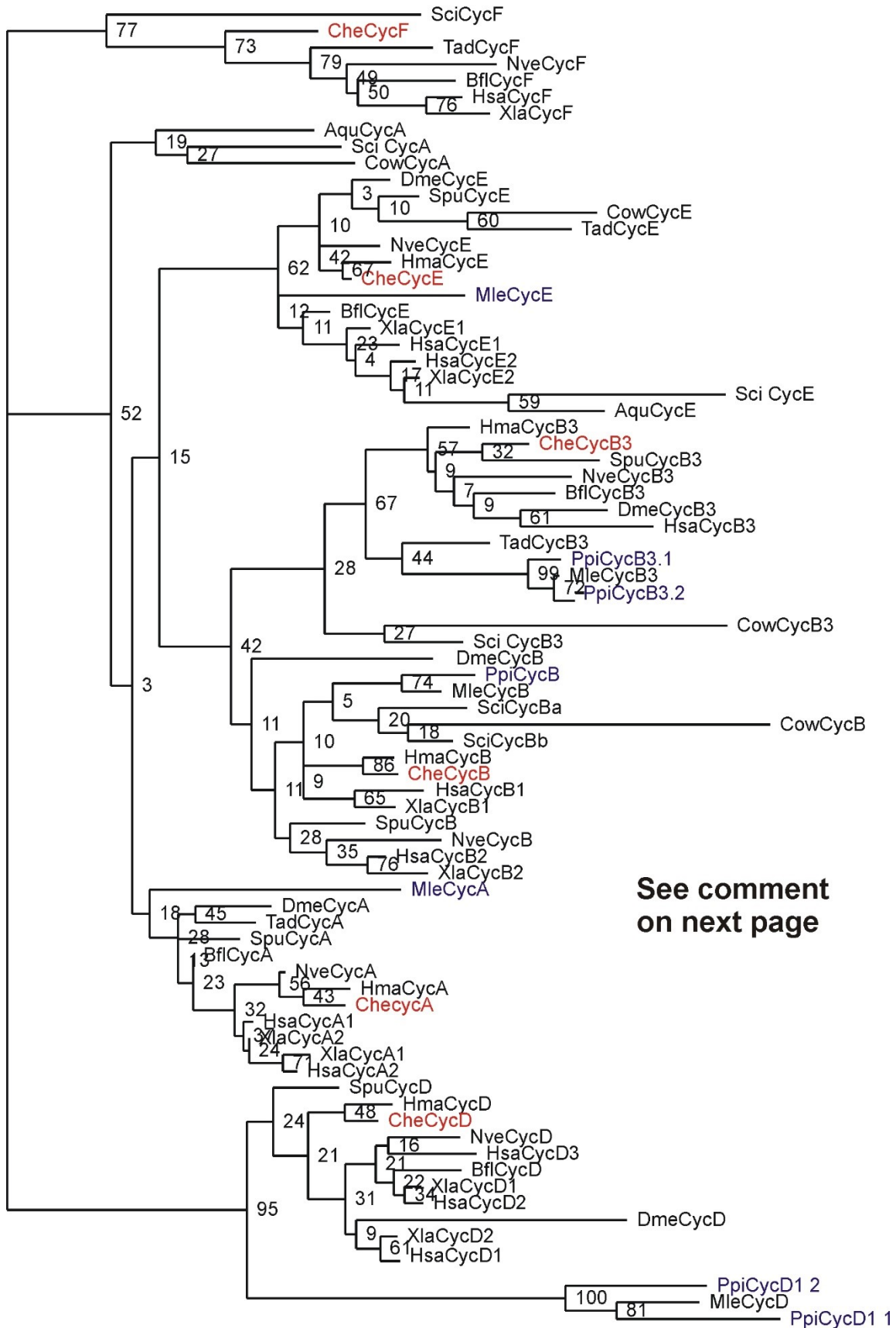
Additional file 2: Phylogenetic analysis of Cyclins and core Hippo pathway genes (other than Yorkie). Maximum likelihood trees are shown for Cyclins (page 2), Sav WW domains (page 4), Sav combined WW and SARA domains (page 5), Hippo (page 6), Warts (page 7), Mats (page 8) and Sd (page 9).

Comment concerning the tree of cyclins

The cyclin subfamilies are strongly conserved at the metazoan level and unsurprisingly, we could detect orthologues of cyclin A, B, B3, D and E in all sampled metazoans including ctenophores. More interestingly, *P. pileus* has two paralogues of cyclin B3 and two paralogues of cyclin D, whereas the other ctenophore *M. leydii* has only one for both subfamilies. In *P. bachei* we found two paralogues of cyclin B3 but only one cyclin D (not shown). In both cases, the tree topology suggests secondary loss of one of the duplicated ctenophore cyclins in *M. leydii*.

Cyclins

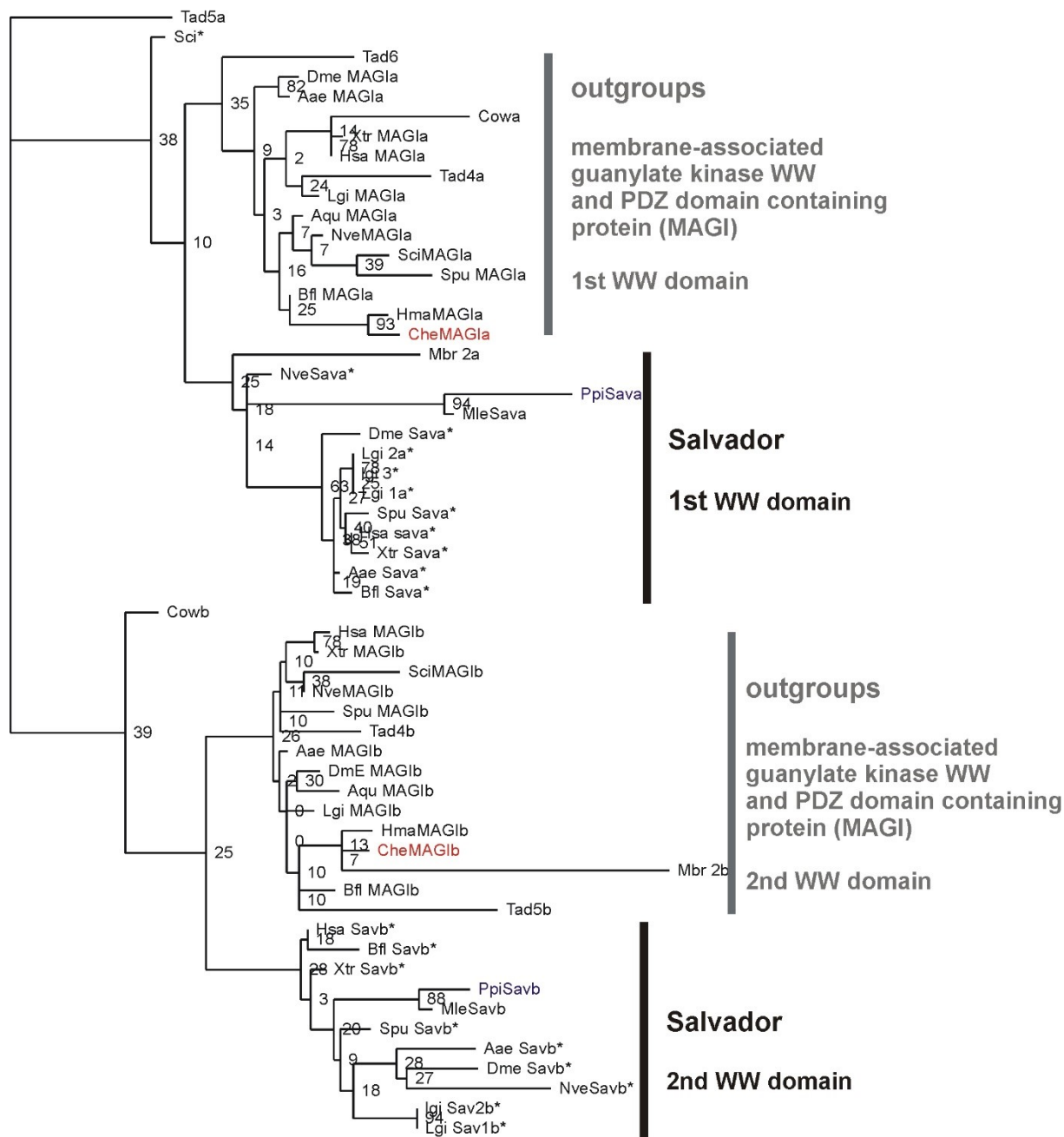
(65 amino-acids)



Salvador

Alignment of WW domains only (34 amino-acids)

* proteins which contain a SARAH domain (the Hippo-interacting domain of Sav)

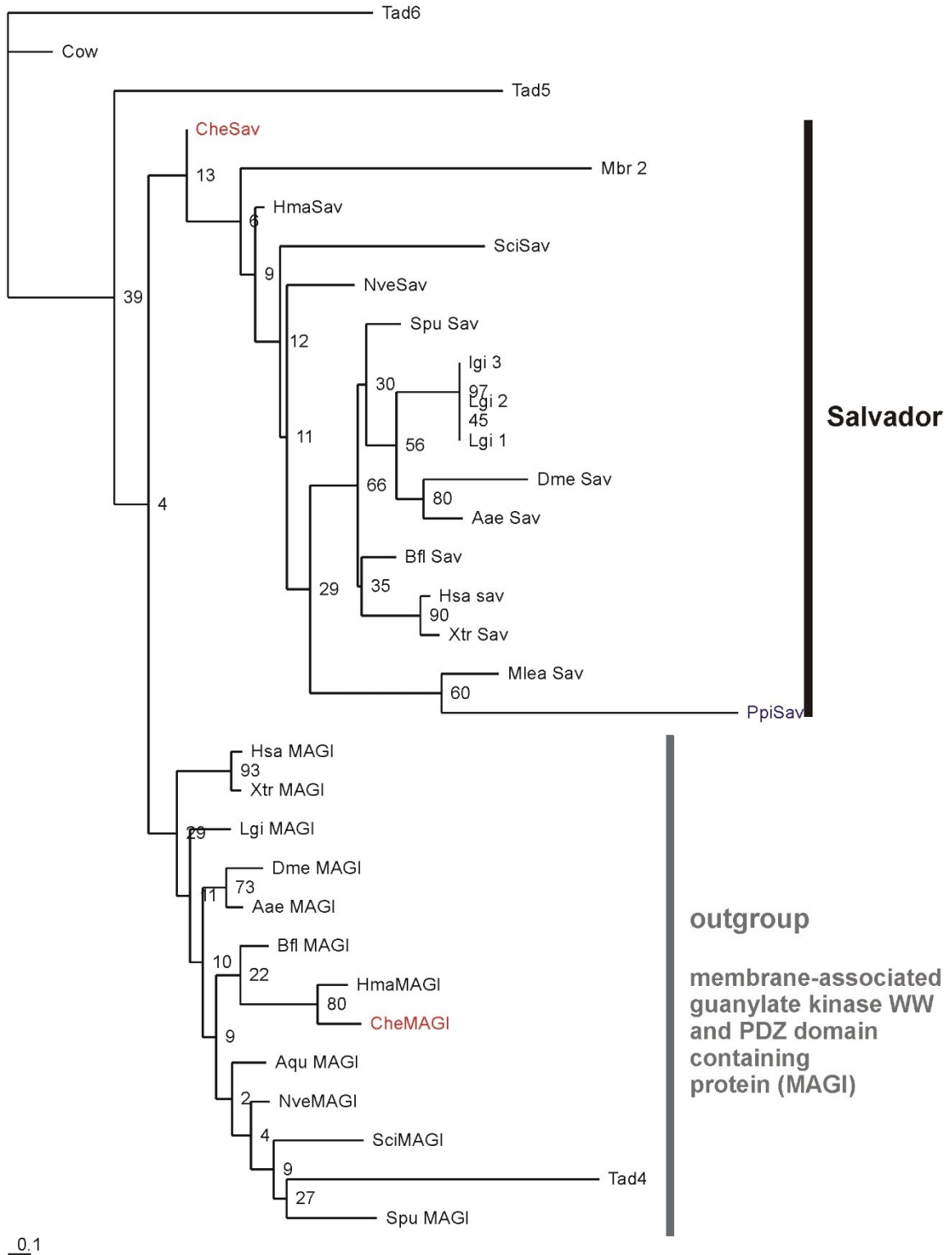


_0.1

Note: WW domains are absent in the Salvador proteins of hydrozoans (*Clytia hemisphaerica* and *Hydra magnipapillata*).

Salvador

Combined analysis of the two WW domains and the SARAH domain
(116 amino-acids)



Note: WW domains are absent in the Salvador proteins of hydrozoans (*Clytia hemisphaerica* and *Hydra magnipapillata*). In this alignment they have been replaced by missing data.

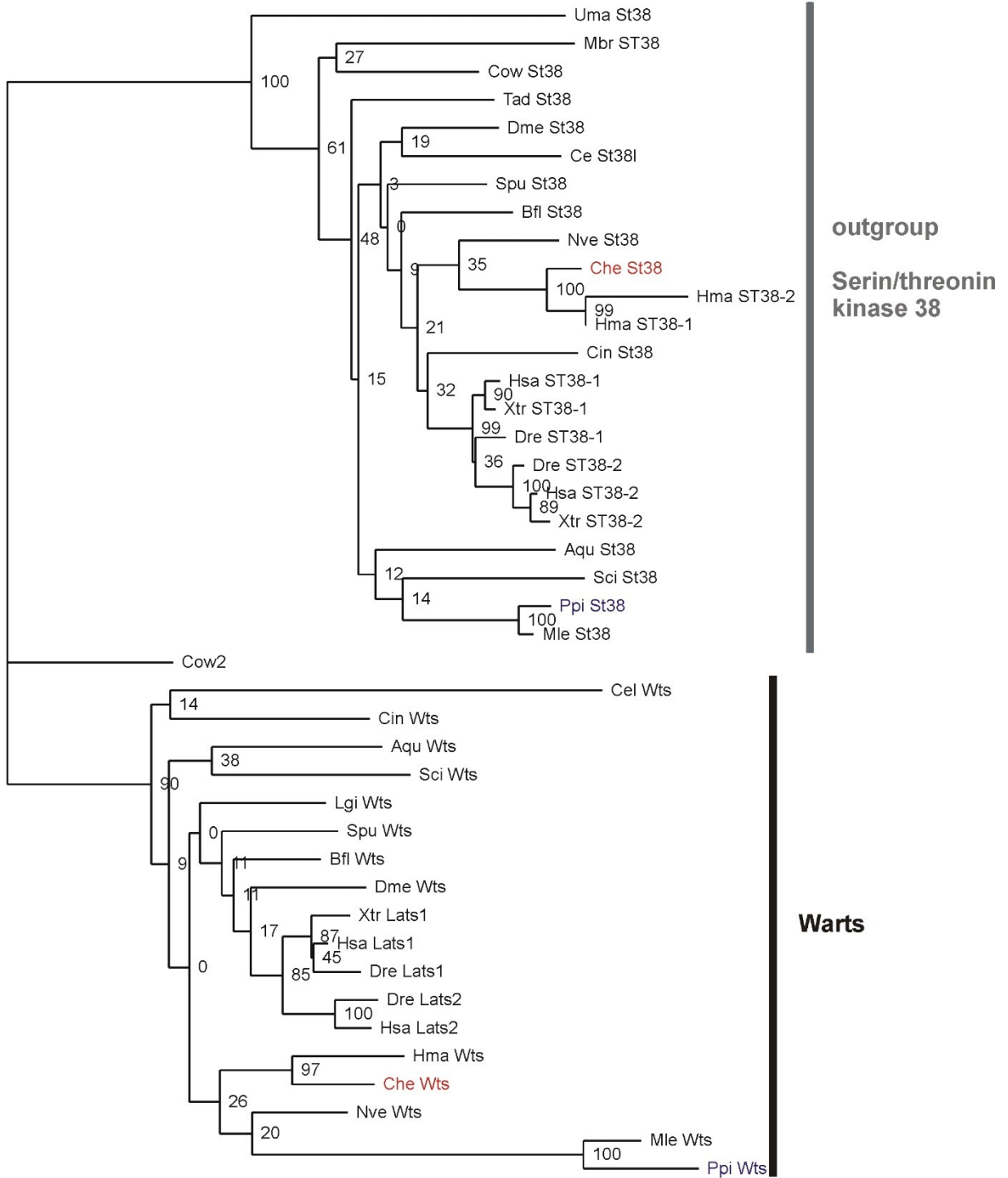
Hippo

(234 amino-acids)



Warts

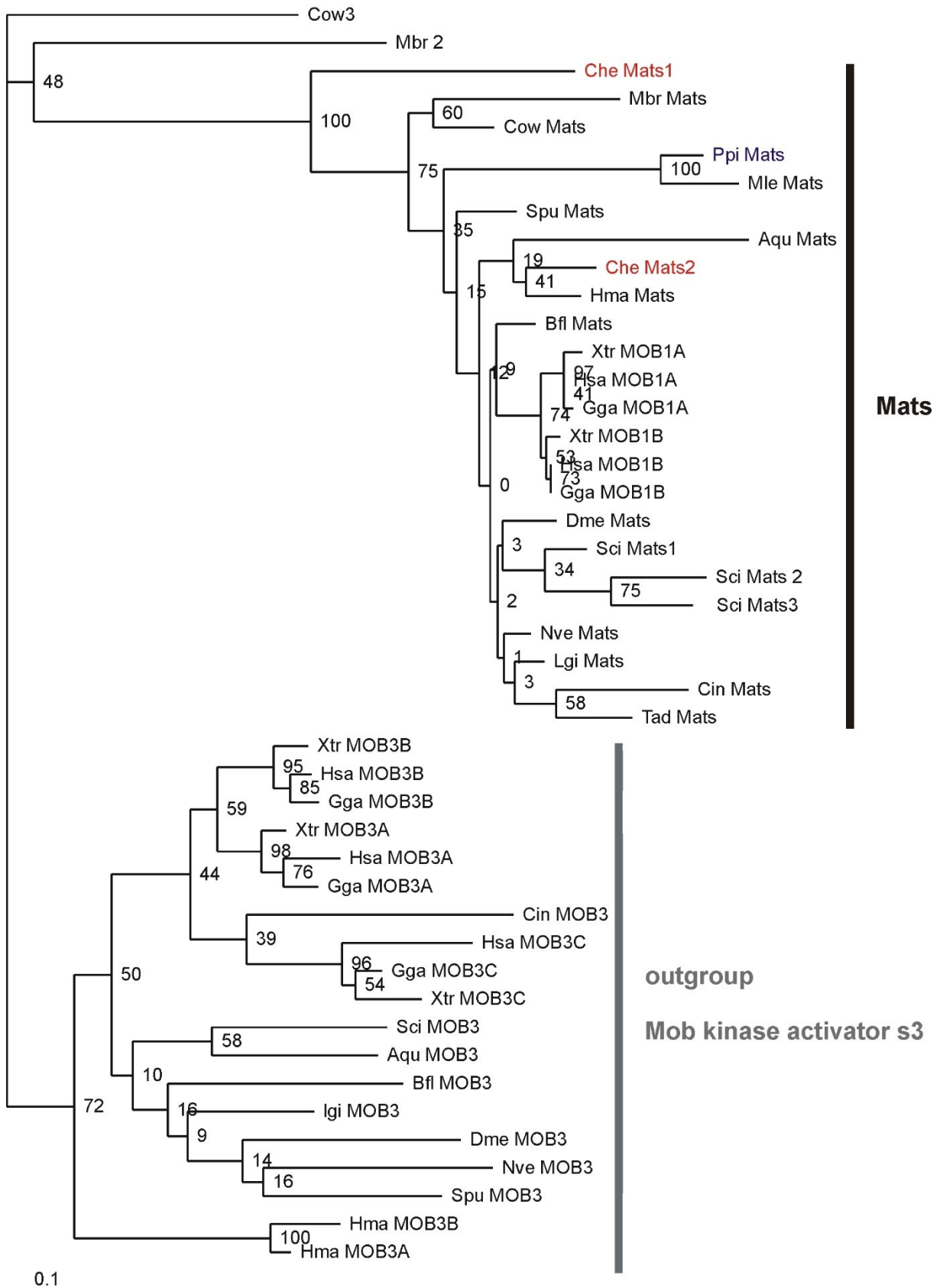
(325 amino-acids)



0.1

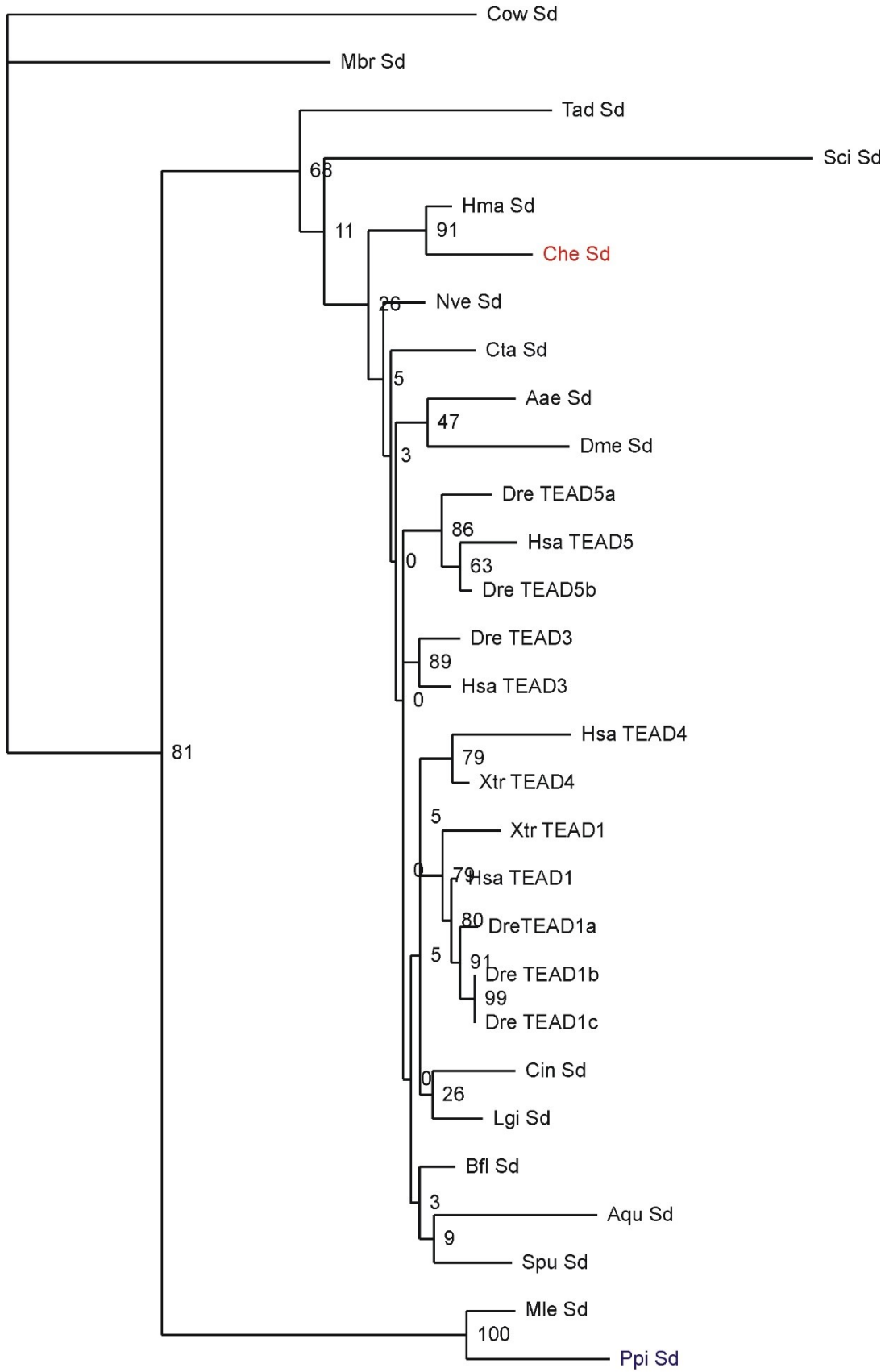
Mats

(182 amino-acids)



Scalloped

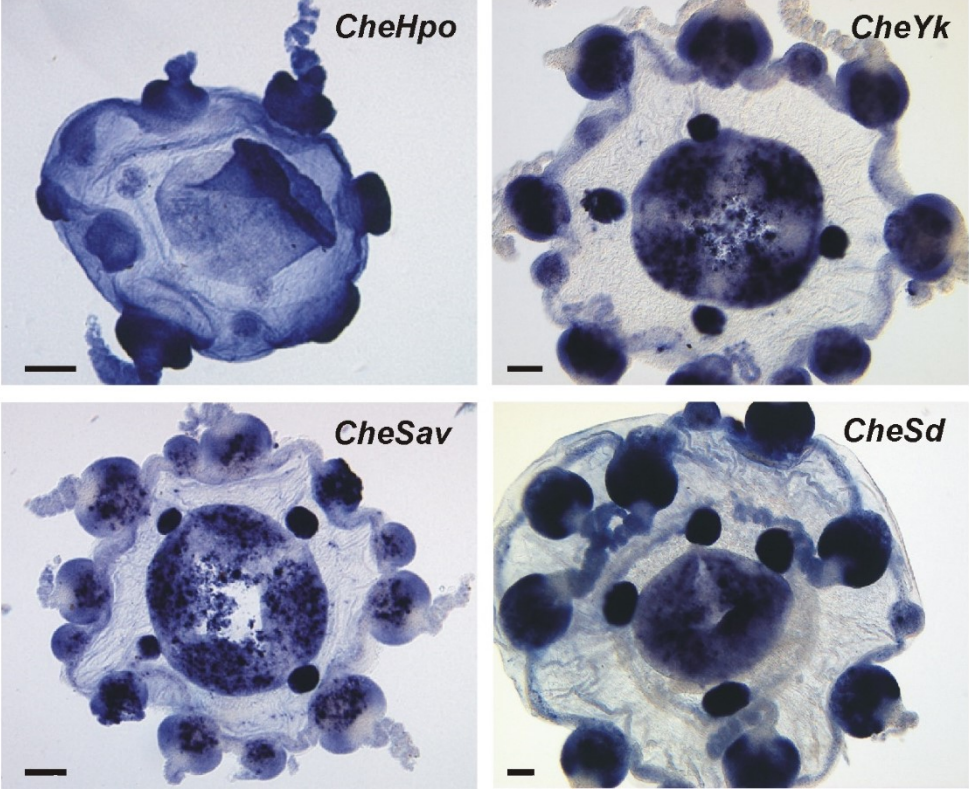
(240 amino-acids)



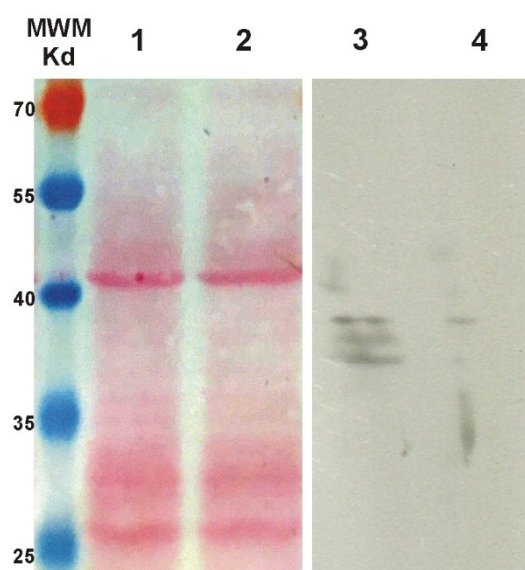
0.1

Additional file 3: In situ hybridisation for *CheHpo*, *CheYk*, *CheSav* and *CheSd* in whole medusae.

Scale bars: 100 µm.



Additional file 4: Validation of the anti-CheYorkie antibody by Western-blot. Lanes 1 and 2: equivalent total protein extracts from *C. hemisphaerica* medusae, after electrophoresis, transfer onto nitrocellulose membrane, and Ponceau red staining. Lane 3: the nitrocellulose membrane of lane 1 was incubated with antiserum against CheYorkie (see Methods for the revelation procedure). The three bands around 38 Kd can be interpreted as different phosphorylation states of the CheYorkie protein (the composition of the lysate solution allows for conservation of phosphorylations). The size of the predicted CheYorkie protein (based on the corresponding contig in the transcriptome assembly) is 351 amino-acid, corresponding to about $351 \times 110 = 38.61$ Kd. Lane 4: the nitrocellulose membrane of lane 2 was incubated with preimmune serum (negative control).



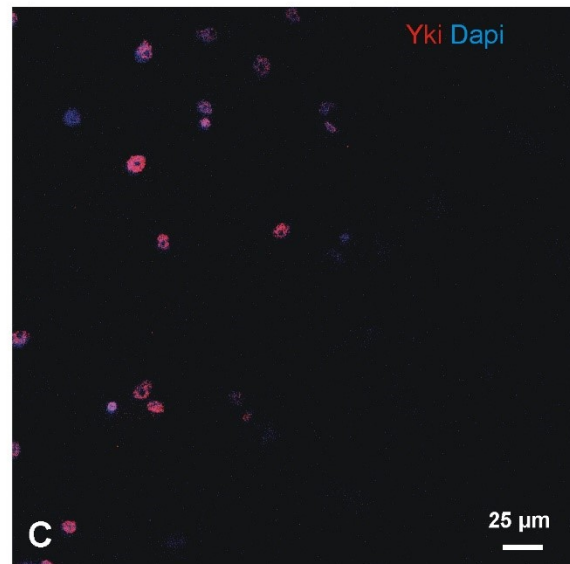
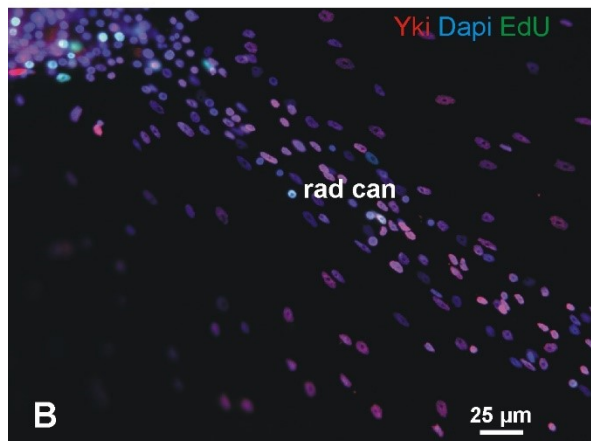
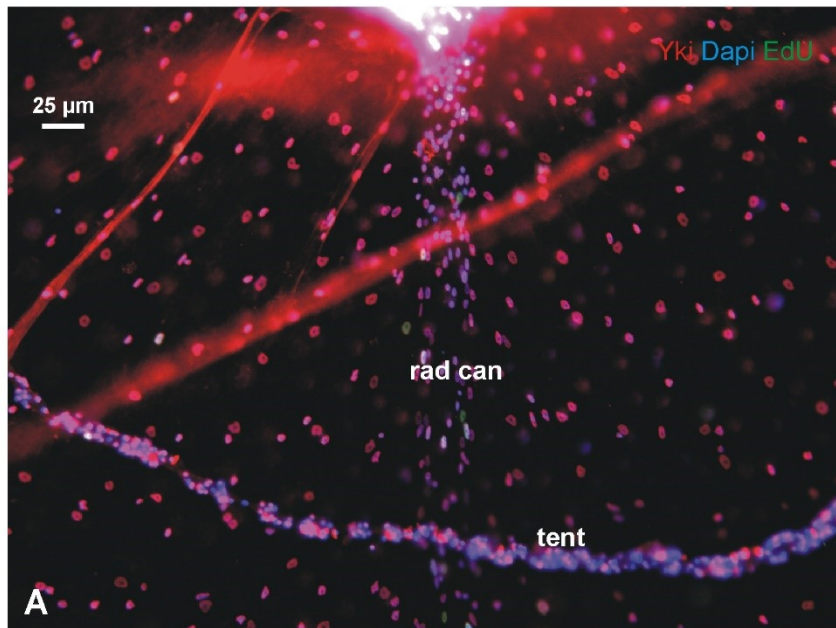
Lanes 1 and 2: equivalent total protein extracts from *C. hemisphaerica* medusae, after electrophoresis, transfer onto nitrocellulose membrane, and Ponceau red staining.

Lane 3: the nitrocellulose membrane of lane 1 was incubated with antiserum against CheYorkie (see Methods for the revelation procedure). The three bands around 38 Kd can be interpreted as different phosphorylation states of the CheYorkie protein (the composition of the lysate solution allows for conservation of phosphorylations). The size of the predicted CheYorkie protein (based on the corresponding contig in the transcriptome assembly) is 351 amino-acid, corresponding to about $351 \times 110 = 38.61$ Kd.

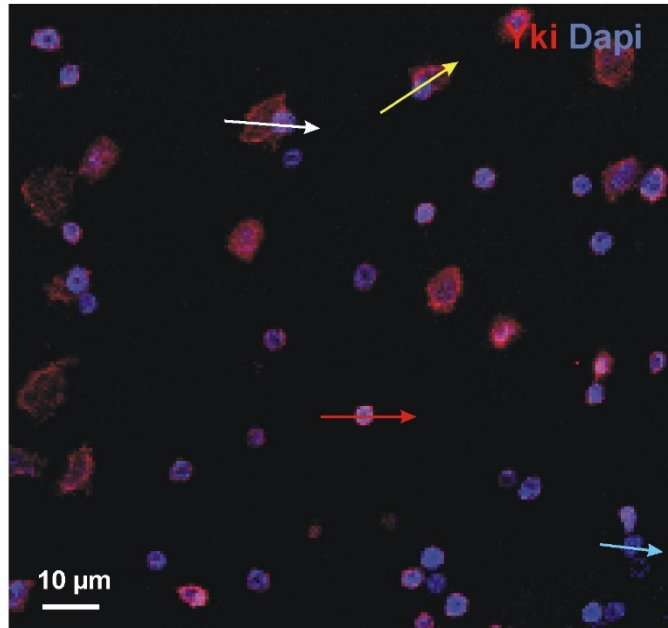
Lane 4: the nitrocellulose membrane of lane 2 was incubated with preimmune serum (negative control).

Additional file 6: Anti-Yorkie immunoreactivity in the *C. hemisphaerica* sub-umbrellar epidermis.

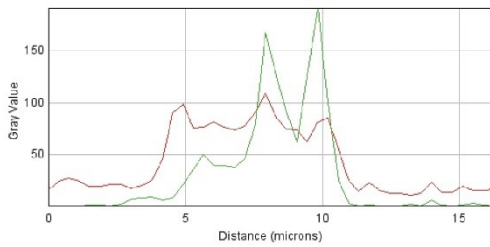
The three pictures are focused on the sub-umbrella. *rad can*: radial canal; *tent*: tentacle (superimposed). (A) and (B) are conventional epifluorescence microscopy views; (C) is a confocal section.



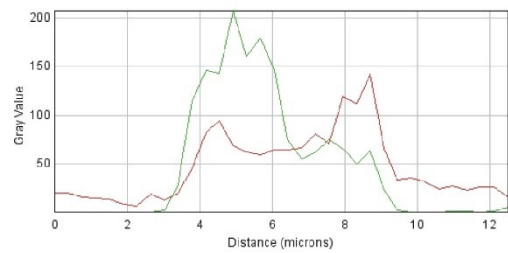
Additional file 7: Anti-Yorkie immunoreactivity in the *C. hemisphaerica* manubrium. Confocal section in the manubrium epidermis, with graphs of Dapi and anti-Yorkie immunofluorescence according to the four coloured arrows on the picture.



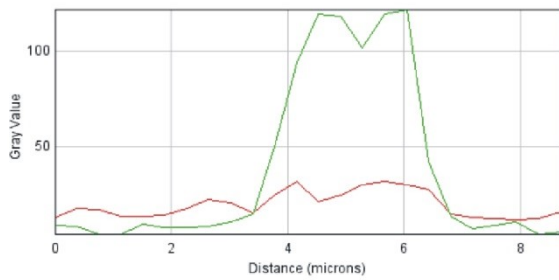
— anti-Yorkie
— Dapi



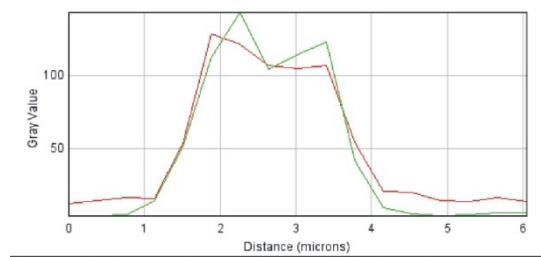
White arrow:
Yorkie in cytoplasm and nucleus



Yellow arrow:
Yorkie in cytoplasm and nucleus



Blue arrow:
Cell without anti-Yorkie signal



Red arrow:
Yorkie only in nucleus